



Аналитические возможности жидкостного хроматографа МаэстроВЭЖХ с амперометрическим детектором на примере определения катехоламинов в плазме крови

Яшин А. Я. к. х. н., ведущий инженер отдела исследований и разработок, ООО Интерлаб, Россия, Москва

Ключевые слова

Жидкостная хроматография, катехоламины, плазма крови, амперометрический детектор

Резюме

Показаны аналитические возможности МаэстроВЭЖХ для определения катехоламинов. Представлены примеры определения катехоламинов в плазме крови.

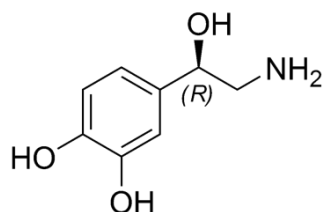
Введение

Катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) – это группа сходных гормонов, вырабатываемых мозговым веществом надпочечников, они являются важнейшими нейротрансмиттерами. Катехоламины выбрасываются в кровь в ответ на физический или эмоциональный стресс и участвуют в передаче нервных импульсов в мозг, способствуют высвобождению глюкозы и жирных кислот в качестве источников энергии. При расстройствах функций мозга, заболеваниях ЦНС значительно увеличивается содержание катехоламинов в различных биологических жидкостях, например, крови, моче. У больных с феохромоцитомой концентрация катехоламинов в крови увеличивается в 10 – 100 раз. При гипертонической болезни содержание катехоламинов в крови находится на верхней границе нормы или увеличено в 1,5 – 2 раза. Поэтому исключительно важно осуществлять контроль концентраций катехоламинов, что является важным этапом дифференциальной диагностики артериальной гипертензии, мониторинга опухолей надпочечников.

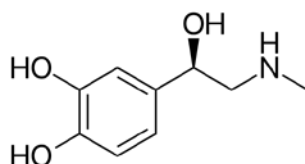
Обычно в качестве объекта анализа для скрининга катехоламинов выбирается моча, так как известно, что в крови содержание катехоламинов на 2 – 3 порядка ниже, чем в моче. Однако в некоторых случаях (для оценки локализации опухоли, при проведении фармакологических тестов, при сомнительных результатах анализа мочи и т.д.) применяют исследование катехоламинов плазмы. Также следует учитывать, что определение катехоламинов в моче может быть недостаточно информативно, если у пациента наблюдается нарушение функции почек.

Низкие концентрации катехоламинов в биологических объектах (в моче на уровне мкг/сут, а в плазме крови – пг/мл) требуют применения современных высокочувствительных и селективных методов анализа. Наиболее распространен метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием. Высокочувствительное амперометрическое детектирование позволяет добиться необходимых пределов обнаружения для катехоламинов в моче и, особенно, в плазме крови.

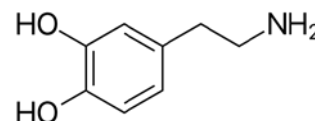
С учетом простоты, хорошей воспроизводимости и достаточной чувствительности предлагаемый метод и прибор МаэстроВЭЖХ с амперометрическим детектором может быть использован в клинической лабораторной практике для диагностики феохромоцитом.



Норадреналин



Адреналин



Дофамин

Экспериментальная часть

Для анализа использовали чистые вещества фирмы Sigma-Aldrich:

Норадреналин (стандарт, не менее 99%)

Адреналин (стандарт, не менее 99%)

Дофамин (стандарт, не менее 99%)

Ацетонитрил для ВЭЖХ;

Октилсульфат натрия для ион-парной хроматографии

Инструменты:

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с амперометрическим детектором

Напряжение на рабочем электроде: +1,3В

Колонка Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 2 мм

Скорость потока 0,5 мл/мин

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – Октилсульфат натрия $8 \cdot 10^{-3}$ М (рН 3, H₃PO₄), А:В (18:82)

Колонка GL WAKOSIL C18AR 5мкм, 4x150 мм

Скорость потока 1 мл/мин

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – Октилсульфат натрия $1 \cdot 10^{-3}$ М, 50мМ КН₂РО₄ (рН 3, H₃PO₄), А:В (10:90)

Результаты и обсуждения

Метод ион-парной ВЭЖХ позволяет одновременно определять все исследуемые катехоламины. Порядок элюирования определяется различным сродством аналитов к подвижной и неподвижной фазе и обусловлен в большей степени двумя факторами – собственной гидрофобностью аналитов и повышение гидрофобности за счет образования ионных пар с октилсульфатом натрия.

Для разделения катехоламинов были испытаны две колонки: Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 2 мм и GL WAKOSIL C18AR 5мкм, 4x150 мм

Типичная хроматограмма стандартной смеси катехоламинов на колонке Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 2 мм

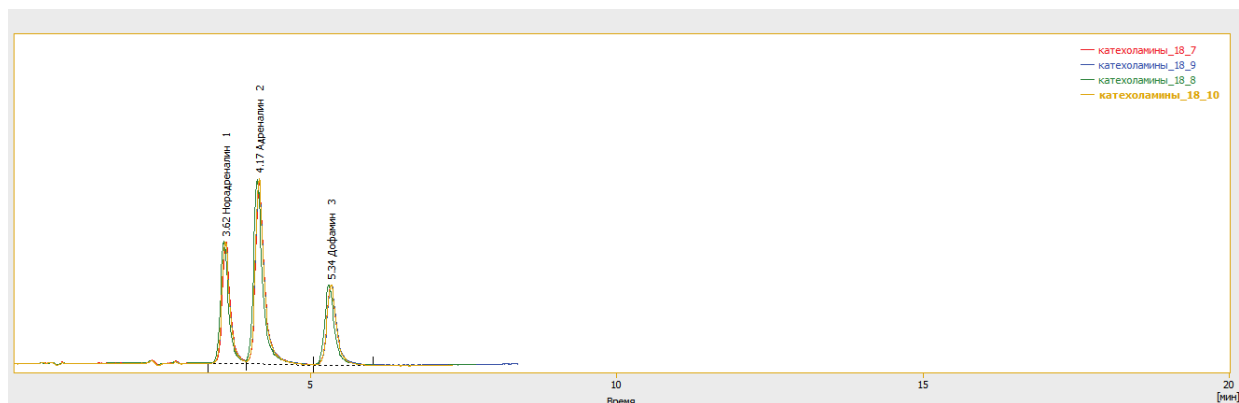


Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Норадреналин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]
Среднее значение	3.61	5195.6598	552.9118
СКО %	0.36	0.56	0.34
1	3.625	5154.732	550.532
2	3.618	5195.872	552.39
3	3.618	5214.01	554.655
4	3.595	5218.025	554.07

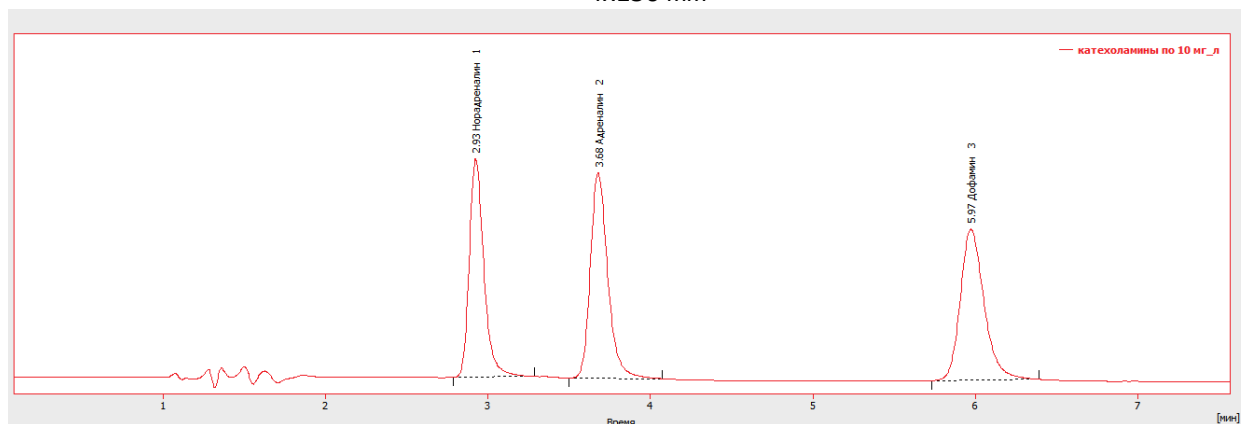
Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Адреналин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]
Среднее значение	4.16	8856.9138	837.6818
СКО %	0.38	0.89	0.75
1	4.172	8744.47	828.689
2	4.168	8870.622	839.583
3	4.138	8884.682	839.226
4	4.169	8927.881	843.229

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Дофамин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]
Среднее значение	5.33	4094.3158	362.4063
СКО %	0.32	0.70	0.44
1	5.342	4057.511	360.463
2	5.309	4090.539	362.521
3	5.345	4102.853	362.278
4	5.343	4126.36	364.363

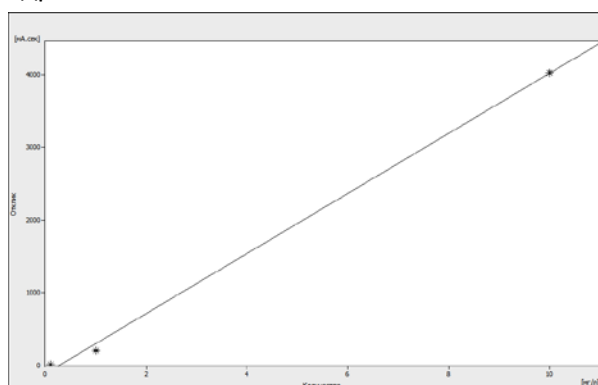
Типичная хроматограмма стандартной смеси катехоламинов на колонке GL WAKOSIL C18AR 5мкм, 4x150 мм



В дальнейшем, для определения катехоламинов в плазме крови применялась колонка GL WAKOSIL C18AR 5мкм, 4x150 мм, т.к. она показала лучшую степень разделения между компонентами.

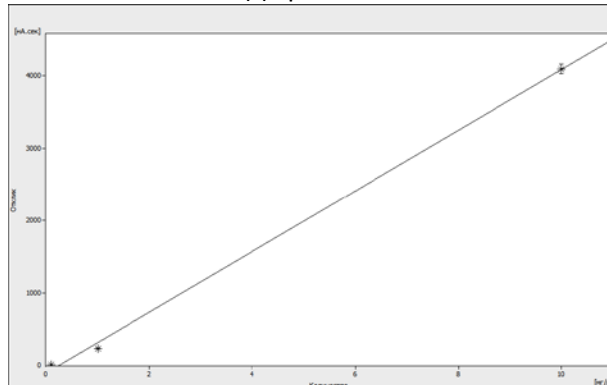
Для определения катехоламинов были построены градуировочные графики:

Адреналин



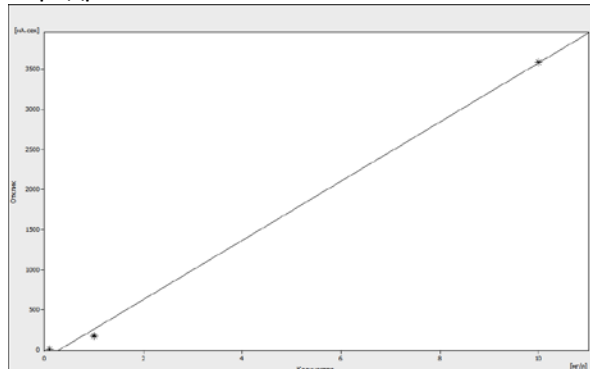
Уравнение: $Y = 412.76386 * X - 110.4907$
Коэффициент корреляции: 0.9991708

Дофамин



Уравнение: $Y = 419.3882 * X - 106.45937$
Коэффициент корреляции: 0.9994214

Норадреналин

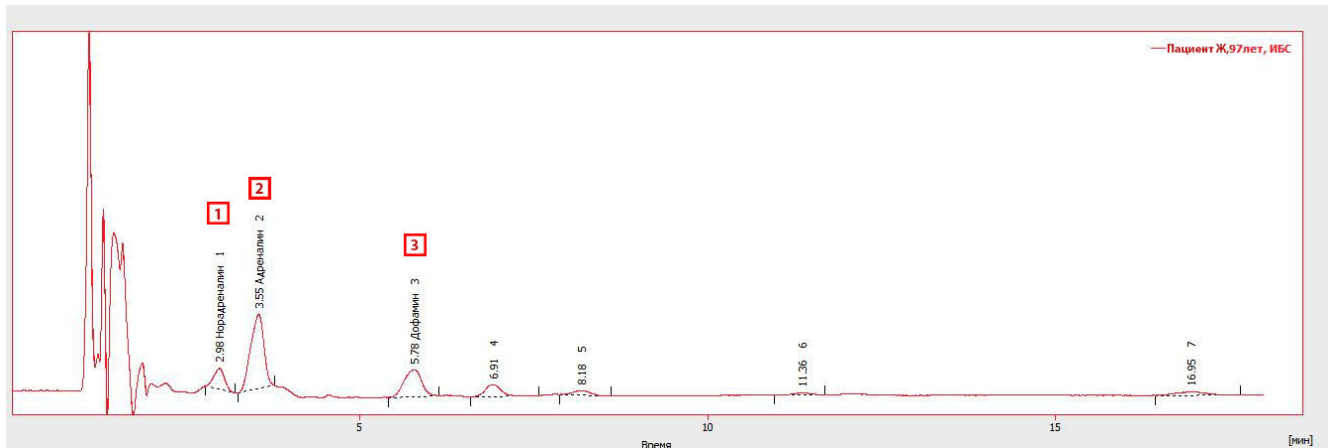


Уравнение: $Y = 368.56314 * X - 106.92975$
Коэффициент корреляции: 0.9992206

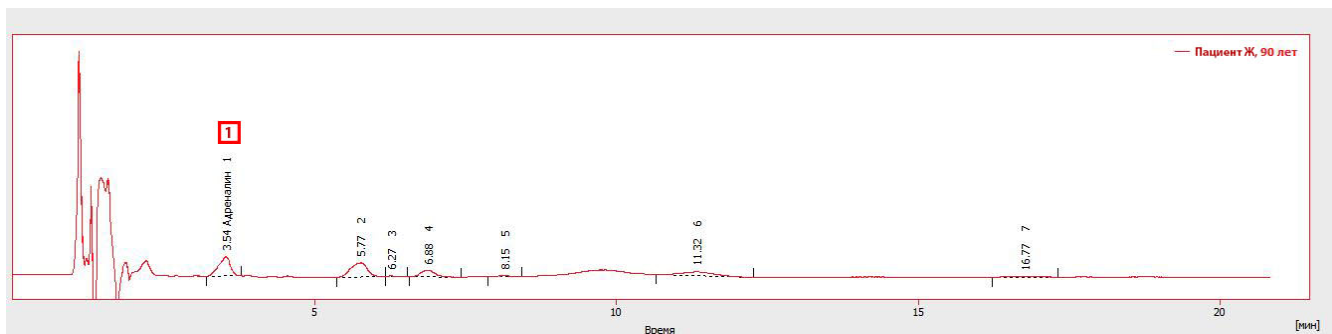
Расчетные пределы детектирования составили: **для норадреналина $1,7 \cdot 10^{-10}$ г/мл, для адреналина $1,3 \cdot 10^{-10}$ г/мл и для дофамина $1,4 \cdot 10^{-10}$ г/мл.**

Пробоподготовка заключалась в твердофазной экстракции (ТФЭ) на полимерном сорбенте на основе сильного сульфь-катионита согласно работе [1].

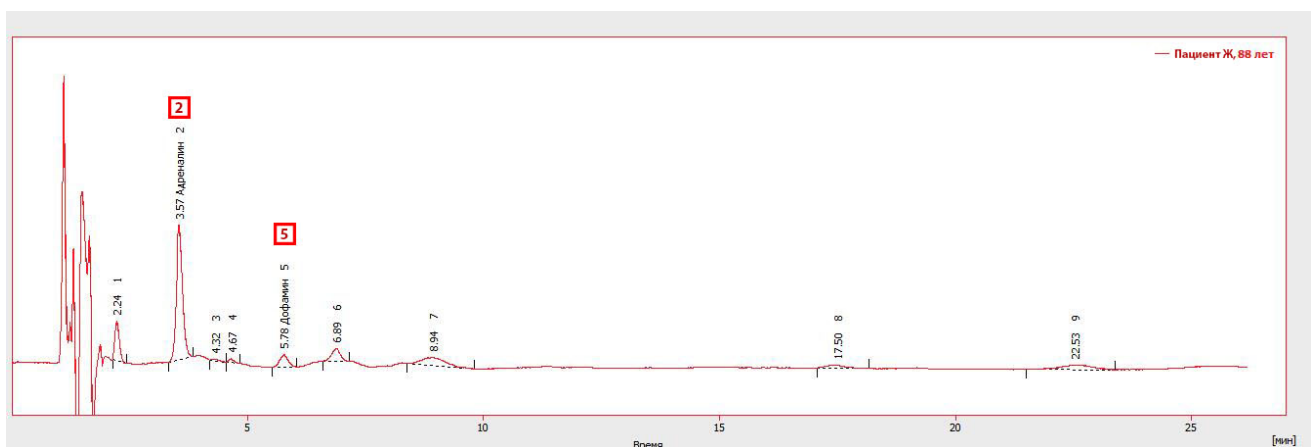
Ниже представлены хроматограммы определения катехоламинов в плазме крови пациентов – долгожителей. Исследования проводились с целью оценки эндокринных причин повышения артериального давления, а также мониторинга катехоламин - секретирующих опухолей – феохромоцитом, параганглиом, нейробластом.



	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мг/л]	Название вещества
1	2.98	108.17	9.915	0.584	Норадреналин
2	3.546	462.866	35.063	1.389	Адреналин
3	5.779	221.578	12.652	0.782	Дофамин



	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мг/л]	Название вещества
1	3.539	200.971	14.819	0.755	Адреналин



	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мг/л]	Название вещества
2	3.565	385.799	42.328	1.202	Адреналин
5	5.779	49.522	3.916	0.372	Дофамин

Для справки приводим референсные значения содержания катехоламинов в плазме крови [2] для здоровых взрослых (сидя, 20-30 минут покоя):

Адреналин – менее 88 мкг/л

Норадреналин – 104 – 548 мкг/л

Дофамин – менее 136 мкг/л

Как видно из представленных данных, определение катехоламинов с помощью жидкостного хроматографа МаэстроВЭЖХ и амперометрического детектора дает однозначную информацию о их содержании в анализируемом образце, что в свою очередь, позволит врачу точно поставить диагноз пациенту.

Выводы

Жидкостный хроматограф МаэстроВЭЖХ с амперометрическим детектором может быть использован в клинической лабораторной практике медицинскими диагностическими лабораториями для мониторинга опухолей надпочечников.

Литература

1. Сидорова А.А., Карцова Л.А. Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. Вып. 6. С.774-782.
2. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. - Т. I. / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 928 с.