



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

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

Ключевые слова

Жидкостная хроматография, гомоцистеин, плазма крови, амперометрический детектор

Резюме

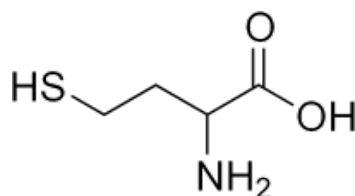
Показаны аналитические возможности МаэстроВЭЖХ для определения гомоцистеина. Представлены примеры определения гомоцистеина в плазме крови.

Введение

Гомоцистеин представляет собой серосодержащую аминокислоту, которая обычно присутствует в очень небольших количествах во всех клетках организма. Эта аминокислота является продуктом метаболизма метионина. Метионин - это одна из незаменимых аминокислот, которые поступают из пищи, так как организм не может их производить. В здоровых клетках гомоцистеин быстро преобразуется в другие вещества. Однако в случае ряда заболеваний гомоцистеин накапливается в организме. Исследованиями в течение последних 30 лет установлено, что гомоцистеин является независимым фактором риска сердечно – сосудистых заболеваний — инфаркта миокарда, инсульта и венозной тромбоэмболии, атеросклероза. По данным многочисленных клинических исследований известно, что увеличение концентрации гомоцистеина в плазме крови на 5 мкмоль/л увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний и общей смертности в 1,3 - 1,7 раза. По некоторым оценкам, если бы удалось снизить уровень гомоцистеина на 40%, то это привело бы к сохранению 8 лет жизни для мужчин и 4 лет жизни для женщин. В норме содержание гомоцистеина 8-11 мкмоль/л, с возрастом содержание его незначительно возрастает. При увеличении до 30 мкмоль/л опасность для жизни в 100 раз больше, чем повышенное содержание холестерина, а смертельно опасное содержание >50 мкмоль/л. Поэтому крайне важно внедрение мониторинга концентрации гомоцистеина в широкую клиническую практику.

Для определения в плазме гомоцистеина существует ряд методов, такие, как анализ с применением анализатора аминокислот, радиоэнзимные методы, флуориметрические, а также самый востребованный метод - ВЭЖХ. В случае применения ВЭЖХ, в качестве детектирующих систем используют спектрофотометрические, флуоресцентные и амперометрические детекторы. При применении первых двух гомоцистеин необходимо предварительно химически дериватизировать в соответствующие производные. Амперометрический детектор определяет гомоцистеин напрямую без дериватизации, что сильно повышает точность анализа, а также удешевляет его.

С учетом простоты, хорошей воспроизводимости и достаточной чувствительности предлагаемый метод и прибор МаэстроВЭЖХ с амперометрическим детектором может быть использован в клинической лабораторной практике для надежного мониторинга гомоцистеина в плазме крови.



Гомоцистеин

Экспериментальная часть

Для анализа использовали чистые вещества фирмы Sigma-Aldrich:

Гомоцистеин (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 5 мМ, 10мМ КН₂РО₄ (рН 3, НЗРО₄), А:В (10:90)

Результаты и обсуждения

Добавление в элюент ион-парного модификатора позволяет увеличить время удерживания гомоцистеина за счет образования ионных пар с октилсульфатом натрия (ион-парная добавка). Варьируя содержание октилсульфата натрия, а также ацетонитрила, можно добиться нужного времени удерживания гомоцистеина таким образом, чтобы сопутствующие примеси не мешали определению гомоцистеина.

Хроматограмма стандартной раствора гомоцистеина (2,5 мкМ/л) на колонке Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 2 мм, элюент: А – Ацетонитрил : В - Октилсульфат натрия 5 мМ, 10мМ КН₂РО₄ (рН 3, НЗРО₄), А:В (12:88)

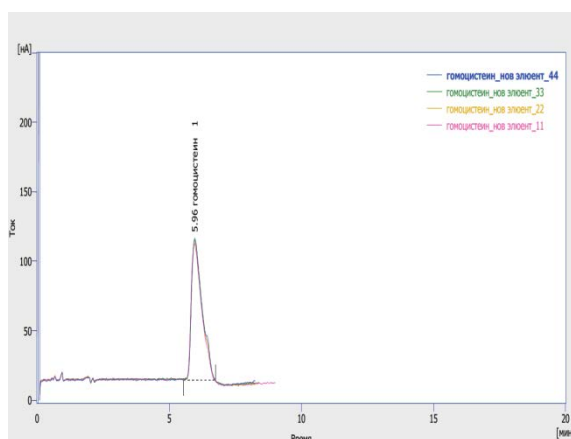
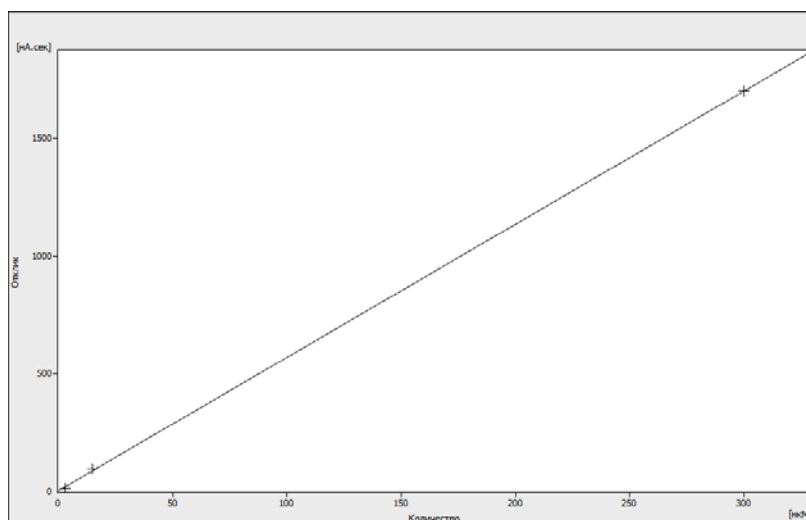


Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Гомоцистеин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]
Среднее значение	5.962	2853.947	100.211
СКО %	0.11	0.35	1.38
1	5.956	2856.993	102.007
2	5.965	2839.455	100.459
3	5.969	2857.393	99.631
4	5.956	2861.945	98.749

Для определения гомоцистеина в плазме был построен градуировочный график:



Уравнение: $Y = 5.65304 * X + 4.85104$

Коэффициент корреляции: 0.9999541

Расчетный предел детектирования гомоцистеина составил: **4,2 нМ/литр.**

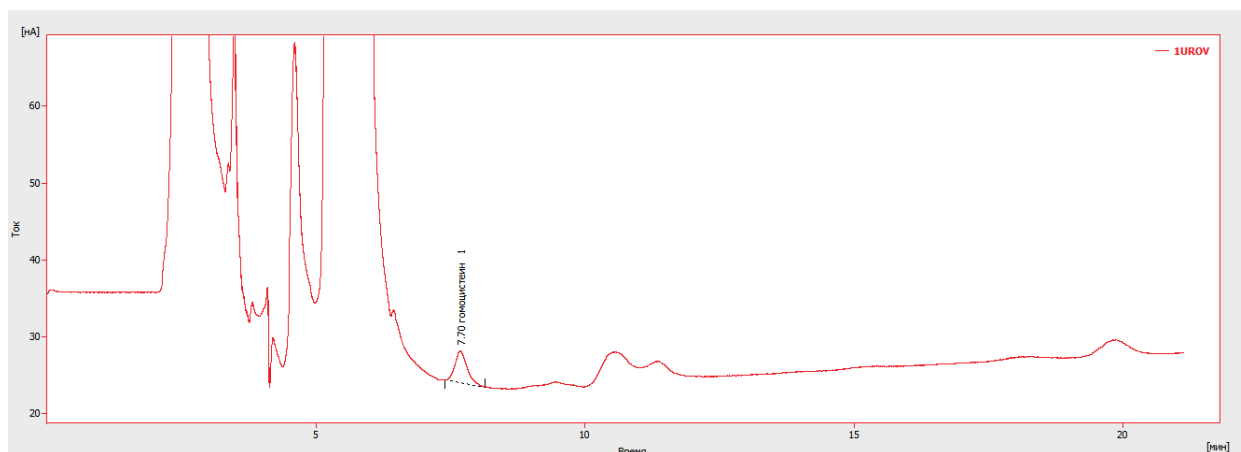
В плазме крови гомоцистеин находится в основном в связанном состоянии, поэтому необходима процедура восстановления проб. Пробоподготовка заключалась в осаждении белков, добавлением специального восстанавливающего реактива к полученной плазме и последующим фильтрованием через PTFE 0.45 мкм фильтр – насадку.

Контроль правильности методики анализа проводился методом “введено-найдено” путем сравнения результатов измерений введенных известных концентраций контрольного раствора гомоцистеина "Liquichek", 2 уровня концентрации.

Ниже представлены хроматограммы определения гомоцистеина в контрольном образце "Liquichek" (БиоРад): Уровень 1 (8,3 - 14,9) мкМ, Уровень 2 (25 - 37) мкМ.

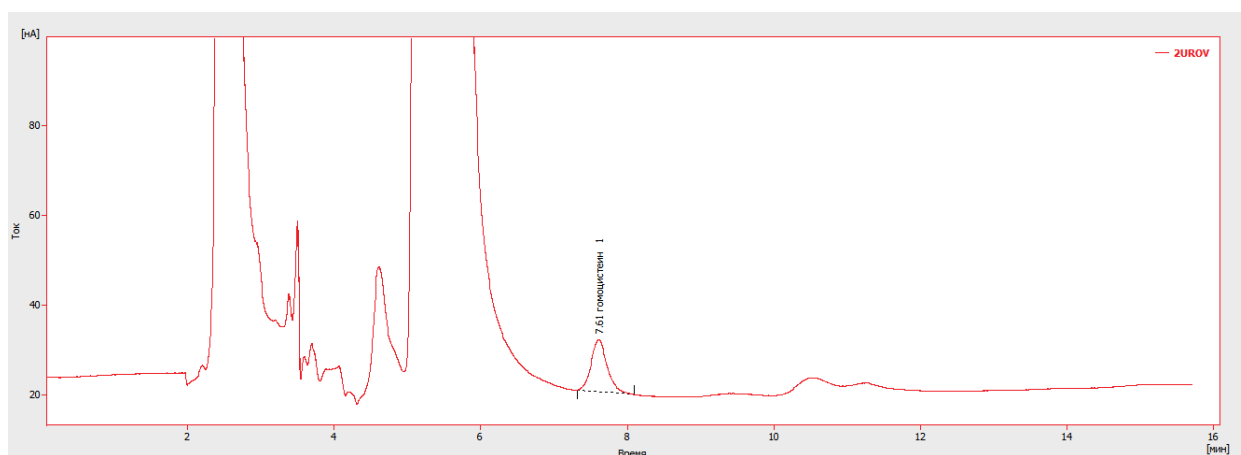
Для определения гомоцистеина в плазме применялся элюент: А – Ацетонитрил : В - Октилсульфат натрия 5 мМ, 10мМ КН₂РО₄ (рН 3, Н₃РО₄), А:В (10:90).

1 уровень



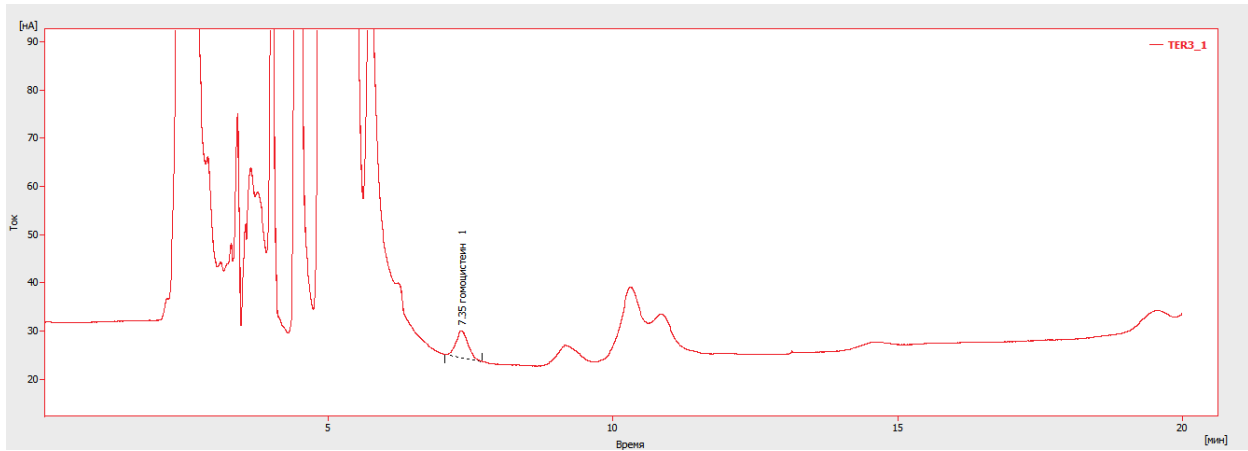
	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мкМ]	Название вещества
1	7.695	65.502	4.096	10.729	гомоцистеин

2 уровень

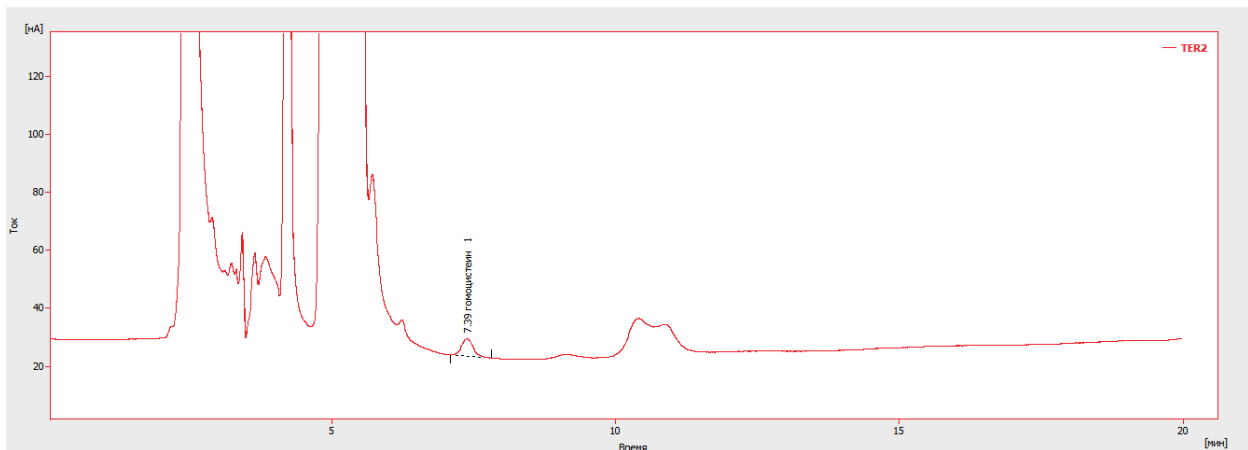


	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мкМ]	Название вещества
1	7.613	177.105	11.543	30.471	гомоцистеин

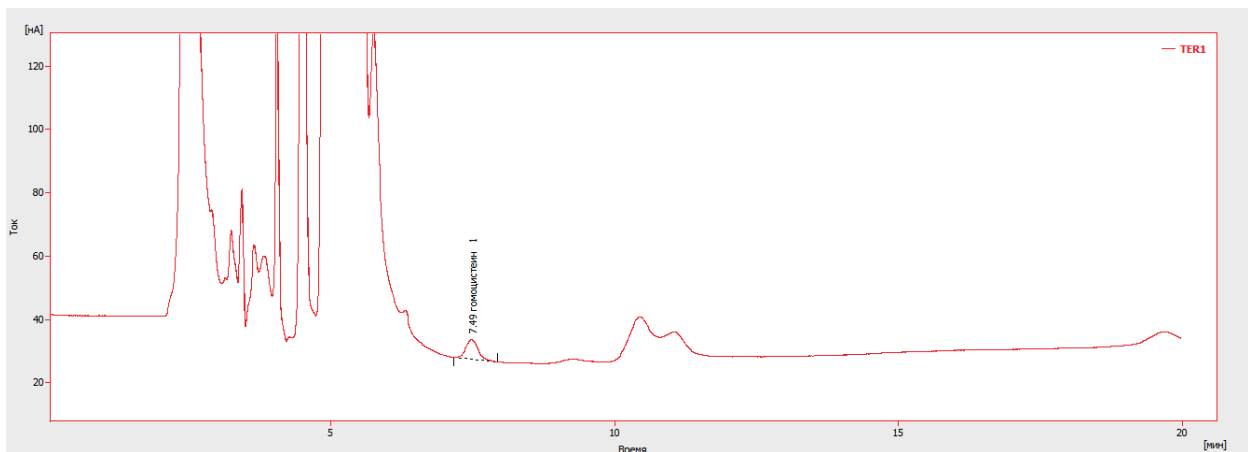
Ниже представлены хроматограммы определения гомоцистеина в плазме крови пациентов.



	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мкМ]	Название вещества
1	7.35	82.954	5.632	13.816	гомоцистеин



	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мкМ]	Название вещества
1	7.386	84.941	6.059	14.168	гомоцистеин



	Время уд. [мин]	Площадь [нА.сек]	Высота [нА]	Количество [мкМ]	Название вещества
1	7.486	93.431	6.225	15.669	гомоцистеин

Как видно из представленных данных, определение гомоцистеина с помощью жидкостного хроматографа МаэстроВЭЖХ и амперометрического детектора дает однозначную информацию о его содержании в анализируемом образце, что в свою очередь, позволит врачу точно поставить диагноз пациенту и принять меры, в случае необходимости, к снижению уровня гомоцистеина.

Выводы

Жидкостный хроматограф МаэстроВЭЖХ с амперометрическим детектором может быть использован в клинической лабораторной практике медицинскими диагностическими лабораториями для мониторинга гомоцистеина в плазме крови.