



УДК 543.54

Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови

Сидорова А.А.

*Санкт-Петербургский государственный политехнический университет
ЦКП «Аналитическая спектроскопия», Санкт-Петербург*

Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 9.11.2009 г.

Аннотация

Описаны различные процедуры пробоподготовки биологических объектов (мочи и плазмы крови), включающие твердофазную экстракцию с использованием оксида алюминия и сильного катионита, позволяющие с высокими степенями экстракции (~ 90%) извлекать катехоламины, метанефрины и 3,4-дигидроксифенилаланин. Проведена сравнительная оценка методов капиллярного зонного электрофореза с УФ-детектированием и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием при исследовании содержания катехоламинов и метанефринов в моче и плазме крови.

Ключевые слова: катехоламины, метанефрины, 3,4 дигидроксифенилаланин, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, твердофазная экстракция

Various procedures of sample preparation of biological objects (urine and blood plasma), including SPE with aluminum oxide and strong cation exchange sorbent were investigated. The efficiency of catecholamines, metanephines and 3,4-dihydroxyphenylalanine extraction was 90%. The capillary zone electrophoresis with UV detection and reversed-phase high performance liquid chromatography with amperometric detection were compared for catecholamines and metanephines analysis in urine and blood plasma.

Keywords: catecholamines, methanephine, 3,4-dihydroxyphenylalanine, HPLC, capillary electrophoresis, solid-phase extraction

Введение

Катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) и их метаболиты (метанефрин, норметанефрин) являются важнейшими нейротрансмиттерами [1 – 3]. Они участвуют в обменных и энергетических процессах, осуществляя передачу импульсов возбуждения и торможения нервной системы. При расстройствах функций мозга, заболеваниях ЦНС значительно увеличивается содержание катехоламинов в различных биологических объектах: спинномозговой жидкости, крови, моче, структурах мозга [1, 2].

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. Контроль концентрации катехоламинов и их метаболитов является важным этапом дифференциальной диагностики артериальной гипертензии, мониторинга опухолей надпочечников и нервной ткани (феохромоцитом и нейробластом) [1, 3].

Катехоламины образуются в организме в результате декарбоксилирования небелковых аминокислот. Из 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) синтезируется дофамин. Он является одновременно предшественником адреналина и норадреналина, которые, в свою очередь, продуцируют метанефрины (Рис. 1) [2, 3]. Нарушение метаболизма дофамина является основной причиной болезни Паркинсона, для лечения которой применяется препарат на основе 3,4-дигидроксифенилаланина (*L*-ДОФА).

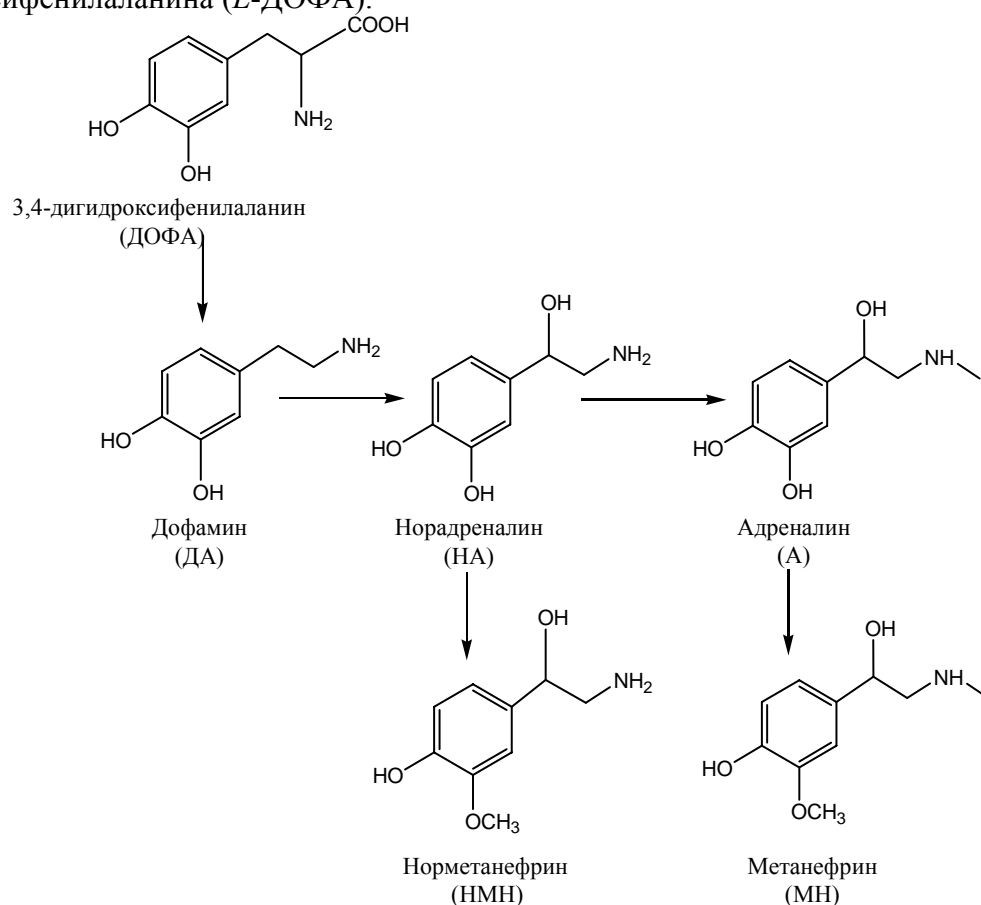


Рис. 1. Схема синтеза катехоламинов и их метаболитов в организме

Сходство химической структуры катехоламинов (КА) и метанефринов (Рис. 1), а также их низкие концентрации 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 (ОФ ВЭЖХ) с амперометрическим детектированием [2 — 10]. Для этой задачи может быть также использован метод капиллярного электрофореза со спектрофотометрическим детектированием (КЭ-УФ), однако из-за недостаточной чувствительности УФ-детектора требуется применение различных вариантов концентрирования [3 — 5, 8 —

10]. Ранее нами были описаны возможности метода КЭ-УФ с *on-line* и *off-line* концентрированием для определения катехоламинов в моче [8 – 12].

В связи с многокомпонентностью биологической матрицы и низкими концентрациями катехоламинов особой задачей является грамотная стратегия подготовки пробы к анализу. В [1–5, 7, 13] описаны различные варианты жидкостной и твердофазной экстракции катехоламинов из биологических жидкостей.

В зависимости от объекта исследования (моча или плазма крови) процедура экстракции значительно меняется. В крови содержание катехоламинов на 2 – 3 порядка ниже, чем в моче, соответственно концентрирование требуется в большей степени.

В данной работе рассматриваются возможности одновременного определения катехоламинов (адреналин, норадреналин, дофамин), их предшественника (3,4-дигидроксифенилаланина) и метаболитов (метанефрин, норметанефрин) в моче и плазме крови. Описаны различные процедуры пробоподготовки, включающие твердофазную экстракцию (ТФЭ) с использованием оксида алюминия и сильного катионита, позволяющие с высокими степенями экстракции (~ 90%) извлекать определяемые компоненты. Проведена сравнительная оценка методов капиллярного зонного электрофореза с УФ-детектированием (КЗЭ-УФ) и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием (ОФ ВЭЖХ-АД) при исследовании содержания катехоламинов и метанефринов в моче и плазме крови. Указаны их достоинства и ограничения при решении этой задачи.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Работа выполнялась на жидкостном хроматографе *Waters 590* с амперометрическим детектором (НПО «Химавтоматика») (материал рабочего электрода – стеклоуглерод), колонка *Ascentic C18* (5 мкм, 4,6 x 250 мм). Электрофоретическое определение проводилось на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105» (ООО «НПФ Люмэкс») со спектрофотометрическим детектором, немодифицированный кварцевый капилляр общая длина – 60см, эффективная длина – 50см, внутренний диаметр – 50мкм. Для проведения пробоподготовки использовалась система *Supelco Preppy* с мембранным насосом *KNF Laboport*.

Реагенты. Для приготовления буферного электролита, подвижной фазы и проведения пробоподготовки использовались: ледяная уксусная кислота (х.ч.), триэтанолламин (ТЭА) (х.ч.), соляная кислота, конц. (х.ч.), гидроксид натрия (х.ч.), аммиак водный (х.ч.), октилсульфонат натрия (*Sigma*), ацетонитрил (для ВЭЖХ, *Merck*), хлоруксусная кислота (*Sigma*), дигидрофосфат натрия (*Sigma*), карбонат натрия (*Sigma*), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (*Sigma*), оксид алюминия (кисл.) (*Sigma*), патроны для твердофазной экстракции *Supelco DSC-SCX SPE* и бидистиллированная вода, полученная с помощью системы «Водолей» (НПП «Химэлектроника»).

Стандартные вещества: адреналин (А), дофамин (ДА), норадреналин (НА), 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), метанефрин (МН) и норметанефрин (НМН) (*Sigma-Aldrich*).

Растворы катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина (5 г/л) готовили растворением точных навесок каждого стандарта (5 мг) в 1 мл 0,1

моль/л соляной кислоты в пробирках Эппендорфа и хранили при -20°C в течение месяца.

Пробоотбор биологического материала. Содержание катехоламинов в крови повышается под влиянием многих факторов, в том числе в результате стресса и физических нагрузок, поэтому очень важен правильный пробоотбор.

Получение плазмы крови. Проба отбиралась в вакутейнер с ЭДТА для предотвращения окисления катехоламинов. Плазма отделялась центрифугированием в течение 15 мин после взятия пробы и затем немедленно замораживалась при -20°C в пластиковых сосудах.

Сбор мочи. Мочу собирали в течение 24 ч в контейнер с добавлением консерванта (10 мл 6 н HCl).

Результаты и их обсуждение

Пробоподготовка биологических образцов

Твердофазная экстракция (ТФЭ) с использованием оксида алюминия. Процедура пробоподготовки основана на ранее описанной нами методике ТФЭ [4, 8, 10] с некоторыми модификациями (Табл. 1, Рис. 2).

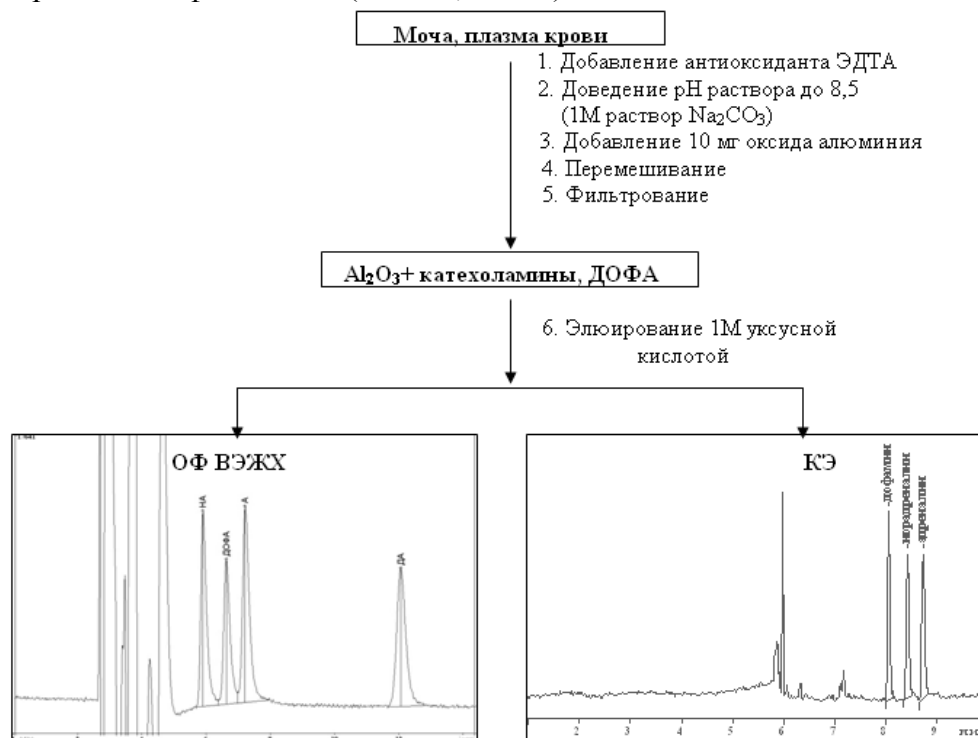


Рис. 2. Схема твердофазной экстракции катехоламинов и ДОФА из биологической жидкости с использованием сорбента Al_2O_3

Таблица 1. Объемы биологических жидкостей и элюирующих растворов, необходимые при проведении ТФЭ с использованием Al_2O_3

Объект	Метод анализа	Объем пробы, мл	Объем элюирующей жидкости, мл
Моча	ВЭЖХ-АД	5	1
Моча	КЭ-УФ	15	0,2
Плазма крови	ВЭЖХ-АД	5	0,15

К образцу мочи / плазмы крови (Табл. 1) добавляли 400 мкл ЭДТА (50 мМ) в качестве антиоксиданта, затем 1 М раствором карбоната натрия доводили рН образца до 8,5 и быстро вносили прокаленный оксид алюминия (10 мг), перемешивали 2 мин и отфильтровывали с использованием системы *Preppy* с мембранным насосом. Сорбент промывали дистиллированной водой (2 × 1 мл) и элюировали аналиты 1М раствором уксусной кислоты (Рис. 2).

ТФЭ с использованием картриджа DSC-SCX

Сорбент *DSC-SCX* представляет собой сильный сульфо-катионит. Наличие протонированных аминогрупп в молекулах определяемых соединений обеспечивает высокую степень их сорбции.

Подкисленный соляной кислотой образец мочи или плазмы крови объемом 5 мл пропускали через предварительно кондиционированный ацетонитрилом и водой патрон *DSC-SCX*, который далее промывали водой (2 × 1мл) и экстрагировали катехоламины, метанефрины и ДОФА 1 мл 10%-ого раствора аммиака в ацетонитриле. Элюат высушивали в токе азота и перерастворяли в воде (Рис. 3).

Из-за необходимой стадии выпаривания пробоподготовка с использованием патрона *DSC-SCX* занимает большее время, чем экстракция на оксиде алюминия. Однако, одновременное извлечение всех шести определяемых компонентов возможно только на катионообменном сорбенте. Сорбция же на оксиде алюминия происходит с участием катехольного ядра в молекулах аналитов, т.е. этот вариант может быть использован для экстракции лишь четырех компонентов: А, НА, ДА и ДОФА. В Табл. 2. представлены сравнительные характеристики обоих вариантов экстракции.

Таблица 2. Сравнительные характеристики экстракционных патронов с различными сорбентами

Параметры \ Сорбент	Al ₂ O ₃	<i>DSC-SCX</i>
Время пробоподготовки	5 мин	15 мин
Степень экстракции	85 ± 5%	96 ± 3%
Экстрагируемые компоненты	А, НА, ДА, ДОФА	А, НА, ДА, ДОФА, МН, НМН

Хроматографическое и электрофоретическое определение аналитов

ОФ ВЭЖХ с амперометрическим детектированием

Анализ выполнялся при окислительном потенциале рабочего электрода + 0,85 В (найденное экспериментально оптимальное значение). Состав подвижной фазы: 70 мМ дигидрофосфат натрия, 1,5 мМ октилсульфонат натрия, 40 мМ хлоруксусная кислота, ацетонитрил. Объем вводимого образца составил 100 мкл. Равновесие в колонке устанавливается медленно из-за сложного состава подвижной фазы и наличия в ней ион-парного агента. Кондиционирование колонки и электрода в начале рабочего дня занимает 30 – 40 мин.

Чувствительность амперометрического детектирования и большой объем вводимого образца (100 мкл) позволили добиться необходимых пределов обнаружения для катехоламинов и их метаболитов в моче и плазме крови (Рис. 4).

Для плазмы крови дополнительный вклад дает фактор *off-line* концентрирования равный 9 ± 2, лимитирующим условием в данном случае является объем плазмы (не более 5 мл).

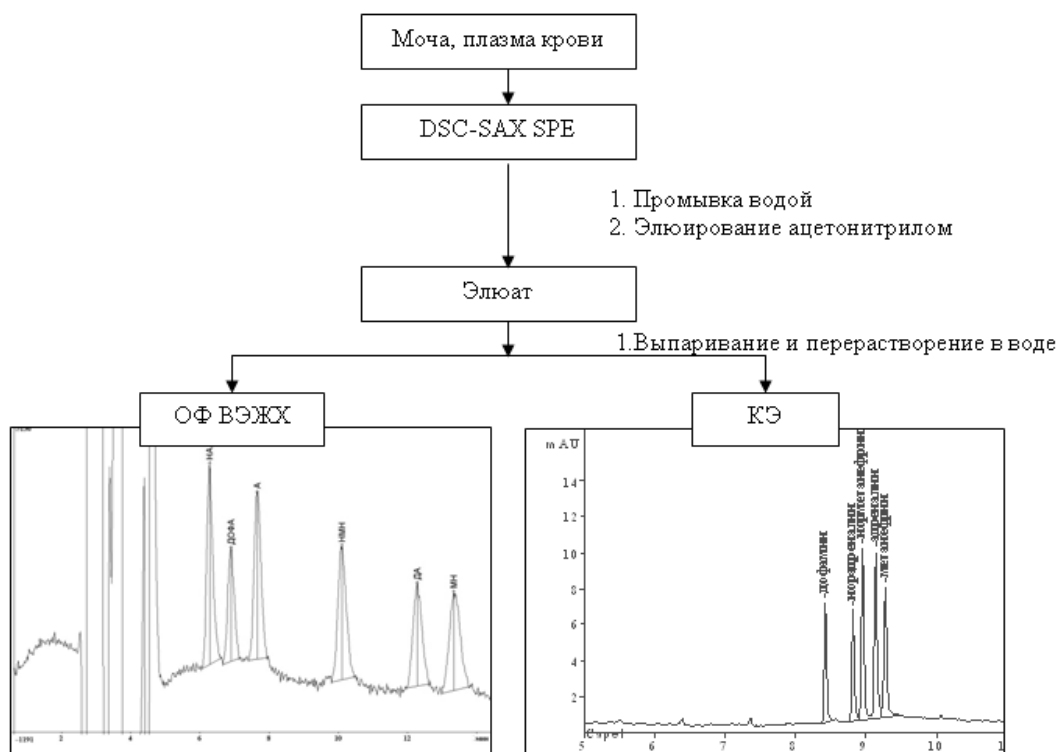


Рис. 3. Схема твердофазной экстракции катехоламинов, ДОФА и метанефринов из биологической жидкости с использованием патрона DSC-SCX

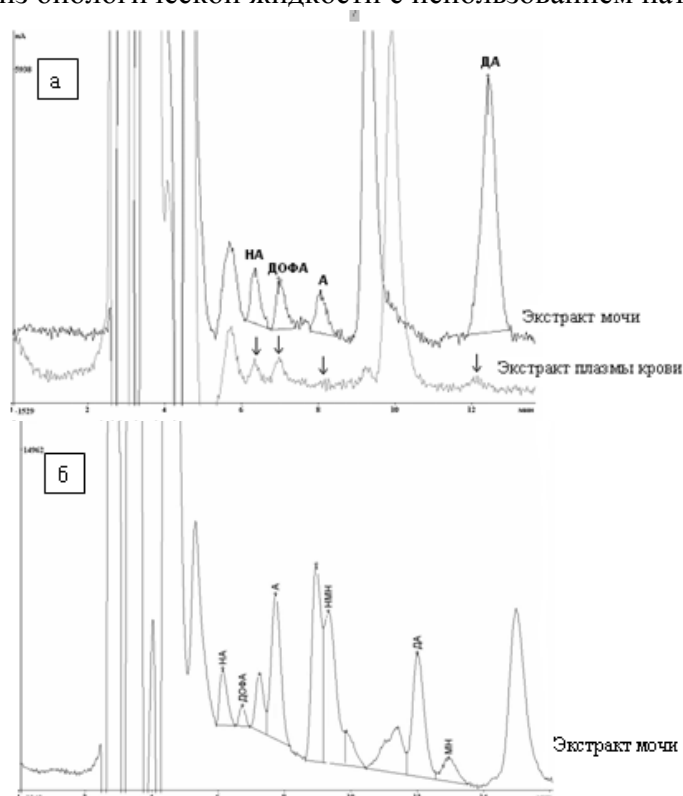


Рис. 4. Хроматограмма экстракта мочи и плазмы крови при различных вариантах ТФЭ: (а) сорбент Al_2O_3 , (б) картридж DSC-SCX. Прибор: Waters 590 с амперометрическим детектированием, напряжение на рабочем электроде +0,85 В), колонка Ascentic C18 (5 мкм, 4,6 x 250 мм). Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, объем пробы 100 мкл.

Воспроизводимость по площадям пиков и временам удерживания ~ 4 – 6% и 0,5 – 1,5 %, соответственно.

Метод ион-парной ВЭЖХ позволяет одновременно определять все исследуемые амины. Порядок элюирования определяется различным сродством аналитов к подвижной и неподвижной фазе: норадреналин (НА), 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), адреналин (А), норметанефрин (НМН), дофамин (ДА), метанефрин (МН). Он обусловлен в значительной степени двумя факторами – собственная гидрофобность аналитов (наибольшая – у метанефринов) и повышение гидрофобности за счет образования ионных пар с октилсульфонатом натрия (наиболее стабильную ионную пару образует дофамин).

В зависимости от выбранного варианта ТФЭ методом ВЭЖХ-АД в моче и плазме крови можно определять одновременно катехоламины и ДОФА, либо катехоламины, метанефрины и ДОФА. Выбор определяется конкретной задачей диагностики той или иной патологии.

Капиллярный зонный электрофорез с УФ- детектированием

Результаты разделения и определения катехоламинов и их основных метаболитов описаны нами ранее [9, 11]. Состав рабочего электролита: 0,175 М уксусная кислота, 30 мМ триэтанолламин (рН 3.2), температура стабилизации кассеты 25⁰С.

Определение катехоламинов и метанефринов осуществлялось при положительной полярности, но 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА) в этих условиях зарегистрировать не удалось, поскольку при рН рабочего электролита 3.2 он находится в виде аниона (рКа 2,32).

В режиме КЭ-УФ были получены достаточно высокие степени воспроизводимости по площади пика и времени миграции аналитов сравнимые с ВЭЖХ (Табл. 3).

Таблица 3. Сравнительные характеристики метода ОФ ВЭЖХ-АД И КЭ-УФ при определении катехоламинов их предшественника и метаболитов в биологических жидкостях

Характеристики	Методы	ОФ ВЭЖХ-АД	КЭ-УФ
Время анализа		16 мин	10 мин
Предел обнаружения, нг/мл сигнал/шум = 3		0,4 достаточно для определения в моче и плазме крови	25 достаточно для определения в моче
Возможность одновременного определения		А, НА, ДА, МН, НМН, ДОФА	А, НА, ДА, МН, НМН
Эффективность, N*10 ³ тт/м		10	150
Воспроизводимость (%) по площади пика		4 – 6	3 – 5
по времени удерживания/миграции		0,5 – 1,5	0,8 – 2
Необходимый объем образца		5 мл мочи/плазмы крови	15 мл мочи

Пробоподготовка образцов мочи в обоих вариантах ТФЭ позволяет достичь фактора концентрирования 20 ± 3. При таких условиях чувствительность метода КЭ-

УФ обеспечивает определение катехоламинов в моче здоровых доноров (Рис. 5), но недостаточна для плазмы крови.

При проведении предварительной пробоподготовки мочи с использованием оксида алюминия матрица биологического объекта не мешает детектированию катехоламинов, т.к. условия сорбции достаточно селективны (Рис. 5 а), в то время как экстракция на патроне *DSC-SCX* дает большое количество матричных пиков, которые могут препятствовать получению достоверного результата (Рис. 5 б).

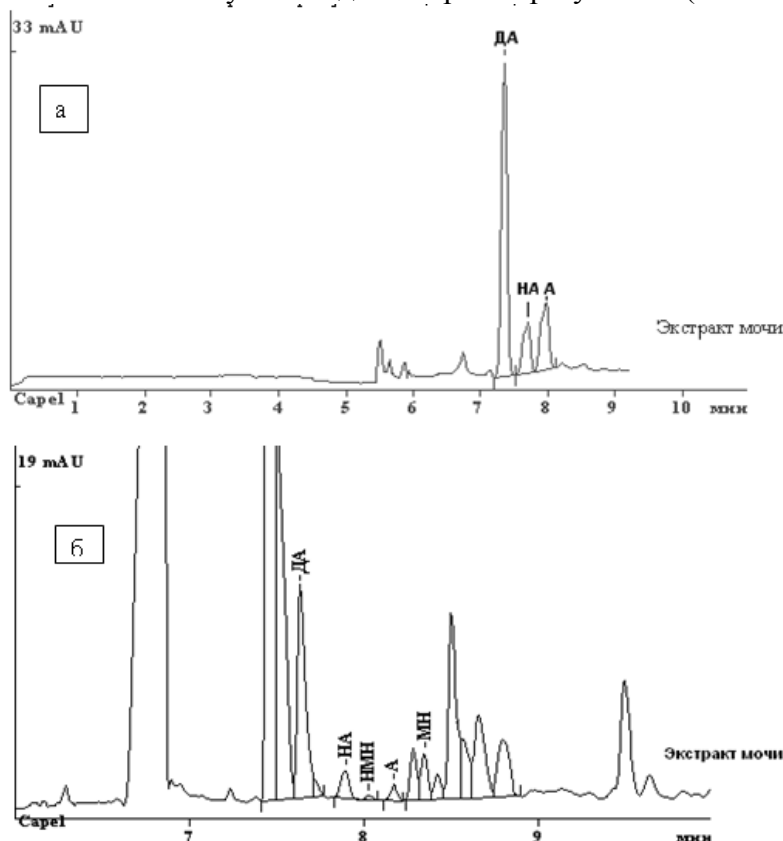


Рис. 5. Электрофореграмма экстракта мочи при различных вариантах ТФЭ: (а) сорбент Al_2O_3 , (б) картридж *DSC-SCX*. Прибор: «КАПЕЛЬ-105», $\lambda = 210$ нм, ввод пробы: 30 мбар, 20 с

Сравнение двух методов ВЭЖХ-АД и КЭ-УФ по пределам обнаружения (ПО), воспроизводимости, времени анализа, эффективности и возможности одновременного определения исследуемых компонентов представлено в Табл. 3.

Таким образом, рассмотренные методы анализа позволяют решать задачу определения катехоламинов, метанефринов и ДОФА в биологических объектах (КЭ-УФ в моче, а ВЭЖХ-АД в моче и плазме крови). Наиболее низкие пределы обнаружения были получены в режиме ОФ ВЭЖХ с амперометрическим детектированием (0,4 нг/мл) из-за большого объема вводимого образца и большей чувствительности детектирования, чем в режиме КЭ-УФ (25 нг/мл).

Метод капиллярного электрофореза, за счет высокой эффективности на порядок превосходящей метод ВЭЖХ, позволяет за более короткое время определять катехоламины и их метаболиты в моче (10 мин). Информативность анализа биологических жидкостей методом ВЭЖХ-АД выше, чем КЭ-УФ, т.к. возможно одновременно контролировать больший спектр аналитов как в моче, так и в плазме крови.

Список литературы

1. Kagedal B. Catecholamines and their metabolites // *J. Chrom. B.* 1988. V. 429. P.177-233.
2. Siren H., Karjalainen U. Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis // *J. Chrom. A.* 1999. V. 853. P. 527-533.
3. Volin P. Determination of free urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *J. Chrom. B.* 1994. V. 655. P. 121-126.
4. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Казаков В.А., Бессонова Е.А., Яшин А.Я. Определение катехоламинов методами капиллярного электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ // *Журнал аналит. химии.* 2004. т.59. №8. с.826-831.
5. Siren H., Mielonen M., Herlevi M. Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine // *J. Chrom. A.* 2004. V. 1032. P. 289-297.
6. Карцова Л. А., Краснова И. Н., Пименов А. И. Анализ нейротрансмиттерных аминокислот и биогенных аминов методом ВЭЖХ в присутствии краун эфиров в подвижной фазе // *Журн. аналит. химии.* 1996. Т. 51. № 10. С. 1068-1073.
7. Vuorensola K., Siren H., Karjalainen U. Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry // *J. Chrom. B.* 2003. V. 788. P. 277-289.
8. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Иванова А.С. Электрофоретическое определение биогенных аминов в биологических жидкостях // *Журнал аналит. химии,* 2007. т. 62, № 10. С. 1066-1072.
9. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Ганжа О.В. Определение катехоламинов и их метаболитов в различных режимах капиллярного электрофореза с использованием макроциклических и ион-парных реагентов // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2008. Т.8. вып.1. С.75-82.
10. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Сидорова А.А., Тверьянович И.А., Казаков В.А., Великанова Л.И. Определение адреналина, норадреналина, дофамина методом капиллярного электрофореза // *Журнал прикл. химии.* 2004. т.77. с.1164-1169.
11. Карцова Л.А., Попова А.М., Сидорова А.А., Маркова О.И. Оценка констант устойчивости органических веществ кислотного и основного характера с 18-краун-6 и β -циклодекстрином методом капиллярного зонного электрофореза // *Журнал аналит. химии.* 2007. т. 62. № 2. С. 198-203.
12. Казаков В.А., Сляднев М.Н., Сидорова А.А., Карцова Л.А., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. Оптимизация условий определения катехоламинов методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием // *Научное приборостроение.* 2004. т. 14. №1. с. 33-44.
13. Talwar D., Williamson C., McLaughlin A., Gill A., O'Reilly D. St. J. Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C_{18} solid-phase extraction sorbent and high-performance liquid chromatography // *J. Chrom. B.* 2002. V. 769. P. 341-349.

Сидорова Алла Анатольевна – к.х.н., вед. инженер ЦКП «Аналитическая Спектрометрия» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета, тел.: (812) 716-21-66

Карцова Людмила Алексеевна – д.х.н. проф. кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета

Sidorova Alla A. – Dr.Sc.Chem. Engineer CSU Analytical Spectrometry St. Petersburg state polytechnic university, e-mail: csu@delfa.net

Kartsova Ludmila A. – Dr.Sc.Chem. Professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university