

Санкт-Петербургский государственный университет

на правах рукописи

04

- 1 ЯНВ 1998

КОРОЛЕВА

Елена Михайловна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ИХ МОНОАМИНОВЫХ
МЕТАБОЛИТОВ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ
МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
С ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Специальность 02.00.02 -аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Санкт-Петербург

1998

Работа выполнена в Институте высокомолекулярных соединений Российской
Академии Наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент В.А. Лугинин

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор Л.Н. Москвин

Официальные оппоненты:

доктор химических наук И.Г. Зенкевич

кандидат химических наук В.В. Нестеров


Ведущая организация: Клиника нервных болезней Военно-Медицинской
Академии им. С.М. Кирова.

Защита диссертации состоится 17 декабря 1998 г. в 15 часов на заседании
диссертационного совета Д 063.57.44 по защите диссертаций на соискание ученой
степени доктора наук в Санкт-Петербургском государственном университете по адресу:
199004, Санкт-Петербург, Средний пр. дом. 41/43, Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М. Горького
Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан _____ ноября 1998 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

 /Б.В. Столяров/

Актуальность темы. Для диагностики генетически детерминированных патологий обмена веществ в организме человека, связанных с тяжелыми поражениями центральной нервной системы, часто ведущими к инвалидности, отставаниями детей в умственном, физическом, речевом развитии, часто сопровождающимися тяжелыми аллергическими или желудочно-кишечными патологиями, необходима разработка современных методик определения аминокислот и их основных моноаминовых метаболитов, пригодных к применению в практике клинко-диагностической биохимической лаборатории.

Большая часть этих заболеваний диагностируется поздно, когда изменения в организме носят уже необратимый характер. Причиной этого является клинический полиморфизм генетических патологий и схожесть их ранних фенотипических проявлений с заболеваниями ненаследственного генеза.

Для диагностики наследственных заболеваний необходима разработка методик определения концентраций аминокислот, т.к. только по изменению их спектра в физиологических жидкостях можно диагностировать более 60 заболеваний. Но для точного определения "метаболического блока", выяснения причин вторичных энзимопатий и для подбора терапии необходимо иметь возможность изучать также и пути метаболизма аминокислот, особенно таких, как триптофан, тирозин и гистидин, в превращениях которых участвует более 20 ферментных систем.

Цель работы. Целью данной работы явилось создание комплекса экспрессных методик определения концентраций аминокислот (АК) в физиологических жидкостях (крови, моче, ЦСЖ), основных метаболитов триптофана (ТРП) серотонинового и кинуренинового путей, метаболитов тирозина (ТИР) - катехоламинов (КА), ванилдимидальной кислоты (ВМК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), а также основного метаболита гистидина - гистамина, обеспечивающих возможность диагностики генетических патологий. Методики должны обладать высокой чувствительностью, требовать, по возможности, минимальных затрат времени и средств на проведение анализа и быть пригодными для применения в практике клинической диагностики.

Научная новизна. Предложен и обоснован общий методический подход к снижению пределов обнаружения АК и их метаболитов в физиологических жидкостях, включающий оптимизацию условий проведения реакций дериватизации, условий извлечения определяемых компонентов из физиологических жидкостей и их концентрирования на аналитической хроматографической колонке, использование лазерного флуориметрического детектора.

На основании этого общего подхода:

- 1. Выбраны условия определения 38 свободных АК и дипептидов в физиологических жидкостях при генетических патологиях с чувствительностью 1×10^{-13} моль (1×10^{-16} моль при использовании лазерного флуориметрического детектора). Показано, что для проведения анализа достаточно 10 мкл сыворотки крови и мочи или 100 мкл ЦСЖ.

- 2. Выбраны условия, позволяющие проводить определение 12 метаболитов триптофана и тирозина в физиологических жидкостях за 30 мин при объеме пробы 200 мкл сыворотки крови или ЦСЖ. Найдены оптимальные условия хроматографического разделения компонентов смеси и снижения предела обнаружения путем их концентрирования из большого объема пробы на хроматографической колонке без потери селективности.

- 3. Выбраны условия определения кинуреновой и ксантуреновой кислот в моче и показано, что для анализа достаточно 10 мкл образца.

- 4. Выбраны условия определения катехоламинов в плазме крови при объеме пробы 200 мкл в виде 1,2-дифенилэтилендиаминовых (ДФЭД) производных с лазерным флуориметрическим детектированием, позволяющие определять их без предварительного концентрирования (предел обнаружения - 0,2 пг в пробе). Оптимизированы условия проведения реакции КА с ДФЭД, хроматографического разделения производных и их концентрирования на хроматографической колонке с целью снижения предела обнаружения.

- 5. Выбраны условия определения гистамина в виде ортафталевого (ОФТ) производного с чувствительностью 0,01 нг/мл, требующие не более 100 мкл сыворотки крови. Оптимизированы условия извлечения гистамина, проведения реакции с ОФДА, хроматографического разделения и показана возможность его концентрирования из пробы на хроматографической колонке с целью снижения предельных определяемых концентраций.

Показано, что использование микроколоночной ВЭЖХ позволяет работать с микролитровыми объемами проб и снижает расход элюента на проведение анализа до сотен микролитров.

Практическая ценность работы. Впервые разработан комплекс аналитических хроматографических методик, позволяющий определять более 50 компонентов физиологических жидкостей, при объеме пробы сыворотки крови 550 мкл, а ЦСЖ - не более 1 мл, обеспечивающий диагностику и контроль хода лечения для нескольких десятков заболеваний.

Разработанные методики в течении ряда лет применяются в практике лабораторных исследований в Научно-исследовательском Центре и на Кафедре медицинской генетики Медицинской Академии Последипломного Образования, в Клинике нервных болезней Военно-Медицинской Академии, Центре "Мозг и иммунитет" и других клиниках.

С помощью перечисленных выше методик были исследованы биохимические показатели при таких патологиях нервной системы, как рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, эпилепсия, детский церебральный паралич, наследственная ксантуренурия.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на Международном конгрессе по Аналитической химии (Москва, 1997 г.), Международном симпозиуме по капиллярной хроматографии (Италия, 1987г., 1996г.), Дунайском симпозиуме по хроматографии (Ялта, 1985г., Варшава, 1991 г.), Международном симпозиуме по ВЭЖХ (США, 1996 г.), Международном симпозиуме по капиллярному электрофорезу и изатахофорезу (Чехия, 1996 г.), Все-

союзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (1982 г., 1987 г., 1990 г., 1996 г.) Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов (Таллинн, 1987 г.), Первом Национальном конгрессе по профилактической медицине (Санкт-Петербург, 1994 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 печатных работ - 18 статей и 30 тезисов докладов на конференциях и симпозиумах.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

Результаты, позволяющие оценить влияние условий проведения реакций дериватизации АК, гистамина, катехоламинов на выход соответствующих флуоресцирующих производных.

Условия оптимизации хроматографического разделения смеси АК, метаболитов ТИР и ТРП различных путей метаболизма, катехоламинов.

Способы повышения степени извлечения гистамина при жидкостной экстракции.

Результаты, позволяющие обеспечить возможность снижения предела обнаружения исследуемых компонентов путем концентрирования больших объемов проб непосредственно на аналитической хроматографической колонке.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из 5 глав: введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, выводов, а также содержит список сокращений и список литературы. Работа изложена на 135 страницах, содержит 28 рисунков и 20 таблиц. В списке цитируемой литературы - 215 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Обзор литературы. Обзор состоит из 6 разделов: определение содержания АК, метаболитов триптофана, метаболитов тирозина, гистамина, основы метода ВЭЖХ, методы обработки результатов клинического анализа.

В обзоре подробно описываются химическая природа и свойства определяемых соединений, методы их определения, обосновывается необходимость применения дериватизирующих реагентов для повышения чувствительности определения АК и их метаболитов, рассматриваются достоинства и недостатки наиболее широко употребляемых на сегодняшний день дериватизирующих реагентов, возможность их использования при анализе физиологических жидкостей для диагностики генетических и неврологических патологий. Приводятся данные о влиянии способа депротеинизации образца на выход свободных АК. Рассматриваются преимущества метода ВЭЖХ при определении биологически активных веществ, способы повышения чувствительности и селективности метода (применение селективных детекторов, получение производных, концентрирование определяемых веществ на хроматографической колонке). Подробно обосновываются преимущества микроколоночной ВЭЖХ при использовании ее в клинической лабораторной практике.

Оборудование, реактивы, методики анализа. В методическом разделе дан перечень используемых реактивов, реагентов и приборов и хроматографического оборудования. Даются описания экспериментов, проведенных при разработке методик определения АК в виде ДНС-производных (ДНС - 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид), определения метаболитов триптофана серотонинового цикла, метаболитов триптофана цикла ксантуреновой кислоты, катехоламинов в виде ДФЭД-производных, гистамина в виде ОФТ-производного.

Хроматографические исследования проводились с использованием микроколоночного хроматографа ХЖ-1311 с флуориметрическим детектором или лазерным флуориметрическим детектором на основе He-Cd лазера на фторопластовой микроколонке с внутренним диаметром 0,5 мм и длиной 150 - 350 мм в системе элюентов: ацетонитрил - водный буфер при объеме вводимой пробы от 1 до 200 мкл.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Определение АК. В современной литературе описано большое количество методик определения АК. Но при детальном рассмотрении выясняется, что практически все они посвящены определению АК белковых гидролизатов, т.е. разделению смеси из 18 - 20 АК. Единичные работы посвящены определению АК в физиологических жидкостях (23 - 25 АК), а для определения АК при генетических патологиях (35 - 50 АК) используются автоматические аминокислотные анализаторы, время анализа физиологических жидкостей на которых с учетом регенерации колонки составляет 4 - 6 часов. Количество дериватизирующих реагентов, пригодных для определения АК в физиологических жидкостях также заметно сокращается. Так, например, популярный при определении АК в белковых гидролизатах ОФДА неприменим при анализе физиологических жидкостей, т.к. не вступает в реакцию с вторичными аминами, и, следовательно, не дает возможности детектировать пролин и ОН-пролин. Низка и чувствительность детектирования с помощью ОФДА цистеин-содержащих соединений. Доказывается, что в анализе физиологических жидкостей наиболее целесообразно применение ДНС-хлорида в качестве реагента для предколоночной дериватизации. И хотя процедура получения ДНС-производных в применении к АК белковых гидролизатов подробно изучена, для доказательства целесообразности использования этого реагента в анализе физиологических жидкостей при генетических патологиях потребовалось проведение дополнительных подробных исследований. Это связано, во-первых, с присутствием в анализируемых образцах не только АК, но некоторых ди- и три-пептидов а также ди-сульфидов, условия проведения реакции для которых не совпадают с условиями для АК. Во вторых, с возможностью гипераминоацидемии или генерализованной гипераминоацидурии, когда концентрации одной или всех АК повышаются в 5 - 50 раз. В этих случаях молярный избыток реагента может оказаться недостаточным, что приведет не только к неполному образованию ДНС-производных, но и к образованию моно-дансильных производных вместо ди-дансильных у таких АК, как лизин, гистидин, орнитин, аргинин, цитруллин, тирозин. Это затрудняет иден-

тификацию компонентов в физиологических жидкостях и, соответственно, диагностику. Литературные данные, касающиеся времени и температуры проведения реакции, крайне разноречивы. В связи с этим были проведены исследования зависимости выхода ДНС-АК от времени и температуры.

Проблемы на стадии пробоподготовки начинаются с выбора реагента для депротенизации сыворотки крови. Были исследованы выходы АК после депротенизации сыворотки крови с помощью органических растворителей (ацетонитрил, ацетон) и кислот (сульфосалициловой, хлорной, трихлоруксусной), причем хлорная кислота использовалась с концентрациями 2,4 Н и 0,25 Н.

Наибольший выход АК наблюдался при использовании для осаждения белка 0,25 М хлорной кислоты (500 мкл на 50 мкл сыворотки крови). Недостатком использования органических депротенизирующих реагентов является то, что в растворе остаются не осажденными липидные фракции, препятствующие проведению реакции денсирования и снижающие выход ДНС-АК. Более низкий выход АК при использовании для осаждения белков концентрированных кислот связан с образованием осадка белка высокой плотности вместе с которым соосаждается и часть свободных АК (до 10%).

В литературе высказывалась гипотеза о том, что более высокий выход АК при депротенизации кислотами связан с частичным кислотным гидролизом белков сыворотки крови. Были проведены эксперименты с модельными смесями сывороточного альбумина - белка, присутствующего в сыворотке крови в наибольшей концентрации. После депротенизации растворов сывороточного альбумина хлорной кислотой свободные АК в надосадочной жидкости обнаружены не были, что свидетельствует об ошибочности обсуждаемой гипотезы.

В итоге для депротенизации сыворотки крови была выбрана 0,25 М хлорная кислота.

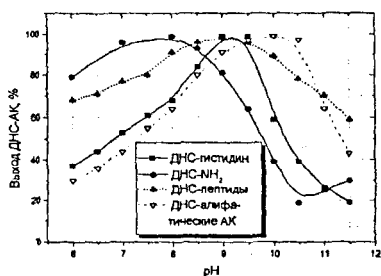


Рис. 1. Зависимости выхода ДНС-АК и ДНС-пептидов от pH буфера.

При депротенизации кислотой реальных образцов сыворотки крови нельзя заранее предсказать, какое значение pH будет иметь полученный раствор, т.к. количество белков в крови пациентов может сильно варьироваться. Помимо АК, в физиологических жидкостях присутствуют также подлежащие определению пептиды, условия денсирования для которых отличаются от условий проведения этой процедуры для АК. При работе с аликватами объемом 50 - 100

мкл нет возможности с высокой точностью контролировать pH реакционной смеси. Поэтому необходимо было выяснить, какую погрешность вносит изменение pH в результаты количе-

мкл нет возможности с высокой точностью контролировать pH реакционной смеси. Поэтому необходимо было выяснить, какую погрешность вносит изменение pH в результаты количественного анализа. Были исследованы зависимости выхода ДНС-АК и ДНС-пептидов от pH буфера в интервале pH от 6,0 до 11,5. (Рис. 1). Наибольший выход ДНС-АК (кроме ди-ДНС-гистидина) наблюдался при значениях pH в интервале 9,5 - 10,5 (для ди-ДНС-гистидина - 9,5 - 10,0), а для ДНС-пептидов - в интервале pH 8,5 - 9,5. Выход побочных продуктов реакции дансирования, в частности ДНС-NH₂, снижается при pH 9,0 - 10,5 на 60 - 80 % от максимального значения, достигаемого при pH 7,0 - 8,0

Для определения необходимого молярного избытка ДНС-хлорида исследовали выход ДНС-производных при различных его концентрациях для 25 АК. Было показано, что для большинства АК в выбранных условиях достаточно 5 -10 кратного молярного избытка ДНС-хлорида. Для аргинина, тирозина, лизина, орнитина необходим 10 ÷ 20- кратный избыток ДНС-хлорида, при этом в свободном виде они образуют только ди-ДНС-производные. Гистидин может образовывать и моно-, и ди-ДНС- производные. Поэтому поведение этой АК исследовали более подробно. Было показано, что для полного образования ди-ДНС-производных гистидина необходим 50-кратный молярный избыток реагента. В противном случае гистидин может образовывать и моно-ДНС-производные, коэлюирующиеся с ДНС-глутамином.

Были также изучены зависимости выхода ДНС-АК от длительности реакции и температуры для всех АК и побочных продуктов реакции. На Рис. 2 приведены полученные зависимости на примере ДНС производных пролина, гистидина и ДНС-амида. Видно, что максимальный выход ДНС-АК достигается при 0° С за 12 - 24 часа, при 40° С - за 30 мин, при 70° С и выше - за 5 - 15 мин, но площади пиков в последнем случае ниже, чем при 40° С. Соотношение площадей пиков ДНС-АК и ДНС-амида наилучшее также при 40° С и длительности реакции 40 мин.

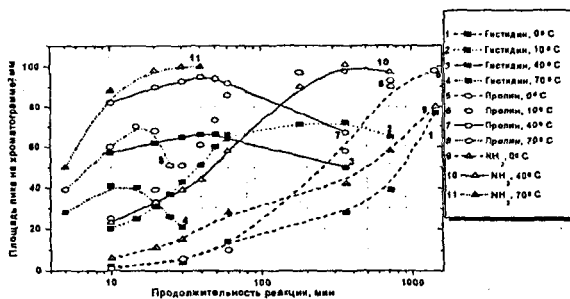


Рис. 2. Зависимость выхода ДНС-АК от длительности реакции и температуры.

Разделение ДНС-АК большинством авторов предлагается проводить, используя градиент ацетонитрила в 0,1 - 0,2 М водном формиатном буферном растворе с рН 7,0. Зависимость емкости хроматографической колонки - K' от рН в интервале 4,5 - 8,5 выражена слабо. При работе с физиологическими жидкостями, когда разделяемая смесь может включать более 40 компонентов, целесообразнее проводить разделение в областях рН, где K' возрастают, т.е. при рН ниже 4,0.

Нами были проведены исследования хроматографического поведения ДНС-АК и побочных продуктов реакции дансирования при рН 2,5 ÷ 7,5. Было показано, что при рН = 3,5 для большинства пар разделяемых АК коэффициент разрешения K_R был больше 1,5 (за исключением пар: Асп - Сер и Арг - Цитр, K_R которых 0,60 и 0,66, соответственно). Наибольшую сложность вызывало разделение β -аланина, ДНС-амида и γ -аминоасляной кислоты. Были исследованы зависимости K_R этих компонентов от рН в области 3,2 - 3,8 (Рис. 3). Это позволило выбрать для разделения ДНС-АК буфер с рН 3.53 ± 0.03 .

Возрастание ионной силы буфера, как известно, увеличивает время удерживания полярных компонентов на обращеннофазовых колонках, а ее снижение ухудшает селективность разделения. Но увеличение концентрации буфера приводит к возрастанию давления, и, главное, к увеличению времени регенерации колонки после градиентного элюирования. Поэтому были проведены исследования зависимости K' от молярности буфера для группы из 4 "слабо" и "средне" удерживаемых АК (Рис. 4).

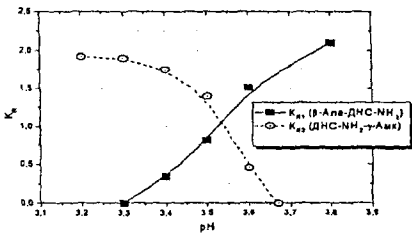


Рис. 3. Зависимости K_R β -аланина, ДНС-амида и γ -аминоасляной кислоты от рН в области 3,2 - 3,8

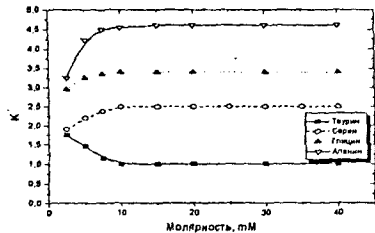


Рис. 4. Зависимости K' от молярности буфера для группы из 4 "слабо" и "средне" удерживаемых АК.

В результате было показано, что 10 мМ формиат натрия с рН 3.53 ± 0.03 является оптимальной водной фазой для разделения АК физиологических жидкостей.

Форма градиента для разделения физиологической смеси АК подбиралась эмпирически так, чтоб K_R для разделяемых компонентов был не менее 1,0, а время определения, по возможности, минимально. Хроматограмма разделения смеси ДНС-АК приведена на Рис. 5-

а. Форма градиента приведена на рисунке. На Рис. 5-б приведены хроматограммы разделения АК сыворотки крови.

Были определены пределы детектирования ДНС-АК (1×10^{-13} моль для прибора ХЖ-1311 и 1×10^{-16} моль для флуориметрического детектора на основе He-Cd лазера) при соотношении сигнал/шум = 3.

В этих условиях были определены показатели нормального содержания АК в физиологических жидкостях здоровых волонтеров, значения которых совпали с данными ВОЗ. С помощью разработанной методики проведено более 1000 анализов при диагностике первичных и вторичных энзимопатий.

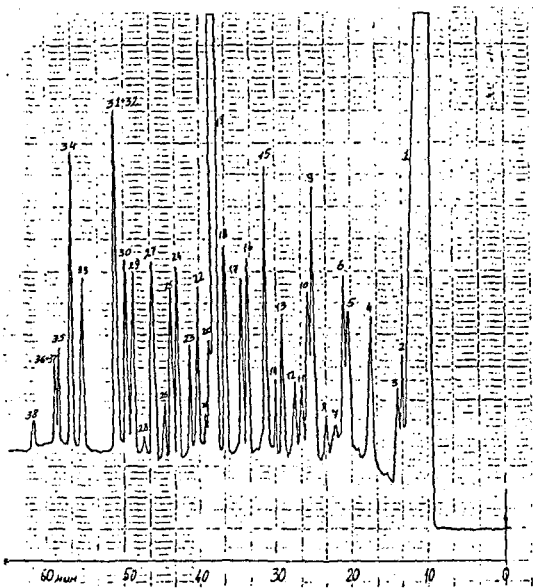


Рис. 5-а. Разделение смеси стандартов ДНС-АК, 10 пикомоль каждый.

Колонка 300×0.5 мм, упакованная сорбентом Нуклеосил-5-С₁₈. Градиент ацетонитрила в 0.01 N формиате натрия с pH 3.53 от 26 до 85 %. Скорость элюирования 5 мкл/мин. Объем пробы 1 мкл. Детектирование флуориметрическое. $\lambda_{\text{возб.}}$ 254 нм, фильтр 500 - 700 нм. Обозначения: 1 - ДНС-хлорид, 2 - Цис к-та, 3 - Карн, 4 - Тау, 5 - Асн, 6 - Глн, 7 - Арг, 8 - Цитр, 9 - Сер, 10 - Асп, 11 - Глу, 12 - ОН-Про, 13 - Тре, 14 - Цистатион, 15 - Гли, 16 - Гомо-цис, 17 - Ала, 18 - β -Ала, 19 - ДНС-амид, 20 - γ -АМК, 21 - Саркозин, 22 - α -АМК, 23 - β -АМК, 24 - Мет, 25 - Про, 26 - Цис, 27 - Вал, 28 - Гомосерин, 29 - Трп, 30 - Фен, 31 - Иле, 32 - Леи, 33 - Орн, 34 - Лиз, 35 - Гис, 36 - 1-Мет-Гис, 37 - 3-Мет-Гис, 38 - Тир.

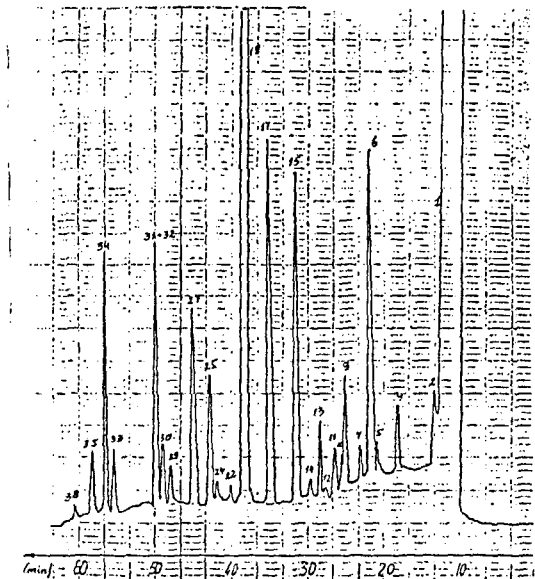


Рис. 5-б. Разделение свободных АК сыворотки крови здорового волонтера в виде ДНС-производных. Условия проведения анализа и обозначения - как на Рис. 7-а.

Определение метаболитов тирозина и триптофана. Выбор группы анализируемых соединений проводился исходя из диагностической целесообразности, сопоставимости физиологических концентраций и близости химических свойств соединений. В состав смеси были включены Трп, 5-ОН-Трп, 5-ОН-Та, Ац-5-ОН-Та, 5-ГИУК, ИПВК, ИМК, ИУК, Тир, ВМК, ГВК. Содержание выбранных 12 компонентов в сыворотке крови достаточно для детектирования их по нативной флуоресценции. Были исследованы зависимости времени удерживания компонентов от содержания ацетонитрила в элюенте (Рис. 6). Для наиболее трудно разделяемой группы соединений (Трп, 5-ОН-Трп, 5-ОН-Та, Ац-5-ОН-Та) были исследованы зависимости времени удерживания от pH элюента (Рис. 7) и зависимости K_R от pH элюента. В результате, для разделения смеси 12 метаболитов Тир и Трп в сыворотке крови был выбран линейно-ступенчатый градиент ацетонитрила в буфере с pH 3,5. Для повышения чувствительности определения было применено концентрирование определяемых веществ из пробы на хроматографической колонке. Ввод пробы производился в незлюирующем растворителе. Для наиболее трудно разделяемых пар компонентов были исследованы зависимости K_R от объема вводимой пробы. Было показано, что на обращеннофазовую колонку $0,5 \times 300$ мм можно вводить пробу объемом до двух свободных объемов колонки.

Было исследовано влияние температуры колонки на параметры хроматографического разделения. Было показано, что повышение температуры в интервале от 20 до 35° С ведет к

размыванию пика 5-ОН-Та и, соответственно, к снижению K_R и повышению предела обнаружения 5-ОН-Та. В дальнейшем определение проводилось при температуре не выше 25°C .

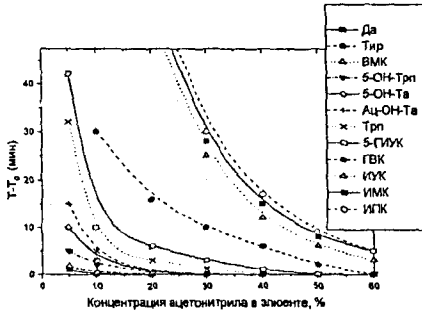


Рис. 6. Зависимость времен удерживания метаболитов Тир и Трп от содержания ацетонитрила в элюенте.

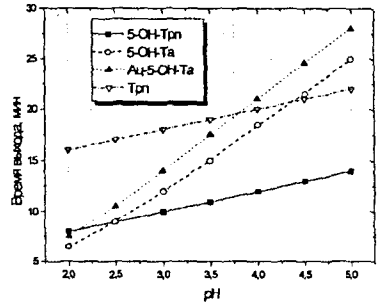


Рис. 7. Зависимость времен удерживания метаболитов Тир и Трп от pH элюента.

На Рис. 8-а, б приведены хроматограммы разделения смеси стандартов метаболитов Тир и Трп и компонентов сыворотки крови.

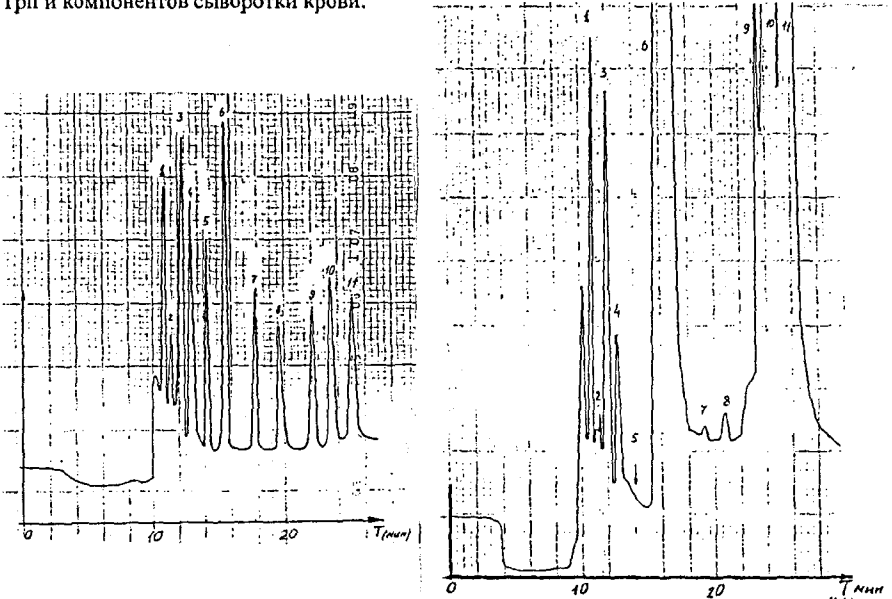


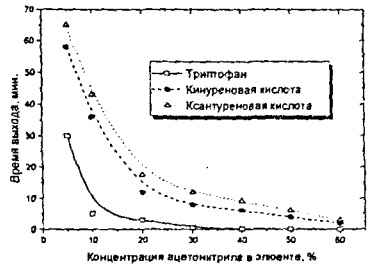
Рис. 8. Разделение смеси стандартов метаболитов Тир и Трп (а) и метаболитов Тир и Трп в сыворотке крови пациента, страдающего гастродуоденитом (б).
Обозначения: 1 - Тир, 2 - ВМК, 3 - 5-ОН-Трп, 4 - 5-ОНТА, 5 - N-Ац-5-ОН-Та, 6 - Трп, 7 - 5-ГИУК, 8 - ГВК, 9 - ИУК, 10 - ИМК, 11 - ИПК.

С помощью разработанной методики проводились исследования состава физиологических жидкостей здоровых волонтеров и пациентов, страдающих неврологическими, аллергическими, желудочно-кишечными, онкологическими заболеваниями.

Определение метаболитов триптофана (цикл ксантуреновой кислоты). Неиндолные метаболиты Трп - кинуреновая и ксантуреновая кислоты - имеют большое значение для диагностики генетических патологий и вторичных энзимопатий. По своим химическим свойствам кинуреновая и ксантуреновая кислоты отличаются от других метаболитов Трп - они нерастворимы в кислой среде и имеют отличающийся от индолов спектр флуоресценции.



а



б

Рис. 9. Зависимости времен выхода метаболитов триптофана от молярности буфера (а) и от содержания ацетонитрила в элюенте (б).

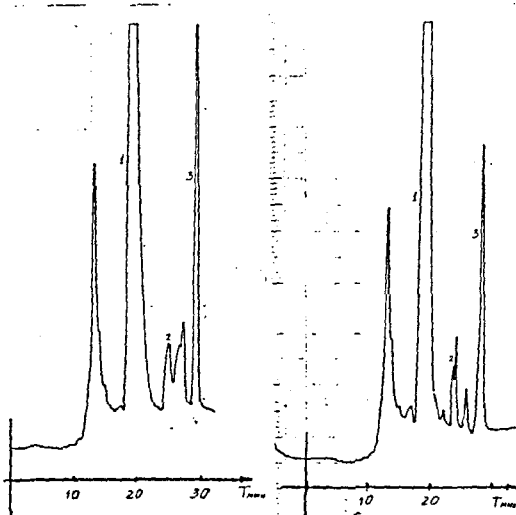


Рис. 10. Разделение компонентов мочи больного пиридоксинзависимой ксантуренурией до (а) и после (б) лечения. Обозначения: 1 - Трп, 2 - кинуреновая кислота, 3 - ксантуреновая кислота.

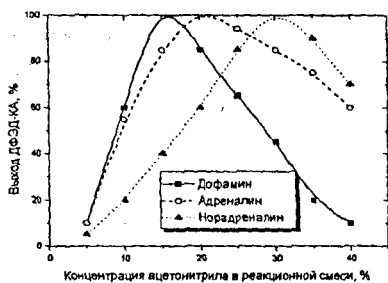
Были исследованы зависимости времен удерживания кислот от молярности буфера и от содержания ацетонитрила в элюенте, K_R от объема вводимой пробы (Рис. 9-а, б). На Рис. 10-а, б приведены хроматограммы разделения компонентов мочи больного ксантуреноурией до и после лечения. Были определены пределы детектирования, которые составили 0,1 и 0,05 мкг/мл соответственно для кинуреновой и ксантуреновой кислот при соотношении сигнал/шум = 3. Диапазон линейности составил 0,2 - 100 мкг/мл. С помощью разработанной методики были определены уровни концентраций кинуреновой и ксантуреновой кислот у здоровых волонтеров и больных, страдающих пиридоксин-зависимыми и резистентными аллергодерматитами.

Определение катехоламинов в плазме крови. Определение катехоламинов (КА), несмотря на многочисленные опубликованные методики, остается сложной в исполнении процедурой, требующей высокочувствительного оборудования и высокой квалификации персонала. Серьезные проблемы могут возникать в трактовке результатов из-за неправильно взятой пробы или ошибок при хранении и транспортировке образца. Главные проблемы - низкое содержание КА в плазме крови: норадреналин (НА) - 250 пг/мл, адреналин (А) - 35 пг/мл, дофамин (ДА) - менее 35 пг/мл, низкая стабильность соединений и реакция пациента, особенно - ребенка, на взятие крови.

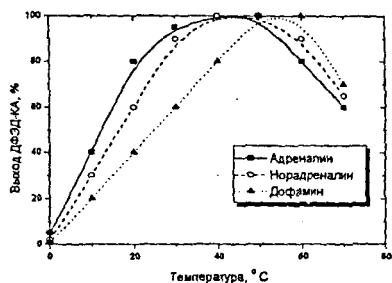
Для повышения чувствительности определения нами была выбрана предколоночная дериватизация КА с помощью 1,2 дифенилэтилендиамина (ДФЭД) и детектирование их после хроматографического разделения с помощью лазерного флуориметрического детектора (на основе He-Cd лазера). Были определены пределы детектирования ДФЭД-КА с использованием растворов стандартов (предел детектирования А - 0,35 пг, НА - 0,30 пг, ДА - 0,2 пг при соотношении сигнал/шум = 3) и было показано, что они достаточны для определения физиологических концентраций КА в плазме крови без предварительного концентрирования. Благодаря исключительной избирательности ДФЭД, который реагирует только с катехоламинами, удалось исключить и стадию выделения КА из плазмы. При определении КА мочи этого добиться не удалось, т.к. ДФЭД реагирует с присутствующими моче соединениями, образуя сильно флуоресцирующие производные, элюирующиеся в свободном объеме и препятствующие дериватизации КА.

Использование лазерного флуориметрического детектора, чувствительность которого в 1000 раз выше, чем чувствительность детектора ХЖ-1311, потребовала проведения дополнительных исследований состава реакционной смеси и условий хроматографического разделения. Были исследованы зависимости определения ДФЭД-производных от типа и молярности используемого буфера, содержания ацетонитрила в реакционной смеси, молярного избытка реагента, времени проведения реакции и температуры. Полученные зависимости приведены на Рис. 11-а-г.

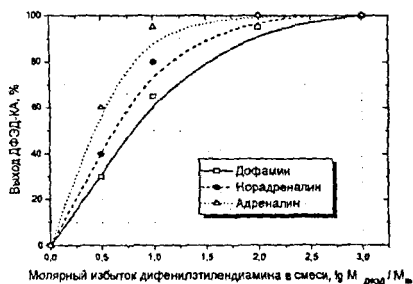
Для выбора условий хроматографического разделения были исследованы зависимости времени удерживания ДФЭД-КА от содержания ацетонитрила в элюенте и K_D от объема вводимой пробы. Объем вводимой пробы при работе с реальными образцами пришлось ограничить 50 мкл из-за увеличения площади пиков побочных продуктов, выходящих со свободным объемом и мешающих идентификации НА.



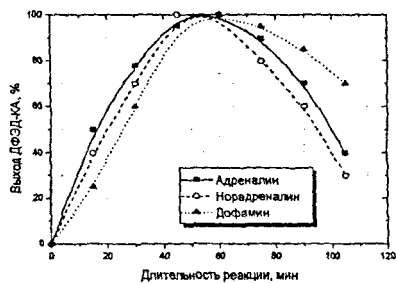
а



в



б



г

Рис. 11. Зависимости выхода ДФЭД- производных от содержания ацетонитрила в реакционной смеси (а), молярного избытка реагента (б), температуры (в) и времени (г) проведения реакции.

Определение гистамина. Концентрация гистамина в сыворотке крови в норме составляет 0,67 нг/мл. При гистаминовом шоке его концентрация может превышать 20 нг/мл. Для снижения предела обнаружения гистамина необходимо было отработать процедуры его выделения из сыворотки и дериватизации.

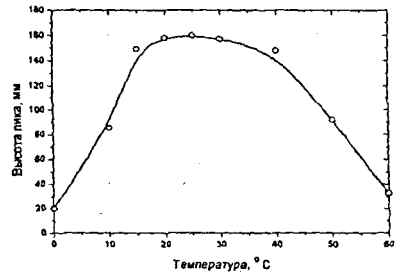
Была выбрана предколоночная дериватизация ОФДА. Исследованы зависимости выхода ОФТ- гистамина от времени и температуры реакции, молярного избытка реагента, стабильности производных гистамина от условий их хранения (Рис. 12). Полученные производные стабильны до 10 часов в темноте при 0° С, что позволяет проводить прободготовку нескольких проб одновременно.

В процессе разработки методики исследовалась зависимость полноты извлечения гистамина от условий экстракции: концентраций растворов щелочи и кислоты на стадиях экстракции, резекстрация, объемный избыток бутанола, объем бензола, длительность и кратность резекстракции. Разработана методика экстракции гистамина из 100 мкл сыворотки крови. Полно извлечения составляет $82 \pm 3 \%$.

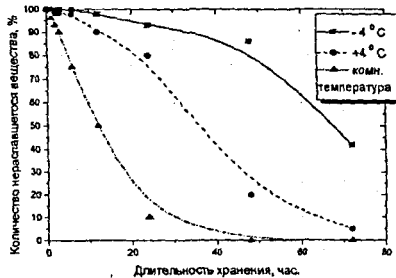
Исследованы также условия хроматографического определения ОФТ - гистамина с целью повышения чувствительности и снижения времени анализа.



а



б



в

Рис. 12. Зависимости выхода ОФТ- гистамина от длительности (а) и температуры (б) и стабильность производных гистамина в процессе их хранения (в).

Предел детектирования гистамина составляет 0,01 нг/мл при отношении сигнал/шум = 3. Диапазон линейности - 0,03 - 50 нг/мл. С помощью разработанной методики определялись значения концентраций гистамина у здоровых волонтеров и больных аллергическими желудочно-кишечными заболеваниями в период обострения и в фазе ремиссии.

Для всех вышеперечисленных компонентов физиологических жидкостей определены пределы детектирования, диапазоны линейности, доверительные интервалы, построены гр

дуривочные зависимости, правильность определения по которым контролировалась методом добавок.

Применение микроколоночной ВЭЖХ для анализа физиологических жидкостей не только дало возможность использовать микролитровые количества образцов, но и снизить расход элюентов. Так, для определения АК, метаболитов Тир и Трип, гистамина и Ка необходимо, соответственно, 350, 500, 300 и 600 мкл элюента. Снижение расхода элюентов важно при проведении серийных анализов в клинической лаборатории.

В результате проведенных исследований разработан комплекс хроматографических методик для определения АК и их моноаминовых метаболитов (более 50 биологически активных соединений) в физиологических жидкостях методом микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием, позволяющий проводить диагностику нескольких десятков первичных и вторичных энзимопатий, для чего требуется не более 550 мкл плазмы крови.

ВЫВОДЫ.

- 1. Разработана методика определения свободных АК в физиологических жидкостях (плазме и сыворотке крови, моче, ЦСЖ), позволяющие идентифицировать и количественно определять содержание 38 АК и дипептидов в виде ДНС-производных методом микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии с флуориметрическим детектированием. Разработанная методика не имеет аналогов по совокупности параметров: аналитической чувствительности (для анализа необходимо 10 мкл сыворотки крови или 100 мкл ЦСЖ), времени полного анализа (для определения 38 компонентов смеси необходимо 70 мин. с учетом регенерации колонки) при низком расходе элюента - 350 мкл на 1 анализ.
- 2. Разработаны методики определения 12 метаболитов ТРП (индольного цикла) и ТИР, позволяющие проводить анализ проб объемом не более 200 мкл сыворотки крови или ЦСЖ, или 10 мкл мочи.
- 3. Разработана методика хроматографического определения кинуреновой и ксантуреновой кислот методом микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии в пробе физиологической жидкости объемом 10 мкл.
- 4. Разработана методика определения катехоламинов в виде ДФЭД-производных методом ВЭЖХ с лазерным флуориметрическим детектированием, позволяющая определять катехоламины в плазме крови без предварительного концентрирования с пределом обнаружения 0,2 пг при объеме пробы 200 мкл.
- 5. Разработана методика определения гистамина в пробе сыворотки крови объемом 200 мкл в виде ОФТ-производного методом микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии с пределом обнаружения 0.01 нг/мл.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

1. Беленький Б.Г., Королева Е.М., Мальцев В.Г. Микрохроматографический анализ ДНС-аминокислот с чувствительностью 10^{-12} моль// ДАН СССР.-1982.-Т. 263.-№ 4.-С. 1013-1014
2. Koroleva E.M., Maltsev V.G., Belenkii B.G., Viska M. Microchromatographic analysis of DN amino acids with sensitivity of 10^{-13} mole// J. of Chromatogr.-1982.-V. 242.-P. 145-152.
3. Lobazov A.Ph., Mostovnikov V.A., Nechaev S.V., Belenkii B.G., Keвер E.E., Koroleva E.M., Maltsev V.G. Laser Fluorimetric Detector for Capillary Liquid Chromatography// J. of Chromatogr.-1986.-V. 365.-P. 321-327.
4. Беленький Б.Г., Белло М.С., Королева Е.М., Кевер Е.Е. Проблемы микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии// В. сб.: Синтез, структура и свойства полимеров, "Наука" Л.: -1989.-С. 253-266.
5. Королева Е.М., Мальцев В.Г. Анализ свободных аминокислот в плазме крови и цереброспинальной жидкости методом микроколоночной хроматографии с флуориметрическим детектированием// В. сб.: Теория и практика жидкостной хроматографии.-Уфа.- 1990.-С. 25-30.
6. Koroleva E.M., Maltsev V.G., Vojevodskaja E.A. Determination of Catecholamines in Human Plasma in the Form of their 1,2-diphenylethylenediamine Derivatives by Microcolumn HPLC with Laser Induced Fluorimetric Detection// VII Дунайский симпозиум по хроматографии, Варшава 1991.-Тезисы докладов.- Варшава: 1991.-С. 386.
7. Михайленко А.А., Дыскин Д.Е., Королева Е.М., Головкин В.И. Нейромедиаторные варианты эпилепсии и их коррекция пептидным биорегулятором кортексином// В. сб.: Нейроиммунология на пороге XXI века, вып. 1.-СПб.: -1992.-С. 89-97.
8. Михайленко А.А., Головкин В.И., Дыскин Д.Е., Королева Е.М., Денищук И.С. Нейромедиаторные аминокислоты в плазме крови и ликворе больных рассеянным склерозом и боковым амиотрофическим склерозом// В. сб.: Нейроиммунология на пороге XXI века, вып. 1.-СПб.: - 1994.- С. 72-77.
9. Королева Е.М., Добродумова В.В., Лугинин В.А. Анализ основных метаболитов триптофана в физиологических жидкостях методом микроколоночной ВЭЖХ// VII Всероссийский симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии, М.-1996.-Тезисы докладов.-М.: -1996.-С. 82.
10. Королева Е.М., Похелайнен Е.А., Лугинин В.А. Анализ свободных аминокислот физиологических жидкостей при диагностике генетических патологий// VII Всероссийский симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии, М.-1996.-Тезисы докладов.-М.: -1996.-С. 89.
11. Koroleva E., Pohelainen E., Dobrodumova V., Gamper N., & Tyukavin A. Microcolumn HPLC in Diagnostic of Hereditary Diseases// International Congress on Analytical Chemistry.-Moscow: 1997.- Abstr. Moscow: 1997.-P.-26.