

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЛЬТА-АМІНОЛЕВУЛІНОВОЇ КИСЛОТИ МЕТОДОМ ОБЕРНЕНО-ФАЗОВОЇ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

К. А. Лантєва

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

У статті наведені результати, отримані у ході розробки методики кількісного визначення дельта-амінолевулінової кислоти методом обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії з градієнтним елююванням та передколонковою дериватизацією 1-фтор-2,4-динітробензолом. Виявлені наступні оптимальні умови хроматографічного розподілу: колонка стальна C18 150×2,0 мм, 3,0 мкм; швидкість рухомої фази 0,4 см³/хв; температура термостату колонки 35 °С; довжина хвилі детектування 360 нм.

Біологічним маркером при отруєннях тварин сполуками важких металів, у тому числі Плюмбумом, є дельта-амінолевулінова кислота (δ-АЛК), один із проміжних продуктів синтезу гемму [1–3]. Визначення її рівня в біологічних об'єктах (сироватка крові, сеча) має діагностичне значення [4]. Концентрація δ-АЛК у сироватці крові знаходиться на рівні, який ускладнює застосування аналітичних методів, що базуються на застосуванні спектрофотометричного детектування. Існуючі методи визначення δ-АЛК недостатньо чутливі та селективні. Одним з можливих шляхів рішення цієї проблеми є розробка максимально уніфікованої та селективної методики визначення δ-АЛК методом вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Дельта-амінолевулінова кислота відноситься до сполук амінокислотної природи, в зв'язку з чим, для її ідентифікації доцільно використовувати реактиви на вільну аміногрупу за методом Сенгера [5]. Відомо, що ускладнення при проведенні хроматографічного аналізу більшості амінокислот зумовлені їх полярністю та низькими коефіцієнтами поглинання світла в УФ-діапазоні. Тому для покращення виявлення та хроматографічного розділення необхідно проводити модифікацію УФ-спектру аналіту через генерацію нових сполук з більш високим молярним коефіцієнтом поглинання [6]. Проведений аналіз літературних джерел показав перспективність подальшої роботи з 1-фтор-2,4-динітробензолом (ДНФБ), реагентом для дериватизації для сполук, що містять аміногрупи [7, 8]. При взаємодії амінокислоти з ДНФБ утворюється стабільне 2,4-динітрофенольне похідне жовтого кольору.

Метою роботи була розробка методики визначення дельта-амінолевулінової кислоти методом обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження були проведені на базі відділу токсикології, безпеки та якості с/г продукції ННЦ «ІЕКВМ». Нами був розроблений оптимальний спосіб обернено-фазової ВЕРХ з градієнтним елююванням та передколонковою дериватизацією компонентів 1-фтор-2,4-динітробензолом (ДНФБ). Утворену в результаті гідролізу ДНФ-амінокислоту екстрагували та ідентифікували.

При розробці методики використовували наступні реактиви: стандартний зразок (СЗ) δ-АЛК ("Merck", Німеччина), 1-фтор-2,4-динітробензол, натрію тетраборат кваліфікації "чда" ("Sigma", США). Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Shimadzu LC-20 AD, (Японія) з автосамплером та УФ-спектрофотометричним детектором. Використовували хімічний посуд класу А.

Досліджуваний стандартний розчин готували так: 10 нг (точну наважку) δ-АЛК вносили до пробірки, ємністю 10 см³, додаючи 1,0 см³ 3 % розчину 1-фтор-2,4-динітробензолу, 1,0 см³ 1 % розчину натрію тетраборату, пробірку закривали, перемішували

та витримували в термостаті за температури 50 °С протягом 30 хв. Потім додавали 3 см³ суміші діоксан-вода (1:1). Уміст пробірки кількісно переносили до мірної колби ємністю 10 мл і доводили об'єм розчину до мітки сумішшю діоксан-вода (1:1) та перемішували. Отриманий розчин фільтрували через фторопластовий фільтр з розміром пор не більше 0,5 мкм. Для приготування розчину порівняння 10 мг (точна наважка) δ-АЛК поміщали до мірної колби ємністю 100 см³, додавали 80 мл 1 % розчину натрію тетраборату, перемішували до повного розчинення, доводили об'єм цим же розчинником до мітки та перемішували. До мірної колби, ємністю 10 см³ вносили 100 мкл розчину, додавали 1,0 см³ 3 % розчину 1-фтор-2,4-динітробензолу та 1,0 см³ 1 % розчину натрію тетраборату, пробірку закривали, витримували в термостаті за температури 50 °С протягом 30 хв, додавали 3 см³ суміші діоксан-вода (1:1), кількісно переносили вміст пробірки в мірну колбу ємністю 10 см³, доводили сумішшю розчинників до мітки та перемішували. Отриманий розчин фільтрували через фторопластовий фільтр з розміром пор не більше 0,5 мкм.

У ході роботи були виявлені такі оптимальні умови хроматографування: колонка стальна "Reposil Pur Aqua" C18 150×2,0 мм, 3,0 мкм; швидкість рухомої фази 0,4 см³/хв; температура термостату колонки 35 °С; довжина хвилі детектування 360 нм. Градієнтне елюювання здійснювали змішуванням двох елюентів: рухома фаза "А" – 50 см³ ацетонітрилу внесли до мірної колби ємністю 1000 см³, довели об'єм фосфатним буферним розчином (рН 3,0) до мітки; рухома фаза "В" – 800 см³ ацетонітрилу внесли до мірної колби ємністю 1000 см³ та доводили об'єм фосфатним буферним розчином (рН 3,0) до мітки. Умови градієнтного елюювання наведені в таблиці.

Таблиця

Умови градієнтного елюювання

Час (хв.)	Концентрація РФ А %	Концентрація РФ В %
0 – 5	100	0
5 – 20	100 – 20	0 – 80
20 – 25	20	80
25 – 27	20 – 80	80 – 0
27 – 30	100	0

Результати й обговорення. У результаті експерименту були отримані хроматограми 1-фтор-2,4-динітробензолу та ДНФ-похідного СЗ дельта-амінолевулінової кислоти (рис.).

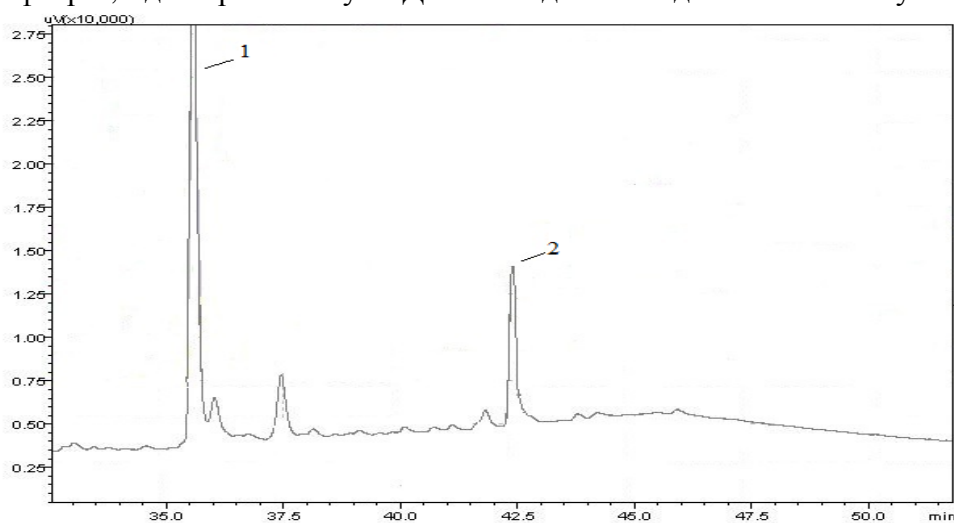


Рис. Хроматограма 1-фтор-2,4-динітробензолу (1); ДНФ-похідного СЗ АЛК (2).

Колонка: Reposil C18 150×2,0 мм, 3 мкм.
Елюент: фосфатний буфер – ацетонітрил.

Довжина хвилі: 360 нм.

Експериментальними дослідженнями встановлено, що для реагенту 1-фтор-2,4-динітробензолу, за даних умов хроматографування, характерна наявність піку з часом утримання 35,5 хв. Час утримання піку СЗ ДНФ-амінокислоти становив 42,5 хв.

Кількісний вміст дельта-амінолевулінової кислоти (X_i , мг/см³) розраховували за формулою:

$$X_i = \frac{S_i \times m_{oi} \times 0,1 \times 0,1 \times 10 \times 1000 \times P}{S_{oi} \times V \times 100 \times 100 \times 10 \times 100} = \frac{S_i \times m_{oi} \times P}{S_{oi} \times V \times 100000}, \text{ де:}$$

S_i — середнє значення площ піків ДНФ-похідного дельта-амінолевулінової кислоти, розраховане з хроматограм досліджуваного розчину;

S_{oi} — середнє значення площ піків ДНФ-похідного дельта-амінолевулінової кислоти, розраховане з хроматограм розчину стандартного зразка дельта-амінолевулінової кислоти;

m_{oi} — маса наважки стандартного зразка дельта-амінолевулінової кислоти, г;

V — об'єм досліджуваного зразка, см³;

P_i — вміст основної речовини у стандартному зразку дельта-амінолевулінової кислоти, %.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена методика кількісного визначення дельта-амінолевулінової кислоти методом обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії з градієнтним елююванням та передколонковою дериватизацією 1-фтор-2,4-динітробензолом.

2. Виявлені наступні оптимальні умови хроматографічного розподілу: колонка стальна С18 150×2,0 мм, 3,0 мкм; швидкість рухомої фази 0,4 см³/хв; температура термостату колонки 35 °С; довжина хвилі детектування 360 нм.

Перспективи подальших досліджень. Планується провести валідацію аналітичної методики кількісного визначення дельта-амінолевулінової кислоти.

DEVELOPMENT OF A METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DELTA-AMINOLEVULINIC ACID BY REVERSED- PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

K. A. Lapteva

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»

S U M M A R Y

Results of the development of a method of quantitative determination of delta-aminolevulinic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography with gradient elution and pre-column derivatization 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene are presented in the article. It has been determined next optimal conditions of chromatography selection: columns C18 150×2,0 mm, 3,0 μm; flow rate 0,4 ml/min; temperature 35 °C; detection 360 nm.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЛЬТА-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ОБРАЩЁННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е. А. Лантева

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты исследований разработки методики определения дельта-аминолевулиновой кислоты методом обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии с градиентным элюированием и предколоночной дериватизацией 1-фтор-2,4-динитробензолом. Выявлены следующие оптимальные условия хроматографического разделения: колонка стальная C18 150×2,0 мм, 3,0 мкм, скорость подвижной фазы 0,4 см³/мин, температура термостата колонки 35 °С, длина волны детектирования 360 нм.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Mauzerall D.* The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine [Text] / D. Mauzerall, S. Granick // J. Biol. Chem. — 1956. — № 219. — P. 435–446.
2. *Wada O.* A simple method for the quantitative analysis of urinary delta-aminolevulinic acid to evaluate lead absorption [Text] / O. Wada [et al.] // Br. J. Ind. Med. — 1969. — № 26. — P. 240–245.
3. *Tomokuni K.* Simple method for determination of urinary delta-aminolevulinic acid as an index of lead exposure [Text] / K. Tomocuni, M. Ogata // Clin. Chem. — 1972. — № 18. — P. 1534–1536.
4. *Okayama A.* Optimized fluorometric determination of δ -aminolevulinic acid by using pre-column derivatisation, and identification of the derivative [Text] / A. Okayama, S. Fujii, R. Miura // Clin. Chem. — 1990. — № 36. — P. 1494–1497.
5. *Шаповалова Е. Н.* Хроматографические методы анализа: метод. пособие для спец. курса [Текст] / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов. — М.: Изд-во МГУ им. М. В. Ломоносова, 2007. — 109 с.
6. *Буланова А. В.* Хроматография в медицине и биологии: учебное пособие [Текст] / А. В. Буланова, Ю. Л. Полякова. Федер. агентство по образованию. — 2-е изд. — Самара: Самарский университет, 2006. — 116 с.
7. *Бойченко А. П.* Алифатические карбоновые кислоты как новые модификаторы для разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот методом мицеллярной жидкостной хроматографии [Текст] / А. П. Бойченко, А. Ю. Куликов, Л. П. Логинова // Вестник Харьковского национального университета. Серия: Химия. — 2006. — № 731. — Вып.14 (37). — С. 101–111.