

УДК 612.461.251

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛАТОНИНА В МОЧЕ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**© 2014 г. М.А. Шаленкова,¹ З.Д. Михайлова,¹ Т.А. Басалгина,² А.П. Шишкина³¹Городская клиническая больница № 38, Н. Новгород²Клинический диагностический центр, Н. Новгород³«Химаналитсервис», Дзержинск

zinaida.mihailowa@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2012

Количественное определение метаболита мелатонина в моче в клинической лаборатории проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием твердофазной экстракции на концентрирующих патронах Диапак П. Разделение образцов проводили на колонке *Eurospher* 100-5 C 18 с УФ-детекцией при 223 нм. Элюент ацетонитрил–вода–изопропиловый спирт (объемное соотношение 30:70:0.1), скорость потока 1000 мкл/мин, давление 100 атм, температура комнатная. Простота, воспроизводимость и достаточная чувствительность метода в сочетании с возможностью его реализации на стандартном хроматографическом оборудовании (изократический насос высокого давления и УФ-детектор) делают его пригодным для клинического применения.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, мелатонин, моча, сверхсшитый полистирол, ишемическая болезнь сердца.

Введение

В настоящее время большой интерес проявляется к изучению физиологических свойств мелатонина (МТ) и путей его взаимодействия с различными системами организма. Для количественного определения МТ в различных биологических жидкостях могут быть использованы такие методы, как радиоиммунологический, биоопределение, флуориметрия, газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), определение с помощью ядерного магнитного резонанса или атомного силового микроскопа, спектрометрия (УФ), масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки [1]. Существующие методы ВЭЖХ-анализа реализуются, в основном, с использованием электрохимической детекции. В то же время можно определять МТ (его метаболит) в моче твердофазной экстракцией (ТФЭ) на сверхсшитом полистироле и быстрым разделением на колонках в обращенно-фазном варианте и детектированием МТ на УФ-детекторе [2–6].

Цель данной работы – использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения метаболита МТ в клинической практике.

Материалы и методы.**Биоматериал. Реактивы**

Пробы мочи для определения уровня секреции МТ по экскреции его основного метаболита

6-гидроксимелатонина (6-ГОМТ) собирали в отдельные емкости в период с 23.00 до 08.00 и с 08.00 до 23.00 часов. Пациенты информировались о недопустимости включения источников света в течение времени сбора проб. Замерялся общий объем мочи в пробах. Моча взбалтывалась, и из середины емкости отбиралось по 5 мл в полипропиленовую пробирку «*Deltalab*» (Испания). Пробы замораживались и хранились при температуре –20°С до момента проведения анализа. Каждая проба использовалась в рабочем процессе только один раз и повторному замораживанию не подвергалась.

Стандарт 6-гидроксимелатонина («*Sigma*») готовили в день исследования (метанолиз), проводили ТФЭ одновременно и аналогично с исследуемыми пробами: стандарт известной концентрации готовили в растворе фосфатного буфера, 5 мл этого раствора брали для ТФЭ аналогично пробам мочи. Ацетонитрил – HPLC, «Криохром», Санкт-Петербург; метанол – «х. ч.», «Вектон», Санкт-Петербург; хлороформ – стабилизированный 1% этанола, «х. ч.», ЗАО «ЭККОС-1», Москва.

Аппаратура и оборудование

Хроматограф жидкостный «Хромос-ЖХ-301» (ООО «Хромос», Дзержинск, 2011 г.). Спектрофотометрический детектор «*Sapphire-600*» («*Ecom*», Чехия), насос высокого давления «*Alpha-10*» («*Ecom*», Чехия), ручной инжектор Д-4 («*Ecom*», Чехия) с петлей на 20 мкл, ком-

Таблица

**Воспроизводимость результатов анализов
по времени удержания и площади хроматографического пика ($n = 7$)**

№	Время удержания, мин			Площадь хроматографического пика, мВ/мин			Концентрация, нг/мл		
	t_1	t_2	Δ	S_1	S_2	Δ	K_1	K_2	Δ
1	9.21	9.32	0.11	0.21	0.20	0.01	0.20	0.22	0.02
2	8.93	8.63	0.30	2.04	2.81	0.77	1.21	1.51	0.30
3	8.25	8.24	0.01	0.76	0.71	0.05	0.49	0.45	0.04
4	8.29	8.75	0.46	0.67	0.37	0.30	0.39	0.38	0.01
5	8.47	8.17	0.30	0.53	0.54	0.01	0.51	0.52	0.01
6	8.81	8.31	0.50	0.29	0.21	0.08	0.04	0.05	0.01
7	8.27	8.16	0.11	0.14	0.12	0.02	0.16	0.17	0.01
$M \pm SD$	8.6 \pm 0.38	8.51 \pm 0.42	–	0.81 \pm 1.01	0.85 \pm 1.32	–	0.43 \pm 0.39	0.47 \pm 0.49	–
t -критерий Стьюдента	0.23		–	0.37		–	0.18		–

пьютерная хроматографическая программа «Хромос», версия 2-12-29 (ООО «Хромос», Дзержинск). Колонка Eurosphere 100-5 C 18, размер зерна 5 мкм, диаметр 4 мм, длина 150 мм («Knauer», Германия). УФ-детекция при 223 нм. Элюент: ацетонитрил–вода–изопропиловый спирт (объемные соотношения 30:70:0.1). Скорость потока 1000 мкл/мин. Картриджи «Диапак-П» объемом 3 см³, содержащие 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200).

ТФЭ осуществляли с помощью манифолда на 12 картриджей и вакуумного микронасоса DAP-6D (Япония). Упаривание производили на водяной бане при температуре 60–65°C.

Экспериментальная часть

Метод измерений основан на определении 6-ГОМТ в моче на аналитической колонке в обращенно-фазном варианте с последующим детектированием на спектрофотометрическом детекторе. Результат анализа получали по методу абсолютной градуировки, используя в качестве параметра для расчета высоту хроматографического пика.

Стандарты без экстракции (без обработки). Для проведения градуировки готовили раствор стандарта с концентрацией 0.4 нг/мл. Для этого предварительно готовили раствор стандарта в метаноле с концентрацией 40 нг/мл. Затем полученный раствор разбавляли фосфатным буфером до концентрации 0.4 нг/мл. 20 мкл стандарта с концентрацией 0.4 нг/мл растворяли в 100 мкл элюента и вводили в петлю инжектора.

Гидролиз и экстракция. К 5 мл мочи добавляли равный объем 1% раствора серной кислоты. Нагревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 мин. Затем выдерживали пробы ~ 2 часа при температуре 20 \pm 5°C. Доводили до pH ~ 12.5–13 2.5M раствором NaOH и центрифугировали.

После гидролиза 5 мл пробы вводили само-теком в картридж, предварительно промытый последовательно 2 мл метанола и 2 мл воды.

Скорость загрузки не превышала ~ 0.5 мл/мин. После окончания загрузки промывали сорбент 3 мл дистиллированной воды. Высушивали 3–4 мин под небольшим вакуумом (–5 InHg) и элюировали 5 мл смеси хлороформ–метанол (3:1). Элюат упаривали досуха на водяной бане при температуре 60–65°C. Остаток растворяли в 100 мкл элюента и вводили в петлю инжектора.

Хроматография. Перед проведением анализа колонку уравнивали в течение 30 мин путем непрерывного прокачивания элюента. Затем в петлю инжектора вводили градуировочный раствор и регистрировали пик стандарта. Определение градуировочного коэффициента проводили ежедневно перед началом измерений с помощью программы «Хромос».

Условия построения градуировки и проведения анализа: длина волны 223 нм; элюент – ацетонитрил–вода–изопропиловый спирт (объемное соотношение 30:70:0.1); скорость потока 1000 мкл/мин.

Ориентировочное время удерживания 6-ГОМТ 8–10 минут. Предел обнаружения для 6-ГОМТ 0.001 нг/мл. Хроматограммы стандарта и исследуемого образца приведены на рис. 1 (а, б).

Статистическая обработка осуществлялась с помощью специализированного пакета прикладных программ «Statistica v.6» для Windows. Количественные данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t -критерия Стьюдента. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Исследовали пробы мочи пациентов с разными формами ишемической болезни сердца.

Результаты анализов проб мочи представлены в таблице.

Как видно из таблицы, при проведении парных исследований 7 образцов средние значения

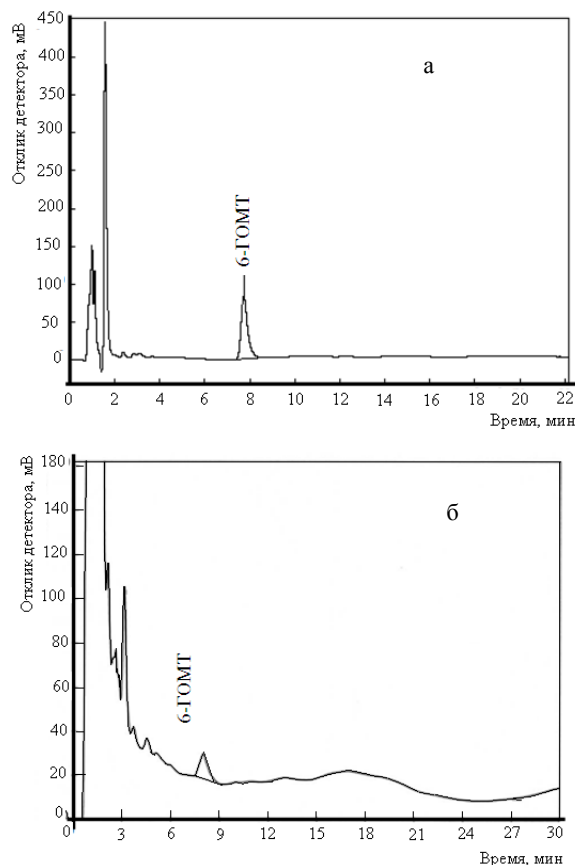


Рис. 1. Хроматограммы стандарта 0,4 нг/мл, разб. элюентом 100 мкл (а) и экстракта мочи пациента со стабильной стенокардией (б). Колонка Eurospher 100-5 С 18, размер зерна 5 мкм, диаметр 4 мм, длина 150 мм. УФ-детекция при 223 нм. Элюент: ацетонитрил-вода-изопропиловый спирт (30:70:0,1 v/v/v), 1000 мкл/мин, 100 бар. Концентрация 6-ГОМТ 0,157 нг/мл (б)

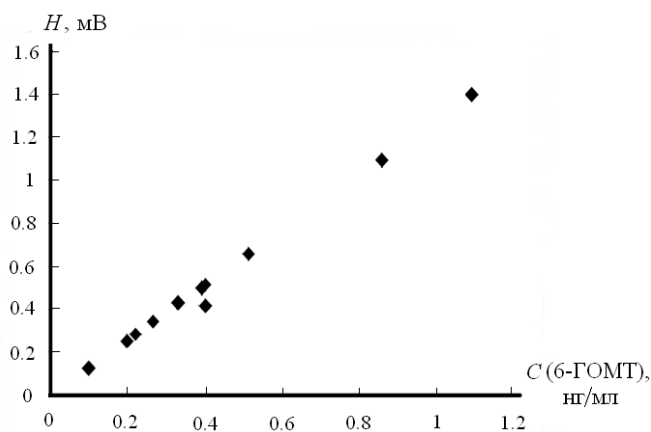


Рис. 2. График градуировочной зависимости между высотой хроматографического пика и концентрацией 6-ГОМТ в моче

и индивидуальные данные по времени удерживания, площади хроматографического пика, концентрации были сопоставимы, достоверных различий не выявлено ($p > 0.05$).

На рис. 2 представлен график градуировочной зависимости. Полученные данные свидетельствуют о линейной зависимости между высотой хроматографического пика и концентрацией 6-ГОМТ.

Полнота гидролиза исследуемого 6-ГОМТ устанавливалась эмпирическим путем и составляла

85%. Потери при осуществлении процессов сорбции и десорбции исследованного вещества – 20%.

Заключение

Простота, воспроизводимость и достаточная чувствительность метода в сочетании с возможностью его реализации на стандартном хроматографическом оборудовании (изократическом насосе и УФ-детекторе) делают его пригодным для клинического применения.

Авторы статьи выражают благодарность д.м.н. А.А. Дутову за методическую помощь.

Список литературы

1. Мелатонин: теория и практика / Под ред. С.И. Рапопорта, В.А. Голиченкова. М.: Медпрактика-М, 2009. 100 с.
2. Anderson G.M. Signal-to-noise optimization of HPLC-fluorometric systems and their application to the analysis of indoles // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991. № 294. P. 51–61.
3. Harumi T., Matsushima S. Separation and assay methods for melatonin and its precursors // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2000. № 747 (1–2). P. 95–110.

4. Middleton B. Measurement of melatonin and 6-sulphatoxymelatonin // *Methods Mol. Biol.* 2006. № 324. P. 235–254.

5. Minami M., Takahashi H., Inagaki H. et al. Novel tryptamine-related substances, 5-sulphatoxydiacetyltryptamine, 5-hydroxydiacetyltryptamine, and reduced melatonin in human urine and the determination of those compounds, 6-sulphatoxymelatonin, and melatonin with fluorometric HPLC // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. № 877 (8–9). P. 814–822.

6. Vieira R., Miguez J., Lema M., Aldegunde M. Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *Anal. Biochem.* 1992. № 205 (2). P. 300–305.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF MELATONIN IN URINE BY HPLC

M.A. Shalenkova, Z.D. Mikhailova, T.A. Basalgina, A.P. Shishkina

The quantitative determination of a urinary melatonin metabolite by HPLC in the clinical laboratory has been carried out using Diapak P solid-phase extraction cartridges. The samples were separated on a Eurospher 100-5-C18 column with ultraviolet detection at 223 nm. Eluent composition was acetonitrile-water-isopropyl alcohol (30:70:0.1) (v/v/v), flow rate was 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$, pressure was 100 bar, the procedure was performed at room temperature. Simplicity, reproducibility and sufficient sensitivity of this method combined with a possibility of its implementation on standard chromatography equipment (an isocratic high-pressure pump and a UV detector) makes it suitable for clinical applications.

Keywords: high-performance liquid chromatography (HPLC), melatonin, urine, ultra cross-linked polystyrene, ischemic heart disease.

References

1. Melatonin: teorija i praktika / Pod red. S.I. Rapoport, V.A. Golichenkova. M.: Medpraktika-M, 2009. 100 s.
2. Anderson G.M. Signal-to-noise optimization of HPLC-fluorometric systems and their application to the analysis of indoles // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991. № 294. P. 51–61.
3. Harumi T., Matsushima S. Separation and assay methods for melatonin and its precursors // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2000. № 747 (1–2). P. 95–110.
4. Middleton B. Measurement of melatonin and 6-

sulphatoxymelatonin // *Methods Mol. Biol.* 2006. № 324. P. 235–254.

5. Minami M., Takahashi H., Inagaki H. et al. Novel tryptamine-related substances, 5-sulphatoxydiacetyltryptamine, 5-hydroxydiacetyltryptamine, and reduced melatonin in human urine and the determination of those compounds, 6-sulphatoxymelatonin, and melatonin with fluorometric HPLC // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. № 877 (8–9). P. 814–822.

6. Vieira R., Miguez J., Lema M., Aldegunde M. Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *Anal. Biochem.* 1992. № 205 (2). P. 300–305.