

31. Mochler P.J., Zhu M.Y., Blade A.M. et al. Identification of a novel isoform of microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (37): 26 981–8.
32. Mann C.J., Troussard A.A., Yen F.T. et al. Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 31 348–54.
33. Qin B., Dawson H., Anderson R.A. Elevation of tumor necrosis factor- α induces the overproduction of postprandial intestinal apolipoprotein B48-containing very low-density lipoprotein particles: evidence for related gene expression of inflammatory, insulin and lipoprotein signaling in enterocytes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2010; 235 (2): 199–205.
34. Cohen P., Friedman J.M. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J. Nutr.* 2004; 134: 2455S–63S.
35. Gable D.R., Hurel S.J., Humphries S.E. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 231–44.
36. Veilleux A., Caron-Jobin M., Noel S. et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011; 60: 1504–11.
37. Henson P.M., Bratton D.L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 22 773–7.
38. Nakamura Y., Ueshima H., Okuda N. et al. Relation of Serum Leptin and Adiponectin Level to Serum C-Reactive Protein: The INTER-LIPID Study. *Int. J. Vasc. Med.* 2013; 2013: 601364.
39. Frigolet M.E., Torres N., Tovar A.R. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24 (12): 2003–15.
40. Fonseca-Alaniz M.H., Takada J., Alonso-Vale M.I., Lima F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J. Pediatr.* 2007; 83 (5): S192–203.
41. Robinson K., Prins J., Venkatesh B. Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Critic. Care*. 2011; 15: 221–30.
42. Gonzalez S., Lopez P., Margolles A. et al. Fatty acids intake and immune parameters in the elderly. *Nutr. Hops.* 2013; 28 (2): 474–8.
43. Parakhonskiy A.P. Autocrine and paracrine cytokine regulation of immune response. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. 2007; 8: 57–8. (in Russian)
44. Dilman V.M. *Large biological clock (an introduction to integrative medicine)*. Moscow: Znanie; 1982. (in Russian)
45. Anisimov V.I. *Molecular and physiological mechanisms of aging*. Sankt-Peterburg: Nauka; 2008. (in Russian)
46. Hellmuth C., Demmelair H., Schmitt I. et al. Association between plasma nonesterified fatty acids species and adipose tissue fatty acid composition. *PLOS One*. 2013; 8 (10): e74927.

Received 24.06.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.633-074:543.544.45

Дутов А.А., Никитин Д.А., Терешков П.П., Мартынова А.В., Сверкунова А.В., Ермолина А.В., Лукьянова Ю.Л.

ОДНОВРЕМЕННЫЙ АНАЛИЗ СВОБОДНЫХ КАТЕХОЛАМИНОВ И МЕТАНЕФРИНОВ В МОЧЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙ НА ПОЛИМЕРНОМ СОРБЕНТЕ (PUROSEP-200)

Лаборатория экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672090, г. Чита

Предложен метод одновременного определения свободных катехоламинов и свободных метанефринов в моче с помощью обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической детекцией. Твердофазная экстракция выполнялась на картриджах с 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200). Простота, воспроизводимость и достаточная чувствительность метода позволяют использовать его в клинической практике для диагностики феохромоцитом.

Ключевые слова: свободные катехоламины; метанефрин; норметанефрин; твердофазная экстракция; сверхсшитый полистирол; высокоэффективная жидкостная хроматография.

Для цитирования: *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (8): 23–25.

Dutov A.A., Nikitin D.A., Tereshkov P.P., Martynova A.V., Sverkunova A.V., Ermolina A.V., Lukyanova Yu.L.

THE SIMULTANEOUS ANALYSIS OF FREE CATECHOLAMINES AND METANEPHRINES IN URINE USING TECHNIQUE OF HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORIMETRIC DETECTION AND SOLID PHASE EXTRACTION ON POLYMERIC SORBENT (PUROSEP-200)

The laboratory of experimental and clinical biochemistry and immunology of the research institute of molecular medicine of the Chita state medical academy of Minzdrav of Russia, 672090 Chita, Russia

The article considers the technique of simultaneous detection of free catecholamines and free metanephrines in urine using inverse phase highly effective liquid chromatography with fluorimetric detection. The solid phase extraction was implemented on cartridges with 30 mg of hyper cross-linked polystyrene (Purosep-200). The simplicity, reproducibility and sufficient sensitivity of technique permit applying it in clinical practice to diagnose pheochromocytoma.

Key words: free catecholamines; metanephrine; normetanephrine; solid phase extraction; hyper cross-linked polystyrene; highly effective liquid chromatography

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (8): 23–25. (in Russ.)

Для корреспонденции: Дутов Алексей Александрович, dutovaa@yandex.ru

For correspondence: Dutov A.A., dutovaa@yandex.ru

Введение. Известно достаточно много исследований по определению катехоламинов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), выполненных в основном с использованием электрохимической детекции. Разработаны и полностью роботизированные методы [1–3]. В последнее время особое внимание уделяется промежуточным метаболитам катехоламинов – метанефрину и норметанефрину [4] (рис. 1). В обстоятельном обзоре [5] убедительно показано, что анализ свободных метанефринов мочи является самым высокочувствительным и специфичным тестом для диагностики феохромоцитомы и превосходит все остальные, такие как определение ванилилминдальной кислоты в моче, катехоламинов в моче и плазме.

Поскольку катехоламины и метанефрины являются высокополярными соединениями, твердофазная экстракция (ТФЭ) на гидрофобных C18-сорбентах недостаточно эффективна, а на катионообменниках – довольно трудоемка. Известно только одно исследование по ТФЭ катехоламинов (но не метанефринов) на полимерном сорбенте (картриджи Oasis HLB, Waters Corp., USA) по стандартному протоколу [6].

Нами разработан простой метод одновременного определения свободных катехоламинов и свободных метанефринов в моче с ТФЭ на отечественном полимерном сорбенте на основе сверхсшитого полистирола (Purosep-200)¹.

Материалы и методы. Использовали следующие реактивы: эпинефрина гидрохлорид, или адреналин (Sigma), D,L-норэпинефрина гидрохлорид, или норэпинефрин (Aldrich), дофамин гидрохлорид (Sigma), D,L-норметанефрина гидрохлорид (Sigma), D,L-метанефрина гидрохлорид (Sigma) и фенилэфрин, или мезатон (ОЗ ГНЦДС, Украина). Сухие вещества растворяли в 0,05 М HCl (100 нг/мкл) и хранили в холодильнике при +4°C (сохраняются до 1 мес). Фенилэфрин в ампулах, используемый в качестве внутреннего стандарта (IS), разбавляли 0,05 М HCl до концентрации 100 нг/мкл и хранили в тех же условиях. Использовались также ацетонитрил (ОСЧ, “Криохром”, Россия), ацетон (ОСЧ, “Реактив”, Россия), метанол (ХЧ, “Вектон”, Россия), трифторуксусная кислота (TFA, 99%, Panreac, Испания). Фосфатный буфер 0,25 М pH 8,0 готовили смешиванием Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄ (Fluka) в соответствующих пропорциях [7].

Аппаратура и оборудование: флюориметрический детектор RF-10AXL (Shimadzu, Япония), насос высокого давления LC-20AT Prominence (Shimadzu, Япония), ручной инжектор 7725i Rheodyne (США) с петлей на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа «Мультихром» версии 3.0 («Амперсанд», Россия); колонка Synergi Hydro-RP (Phenomenex, США) 150 x 4,6 мм, 4 мкм, около 7000 ТТ с защитным предколоночным фильтром (Supelco, США). Флюориметрическая детекция ex280–em320 нм, чувствительность средняя (Sens=2, Gain=1). Элюент: ацетонитрил-вода-TFA (2:98:0.1, v/v/v²), скорость потока 1000 мкл/мин, давление 72 бара. Применялись картриджи на основе полипропиленовых шприцов объемом 3 мл с фторопластовыми фильтрами (Supelco, США), упакованные 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200) по собственной технологии: готовили 30 мг суспензии сорбента в 3 мл изопропанола, интенсивно перемешивали и быстро вводили в картридж. Упаковка осуществлялась самотеком. ТФЭ проводилась с помощью мани-

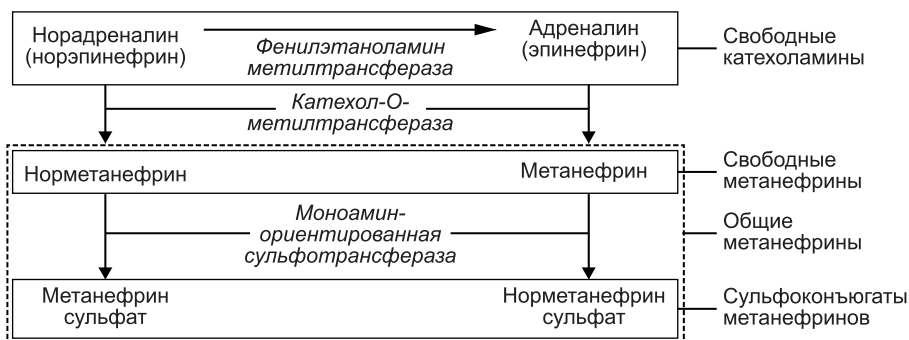


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая пути метаболизма катехоламинов в свободные и сульфоконъюгированные метанефрины [4].

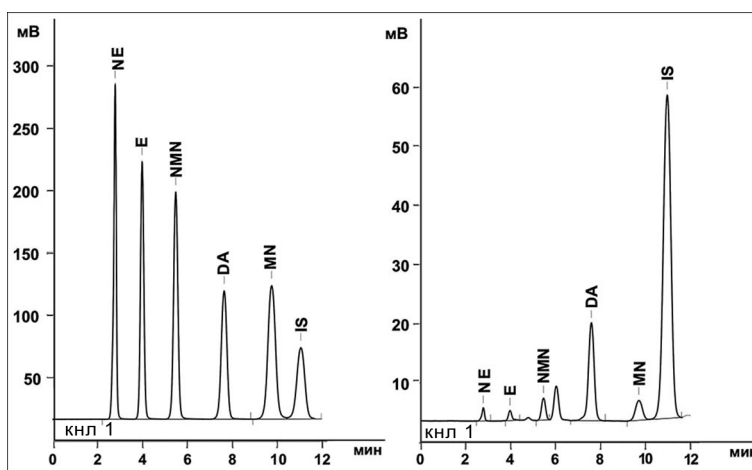


Рис. 2. Хроматограммы стандартных образцов и экстракта мочи.

NE – норэпинефрин, E – адреналин, NMN – норметанефрин, DA – дофамин, MN – метанефрин, IS – внутренний стандарт (фенилэфрин).

фолда на 12 картриджах (Merck, Германия) и вакуумного насоса KNF Lab (США). Упаривание проводили в стеклянных стаканчиках объемом 5 мл Simax (Чехия) в электрошкафу с пассивной конвекцией СНОЛ-3.5 (“Рембыттермо”, Россия). Статистическая обработка результатов выполнена с помощью GraphPad Prism 5.

Результаты и обсуждение. В банку для сбора суточной мочи добавляли 20 мл 6 М HCl и собранный биоматериал хранили в холодильнике [8]. Аликвоту из суточной мочи отбирали в полипропиленовую пробирку объемом 2 мл и доставляли в лабораторию. Стабильна в холодильнике до 2 нед.

Картриджи промывали 1 мл ацетона, 1 мл метанола и 1 мл воды. К 1 мл аликвоты суточной мочи добавляли 0,2 мл 0,25 М фосфатного буфера pH 8,0 и 10 мкл IS (100 нг/мкл). Загружали в картридж самотеком, скорость не превышала 2 мл/мин. Промывали сорбент картриджа 1 мл смеси метанол-вода (2:1, v/v), 1 мл воды с 10 мкл TFA и 1 мл воды. Высушивали под вакуумом в течение 1 мин и элюировали катехоламины и метанефрины 1 мл метанола с 10 мкл TFA. Упаривали в термостате при 60°C, сухой остаток растворяли в 100 мкл воды и 10 мкл вводили в петлю инжектора (содержит 100 нг IS и эквивалентно 0,1 мл мочи).

Типичные хроматограммы представлены на рис. 2. Разработка метода включала оптимизацию экстракции (загрузка, промывка, элюирование) и хроматографического разделения. Загрузку оптимально проводить при слабощелочном pH от 7 до 9. Промывка только водой дает “грязные” экстракты, потому целесообразнее проводить ее нейтральным водным метанолом (50–75%). Дополнительная промыв-

¹ Сорбент предоставлен проф. В.А. Даванковым, ИНЭОС РАН, Москва.

² Здесь и далее: volume/volume, т. е. объемные соотношения.

Свободные катехоламины и метанефрины в моче (данные литературы и собственные наблюдения)

Показатель	Концентрация, мкг/сут		
	[2]	[3]*	собственные данные (n = 12)**
Норадреналин	15–80	–	27,31 (10,33–44,27)
Адреналин	0–20	–	10,65 (5,02–17,18)
Норметанефрин	–	39 (7–158)	57,7 (37,33–78,12)
Дофамин	65–400	–	286,1 (227,80–344,10)
Метанефрин	–	16 (1,6–192)	38,5 (29,95–47,10)

Примечание. * – в скобках разброс значений; ** – в скобках интерквартильный размах.

ка сильно разбавленной TFA устраняет большинство полярных урохромов. Элюирование можно проводить метанолом с 1% TFA или ацетоном с 1% TFA. В последнем случае достигается существенное сокращение времени упаривания, однако экстракция на 15–20% меньше в сравнении с метанолом.

Хроматографическое разделение оптимально проводить на колонках, упакованных специализированным сорбентом, предназначенным для работы с “чисто” водными элюентами, не содержащими органического компонента. Возможно разделение и на традиционных колонках с октадецилсиликагелем (C18), однако в этом случае часто наблюдается нестабильность времен удерживания, обычно в сторону укорочения.

Выход из процедуры экстракции составил $77 \pm 4,4\%$ ($n = 12$, $p = 0,05$), что можно считать вполне удовлетворительным, особенно с учетом высокой чистоты экстрактов.

Предел количественного обнаружения составил 0,07 нг для норадреналина, 0,09 нг для эпинефрина и норметанефрина, 0,2 нг для дофамина и метанефрина и 0,4 нг для IS на инъекцию при соотношении сигнал/шум = 10.

В литературе в основном приводятся сведения по содержанию общих метанефринов, а данные по содержанию свободных катехоламинов и метанефринов в моче немногочисленны (см. таблицу).

В целом наши результаты совпадают с литературными. Однако, даже несмотря на небольшое количество наблюдений (здоровые нормотензивные добровольцы в возрасте от 18 до 45 лет), вариабельность результатов заметно ниже в сравнении с данными литературы.

С учетом простоты, хорошей воспроизводимости и достаточной чувствительности предлагаемый метод может быть использован в клинической лабораторной практике для диагностики феохромоцитом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Green B., Cooper J. D., Turnell D. C. An automated method for the analysis of urinary free catecholamines using ASTED and high pressure liquid chromatography. *Ann. Clin. Biochem.* 1989; 26: 361–7.
- Pastoris A., Cerutti L., Sacco R., De Vecchi L., Sbaifi A. Automated analysis of urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography and on-line sample pretreatment. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995; 664 (2): 287–93.
- Said R., Robinet D., Barbier C., Sartre J., Huguet C. Fully automated high-performance liquid chromatographic assay for the analysis of free catecholamines in urine. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1990; 530: 11–8.
- Eisenhofer G. Free or Total Metanephrines for Diagnosis of Pheochromocytoma: What Is the Difference? *Clin. Chem.* 2001; 47 (6): 988–9.
- Boyle J.G., Davidson D.F., Perry C.G., Connell J.M.C. Comparison of Diagnostic Accuracy of Urinary Free Metanephrines, Vanillyl Mandelic Acid, and Catecholamines and Plasma Catecholamines for Diagnosis of Pheochromocytoma. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2007; 92 (12): 4602–8.
- Vuorensola K., Siren H. Determination of urinary catecholamines with capillary electrophoresis after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.* 2000; 895: 317–27.
- Dawson R., Elliott D., Elliott W., Jones K. *Reference book for biochemists.* Moscow: Mir; 1991. [Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика* (пер. с англ.). М.: Мир; 1991].
- Tietz N.U., ed. *Clinical guide to laboratory tests.* St. Louis; 2006. [Титц Н.У., ред. *Энциклопедия клинических лабораторных тестов.* М.: Лабинформ; 1997].

Поступила 11.08.14

Received 11.08.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.153:577.152.311:074:613.6

Бадамшина Г.Г., Бакиров А.Б., Гимранова Г.Г., Валеева О.В.

ХОЛИНЭСТЕРАЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ У РАБОТНИКОВ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

ФБУН “Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ, 450106, Республика Башкортостан, г. Уфа

Биохимическое исследование активности сывороточной холинэстеразы у работников промышленного предприятия проведено на примере нефтехимического производства. Проанализированы показатели средней активности фермента и распространенность показателей, выходящих за пределы референтных значений, в зависимости от стажа работы на производстве, профессии и заболеваний, выявленных у работников. Установлены основные болезни, профессиональные и стажевые группы, в которых активность холинэстеразы значительно изменяется. Показано влияние стажа и профессии на уровень активности фермента в сыворотке крови.

Ключевые слова: сывороточная холинэстераза; биохимическое обследование; здоровье работников промышленных предприятий; нефтехимическое производство.

Для цитирования: *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; 60 (8): 25–29.

Для корреспонденции: Бадамшина Гульнара Галимяновна, gulyabakirova@yandex.ru

For correspondence: Badamshina G.G., gulyabakirova@yandex.ru