



Аналитические возможности жидкостного хроматографа «Маэстро ВЭЖХ» с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD на примере определения маннитола, лактулозы, сукралозы для диагностики воспалительных заболеваний кишечника.

Яшин А. Я. к. х. н., ведущий инженер отдела исследований и разработок, ООО Интерлаб, Россия, Москва

Ключевые слова

Жидкостная хроматография, «тройной сахарный тест», воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния

Резюме

Показаны аналитические возможности Маэстро ВЭЖХ для определения маннитола, лактулозы и сукралозы. Представлены примеры определения указанных соединений в моче.

Введение

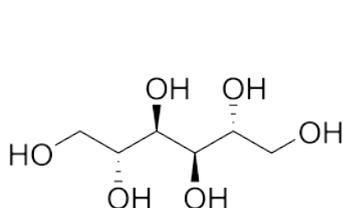
Диагностика воспалительных заболеваний кишечника является актуальной задачей в медицине. К таким заболеваниям относятся болезнь Крона и язвенный колит. Несмотря на то, что частота подобных заболеваний составляет от нескольких десятков до нескольких сотен на 100 тысяч населения, с каждым годом происходит их постоянный рост. По некоторым данным возникновение воспалительных заболеваний кишечника связано с дисбалансом иммунного ответа у генетически предрасположенных лиц, а к основным провоцирующим факторам этого нарушения относят факторы окружающей среды и кишечную микробиоту.

Для оценки тонкокишечной проницаемости используется так называемый “двойной сахарный тест”, т.е. определение соотношения лактулозы и маннитола в моче. Однако, такой тест не применим для оценки толстокишечной проницаемости, т.к. лактулоза переваривается бактериями толстой кишки. С этой целью предложено применять сукралозу (синтетический подсластитель), которая остается неизменной в толстой кишке. Комбинация оценки проницаемости тонкой кишки с помощью отношения лактулоза/маннитол, а толстой кишки – с помощью содержания сукралозы в моче получила название “тройного сахарного теста”.

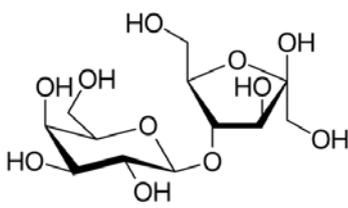
Содержание сахаров в моче обычно определяют с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве детектора для определения сукралозы применяют рефрактометрический детектор, а для определения лактулозы и маннитола чаще всего амперометрический детектор, работающий в импульсном режиме, т.к. чувствительности рефрактометрического детектора может не хватить для определения этих сахаров в моче.

В настоящей работе предлагается использовать один детектор - низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния МАЭСТРО ELSD для определения как лактулозы, маннитола, так и сукралозы в моче.

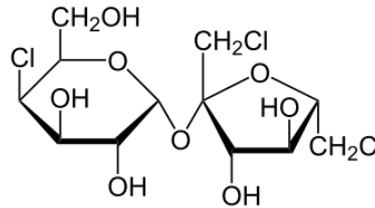
Маннитол



Лактулоза



Сукралоза



Экспериментальная часть

Для анализа использовали чистые вещества фирмы *Sigma-Aldrich*:

Маннитол (стандарт, не менее 99%)

Лактулоза (стандарт, не менее 99%)

Сукралоза (стандарт, не менее 99%)

Ацетонитрил для ВЭЖХ;

Инструменты:

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD

Колонка Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 2 мм

Скорость потока 0,4 мл/мин

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – Вода, А:В (15:85)

Колонка Phenomenex Luna NH2 150x4,6 мм, 5 мкм

Скорость потока 1,2 мл/мин

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – Вода, А:В (80:20)

Результаты и обсуждения

Для разделения маннитола и лактулозы обычно применяют колонки с катионообменником, либо с сорбентом с привитой NH₂ фазой. Для разделения сукралозы необходима обращено-фазная колонка с привитыми группами C18.

Для разделения маннитола и лактулозы выбрана колонка Phenomenex Luna NH₂ 150x4,6 мм, 5 мкм, а для разделения сукралозы Phenomenex Luna C18(2) 150x2 мм, 5 мкм. Были подобраны оптимальные условия разделения и детектирования анализируемых соединений. Ниже приведены типичные хроматограммы разделения маннитола, лактулозы и сукралозы, а также метрологические характеристики.

Хроматограмма стандартной смеси маннитол, лактулоза

Условия разделения: Аналитическая колонка: Phenomenex Luna NH₂ 150x4,6 мм, 5 мкм; элюент: А – ацетонитрил, В – вода (80:20); расход элюента: 1,2 мл/мин; температура колонки: 25 °С; дозируемый объем: 10 мкл; детектор: МаэстроELSD, температура испарителя 30 °С, газ – N₂, коэффициент усиления 8, фильтр 5 сек.

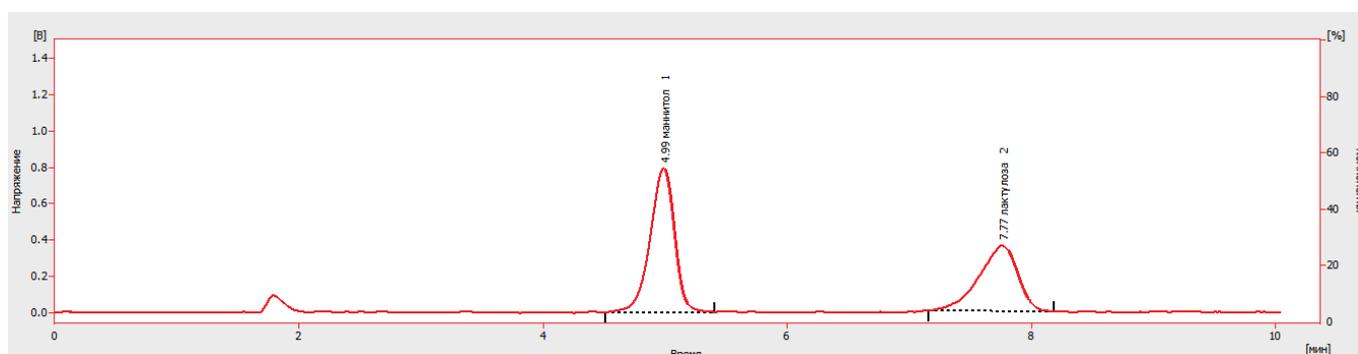


Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Маннитол)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мВ.сек]	Высота [мВ]
Среднее значение	5.01	10715.2508	772.1680
СКО %	0.54	0.85	0.88
1	5.002	10620.068	770.022
2	5.003	10665.079	772.168
3	4.989	10674.358	779.022
4	5.059	10774.938	761.981
5	5.019	10841.811	777.647

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Лактулоза)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мВ.сек]	Высота [мВ]
Среднее значение	7.79	8125.4580	350.6236
СКО %	0.04	0.80	0.78
1	7.792	8026.026	351.287
2	7.796	8116.62	348.612
3	7.798	8121.832	347.448
4	7.791	8162.465	354.479
5	7.793	8200.347	351.292

Хроматограмма раствора стандарта сукралозы

Условия разделения: Аналитическая колонка: Phenomenex Luna C18(2) 150x2 мм, 5 мкм; элюент: 15% (v/v) ацетонитрил/вода; расход элюента: 0,4 мл/мин; температура колонки: 25 °С; дозируемый объем: 20 мкл; детектор: МаэстроELSD, температура испарителя 30 °С, газ – N₂, коэффициент усиления 7, фильтр 4 сек.

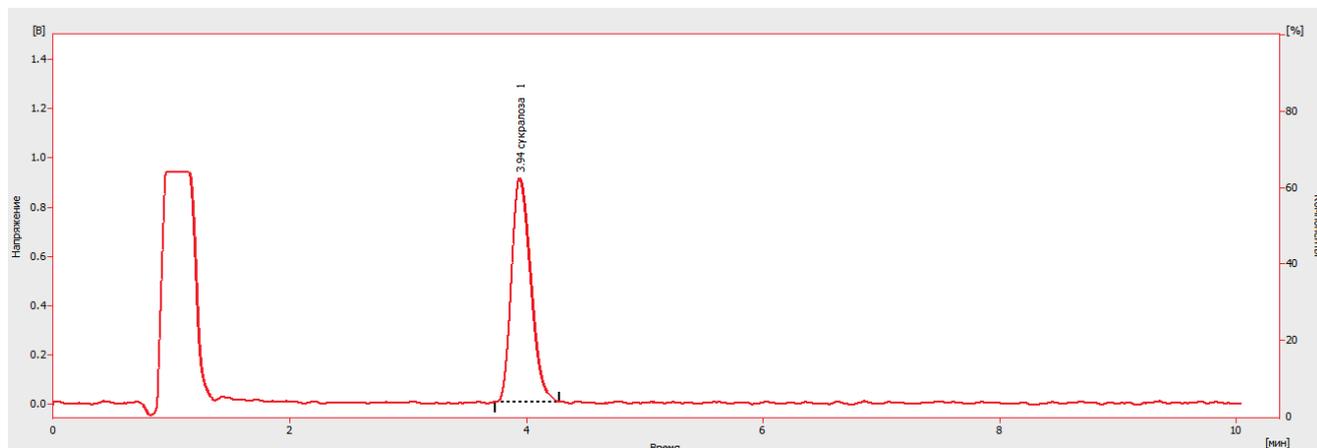
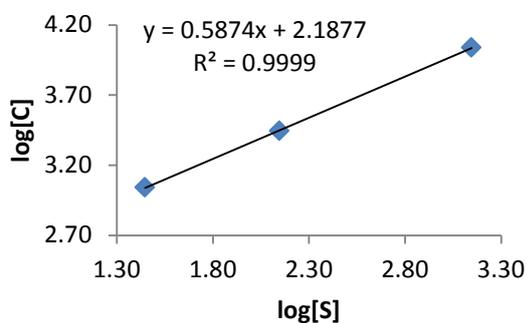


Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – Сукралоза)

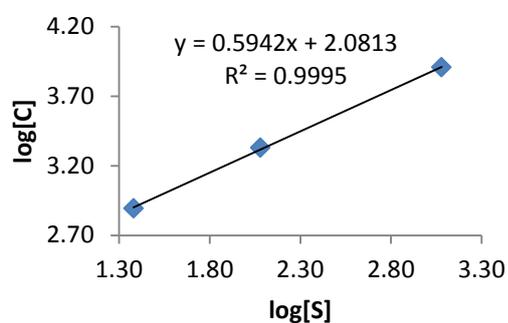
Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мВ.сек]	Высота [мВ]
Среднее значение	3.934	10276.7966	902.9354
СКО %	1.0	2.3	0.5
1	3.889	10117.714	908.298
2	3.908	10576.457	896.674
3	3.924	10162.345	901.156
4	3.956	10042.775	902.396
5	3.993	10484.692	906.153

Для определения сахаров в моче были построены градуировочные графики:

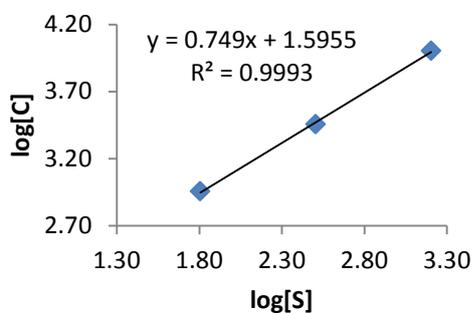
Маннитол



Лактулоза



Сукралоза

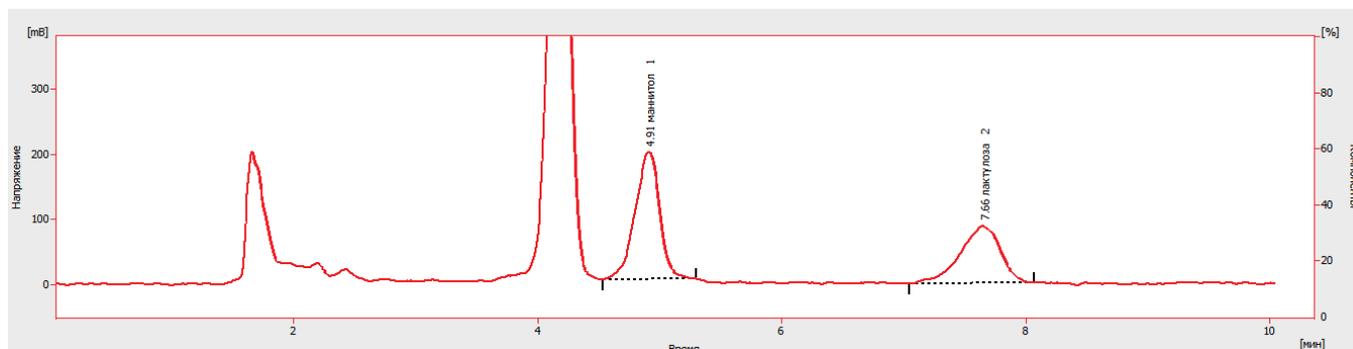


Расчетные пределы детектирования составили: для маннитола $5 \cdot 10^{-8}$ г/мл, для лактулозы $7 \cdot 10^{-8}$ г/мл и для сукралозы $3 \cdot 10^{-7}$ г/мл.

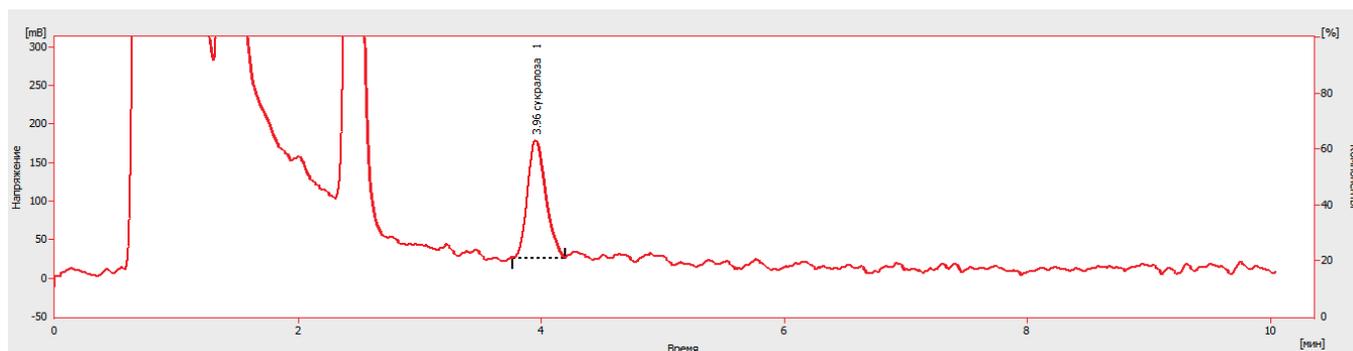
Процедура оценки кишечной проницаемости – «тройной сахарный тест» заключается в следующем [1, 2]. Пациентам предлагается выпить 100-150 мл раствора, содержащего по несколько грамм каждого компонента (маннитола, лактулоза, сукралоза). Отбор мочи осуществляется в течении 24 часов в специальный контейнер, содержащий консервант. За 48 часов до проведения анализа пациент должен воздержаться от приема алкоголя [1].

Для пробоподготовки мочи рекомендовано применять методику на основе работ [1,2].

Ниже представлены хроматограммы разделения маннитола, лактулозы и сукралозы в моче. Предварительно в образец мочи были добавлены сахара в концентрациях, обычно определяемых после проведения «тройного сахарного теста».



	Время уд. [мин]	Площадь [mB.сек]	Высота [mB]	Количество [мг/л]	Название вещества
1	4.914	2701.114	195.065	93.684	маннитол
2	7.661	2012.528	87.996	99.675	лактюлоза



	Время уд. [мин]	Площадь [mB.сек]	Высота [mB]	Количество [мг/л]	Название вещества
1	3.957	1575.399	152.034	137.604	сукралоза

Как видно из представленных данных, определение сахаров с помощью жидкостного хроматографа «МаэстроВЭЖХ» с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD дает однозначную информацию об их содержании в анализируемом образце, что в свою очередь, позволит врачу точно поставить диагноз пациенту.

Выводы

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD может быть использован в клинической лабораторной практике медицинскими диагностическими лабораториями для выявления воспалительных заболеваний кишечника.

Литература

1. Anderson, A. D. G., Jain, P. K., Fleming, S., Poon, P., Mitchell, C. J. and MacFie, J. (2004), Evaluation of a triple sugar test of colonic permeability in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*, 182: 171–177.
2. Camilleri, M.; Nadeau, A.; Lamsam, J.; Nord, S. L.; Ryks, M.; Burton, D.; Sweetser, S.; Zinsmeister, A. R.; Singh, R., Understanding measurements of intestinal permeability in healthy humans with urine lactulose and mannitol excretion. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2010, 22, e15-26.

За дополнительной информацией обращайтесь в компанию Интерлаб



Московская обл., Красногорский р-н, д.
Гаврилково, ЭЖК Эдем, квартал 5, д.12
т. (495) 788-09-83, ф. (495) 755-77-61
www.interlab.ru
e-mail: interlab@interlab.ru

Екатеринбург:
т. (343) 379-57-33,
ф. (343) 379-57-34
e-mail: ural@interlab.ru

Новосибирск:
т. (913)783-12-31
e-mail: zverevav@interlab.ru

Санкт Петербург:
т/ф. (812)643-14-23
e-mail: spb@interlab.ru