



МЕДИЦИНСКИ
УНИВЕРСИТЕТ
ПЛОВДИВ

Приложимост на хроматографски колони C18 с пълнеж тип „твърда сърцевина“ за анализ на мастни киселини в кръвна плазма

Десислав Томов¹, Йорданка Узунова^{1,2}, Видка Диварова³, Венета Гиздакова², Мария Орбецова⁴

¹Катедра Биоорганична химия, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив, ²Научноизследователски институт на МУ-Пловдив, ³Катедра Химични науки, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив, ⁴Катедра Ендокринология, Медицински факултет, МУ-Пловдив

Въведение: Свободните мастни киселини (СМК) са много малка част (3-10%) в сравнение с останалата част участващи в триацилглицероли, фосфолипиди или холестеролови естери, но са основен участник както в енергийния метаболизъм, така и в сигналната система на организма. Тяжната плазмена концентрация се влияе от мастната тъкан, храненето, микробиота, физическите усилия и действието на няколко хормона. Повишената им концентрация се свързва с периферна инсулинова резистентност в мускулите, повишен синтез на глюкоза в черния дроб, намален синтез на азотен окис в ендотела и намаляване на периферното кръвоснабдяване.

Целта е разработване на течно-хроматографски метод с мас спектрометрична детекция за количествено определяне на свободни мастни киселини в кръвна плазма с използването на C18 хроматографска колона с пълнеж тип „твърда сърцевина“.

Материали и методи:

Работните разтвори на миристинова и лигноцеринова киселина бяха приготвени в 100% метанол. 98 % мравчена киселина за приготвяне на подвижната фаза.

Апаратура: течен хроматограф UHPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 с тройноквадруполен детектор TSQ Quantum Access Max.

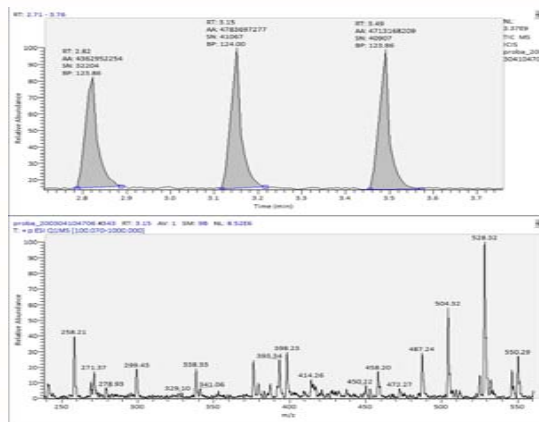
Хроматографски условия: хроматографска колона тип „твърда сърцевина“ RPMS Accucore C18. Използвани мобилни фази : (А) 90% ацетонитрил + 0.1% мравчена киселина, (В) метанол/2-пропанол/вода (72:9:19, v/v/v) и (С) 100% метанол. Хроматографското разделяне се извърши с градиентно елуиране с подвижни фази В и С, при поток 0.2 mL/min. За детекция на анализите се приложи електроспрей йонизация със загряване (HESI)



Фигура 1. Използвани типове хроматографски колони по литературни данни

в режим отрицателна йонизация с напрежение на спрея - 3000V; температура на йонния източник – 300 °C; носещ газ-30 единици; спомагателен газ-2 единици; температура на трансферната капилара 300 °C.

Резултати и обсъждане: От прегледа на научната литература, беше установено основно използването на C18 хроматографски колони за анализ на свободни мастни киселини (фиг.1). Едни от последните въведени в употреба C18 колони са тези с пълнеж тип „твърда сърцевина“.



Фигура 2. Спектрограма получена при директно инжектиране на стандартен разтвор на лигноцеринова киселина в поток от 90% ацетонитрил + 0.1% мравчена киселина. Не се установи молекулен йон на лигноцериновата киселина (368.6)

Използваната фаза А съдържаща 0.1% мравчена киселина доведе до силно потискане на йонизацията и отпадна от следващите експерименти (фиг2). С цел повишаване елуиращата сила на подвижната фаза използвахме допълнителен органичен модификатор 2-пропанол. Депротонирани молекули на анализите бяха използвани като прекурсорен и продуктово йон в SRM – режим на работа на мас детектора. Наблюдаваният преход за миристиновата киселина беше 227.06 → 227.06, а за лигноцериновата 367.3 → 367.2. Използването на SRM преход прекурсорен йон → прекурсорен йон, при недобро разбиване на основния йон в колизионната клетка, е прието и допустимо. Като колизионен газ използвахме аргон, с налягане 1.5 bar; и колизионната енергия е 12 V. Проведените експерименти с последователно инжектиране на разтвор на миристинова киселина с

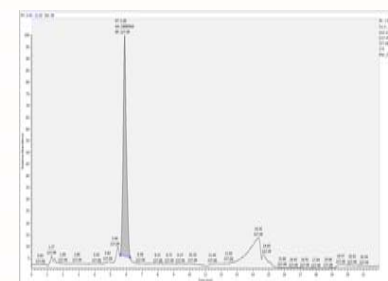
концентрация 2µg/L (фиг.3) и чист разтворител (100% метанол) през хроматографската колона показва наличие на „carry-over“ ефект в значително голям процент (≈13%). Модификацията на хроматографския метод с промиване на колоната с 100% метанол намали чувствително, но не доведе до пълно неутрализиране на ефекта на пренасянето. Многократното миене на колоната със силни елуенти като 100% ацетонитрил, 100% метанол и комбинацията

им с 2-пропанол също не доведе до пълното преодоляване на този ефект (табл.1). Значителният ефект на пренасяне, неповлияващ се от силата на елуента показва наличие на силна адхезия на анализирани молекули към неподвижната октадецил фаза.

Изводи:

1. Проведените експерименти с C-18 RPMS хроматографска колона с пълнеж тип „твърда сърцевина“ показаха неприложимостта ѝ за целите на проучването.
2. За елиминиране или свеждане до минимум на ефекта на пренасяне за анализирани мастни киселини са необходими допълнителни експерименти с хроматографска колона с по-ниска хидрофобност.

Изследването се финансира от МУ– Пловдив по проект ДПДП 15/2019.



Фигура 3. Хроматограма получена при анализ на разтвор на миристинова киселина (2µg/L) инжектирана през колона Accucore RPMS C-18.

Проба	площ на пиковете				
	1	2	3	4	5
миристинова киселина	24880944	24392397	24244525	25100218	24404639
100 % метанол	3242780	3258859	3306342	3226027	3315852
100 % метанол след clean	469246	529068	506680	517675	556570

Таблица 1. Сравнение на сигнала на миристинова киселина, и 100% метанол в последващо инжектиране, и след дълга почистваща процедура.