

УДК 543.544.6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТ- И НИТРАТ-ИОНОВ В МОЧЕ МЕТОДОМ ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Юсенко Е.В., Полынцова Е.А.

ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Институт цветных металлов и материаловедения, Красноярск, e-mail: elena.yusenko@yahoo.com

Диагностика пиелонефрита – инфекционного заболевания почек – заключается в обнаружении нитрит-ионов тест-методами в моче человека. Чувствительность такого медицинского анализа низкая и выявляет только 60% случаев. В работе показана возможность высокочувствительного количественного определения нитрит- и нитрат-ионов в моче человека методом ионной хроматографии (ИХ) со спектрофотометрическим детектированием и применением анионообменной колонки Shodex IC-SI-90 (250×4,0 мм). Линейные диапазоны определяемых содержаний нитрит- и нитрат-ионов в разработанной методике составили 0,05–50 и 0,009–10 мг/л, пределы обнаружения 0,015 и 0,002 мг/л соответственно, что существенно ниже по сравнению с существующими методами. Проведено определение нитрит- и нитрат-ионов в образцах мочи. Среднее содержание нитрит-иона составило 85,4 мг/л, нитрат-иона – 54,4 мг/л. По данным корреляционного анализа установлено, что содержания нитрита и нитрата в моче человека связаны между собой. На основании полученных данных сделаны выводы о возможности применения разработанной методики в анализе биологических объектов.

Ключевые слова: ионная хроматография, спектрофотометрический детектор, нитрит-ион, нитрат-ион, моча

DETERMINATION OF NITRITE AND NITRATE IONS IN URINE BY ION CHROMATOGRAPHY

Yusenko E.V., Polyntseva E.A.

Siberian Federal University, Institute of Nonferrous Metals and Materials, Krasnoyarsk, e-mail: elena.yusenko@yahoo.com

The diagnostics of pyelonephritis (infection of the kidneys) is to detect nitrite by test methods in human urine. A sensitivity of these medical analysis is low and identify only 60% of cases. An analytical protocol for ion chromatographic (IC) determination of nitrite and nitrate in human urine was developed. The IC separation was performed with a Shodex IC-SI-90 (250×4,0 mm) anion exchange column. The linear ranges of nitrite and nitrate concentration for spectrophotometric detection of the developed technique were 0,05–50 mg/l and 0,009–10 mg/l, the limits were 0,015 mg/l and 0,002 mg/l, respectively. It is significantly lower with existing ones. The urine samples were analyzed using the developed IC method. The average content of nitrite ion was 85.4 mg/l, nitrate ion was 54.4 mg/l. In correlation analysis was determined that the concentration nitrate and nitrite are depend on together. The developed technique should be application in the analysis of biological specimens.

Keywords: ion chromatography, spectrophotometric detector, nitrite ion, nitrate ion, urine

Пиелонефрит – инфекционно-воспалительное заболевание почек. Встречается у всех групп населения, чаще у молодых женщин, детей, больных диабетом и мужчин старше 45 лет. Обычно диагностируется только на поздних стадиях, поскольку протекает бессимптомно [2].

Диагностика пиелонефрита заключается в обнаружении нитрит-ионов тест-методами в моче. Но чувствительность такого медицинского анализа низкая и выявляет только 60% случаев. Целесообразнее определять нитриты в моче хроматографическими методами: газовой с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) [7], высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием [8, 4] и капиллярным электрофорезом (КЭ) [3, 5]. Эти методы позволяют одновременно определять еще и нитрат-ионы. Для анализа ГХ необходима сложная и длительная пробоподготовка с предварительной дериватизацией.

В ВЭЖХ низкая селективность определения и наблюдается мешающее влияние больших концентраций хлорид-ионов, присутствующих в моче. А в методе КЭ – низкая воспроизводимость из-за мешающего влияния органических компонентов матрицы. Наиболее эффективным методом их исследования в моче является ионная хроматография со спектрофотометрическим детектированием, но таких публикаций не встречалось.

Целью работы являлась разработка методики одновременного определения нитрит- и нитрат-ионов в моче методом ионной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.

Материалы и методы исследования

Реактивы. Рабочие растворы нитрит-, нитрат-ионов готовили из стандартных образцов (ГСО «Уральский завод химических реактивов», Россия, 1 г/л), добавляя соответствующие аликвоты растворов в мерную колбу и доводя до метки деионизованной водой (aquaMAX™-Ultra Younglin, Корея). Градуировочные растворы (0,01–20 мг/л) готовили после-

довательным разбавлением модельных растворов непосредственно перед анализом. Для приготовления элюентов использовали карбонат и гидрокарбонат натрия («Sigma-Aldrich», США). Для пробоподготовки мочи применяли этиловый спирт (ч.д.а, 96%).

Оборудование. В работе использован высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), укомплектованный спектрофотометрическим детектором, разделяющей колонкой 250×4,0 мм IC SI-90 4E 9 мкм (Shodex, Япония), подавительной колонкой 200×6 мм СПС-SAC 50 мкм (Аквилон, Россия) и предколонкой IC SI-90G 9 мкм (Shodex, Япония). Рабочий элюент: 1,8 мМ Na₂CO₃ и 1,7 мМ NaHCO₃, объемная скорость 1,0 мл/мин и температура колонки 33 °С. Объем вводимой пробы 20 мкл. Управление прибором и обработку хроматограмм осуществляли с помощью комплекса программного обеспечения LCsolution.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения SPSS 15.0 для Windows. Для проверки формы распределения полученных результатов применяли тест Шапиро–Уилкса, поскольку объем выборки был менее 50 наблюдений. Доверительный интервал, в котором находится среднее значение с вероятностью 95%. Значимость вероятности ошибки была $p < 0,05$.

Образцы и их пробоподготовка. Пробы мочи были отобраны у пациентов, проживающих на территории Красноярского края, наблюдающихся в урологическом отделении Красноярской краевой клинической больницы.

Методика пробоподготовки образцов мочи состояла из следующих стадий. На первом этапе моча была центрифугирована в течение 10 минут, полученный осадок отделен от центрифугата. Затем в центрифугате осажены белки, для этого добавлен этиловый спирт (1 мл мочи и 2 мл этилового спирта). Далее раствор был помещен в шейкер на 10 минут и проведено повторное центрифугирование (10 мин), удален осадок (белки), а жидкость отфильтрована через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм (Whatman, США) для удаления механических примесей. Полученный фильтрат был разбавлен в 10 раз деионизированной водой и введен в хроматограф.

Результаты исследования и их обсуждение

Для установления времен удерживания нитрит- и нитрат-ионов и оптимальных длин их детектирования по максимумам светопоглощения проведен анализ модель-

ного раствора, содержащего нитрит- и нитрат-ионы при спектрофотометрическом детектировании (рис. 1).

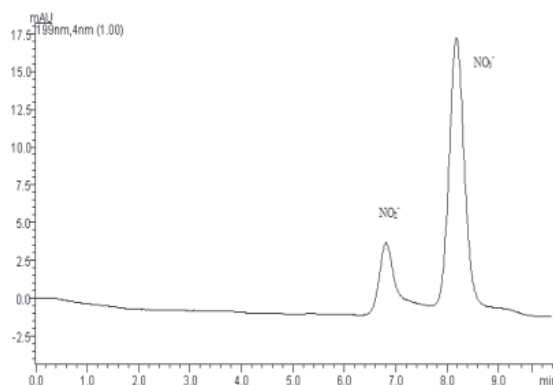


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси анионов NO₂⁻ (0,75 мг/л), NO₃⁻ (0,75 мг/л). Хроматографические условия описаны в разделе «Оборудование», λ = 199 нм

Определены времена удерживания нитрит- и нитрат-ионов $t_R = 6,81 \pm 0,01$ мин; $t_R = 8,18 \pm 0,01$ мин соответственно и оптимальные длины волн детектирования $\lambda_{NO_2^-} = 208$ нм; $\lambda_{NO_3^-} = 199$ (рис. 2).

Поскольку пики нитрит- и нитрат-ионов имеют разные максимумы поглощения, определять их возможно только на разных длинах волн, что приводит к необходимости проведения обработки двух хроматограмм и, следовательно, увеличению времени анализа. Для упрощения обработки полученных результатов рассчитаны коэффициенты их разрешения при 199 и 208 нм они составили $R_{s(199nm)} = 2,77$ и $R_{s(208nm)} = 2,51$ соответственно. Разрешение при 199 нм оказалось наилучшим и позволило количественно определять компоненты, поэтому дальнейшие эксперименты проводили при данной длине волны. Установлено время удерживания нитрит-иона при 199 нм $t_R = 6,81 \pm 0,01$ мин. Некоторые метрологические характеристики определения нитрит- и нитрат-ионов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики определения нитрит- и нитрат-ионов при λ = 199 нм

Определяемый ион	Время удерживания, t_R	Уравнение градуировочного графика*	r	Диапазон определяемых содержаний, мг/л**	Предел обнаружения, мг/л
NO ₂ ⁻	6,81 ± 0,01	C = 48991 · S - 1736	0,9990	0,05–50	0,015
NO ₃ ⁻	8,18 ± 0,01	C = 202961 · S - 1620	0,9997	0,009–10	0,002

Примечание. * C – концентрация иона, мг/л; S – площадь пика. ** n = 5; p = 0,95; Диапазон определяемых содержаний приведен без учета возможного разбавления/упаривания пробы.

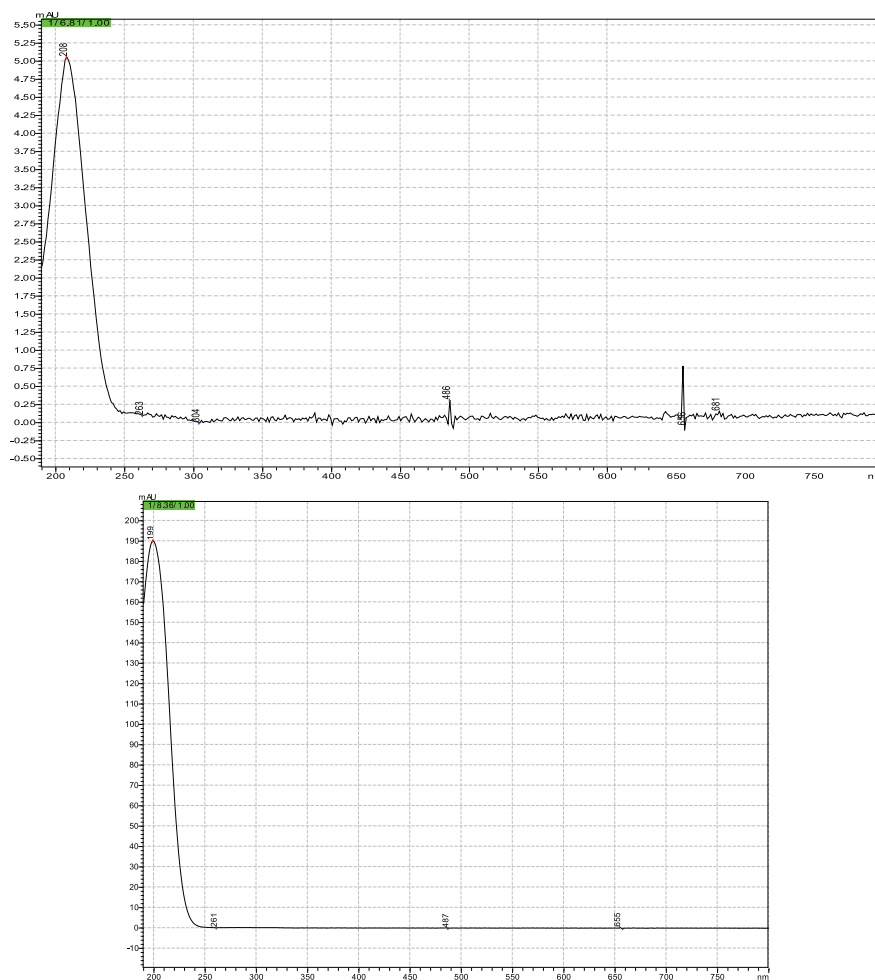


Рис. 2. Спектры поглощения нитрит- и нитрат-ионов

Проведена пробоподготовка образцов мочи для ионохроматографического анализа. Сложность пробоподготовки заключалась в удалении белков, присутствующих в моче, которые губительны для разделяющей колонки. Их осаждение проводили этиловым спиртом с последующим центри-

фугированием. Для проверки на полноту осаждения спирт был добавлен несколько раз. В результате установлено, что полное осаждение белков в пробах мочи достигается при использовании 2-кратного избытка этилового спирта. Далее проведен анализ образцов мочи (рис. 3).

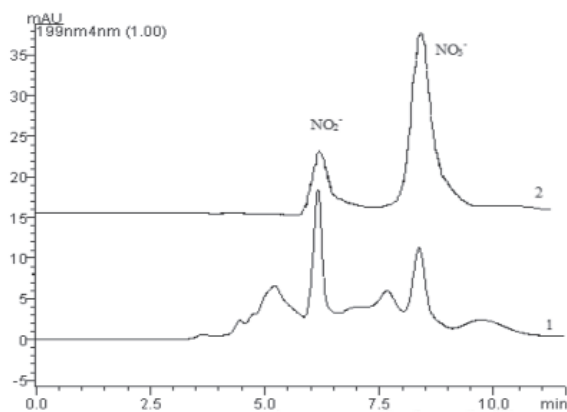


Рис. 3. Хроматограммы: образца мочи (1), модельной смеси анионов NO_2^- (0,75 мг/л), NO_3^- (0,75 мг/л) (2). Хроматографические условия описаны в разделе «Оборудование», $\lambda = 199 \text{ нм}$

Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания для каждого аниона, сравнивая хроматограммы образца и модельного раствора. Из рис. 3 видно, что в образце мочи присутствуют нитрит- и нитрат-ионы, результаты их определения представлены в табл. 2.

Все анализы были проведены в пяти параллельных измерениях, относительное стандартное отклонение (S_r) определяемых ионов не превышало 5%. Диапазон содержания нитрит- и нитрат-ионов в исследуемых образцах мочи варьировался от 17 до 235 мг/л и от 2,10 до 197 мг/л соответственно. Среднее содержание нитрит-иона составило 85,4 мг/л, нитрат-иона 54,4 мг/л. Из работ [9, 4] известно, что у здорового

человека содержание нитритов и нитратов в моче составляет 0,2–0,4 и 70–90 мг/л соответственно. В данной работе содержание нитритов значительно выше, это может быть объяснено тем, что образцы мочи были взяты не у здоровых людей, а у пациентов, наблюдающихся в урологическом отделении клинической больницы. Другой причиной высоких содержаний нитритов могли стать условия отбора пробы (перед проведением данного анализа пациент должен съесть накануне достаточное количество овощей (шпинат, капуста, морковь) и должна быть отменена антибактериальная терапия). Либо возможно вторичное бактериальное загрязнение, связанное с хранением образцов [1].

Таблица 2

Результаты определения нитрит- и нитрат-ионов в моче ($n = 5; p = 0,95$)

Номер пробы	$C(NO_2^-)$, мг/л	$S_r, \%$	$C(NO_3^-)$, мг/л	$S_r, \%$	Номер пробы	$C(NO_2^-)$, мг/л	$S_r, \%$	$C(NO_3^-)$, мг/л	$S_r, \%$
1	112 ± 4	3,2	53 ± 2	1,5	6	66 ± 2	2,5	19 ± 1	1,1
2	235 ± 7	3,8	65 ± 2	1,0	7	137 ± 4	3,4	30 ± 1	1,5
3	40 ± 1	1,2	29 ± 1	1,7	8	109 ± 3	3,6	2,4 ± 0,1	3,4
4	48 ± 1	1,4	197 ± 6	4,1	9	17 ± 1	1,8	4,6 ± 0,1	3,0
5	72 ± 2	2,1	40 ± 1	1,5	10	36 ± 1	1,4	35 ± 1	1,4

Правильность определения нитрита и нитрата проверена с применением ме-

тода добавок, результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты ИХ определения нитрит- и нитрат-ионов методом добавок в образцах мочи ($n = 5; P = 0,95$)

NO_2^-				NO_3^-			
Величина добавки, мг/л	Значение экспериментально найденной величины добавки, мг/л	$S_r, \%$	$\Delta, \%$	Величина добавки, мг/л	Значение экспериментально найденной величины добавки, мг/л	$S_r, \%$	$\Delta, \%$
0,10	0,095	2,4	4,8	0,10	0,097	2,3	2,8
1,00	0,983	2,8	1,7	1,00	0,985	2,1	1,5
10,00	9,910	3,3	0,9	10,00	9,900	3,5	1,0

Проведено сравнение разработанной методики определения нитратов и нитритов в моче с существующими, результаты представлены в табл. 4.

В ионохроматографической методике время удерживания нитрит- и нитрат-ионов больше в два раза по сравнению с методиками ВЭЖХ и КЭ, но при этом она позволяет снизить пределы обнаружения нитрата на два порядка по сравнению с ВЭЖХ и на один порядок по сравнению с КЭ; для нитрит-иона предложенная методика снизила предел обнаружения на один порядок по сравнению с КЭ и ВЭЖХ.

Из полученных результатов рассчитан коэффициент корреляции (r) между содержаниями нитрита и нитрата в моче, он со-

ставлял $r = 0,5$, что свидетельствует о средней силе связи между этими иона.

В данной работе показана возможность высокочувствительного количественного определения нитрит- и нитрат-ионов в моче методом ионной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Полученные результаты показали, что достоинством разработанной методики являются значительно более низкие пределы обнаружения нитрита и нитрата по сравнению с существующими. Характеристики методики позволяют рекомендовать ее для применения в анализе биологических объектов. Установлено, что существует зависимость между содержаниями нитрит- и нитрат-ионов в моче.

Таблица 4

Сравнительная характеристика методик определения нитрит- и нитрат-ионов в моче
($n = 5$; $p = 0,95$)

Определяемый ион	Метод	Время удерживания, мин	Диапазон определяемых содержаний, мг/л	Предел обнаружения, мг/л	r	$S_r, \%$	Литература
NO_2^-	КЭ	$3,9 \pm 0,8$	0,5-1,0	0,046	0,9900	–	[3]
	ГХ-МС	$2,65 \pm 0,09$	–	–	–	4,4	[9]
	ВЭЖХ	$3,3 \pm 0,1$	0,4-60	0,100	0,9990	–	[6]
	ИХ	$6,81 \pm 0,01$	0,05-50	0,015	0,9990	3,9	
NO_3^-	КЭ	$4,0 \pm 0,8$	0,7-1,2	0,062	0,9900	–	[3]
	ВЭЖХ	$4,8 \pm 0,1$	0,5-60	0,200	0,9999	–	[6]
	ИХ	$8,18 \pm 0,01$	0,009-10	0,002	0,9997	4,3	

Список литературы

1. Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика: справочник для врачей. – СПб.: Гиппократ, 1995. – 208 с.
2. Особенности диагностики малосимптомного течения хронического пиелонефрита / С.В. Шатохина, Л.А. Дасаева, И.С. Шатохина, В.Н. Шабалин, Е.М. Шилов // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90. – № 1. – С. 69-71.
3. Bories P.N., Scherman E., Dziedzic L. Analysis of Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Capillary Electrophoresis // Clinical Biochemistry. – 1999. – Vol. 32. – № 1. – P. 9–14.
4. Jobgen W.S., Jobgen S.C., Li H., Meininger C.J., Wu G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography // Journal of Chromatography B. – 2007. – Vol. 851. – P. 71–82.
5. Morcos E., Wiklund P.N. Nitrite and Nitrate Measurements in Human Urine by Capillary Electrophoresis // Methods in Molecular Biology. – 2004. – Vol. 279. – P. 21–34.
6. Tsikas D. Mass Spectrometry-Validated HPLC Method for Urinary Nitrate // Clinical Chemistry. – 2004. – Vol. 50. – № 7. – P. 1259–1261.
7. Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry // Anal Chem. – 2000. – Vol. 72. – P. 4064–4072.
8. Tsikas D., Gutzki F., Stichtenoth D. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis // Eur J Clin Pharmacol. – 2006. – Vol. 62. – P. 51–59.
9. Tsikas D., Suchy M., Mitschke A., Beckmann B., Gutzki F. Measurement of Nitrite in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry // Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – 2012. – Vol. 844. – P. 277–293.

References

1. Medvedev V.V., Volchek Yu.Z. Clinical Laboratory Services: A Guide for Physicians. St. Petersburg, Hippocrates, 1995. 208 p.
2. Shatokhina S.V., Dasaeva L.A., Shatokhina I.S., Shabalin V.N., Shilov E.M. Features diagnostic of chronic pyelone-

phritis malosimptomno, Clinical Medicine, 2012, T. 90., no. 1, pp. 69–71.

3. Bories P.N., Scherman E., Dziedzic L. Analysis of Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Capillary Electrophoresis, Clinical Biochemistry, 1999, Vol. 32, no. 1, pp. 9–14.

4. Jobgen W.S., Jobgen S.C., Li H., Meininger C.J., Wu G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography B, 2007, Vol. 851, pp. 71–82.

5. Morcos E., Wiklund P.N. Nitrite and Nitrate Measurements in Human Urine by Capillary Electrophoresis, Methods in Molecular Biology, 2004, Vol. 279, pp. 21–34.

6. Tsikas D. Mass Spectrometry-Validated HPLC Method for Urinary Nitrate, Clinical Chemistry, 2004, Vol. 50, no. 7, pp. 1259–1261.

7. Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry, Anal Chem, 2000, Vol. 72, pp. 4064–4072.

8. Tsikas D., Gutzki F., Stichtenoth D. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis, Eur J Clin Pharmacol, 2006, Vol. 62, pp. 51–59.

9. Tsikas D., Suchy M., Mitschke A., Beckmann B., Gutzki F. Measurement of Nitrite in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2012, Vol. 844, pp. 277–293.

Рецензенты:

Ефремов А.А., д.х.н., профессор, зав. лабораторией хроматографических методов анализа центра коллективного пользования Сибирского федерального университета, г. Красноярск;

Киселев В.П., д.т.н., доцент кафедры химии Сибирского федерального университета, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 08.04.2013.