



УДК 543.544.5.068.7:616-074:615.9

Применение комбинации «высокоэффективная жидкостная хроматография – метод главных компонент» для распознавания синдрома эндогенной интоксикации. Часть II.

Сычев С.Н., Гаврилина В.А.

Государственный университет учебно-научный производственный комплекс, Орел

Поступила в редакцию 6.06.2012 г.

Аннотация

Рассмотрено использование комбинации «высокоэффективная жидкостная хроматография – метод главных компонент» (ВЭЖХ – МГК), как метода распознавания последствий воздействия ксенобиотика при отсутствии ксенобиотика и его метаболитов в плазме крови (синдром эндогенной интоксикации). Показано, что методом ВЭЖХ-МГК возможно выделение факторов, отвечающих за влияние ксенобиотика на общую хроматографическую картину плазмы крови.

Ключевые слова: эндогенная интоксикация, высокоэффективная жидкостная хроматография, метод главных компонент.

Examined using a combination of "high-performance liquid chromatography - a method of principal components" (HPLC - PCA) as a method for detecting effects of xenobiotics in the absence of xenobiotics and its metabolites in blood plasma (a syndrome of endogenous intoxication). Shown that the HPLC-CIM may allocate the factors responsible for the overall effect of xenobiotic chromatographic pattern of blood plasma.

Keywords: endogenous intoxication, high performance liquid chromatography, the method of principal components.

Введение

В предыдущей статье «Применение комбинации «высокоэффективная жидкостная хроматография – метод главных компонент» для исследования синдрома эндогенной интоксикации» (Часть I) [1], были сделан вывод о том, что, несмотря на вариативность таких систем, как плазма крови, в спокойных одинаковых условиях для одной и той же крысы коэффициенты корреляции факторов, полученных из матрицы оптических плотностей многоволновых хроматограмм, с вероятностью 95% находятся в диапазоне от 0,94 до 1,00. Эти беспрецедентные для биологических систем значения коэффициентов корреляции характеризует лабораторных крыс как устойчивых к внешним воздействиям высокоорганизованных животных. Воспроизводимость (в смысле линейной зависимости) полученных факторов делает возможным их применение как реперов при распознавании состояния крысы.

Воспроизводимость факторов для разных крыс

Для проверки общности и воспроизводимости факторов для разных крыс дополнительно был проведен эксперимент с плазмой крысы №5 (табл. 1). Крыса № 5, не отравленная, плазма нормальная, кровь отобрана спокойно.

Таблица 1. Значения факторов и их вклады, длины волн 210, 220, 230, 240, 250 нм, крыса №5

Длины волн, нм	Факторы			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
210	1.605963	0.60709	-0.50172	-0.02455
220	0.295588	-0.79825	1.56917	0.11464
230	-0.346148	-1.33265	-1.13301	0.14324
240	-0.732689	0.59263	0.04071	-1.51997
254	-0.822715	0.93117	0.02485	1.28664
Вклады факторов в %				
	81.37982	12.67109	3.20238	2.74671

Результаты сравнения факторов представлено в табл. 2.

Таблица 2. Матрица корреляции факторов плазмы крови крыс № 3 и №5, длины волн 210, 220, 230, 240, 254 нм

	F1	F2	F3	F4	F1 ₅	F2 ₅	F3 ₅	F4 ₅
F1	1.000	-0.000	-0.000	0.000	0.997	0.024	0.070	0.011
F2	-0.000	1.000	0.000	0.000	0.016	0.857	-0.495	-0.144
F3	-0.000	0.000	1.000	0.000	-0.059	0.370	0.783	-0.496
F4	0.000	0.000	0.000	1.000	-0.044	0.359	0.370	0.856
F1 ₅	0.997	0.016	-0.059	-0.044	1.000	0.000	-0.000	-0.000
F2 ₅	0.024	0.857	0.370	0.359	0.000	1.000	0.000	-0.000
F3 ₅	0.070	-0.495	0.783	0.370	-0.000	0.000	1.000	-0.000
F4 ₅	0.011	-0.144	-0.496	0.856	-0.000	-0.000	-0.000	1.000

Для самого чувствительного и нестабильного диапазона длин волн по отношению к воспроизводимости многоволновых хроматограмм, коэффициент корреляции для двух разных крыс с вероятностью 95% может находиться в диапазоне от 0,784 до 0,997, что характерно для биологических систем и является характеристикой тенденции. Среднее значение коэффициента корреляции $0,92 \pm 0,08$, что также является очень хорошим результатом для биологических систем. Использование более длинноволнового излучения (260, 270, 280, 290, 300 нм) значительно улучшает коэффициенты корреляции (табл. 3) и превращает тенденцию в закономерность.

Диапазон изменений коэффициентов корреляции факторов в длинноволновом диапазоне находятся в пределах от 0.917 до 0.952, что является удивительным результатом для биологических систем.

Таким образом:

1. Можно предположить, что факторы, полученные в коротковолновом диапазоне длин волн одновременно подтверждают принадлежность животных к одному виду, одновременно подчеркивая их индивидуальность.

2. Исходя из больших значений коэффициентов корреляции факторов, полученных для длинноволнового излучения, можно допустить, что эти факторы

отвечают влиянию внешнего воздействия на животных (в данном случае, спокойная обстановка и поведение животных).

Таблица 3. Матрица корреляции факторов плазмы крови крыс № 3 и 5, длины волн 260, 270, 280, 290, 300 нм

	F1	F2	F3	F4	F1 ₅	F2 ₅	F3 ₅	F4 ₅
F1	1.000	0.000	-0.000	0.000	0.952	-0.147	0.121	-0.241
F2	0.000	1.000	-0.000	0.000	-0.147	-0.975	-0.150	-0.064
F3	-0.000	-0.000	1.000	0.000	-0.262	0.054	0.296	-0.917
F4	0.000	0.000	0.000	1.000	0.064	0.154	-0.935	-0.312
F1 ₅	0.952	-0.147	-0.262	0.064	1.000	-0.000	0.000	-0.000
F2 ₅	-0.147	-0.975	0.054	0.154	-0.000	1.000	0.000	0.000
F3 ₅	0.121	-0.151	0.296	-0.935	0.000	0.000	1.000	0.000
F4 ₅	-0.241	-0.064	-0.917	-0.312	-0.000	0.000	0.000	1.000

Выявление факторов, отвечающих за интоксикацию этанолом

Для проверки способности метода «ВЭЖХ-МГК» к распознаванию отравления, были получены факторы плазмы крови до и после отравления крысы этанолом, а также определен фактор, отвечающий за отравление крысы этанолом. Этанол идеально подходит для моделирования синдрома эндогенной интоксикации: ни этанол, ни его метаболиты в используемых концентрациях не видны на УФ-детекторе. Таким образом, для распознавания отравления можно было использовать только факторы, полученные из хроматограмм плазмы крови при отсутствии ксенобиотика или его метаболитов. Одновременно было необходимо выяснить, являются ли факторы, полученные при длинноволновом излучении, результатом внешнего воздействия (отравления, например), как было предположено ранее.

В табл. 4 представлены коэффициенты корреляции факторов, полученных для нормальной и отравленной («о») крысы № 5 в диапазоне длин волн 210 – 250 нм.

Как и предполагалось ранее, коэффициенты корреляции третьих и четвертых факторов, полученных для коротковолновой области сравнительно велики (0.87, 0.87) и, на наш взгляд, недостаточно ярко оттеняют влияние ксенобиотика.

Таблица 4. Выявление отклонения факторов не отравленной и отравленной алкоголем крысы № 5 в диапазоне 210 – 250 нм. Коэффициенты корреляции факторов плазмы крови крысы №5

	F1	F2	F3	F4	F1 _о	F2 _о	F3 _о	F4 _о
F1	1.000	0.000	-0.000	-0.000	0.9998	-0.008	-0.007	-0.012
F2	0.000	1.000	0.000	0.000	0.008	0.999	0.008	0.037
F3	-0.000	0.000	1.000	-0.000	0.011	-0.025	0.866	0.500
F4	-0.000	0.000	-0.000	1.000	0.007	-0.027	-0.501	0.865
F1 _о	0.999	0.008	0.011	0.007	1.000	-0.000	-0.000	0.000
F2 _о	-0.007	0.999	-0.025	-0.027	-0.000	1.000	0.000	-0.000
F3 _о	-0.007	0.008	0.866	-0.501	-0.000	0.000	1.000	0.000
F4 _о	-0.012	0.037	0.500	0.865	0.000	-0.000	0.000	1.000

Иная картина наблюдается для диапазона 260-300 нм (табл. 5)

Таблица 5. Выявление отклонения факторов не отравленной и отравленной алкоголем крысы № 5 в диапазоне 250 – 300 нм. Коэффициенты корреляции факторов плазмы крови крысы №5

	F1	F2	F3	F4	F1 _о	F2 _о	F3 _о	F4 _о
F1	1.000	-0.000	0.000	-0.000	-0.953	0.244	-0.167	0.074
F2	-0.000	1.000	0.000	0.000	-0.270	-0.947	0.170	0.019
F3	0.000	0.000	1.000	-0.000	0.039	-0.158	-0.742	-0.650
F4	-0.000	0.000	-0.000	1.000	0.134	-0.136	-0.627	0.756
F1 _о	-0.953	-0.270	0.039	0.134	1.000	-0.000	-0.000	0.000
F2 _о	0.244	-0.947	-0.157	-0.136	-0.000	1.000	-0.000	-0.000
F3 _о	-0.169	0.170	-0.742	-0.627	-0.000	-0.000	1.000	-0.000
F4 _о	0.074	0.019	-0.650	0.756	0.000	-0.000	-0.000	1.000

Коэффициенты корреляции третьих и четвертых факторов, полученных для длинноволновой области коротковолновой области показывают полное несоответствие (коэффициенты корреляции 0.74, 0.76) плазмы здоровой и отравленной крысы, что и требовалось показать.

Исходя из вышеизложенного, распознавание синдрома эндогенной интоксикации, обусловленной действием ксенобиотика, целесообразней проводить при спектрофотометрической детекции в длинноволновой УФ-области, обращая особое внимание на значения третьих и четвертых (по вкладам в информацию) факторов и коэффициентов корреляции.

Распознавание факторов испуга и отравления

Для разделения факторов испуга (а такой обязательно предполагался) и фактора действия ксенобиотика было проведено распознавание третьих и четвертых факторов путем получения информации о плазме двух крыс: не отравленной, но сильно испуганной крысы № 4 и испуганной отравленной крысы № 5 (табл. 6 и 7).

Таблица 6. Факторы не отравленной испуганной крысы № 4 в диапазоне 260 – 300 нм

	Factor 1	Factor 2 _о	Factor 3 _о	Factor 4 _о
260	1.429	-0.802	0.128	-0.704
270	-0.088	-0.538	-0.980	1.394
280	-1.266	-0.352	-0.469	-1.120
290	-0.458	-0.023	1.643	0.544
300	0.376	1.715	-0.322	-0.114

Таблица 7. Матрица корреляции факторов 4 отравленной этанолом крысы № 5 и не отравленной, но сильно напуганной крысы №4

	Factor 3 _о	Factor 4 _о	Factor 3	Factor 4
Factor 3 _о	1.000	-0.000	0.917	0.029
Factor 4 _о	-0.000	1.000	-0.0025	-0.997
Factor 3	0.917	-0.0025	1.000	-0.000
Factor 4	0.0269	-0.997	-0.000	1.000

Отсюда видно, что для двух разных крыс существует только один фактор, преимущественно отвечающий за отравления этанолом – фактор 3. Фактор 4, по-видимому, отвечает за испуг: обе крысы были испуганы – и отравленная, и неотравленная (коэффициент корреляции четвертых факторов 0.997), причем

сильный испуг (вклад - 1.78%) вполне сопоставим с воздействием ксенобиотика (вклад – 2.66%).

Специфичность по отношению к ксенобиотикам

Для решения вопроса о специфичности или не специфичности полученных факторов был поставлен дополнительный эксперимент по воздействию другого ксенобиотика, не этанола. В таблице 8 представлены факторы F_{3-8} , F_{4-8} , F_{3-7} , F_{4-7} крыс №8 и №7 с введенным другим ксенобиотиком; F_{3-4} , F_{4-4} крысы № 4 с введенным этанолом в области поглощения 260-300 нм

Таблица 8. Факторы F_{3-8} , F_{4-8} , F_{3-7} , F_{4-7} с введенным другим ксенобиотиком и факторы F_{3-4} , F_{4-4} крысы № 4 с введенным этанолом в области поглощения 260-300 нм

Длины волн, нм	F_{3-8}	F_{4-8}	F_{3-7}	F_{4-7}	F_{3-4}	F_{4-4}
260	0.135	1.298	-0.618	0.871	-1.328	-0.518
270	-0.086	-1.470	0.622	-1.444	0.669	1.180
280	-1.082	0.351	0.894	1.008	0.426	-1.233
290	1.582	-0.009	-1.456	-0.387	-0.772	0.859
300	-0.549	-0.170	0.558	-0.041	1.005	-0.288

Коэффициенты корреляции факторов из табл. 8 представлены в табл.9

Таблица 9. Матрица корреляции факторов крыс, отравленных разными ксенобиотиками

	F_{3-8}	F_{4-8}	F_{3-7}	F_{4-7}	F_{3-4}	F_{4-4}
F_{3-8}	1.000	-0.000	-0.929	-0.358	-0.618	0.670
F_{4-8}	-0.000	1.000	-0.371	0.904	-0.681	-0.700
F_{3-7}	-0.928	-0.371	1.000	-0.000	0.826	-0.365
F_{4-7}	-0.357	0.904	-0.000	1.000	-0.360	-0.928
F_{3-4}	-0.617	-0.680	0.826	-0.360	1.000	0.000
F_{4-4}	0.669	-0.699	-0.364	-0.928	0.000	1.000

Из данных табл. 9 следует, что третьи факторы, отвечающие за отравление, хорошо коррелируют с такими же факторами другой крысы, отравленной тем же ксенобиотиком, и совсем не коррелируют с третьим фактором крысы, отравленной этанолом.

Например, фактор F_{3-8} хорошо коррелирует с аналогичным фактором F_{3-7} , полученного для другой крысы, отравленной тем же ксенобиотиком (коэффициент корреляции 0.929) и совсем не коррелирует с третьим фактором, полученным для крысы, отравленной этанолом (коэффициент корреляции 0.618). Напротив, факторы, отвечающие за испуг, хорошо коррелируют для всех крыс. Например, фактор F_{4-7} удовлетворительно коррелирует с фактором F_{4-8} (0.904) и фактором F_{4-4} (0.928).

Можно сделать вывод, что полученный фактор F_3 является специфическим по отношению к разным ксенобиотикам. Наоборот, удовлетворительная корреляция всех факторов F_4 позволяет предположить, что на испуг разные крысы реагируют приблизительно одинаково.

Заключение

Предложенный комбинированный метод и полученные результаты внушают осторожный оптимизм по поводу прорыва в очень важной области исследований синдрома эндогенной интоксикации и позволяет направленно перейти к поиску соединений или группы соединений плазмы крови, отвечающих за тот или иной эффект эндогенной интоксикации. Применение несложных методов рассмотрения и интерпретации полученных результатов (например, анализ так называемых нагрузок) [2] позволяет довольно точно указать хроматографические пики на хроматограмме плазмы крови, отвечающие за определенный эффект, что существенно сужает диапазон дальнейшего поиска и идентификацию веществ, ответственных за интоксикацию с помощью жидкостного хромато-масс-спектрометра (LC/MS).

Список литературы

1. Сычев С.Н., Гаврилина В.А. Применение комбинации «высокоэффективная жидкостная хроматография – метод главных компонент» для распознавания синдрома эндогенной интоксикации // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т. Вып. 5. С. 814-821.
2. Померанцев А.Л. Метод главных компонент // Российское хемометрическое общество <http://rcs.chph.ras.ru/2008>.

Сычев Сергей Николаевич – д.т.н., профессор кафедры «Химия», заведующий лабораторией «Высокоэффективная жидкостная хроматография», Государственный университет УНПК, Орел

Гаврилина Вера Александровна – к.т.н., доцент кафедры «Химия», инженер лаборатории «Высокоэффективная жидкостная хроматография», Государственный университет УНПК, Орел

Sychev Sergey N. – Doctor of Technical Sciences, Professor, Department of Chemistry, Head of Laboratory "HPLC", UNPK State University, Orel

Gavrilina Vera A. – Ph.D., Associate Professor of Department Chemistry", Engineer Lab "HPLC", UNPK State University, Orel, e-mail: chemistry@ostu.ru