

Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando CLAE

Andrea Sanchez¹

Manoel Lima de Menezes¹

Oduvaldo Câmara Marques Pereira²

Recebido em: 09/10/2000

Aceito em: 12/06/2001

SANCHEZ, Andrea et al. Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando clae. *Salusvita*, Bauru, v. 20, n. 2, p. 69-77, 2001.

RESUMO

No presente trabalho, foram feitos ensaios para a determinação de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) em plasma de rato. As análises quantitativas foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV. O método envolveu a injeção direta da amostra de plasma em uma coluna cromatográfica com superfície interna de fase reversa (HSA-C₁₈) e a fase móvel foi composta por solução de fosfato diácido de sódio 0,05mol.L⁻¹ (pH=6,0) e acetonitrila (97,5:2,5 v/v), contendo 0,01g de ácido heptanossulfônico. A identificação do analitos foi baseada nos tempos de retenção de cada catecolamina e a quantificação foi feita pela determinação da área do pico do analito. Os valores de recuperação das catecolaminas foram de 57% para noradrenalina, 71% para adrenalina e 85% para dopamina. O limite de quantificação foi igual a 0,156mg.mL⁻¹. O método cromatográfico proposto permite boa separação das catecolaminas plasmáticas. Vale ressaltar que o método desenvolvido é bastante simples e apresenta várias vantagens devido à boa precisão e seletividade.

Unitermos: catecolaminas, plasma, CLAE.

INTRODUÇÃO

Catecolaminas são amins ativas contendo o composto catecol, as quais atuam como neurotransmissores e hormônios. Tais substâncias são biossintetizadas a partir da tirosina (FIGURA 1).

1 Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências, Departamento de Química. Av. Engº. Luiz Edmundo C. Coube, s/nº. – 17033-360 – Bauru – SP.

2 Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia – Caixa Postal 510 – 18618-000 – Botucatu – SP.

As catecolaminas são controladores do sistema nervoso central e autônomo (Benedict, 1987). Pesquisas, no sentido de conhecer a síntese e metabolismo destas monoaminas, têm sido a preocupação de vários pesquisadores (Scheurink et al., 1989, Kvetnansky et al., 1993, Pappa-Louisi et al., 1997). A determinação de catecolaminas em plasma ou urina por cromatografia líquida consiste em extração e purificação das catecolaminas, antes de injetá-las em Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE). Desta forma, o emprego da alumina na forma ácida tem sido o método de extração mais utilizado para a purificação das catecolaminas (Kvetnansky et al., 1993, Javidan & Cwik, 1996). Também está descrita a extração de catecolaminas empregando a técnica *on column*, complexando-as com difenilboratos, seguido pela eluição dos complexos catecolamínicos, empregando uma coluna cromatográfica C₁₈ (Ni et al., 1989). Para a extração *on line* e determinação de catecolaminas presentes em amostras de urina, foram empregadas colunas cromatográficas empacotadas com fase estacionária contendo boratos (Eriksson & Wikström, 1992).

A separação e quantificação de pequenas moléculas de matrizes constituídas de macromoléculas (drogas, hormônios e metabólitos) tem apresentado um desafio importante no campo da cromatografia líquida. Isto se deve à necessidade de remover inicialmente as proteínas, para evitar que estas danifiquem as colunas cromatográficas. A preparação convencional da amostra envolve procedimentos de precipitação de proteínas, seguido por extração e pré-concentração dos analitos. As fases estacionárias com Superfície Interna de Fase Reversa (ISRP) foram desenvolvidas por Pinkerton (Pinkerton, 1991). Esta fase estacionária permite a injeção direta das amostras de fluidos biológicos sem tratamento prévio.

A proposta desta pesquisa foi desenvolver uma metodologia analítica precisa, empregando uma coluna cromatográfica ISRP, que permite a injeção direta da amostra de plasma em CLAE, para efetuar determinações e quantificações das catecolaminas.

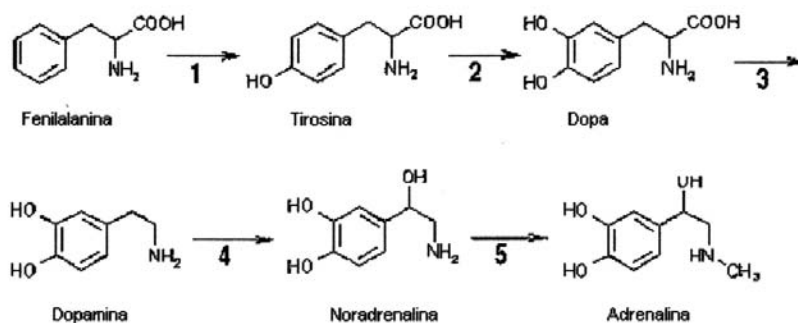


FIGURA 1 - Biossíntese das catecolaminas.

Enzimas: 1- Fenilalanina-hidroxilase, 2- Tirosina-hidroxilase, 3- Ácido amino- descarboxilase aromático, 4- Dopamina--hidroxilase, 5- Feniletanolamina-N-metil- transferase.

SANCHEZ,
Andrea et al.
Determinação de
catecolaminas em
amostras de plas-
ma de ratos por
injeção direta
usando CLAE.
Salusvita, Bauru,
v. 20, n. 2,
p. 69-77, 2001.

SANCHEZ,
Andrea et al.
Determinação de
catecolaminas em
amostras de plas-
ma de ratos por
injeção direta
usando CLAE.
Salusvita, Bauru,
v. 20, n. 2,
p. 69-77, 2001.

MATERIAL E MÉTODO

Material

- Reagentes

Os reagentes, Ácido heptanossulfônico, Adrenalina, Noradrenalina, Dopamina, L-dopa e Albumina de soro humano foram adquiridos junto à Sigma -Aldrich Chemical Company (USA), Fosfato dibásico de sódio e ácido clorídrico foram adquiridos junto à Merck -E. Merck RgaA (Darmsradt, Germany), Acetonitrila (grau CLAE) e EDTA foram adquiridos junto a Carlo Erba -(Milan, Italy).

A água pura foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q, adquirido da Millipore, (Millipore, Bedford, MA, USA).

- Instrumentação

A análise cromatográfica foi realizada em condições isocráticas em um sistema de cromatografia de alta performance (Varian Modelo 2510), equipado com uma bomba recíproca; um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (Varian Modelo 2550) ajustado em 205nm e um integrador SP 4400 Chromajet (Varian Associates, Inc; Sunnyvale, CA, USA). Foi utilizado um sistema de injeção manual Rheodyne (7125, Cotati, CA, USA) com amostrador de 10mL.

Método

- Fonte de plasma utilizado

Foram utilizados ratos albinos adultos machos, Wistar, cepa UNESP, com aproximadamente 90 dias de idade, pesando cerca de 300g, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP localizado no Câmpus de Botucatu (SP). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico. As amostras sanguíneas foram coletadas em frascos heparinizados através da inserção de uma cânula na aorta abdominal. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2000 R.P.M, durante 20min. a 20°C, o plasma obtido foi estocado a -20°C.

- Imobilização da Albumina de Soro Humano - HSA

A coluna cromatográfica ISRP foi preparada conforme protocolo descrito por Menezes (Menezes et al., 1999), partindo-se de uma coluna C₁₈ (150mm x 4,6mm - DI) Phenomenex - Luna 5mm, avaliada comercialmente, adquirida junto à Labtron Comércio e Representações Ltda.

- Otimização Cromatográfica

- Preparação das soluções-padrão das catecolaminas

As soluções-padrão foram preparadas, dissolvendo-se uma massa de 0,001g de cada Catecolamina em 10mL de ácido clorídrico 0,1mol.L⁻¹.

A partir da solução-estoque, foram feitas diluições obtendo-se concentrações de $0,625\text{mg.mL}^{-1}$ a $5,0\text{mg.mL}^{-1}$.

- Avaliação da coluna cromatográfica após a imobilização da proteína, (HSA)

A avaliação da imobilização da proteína sobre a superfície da fase estacionária foi efetuada injetando-se uma amostra de plasma fortificada com catecolaminas variando as concentrações de $1,0\text{mg.mL}^{-1}$ a $4,0\text{mg.mL}^{-1}$. A determinação dos números de pratos teóricos (N), fator de capacidade (k), assimetria de pico (As) e altura equivalente de pratos teóricos (H) foram efetuados empregando-se um cromatograma obtido após a injeção de uma solução-padrão contendo $2,5\text{mg.mL}^{-1}$ de catecolaminas.

- Condições cromatográficas

- Preparação da curva analítica e fortificação das amostras de plasma

As curvas de calibração foram obtidas injetando-se 10mL de soluções-padrão contendo $0,625$, $1,25$, $2,5$ e $5,0\text{mg.mL}^{-1}$ de catecolaminas.

A amostra de plasma foi diluída em água deionizada (1:100) e a esta adicionadas quantidades conhecidas de catecolaminas, para obter as concentrações de $1,0$, $2,0$ e $4,0\text{mg.mL}^{-1}$. Essas amostras foram injetadas diretamente no sistema de cromatografia líquida equipado com uma coluna cromatográfica ISRP-C₁₈.

- Determinação do limite de quantificação

Após a escolha da fase móvel adequada, foi determinado o limite de detecção, ensaiando-se diferentes concentrações de catecolaminas de forma decrescente até obter picos com altura superior a duas vezes o sinal do ruído.

- Separação das catecolaminas nas amostras de plasma

A separação das catecolaminas foi realizada à temperatura de 25°C constante, com fluxo da fase móvel ajustado em $1,0\text{mL.mim}^{-1}$. A fase móvel foi composta por solução de fosfato diácido de sódio $0,05\text{mol.L}^{-1}$ (pH=6,0) e acetonitrila (97,5:2,5 v/v), contendo 0,01g de ácido heptanossulfônico.

Os experimentos de separação das catecolaminas presentes nas amostras de plasma foram realizados injetando-se 5 replicatas para cada concentração da amostra de plasma previamente fortificada, contendo concentrações de catecolaminas de $1,0\text{mg.mL}^{-1}$ a $4,0\text{mg.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos foram avaliados em função da porcentagem de recuperação e desvio-padrão relativo.

SANCHEZ,
Andrea et al.
Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando CLAE. *Salusvita*, Bauru, v. 20, n. 2, p. 69-77, 2001.

SANCHEZ,
 Andrea et al.
 Determinação de
 catecolaminas em
 amostras de plas-
 ma de ratos por
 injeção direta
 usando CLAE.
Salusvita, Bauru,
 v. 20, n. 2,
 p. 69-77, 2001.

RESULTADOS

As TABELAS 1, 2 e 3 mostram os resultados obtidos para a avaliação da coluna cromatográfica após a imobilização da HSA, os parâmetros da curva analítica de catecolaminas e a porcentagem de recuperação absoluta das catecolaminas em plasma de rato, respectivamente.

A FIGURA 2 apresenta um cromatograma obtido após a injeção de 10mL de uma solução de $2,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) após a otimização cromatográfica. A FIGURA 3 apresenta um cromatograma obtido após a injeção de 10mL de plasma 1:100 fortificado com solução-padrão de catecolaminas ($4,0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) após a otimização cromatográfica.

TABELA 1: Número de pratos teóricos (N), fator de capacidade (k), assimetria de pico (As) e altura equivalente de pratos teóricos (H) das diferentes catecolaminas empregando a coluna cromatográfica ISRP C18 (150mm x 4,6mm DI).

Analito	TR(min)	N	H(mm)	K	As 0,1
Noradrenalina	4,26	2513	5,968	4,325	1,0
Adrenalina	6,23	1345	2,790	6,787	1,2
Dopamina	12,72	2490	1,506	14,900	1,0

TABELA 2: Equação da curva analítica de catecolaminas.

Analito	Equação de regressão linear	Coefficiente de determinação
Noradrenalina	$Y=528,26+3701,00 X$	0,996
Adrenalina	$Y=1108,34+4196,75 X$	0,992
Dopamina	$Y=1178,08+6262,46 X$	0,998

x é expresso em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e y é expresso em unidades de área.

TABELA 3: Recuperação absoluta das catecolaminas em plasma de rato.

Analito	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperação absoluta (%)	Desvio-padrão Relativo
Noradrenalina	4,0	82,35	8,0
	2,0	68,00	6,3
	1,0	57,00	5,2
Adrenalina	4,0	89,30	4,7
	2,0	81,00	17,0
	1,0	71,30	18,0
Dopamina	4,0	93,30	1,2
	2,0	85,00	10,0
	1,0	87,30	8,0

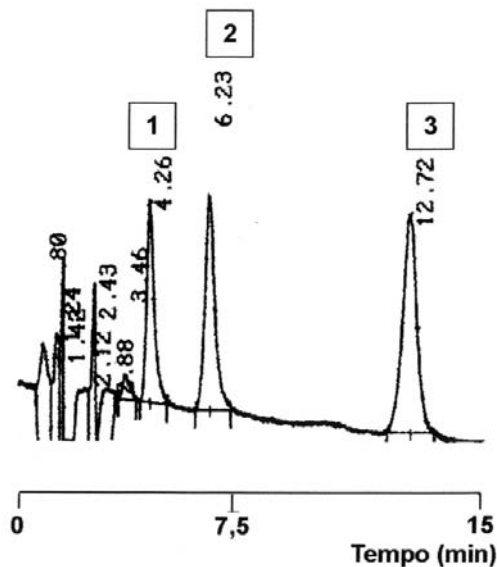


FIGURA 2: Cromatograma obtido após a injeção de 10mL de uma solução de 2,5mg.mL⁻¹ de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina), empregando a fase móvel composta por uma mistura de solução de fosfato diácido de sódio 0,05mol.L⁻¹ com pH ajustado em 6,0, acetonitrila (97,5:2,5 v/v) e 0,01g de ácido heptanosulfônico, fluxo de 1,0mL.min⁻¹ e detecção a 205nm.
Pico: 1 - noradrenalina, 2 - L-dopa e 3 - dopamina.

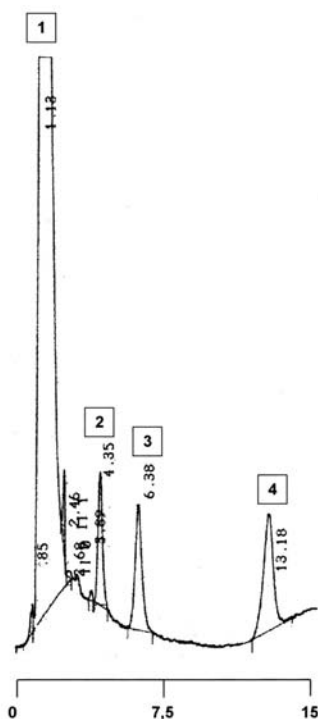


FIGURA 3: Cromatograma obtido após a injeção de 10mL de amostra de plasma diluído 1:100 fortificada com uma solução de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) nas concentrações de 4,0mg.mL⁻¹, empregando a fase móvel composta por uma mistura de solução de fosfato diácido de sódio 0,05mol.L⁻¹ com pH ajustado em 6,0, acetonitrila (97,5:2,5 v/v) e 0,01 g de ácido heptanosulfônico, com fluxo de 1mL. min⁻¹ e detecção a 205nm.
Pico: 1 - Plasma, 2 - noradrenalina, 3 - L-dopa e 4 - dopamina.

SANCHEZ,
Andrea et al.
Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando CLAE. *Salusvita*, Bauru, v. 20, n. 2, p. 69-77, 2001.

DISCUSSÃO

A nova coluna cromatográfica permite a separação e determinação das catecolaminas através da injeção direta das amostras de plasma fortificado em CLAE.

A *performance* da coluna cromatográfica foi avaliada em função dos tempos de retenção e dos parâmetros apresentados na TABELA 1 (número de pratos teóricos (N), fator de capacidade (k), assimetria de pico (As) e altura equivalente de pratos teóricos (H) das diferentes catecolaminas), calculados a partir da FIGURA 2. Sendo assim, tais resultados são considerados satisfatórios, uma vez que a imobilização da HSA sobre a superfície externa das partículas esféricas da fase estacionária C₁₈ auxiliou na obtenção de picos bem resolvidos e separação das catecolaminas do plasma nos seguintes tempos de retenção 4,35, 6,38 e 13,18 minutos para noradrenalina, adrenalina e dopamina, respectivamente.

Está descrito na literatura que são considerados excelentes coeficientes de assimetria de pico valores de 1,0 a 1,5 (Ciola, 1989). Assim, os coeficientes de assimetria de pico calculados para as catecolaminas, observados na TABELA 1, indicam uma boa *performance* da coluna cromatográfica ISRP, na qual foi efetuada a imobilização da HSA. De acordo com estes valores, pode-se afirmar que a referida coluna cromatográfica apresenta uma excelente *performance* cromatográfica.

Os coeficientes de determinação, apresentados na TABELA 2, mostram que a eluição das catecolaminas é reprodutível, empregando-se a otimização cromatográfica descrita.

Durante a otimização cromatográfica, várias composições de fase móvel foram ensaiadas; entretanto, a fase móvel mais adequada foi composta por solução de fosfato diácido de sódio 0,05mol.L⁻¹ (pH=6,0) e acetonitrila (97,5:2,5 v/v), contendo 0,01g de ácido heptanossulfônico.

A presença do ácido heptanossulfônico na fase móvel é imprescindível, uma vez que este composto forma um par iônico com as catecolaminas, possibilitando, assim, a retenção destas aminas na fase estacionária ISRP. Desta forma, podemos dizer que este composto contribuiu significativamente para separação das catecolaminas. A FIGURA 3 apresenta um cromatograma obtido após a injeção de 10mL de plasma 1:100 fortificado com solução-padrão de catecolaminas, em que a fase móvel otimizada permite uma linha de base estável durante a separação das catecolaminas. Vale ressaltar que a amostra de plasma foi diluída 1:100, para que se pudesse assegurar que os metabólitos e pequenas concentrações de proteínas fossem eluídos rapidamente da coluna cromatográfica. Não obstante, pode-se observar que as catecolaminas foram extraídas da fase estacionária sem picos interferentes.

Os experimentos cromatográficos para avaliar a eficiência da extração foram testados, efetuando-se a fortificação das amostras de plasma de rato com catecolaminas, cujas concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0mg.mL⁻¹ foram injetadas em 5 replicatas. Os resultados obtidos, apresentados na

TABELA 3, são satisfatórios, uma vez que a recuperação das catecolaminas em plasma fortificado de rato foi maior do que 57, 71 e 85% para noradrenalina, adrenalina e dopamina, respectivamente. Vale ressaltar que o método desenvolvido é simples, rápido e barato e apresenta boa reprodutibilidade.

O limite de quantificação determinado foi de $0,156\text{mg.mL}^{-1}$ para as catecolaminas. Vale ressaltar que o detector ultravioleta foi ajustado com o comprimento de onda igual a 205nm, sendo este o mais sensível para detecção de catecolaminas, a faixa variou entre 0,08 a 0,02 e a atenuação variou entre 2 e 1. Desta forma, a linearidade do detector foi determinada, avaliando relações entre as concentrações de $0,625$ a $5,0\text{mg.ml}^{-1}$.

De acordo com trabalhos recentemente publicados, tem sido empregada uma pré-coluna C_8 ($30\text{mm} \times 4,6\text{mm}$, DI), para efetuar a pré-concentração da amostra e reduzir a influência da matriz (Raggi et al., 1999). Assim, o método analítico proposto não requer a preparação da amostra de plasma antes desta ser analisada, constituindo um método simples e rápido para a determinação de catecolaminas.

CONCLUSÃO

O novo método proposto para a determinação de catecolaminas empregando um sistema isocrático de cromatografia líquida equipado com um detector UV visível e a aplicação de uma coluna cromatográfica ISRP- C_{18} possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e precisa para efetuar separações e determinações de catecolaminas presentes em amostras de plasma.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Processo 98/05510-5) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BENEDICT, C. R. Simultaneous measurement of urinary and plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine, dihydroxyphenylalanine, and dihydroxyphenylacetic acid by coupled-column high-performance liquid chromatography on C_8 and C_{18} stationary phases. *J.Chromatogr.* n. 385, p. 369-375, 1987.
- 2 CIOLA, R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho - CLAE*. São Paulo: Edgar Blücher, 1998.

SANCHEZ, Andrea et al. Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando CLAE. *Salusvita*, Bauru, v. 20, n. 2, p. 69-77, 2001.

SANCHEZ, Andrea et al.
Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando CLAE. *Salusvita*, Bauru, v. 20, n. 2, p. 69-77, 2001.

- 3 ERIKSSON, B-M.; WIKSTRÖM, M. Determination of catecholamines in urine by liquid chromatography and electrochemical detection after on-line sample purification on immobilized boronic acid. *J. Chromatogr. n.* 593, p. 185-190, 1992.
- 4 JAVIDAN, S.; CWIK, M. J., Determination of catecholamines in human plasma by HPLC with electrochemical detection. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* v. 19, n. 8, p. 1339-1348, 1996.
- 5 KVETNANSKY, R.; FUKUHARA, K.; PACAK, K.; CIZZ, G.; GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamines synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinol.* v. 133, n. 3, p. 1411-1419, 1993.
- 6 MENEZES, M. L.; SANCHEZ, A.; MARTINS, P. R.; GARCIA, M. Z.; PEREIRA, O. C. M.; CARDOSO, A. A. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. *Salusvita, Bauru*, v. 18, n. 2, p. 35-42, 1999.
- 7 NI, P.; GUYON, F.; CAUDE, M.; RESSET, R. Automated determination of catecholamines using on-column extraction of diphenylborate-catecholamine complexes and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. of Liq. Chromatogr.* v. 12, n. 10, p. 1873-1888, 1989.
- 8 PAPPALOUISI, A.; RAFALIKOU, E.; MICHAELIDIS, B. Determination of biogenic amines and related compound in the ganglia and auricle and ventricle of the heart of the snail *Helix lucorum* L. by HPLC with amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* v. 20, n. 15, p. 2427-2439, 1997.
- 9 PINKERTON, T. C., High-performance liquid chromatography packing materials for analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. *J. Chromatogr. n.* 544, p. 13-23, 1991.
- 10 RAGGI, M. A.; SABBIONI, C.; CASAMENTI, G.; GERRA, G.; CALONGHI, N.; MASOTTI, L. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. n.* 730, p. 201-211, 1999.
- 11 SCHEURINK, A. J. W.; STEFFENS, A. B.; BOURITIUS, H.; DRETELER, G. H.; BRUNTINK, R.; REMIE, R. and ZAAGSMA, J. Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *Am. J. Physiol.* v. 256, n. 25, p. 155-160, 1989.