



УДК 543.544.5.068.7

Экстракционные технологии для клинического ВЭЖХ анализа кортикостероидов в сыворотке крови

Дутов А.А.¹, Никитин Д.А.², Сверкунова А.В.², Мартынова А.В.², Коновалова О.Н.², Федорова Е.Н.², Лукьянова Ю.Л.¹, Ермолина А.В.¹

¹ГБОУ ВПО Читинская медицинская академия, Чита
²ФГБОУ ВПО Забайкальский государственный университет, Чита

Поступила в редакцию 14.06.2013 г.

Аннотация

Предложен метод твердофазной экстракции (SPE) кортизола, кортизона и вторичных стероидов из сыворотки для последующего анализа традиционной обращено-фазной ВЭЖХ с УФ детекцией. SPE на картриджах с 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200). Простота, воспроизводимость и достаточные селективность и чувствительность метода, позволяют его использовать в клинической практике для диагностики врожденной дисфункции коры надпочечников.

Ключевые слова: кортизол, кортизон, вторичные стероиды, твердофазная экстракция (SPE), сверхсшитый полистирол, ВЭЖХ.

The method solid-phase extraction (SPE) cortisol, cortisone and secondary steroids from human serum for the subsequent analysis with conventional reversed-phase HPLC and UV detection is offered. SPE on cartridges packed 30 mg hyper cross-linked polystyrene. Simplicity, reproducibility both sufficient selectivity and sensitivity of a method, allow to use it in a clinical practice for diagnostics congenital adrenal hyperplasia.

Keywords: cortisol, cortisone, secondary steroids, solid-phase extraction (SPE), hyper cross-linked polystyrene, HPLC

Введение

В клинической лабораторной практике кортикостероиды определяют с помощью радиоиммунных или иммуноферментных методов, главным достоинством которых является простота. Однако они не всегда проявляют достаточную селективность, поскольку могут вступать в перекрестные реакции с предшественниками кортизола и его метаболитами [1-6]. Произвести точную диагностику ферментопатий при врожденной дисфункции коры надпочечников, можно произвести только с помощью хроматографических методов. В частности, анализ вторичных стероидов – 11-дезоксикортизола, кортикостерона, дезоксикортикостерона и 17 α -гидроксипрогестерона, которые в норме в крови находятся в следовых количествах [4]. Хроматографические методы анализа кортикостероидов разработаны достаточно основательно [2, 4, 5, 7, 9]. Между тем имеются единичные исследования по экстракции кортикостероидов из

биологических жидкостей с использованием уникального отечественного сорбента – сверхсшитого полистирола [10].

В этой связи мы разработали простой метод определения эндогенных кортикостероидов в сыворотке крови с твердофазной экстракцией на сверхсшитом полистироле и последующим ВЭЖХ анализом экстрактов.

Эксперимент

Стандартные растворы и реагенты. Базовые растворы стандартов стероидных гормонов (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 нг/мкл готовили на метаноле и хранили в холодильнике при +4°C (сохраняются больше 1 года). Рабочие растворы готовили в день исследования разведением базовых метанолом до концентрации 10 нг/мкл. В качестве внутреннего стандарта использовали дексаметазон (ОЗ "ГНЦЛС", Украина): таблетку растворяли в 50% водном метаноле (100 нг/мкл) и фильтровали дважды через капроновый фильтр 0.2 мкм.

Ацетонитрил градиентный, изопропанол квалификации UV-IR-HPLC-GPC (Panreac, Испания), метанол LiChrosolv for liquid chromatography (Merck, Германия). Фосфорная и уксусная кислоты квалификации "puriss" (Fluka, Германия). Соляная кислота квалификации "ХЧ" (Реактив, Санкт-Петербург). Аммиак квалификации "ОСЧ" (Сигма-Тек, Россия). Пентан квалификации HPLC (Panreac, Испания), хлороформ "ХЧ" (Реактив, Санкт-Петербург) и ацетон "ОСЧ" (Вектон, Санкт-Петербург).

Аппаратура и оборудование. Спектрофотометрический детектор SPD-20A Prominence (Shimadzu, Япония) и диодно-матричный детектор SPD- M20A Prominence (Shimadzu, Япония), насос высокого давления LC-20AT Prominence (Shimadzu, Япония), ручной инжектор 7725i Rheodyne (США) с петлей на 100 мкл, компьютерные хроматографические программы LC Solution (Shimadzu) и "Мультихром" версия 3.2 (Амперсанд, Москва). Колонка Luna (Phenomenex) 150×4.6 мм, C18(2), 5 мкм с предколоночным фильтром (Supelco, США). УФ детекция при 240 нм. Перемешивание на вортексе Intelli-Mixer RM-1L, центрифугирование на CM-6M (Elmi, Латвия). Картриджи на основе 3-мл полипропиленовых шприцов с 20 мкм фторопластовыми фильтрами (Supelco, США), упакованные 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200) по собственной технологии: 30 мг сорбента в 3 мл смеси изопропанола, интенсивное перемешивание, быстрое введение в картридж, упаковка самотеком. Твердофазная экстракция осуществлялась с помощью манифолда на 12 картриджах (Merck, Германия) и вакуумного насоса KNF-Lab (США). Упаривание производили в сушильном электрошкафе с пассивной конвекцией СНОЛ-3.5 ("Рембыттермо", Новосибирск).

Обсуждение результатов

Разделение стандартов кортикостероидов

На первом этапе оптимизированы хроматографические условия разделения первичных и вторичных стероидов, а также синтетического стероида дексаметазона, который в дальнейшем использовали в качестве внутреннего стандарта (IS). Результаты на хроматограмме и в таблице.

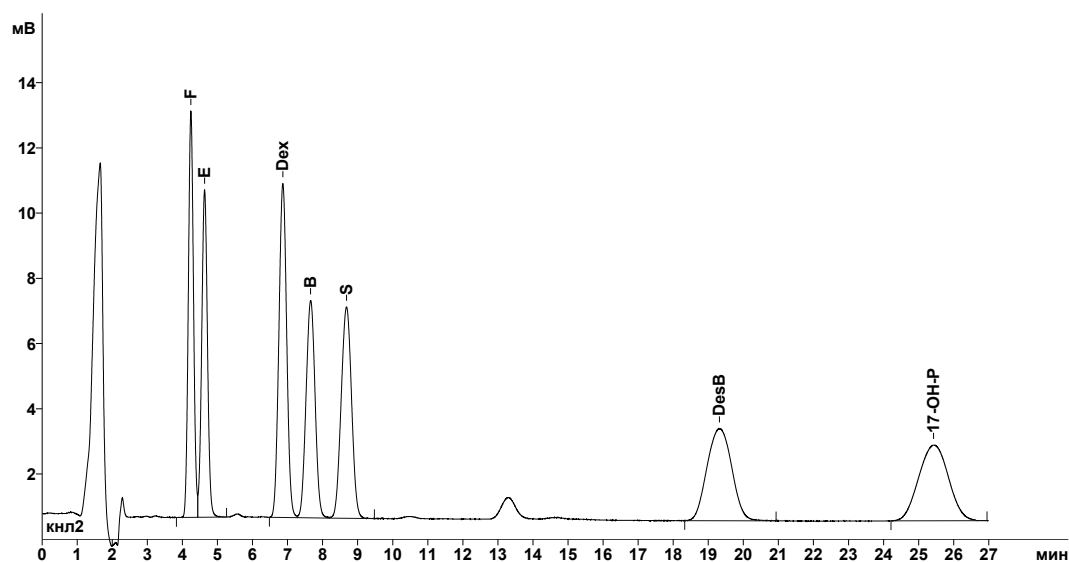


Рис. 1. Разделение стандартов кортикостероидов (по 50 нг каждого). Колонка Luna 150 × 4.6 мм C18(2) 5 мкм (Phenomenex, США), УФ детекция при 240 нм, элюент ацетонитрил – вода (35:65, v/v), скорость потока 1000 мкл/мин, давление 74 бара

Таблица 1. Хроматографические параметры кортикостероидов (по 50 нг каждого)

	t_R	H, mV	S, mV*сек
Кортизол (F)	4.244	12.45	127.74
Кортизон (E)	4.634	10.04	114.19
Дексаметазон (Dex)	6.866	10.24	158.19
Кортикостерон (B)	7.66	6.66	119.44
11-дезоксикортизол (S)	8.682	6.48	133.57
Дезоксикортикостерон (DesB)	19.32	2.82	138.19
17 α -гидроксипрогестерон (17-OH-P)	25.44	2.32	136.80

* t_R – время удерживания (time of retention), H, mV – высота пика и S, mV*сек - площадь пика.

Разделение можно считать вполне удовлетворительным, особенно с учетом того факта, что мы намеренно использовали старую колонку, отработавшую более 3 лет и у которой от первоначально заявленной эффективности в 11.000 ТТ, осталось чуть больше половины. Разделение кортизола и кортизона можно улучшить несколькими путями: (1) уменьшением процента ацетонитрила до 30-33% по мере старения колонки и снижения эффективности, (2) заменой воды в элюенте на 0.01 М фосфатный буфер с pH 8.0 (3) уменьшением доз стандартов и (4) использованием более эффективной колонки (около 10.000 ТТ). При анализе 17-гидроксипрогестерона, оптимальным является элюент, содержащий 45% ацетонитрила, при этом время удерживания его сокращается примерно в 2.5 раза.

Определение кортизола и вторичных кортикостероидов в сыворотке.

Биологический материал. Кровь забирали в пробирки без антикоагулянтов (vacutainer), центрифугировали 10 мин при 2000 rpm (СМ-6М, Elmi, Латвия) и отбирали 1 мл сыворотки в 2-мл полипропиленовые пробирки. Если не проводилась немедленная обработка, сыворотку замораживали и хранили в холодильнике при -20°C. С учетом циркадности секреции кортизола, забор крови производили не позднее 8.00 часов утра.

Экстракция. Картридж регенерировали последовательно 1 мл ацетона, 1 мл хлороформа, 1 мл метанола и 1 мл воды. К 1 мл сыворотки добавляли 200 нг дексаметазона (IS, 10 нг/мкл в метаноле) и 20 мкл концентрированной H_3PO_4 . Осторожно перемешивали, выдерживали 5 мин и вводили в картридж самотеком. Промывали сорбент картриджа 1 мл воды, 1 мл 0.1 М NaOH, 1 мл воды и высушивали под вакуумом в течение 2 мин. Элюировали стероиды 1 мл органических растворителей в стеклянные 10-мл стаканчики Simax и упаривали досуха в сушильном электрошкафу при $50^{\circ}C$. Сухой остаток растворяли в 100 мкл 50% водного метанола и 25 мкл вводили в петлю инжектора (содержит 50 нг IS и соответствует 0.25 мл сыворотки). Типичные хроматограммы одной и той же сыворотки с нормальным содержанием кортикостероидов при разных вариантах элюирования с картриджа, на рис. 2.

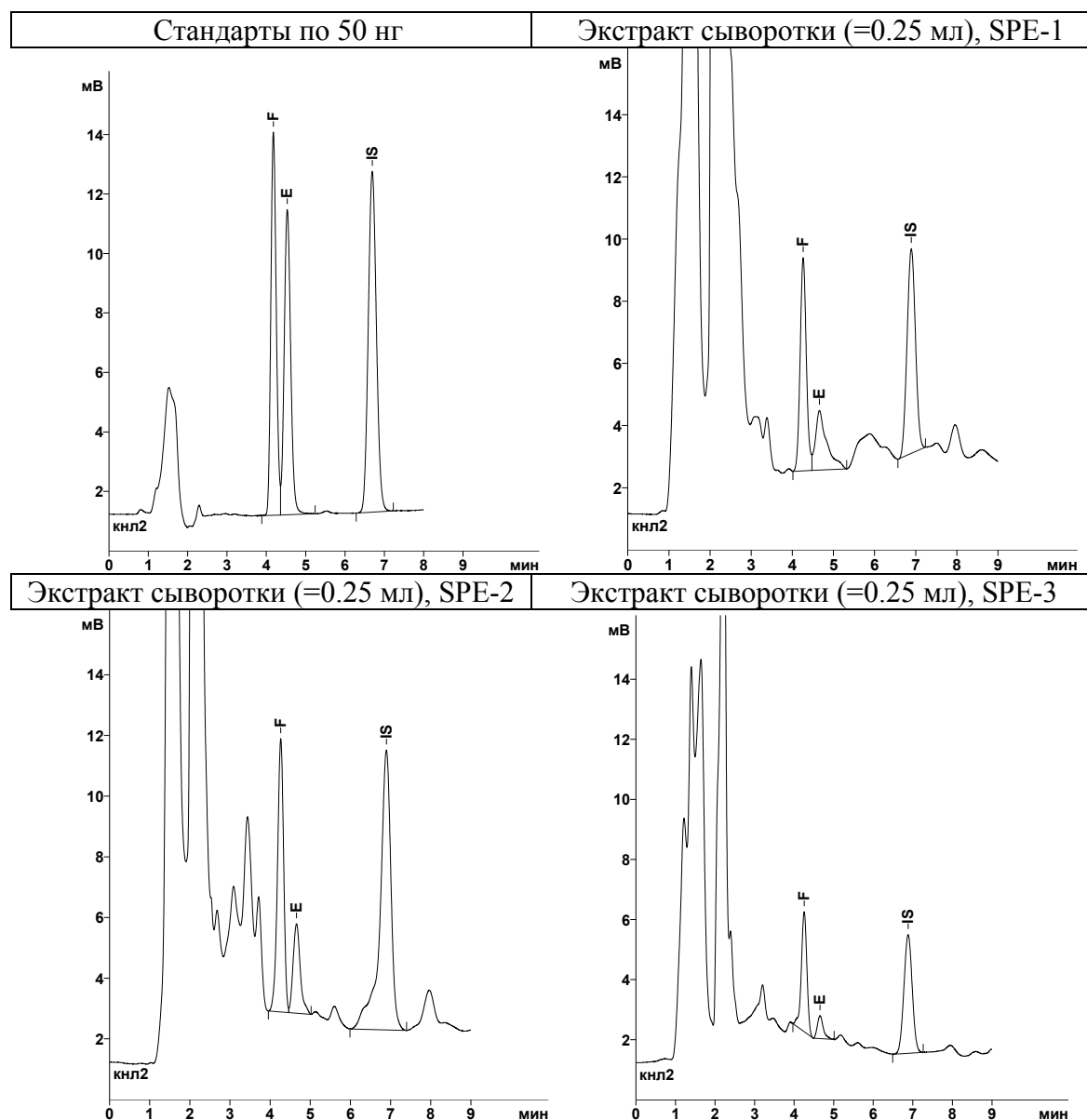


Рис. 2. Хроматограммы стандартов и экстрактов одной и той же сыворотки при разных вариантах элюирования с картриджа: SPE-1 – 1 мл метанола, SPE-2 – 1 мл ацетона-метанола (1:1, v/v), SPE-3 – 1 мл хлороформа-метанола (3:1, v/v). Хроматографические условия и обозначения как на рис. 1.

Разработка твердофазной экстракции включает оптимизацию загрузки, промывки, элюирования и упаривания/растворения. Добавление фосфорной кислоты к сыворотке перед загрузкой – стандартная процедура, преследующая высвобождение стероидов из связи с белками-переносчиками, в частности, с транскортином или альбумином [4]. Процесс можно ускорить добавлением к сыворотке небольшого количества метанола [2, 4] – по нашим данным до 10% (100 мкл метанола на 1 мл сыворотки). Еще высвобождение из связи с белками быстро и эффективно реализуется при pH=11 и выше [4]. Промывку оптимально проводить водой – NaOH – водой. Добавление 10% метанола (по объему) не улучшает качество экстрактов, а 25% уже полностью смывает стероиды. В качестве элюентов испытаны ацетонитрил, ацетон, этилацетат, хлороформ, дихлорметан и их смеси с метанолом в разных пропорциях. Одной из самых эффективных оказалась смесь ацетон – метанол (1:1/ v/v). Выход из процедуры экстракции составил $90 \pm 9.7\%$ ($n=33$). Допустимо элюирование "чистыми" метанолом или ацетоном, экстракция $64 \pm 7.2\%$ ($n=28$) и $84 \pm 8.4\%$ ($n=28$). Самые чистые экстракты получены при элюировании хлороформом – метанолом (3:1 или 9:1, v/v), однако, экстракция в этом случае не превышала 40%. Этот вариант можно рекомендовать для элюирования менее полярных стероидов – 17 α -гидроксипрогестерона и прогестерона с другими внутренними стандартами, например, 17-метилтестостероном или L-норгестрелом.

В качестве альтернативы твердофазной экстракции, можно использовать жидкостную экстракцию. Еще задолго до использования сверхсшитого полистирола, мы использовали этот вариант для рутинных клинических анализов: к 1 мл сыворотки добавляли 20 мкл IS (дексаметазон, 10 нг/мкл), 100 мкл 0.1 М NaOH и 3 мл смеси диэтилового эфира – хлороформа (3:1, v/v). Осторожно перемешивали в течение 5 мин, отбирали органический слой и упаривали в стеклянных стаканчиках при 60⁰C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл 50% метанола, 25 мкл в петлю (=50 нг IS и =0.25 мл serum). Качество экстрактов практически такое же, как при SPE, выход из процедуры экстракции $88 \pm 13.6\%$ ($n=145$). Однако, жидкостная экстракция менее стабильна, чем твердофазная, о чем свидетельствует больший разброс значений процентов экстракции.

С помощью предложенных методов можно проводить диагностику врожденных дисфункций коры надпочечников (гиперплазии 1-го и 2-го типов). Общим для обоих состояний является сниженный уровень кортизола [4]. При гиперплазии 1-го типа (недостаточность фермента 21-гидроксилазы), наблюдается повышенный уровень 17 α -гидроксипрогестерона. При гиперплазии 2-го типа (недостаточность фермента 11-гидроксилазы), в крови повышенный уровень 11-дезоксикортизола и дезоксикортикостерона [4]. Для уточнения характера гиперплазии, достаточно прокачать через колонку 35% водный ацетонитрил до выхода 11-дезоксикортизола в течение примерно 10 мин (гиперплазия 2-го типа) или 45% водный ацетонитрил до выхода дезоксикортикостерона и 17 α -гидроксипрогестерона.

Нижний предел обнаружения (лимит количественного определения, LOQ) составил для кортизола 0.06 нг на инъекцию, для его неактивного метаболита кортизона – 0.08 нг при соотношении сигнал/шум = 10. Этого достаточно для клинического анализа кортикостероидов в сыворотке, где их концентрация составляет 58 – 621 нмоль/л (или 21 – 225 нг/мл) для кортизола и 27 – 97 нмоль/л (или 9.8 – 35 нг/мл) для кортизона [4]. Концентрация вторичных стероидов гораздо ниже и составляет (в нмоль/л) для 11-дезоксикортизола 2.5 – 8.5, кортикостерона 1.9 – 8.1, дезоксикортикостерона 0.7 – 1.9 и 17-гидроксипрогестерона 0 – 11.5.

Список литературы

1. Kuhn R.W. and Deyman M.E., Simultaneous quantification of natural glucocorticoids and progestins in serum. // *J. Chromatogr. - B.* 1987. V. 421. P. 123-129.
2. Kabra P.M. Clinical analysis of individual steroids by column liquid chromatography (review). // *J. Chromatogr. - B.* 1988. V. 429. P. 155-176.
3. Volin P. High-performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids (review). // *J. of Chromatogr. B.* 1995. V. 671. P. 319-340.
4. *Steroid Analysis.* Edited by H.L.J. Makin and D.B. Gower. Springer. 2010. 1224 p.
5. Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. // *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, 2010. V. 121(3-5). P. 481-490.
6. Fanelli F., Belluomo I., Di Lallo V.D., Cuomo G., De Iasio R., Baccini M., Casadio E., Casetta B., Vicennati V., Gambineri A., Grossi G., Pasquali R., Pagotto U. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults. // *Steroids.* 2011. V. 76(3). P. 244-253.
7. Sjoval J., Axelson M. Never approaches to the isolation, identification and quantitation of steroid in biological material (review). // *Vitamins and Hormones.* 1982. V. 39. P. 31-41.
8. Shackleton C.H.L. Profiling steroid hormones and urinary steroids (review). // *J. Chromatogr. - B.* 1986. V. 379. P. 91-156.
9. Volin P. Simultaneous determination of serum cortisol and cortisone by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. - B.* 1992. V. 584. P. 147-155.
10. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Обьедкова Е.В., Даванков В.А. Использование сверхсшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе лекарств в биологических объектах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2010. Т. 10. Вып. 1. с. 5-14.

Дутов Алексей Александрович - д.м.н. (клиническая фармакология), врач высш. кат. (клиническая лабораторная диагностика), с.н.с. лаборатории экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии научно-исследовательского института медицинской экологии при Медицинской Академии, Чита

Никитин Денис Александрович - зав. лабораторией химического анализа Забайкальского государственного университета, Чита

Сверкунова Анна Викторовна - аспирант кафедры химии Забайкальского Государственного Университета, Чита

Мартынова Анастасия Владимировна - аспирант кафедры химии Забайкальского Государственного Университета, Чита

Коновалова Ольга Николаевна - аспирант кафедры химии Забайкальского Государственного Университета

Федорова Екатерина Николаевна - аспирант кафедры химии Забайкальского Государственного Университета

Лукьянова Юлия Львовна - врач-ординатор кафедры неврологии Читинской Медицинской Академии, Чита

Ермолина Алена Владимировна - врач офтальмолог Краевой больницы № 2, Чита

Dutov Alexei A. - MD (clinical pharmacology), physician of the highest qualifying category (clinical laboratory diagnostics), Senior Research Fellow Laboratory of Experimental and Clinical Biochemistry and Immunology, Research Institute of Medical Ecology of the Medical Academy, Chita. e-mail: dutovaa@yandex.ru

Nikitin Denis A. - head of the laboratory of chemical analysis of the Zabaikalsky State University, Chita, e-mail: nikitinnnd@gmail.com

Sverkunova Anna V. - Post-graduate student of chemistry the Zabaikalsky State University, Chita

Martynova Anastasia V - Post-graduate student Department of Chemistry Zabaikalsky State University, Chita

Konovlova Olga N. - Post-graduate student Department of Chemistry, Zabaikalsky State University, Chita

Fedorova Ekaterina N. - Post-graduate student Department of Chemistry, Zabaikalsky State University, Chita

Lukyanova Julia L. - a physician ordinator Department of Neurology, Medical Academy, Chita

Yermolina Alena V. - physician ophthalmologist Regional Hospital № 2, Chita