



УДК 543.544.5.068.7

Экстракционные технологии для клинического ВЭЖХ анализа прогестерона, 17 α -гидроксипрогестерона и синтетических прогестинов в сыворотке крови

Дутов А.А.¹, Никитин Д.А.², Терешков П.П.¹, Колесников А.Д.¹,
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

Разработаны методики жидко-жидкостной (LLE) и твердофазной экстракции (SPE) 17 α -гидроксипрогестерона, прогестерона и синтетических прогестинов из сыворотки для последующего анализа традиционной обращенно-фазной ВЭЖХ с УФ детекцией. LLE с помощью пентана – дихлорметана/хлороформа, SPE на картриджах с 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200). Простота, воспроизводимость и достаточные селективность и чувствительность методики, позволяют использовать ее в клинической практике для оценки гормонального статуса у женщин, в том числе получающих синтетические стероиды.

Ключевые слова: 17 α -гидроксипрогестерон, прогестерон, жидко-жидкостная экстракция (LLE), твердофазная экстракция (SPE), сверхсшитый полистирол, ВЭЖХ.

The methods of liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) from human serum for 17 α -hydroxyprogesterone and progesterone, as well as, synthetic progestin's are developed. The analysis carried out by means of conventional reversed-phase HPLC with UV detection. LLE made by mean of pentane – dichloromethane/chloroform, 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 an estimation of the hormonal status at women, including receiving synthetic steroid drugs.

Keywords: 17 α -hydroxyprogesterone, progesterone, liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), hyper cross-linked polystyrene, HPLC

Введение

Клиническая ценность мониторинга уровня прогестерона в крови определяется тем что, прогестерон служит надежным маркером овуляции и является ответственным за сохранение беременности [1,4]. Определение уровня прогестерона в крови помогает установить причину гормонально-зависимого бесплодия (лютеиновая недостаточность) и невынашивания беременности, а также контролировать эффективность проводимой фармакотерапии этих состояний. Между тем, определение его уровня в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) не всегда возможно из-за его низкой концентрации в плазме: менее 1 нг/мл в фолликулиновую и 10-25 нг/мл в

лютеиновую фазу цикла. К концу беременности содержание прогестерона в крови достигает 150-200 нг/мл [1, 4] и это значительно облегчает его определение методом традиционной ВЭЖХ. Содержание другого прогестина в плазме/сыворотке – 17 α -гидроксипрогестерона – составляет 0.2 – 8.3 нг/мл [5] и многократно (в 5-10 раз и более) возрастает при гиперплазии надпочечников 1-го типа [3]. Признанные методы ВЭЖХ анализа прогестерона и других прогестинов, основаны на классической жидко-жидкостной или твердофазной экстракции на обращено-фазном силикагеле [9, 11, 14, 16]. Известны единичные исследования по твердофазной экстракции стероидов на сверхсшитом полистироле [2, 10]. В последние годы для анализа прогестерона и 17 α -гидроксипрогестерона используют ВЭЖХ-масс-спектрометрию [6-8, 15, 16, 18] – высокочувствительный и дорогостоящий метод, доступный не всем лабораториям.

Целью настоящего исследования явилось разработка простых, селективных и недорогих ВЭЖХ методов определения прогестерона, 17 α -гидроксипрогестерона и синтетических прогестинов с использованием жидко-жидкостной (LLE – liquid-liquid extraction) и твердофазной экстракции (SPE – solid-phase extraction) на сверхсшитом полистироле (Purosep-200)¹. В дополнение, оптимизированы условия хроматографического разделения на сложных экстрактах биологических проб.

Эксперимент

Реактивы. Стандарты прогестерона (Aldrich), 17 α -гидроксипрогестерона, кортикостерона, дезоксикортикостерона, 11-дезоксикортизола, ДГЭА (все Sigma), 17 α -метилтестостерона, 19-норэтиндрона, 19-норэтиндрона ацетата, медроксипрогестерона (все VetranalTM, analytical standard, Fluka), L-норгестрела и тестостерона (Fluka), дидрогестерона (Solvay Pharma), мифепристона ("Мир-Фарма", Россия), растворяли в метаноле в концентрации 100 нг/мкл. Метанол "ХЧ" (Вектон), ацетонитрил "ОСЧ" (Криохром), ацетон "ОСЧ" (Экос-1), хлороформ LiChrosolv for liquid chromatography (Merck), дихлорметан Suprasolv for gas chromatography (Merck), пентан UV-IR-HPLC (Panreac), NaOH "ХЧ" (НеваРеактив), изопропанол "ОСЧ" (НеваРеактив), фосфорная кислота (Fluka).

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 защитным предколоночным фильтром (Supelco, США). УФ детекция при 240, 287 и 302 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",

¹ Сорбент предоставлен проф. В.А. Даванковым, ИНЭОС РАН, Москва

Новосибирск). Расчет LogP с помощью ChemOffice (Cambridge Soft Co.). Статистическая обработка проводилась с помощью Excel ("описательная статистика").

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 .

Обсуждение результатов

На первом этапе были проведены эксперименты по хроматографическому разделению естественных и синтетических стероидов. Здесь преследовались две цели: первая – выбор синтетического стероида на роль внутреннего стандарта и вторая – исключение хроматографического взаимодействия между естественными и синтетическими стероидами. Это важно при клиническом анализе гормонального фона у женщин, находящихся на лечении синтетическими прогестинами.

Хроматографические параметры стандартов стероидов

	УФ	t_R	H, mV	S, mV*сек
Кортикостерон 50 нг	240	4.40	11	87
11-дезоксикортизол 50 нг	240	4.68	12	101
Тестостерон 50 нг	240	7.16	16.5	173
19-норэтиндрон 50 нг	240	8.00	26	332
Дезоксикортикостерон 50 нг	240	8.06	9.1	106
17 α -метилтестостерон 50 нг	240	8.70	8.0	134
ДГЭА 50 нг	200	9.31	6.8	91
17 α -гидроксипрогестерон 50 нг	240	9.97	14.2	254
L-норгестел 50 нг	240	12.64	9.0	154
Дидрогестерон 50 нг	287	16.47	8.2	171
Медроксипрогестерон 50 нг	240	23.68	4.8	138
Мифепристон 50 нг	302	24.42	4.9	153
19-норэтиндона ацетат 50 нг	240	26.21	6.4	222
Прогестерон 50 нг	240	28.48	2.1	71

*Колонка Luna 150 $\times$ 4.6 мм, C18(2), 5 мкм, УФ 240 нм, 45% водный ацетонитрил, 1000/мин, 68 бар. Обозначения: УФ – длина волны в нм, t_R – время удерживания в мин., H – высота пика, S – площадь пика.

Важно, что 17 α -гидроксипрогестерон полностью разделяется с тестостероном, уровень которого также может возрастать при гиперплазиях надпочечников, а также от вторичных кортикостероидов. В качестве IS для 17 α -гидроксипрогестерона мы использовали 17 α -метилтестостерон. Возможно также использование в этом качестве L-норгестела, однако, это несколько удлиняет время анализа.

Синтетические прогестины, элюирующиеся после 17 α -гидроксипрогестерона, полностью разделяются с ним и прогестероном. Медроксипрогестерон (депо-провера) и дидрогестерон (дюфастон) – наиболее востребованные препараты в гинекологической эндокринологии, не мешают определению 17 α -

гидроксипрогестерона и прогестерона. К тому же дидрогестерон детектируется не при 240, а при 287 нм, а в дальнейшем быстро метаболизируется в активный и стабильный метаболит 20 α -дигидродидрогестерон [12]. Мониторинг мифепристона, являющегося антагонистом прогестерона, представляет скорее теоретический интерес, поскольку используется для прерывания беременности и детектируется при 302 нм.

Растворы стандартов. Из базовых растворов стандартов L-норгестрела и 17-метилтестостерона (внутренние стандарты, IS), а также 17 α -гидроксипрогестерона и прогестерона (100 нг/мкл в метаноле) готовили рабочие, разбавляя базовые метанолом 1:9 (v/v²). В петлю инжектора вводили по 5 мкл (=50 нг) каждого стероида. Эти же разбавленные IS добавляли к плазме (20 мкл = 200 нг).

Жидко-жидкостная экстракция (LLE)

Поскольку 17 α -гидроксипрогестерон и прогестерон являются неполярными стероидами – logP 2.36 и 3.78, соответственно, для селективной LLE испытаны неполярные растворители или их смеси. Из нескольких десятков вариантов, оптимальной оказалась смесь пентан – хлороформ или пентан – дихлорметан (9:1, v/v). К 1 мл сыворотки, помещенной в 4,5-мл полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой (Thermo Scientific, США, кат. № 347791), добавляли 200 нг IS (17 α -метилтестостерон и L-норгестрел для 17 α -гидроксипрогестерона и прогестерона, соответственно), 0.1 мл 1 М NaOH и 3 мл смеси пентан – хлороформ или пентан – дихлорметан. Перемешивали 2 мин на вортексе (режим F1) и органическую фазу отбирали в 5-мл стеклянный стаканчик Simax и помещали в сушильный электрошкаф при 50⁰С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила и 25 мкл вводили в петлю инжектора. Типичные хроматограммы на рис. 1 и 2.

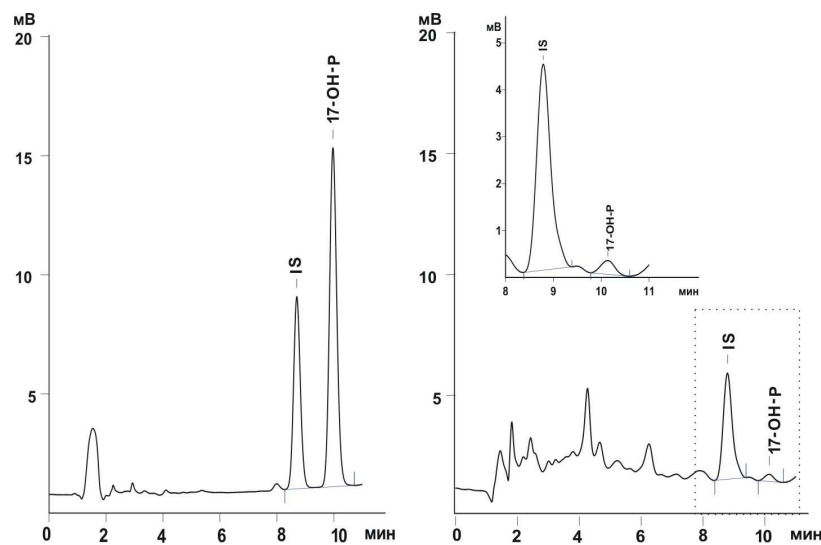


Рис. 1. Хроматограммы стандартов (1) по 50 нг каждого и экстракта сыворотки (2)

Колонка Luna 150 × 4.6 мм, C18, 5 мкм, УФ 240 нм, ацетонитрил – вода (45:55, v/v), 1000/мин, 68 бар. Концентрация 17 α -гидроксипрогестерона 7.4 нг/мл, экстракция 55%. Обозначения: IS – внутренний стандарт (17 α -метилтестостерон), 17-OH-P – 17 α -гидроксипрогестерон.

² Volume/volume, т.е., объемные соотношения

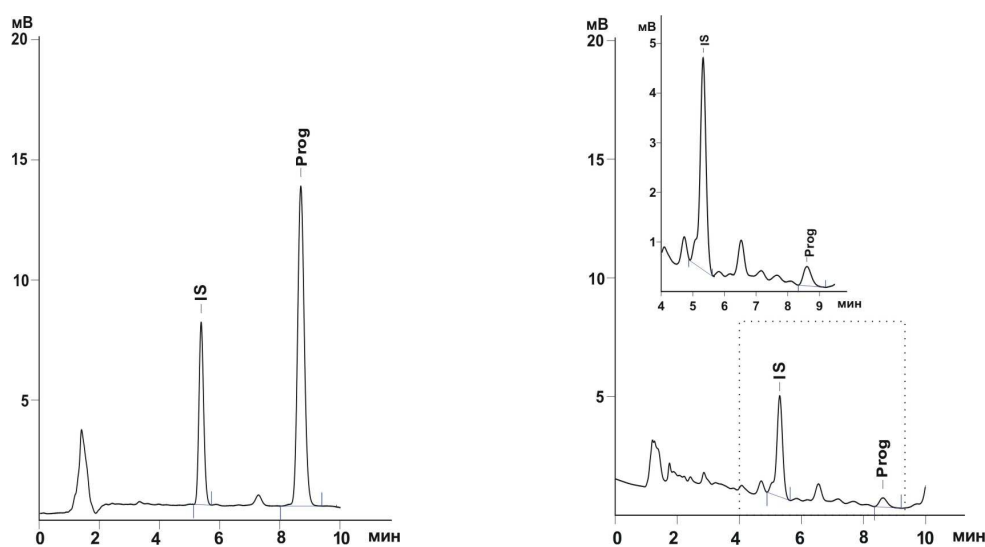


Рис. 2. Хроматограммы стандартов (1) по 50 нг каждого и экстракта сыворотки (2).

Колонка Luna 150 × 4.6 мм, C18(2), 5 мкм, УФ 240 нм, ацетонитрил – вода (60:40, v/v), 1000/мин, 51 бар. Концентрация прогестерона 10.4 нг/мл, экстракция 56%. Обозначения: IS – внутренний стандарт (левоноргестрел), Prog – прогестерон

Видно, что при таком варианте экстракции минимальное количество мешающих полярных пиков. Некоторые исследователи одной из проблем LLE считают образование эмульсии [2]. В наших экспериментах на нескольких сотнях биологических проб, эмульсия образовывалась не более чем в 5% случаев, а устранить ее можно центрифугированием (2 мин при 3000 rpm) или добавлением небольшого количества NaCl [13]. Экстракционных потерь при этом, как правило, не происходит.

Добавление к сыворотке перед экстракцией NaOH, необходимо для высвобождения стероидов из связи с белками. Этот процесс быстро и эффективно реализуется при pH=11 и выше [16]. Аналогичными свойствами обладает фосфорная кислота (20 мкл на 1 мл сыворотки), при этом необходима более длительная инкубация в течение 15-30 мин. Процесс можно ускорить добавлением метанола (20 – 50 мкл на 1 мл сыворотки).

Использование качественной посуды из полипропилена на всех этапах LLE, за исключением упаривания, является обязательным условием, поскольку многие стероиды сильно и необратимо сорбируются на стекле [16], а если используется стеклянная посуда, то ее рекомендуют силанизировать.

Хроматографического перекрытия стероидов с эндогенными пиками биопробы практически не было, за исключением небольшой деформации на восходящем фронте пика L-норгестрела. Пики 17 α -гидроксипрогестерона и прогестерона в подавляющем большинстве случаев были гомогенные, а времена удерживания совпадали до сотых долей минуты. Для достижения таких результатов необходима качественная хроматографическая колонка эффективностью не менее 8000 ТТ. После завершения хроматографического цикла, необходимо промыть колонку 3 × 100 мкл ацетонитрила для полного удаления неполярных компонентов биопробы.

Экстракция составила $56 \pm 4.4\%$ ($n=230$) для 17 α -гидроксипрогестерона и $58 \pm 6.1\%$ ($n=174$) для прогестерона (расчеты производили по площади пиков). На первый взгляд, экстракция недостаточная, поскольку по классическим канонам она не должна быть менее 90%. Добиться такого процента выхода можно, но ценой

значительной потери селективности и, как следствие, появления множества интерферирующих пиков. Мы не считаем такой подход оправданным.

Твердофазная экстракция (SPE)

Карtridge с 30 мг Purosep-200 промывали последовательно 1 мл ацетона, 1 мл метанола и 1 мл воды. К 1 мл сыворотки добавляли 200 нг IS, 20 мкл H_3PO_4 , перемешивали, выдерживали 1-2 мин и вводили в cartridge самотеком (не более 1 мл/мин). Промывали сорбент cartridge 1 мл воды, 1 мл смеси 0.1 М NaOH – метанол (1:1, v/v) и 1 мл воды. Высушивали сорбент 3 мин под слабым вакуумом (-10 InHg). Элюировали стероиды 1 мл смеси хлороформ – метанол или дихлорметан – метанол (9:1, v/v) в 5-мл стеклянный стаканчик Simax, упаривали в сушильном электрошкафе при 60°C, сухой остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила и 25 мкл вводили в петлю инжектора. После экстракции важно не допускать высыхания сорбента и поэтому cartridge хранили в 50% водном изопропанол до следующей экстракции. Типичные хроматограммы практически аналогичны таковым при LLE. Единственное отличие – несколько большее количество полярных пиков, не мешающих хроматографическому анализу.

При обоих вариантах экстракции, хроматографического перекрытия исследуемых стероидов с эндогенными пиками биопробы не обнаружено. Экстракция составила $61 \pm 3.4\%$ ($n=142$) для 17 α -гидроксипрогестерона и $66 \pm 8.5\%$ ($n=104$) для прогестерона.

Предлагаемые методы отличаются хорошей воспроизводимостью и являются практически равноценными. Выбор способа экстракции – LLE или SPE – определяется техническими возможностями лаборатории. Разработанные методы отличается более высокой селективностью, чем иммуноферментные. К тому же с помощью последних невозможно определение синтетических прогестинов, а наборы для определения 17 α -гидроксипрогестерона, недостаточно специфичны [7]. Недостаточную специфичность современных высокоскоростных иммуноферментных методов в виде перекрестных реакций с другими компонентами биологических проб, подтверждают и другие исследователи [8, 14]. Между тем, жесткое противопоставление иммунологических и хроматографических методов анализа стероидов, мы не считаем оправданным. Это скорее взаимодополняющие, чем взаимоисключающие технологии. К примеру, для повышения селективности радиоиммунного анализа при диагностике врожденной гиперплазии надпочечников 1-го типа, сначала проводят очистку экстрактов плазмы/serum с помощью ВЭЖХ, а затем радиоиммунный анализ [8].

Нижний предел обнаружения (лимит количественного определения, LOQ) составил для прогестерона 0.05 нг на инъекцию, для 17 α -гидроксипрогестерона – 0.07 нг при соотношении сигнал/шум = 10. Этого достаточно для клинического анализа естественных и синтетических прогестинов в сыворотке, а экстракционные потери легко контролируются с помощью внутреннего стандарта.

Заключение

Разработаны методики жидко-жидкостной и твердофазной экстракции на сверхсшитом полистироле (Purosep-200) 17 α -гидроксипрогестерона, прогестерона и синтетических прогестинов из сыворотки для последующего анализа традиционной обращенно-фазной ВЭЖХ с УФ детекцией. Простота, воспроизводимость и достаточная чувствительность методики, позволяют использовать ее в клинической

лабораторной практике для оценки гормонального статуса у женщин, в том числе на фоне гормональной терапии синтетическими стероидами

Список литературы

1. Абрамченко В.В. Перинатальная фармакология. Logos. СПб. 1994.
2. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Обьедкова Е.В. 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.
3. Клиническая эндокринология (руководство), под ред. Н.Т. Старковой. Питер. СПб. 2002. 576 с.
4. Сметник В.П., Тумилович Л.Г. Неоперативная гинекология. Сотис. СПб. 1994. 224 с.
5. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. М.: Лабинформ, 1997. 960 с.
6. Alvarez S.B, Capote F.P., Jimenez J.R., Lique de Castro M.D. Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: an approach to lipidomics // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1207(1-2). P. 46-54.
7. Etter M.L, Eichhorst J., Lehotay D.C. Clinical determination of 17-hydroxyprogesterone in serum by LC-MS/MS: comparison to Coat-A-Count RIA method // J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006. V. 840(1). P. 69-74.
8. Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo V.D. et al. 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.
9. Kabra P.M. Clinical analysis of individual steroids by column liquid chromatography (review) // J. Chromatogr.B. 1988. V. 429. P.155-176.
10. Kartsova L.A., Bessonova E.A. Determination of Steroids in Biological Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography // J. of Analytical Chemistry. 2007. V. 62. N. 1. P. 68-75.
11. Kuhn R.W., Deyman M.E. Simultaneous quantification of natural glucocorticoids and progestins in serum // J. Chromatogr.-B. 1987. V. 421. P. 123-129.
12. Naumann J.M., Zöllner A., Drăgan C.A. et al. Biotechnological production of 20-alpha-dihydroprogesterone at pilot scale // Appl Biochem Biotechnol. 2011. V. 165(1). P. 190-203.
13. Santos-Montes A., Gonzalo-Lumbreras R., Gasco-Lopez AI. et al. Solvent and solid-phase extraction of natural and synthetic corticoids in human urine // J. Chromatogr. 1994. V. 652(1). P. 83-89.
14. 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.
15. Shackleton C.H.L. Profiling steroid hormones and urinary steroids (review) // J. Chromatogr. B. 1986. V. 379. P. 91-156.
16. Steroid Analysis / Edited by H.L.J. Makin and D.B. Gower. Springer. 2010. 1224 p.
17. Wu Z., Zhang C., Yang C. et al. Simultaneous quantitative determination of norgestrel and progesterone in human serum by high-performance liquid chromatography-

tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization //Analyst. 2000. V. 125(12). P. 2201-2205.

18. Zhang S., Mada SR., Sharma S. et al. Simultaneous quantitation of 17alpha-hydroxyprogesterone caproate, 17alpha-hydroxyprogesterone and progesterone in human plasma using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS). // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 48(1). P. 1174-1180.

Дутов Алексей Александрович - д.м.н., ст. научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины при Медицинской Академии, Чита

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

Терешков Павел Петрович - к.м.н., зав. лаборатории экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академии, Чита

Колесников Александр Дмитриевич - к.м.н. врач акушер-гинеколог высшей категории. Дорожной Клинической Больницы на станции Чита-2, ОАО РЖД, Чита

Сверкунова Анна Викторовна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета, Чита

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

Коновалова Ольга Николаевна - аспирант кафедры химии Забайкальского Государственного Университета, Чита

Федорова Екатерина Николаевна - аспирант кафедры химии Забайкальского Государственного Университета, Чита

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

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

Dutov Alexey A. - MD, Senior Research Laboratory of Experimental and Clinical Biochemistry and Immunology, Research Institute of Molecular Medicine 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: nikitinn@gmail.com

Tereshkov Pavel P. - PhD, Head laboratory of experimental and clinical biochemistry and immunology Research Institute of molecular medicine of the Medical Academy, Chita

Kolesnikov Alexander D. - PhD, obstetrician-gynecologist of the highest category. Road Clinical Hospital at station Chita-2, ОАО RZD

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

Konovalova 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