

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

БЕССОНОВА ЕЛЕНА АНДРЕЕВНА

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРОИДОВ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ**

Специальность 02.00.02. - АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Санкт-Петербург

2004

Работа выполнена на кафедре органической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета и в НИО лабораторной диагностики Медицинской Академии наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Карцова Людмила Алексеевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Беленький Борис Григорьевич

доктор химических наук, профессор
Калинкин Игорь Петрович

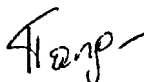
Ведущая организация: Московский государственный
университет имени
М.В. Ломоносова

Защита состоится 20 мая 2004 г. в _____ ч. на заседании диссертационного совета Д 212.232.37 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 1990034 Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43, Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан 20 апреля 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



/А.Г. Папсуева/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы. Стероидные гормоны коры надпочечников играют основную роль в обеспечении жизненных процессов. Изменение концентраций катехоламинов в крови определяет различные заболевания мозга и нервной системы. Низкие концентрации обсуждаемых аналитов в биологических жидкостях требуют использования высокочувствительных и селективных методов их определения. К тому же биологически активной является лишь свободная фракция стероидов, содержание которой в сыворотке не превышает 15%. Для корректной диагностики многих патологий, например, эндокринных нарушений, необходимо определение в сыворотке крови и моче как стероидов, так и катехоламинов.

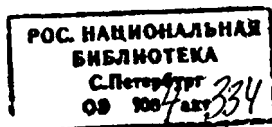
Традиционно используемые в отечественной практике иммуноферментные методы имеют существенные ограничения и обеспечивают определение лишь одного конкретного соединения. Опубликованные работы в области ВЭЖХ стероидов и катехоламинов посвящены ограниченному набору аналитов либо решению конкретной задачи (установлению количественного соотношения кортизол : кортизон). Определенные перспективы, открываются в выяснении возможности использования различных вариантов капиллярного электрофореза с УФ- и МС-детектированием.

Актуальность проблемы подтверждается поддержкой исследований в этом направлении со стороны конкурсного центра фундаментального естествознания (гранты АСП-30513 и АСП - 301053) и Министерства образования РФ (грант АОЗ-2.11-394).

Цель работы Усовершенствование методов хроматографического и электрофоретического разделения стероидов (кортизола (F), кортизона (E), кортикостерона (B), 11-дезоксикортикостерона (DOC), 11-дезоксикортизола (S), 11-дегидрокортикостерона(A), прогестерона(Pr), **17 α -гидроксипрогестеро-на (17 α -OHPr)**, тестостерона (T) и биогенных аминов (адреналина (E), норадреналина (NE), дофамина (DA)) в биологических жидкостях.

В связи с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

- Установить на модельных смесях факторы, влияющие на хроматографическое и электрофоретическое разделение стероидных гормонов и катехоламинов.
- Оработать режимы пробоподготовки для указанных классов аналитов.
- Выяснить пути снижения их предела обнаружения в биологических жидкостях.
- Получить сравнительные оценочные характеристики используемых методов для определения этих аналитов.



- Разработать методики определения стероидов и катехоламинов в сыворотке крови и моче больных с различными эндокринными нарушениями.

Научная новизна

Установлены закономерности электрофоретического и хроматографического разделения стероидов и катехоламинов, позволяющие прогнозировать пути оптимизации условий разделения сложных смесей нейтральных соединений с близкими свойствами.

Выявлена доминирующая роль β -циклодекстрина при разделении природных стероидных гормонов в изокрагическом режиме ОФ ВЭЖХ.

Обнаружен эффект влияния мочевины на разделение кортикостероидов в режиме МЭХХ.

Практическая значимость работы

Разработан метод хроматографического (ОФ ВЭЖХ с УФ-детектором) и электрофоретического (МЭХХ с УФ-детектором) определения стероидных гормонов в сыворотке и моче.

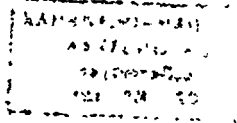
Впервые выполнен анализ смесей стероидных гормонов (F, E, A, B, **17-ОНPr**, DOC, S) в реальных объектах (моча, сыворотка крови) методом МЭХХ с использованием on-line концентрирования.

Проведен комплексный анализ закономерностей хроматографических стероидных профилей, позволяющих обнаруживать нарушения стероидогенеза на ранних этапах заболеваний и осуществить дифференциальную диагностику различных патологий коры надпочечников.

Определение кортикостероидов в биологических объектах нашло практическое применение в области клинической медицины. Получено свидетельство на рационализаторское предложение №1354 от 18.06.2001. Ворохобина Л.В., Великанова Л.И., Королева Е.М., Бессонова Е.А., Шафигулина З.Р., Милютин О.Л. Комплексное исследование уровня кортикостероидов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ для ранней диагностики патологий коры надпочечников.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования влияния состава, концентрации и pH буферного электролита, природы и концентрации мицеллообразователя и органических модификаторов, добавки циклодекстрина в качестве компонента подвижной фазы, разделительного буфера и матрицы образца, определяющие закономерности хроматографического и электрофоретического разделения кортикостероидов.



2. Количественная оценка (константы комплексообразования) процессов комплексообразования с участием стероидов и β-циклодекстрина.

3. Оптимизированный регламент пробоподготовки биологических жидкостей (сыворотки крови и мочи) при определении стероидных гормонов методами ОФ-ВЭЖХ и МЭЖХ.

4. Способы предварительного концентрирования (стэкинга и евпинга) для увеличения концентрационной чувствительности определения кортикостероидов методом мицеллярной электрокинетической хроматографии.

5. Обоснование преимуществ для определения кортикостероидов методом мицеллярной электрокинетической хроматографии по отношению к обращенно-фазовой ВЭЖХ.

6. Сравнительные характеристики ОФ ВЭЖХ и КЭ-МС определения катехоламинов.

7. Методики анализа реальных объекте с использованием выявленных закономерностей:

- определение кортикостероидов методом ОФ-ВЭЖХ,
- определение кортикостероидов методом МЭЖХ.

Апробация работы Результаты исследований докладывались на Всероссийской конференции «Химический анализ веществ и материалов». 16-21 апреля. 2000 г. Москва; IX Международной конференции по теоретическим вопросам адсорбции и адсорбционной хроматографии. 24-28 апреля. Клязьма. 1999 г. Москва; научно-практической конференции молодых ученых СПбМАПО "Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины". 2001. СПб; симпозиуме «Национальные дни лабораторной медицины». 9-11 октября. 2001г. СПб; 4-м Всероссийском конгрессе эндокринологов «Актуальные проблемы современной эндокринологии». 2001. СПб; X Международной конференции по теоретическим вопросам адсорбции и адсорбционной хроматографии. 24-28 апреля. 2001г. Москва; VIII Всероссийском симпозиуме :ю жидкостной хроматографии и капиллярному электрофорезу. 15-19 октября. 2001г. Москва; Всероссийском симпозиуме по «Современным проблемам хроматографии» 18-22 марта. 2002 г. Москва; I International conference «High medical technologies in XXI century» November 2-9. 2002. Benidorm. Spain; IIIrd International symposium on separations in BioScienceJ "100 years of Chromatography". 13-18 may. 2003. Moscow; XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии. 21-26 сентября. 2003. Казань; Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы». 15-19 марта. 2004 г. Москва.

Публикация результатов. Материалы диссертации опубликованы в 2 статьях и 15 тезисах докладов.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, пяти глав с обсуждением полученных результатов, экспериментальной части, приложения, списка принятых сокращений, выводов и списка цитируемой литературы (162 наименований). Работа изложена на 200 страницах машинописного текста, содержит 5 схем, 39 таблиц и 35 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Во введении дано обоснование актуальности темы и сформулированы цели исследования. Отмечена перспективность использования капиллярного электрофореза при определении стероидов и катехоламинов и необходимость одновременного их определения в моче и сыворотке крови при многих заболеваниях, в частности, при эндокринных нарушениях.

1-я глава (Обзор литературных данных) состоит из 8 разделов, в которых обсуждаются общие сведения о стероидных гормонах; биологические формы и их функции; физико-химические методы исследования кортикостероидов (иммунологические, хроматографические и электрофоретические); основные этапы пробоподготовки; краткое описание биосинтеза и функций катехоламинов в организме; физико-химические методы определения катехоламинов.

Во 2-й главе рассматриваются **общие характеристики объектов - и методов исследования.**

В 3-й главе предметом обсуждения является **исследование хроматографического и электрофоретического поведения кортикостероидов методами ОФ ВЭЖХ и МЭКХ.**

Изучение закономерностей хроматографического поведения стероидов проводили на модельной смеси стероидных гормонов. Варьирование рН и состава элюента не обеспечило полного их разделения в одном хроматографическом цикле в изократическом режиме ОФ ВЭЖХ из-за сильно различающейся гидрофобности. Введение Р-циклодекстрина (**β-ЦД**) (от 0,3 до 3 мМ) в состав элюента (ацетонитрил : вода) привело к увеличению эффективности разделения, улучшению разрешения аналитов с близкими параметрами удерживания (кортизол и кортизон), сокращению факторов удерживания для более гидрофобных аналитов (рис. 1, 2,3).

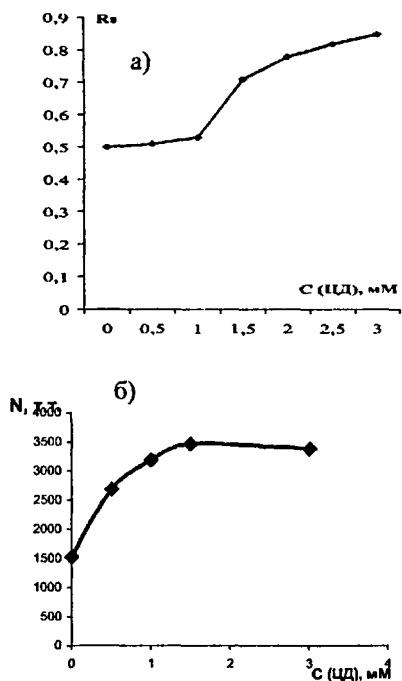


Рис. 1. Зависимость разрешения R_s (а) и эффективности разделения (N) (б) для кортизола и кортизона от концентрации β -циклодекстрина (элюент: ацетонитрил : вода, 45 : 55; по объему).

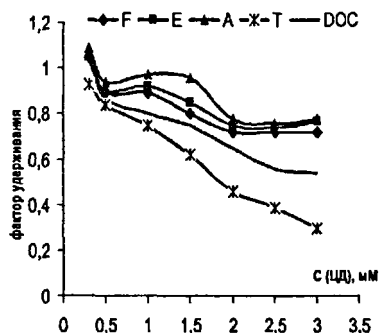


Рис 2. Зависимость относительных факторов удерживания стероидов от концентрации β -ЦД; элюент: ацетонитрил : вода (30 : 70; по объему).

Такое влияние ЦД обусловлено его способностью образовывать комплексы включения со стероидами с участием гидрофобной полости макроцикла. Рассчитаны константы комплексообразования в системе *стероидный гормон - β -ЦД* (табл.1). Стабильность комплексов для более гидрофобных стероидов увеличивается при уменьшении содержания органического компонента в составе элюента, что связано с их меньшей сольватацией в более гидрофильной среде (табл.1).

В оптимизированных условиях (ацетонитрил : вода (45:55, по объему) с добавкой 2,5 мМ β -ЦД) осуществлен анализ реальных объектов с предварительным проведением пробоподготовки, которая предполагала выделение лишь свободной биологически активной фракции стероидных гормонов.

Таблица 1. Значения констант устойчивости комплексов разделяемых стероидов с β -циклодекстрином, введенным в состав п.ф. $CH_3CN:H_2O$.

Стероиды	Константа устойчивости	
	I серия (45:55)	II серия (30:70)
Кортизол	158±6	128±6
Кортизон	121±5	101±7
11-дегидро-кортикостерон	106±5	97±7
Кортикостерон	130±5	218±5
Тестостерон	140±5	363±7
11-дезоксикортикостерон	138±3	280±6
11-дезоксикортизол	63±0,2	-

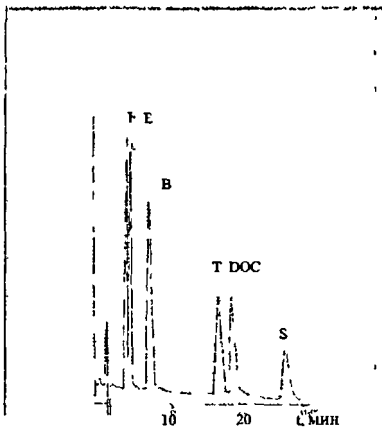


Рис.3. Хроматограмма модельной смеси стероидов с добавлением 2,5 мМ β -ЦД в составе элюента. Колонка Searon SGX C-18 100x2 мм, 5 мкм (Чехия); элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (45.55, по объему), скорость элюента: 3 мл/мин.

Таблица 2. Результаты жидкостной экстракции кортикостероидов из сыворотки крови и мочи (n=5, P=0,95).

Стероидные гормоны	Степень извлечения (в %)		
	Сыворотка крови		Моча
	CHCl_3	CH_2Cl_2	CHCl_3
Кортизол	80±4	82,3±2,5	83±4
Кортизон	78±3	80,6±1,8	89,6±2,5
11-дегидро кортикостерон	56,4±1,3	76,4±1,9	87,8±2,3
Кортикостерон	54,0±1,5	72,6±2,5	70±3
11-дезоксикортикостерон	50,0±2,3	65,8±1,5	71±3
11-дезоксикортизол	47±4	64,4±1,9	65,5±1,9

Для твердофазной экстракции использовались концентрационные патроны с силикагелем и C_{18} . Проведена сравнительная количественная оценка (по значениям степеней извлечения) двух вариантов экстракции кортикостероидов - твердофазной и жидкостно-жидкостной - в сыворотке крови и моче с использованием различных сорбентов и элюирующих систем. Установлено, что в случае сыворотки предпочтительна твердофазная экстракция на концентрационных патронах C_{18} (табл.2, 3). В процессе жидкостной экстракции сыворотки образуется эмульсия, что свидетельствует о частичном разрушении комплексов стероидов, связанных с бел-

ками. Для определения стероидов в моче пригодны оба варианта пробоподготовки. Предел обнаружения кортикостероидов в моче и сыворотке крови ~2 мкг/л.

Стероидные гормоны, являясь нейтральными и близкими по строению аналитами, были определены нами независимо методом мицелярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ), который по эффективности превосходит ВЭЖХ. Разработка такого варианта

для указанных аналитов имеет самостоятельный интерес. Кроме того, при решении данной задачи он выполнил роль арбитражного метода.

Изучены факторы, определяющие закономерности электрофоретического поведения стероидных гормонов в МЭКХ: состав, концентрация и pH рабочего электролита

Таблица 3. Результаты твердофазной экстракции кортикостероидов из сыворотки крови и мочи на силикагеле и обращенно-фазовом сорбенте.

Стероидный гормон	Степень извлечения (%)		
	Силикагель	S ₁₈	S ₁₈
		Сыворотка	Моча
Кортизол	77,0±2,3	92,0±2,3	91±3
Кортизон	78,0±2,3	93±4	90±4
Кортикостерон	82,0±2,5	89,5±2,8	81,0±2,7
11-дегидрокортикостерон	64,0±1,9	87,3±1,5	79,0±2,3
11-дезоксикортикостерон	67,0±2,0	85±3	75,5±1,8

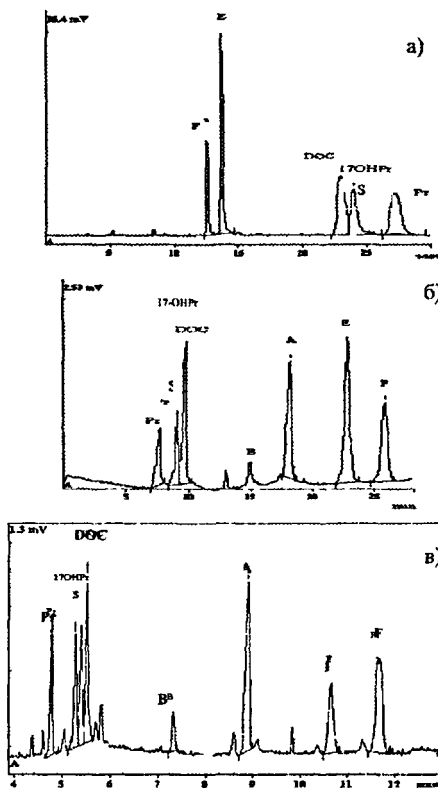


Рис.4. Электрофореграммы смеси кортикостероидов: F, E, A, B, 17-OHPr, DOC, S, Pr в режиме МЭХХ. Гидродинамический ввод пробы 300 мбар; условия КЭ: 22 кВ (а); -25кВ (б,в). Буферный электролит: 5мМ тетраборат натрия, 50мМ ДДСН, 20% метанола (а) 25мМ фосфорная кислота, 10мМ ДДСН, 15% метанола (б); 25мМ фосфорная кислота, 10мМ ДДСН, 4М мочевины (в). Раствор пробы: буферный электролит.

(аммиачно-атдетатный и боратный буферы, фосфорная кислота, 20 - 100 мМ); природа и концентрация мицеллообразователя: додецилсульфата (ДДСН) и холата натрия; роль органических растворителей (метанола и ацетонитрила 10 - 20 %, объемн.) в составе рабочего электролита; влияние добавок - циклодекстрина и мочевины. Использование ДДСН (10 мМ) в качестве мицеллообразователя (в отличие от холата натрия) оказалось возможным при разделении стероидных гормонов в кислой и щелочной среде (рис.4). Порядок выхода стероидов в щелочной среде соответствует увеличению их гидрофобности (как в случае ОФ ВЭЖХ), в кислой - он обращается: более гидрофобные аналиты элюируются первыми, что приводит и к заметному увеличению эффективности

разделения. Так, для прогестерона эффективность при $pH = 9,2$ составила - 48 000 т.т./м, а при $pH 2,5$ - 270 000 т.т./м. Этот результат важен, поскольку более гидрофобные стероидные гормоны находятся в сыворотке в значительно меньших концентрациях, чем кортизол и кортизон.

Вследствие большого сродства гидрофобных стероидов к мицеллам полного разделения достигнуть не удалось. Введение в состав рабочего электролита метанола (10-20%, объемн.) привело к улучшению разрешения пиков на электрофореграмме, но общее время возросло с 5 (0% метанола) до 28 мин. (20% метанола), что к тому же сопровождалось и снижением эффективности.

Оптимальный результат получен при введении в состав рабочего электролита (25мМ ортофосфорной кислоты; 10 мМ ДДСН) мочевины, способной образовывать водородные связи с ДДСН и тем самым ослаблять взаимодействия с аналитами: достигнуто с высокой эффективностью (рис.4в.) полное разделение стероидов. Зависимости параметров удерживания стероидов от концентрации мочевины представлены на Рис.5.

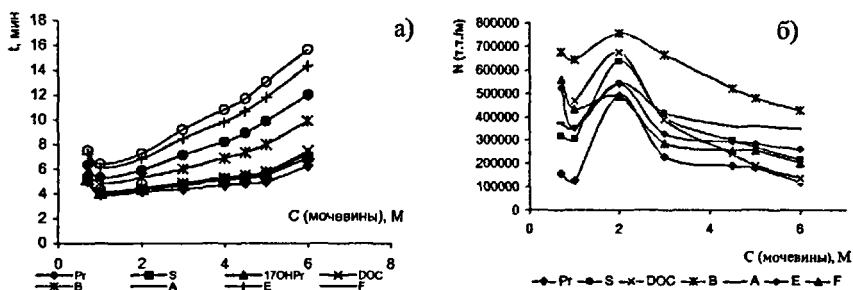


Рис. 5 Влияние концентрации мочевины на времена миграции кортикостероидов (а) и эффективность разделения (б).

В табл.4, представлены сравнительные характеристики электрофоретического разделения стероидов в различных условиях. Полученные пределы обнаружения для стероидных гормонов (5 - 2,5 мкг/мл), показали, что чувствительности УФ-детектирования недостаточно для их определения в сыворотке и моче. Поэтому необходимо было выработать стратегию on-line концентрирования в потоке. Изучены возможности различных вариантов *стэкинга* и *свипинга*: проба перед вводом разбавляется буфером или водой; аналиты движутся с высокой локальной скоростью, концентрируясь на границе, отделяющей зону высокой проводимости рабочего электролита и низкой - образца (стэкинг). При *свипинге* аналиты концентрируются псевдостационарной фазой

Таблица 4. Условия и некоторые характеристики разделения стероидов методом МЭХХ при различных рН

	Фосфорная кислота (рН=2,5) с добавкой мочевины	Борагный буфер рН=9,2	Фосфорная кислота (рН = 2,5) с метанолом
Полярность	Отрицательная	Нормальная	Отрицательная
Скорость ЭОП (см²/В с)	→ 0	3,6×10 ⁻⁴	→ 0
Эффективность, т.т./м	Рг – 350 000 F – 250 000	Рг – 45 000 F – 180 000	Рг – 250 000 F – 210 000
Общее время анализа, мин	12,5	27,0	22,0
Разрешение соседних пиков	>1,34	> 1,25	
Состав ведущего электролита	25мМ фосфорная к-та 10мМ ДДСН 4,5М мочевины	5мМ тетраборат натрия 50мМ ДДСН 20% метанола	25мМ фосфорная к-та 10мМ ДДСН 15% метанола
Условия ввода пробы, величина рабочего напряжения, параметры капилляра	Кварц: L _{эфф} /L _{общ} =30/80см; 75мкм, Ввод: 60 мбар с.		
	U: – 25 кВ I: – 28 мкА	U: +22 кВ I: +28 мкА	U: – 25 кВ I: – 33,5 мкА
Примечание	Полное разделение всех стероидов	Можно разделить все компоненты смсци, кроме 17-ОНРг и ДОС.	

(мицеллами), которая проникает в раствор образца без мицелл. В отличие от стэкинга проводимость раствора образца близка проводимости рабочего электролита. На модельной смеси стероидов проведен сравнительный анализ методов концентрирования: стэкинга с обращено-мигрирующими мицеллами, стэкинга с высокопроводящей матрицей (с использованием добавки **NaCl**), стэкинга с усилением поля, с обращенно-мигрирующими мицеллами и свипинга.

Процедура стэкинга позволила снизить предел обнаружения при МЭХХ определении стероидов в 15-30 раз, а свипинга - в 100 раз (Рис 6.). В табл. 5 приведены сравнительные характеристики методов ОФ ВЭЖХ и МЭХХ при определении стероидов в биологических жидкостях. В табл. 6 сопоставлены результаты МЭХХ и ОФ ВЭЖХ определения кортикостероидов в сыворотке крови больных с эндокринными нарушениями.

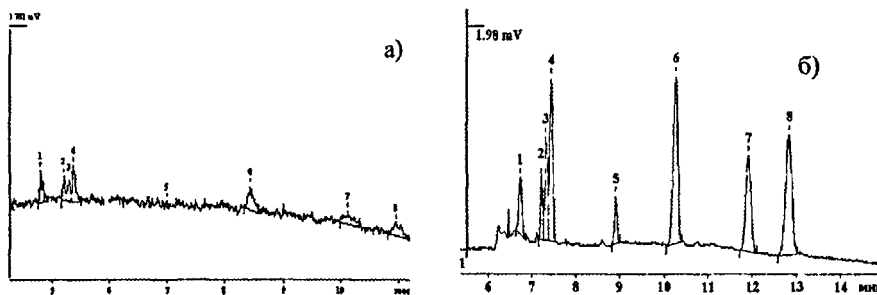


Рис. 6. Оптимизация свипинга на модельной смеси кортикостероидов (2,5 мкг/мл). Матрица образца: р-р H_3PO_4 , равной проводимости буферного электролита, с добавкой 5мМ р-ра р-ЦД. Ввод: 60 мбар с (а), 3000 мбарс (б). Буферный электролит: 25мМ ортофосфорная кислота (рН=2,5), 10 мМ ДДСН, 4,5М мочевины; напряжение: -25 кВ, ток: -28 мкА. Компоненты пробы: 1- прогестерон, 2 - 11-дезоксикортизол, 3 - 17 - гидроксипрогестерон, 4 - 11-дезоксикортикостерон, 5 - кортикостерон, 6 - 11-дегидрокортикостерон, 7 - кортизон, 8 - кортизол.

Таблица. 5. Сопоставление методов ОФ ВЭЖХ и МЭКХ, используемых при определении кортикостероидов

Контролируемый параметр	МЭКХ	ОФ ВЭЖХ (Изократическое элюирование)
Эффективность, тт/м	250 000 – 350 000	10 000 – 15 000
Линейный диапазон определяемых концентраций	0,05 – 500 мг/л	0,02 – 1000 мг/л
Предел обнаружения (мкг/л)	50 мкг/л (без конц.), 3 мкг/л (с конц.).	30 мкг/л (без конц.), 2 мкг/л (с конц.)
Объем пробы	20 нл	20 мкл
Скорость потока	0,3 мкл/мин	250 мл/мин
Разрешение R (n, n+1)	> 1,25	> 1,25
Время анализа (мин)	15 мин	34 мин
Вспомогательные процедуры:		
- кондиционирование капилляра (колонки)	10-15 мин	15-20 мин
- проведение пробоподготовки	20 мин	20 мин
Порядок элюирования	В порядке уменьшения гидрофобности	В порядке ув. гидрофобности.

Таблица 6. Данные ВЭЖХ и МЭЖХ определения кортикостероидов в сыворотке крови и моче больных с гипертензией.

	Сыворотка							Моча		
	F	E	F/E	B	DOC	S	17-ОНPr	F	E	E/F
ВЭЖХ	35,0 ±2,5	10,9 ±0,4	3,2	3,8 ±1,2	3,9 ±1,1	2,0 ±0,5	<1,0	12,0 ±2,1	29,6 ±2,0	2,5
	38,5 ±2,1	14,8 ±1,1	2,6	3,0 ±0,7	2,8 ±0,7	3,0 ±0,3	<1,0	10,6 ±1,8	28 ±3	2,6
МЭЖХ	33 ±4	11,2 ±1,5	2,9	3,9 ±1,8	4,5 ±1,0	3,0 ±1,9	<3,0	13,5 ±0,6	27 ±3	2,0
	39,1 ±2,0	14,0 ±2,2	2,8	3,0 ±1,5	3,2 ±0,8	3,7 ±0,4	<3,0	11,7 ±2,3	30,2 ±1,1	2,6

Глава 4 посвящена определению катехоламинов методом КЭ с УФ и МС-детектированием. Для корректной диагностики эндокринных нарушений необходимо определение катехоламинов: адреналина (E), норадреналина (NA), дофамина (DA) в биологических жидкостях. Наличие легко окисляемых фенольных гидроксиллов обеспечивает режим их определения методом ОФ ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Одним из ограничений данного метода является невозможность добиться одновременного разделения биогенных аминов и их основных, кислотных и нейтральных метаболитов. Использование зонного капиллярного электрофореза (КЗЭ) с УФ-детектированием для определения катехоламинов в сыворотке крови и моче невозможно из-за недостаточной чувствительности. В связи с этим, наряду с методом КЭ-УФ, изучены возможности электрофоретического разделения катехоламинов методом КЗЭ с масс-спектрометрическим детектором. Установлен такой режим работы масс-спектрометра, при котором детектирование катехоламинов осуществляется по соответствующим сигналам молекулярных ионов практически без фрагментации.

Катехоламины в режиме КЗЭ могут быть определены в катионной и анионной формах. Исследованы оба варианта. При оптимизации условий варьировали состав вводимой пробы, состав буферного электролита, концентрацию и pH, наличие солевых добавок и органических модификаторов. Оптимальный состав рабочего электролита: 50 мМ ацетатно-аммонийный буфер с добавкой 5 мМ диэтиламин гидрохлорида (pH = 4,5). Был оптимизирован режим работы электроспрея: скорость газа-осушителя 5 л/мин, температура 200°C, давление 14 кПа; состав обволакивающей жидкости: изопропиловый спирт/вода (1:1), 0,5 % уксусной кислоты; скорость обволакивающей жидкости 4мкл/мин. Отработана процедура пробоподготовки с использованием варианта твердофазной экстракции (ТФЭ) на оксиде алюминия, промытом кислотой. Сопоставление данных, полученных методом КЭ-МС и ОФ ВЭЖХ-ЭХ, показало, что капиллярный электрофорез с масс-спектрометрическим детектированием уступает по пределу обнаружения методу

ВЭЖХ с амперометрическим детектированием при сопоставимом времени анализа (табл.7).

Таблица 7. Пределы обнаружения катехоламинов, определенные методами КЭ-МС, КЭ-УФ и ВЭЖХ-АД

Соединение	m/z [M+1]	Норма катехоламинов в моче, нмоль/л	Предел обнаружения, нмоль/л		
			КЭ-МС	КЭ-УФ	ВЭЖХ-АД
Дофамин	154,1	649 – 4930	110 ± 3	650 ± 2	1,87±0,04
Адреналин	184,1	81,5 – 200	90 ± 2	540 ± 1	0,15±0,03
Норадреналин	170,1	58,8 – 230	100 ± 1	590 ± 3	0,27±0,03

Глава 5. Практическое приложение. Обнаруженные на модельных смесях закономерности позволили разработать методику определения стероидов методом ОФ-ВЭЖХ и МЭХХ в сыворотке крови и моче больных с эндокринными нарушениями. Обследованы сыворотка крови и моча здоровых доноров (21 человек) и 4 групп пациентов с диагнозами: 1. врожденная гиперплазия коры надпочечников (ВГКН) (19 человек); 2. альдостерома (10 человек); 3. рак коры надпочечников (12 человек); 4. синдром Иценко-Кушинга (15 человек) Определен диапазон нормы содержания стероидов у здоровых доноров и при различных заболеваниях коры надпочечников (табл. 8, 9). Установлены соотношения диагностически важных стероидов. Так, при врожденной гиперплазии коры надпочечников (стертая форма) (Рис.7а) — отмечено снижение уровня кортизола в крови и свободную кортизола в моче, что, в свою очередь, приводит к уменьшению соотношения кортизол/кортизон как в крови, так и в моче; а также увеличение

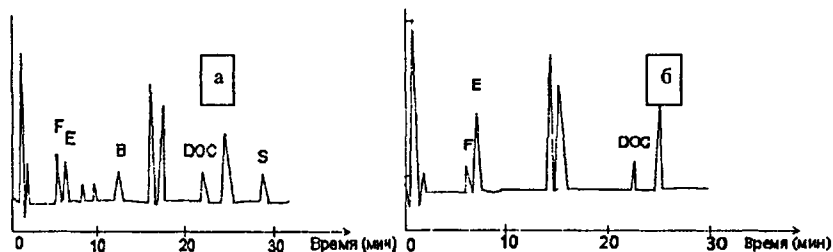


Рис.7. Хроматограмма сыворотки крови (а) и мочи (б) пациента с диагнозом врожденная гиперплазия коры надпочечников. Условия анализа на рис.6.

выработки предшественников стероидогенеза 11-дезоксикортизол и 11-дезоксикортикостерона. Погущенные стероидные профили являются характеристичными для данных заболеваний.

Таблица 8. Данные хроматографического определения кортикостероидов в сыворотке кроли при различных эндокринных нарушениях.

N	Группа обследуемых	Количество наблюдаемых	Сыворотка крови (нг/мл)					
			F	E	B	DOC	S	F/E
1	Норма	21	64±3	19,9±1,1	3,8±0,3	4,0±0,4	2,4±0,2	3,3±0,2
2	ВГКГ (стертая форма)	19	34±4	22,2±2,9	5,9±0,9	21±6	13,4±1,8	1,8±0,1
3	Альдостерома	10	85,2±5	26±3	16,0±2,5	31±8	12,3±1,9	4,0±0,2
4	Рак коры надпочечников	12	100±15	28±5	30±6	26,9±2,9	44±7	4,8±1,1
5	Синдром Иценко-Кушинга	15	193±21	30±4	15,0±2,1	12±4	10±3	8,7±0,9

Таблица 9. Данные хроматографического определения кортикостероидов в моче

N	Группа обследуемых	Количество наблюдаемых	Моча (мкг/24 ч)		
			F	E	F/E
1	Норма	21	13,3±0,6	35±2,1	0,40±0,02
2	ВКГН (стертая форма)	19	5,8±0,6	24,4±2,8	0,26±0,02
3	Альдостерома	10	6,0±1,2	25±6	0,26±0,04
4	Синдром Иценко-Кушинга	15	241±12	266±16	0,9±0,1

Разработанная методика метрологически аттестована и используется для определения кортикостероидов в клинической лаборатории.

ВЫВОДЫ.

1. Выявлены факторы, определяющие закономерности хроматографического и электрофоретического разделения стероидных гормонов: состав элюента (ацетонитрил - вода) и рабочего электролита (25 мМ ортофосфорная кислота; pH=2,5), концентрация мицеллообразователя (10 мМ ДДС11), природа и концентрация органических модификаторов (20% метанола и 4,5М раствора мочевины) в составе буферного электролита и подвижной фазы.
2. Обнаружен эффект доминирующего влияния β-циклодекстрина, введенного в состав элюента, в изократическом режиме ОФ ВЭЖХ на разделение стероидов, и проведена количественная оценка имеющего место комплексобразования. Показано, что наиболее

прочные комплексы с ЦД образуют более гидрофобные стероиды - тестостерон и 11-дезоксикортикостерон.

3. Оптимизирован регламент пробоподготовки биологических жидкостей при определении стероидных гормонов и показано, что для анализа сыворотки крови предпочтительно использование твердо-фазной экстракции (сорбционные патроны **C18**; элюент - этанол).

4. Установлено, что использование динамического концентрирования (*стэкинга и свипинга*) при определении стероидов методом мицеллярной электрокинетической хроматографии позволяет снизить предел обнаружения при стэкинге \sim в 20 раз, при свипинге \sim в 100 раз.

5. Установлено влияние pH, состава и концентрации буферного электролита (50 мМ ацетатно-аммиачный буфер с добавкой 5 мМ диэтиламин гидрохлорида; pH=4,5), режима работы электроспрея (напряжение + 4 кВ; скорость газа-осушителя — 5 л/мин; скорость потока обволакивающей жидкости - 4 мкл/мин; состав обволакивающей жидкости: изопропиловый спирт/ вода (50:50 %, по объему), 0,5% уксусная кислота) на разделение катехоламинов в капиллярном зонном электрофорезе с масс-спектрометрическим детектированием.

6. Получены сравнительные количественные характеристики методов ОФ ВЭЖХ и МЭХХ с УФ детектированием при определении стероидных гормонов. По эффективности и времени анализа МЭХХ предпочтительна по сравнению с ОФ ВЭЖХ, незначительно уступая по пределу обнаружения.

7. На основании установленных закономерностей разработаны методики определения стероидных гормонов в сыворотке крови и моче методами изократической ОФ ВЭЖХ и МЭХХ и получены характеристические стероидные профили, используемые для диагностики эндокринных патологий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Великанова ЛИ, Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Шафигулина З.Р., Серебрякова И.П., Милютин О.Л. Диагностическое значение ВЭЖХ кортикостероидов при различных патологиях системы гипофиз - кора надпочечников. Клиническая лабораторная диагностика. 2001. №10. С. 34 -35.
2. Ворохобина Л.В., Великанова Л.А., Бессонова Е.А., Серебрякова И.П. Некоторые особенности стероидогенеза у больных с различными формами врожденной гиперплазии коры надпочечников. Тезисы научно-практической конференции молодых ученых

СПбМАПО "Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины". 2001. С. 40-42.

3. Великанова Л.И., Карцова Л.А, Бессонова Е.А., Шафигулина З.Р. Диагностическое значение ВЭЖХ кортикостероидов в биологических жидкостях при различных патологиях системы коры надпочечников Тезисы симпозиума «Национальные дни лабораторной медицины» России. 9-11 октября СПб. 2001. С.72.
4. Великанова Л.И., Карцова Л.А, Бессонова Е.А., Арефьева Е.В., Егорова П.И. Диагностическое значение ВЭЖХ для анализа кортикостероидов в биологических жидкостях у больных с патологией надпочечников. Материалы 4-го Всероссийского конгресса эндокринологов «Актуальные проблемы современной эндокринологии». СПб. 2001. С. 56.
5. Ворохобина, Л.В.. Великанова, Л.И. Кораблина И.П., Бессонова Е.А., Крихели И.О., Арефьева Е.В. Некоторые особенности стероидогенеза у больных со стертой формой врожденной гиперплазии коры надпочечников. Материалы 4-го Всероссийского конгресса эндокринологов «Актуальные проблемы современной эндокринологии». 2001. СПб. С.78.
6. Карцова Л.А., Полякова Е.А., Великанова Л.И., Королева Е.М. Определение кортикостероидов в сыворотке крови методом жидкостной хроматографии. Тезисы IX Международной конференции по теоретическим вопросам адсорбции и адсорбционной хроматографии. 24-28 апреля. 2001г. Москва, с. 177.
7. Карцова Л.А., Великанова Л.И., Бессонова Е.А. Оптимизация процедуры пробоподготовки при ВЭЖХ-анализе стероидных гормонов в биологических матрицах. Тезисы VIII Всероссийского симпозиума по жидкостной хроматографии и капиллярному электрофорезу. 15-19 октября . Москва. 2001.С.96
8. Карцова Я.Л, Великанова Л.И., Бессонова Е.А., Павлова Е.Г.. Интерпретация хроматографических профилей кортикостероидов в биологических жидкостях полученных методов. ОФ-ВЭЖХ для диагностики патологии коры надпочечников. Тезисы Всероссийского симпозиума «Современным проблемам хроматографии» 18-22 марта 2002 г. Москва. С. 99.
9. Великанова Л.И., Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Павлова Е.Г., Крихели И.О., Шафигулина З.Р., Серебрякова И.П. ВЭЖХ кортикостероидов биологических жидкостей в ранней диагностике патологий коры надпочечников. Тезисы 1 International conference «High medical technologies in XXI century» November 2-9 2002, Spain Benidorm. P. 62.
10. Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Изучение влияния β -циклодекстрина на разделение смеси стероидных гормонов коры надпочечников методом ОФ ВЭЖХ. Тезисы

Всероссийского симпозиума «Современные проблемы хроматографии» 18-22 марта. 2002 г. Москва. Клязьма. С. 104.

11. Карцова Л.А., Великанова Л.И., Павлова Е.Г., Бессонова Е.Л. Интерпретация хроматографических профилей кортикостероидов биологических жидкостей, полученных методом ВЭЖХ, для диагностики патологии коры надпочечников. Тезисы Всероссийского симпозиума «Современные проблемы хроматографии». 24-31 марта 2002 . Москва. С.99.

12. Kartsova L.A., Velikanova L.I., Pavlova E.G., Bessonova E.A. The investigation of steroidogenic characters and corticosteroids metabolism by RP-11PLC. IIIrd International symposium on separations in BioSciences "100 years of Chromatography". 13-18 may 2003 Moscow. P. 118.

13. Velikanova L.I., Kartsova L.A., Serebryakova I.P., Gloukhov N.V., Bessonova E.A., Pavlova E.G. "High Performance Liquid Chromatography of corticosteroids in the Diagnosis of Adrenal Steroidogenesis Abnormalities in different forms of Hyperandrogenism" // 11 Международный конгресс «Современные медицинские технологии XXI века» Бенидорм, Испания, 1-7 ноября 2003 P.92.

14. Великанова Л.И., Ворохобина Н.В, Серебрякова И.П., Павлова Е.Г., Бессонова Е.А. Диагностическое значение хроматографических профилей кортикостероидов при различных формах надпочечниковой гиперандрогении // Конференция «Врачи мира пациентам». Санкт-Петербург. Сентябрь 2003. С. 15-16.

15. Карцова Л.А, Великанова Л.И, Бессонова Е.А., Сидорова А.А, Казаков В.А., Тверьянович И.А. Определение адреналина, норадреналина и дофамина, методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием. Журн. Аналит. химии. 2004. Т. 59. С. 815-823.

16. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Казаков В.А., Бессонова Е.А., Яшин А.Я. «Определение катехоламинов методами капиллярного электрофореза и ОФ'ВЭЖХ» // Всероссийский симпозиум «Хроматография и хроматографические приборы». 15-19 марта 2004г. Москва. С. 199.

17. Карцова А.А., Бессонова Е.А., Великанова Л.И. «Определение кортикостероидов в сыворотке крови методом мицеллярной электрокинетической хроматографии». // Всероссийский симпозиум «Хроматография и хроматографические приборы». 15-19 марта 2004. Москва. С.239.

ЛР № 040815 от 22.05.97.

Подписано к печати 12.04.2004 г. Формат бумаги 60X84 1/16 Бумага офсетная.

Печать ризографическая. Объем 1 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 3225.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ
с оригинал-макета заказчика.

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр., 26.

№ - 2332