



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АКАДЕМИЧЕСКАЯ ГИМНАЗИЯ

Характеристические профили стероидных гормонов и аминокислот, полученные методами ВЭЖХ и ВЭТСХ

Кулькова Валерия

АГ СПбГУ, 11 кл.

Научный руководитель:

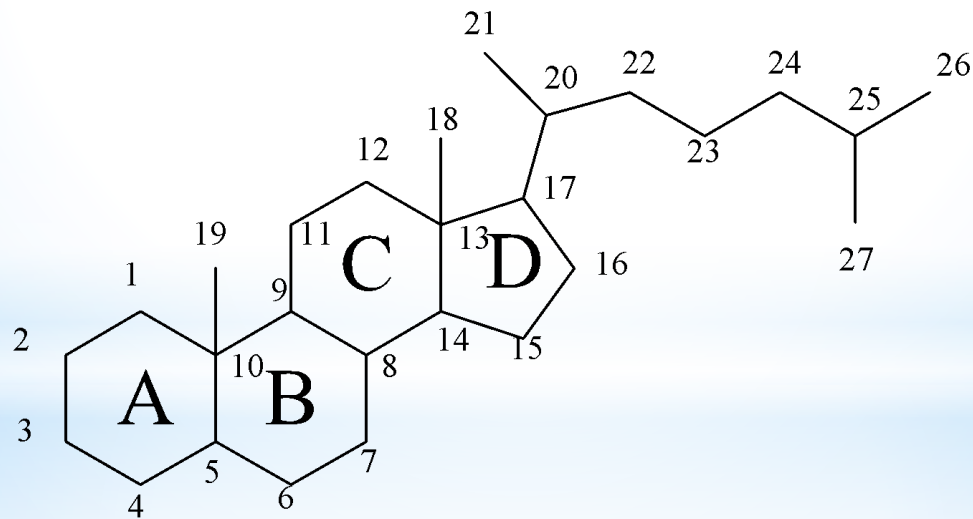
проф. СПбГУ, д.х.н. К..... Анна Алексеевна

г. Санкт-Петербург

2013 год

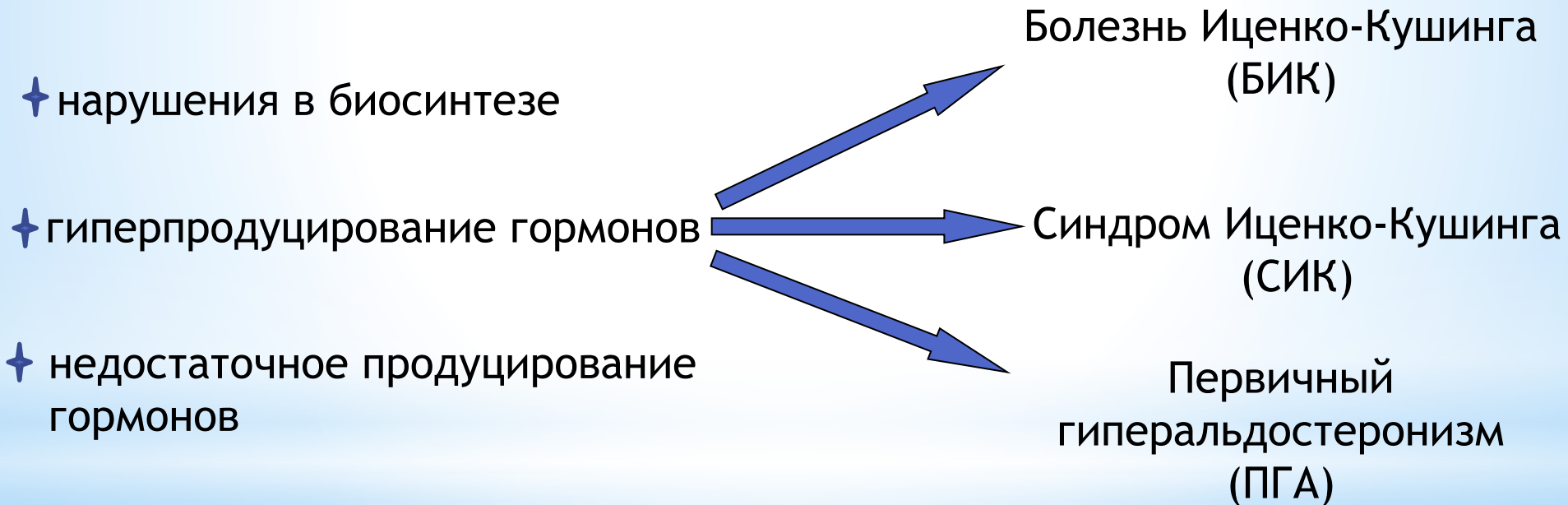
Краткая характеристика стероидов

Стероидные гормоны - биологически активные вещества, вырабатываемые железами внутренней секреции. Обладают строго избирательным действием противовоспалительным и антиаллергическим



Заболевания, связанные с нарушением работы эндокринной системы

Причины заболеваний:

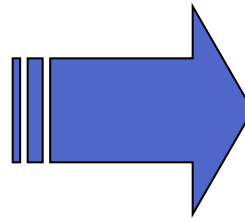


Традиционные методы диагностики

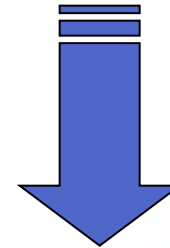
1) ИФА. Анализ содержания кортизола в сыворотке крови и моче

2) Дексаметазоновая проба

3) Данные ультразвукового исследования, КТ, МРТ



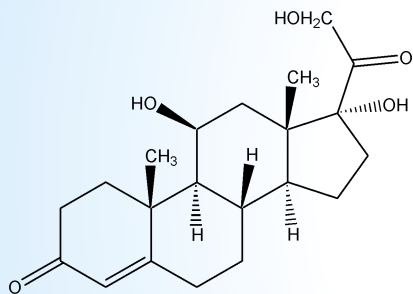
Диагностика –
длительная, и часто
дорогостоящая
процедура



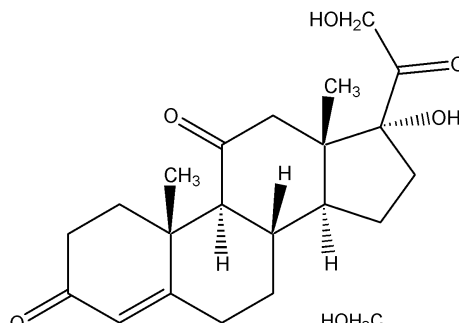
Разработка метода
экспресс-диагностики

Структурные формулы кортикостероидов и стероидных лекарственных средств

Эндогенные кортикостероиды



Кортизол



Кортизон



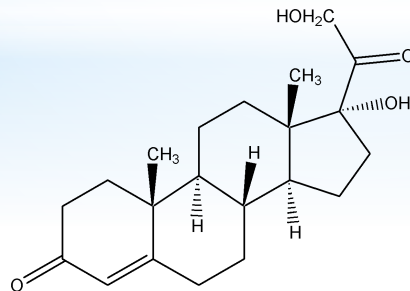
11-дегидро-
кортикостерон



Кортикостерон



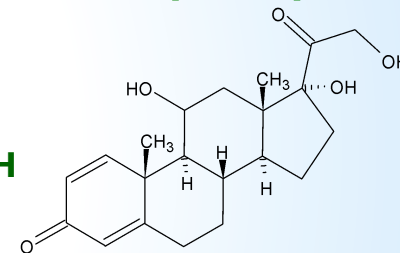
11-дезокортикостерон



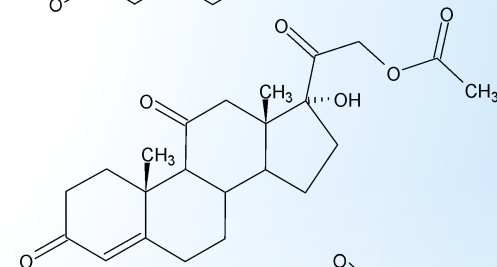
11-дезокортизол

Экзогенные стероидные лекарственные препараты

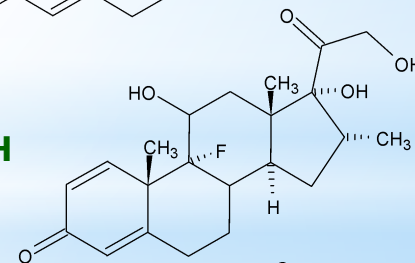
Преднизолон



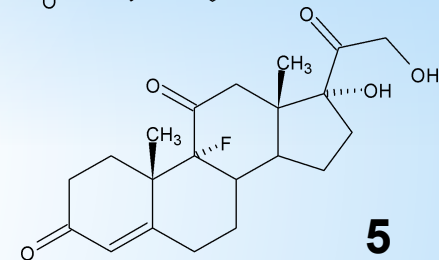
Кортизон
ацетат



Дексаметазон



Кортинефф



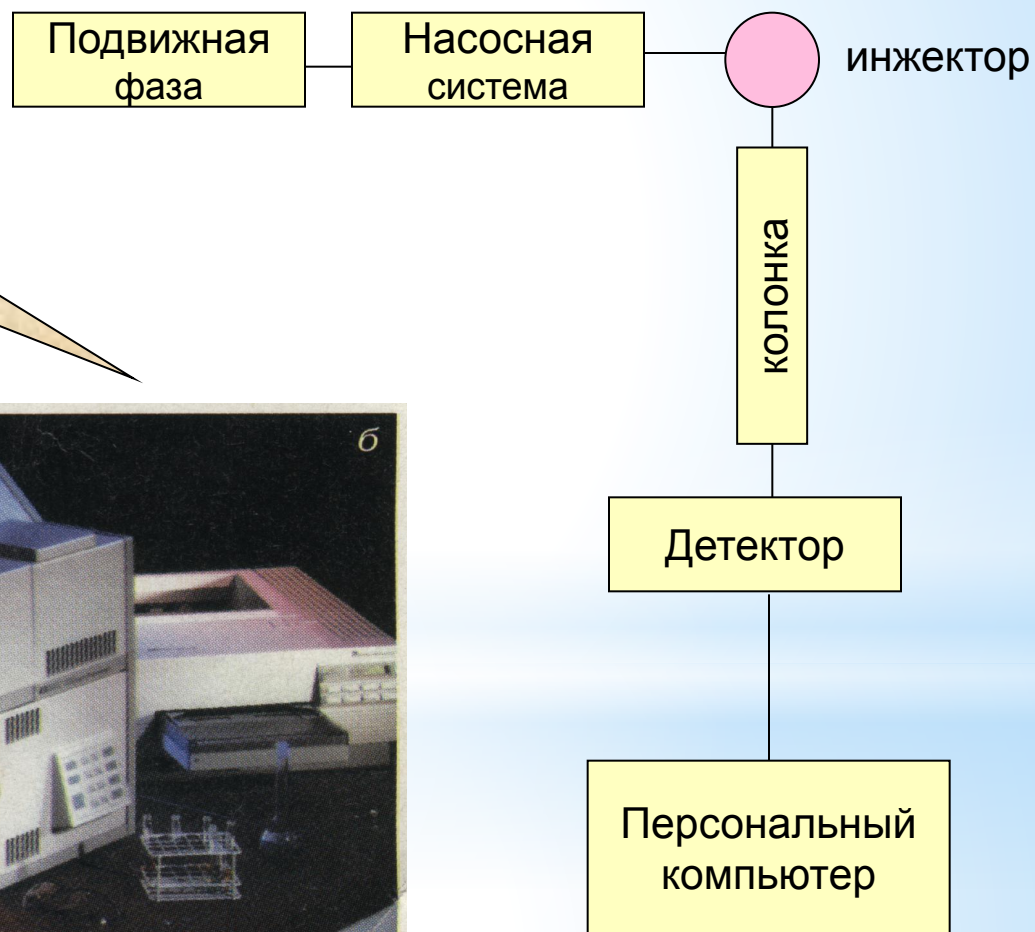
Цель работы

Оптимизировать хроматографические (ВЭТСХ и ВЭЖХ) условия разделения и пробоподготовки стероидных гормонов, провести хемометрическую обработку с целью получения дополнительных диагностических критериев эндокринных патологий

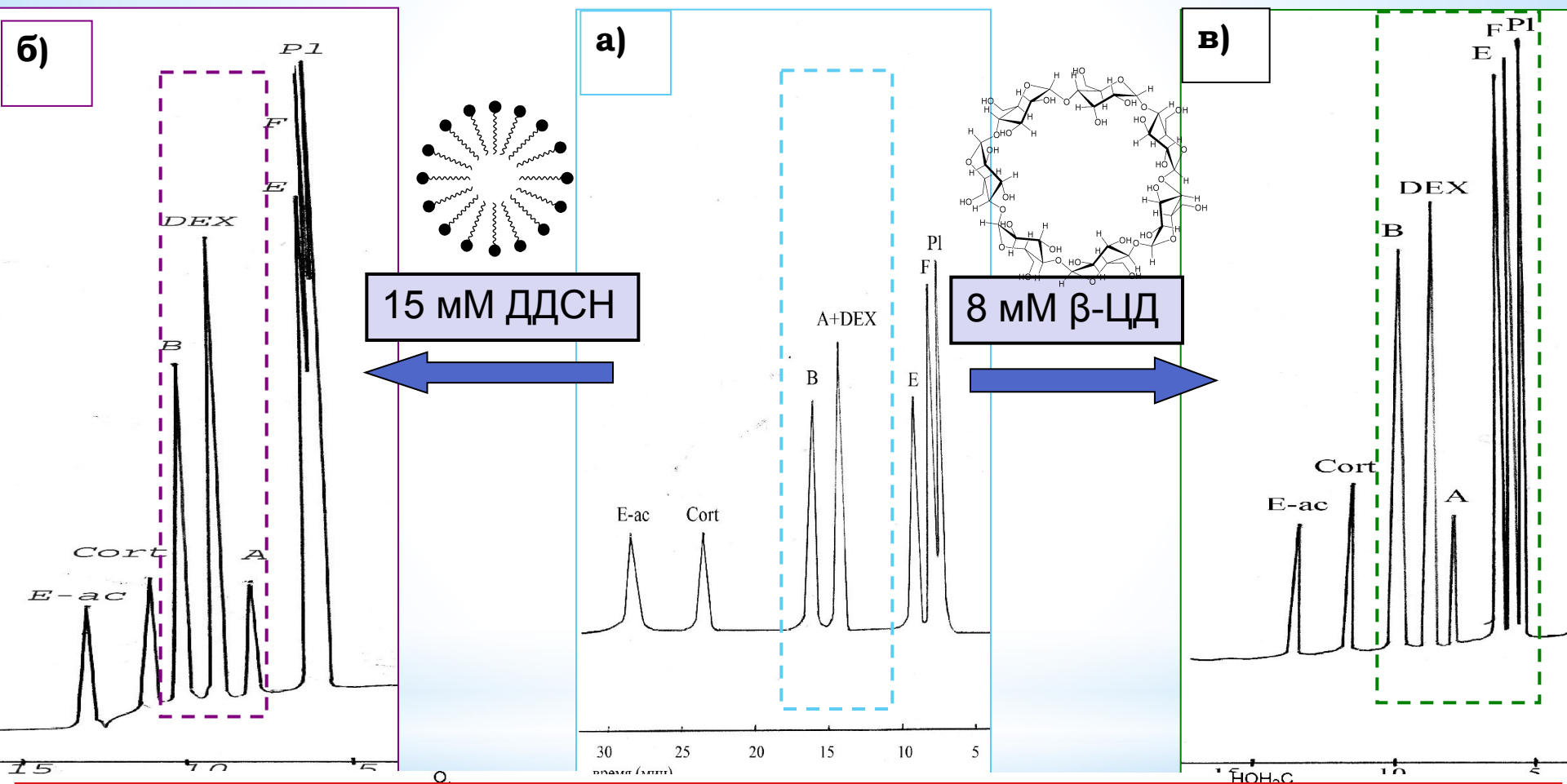
Задачи

1. Оптимизация условий разделения стероидных гормонов с использованием методов ВЭТСХ и высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.
2. Определить пределы обнаружения аналитов.
3. Разработка процедуры пробоподготовки.
4. Выявление возможности получения характеристических профилей.

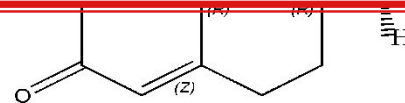
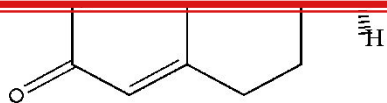
Блок-схема
жидкостного
хроматографа



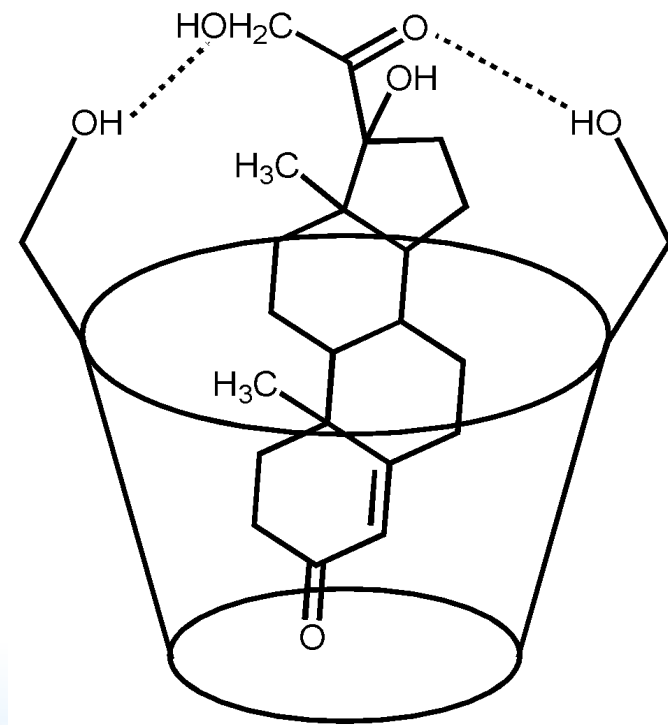
Высокоэффективная жидкостная хроматография стероидов



Предел обнаружения 3 – 5 мкг/л



Комплексообразование циклодекстринов (ЦД) со стероидными гормонами



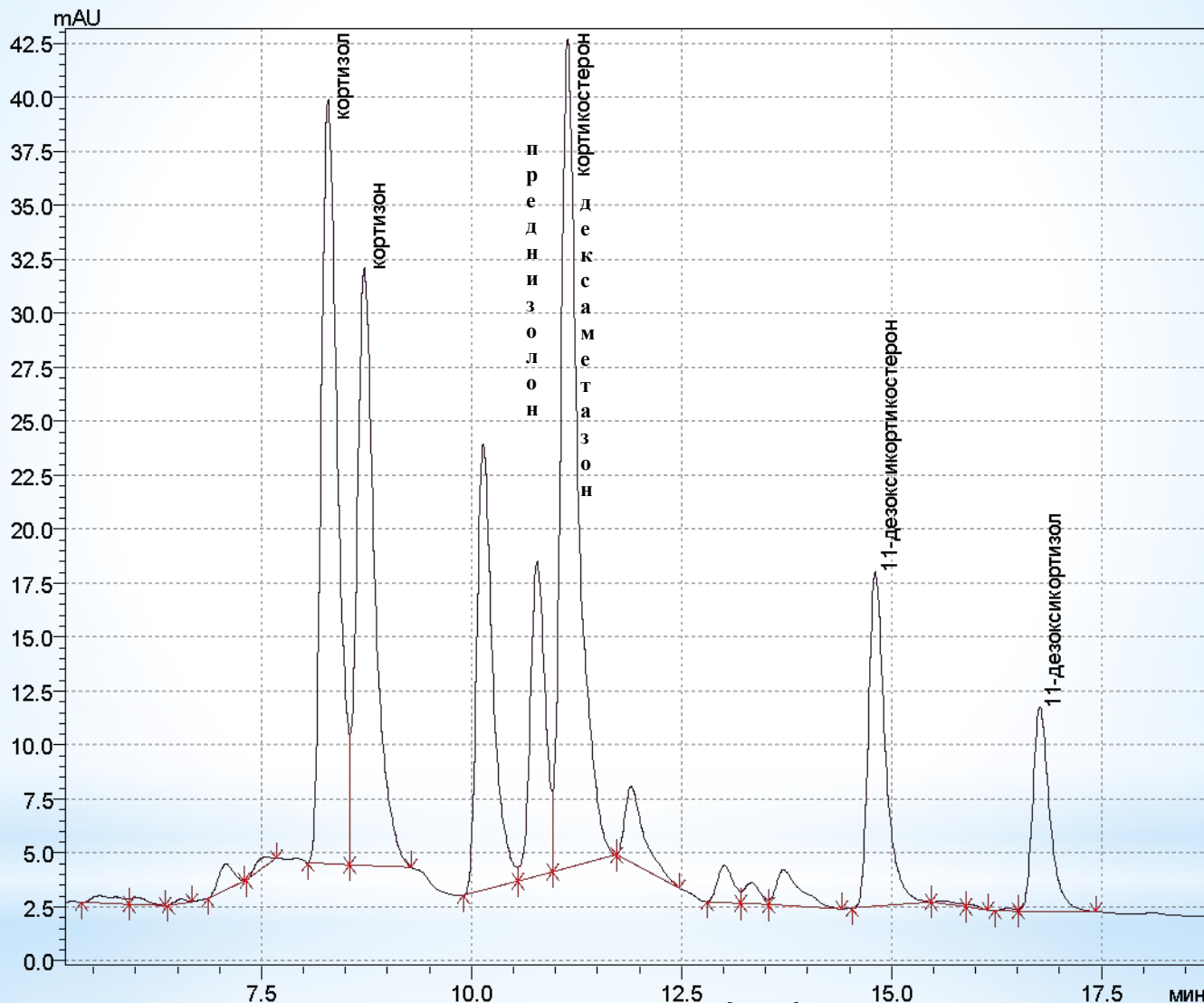
β -ЦД:

Растворимость: 1,85 г/100 мл (25°),

Объем полости: 0,346 нм³,

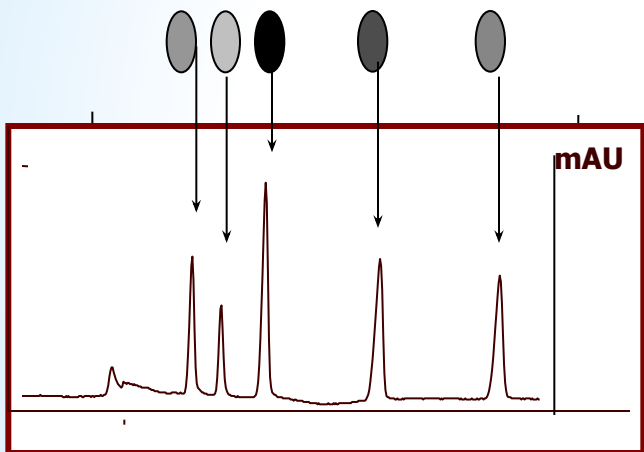
Внутренний диаметр полости: 0,60-0,65 нм,

pKa: 12,20



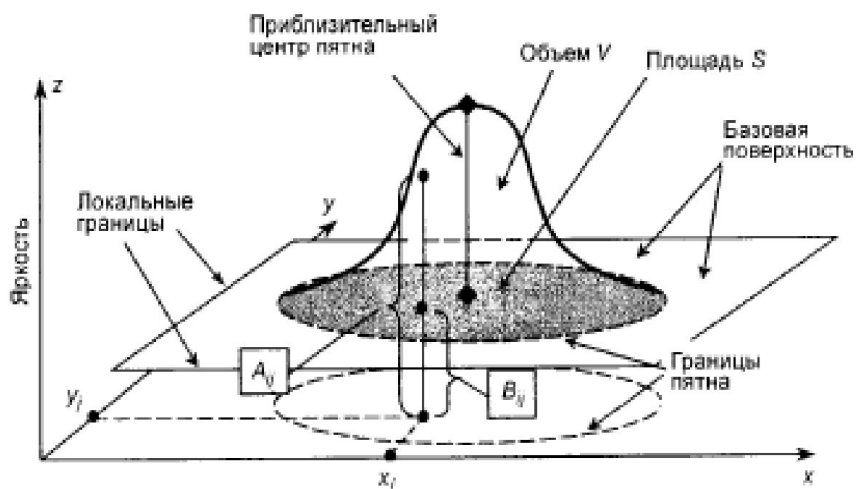
Хроматограмма смеси стандартов гидрофобных лекарств и эндогенных гормонов («Shimadzu»). Подвижная фаза: ацетонитрил-вода, градиентный режим. Детектор УФ, 254 нм. Скорость потока: 300 мкл/мин. Объем пробы: 20 мкл.

ВЭТСХ

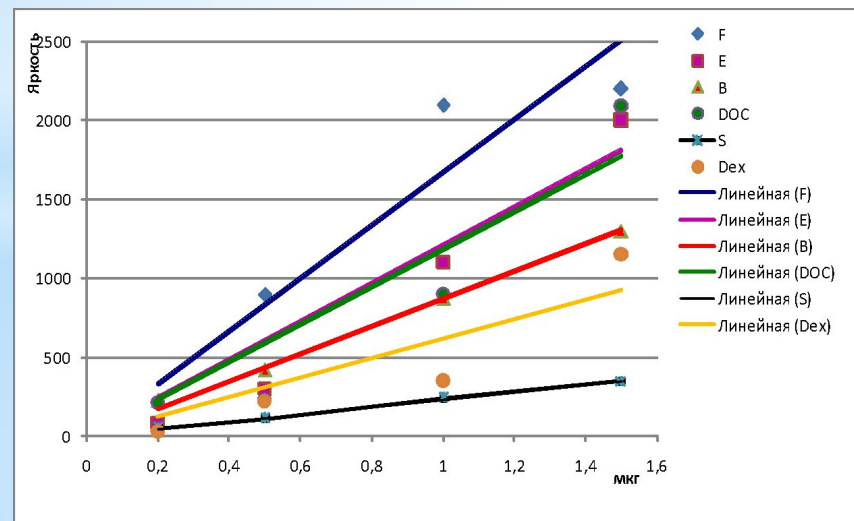
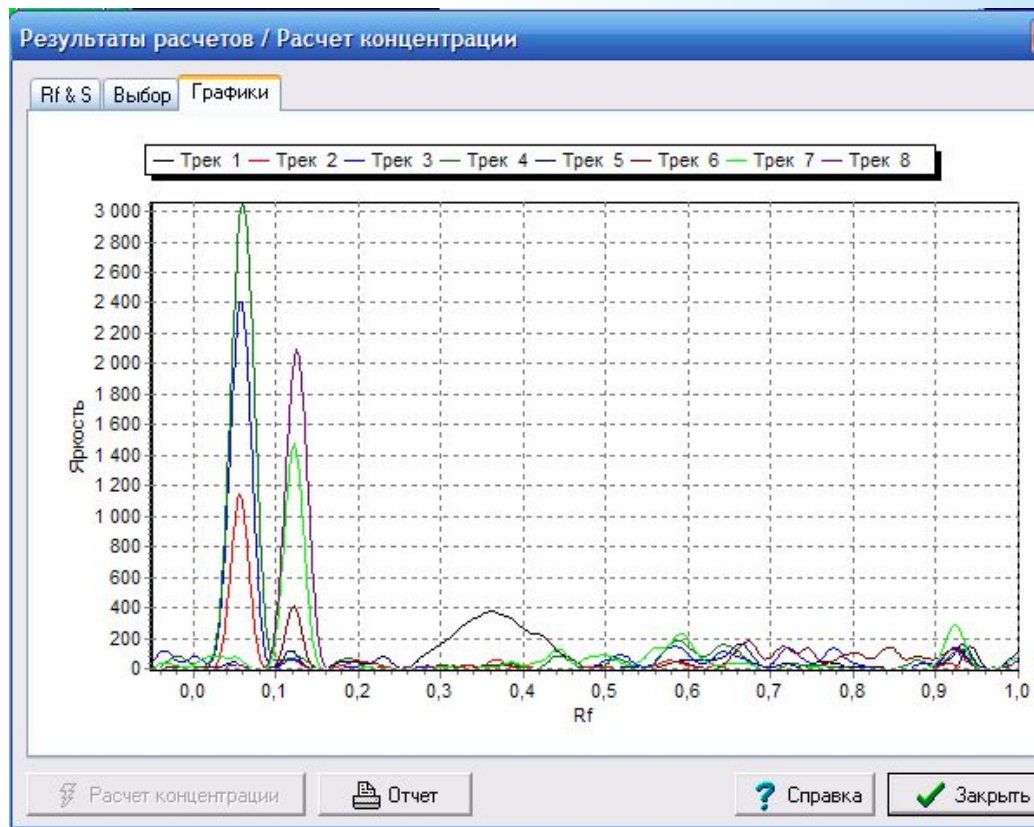
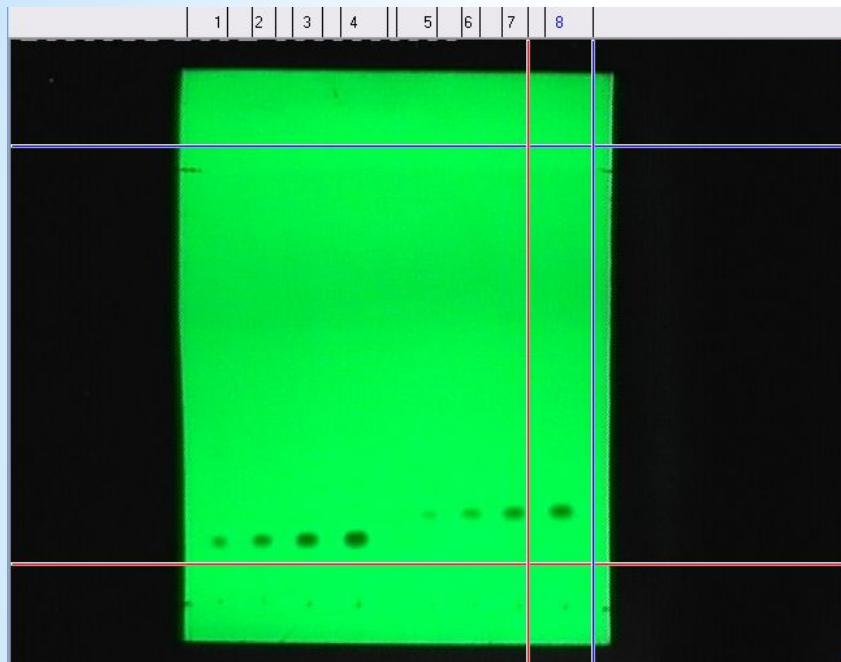


Достоинства

- экспрессность
- одновременное определение образцов
- количественный анализ



Количественная обработка данных (ТСХ)



**Количественная обработка
экспериментальных данных в ВЭТСХ
методом видеоденситометрии с
использованием программы Sorbfill TLC.**

Используемые материалы

C_{18}

Purosep 270
(сверхсшитый
полистирол)

Силикагель

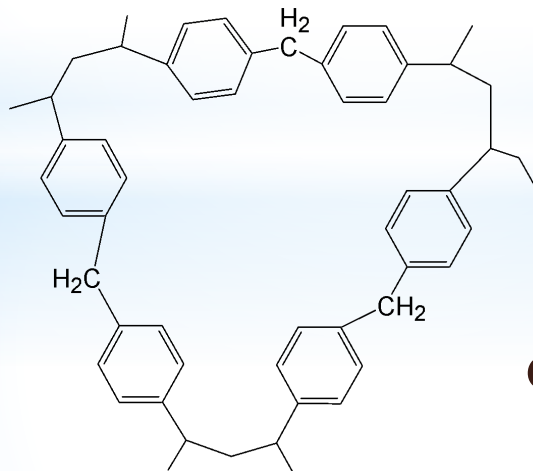
Гидрофобные
соединения

Гидрофильные
соединения

$S_{уд} = 1500 \text{ м}^2/\text{г}$,

плотность = 0,7

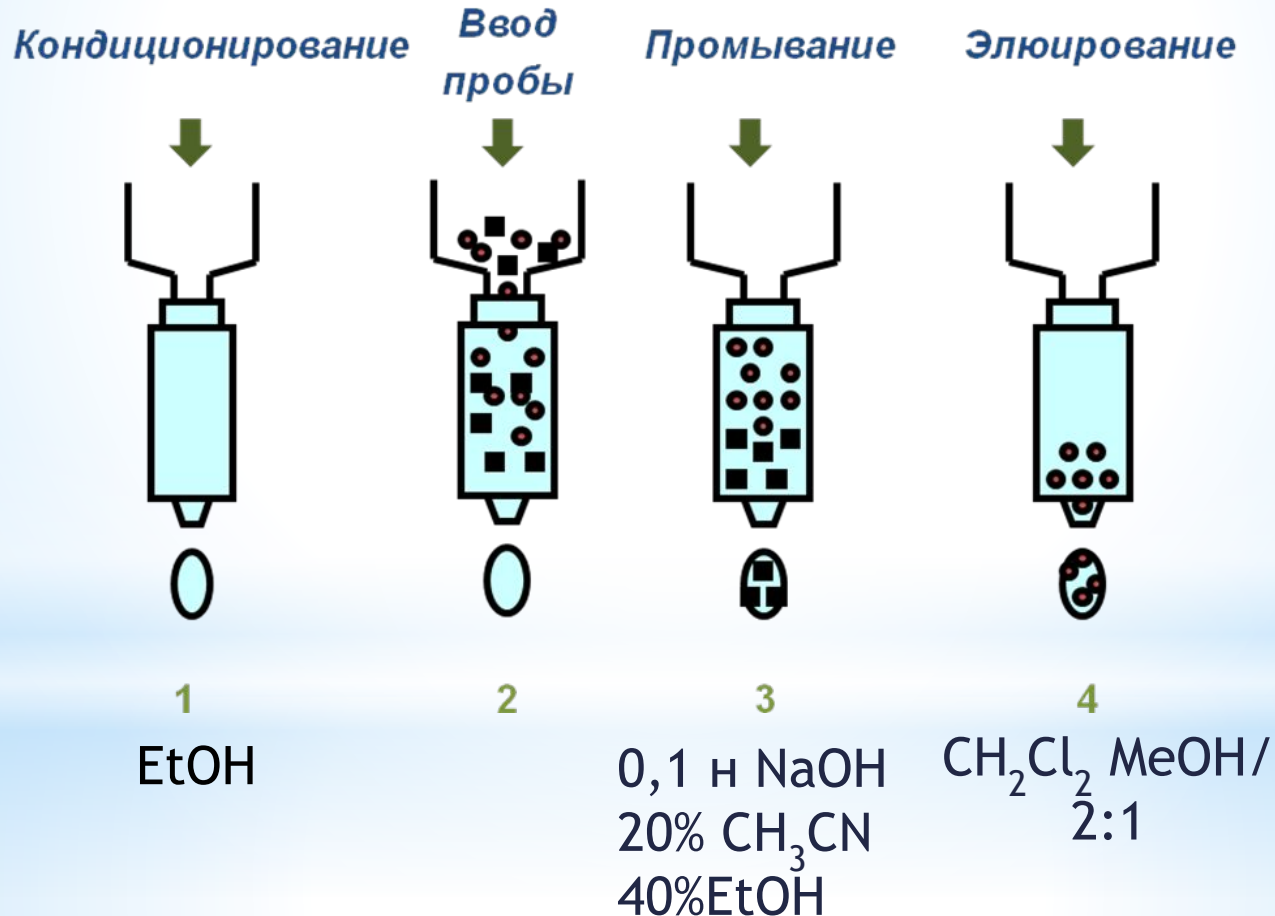
$\text{г}/\text{см}^3$ $d_{пор} = 200 \text{ \AA}$



Фрагмент структуры
сверхсшитого полистирола

Твердофазная экстракция (ТФЭ)

Схема твердофазной экстракции Purosep 270



Стероидный гормон	Степень извлечения (%)		
	Сыворотка крови		Моча
	Хлороформ	Дихлорметан	Хлороформ
<i>Преднизолон</i>	72,3±2,3	80,3±1,5	85,3±2,6
<i>Кортизон ацетат</i>	65,4±2,1	79,5±2,5	93,2±1,8
<i>Дексаметазон</i>	55,6±1,4	64±4	79,6±2,7
<i>Кортинефф</i>	54,3±1,2	62±3	80,2±2,5
Кортизол	81,0±4,3	82,3±2,5	102,8±3,5
Кортизон	78,6±2,6	80,6±1,8	93,7±2,5
Кортикостерон	54,0±1,5	72,6±2,5	70,0±3,0
11-дезоксикортикостерон	50,0±2,3	65,8±1,5	71,0±3,0
11-дезоксикортизол	47,0±4,0	64,4±1,9	65,5±1,9

Степень извлечения = $(S_x - S) / S_0 * 100\%$,

где S_x – площадь хроматографического пика

аналита после экстракции объекта со стандартной добавкой;

S_0 – площадь хроматографического пика аналита

до экстракции водного раствора стандарта;

S - площадь хроматографического пика аналита после экстракции биологического объекта;

Метод главных компонент (МГК)

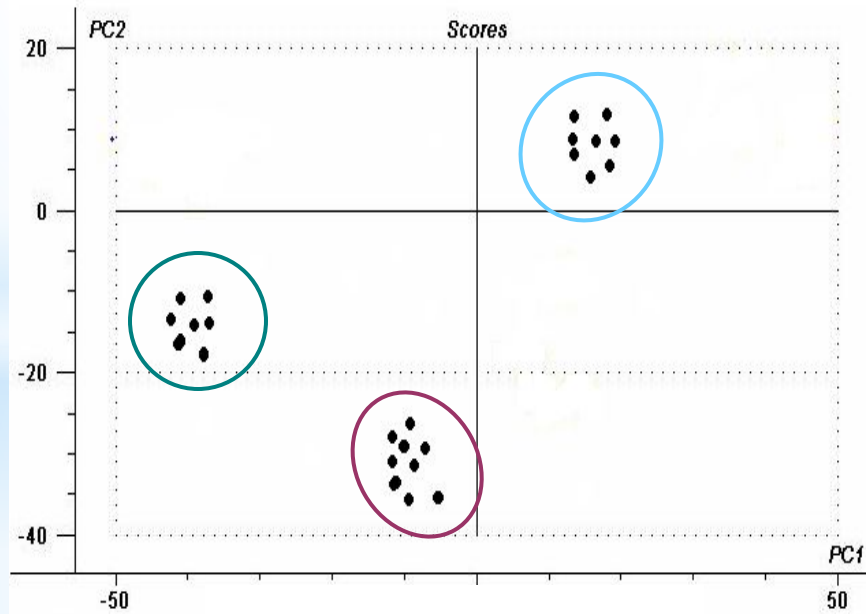
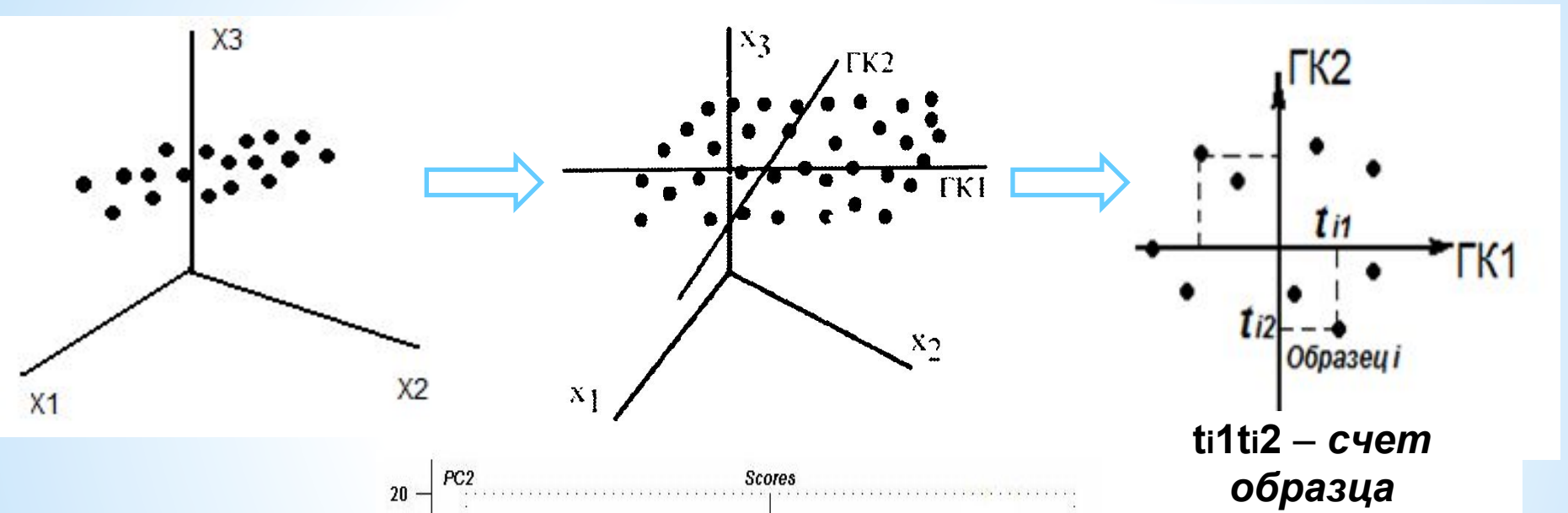
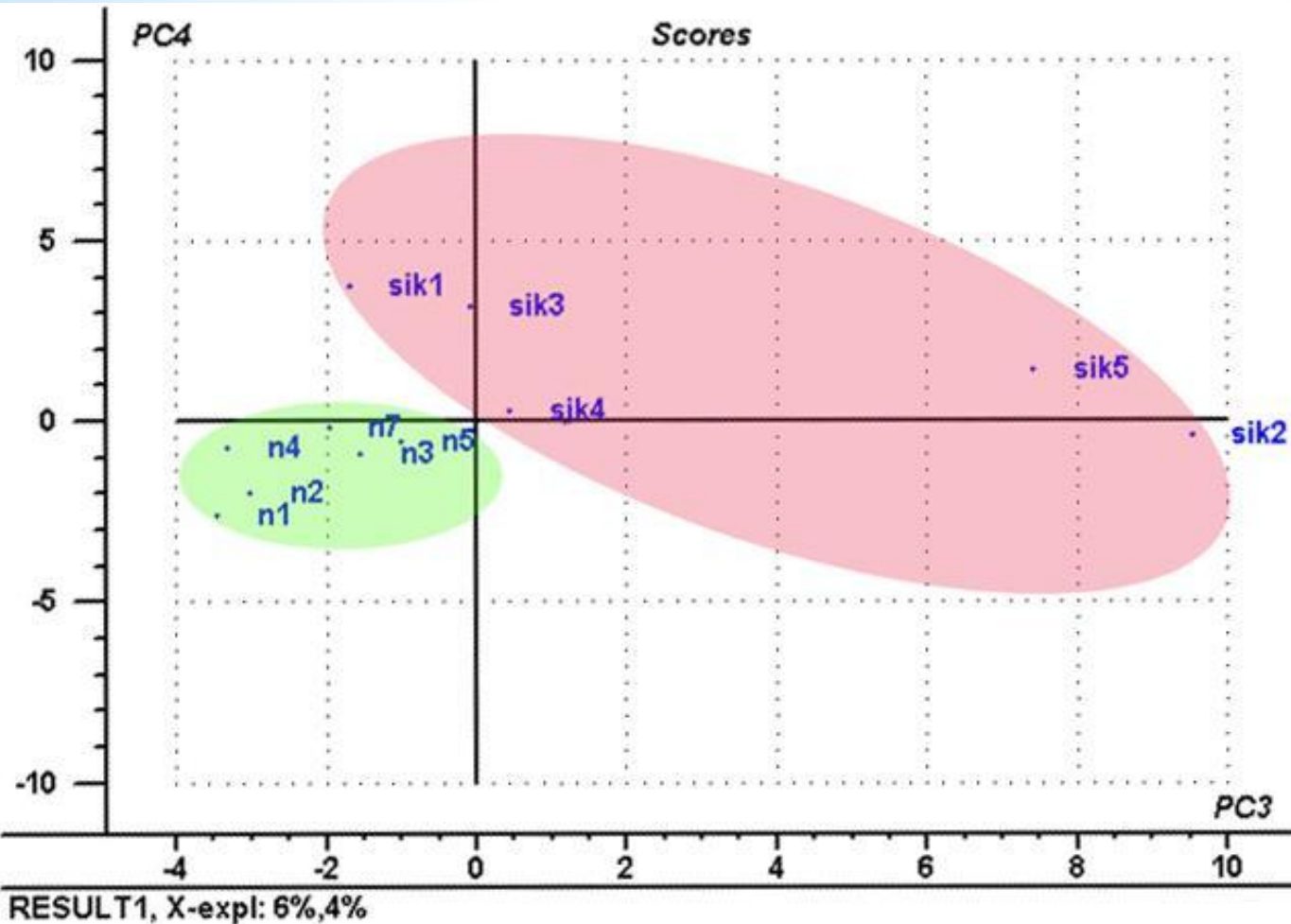


График счетов

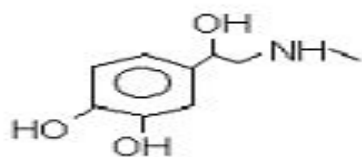
График счетов



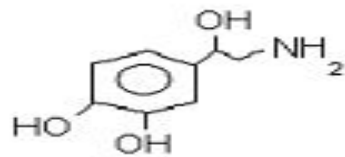
Виден четко сформированный кластер норм.

Имеется размытый кластер образцов с синдромом Иценко-Кушинга.

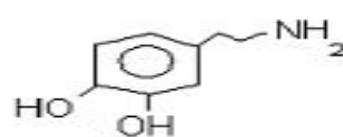
Альфа-аминокислоты, не поглощающиеся в УФ



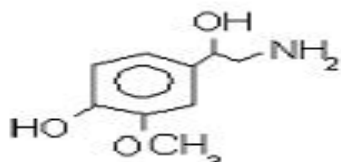
Адреналин (A)



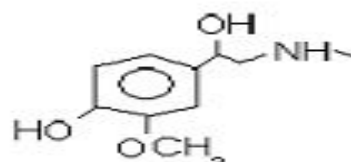
Норадреналин (NA)



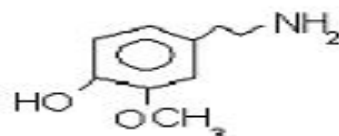
Дофамин (DA)



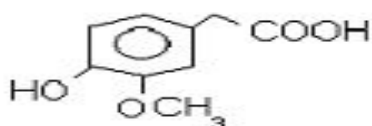
Норметанефрин (NM)



Метанефрин (M)



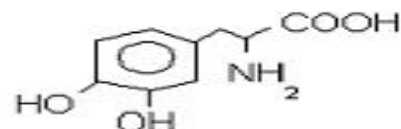
3-метокситирамин
(3MT)



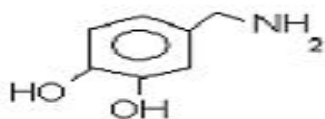
Гомованилиновая
кислота (HVA)



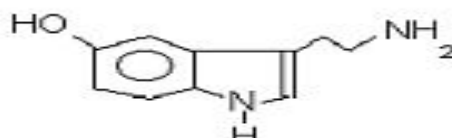
Тирозин (Tyr)



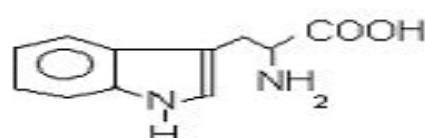
ДОФА (DOPA)
дигидроксифенилаланин



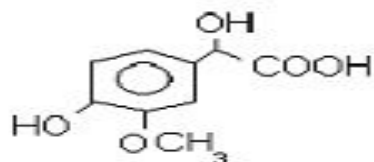
3,4-дигидрокси-
бензиламин



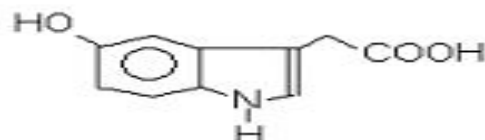
Серотонин (Ser)



Триптофан (Trp)

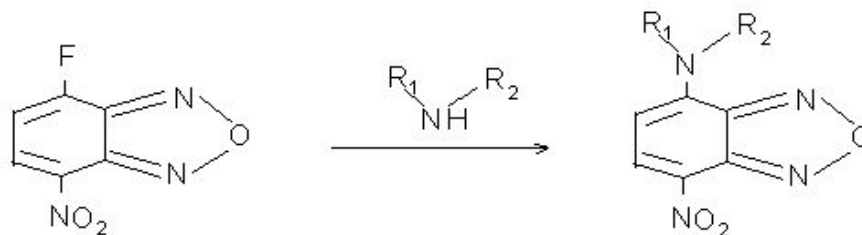


Ванилилминдальная
кислота (VMA)

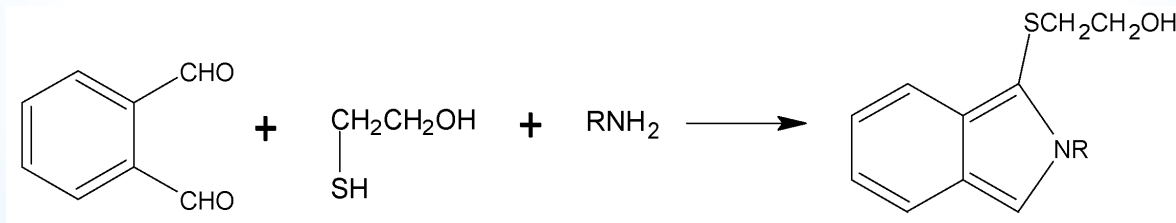


5-гидроксииндол
уксусная кислота

Введение хромофорных групп - derivatization

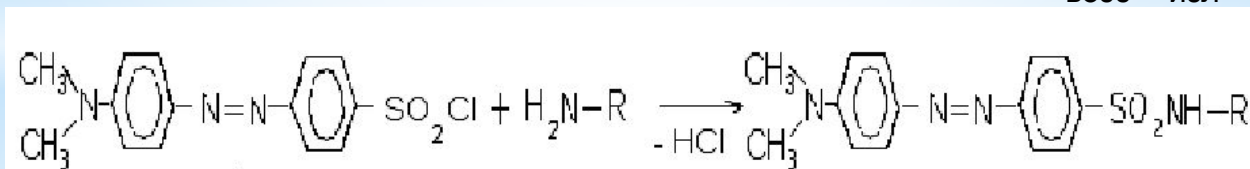


4-фтор-7-нитробензо-1,2,3-оксадиазол (I), предел обнаружения 5 – 20 пмоль



о-фталевый альдегид (ОФА)(II)

в присутствии тиольной компоненты 2-меркаптоэтанол; $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{изл}} = 337/454$ нм



диметиламиноазобензосульфониохлорид (дабсилхлорид) (III)

Выводы

1. Оптимизированы условия разделения стероидных гормонов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с использованием в составе подвижной фазы β-циклодекстрина.
2. Определены пределы обнаружения аналитов.
3. Разработана процедура пробоподготовки мочи к хроматографическому анализу.
4. Выявлена возможность получения характеристических стероидных профилей для диагностики эндокринных патологий.

Спасибо за внимание!



Параметры удерживания в ВЭТСХ

$$R_f = Z_m/Z_r,$$

где Z_m – расстояние, пройденное веществом от стартовой линии до центра пятна (мм);

Z_r – расстояние, пройденное элюентом от стартовой линии до фронта (мм).

Селективность

$$\alpha = (K_A/K_B) - 1,$$

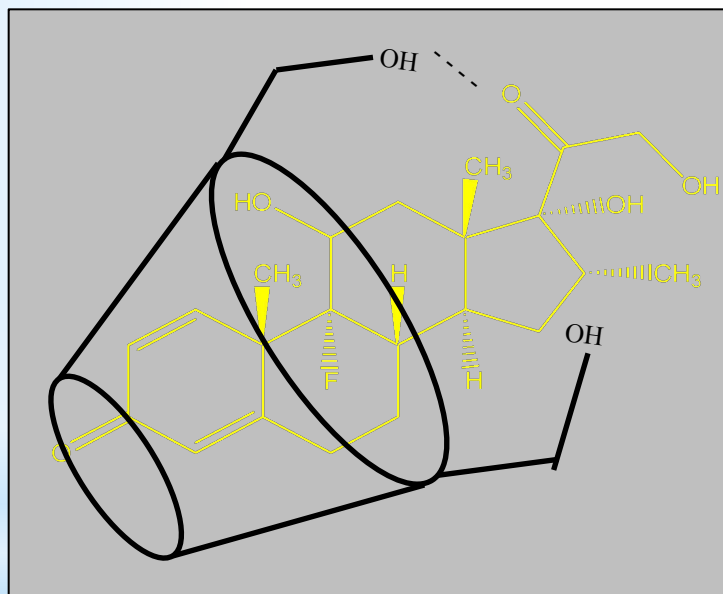
где K_A , K_B – константы распределения аналитов между подвижной и неподвижной фазами.

Эффективность

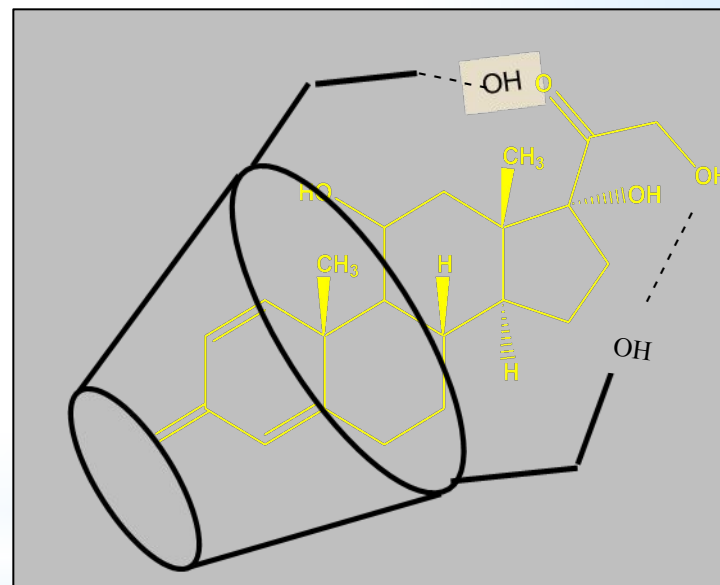
$$N = 16 - (z_f/w)^2,$$

где w – ширина пятна, z_f – путь, пройденный аналитом.

Дексаметазон



Преднизолон



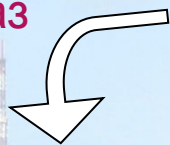
Критерий гидрофобности стероидных гормонов

$$H = nH - 4\sqrt{nf},$$

где nH – суммарное число атомов углерода и галогенов,
 nf – число функциональных групп в молекуле сорбата;

Хроматография

газ



Газовая

флюид



Сверхкритическая
флюидная

жидкость



Жидкостная

★ адсорбционная

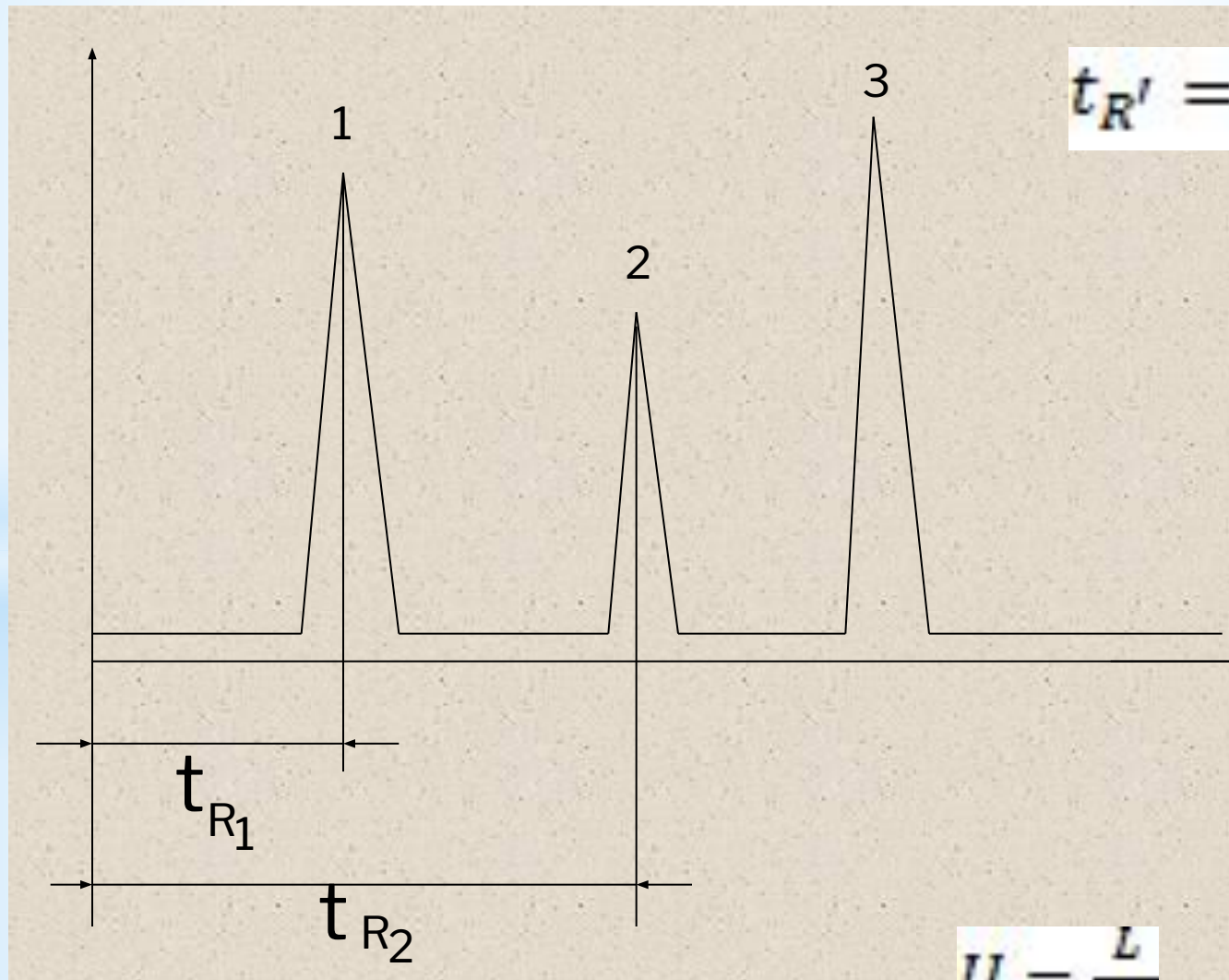
★ распределительная

★ гель-хроматография

★ ионообменная

★ аффинная

Хроматограмма

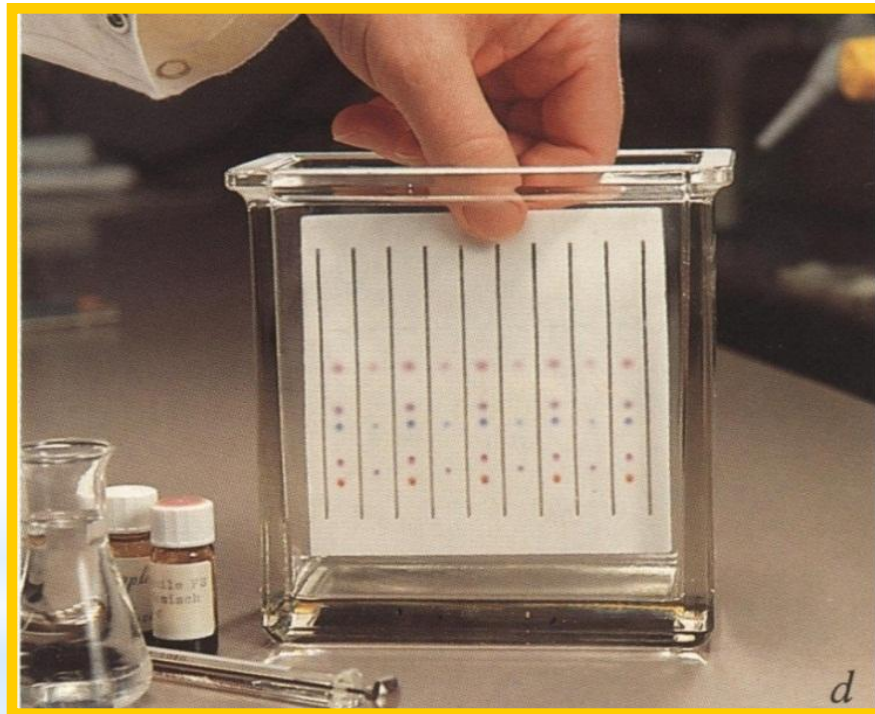


$$t_{R'} = t_R - t_M$$

$$V = \frac{L}{t_r}$$

$$U = \frac{L}{t_M}$$

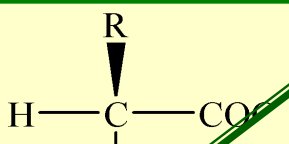
Анализ методом (ВЭТСХ)



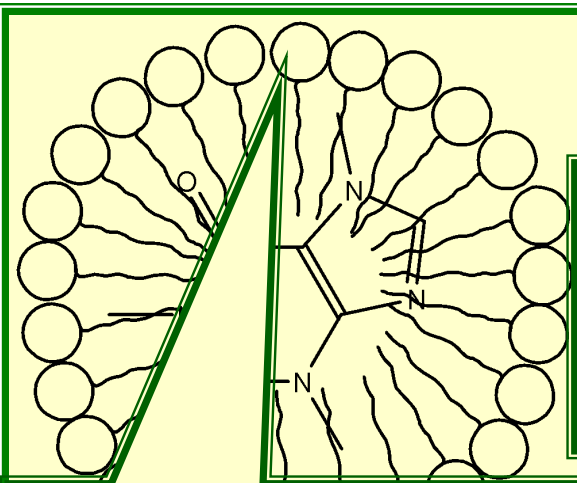
Общая схема анализа биологических образцов методом ВЭТСХ



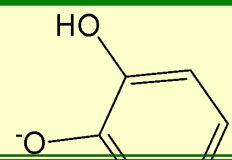
Аналит + комплексообразователь \rightleftharpoons комплекс



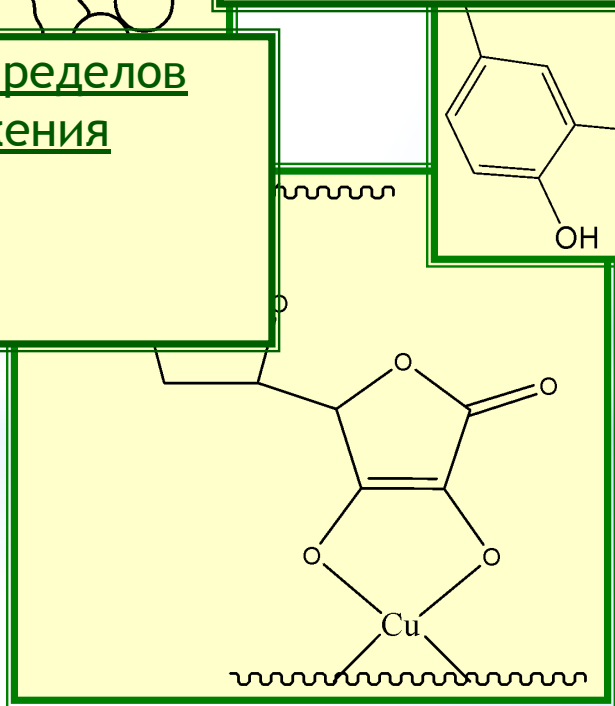
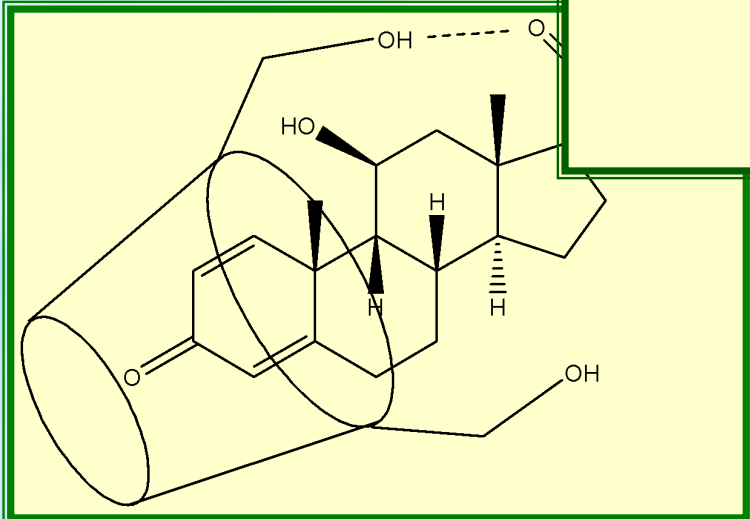
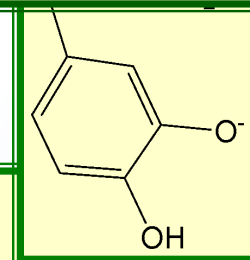
Изменение селективности разделения и эффективности



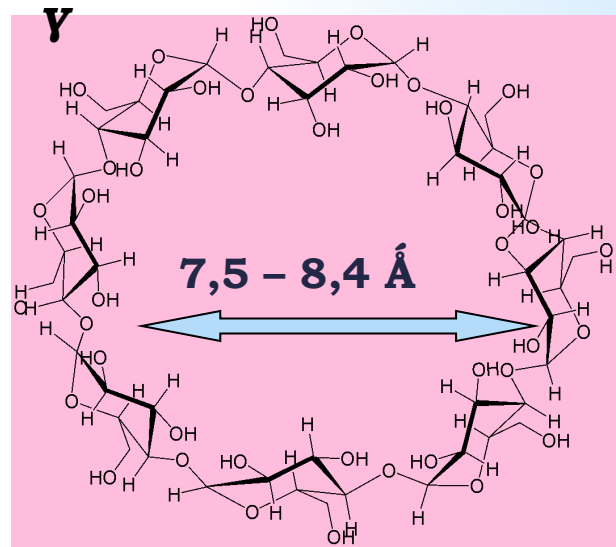
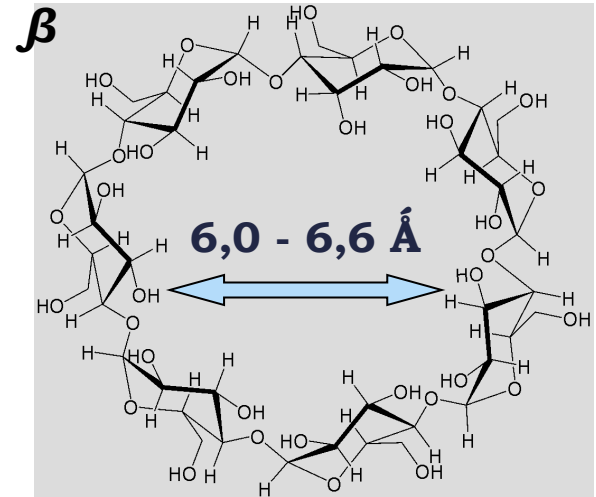
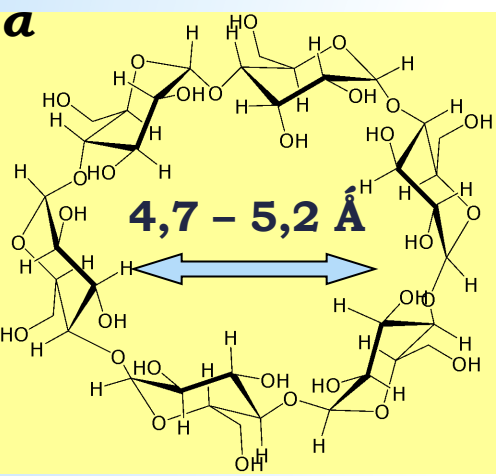
Снижение пределов обнаружения



Обнаружение аналитов, не поглощающих в УФ

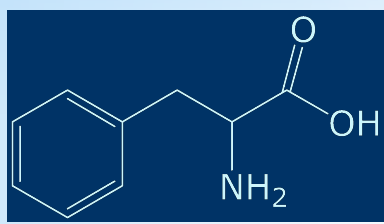


Влияние размера циклодекстрина на процесс комплексообразования

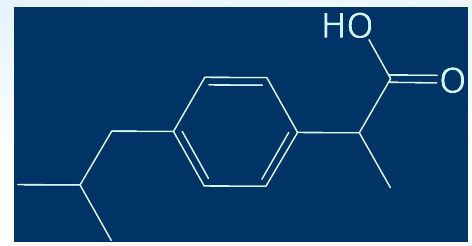


Аминокислоты
небольшого размера
(фенилаланин,
триптофан, тирозин)

а
н
ал
и
т
ы



Анестетики (мепивакаин,
прилокаин), нестероидные
противовоспалительные
препараты (флобуфен, ибупрофен)



Производные аминокислот,
варфарин, стероиды
(кортикостерон)

