САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АКАДЕМИЧЕСКАЯ ГИМНАЗИЯ

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

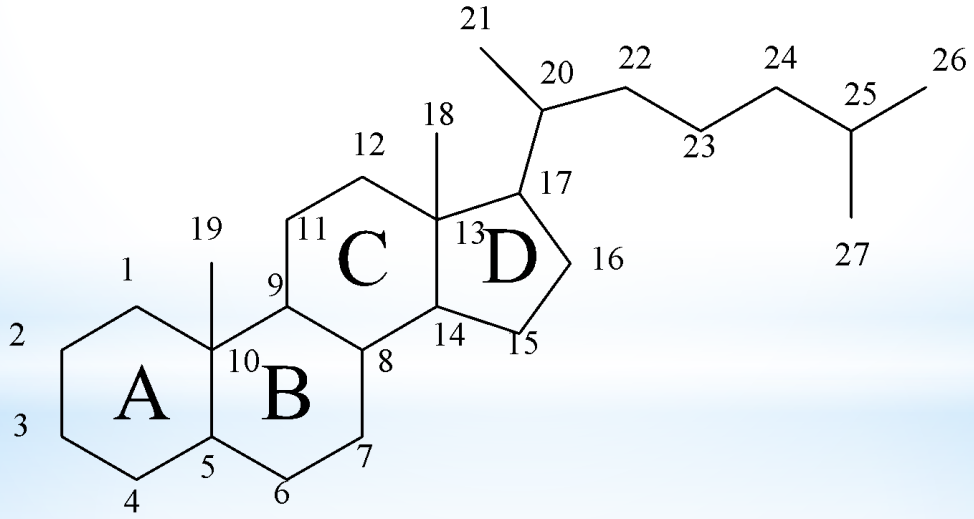
Кулькова Валерия
АГ СПбГУ, 11 кл.

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:

- нарушения в биосинтезе
- гиперпродуцирование гормонов
- недостаточное продуцирование гормонов

Болезнь Иценко-Кушинга (БИК)

Синдром Иценко-Кушинга (СИК)

Первичный гиперальдостеронизм (ПГА)

Традиционные методы диагностики

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

2) Дексаметазоновая проба

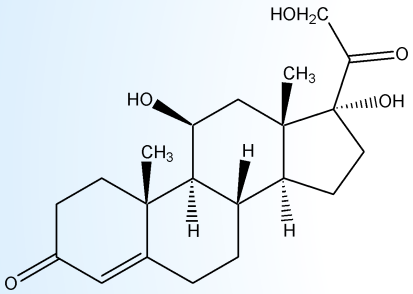
3) Данные ультразвукового исследования, КТ, МРТ

Диагностика – длительная, и часто дорогостоящая процедура

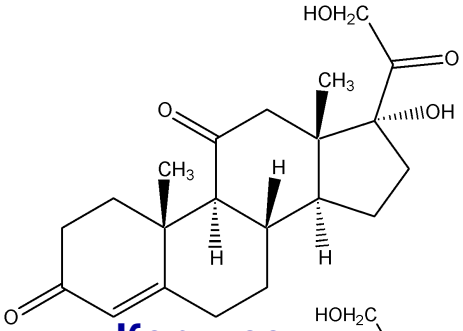
Разработка метода экспресс-диагностики

Структурные формулы кортикостероидов и стероидных лекарственных средств

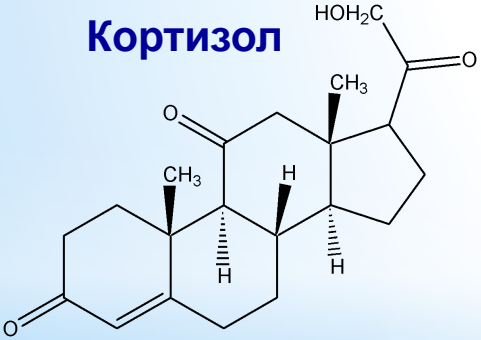
Эндогенные кортикостероиды



Кортизол



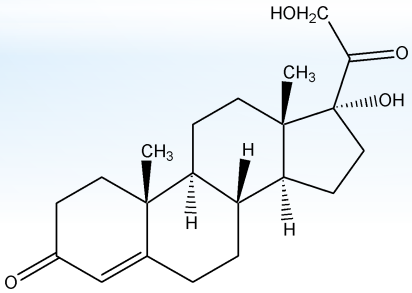
Кортизон



11-дегидро-кортикостерон

Кортикостерон

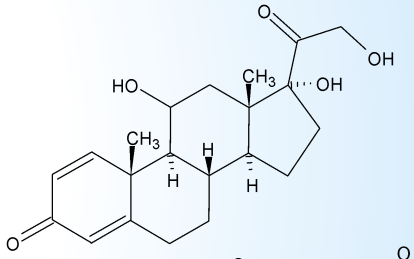
11-дезоксикортикостерон



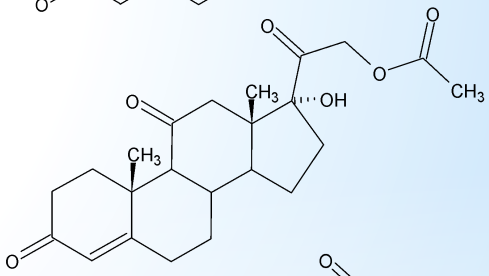
11-дезоксикортизол

Экзогенные стероидные лекарственные препараты

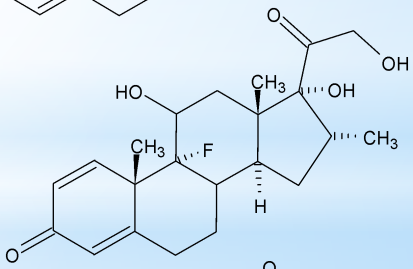
Преднизолон



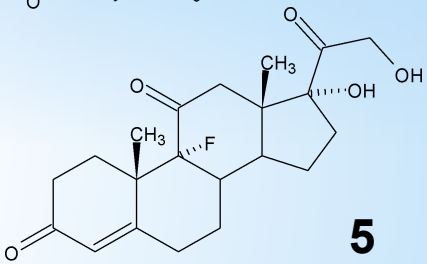
Кортизон ацетат



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

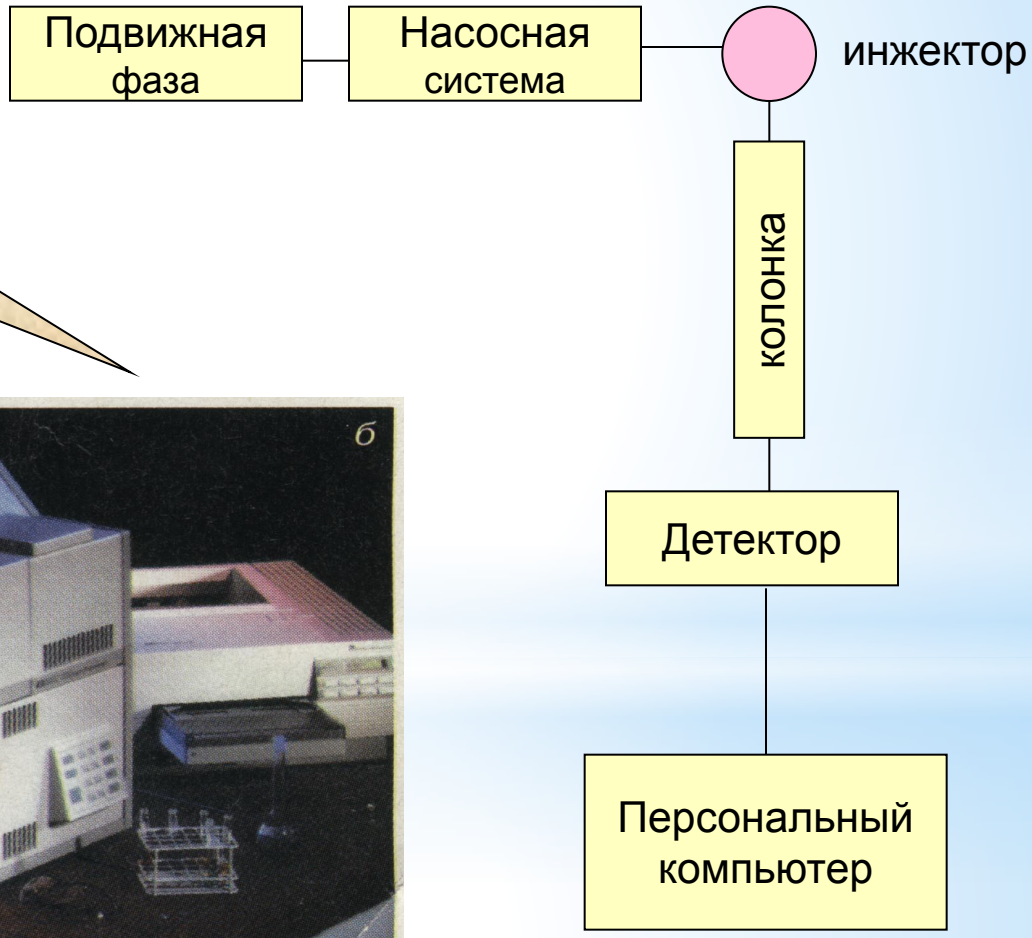
1. Оптимизация условий разделения стероидных гормонов с использованием методов ВЭТСХ и высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

2. Определить пределы обнаружения аналитов.

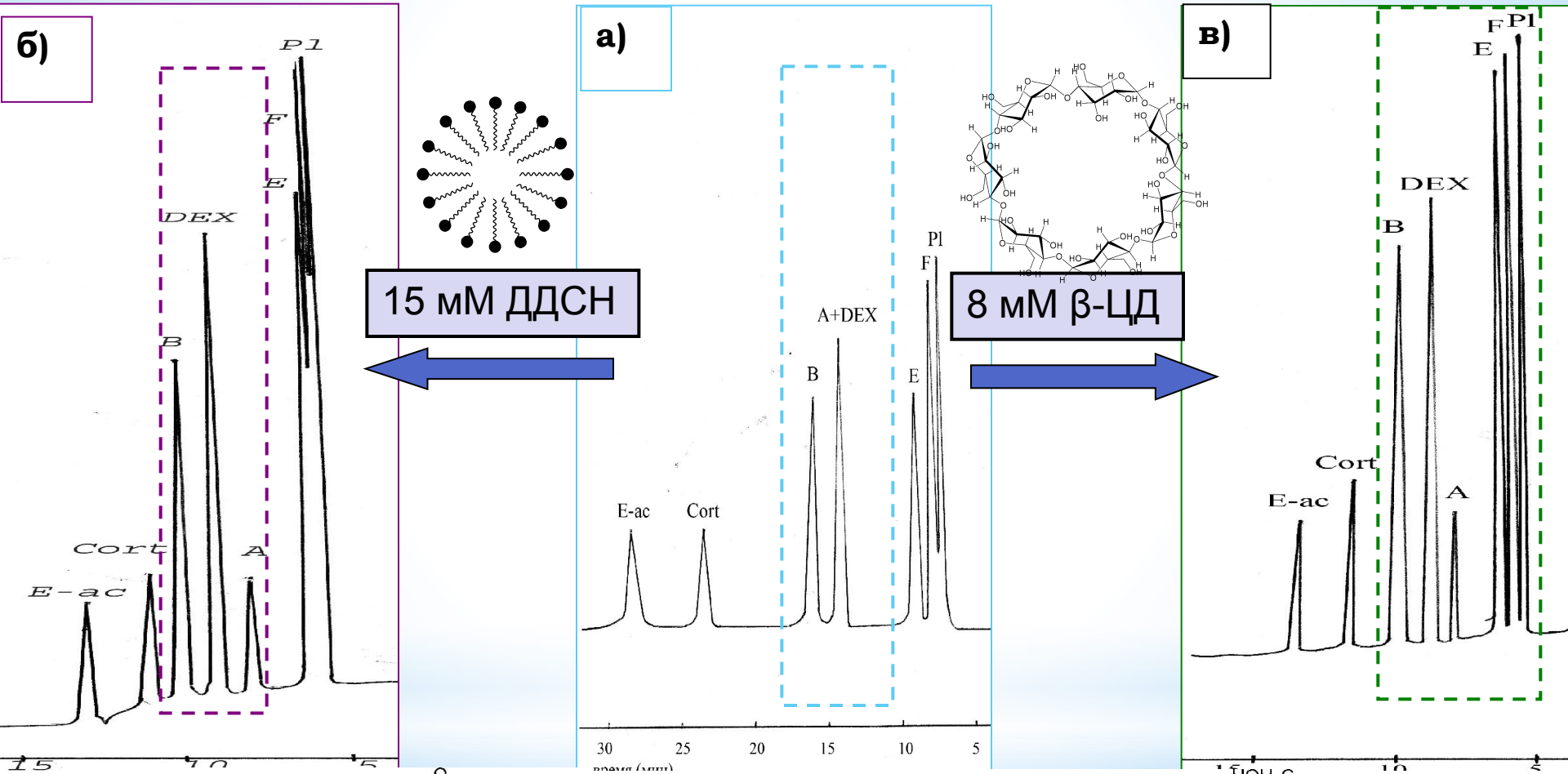
3. Разработка процедуры пробоподготовки.

4. Выявление возможности получения характеристических профилей.

Блок-схема жидкостного хроматографа

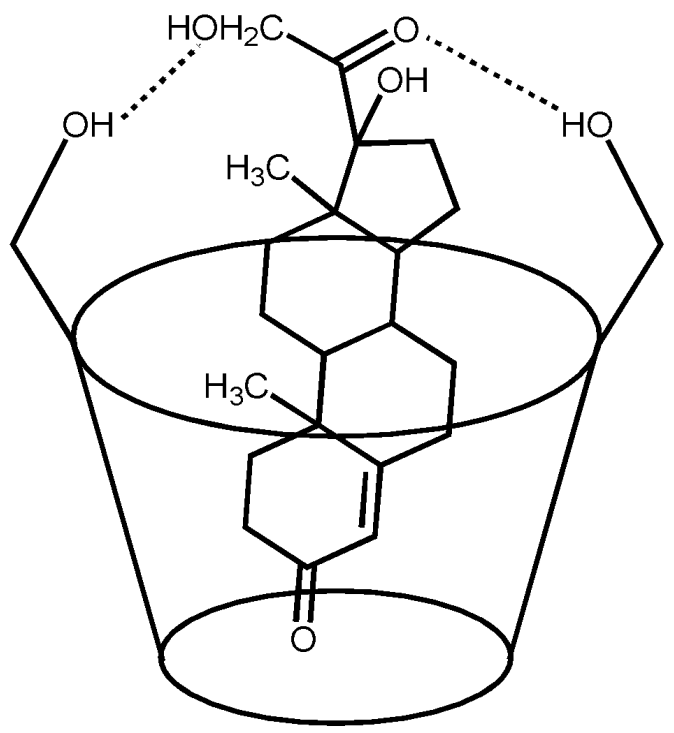


Высокоэффективная жидкостная хроматография стероидов



Предел обнаружения 3 – 5 мкг/л

Комплексообразование циклодекстринов (ЦД) со стероидными гормонами



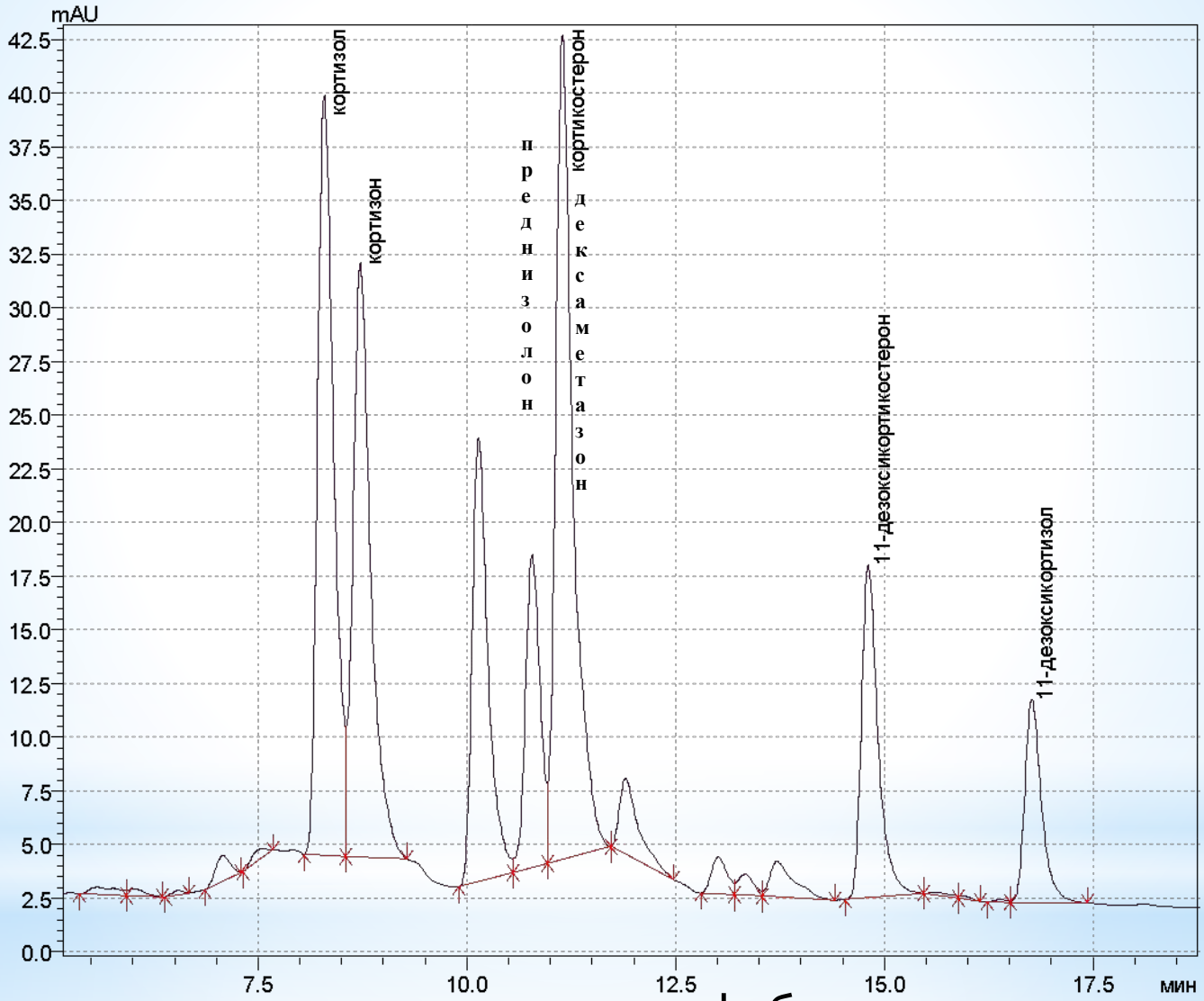
β-ЦД:

Растворимость: 1,85 г/100 мл (25º),

Объем полости: 0,346 нм³,

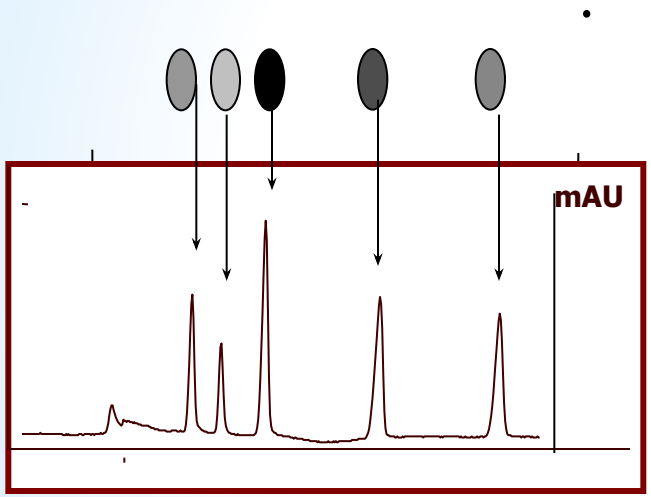
Внутренний диаметр полости: 0,60-0,65 нм,

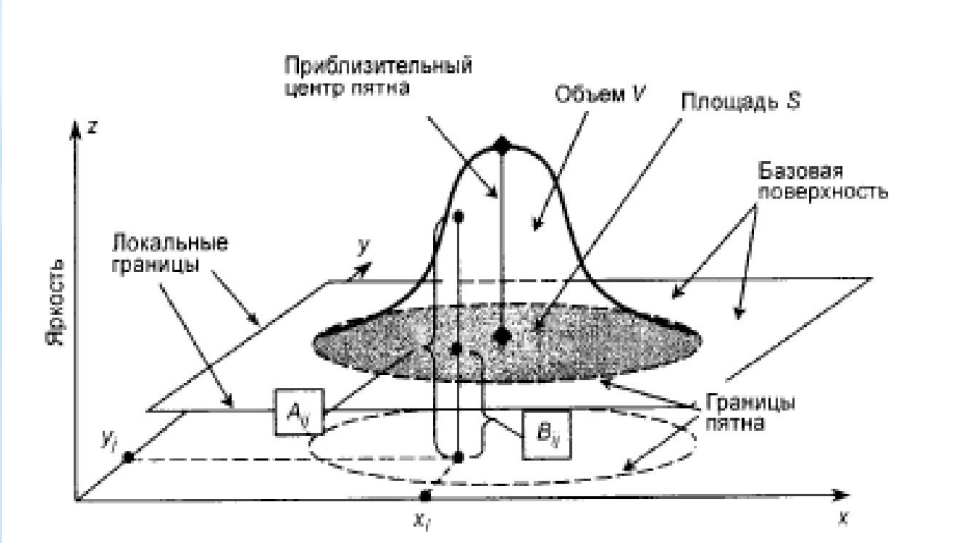
pKa: 12,20



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

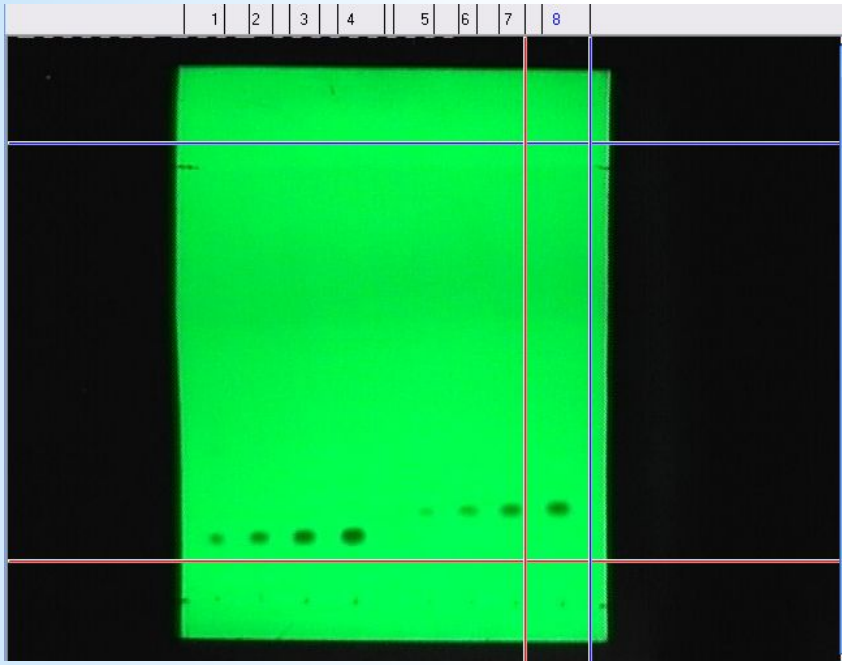


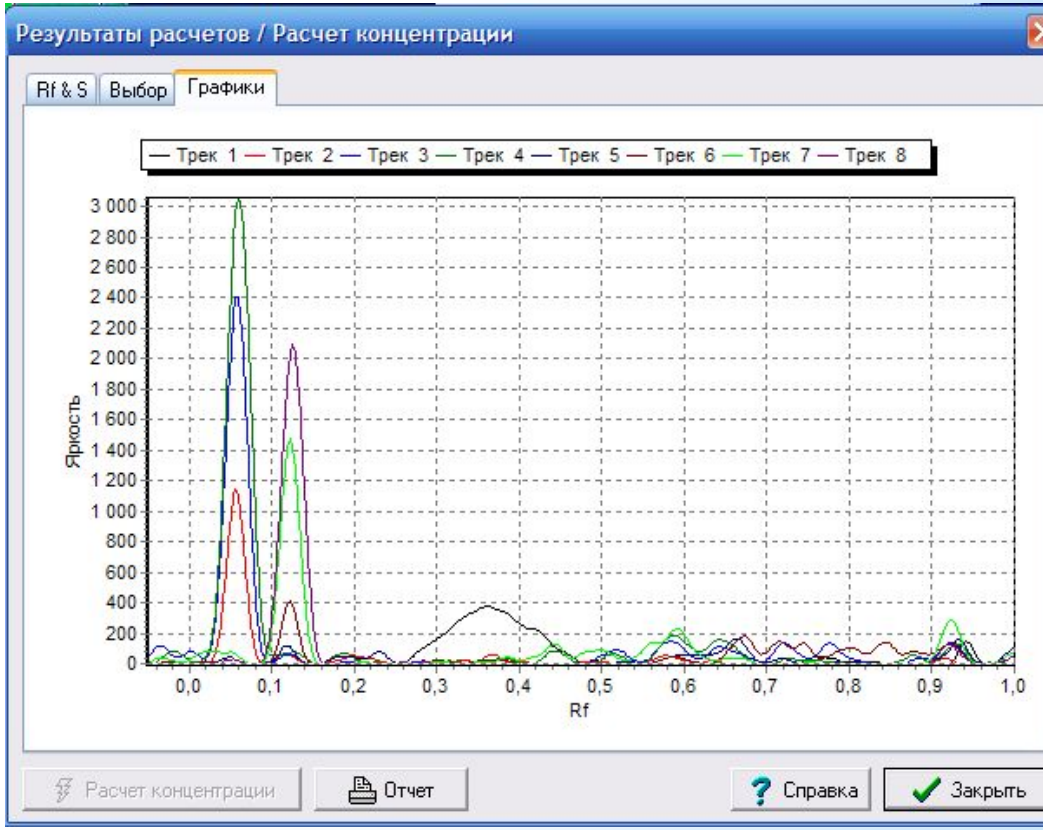


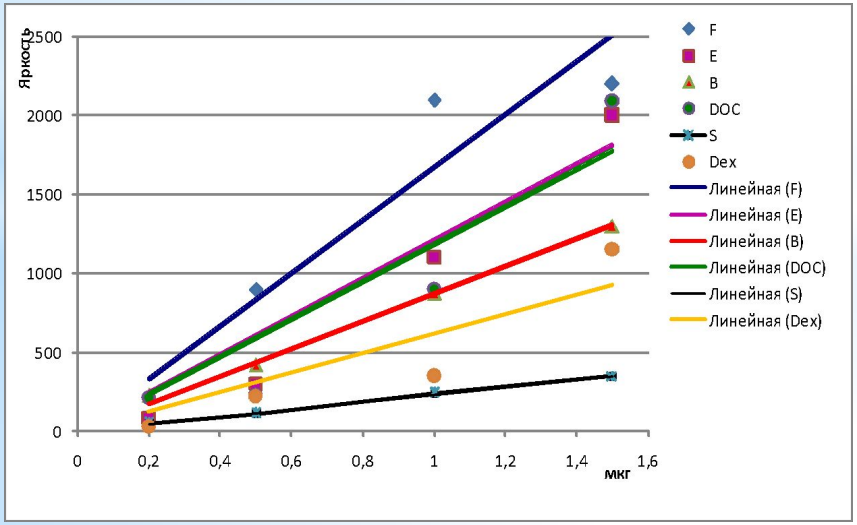
Достоинства

- экспрессность
- одновременное определение образцов
- количественный анализ

Количественная обработка данных (ТСХ)







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

Используемые материалы

C_{18}

Purosep 270 (сверхсшитый полистирол)

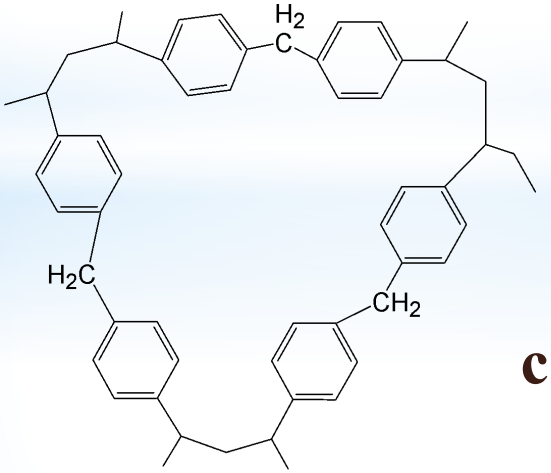
Силикагель

Гидрофобные соединения

Гидрофильные соединения

Sуд=1500 м²/г,

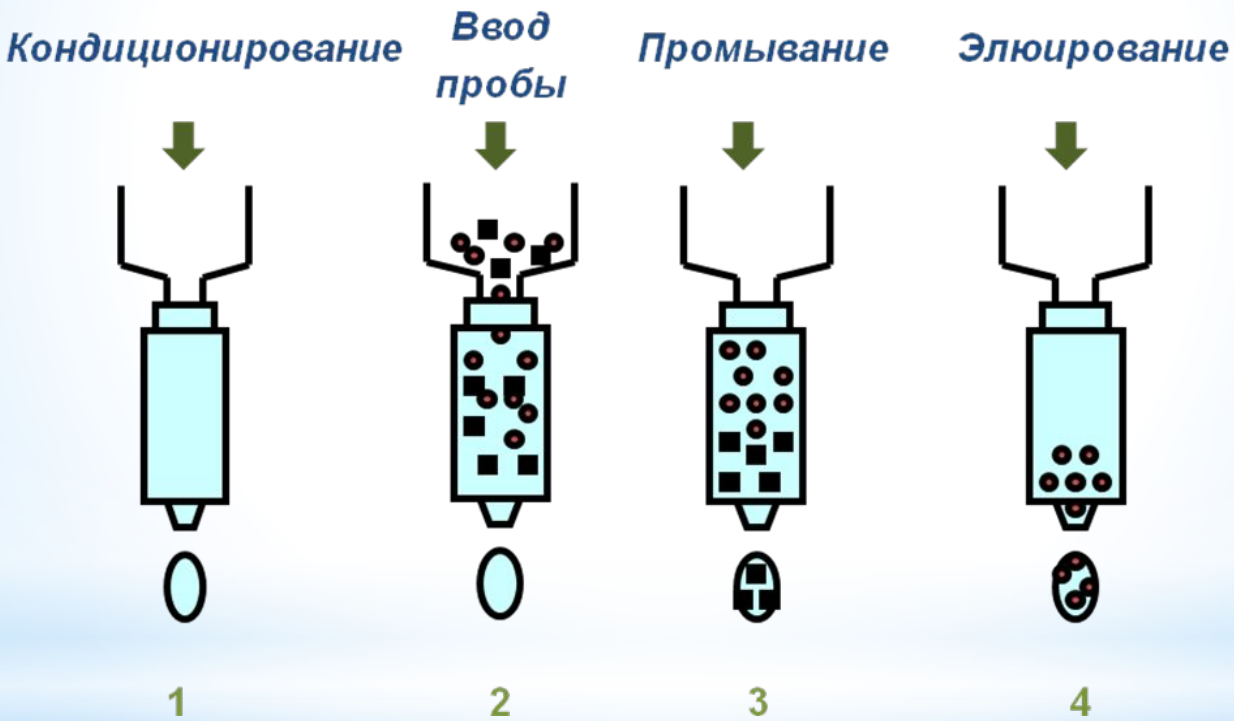
плотность=0,7 г/см³ dпор =200Å



Фрагмент структуры сверхсшитого полистирола

Твердофазная экстракция (ТФЭ)

Схема твердофазной экстракции Purosep 270



1	2	3	4
EtOH		0,1 н NaOH 20% CH_3CN 40%EtOH	CH_2Cl_2 MeOH/ 2:1

Стероидный гормон	Степень извлечения (%)		
	Сыворотка крови		Моча
	Хлороформ	Дихлорметан	Хлороформ
Преднизолон	*72,3±2,3*	*80,3±1,5*	*85,3±2,6*
Кортизон ацетат	*65,4±2,1*	*79,5±2,5*	*93,2±1,8*
Дексаметазон	*55,6±1,4*	*64±4*	*79,6±2,7*
Кортинефф	*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

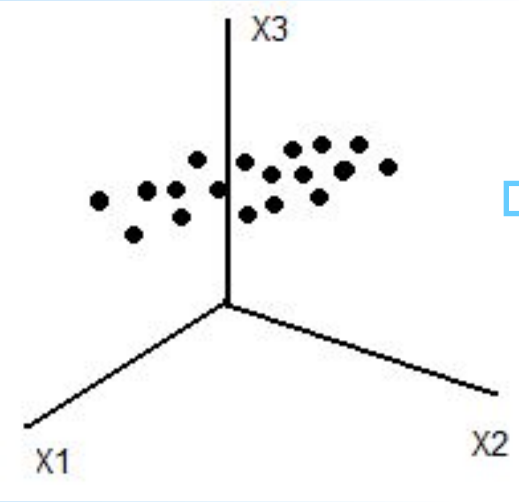
Степень извлечения = $(S_x - S)/ S_0 * 100\%$,

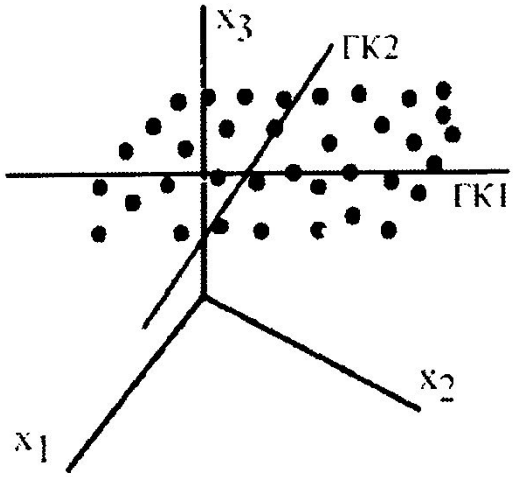
где S_x – площадь хроматографического пика аналита после экстракции объекта со стандартной добавкой;

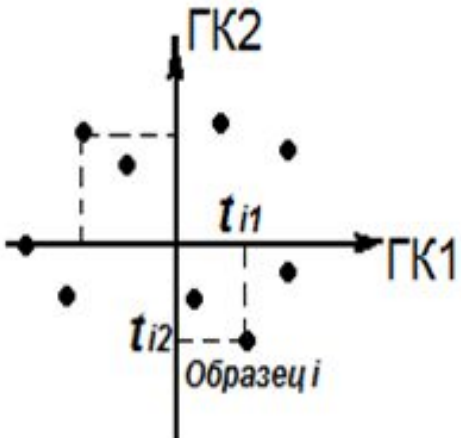
S_0 – площадь хроматографического пика аналита до экстракции водного раствора стандарта;

S - площадь хроматографического пика аналита после экстракции биологического объекта;

Метод главных компонент (МГК)







ti1ti2 – *счет образца*

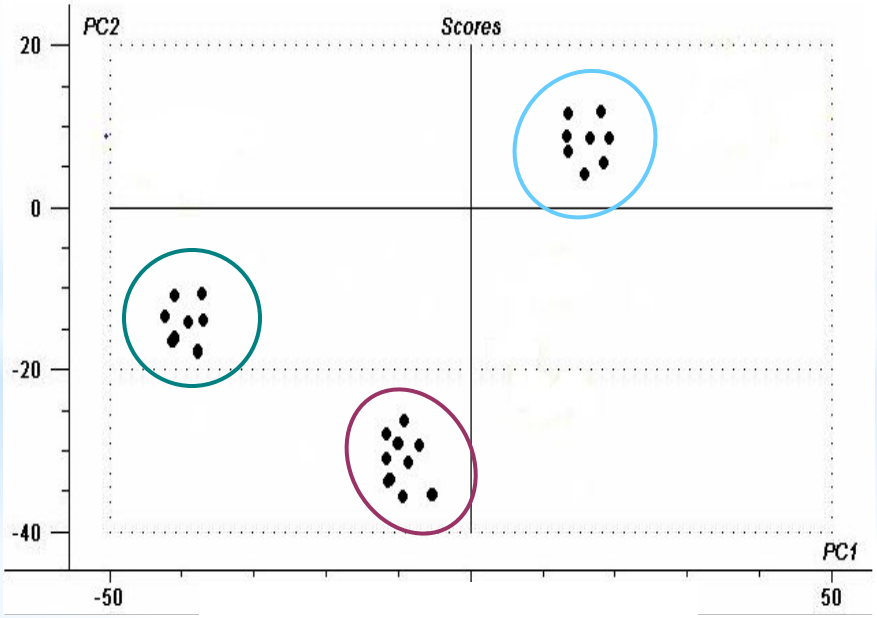
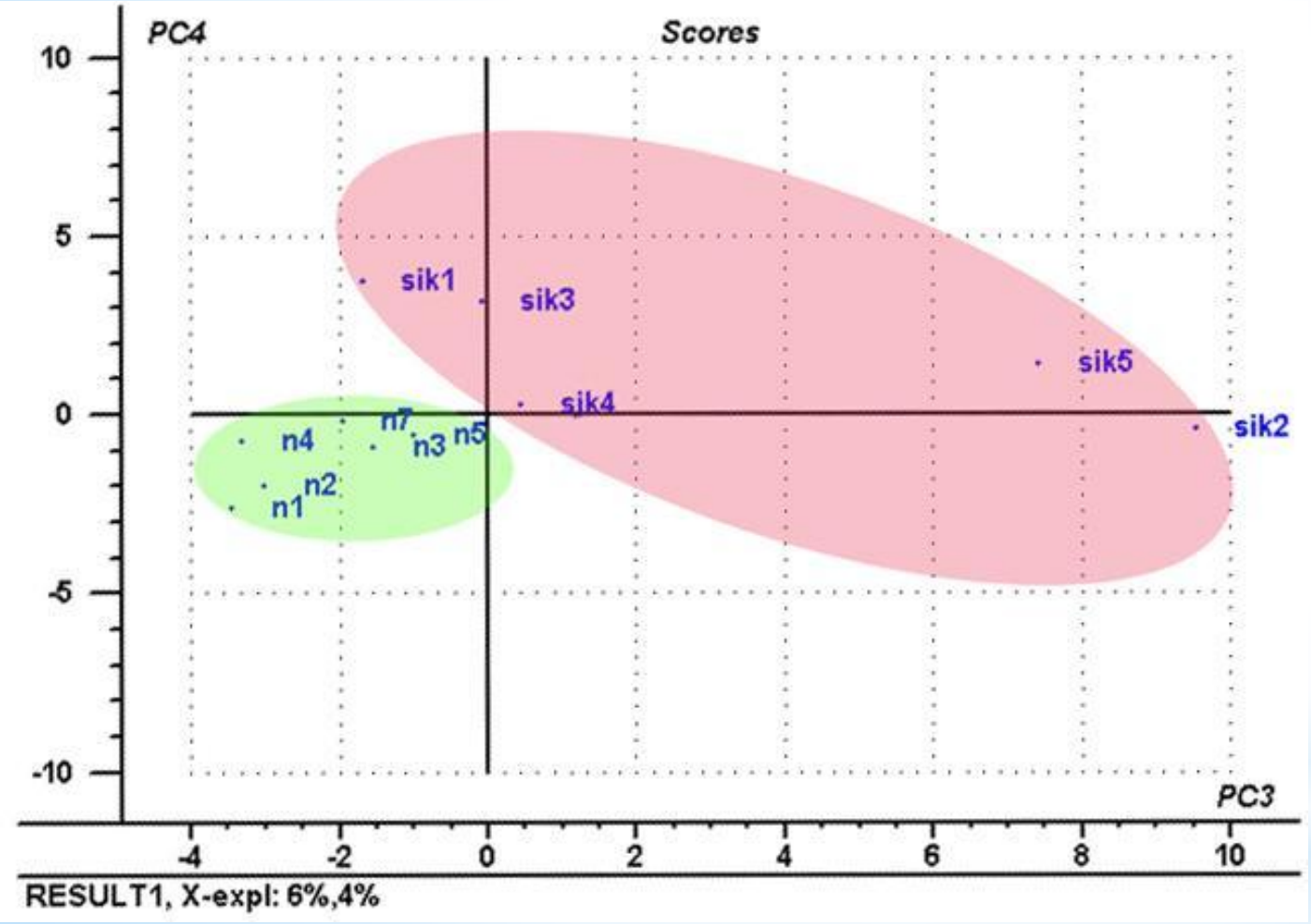


График счетов

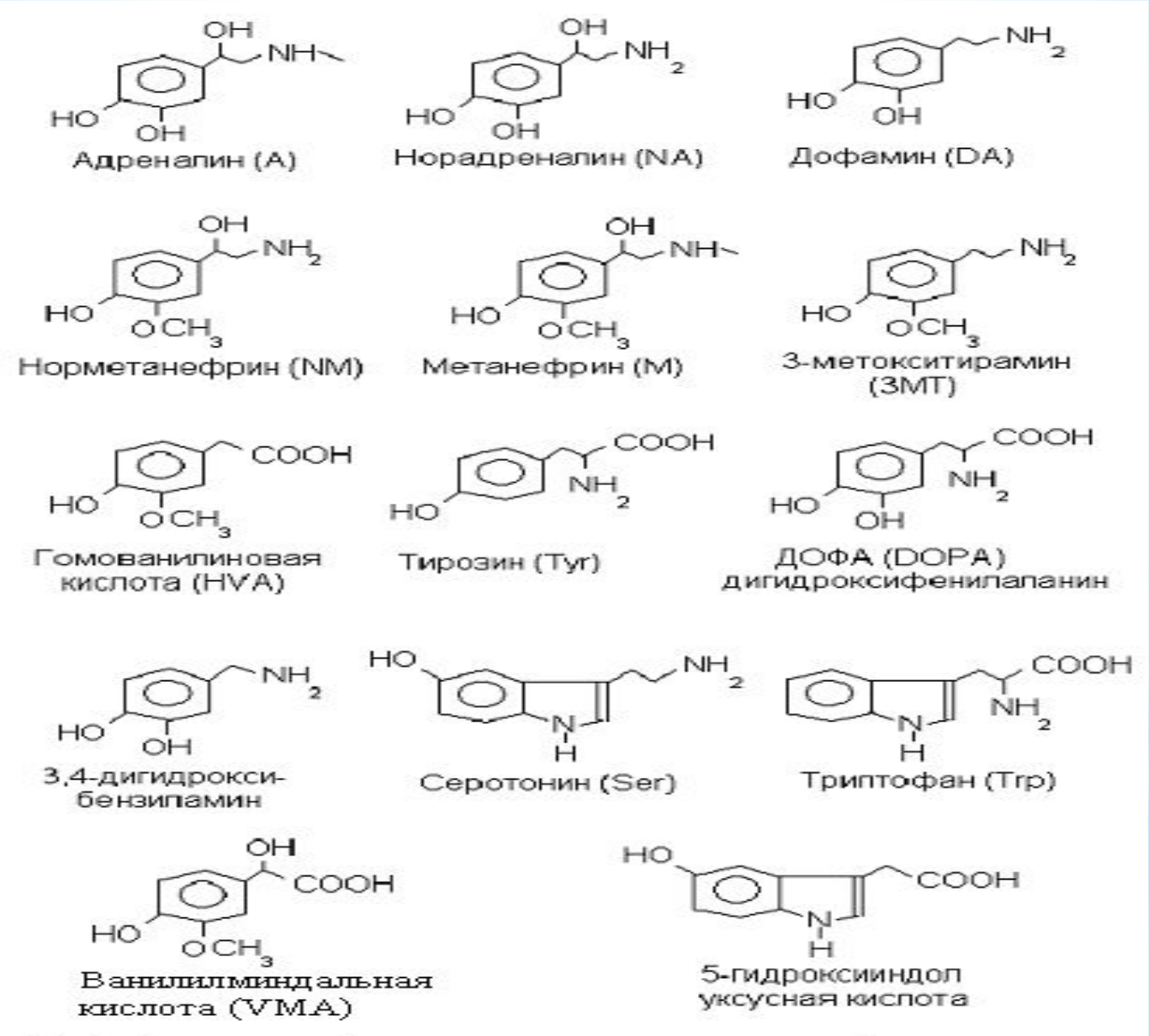
График счетов



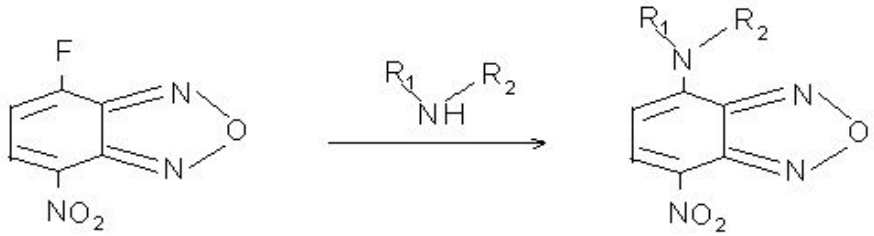
Виден четко сформированный кластер норм.

Имеется размытый кластер образцов с синдромом Иценко-Кушинга.

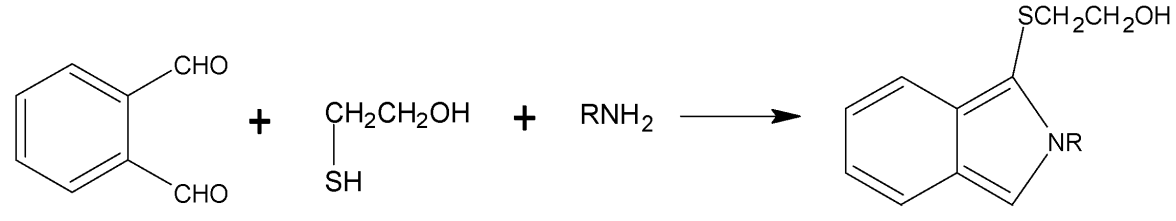
Альфа-аминокислоты, не поглощающиеся в УФ



Введение хромофорных групп - дериватизация

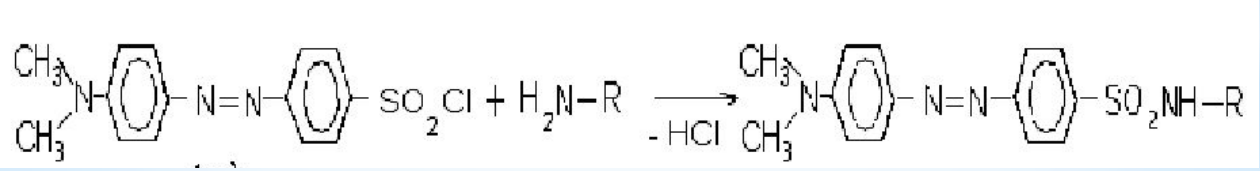


4-фтор-7-нитробензо-1,2,3-оксадиазол (I), предел обнаружения 5 – 20 пмоль



о–фталевый альдегид (ОФА)(II)

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



диметиламиноазобензосульфонилхлорид (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

$$R_f = Zm/Zr,$$

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

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

Селективность

$$\alpha=(K_A/K_в)-1,$$

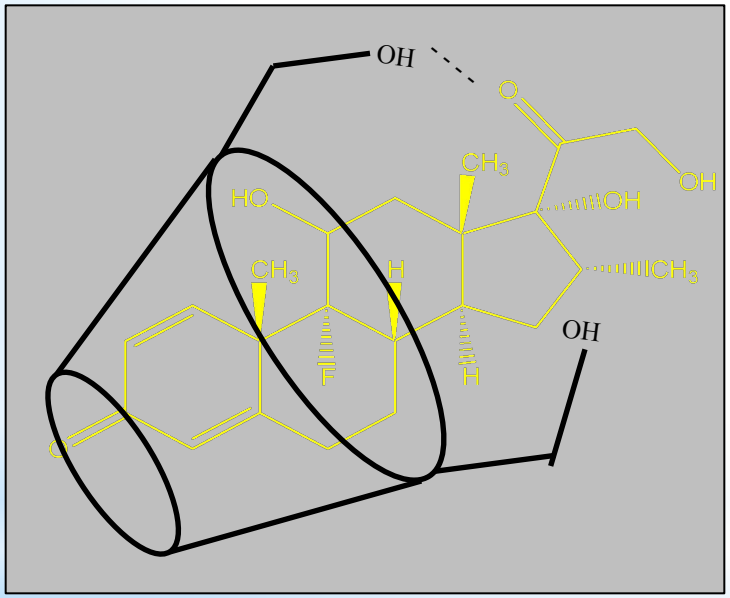
где $К_А$, $К_в$ – константы распределения аналитов между подвижной и неподвижной фазами.

Эффективность

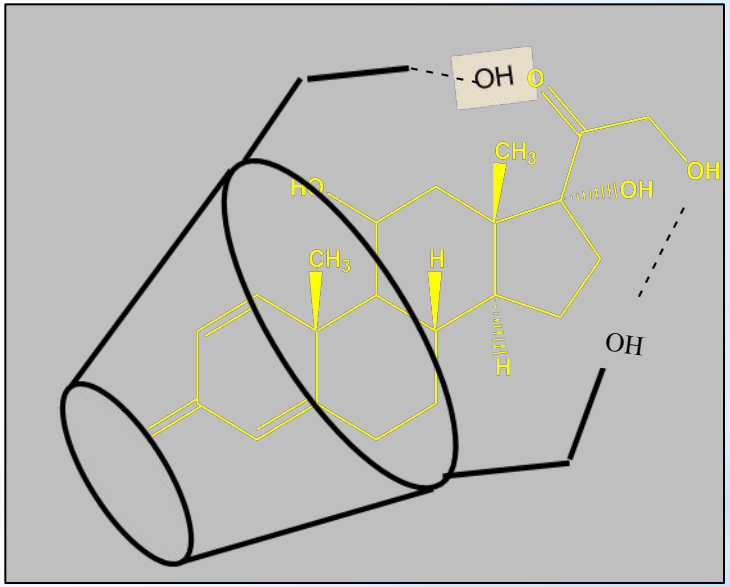
$$N = 16\text{-}(z_i/w)^2,$$

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

жидкость

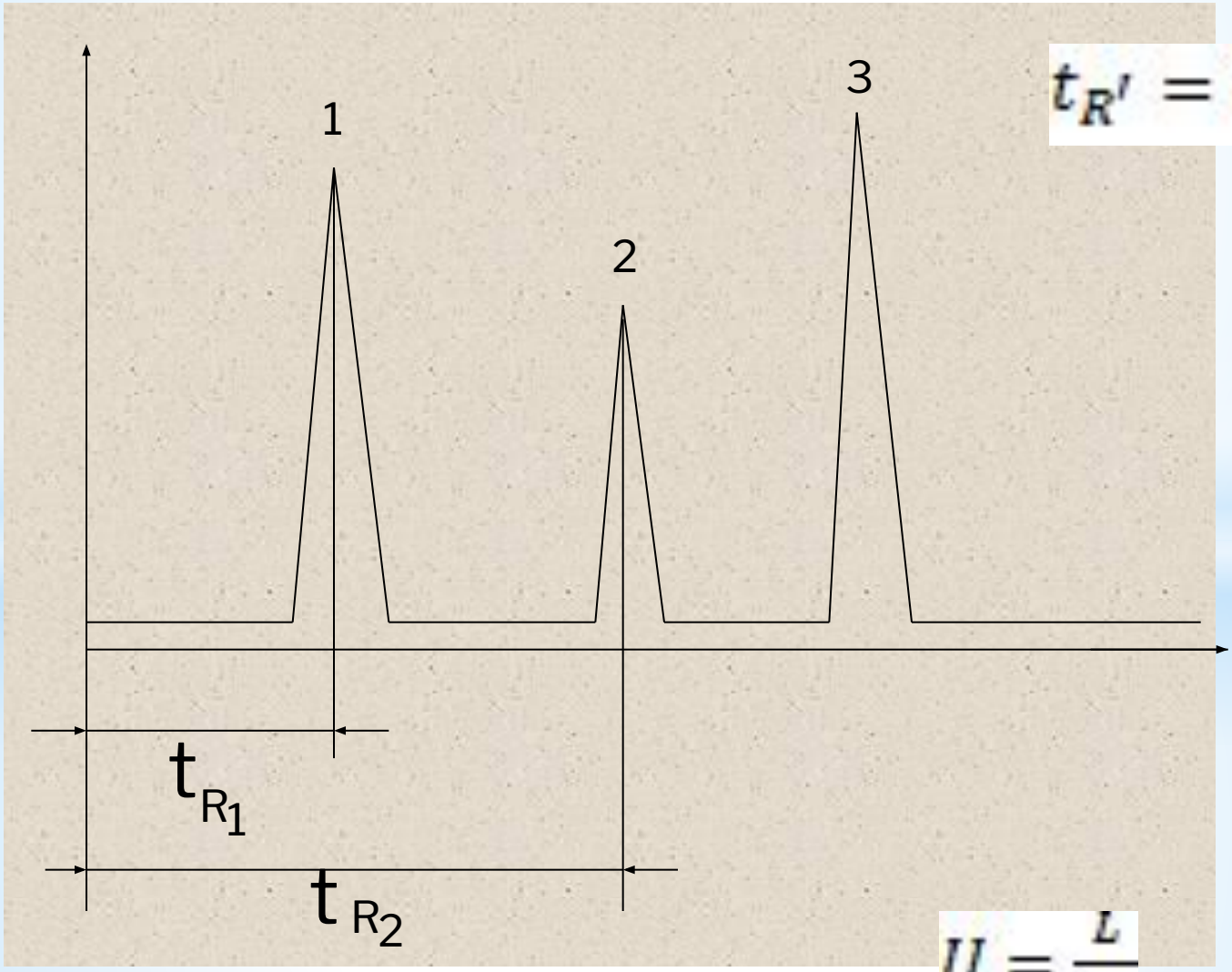
Жидкостная

флюид

Сверхкритическая флюидная

- адсорбционная
- распределительная
- гель-хроматография
- ионообменная
- аффинная

Хроматограмма

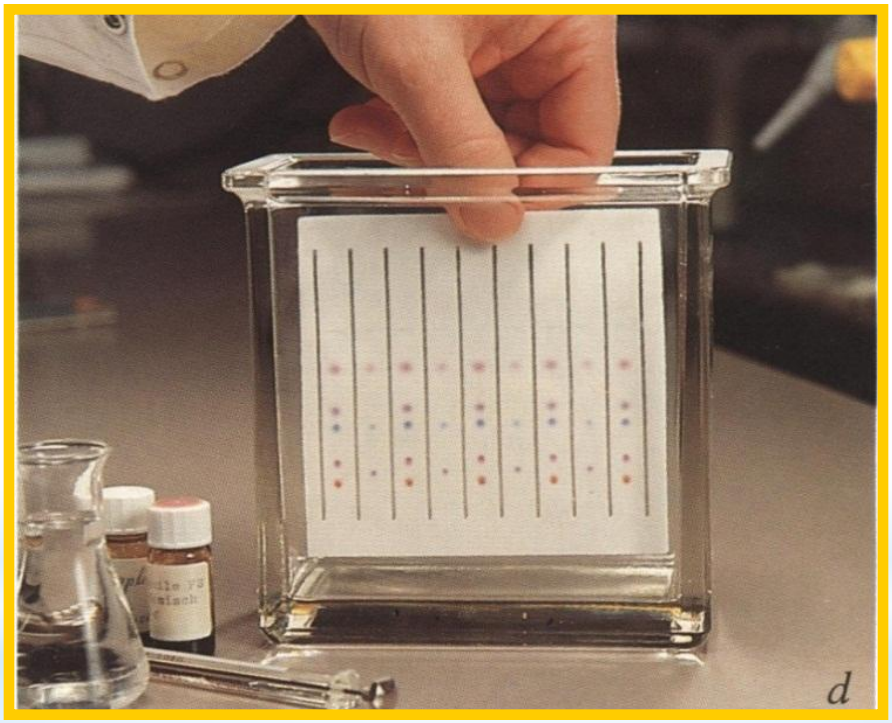


$$t_{R'} = t_R - t_M$$

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

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

Анализ методом (ВЭТСХ)



Общая схема анализа биологических образцов методом ВЭТСХ

Концентрирование и очистка пробы

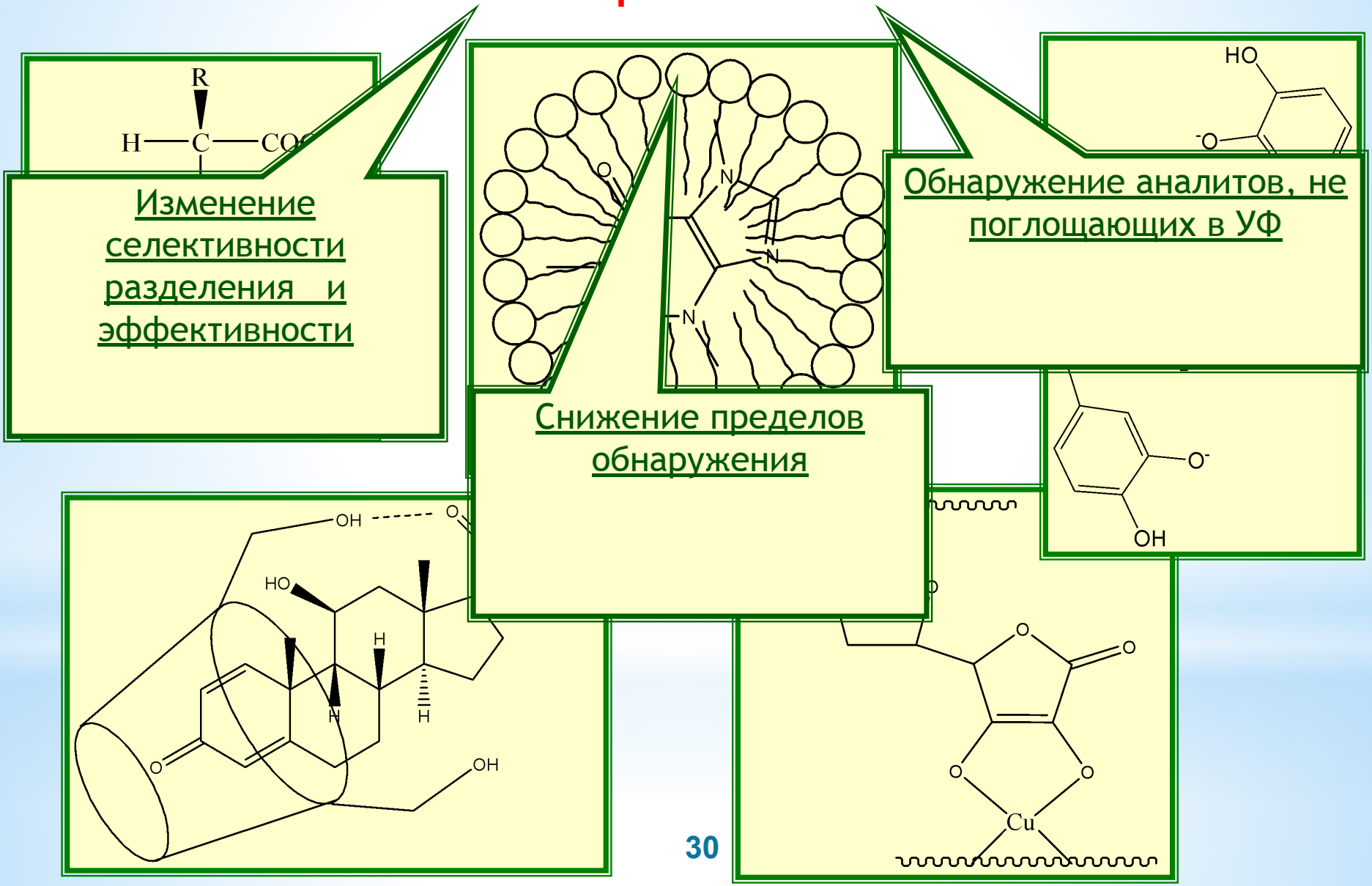
↓

Анализ методом ВЭТСХ

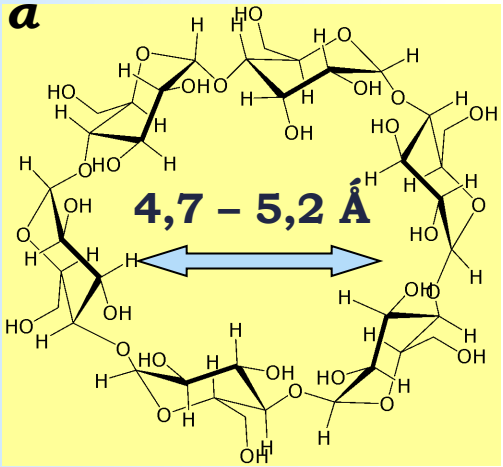
↓

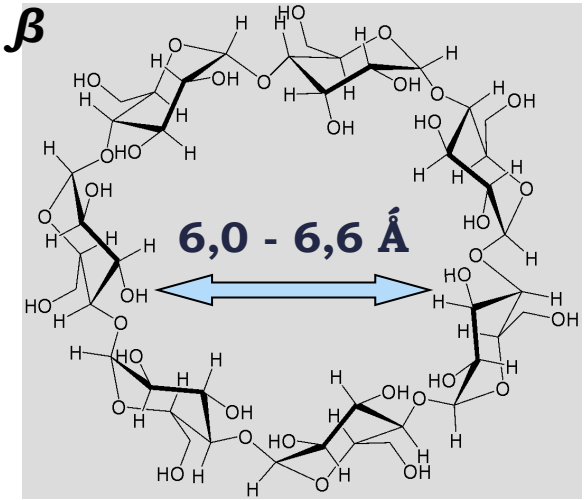
Количественная обработка полученных данных методом видеоденситометрии

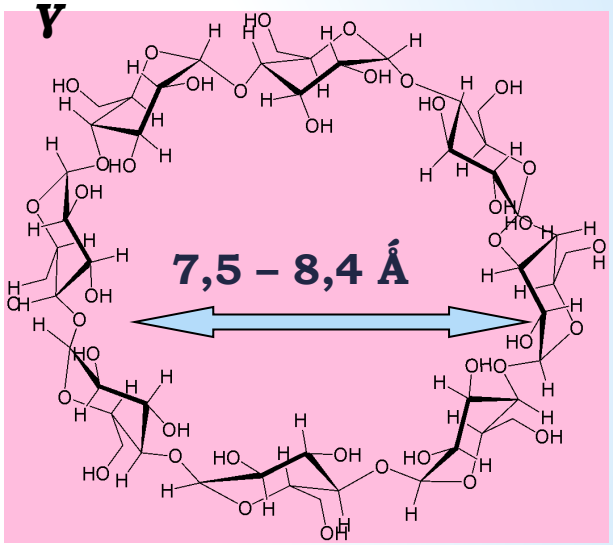
Аналит + комплексообразователь ⇄ комплекс



Влияние размера циклодекстрина на процесс комплексообразования

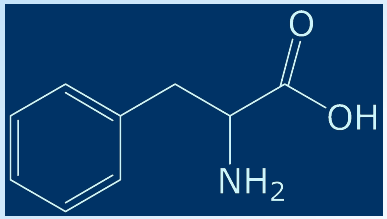
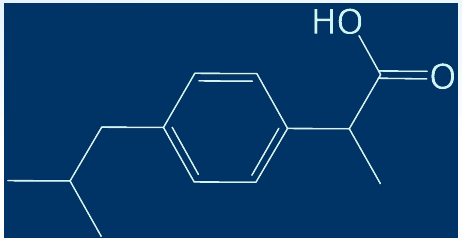
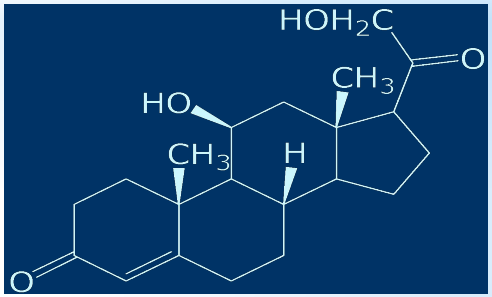






Аминокислоты небольшого размера (фенилаланин, триптофан, тирозин)

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

Производные аминокислот, варфарин, стероиды (кортикостерон)

аналиты