

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.45-007.61-053.1-07:616.154:577.175.53]-074:543:544

Дутов А.А., Никитин Д.А., Лукьянова Ю.Л., Шемякина Н.А.

ВЭЖХ-МЕТОД ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ВРОЖДЕННЫХ ГИПЕРПЛАЗИЙ НАДПОЧЕЧНИКОВ 1-ГО И 2-ГО ТИПОВ

Лаборатория экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия" Минздрава России, 672090, Чита

Предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющий одновременно определять кортизол, кортизон и вторичные стероиды в сыворотке для последующего анализа традиционной обращенно-фазной ВЭЖХ с УФ-детекцией при 240 нм. Жидко-жидкостная экстракция (LLE) из щелочной среды в диэтиловый эфир. Разделение на колонке размером 150 × 4,6 мм ODS – 3,5 мкм в изократическом режиме. Элюент ацетонитрил – 0,02 М фосфатный буфер pH 8,0 – изопропанол (40:60:1). С помощью предложенного метода удалось разделить кортизол, кортизон, дексаметазон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол, тестостерон, дезоксикортикостерон, 17α-метилтестостерон, андростендион и 17α-гидроксипрогестерон за 20 мин. Простота, воспроизводимость и достаточные селективность и чувствительность метода позволяют его использовать в клинической практике для одновременной диагностики врожденных гиперплазий надпочечников 1-го и 2-го типов.

Ключевые слова: ВЭЖХ; кортизол; кортизон; вторичные стероиды; врожденная гиперплазия надпочечников.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (1): 25–39.

Dutov A.A., Nikitin D.A., Lukyanova Yu.L., Shemiakina N.A.

THE TECHNIQUE OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR SIMULTANEOUS DIAGNOSTIC OF INHERENT HYPERPLASIA OF ADRENAL GLANDS TYPE I AND II

The laboratory of experimental and clinical biochemistry and immunology of the research institute of molecular medicine of the Chitinskaja state medical academy of Minzdrav of Russia, 672090 Chita, Russia

The article considers the technique of high-performance liquid chromatography making it possible simultaneously detect cortisol, cortisone and secondary steroids in serum for consequent analysis of common reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet under 240 nm. The liquid-liquid extraction from alkaline medium in diethyl ether. The separation using column of 150x4.6 size ODS 3.5 mkm in isocratic mode. The eluent acetonitrile - 0.02 M phosphate buffer pH 8.0 - isopropanol (40:60:1). The application of proposed technique managed to separate cortisol, cortisone, dexamethasone, corticosterone, 11-desoxycortisol, testosterone, desoxicorticosterone, 17α-gidroxiprogesterone and androstendion in 20 minutes. The simplicity, reproducibility and sufficient selectivity and sensitivity of technique permit implement it in clinical practice for simultaneous diagnostic of inherent hyperplasia of adrenal glands type I and II.

Key words: high-performance liquid chromatography; cortisol; cortisone; secondary steroids; inherent hyperplasia of adrenal glands

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2016; 61 (1): 25–39. (in Russ.)*

Введение. Врожденная гиперплазия надпочечников обусловлена недостаточностью ферментов, участвующих в метаболизме кортикостероидов. «Классической» считается недостаточность 21-гидроксилазы [4], известной как гиперплазия 1-го типа. Недостаточность 11-гидроксилазы или гиперплазия 2-го типа встречается несколько реже. Приблизительная частота, с которой можно обнаружить врожденные гиперплазии – около 1 на 10 тыс. новорожденных и обнаружение их на Западе во многом определяется качеством национальных скрининговых программ [4]. Произвести точную диагностику ферментопатий при врожденной гиперплазии надпочечников можно только с помощью хроматографических методов. В частности, анализ вторичных стероидов – 11-дезоксикортизола, дезоксикортикостерона и 17α-гидроксипрогестерона, которые в норме находятся в крови в следовых количествах [4]. Хроматографические методы анализа кортикостероидов достаточно основательно разработаны [3–7]. В последние годы предпочтение отдают высокочувствительной и дорогостоящей ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией [4, 5]. В качестве альтернативы,

мы предлагаем простой, недорогой и воспроизводимый ВЭЖХ-анализ первичных и вторичных стероидов в сыворотке крови для рутинной лабораторной практики.

Материалы и методы. Стандарты и реактивы. 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 года). Рабочие растворы готовили в день исследования разведением базовых метанолом до концентраций 10 и 1 нг/мкл. В качестве внутреннего стандарта для кортизола, кортизона, кортикостерона и 11-дезоксикортизола (IS-1) использовали дексаметазон (ОЗ "ГНЦЛС", Украина): таблетку растворяли в 50% водном метаноле (100 нг/мкл) и фильтровали через капроновый фильтр 0,2 мкм. В качестве внутреннего стандарта для тестостерона, 11-дезоксикортикостерона, андростендиона и 17α-гидроксипрогестерона, использовали 17α-метилтестостерон (IS-2). Ацетонитрил градиентный, изопропанол квалификации UV-IR-HPLC-GPC (Panreac, Испания), метанол LiChrosolv for liquid chromatography (Merck, Германия). Диэтиловый эфир квалификации х.ч. (Кузбассоргхим). Трифтороуксусная кислота (TFA, 99%, Panreac, Испания), NaOH квалификации х.ч. (Реактив, Санкт-Петербург). Фосфатный буфер 0,2 М с pH 8,0 готовили смешиванием Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄ (Fluka) в соответствующих пропорциях [1]. Для приготовления элюента его разбавляли бидистиллированной водой до 0,02 М и фильтровали через 0,2 мкм капроновый фильтр.

Для корреспонденции: Дутов Алексей Александрович, dutovaa@yandex.ru

For correspondence: Dutov A.A., dutovaa@yandex.ru

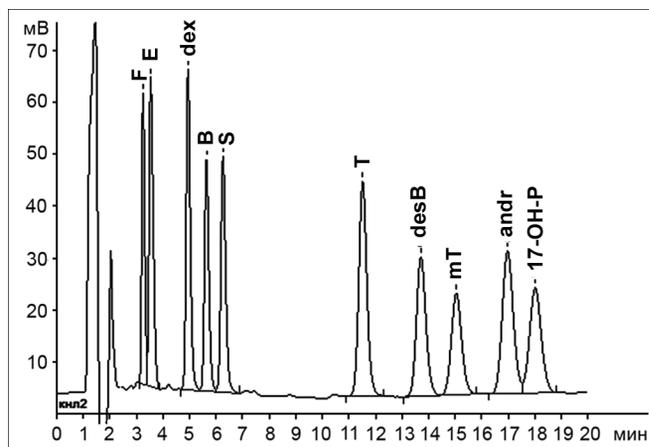


Рис. 1. Хроматограммы стандартов стероидов.

F – кортизол; E – кортизон; dex – дексаметазон (IS-1); B – кортикостерон; S – 11-дезоксикортизол; T – тестостерон; desB – дезоксикортикостерон; mT – 17α-метилтестостерон; andr – андростендион; 17-OH-P – 17α-гидроксипрогестерон.

Аппаратура и оборудование. Система ВЭЖХ включала спектрофотометрический детектор SPD-20A Prominence (Shimadzu, Япония), изократический насос высокого давления LC-20AT Prominence (Shimadzu, Япония), ручной инжектор 7725i Rheodyne (США) с петлей на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа «Мультихром» версия 3,0 (Амперсанд, Москва). Перемешивание на Intelli-Mixer RM-1L (Elmi, Латвия), упаривание в сушильном электрошкафу с пассивной конвекцией СНОЛ-3,5 («Рембыттермо», Новосибирск).

Результаты и обсуждение. Биологический материал. Кровь забирали не позднее 9 ч утра в 5-миллилитровые пробирки Vacutainer без антикоагулянтов и центрифугировали 5 мин при 3000 rpm (СМ-6М, Elmi, Latvia). Если анализ не делался немедленно, сыворотку помещали в 2-миллилитровые полипропиленовые пробирки и хранили до анализа при -20°C в течение 12 нед.

Экстракция. Жидкостную экстракцию проводили в 4,5 мл одноразовых полипропиленовых пробирках с закручивающейся крышкой (Thermo Scientific, США). К 0,5 мл сыворотки добавляли 40 мкл IS-1 и IS-2 (1 нг/мкл, в метаноле, т. е. по 40 нг каждого), 50 мкл 1 М NaOH, перемешивали и выдерживали 2 мин. Затем добавляли 3 мл эфира, закручи-

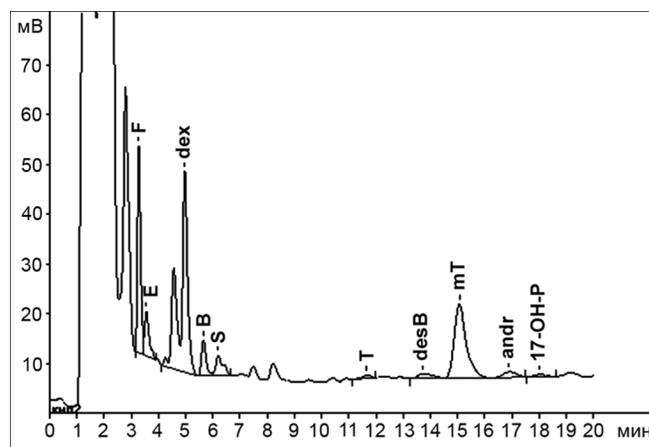


Рис. 2. Хроматограмма экстракта serum (эквивалент 0,25 мл) пациентки 25 лет без патологии надпочечников. Обозначения как на рис. 1. Масштаб изображения такой же, как при записи стандартов.

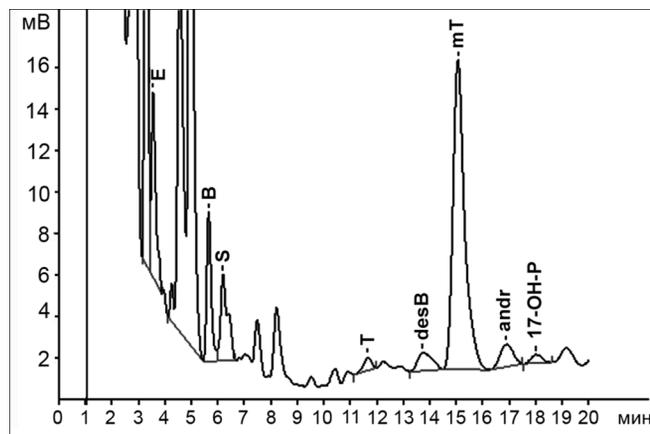


Рис. 3. Хроматограмма той же serum.

Концентрация стероидов (нг/мл): кортизол – 92, кортизон – 19, кортикостерон – 19, 11-дезоксикортизол – 11, тестостерон – 1,6, дезоксикортикостерон – 3,6, андростендион – 4,3, 17α-гидроксипрогестерон – 2,1. Выход из процедуры экстракции 66% (по дексаметазону) и 75% (по 17α-метилтестостерону). Ув. 4.

вали крышку и перемешивали на вортексе в течение 5 мин (режим F1, осторожное переворачивание без встряхивания). После отстаивания в течение 1 мин отбирали эфир в 10-миллилитровые стеклянные стаканчики Simax и упаривали досуха в сушильном электрошкафу при 50°C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл смеси метанол – вода (2:1, об./об.) и 50 мкл вводили в петлю инжектора.

Хроматография. Хроматографическая колонка PerfectSil Target ODS-3 HD размером 150 × 4,6 мм с 5 мкм обращенно-фазным сорбентом с первоначально заявленной эффективностью 11,500 ТТ (Analysentechnik, Germany). Реальная эффективность около 9000 ТТ. Для защиты использовали предколонку размером 10 × 4,6 мм с тем же сорбентом. УФ детекция при 240 нм. Элюент ацетонитрил – 0,02 М фосфатный буфер pH 8,0 – изопропанол (40:60:1, об./об./об.), скорость потока 1000 мкл/мин, давление 90 бар. Типичные рабочие хроматограммы на рис. 1, 2 и 3. Хроматографические параметры указаны в таблице.

На представленных хроматограммах идентифицированы все стероиды. Не совсем полное разделение в парах кортизол – кортизон и андростендион – 17α-гидроксипрогестерон. Здесь важно идентифицировать кортизол, поскольку именно его уровень снижен при обоих видах надпочечниковых гиперплазий. 17α-гидроксипрогестерон практически полностью отделен от андростендиона и выходящего за ним не-

Хроматографические параметры стероидов

Стандарты, по 20 нг каждого	t _r	H, mV
Кортизол (F)	3,25	56
Кортизон (E)	3,54	59
Дексаметазон (dex)	4,95	61
Кортикостерон (B)	5,64	45
11-дезоксикортизол (S)	6,27	45
Тестостерон (T)	11,52	41
Дезоксикортикостерон (desB)	13,71	27
17α-метилтестостерон (mT)	15,05	20
Андростендион (andr)	16,97	27
17α-гидроксипрогестерон (17-OH-P)	18,01	20

Примечание. t_r – время удерживания в мин, H – высота пика.

Продолжение см. на с. 39

идентифицированного пика, который присутствует во всех биопробах. Хроматографического “перекрытия” с другими исследованными стероидами не наблюдали. В частности, ДГЭА элюируется после 17 α -метилтестостерона и не детектируется при 240 нм (λ_{\max} около 200 нм). Другие исследованные стероиды (L-норгестрел, дидрогестерон, медроксипрогестерон, мифепристон, прогестерон) менее полярны, элюируются после 17 α -гидроксипрогестерона и не мешают анализу кортикостероидов.

Диагностика типа гиперплазии с помощью предложенного метода проблем не представляет, поскольку концентрация вторичных стероидов, в частности, 17 α -гидроксипрогестерона возрастает в 5–10 [2], а нередко в 50 раз и более [4]. Для скрининга на предмет надпочечниковых гиперплазий у новорожденных, исследователи клиники Мейо предлагают панель из трех стероидов – 17 α -гидроксипрогестерона, кортизола и андростендиона [4].

Нижний предел обнаружения (лимит количественного определения, LOQ) составил 0,06 нг на инъекцию для кортизола, кортизона и дексаметазона, 0,08 нг для кортикостерона, 11-дезоксикортизола и тестостерона, 0,2 нг для дезоксикортикостерона, 17 α -метилтестостерона, андростендиона и 17 α -гидроксипрогестерона при соотношении сигнал/шум = 5. Выход из процедуры экстракции составил 83 \pm 11% ($n = 43$).

Несколько практических замечаний: перед работой регенерировать колонку прокачкой элюента в течение не менее 25 мин (10 объемов колонки). После каждой биопробы обязательно промыть сорбент 3 \times 100 мкл метанола для удаления неполярных компонентов. После работы промыть всю

хроматографическую систему 5% водным ацетонитрилом в течение 25 мин, смесью ацетонитрил – изопропанол (9:1, об./об.) – 5 мин, 70% водным ацетонитрилом – 15 мин.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–7 см. REFERENCES)

1. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Мир; 1991.
2. Старкова Н.Т., ред. *Клиническая эндокринология: Руководство*. СПб.: Питер; 2002.

Поступила 27.05.15

REFERENCES

1. Doston R., Eliot D., Eliot U., Dzhons K. *Reference Book for Biochemists. [Spravochnik biokhimiya]*. Moscow: Mir; 1991. (in Russian)
2. Starkova N.T., ed. *Clinical Endocrinology: Handbook. [Klinicheskaya endokrinologiya: Rukovodstvo]*. St. Petersburg: Piter; 2002. (in Russian)
3. Kabra P.M. Clinical analysis of individual steroids by column liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1988; 429: 155–76.
4. Makin H.L.J., Gower D.B. *Steroid Analysis*. Springer; 2010.
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; 121 (3–5): 481–90.
6. Volin P. Simultaneous determination of serum cortisol and cortisone by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 1992; 584 (2): 147–55.
7. Volin P. High-performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1995; 671 (1–2): 319–40.

Received 27.05.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.471.03:616.153.45-074

Тимофеев А.В.¹, Хайбулина Э.Т.², Мамонов Р.А.², Горст К.А.¹

ПРОВЕРКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТРЕХ МОДЕЛЕЙ ГЛЮКОМЕТРОВ

¹ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

²ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России

Индивидуальные портативные системы контроля уровня глюкозы в крови (СКГ), обычно называемые глюкометрами, позволяют больным сахарным диабетом самостоятельно корректировать медикаментозную терапию. Эффективность этой коррекции зависит от точности СКГ. Проведена оценка минимальной приемлемой точности и клинической точности СКГ Контур ТС, Сателлит Экспресс и Ван Тач Селект по правилам, изложенным в ГОСТе 15197–2011 и международном стандарте ISO 15197–2013. Показано, что СКГ Контур ТС и Ван Тач Селект соответствуют, а СКГ Сателлит Экспресс не соответствует требованиям этих стандартов в части точности.

Ключевые слова: системы самоконтроля уровня глюкозы в крови; аналитическая точность; клиническая точность; сахарный диабет; глюкометр; стандарты.

Для цитирования: *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (1): 39–45.

Timofeev A.V.¹, Khaibulina E.T.², Mamonov R.A.², Gorst K.A.¹

THE VERIFICATION OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THREE MODELS OF GLUCOMETERS

¹The I.M. Sechenov first Moscow state medical university of Minzdrav of Russia, 119992, Moscow, Russia; ²The research institute of physical chemical medicine of the Federal medical biological agency of Russia, Moscow, Russia

The individual portable systems of control of glucose level in blood commonly known as glucometers permit to patients with diabetes mellitus to independently correct pharmaceutical therapy. The effectiveness of this correction depends on accuracy of control of glucose level. The evaluation was implemented concerning minimal admissible accuracy and clinical accuracy of control of glucose level of devices Contour TC, Satellite Express and One Touch Select according standards expounded in GOST 15197-2011 and international standard ISO 15197-2013. It is demonstrated that Contour TC and One Touch Select meet the requirements of these standards in part of accuracy while Satellite Express does not.

Keywords: system of self-control of glucose level in blood; analytical accuracy; clinical accuracy; diabetes mellitus; glucometer; standards

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61 (1): 39–45. (in Russ.)

Для корреспонденции: Тимофеев Алексей Валентинович, alvaltim@gmail.com

For correspondence: Timofeev A.V., alvaltim@gmail.com