Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 651-654.

УДК 542,98: 615,322
©Коллектив авторов

ВЭЖХ АНАЛИЗ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА СУЛЬФАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙ НА СВЕРХСШИТОМ ПОЛИСТИРОЛЕ (PUROSEP-200)

А.А. Дутов[1]*, Д.А. Никитин[2], Ю.Л. Лукьянова[1], А.В. Сверкунова[2], А.В. Мартынова[2], А.В. Ермолина[1]

[1]Читинская государственная медицинская академия,
672090, Чита, ул. Горького 39а; тел.: (факс): 8-3022-32-30-58;
эл. почта: dutovaa@yandex.ru
[2]Забайкальский государственный университет, Чита

Предложен простой ВЭЖХ метод анализа дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-сульфата) в сыворотке с использованием новой процедуры твердофазной экстракции (SPE) на сверхсшитом полистироле (Purosep-200) и быстрым хроматографическим разделением на колонках с монолитным сорбентом при изократическом элюировании и УФ детекцией при 200 нм. Процедура SPE занимает около 7 минут, хроматографическое разделение – менее 6 мин. Простота и высокая воспроизводимость метода позволяют использовать его в рутинной клинической практике.

Ключевые слова: дегидроэпиандростерона сульфат (ДГЭА-сульфат), ВЭЖХ, сыворотка, твердофазная экстракция, сверхсшитый полистирол (Purosep-200).

ВВЕДЕНИЕ

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и его предшественник ДГЭА-сульфат являются основными андрогенами надпочечников [1-4].

Уровень ДГЭА-сульфата в плазме более чем в 1000 раз выше уровня ДГЭА и в 10 раз выше, чем уровень кортизола [2]. Несмотря на высокий уровень ДГЭА-сульфата в сыворотке крови, его определение затруднено по двум основным причинам:

1) Слабое поглощение в УФ спектре [4, 5], что создает проблемы при ВЭЖХ анализе со спектрофотометрической детекцией;

2) Относительная полярность ДГЭА-сульфата, которая не всегда позволяет провести избирательное извлечение его из биологических жидкостей с помощью традиционных экстракционных методов, таких как жидко-жидкостная или твёрдофазная экстракция на обращённо-фазных сорбентах.

Перечисленные обстоятельства предъявляют особые требования к экстракционной технологии, которая должна быть селективной, а экстракты – высокочистыми.

Целью настоящего исследования была разработка простого, воспроизводимого и селективного ВЭЖХ метода анализа ДГЭА-сульфата в сыворотке с твердофазной экстракцией на уникальном отечественном сорбенте – сверхсшитом полистироле [6] и последующим разделением на колонках с монолитным сорбентом.

МЕТОДЫ

Стандарты и реактивы

Стандарт натриевой соли ДГЭА-сульфата (“Sigma”, США), 1000 нг/мкл, на дистиллированной воде, хранится при +4°С не более 1 месяца.

Ацетонитрил (HPLC-gradient grade, “Panreac”, Испания), изопропанол HPLC-grade (“Panreac”), метанол HPLC-grade и хлороформ for HPLC (“Merck”, Германия).

Фосфорная кислота "puriss" for HPLC (“Fluka”, Швейцария), аммиак водный 25% "ОСЧ" (“SigmaTech”, Россия), трифторуксусная кислота (TFA) 99% PS (“Panreac”,) и сульфат аммония "ХЧ" (“Лабтех”, Россия).

* - адресат для переписки

Аппаратура и оборудование

ВЭЖХ система включала спектрофотометрический детектор SPD-20A Prominence ("Shimadzu", Япония), изократический насос высокого давления LC-20AT Prominence ("Shimadzu"), ручной инжектор 7725i Rheodyne (США) с петлёй на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа "Мультихром" версия 3.0 ("Амперсанд", Москва). Картриджи на основе 3-мл полипропиленовых шприцов с фторопластовыми фильтрами ("Supelco", США), упакованные 30 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200) по собственной технологии: готовили 30 мг суспензии сорбента в 3 мл изопропанола, интенсивно перемешивали и быстро вводили в картридж. Упаковка осуществлялась самотеком. Твёрдофазная экстракция осуществлялась с помощью манифолда на 12 картриджей ("Merck") и вакуумного насоса KNF Lab (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические образцы

Кровь забирали в 5-мл пробирки Vacutainer без антикоагулянтов и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин (СМ-6М, "Elmi", Латвия). Если анализ не делался немедленно, сыворотку помещали в 2-мл полипропиленовые пробирки и хранили до анализа при -20°C в течение 1-2 недель.

Твёрдофазная экстракция (SPE)

Картриджи кондиционировали 1 мл хлороформа, 1 мл метанола и 1 мл воды. В 2-мл полипропиленовую пробирку добавляли 10 мкл стандарта ДГЭА-сульфата (1000 нг/мкл), 1 мл воды и 20 мкл концентрированной H_3PO_4, перемешивали и вводили в картридж. В другой аналогичный картридж вводили 1 мл сыворотки, содержащей 20 мкл концентрированной H_3PO_4. Скорость загрузки составляла не более 2 мл/мин. Сорбент высушивали в течение 1 мин под вакуумом (-10 InHg), промывали 1 мл метанола, содержащего 10 мкл/мл TFA и вновь высушивали в течение 3 мин под вакуумом. Затем ДГЭА-сульфат элюировали 1 мл метанола, содержащего 10 мкл/мл NH_4OH в 15-мл стеклянный стаканчик. Элюат упаривали досуха при пониженном давлении на водяной бане при 40°C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл метанола и 5–20 мкл (стандарт и биопроба, соответственно) вводили в петлю инжектора.

Хроматография

Колонка Chromolith Performance RP-18e 100×4,6 мм с защитной предколонкой 5×4,6 мм ("Merck"). УФ детекция при 200 нм. Элюент ацетонитрил – 0,02 М сульфат аммония (30:70, по объёму), скорость потока 1400 мкл/мин, давление 35 бар. Типичная хроматограмма представлена на рисунке.

Разработка SPE включает оптимизацию загрузки, промывки и элюирования. Загрузку можно производить в диапазоне pH от 2,0 до 7,0 по данным анализа загрузочного элюата, потери не превышали 1-2%. При pH 9,0 они составляют уже более 30%. Если промывать сорбент водой, потери не превышают 1-2%, однако, чистота экстрактов неудовлетворительная

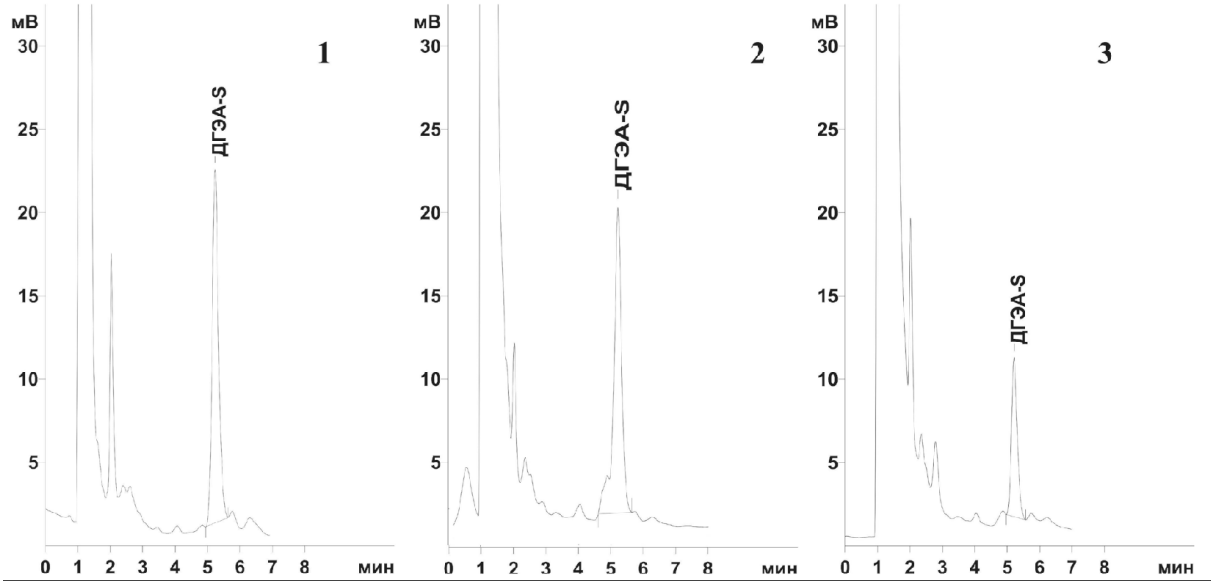

Рисунок. Хроматограммы 500 нг стандарта ДГЭА-сульфата (1) и двух экстрактов сыворотки (2 и 3) с разным содержанием гормона (2,3 и 1,1 мкг/мл, соответственно). Хроматографические условия в тексте.

и зачастую идентифицировать ДГЭА-сульфат на хроматограммах не представляется возможным. Можно сделать дополнительную промывку пентаном или этилацетатом, потерь при этом практически не происходит, однако, чистота экстрактов остается такой же, как при промывке водой. Максимальная чистота экстрактов достигается при промывке кислым безводным метанолом (10 мкл TFA на 1 мл спирта). В качестве альтернативы возможна промывка безводными ацетоном или ацетонитрилом, также содержащих 10 мкл TFA на 1 мл растворителя. Оптимальное элюирование достигается при использовании щелочного безводного метанола, содержащего 10 мкл NH_4OH на 1 мл спирта.

Выход из процедуры экстракции составил 91–107%, что проверено с помощью водного стандарта ДГЭА-сульфата. Потери на этапах упаривания/растворения практически отсутствовали. Затраты времени на процедуру SPE, включая упаривание/растворение, составили около 7 мин.

После завершения процедуры SPE сорбент картриджа необходимо промыть щелочным метанолом, метанолом, кислым метанолом и снова чистым метанолом. Картриджи можно использовать повторно. Важно не допускать высыхания сорбента, поэтому после экстракции и промывки картриджи заполняли изопропанолом и в таком виде хранили до следующего анализа. По нашим данным, картриджи выдерживают 100 и более экстракций из биологических образцов без потери эффективности. Для облегчения загрузки, биологический образец можно предварительно разбавить водой (1:1, по объёму) или пропустить через тефлоновый фильтр (20 мкм).

В доступной литературе мы обнаружили только одно исследование по твердофазной экстракции ДГЭА на полимерных сорбентах [3]. Авторы использовали картриджи Oasis HLB (“Waters”, США), экстракционная процедура по инструкции фирмы производителя, выход стероида >95%. Однако, такие картриджи, упакованные стирол дивинилбензолом, являются одноразовыми.

Проблема внутреннего стандарта (IS) осталась нерешенной. Потому мы предлагаем компромиссный вариант: пропускать стандартный раствор ДГЭА-сульфата через ту же процедуру SPE, как и биологические образцы. При этом необходимо использовать только предварительно стандартизованные картриджи с выходом ДГЭА-сульфата не менее 95%.

Хроматографическое разделение можно проводить как на колонках с монолитным сорбентом (Chromolith Performance RP-18e), так и на традиционных 150×4,6 мм с обращённо-фазным сорбентом (C18). Удовлетворительная форма пика получается на элюентах с добавлением сульфата аммония. Альтернативный вариант – 0,025 М боратный буфер с pH 7,0, насыщенный пентанолом [7].

Предел количественного обнаружения (LOQ) составил 10 нг на инъекцию при соотношении сигнал/шум = 5.

Уровень ДГЭА-сульфата в сыворотке добровольцев без патологии надпочечников, составил 1,75±0,58 мкг/мл для мужчин (возраст 19–36 лет, n=26) и 1,48±0,81 мкг/мл для женщин (возраст 18–40 лет, n=50). Эти результаты соответствуют опубликованным данным [2].

Простота и высокая воспроизводимость метода делают возможным его использование в рутинной клинической практике.

Авторы признательны профессору В.А. Даванкову (институт элементоорганических соединений РАН, Москва) за предоставление сорбента Purosep-200.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shackleton C.H.L.* (1986) J. Chromatogr. Biomed. Appl., **379**, 91-156.
2. *Тиц Н.У.* (1997) Энциклопедия клинических лабораторных тестов, "Лабинформ", М.
3. *Makin H.L.J., Gower D.B.* (2010) Steroid Analysis, Springer.
4. *Marwah A., Marwah P., Lardy H.* (2001) J. Chromatogr. A., **935**, 279-296.
5. *Morioka M., Ohashi Y., Sen Y., Komatsu F., Konishi Y., Fujita Y.* (1993) Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, **69**(1), 55-66.
6. *Цюрупа М.П., Блинникова З.К., Проскурина Н.А., Пастухов А.В., Павлова Л.А., Даванков В.А.* (2009) Российские нанотехнологии, **4**(9-10), 109-117.
7. *Causon R.C., Collins S.L., Fry D.E.* (1982) J. Chromatogr., **227**, 485-491.

Поступила: 10. 06. 2014.

HPLC ANALYSIS OF DEHYDROEPIANDROSTERONE SULFATE IN SERUM WITH USE OF SOLID-PHASE EXTRACTION ON HYPER CROSS-LINKED POLYSTYRENE (PUROSEP-200)

A.A. Dutov[1], D.A. Nikitin[2], Yu.L. Lukyanova[1], A.V. Sverkunova[2], A.V. Martinova[2], A.V. Ermolina[1]

[1]State Medical Academy,
39a, Gorkogo str., Chita, 672090 Russia; tel./fax: 8-3022-32-30-58; e-mail: dutovaa@yandex.ru
[2]Zabaikalsky State University, Chita, Russia

We have developed a simple HPLC method for analysis of the dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-sulfate) in serum with use a new procedure of solid-phase extraction (SPE) on hyper cross-linked polystyrene (Purosep-200) and fast chromatographic separation on the monolithic column under isocratic elution and UV detection at 200 nm. Complete SPE procedure lasts for about 7 min, chromatographic separation takes less than 6 min. Simplicity and high reproducibility of this method makes it attractive in routine clinical practice.

Key words: dehydroepiandrosterone sulfate, HPLC, serum, solid-phase extraction, hyper cross-linked polystyrene (Purosep-200).