

На правах рукописи

ОБЪЕДКОВА ЕКАТЕРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И
НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ВЭТСХ**

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена на кафедре органической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор
Карцова Людмила Алексеевна

Официальные оппоненты:

Доктор химических наук, профессор кафедры
аналитической химии и химической экологии
Саратовского государственного университета
Штыков Сергей Николаевич

Доктор химических наук, профессор
заведующий аналитической лабораторией
Института высокомолекулярных соединений
Красиков Валерий Дмитриевич

Ведущая организация:

Российская Военно-медицинская академия
им. С.М. Кирова

Защита состоится 10 апреля 2014 г.

На заседании диссертационного совета Д 212.232.37 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43.

Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан _____ 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

/В.В. Панчук/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность. Диссертационное исследование посвящено разработке схемы совместного определения стероидных эндо- и экзогенных стероидных гормонов в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча) методом ВЭТСХ и результатам хемометрической обработки характеристических стероидных профилей.

Совместное определение эндо- и экзогенных стероидных гормонов, а также нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), способствующих снижению побочных эффектов при приеме гормональных лекарств, позволяет судить о причине нарушений стероидогенеза при различных эндокринных патологиях. Активно развивающийся метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) открывает широкие возможности для решения этой проблемы.

За последнее десятилетие появилось большое количество публикаций, посвященных получению характеристических профилей биологически активных соединений и разработке на их основе диагностических критериев различных заболеваний. В России работы подобного рода стали появляться сравнительно недавно и относятся, в основном, к фармакологии, токсикологии и микробиологии. Подход, сочетающий получение стероидных профилей в условиях планарной хроматографии, наряду с ВЭЖХ и мицеллярной электрокинетической хроматографией (МЭКХ), и их последующую хемометрическую обработку является перспективным для включения его в комплексную диагностику.

Цель работы: Предложить схему совместного определения эндо- и экзогенных стероидных гормонов в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча) и способ контроля энантиочистоты нестероидных противовоспалительных средств методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

В связи с поставленной целью необходимо было решить задачи:

1. Оптимизировать условия разделения эндогенных и синтетических стероидных гормонов, включаемых в лекарственную терапию, методом ВЭТСХ; установить факторы, влияющие на селективность их разделения с использованием различных модификаторов хроматографических фаз.

2. Предложить различные пути модификации хроматографических фаз хиральными селекторами и условия разделения энантиомеров НПВП методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием. Выявить возможности лигандообменной ВЭТСХ для хирального разделения НПВП.

3. Разработать процедуру пробоподготовки биологических жидкостей (сыворотка крови, моча) для ВЭТСХ определения стероидных гормонов и энантиомеров лекарственных препаратов.

4. Предложить схему совместного определения стероидных гормонов и лекарственных

препаратов в биологических жидкостях методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием.

5. Методом главных компонент и формального независимого моделирования аналогий классов осуществить хеометрическую обработку хроматографических (ВЭЖХ, ВЭТСХ) и электрофоретических (МЭЖХ) профилей стероидных гормонов. Выявить возможности применения данного подхода для получения дополнительного диагностического критерия некоторых эндокринных заболеваний (синдром/болезнь Иценко-Кушинга, первичный гиперальдостеронизм).

Научная новизна

Предложен способ совместного определения стероидных гормонов (кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортикостерон) и синтетических стероидных лекарств (дексаметазон, преднизолон) в сыворотке крови и моче методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием. Установлено, что сверхсшитый полистирол «Purosep 270» в качестве материала для сорбционного концентрирования пригоден для извлечения соединений как гидрофобной (стероидные гормоны), так и гидрофильной (нестероидные противовоспалительные средства) природы. Степени извлечения аналитов 80 – 95%.

Предложены различные варианты модификации хроматографических фаз (*введение хирального селектора в состав неподвижной или подвижной фазы, одновременно в состав обеих фаз*) хиральными селекторами (*β -циклодекстрин, L-аминокислоты*), обеспечившие разделение энантиомеров нестероидных противовоспалительных препаратов методом ВЭТСХ. Обнаружено, что в условиях хиральной лигандообменной ВЭТСХ с применением комплексов Cu(II) с L-пролином/L-гидроксипролином разделение энантиомеров лекарственных средств (*ибупрофен, кетопрофен, кеторолак*), несмотря на моодентантную природу аналитов, осуществляется с высокими факторами энантиоселективности (1,7 – 3,5).

Показано, что сочетание хроматографического (ВЭЖХ, ВЭТСХ) и/или электрофоретического (МЭЖХ) анализа смесей стероидных гормонов и хеометрической обработки полученных стероидных профилей методами главных компонент и формального независимого моделирования аналогий классов позволяет получить дополнительный диагностический критерий ряда эндокринных заболеваний.

Практическая значимость работы

Предложен способ совместного определения стероидных эндогенных (*кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортикостерон*) и синтетических (*дексаметазон, преднизолон*) гормонов в биологических жидкостях (*сыворотка крови, моча*) методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием с пределами обнаружения 30 – 150 нг.

Методом ВЭТСХ с введением различных хиральных селекторов (*β -циклодекстрин,*

L-аминокислоты) в состав хроматографических фаз предложен вариант контроля энантиочистоты нестероидных противовоспалительных препаратов (*ибупрофен, кетопрофен, кеторолак*) (пределы обнаружения 120 – 310 нг).

Показано, что полученные методами ВЭТСХ, ВЭЖХ и МЭЖХ характеристические стероидные профили образцов сыворотки крови и мочи клинически здоровых доноров и больных в сочетании с хемометрической обработкой результатов анализа методами главных компонент и формального независимого моделирования аналогий классов могут быть рекомендованы для получения дополнительного диагностического критерия эндокринных заболеваний (*синдром/болезнь Иценко-Кушинга-СИК/БИК, первичный гиперальдостеронизм (ПГА), обусловленный альдостерон-продуцирующей опухолью*). Точность классификации «норма-патология» в случае ВЭЖХ-стероидных профилей 73% (сыворотка крови) и 91% (моча); ВЭТСХ – 83% и МЭЖХ – 88% для образцов мочи.

По результатам исследования получен патент «Способ диагностики эндокринных патологий».

Положения, выносимые на защиту

1. Закономерности разделения стероидных эндогенных гормонов (*кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортикостерон*) и лекарственных препаратов (*преднизолон, дексаметазон*) близкой химической структуры с использованием различных модификаторов (*анионные и катионные ПАВ, β-циклодекстрин*) хроматографических фаз в ТСХ, обеспечивших их совместное определение.

2. Влияние хиральных селекторов (*аминокислоты, циклодекстрины*) на разделение энантиомеров нестероидных противовоспалительных средств (*ибупрофена, кетопрофена и кеторолака*) с использованием различных способов модификации хроматографических фаз (*хиральный селектор в стационарной фазе; в элюенте; введение хирального селектора одновременно в обе фазы*) с последующим одно-, двумерным или двукратным элюированием в условиях ВЭТСХ с денситометрическим детектированием.

3. Схема пробоподготовки биологических объектов с применением различных сорбционных материалов (*силикагель, С18, сверхсшитый полистирол*) и элюирующих систем, обеспечившая определение стероидных гормонов и нестероидных противовоспалительных средств в сыворотке крови и моче методом ВЭТСХ с требуемыми пределами обнаружения.

4. Хемометрическая обработка полученных хроматографических и электрофоретических профилей стероидных гормонов образцов сыворотки крови и мочи здоровых доноров и пациентов с эндокринными заболеваниями методами главных компонент и формального независимого моделирования аналогий классов для получения дополнительного диагностического критерия некоторых эндокринных патологий (*синдром Иценко – Кушинга, первичный гиперальдостеронизм*).

Публикации и апробация работы. Материалы диссертации опубликованы в 4 статьях и 21 тезисах докладов; получен патент. Результаты исследований докладывались на Международной конференции по химии «Основные тенденции развития химии в начале XXI века» (2009, Санкт-Петербург, Россия); Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнология» (2009, Самара, Россия); International Student Conference «Science and Progress» (2010, Санкт-Петербург, Россия); IV Международной конференции «Экстракция органических соединений 2010» ЭОС-2010 (2010, Воронеж, Россия); V Всероссийской конференции студентов и аспирантов с международным участием «Химия в современном мире» (2011, Санкт-Петербург, Россия); Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия под знаком СИГМА: исследования, инновации, технологии» (2012, Омск, Россия); XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (2011, Волгоград, Россия); XIII Международной научной конференции «Физико-химические основы ионообменных процессов-ИОНИТЫ-2011» (2011, Воронеж, Россия); Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (2012, Санкт-Петербург, Россия); International Conference of Young Chemist «ICYC-2012» (2012, Amman, Jordan); Всероссийском симпозиуме с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» (2012, Краснодарский край, Россия); Всероссийской конференции «Аналитические приборы» (2012, Санкт-Петербург, Россия); 1-й Зимней молодежной школе-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (2013, Санкт-Петербург, Россия); VII Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013» (2013, Санкт-Петербург, Россия); 2-й Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (2013, Краснодар, Россия); 1-ой отчетной сессии научных подразделений СЗГМУ им. И.И. Мечникова «Фундаментальные исследования в современной медицине: достижения и перспективы» (2013, Санкт-Петербург, Россия); Втором съезде аналитиков России (2013, Москва, Россия; 14th European Meeting on Environmental Chemistry «ЕМЕС-14» (2013, Budva, Montenegro).

Структура и объем работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 3 глав с обсуждением полученных результатов, приложения, списка принятых сокращений, выводов, списка цитируемой литературы (218 наименований). Работа изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 82 рисунка, 1 схему и 29 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении дано обоснование актуальности темы и сформулирована цель исследования. Отмечена целесообразность использования метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) при определении стероидных эндогенных и синтетических гормонов в биологических жидкостях и для контроля энантичистоты нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Обсуждается перспективность хемометрической обработки хроматографических и электрофоретических профилей для проведения комплексной диагностики эндокринных заболеваний.

1-я глава (Обзор литературных данных) включает разделы, в которых обсуждаются методы определения стероидных гормонов и нестероидных противовоспалительных средств,

пробоподготовка биологических жидкостей, основы хиральной хроматографии, возможности применения хроматографических и электрофоретических профилей биологически активных соединений для диагностики различных заболеваний; дается характеристика определяемых аналитов, типов модификаторов фаз и хиральных селекторов, методов хемометрической обработки.

Во **2-й главе** рассматривается **характеристика объектов и методов исследования** (высокоэффективная тонкослойная хроматография с денситометрическим детектированием, высокоэффективная жидкостная хроматография, мицеллярная электрокинетическая хроматографии с положительной и отрицательной полярностью, УФ-спектроскопия).

3-я глава посвящена оптимизации условий хроматографического разделения эндогенных и синтетических стероидных гормонов и подготовке биологических жидкостей к хроматографическому анализу. Использование метода ВЭТСХ ограничено, с одной стороны, недостаточной селективностью разделения компонентов (близкие химические структуры соединений, малый фронт пробега элюента), с другой – высокими пределами обнаружения аналитов.

Использование различных модификаторов хроматографических фаз (*β -циклодекстрин, цетилтриметиламмоний бромид-ЦТАБ, додецилсульфат натрия-ДДСН*) позволило регулировать селективность разделения интересующих нас аналитов, и, в первую очередь, наиболее близких по хроматографическим параметрам (кортизол, кортизон, дексаметазон и преднизолон). Выявлены возможности трех режимов ВЭТСХ: модификация неподвижной фазы; модификация подвижной фазы; одновременное введение модификатора в состав элюента и стационарной фазы. Концентрации модификаторов варьировались в диапазоне от 0,5 до 10 ммоль/л. Достигнутые без предварительного концентрирования пределы обнаружения аналитов ~ 60 – 250 нг.

При модификации пластин ДДСН происходит частичная блокировка активных центров сорбента, что приводит к увеличению параметров удерживания (рис. 1). В точке перегиба (1 ммоль/л) додецилсульфат натрия блокирует активные центры сорбента и происходит смена режима с нормально-фазового на обращенно-фазовый. Дальнейшее снижение значений параметров R_f обусловлено гидрофобными взаимодействиями между молекулами аналитов и неполярными фрагментами молекул детергента. Аналогичные зависимости (рис. 2а,б) получены и при введении ПАВ в состав элюента, что может свидетельствовать о том, что в данном варианте происходит модификация и стационарной фазы.

При низких концентрациях циклодекстрина (0 – 1,67 мМ) для всех соединений наблюдалось снижение сродства к неподвижной фазе, что обусловлено ослаблением специфических взаимодействий между аналитами и активными центрами сорбента.

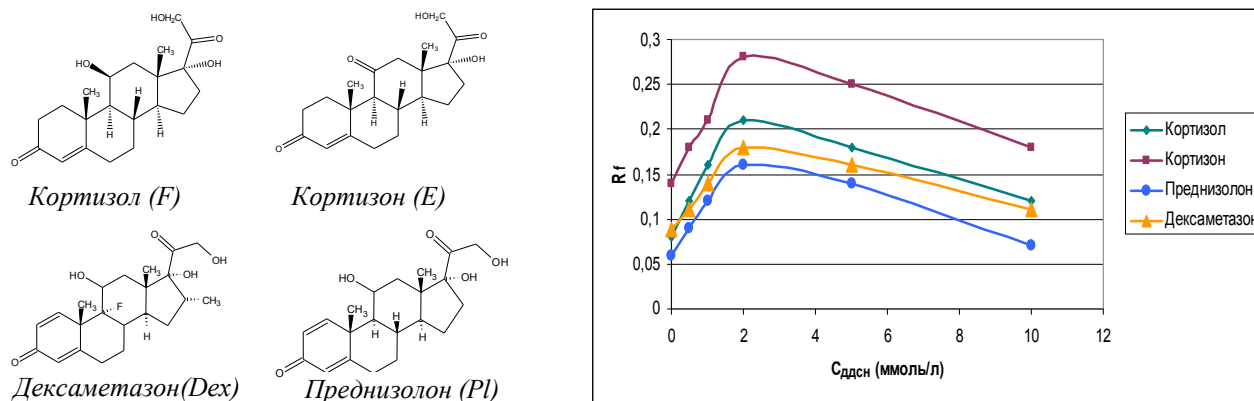


Рис. 1. Зависимость параметров удерживания (R_f) кортизола, кортизона, дексаметазона и преднизолона от концентраций ДДСН в стационарной фазе (силикагель); элюент: толуол – этанол (9:1, объемн.).

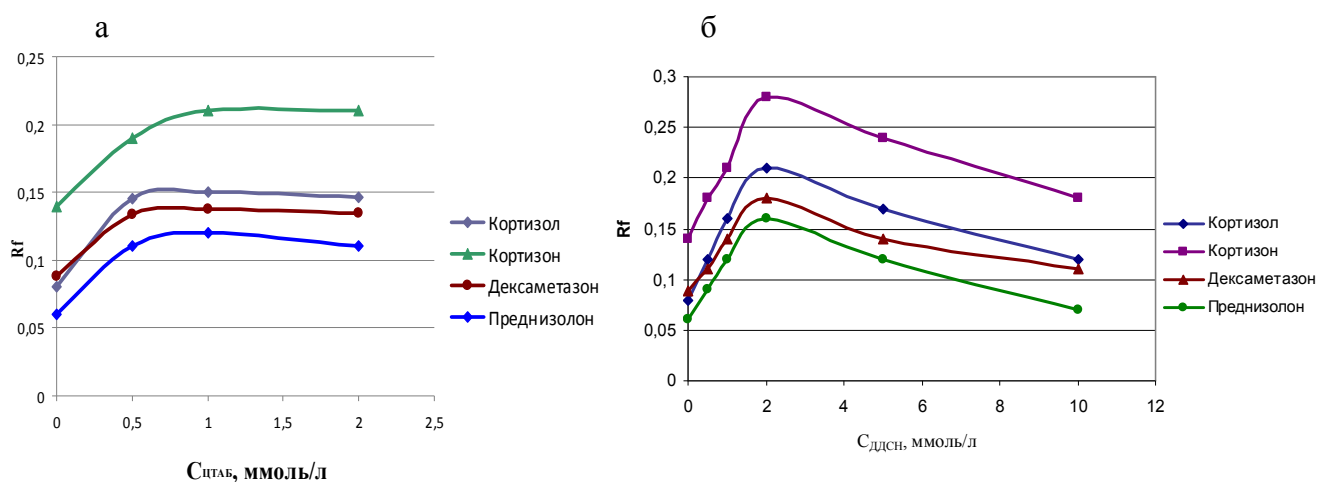


Рис. 2. Зависимость параметров удерживания (R_f) кортизола, кортизона, дексаметазона и преднизолона от концентраций ЦТАБ (а) и ДДСН (б), введенного в состав элюента (толуол – этанол, 9:1, объемн.); неподвижная фаза – силикагель.

Дальнейшее увеличение концентрации β -ЦД приводило к возрастанию значений факторов удерживания аналитов. Стероиды образуют комплексы включения с циклодекстринами: чем устойчивее комплекс, тем выше сродство к неподвижной фазе (рис. 3).

Во всех рассматриваемых случаях определяемые стероидные гормоны удерживаются на силикагеле в соответствии с их относительной гидрофобностью ([преднизолон, кортизон, кортизол] (12,06) < кортикостерон (13,00) < дексаметазон (13,20) < 11-дезоксикортикостерон (14,06)). Исключение составил препарат *дексаметазон*, для которого параметры удерживания оказались ниже ожидаемых. Возможно, подобный факт обусловлен наличием в составе молекулы дексаметазона атома фтора.

Лучшие результаты по селективности разделения получены при модификации ТСХ-пластин и подвижной фазы анионным детергентом ДДСН (1, 2, 5, 10 мМ), а также при введении в состав элюента ЦТАБ (5, 10 мМ), что обеспечило разделение шести определяемых кортикостероидов.

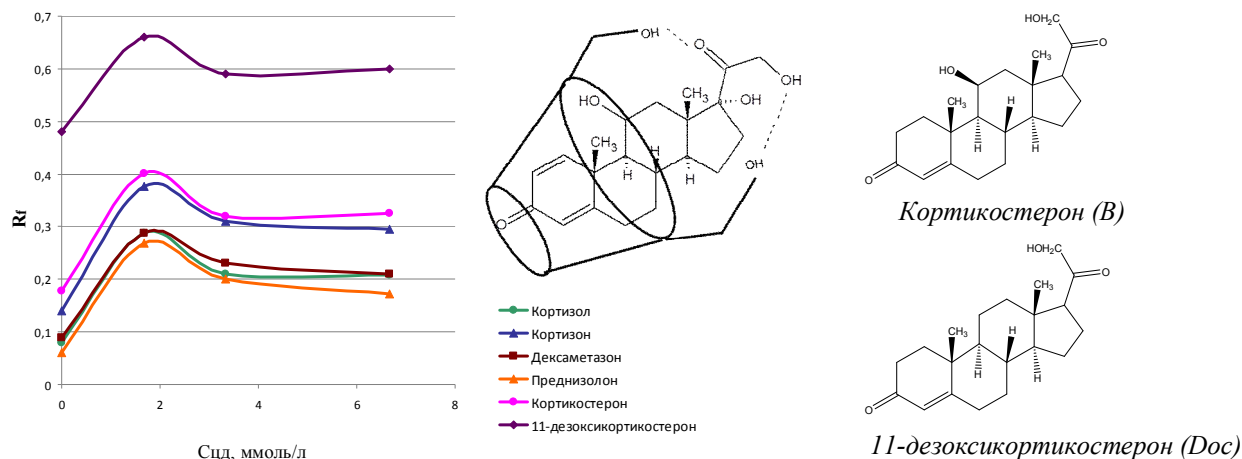


Рис. 3. Зависимость параметров удерживания (R_f) кортизола, кортизона, дексаметазона, преднизолона, кортикостерона и 11-дезоксикортикостерона от концентраций β -циклодекстрина в составе стационарной фазы (силикагель.); элюент: толуол – этанол (9:1, объемн.).

Выявлены возможности жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) и сорбционного концентрирования (ТФЭ) с использованием различных элюирующих систем и сорбционных материалов (силикагель, сорбент С18, сверхсшитый полистирол Purosep 270). От жидкостной экстракции отказались из-за образования эмульсий, приводящего к потерям извлекаемых аналитов. В случае сорбционного концентрирования аналитов из мочи (табл. 1) предпочтение отдано сверхсшитому полистиролу (ССП): большая сорбционная емкость по сравнению с С18; легкость регенерации и длительный срок рабочего времени картриджа; возможность извлечения из биологических объектов гидрофобных и гидрофильных аналитов.

Таблица 1. Степени извлечения эндо- и экзогенных стероидных гормонов из сыворотки крови и мочи методами жидкостно-жидкостной экстракции и сорбционного концентрирования (ТФЭ).

Стероидный гормон	Степень извлечения, %					
	Сыворотка крови			Моча		
	ЖЖЭ*	ТФЭ-С18**	ТФЭ-ССП***	ЖЖЭ*	ТФЭ-С18**	ТФЭ-ССП***
Кортизол	82,3±2,5	92,0±2,3	66±9	102±3	91±3	91,2±3,1
Кортизон	80,6±1,8	93±4	53±4	93,7±2,5	90±4	72±6
Кортикостерон	72,6±2,5	89,5±2,8	56,4±0,7	70,0±3,0	81,0±2,7	63,9±2,4
11-дезоксикортикостерон	65,8±1,5	87,3±1,5	56±4	71,0±3,0	79,0±2,3	75,6±3,2
Преднизолон	80,3±1,5	75,2±1,5	61,2±1,1	85,3±2,6	81,5±2,6	80,1±2,7
Дексаметазон	64±4	76,4±1,9	57,0±1,4	79,6±2,7	82±3	76,6±1,7

* Экстрагенты: дихлорметан (для сыворотки крови), хлороформ (для мочи), ($V_{экстр} = 5$ мл; $n=5$, $p=0,95$);

** Элюирующая система: дихлорметан/этанол (1:1, объемн.), С18 «Separon SGX»

($V_{сорб} = 3$ см³, $V_{эл} = 2$ мл; $n=5$, $p=0,95$);

*** Элюирующая система: дихлорметан/метанол (2:1, объемн.); сверхсшитый полистирол «Purosep 270»

($V_{сорб} = 2$ см³, $V_{эл} = 5$ мл; $n=3$, $p=0,95$);

Степени извлечения с учетом матрицы пробы рассчитывались по формуле:

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

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

S – площадь хроматографического пика аналита после экстракции биологического объекта;

S_0 – площадь хроматографического пика водного раствора стандартной добавки (без проведения экстракции).

Общая схема анализа биологических образцов (моча, сыворотка крови) представлен ниже (схема 1).

В соответствии с предложенной схемой проведен ТСХ анализ образцов мочи (рис. 4). Вид калибровочных зависимостей приведен на рис. 5. В качестве референтного выбран метод ВЭЖХ с предварительным сорбционным концентрированием аналитов на сверхсшитом полистироле (табл. 2).

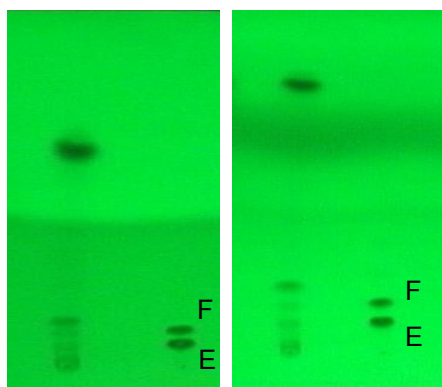


Рис. 4. Снимки пластин в УФ свете после проявления. Элюирующая система: толуол-этанол (9:1, объемн.) с добавкой ДДСН (5 мМ).
F – кортизол, E – кортизон.

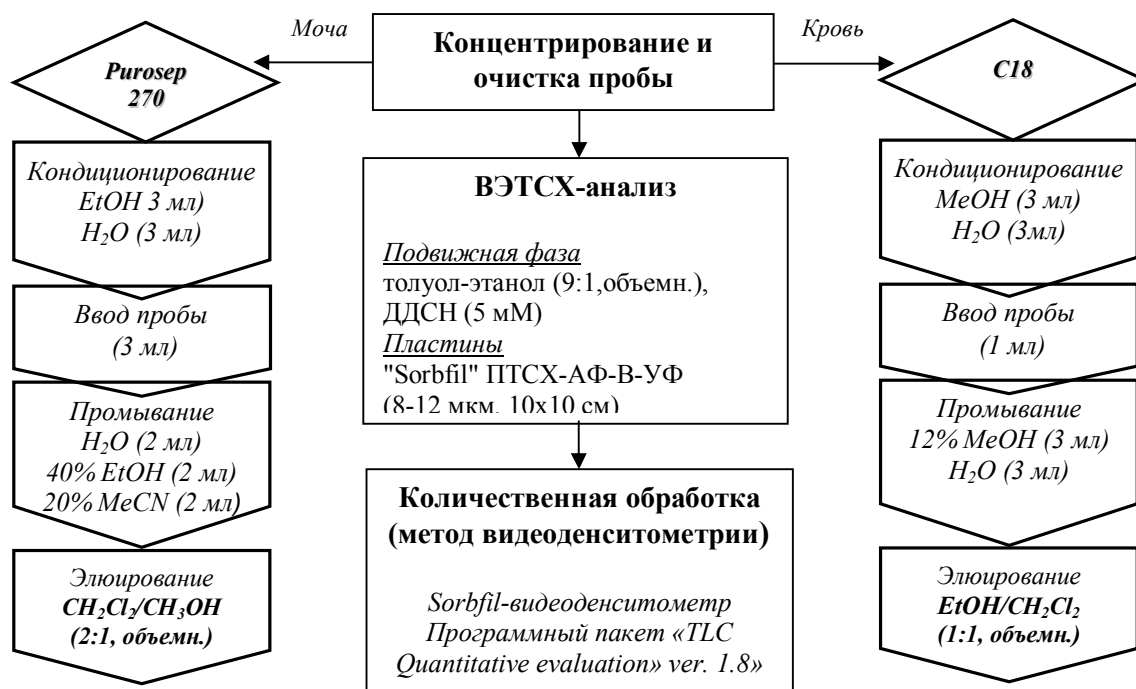


Схема 1. Схема определения стероидных гормонов в образцах мочи и сыворотки крови

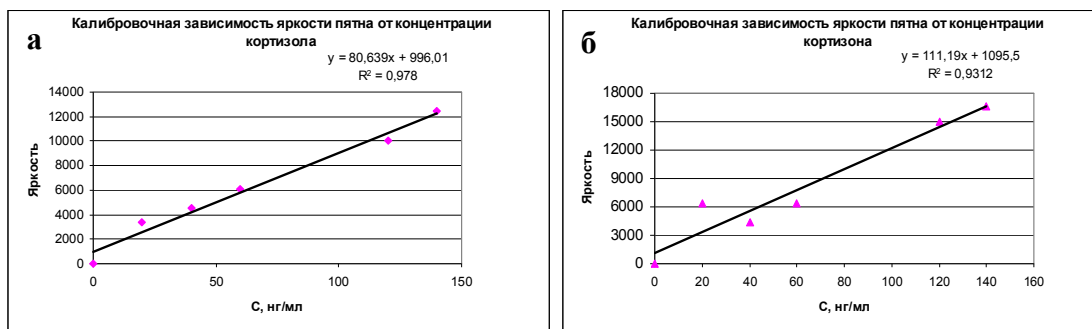
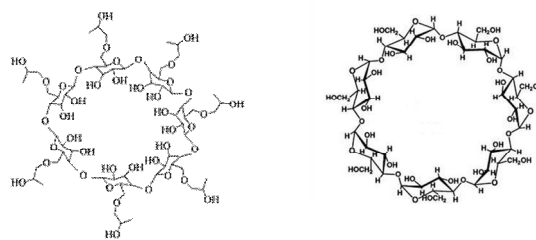


Рис. 5. Вид калибровочных зависимостей яркости пятен от концентрации кортизола (а) и кортизона (б)

Таблица 2. Определение свободных эндогенных стероидов надпочечников в образцах мочи (n=3, p=0,95)

	Стероид	ВЭЖХ/ССП (мкг/сут)	ВЭТСХ/ССП (мкг/сут)
Образец 1	Кортизол	74,1 ± 1,6	72 ± 6
	Кортизон	238,4 ± 2,3	209 ± 10
Образец 2	Кортизол	338 ± 8	308 ± 12
	Кортизон	233 ± 6	213 ± 15

В качестве хиральных селекторов выбраны *L*-пролин, β-циклодекстрин, 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин, комплексы ионов Cu (II) с *L*-пролином, *L*-гидроксипролином.



2-гидроксипропил-β-циклодекстрин β-циклодекстрин

При модификации стационарной фазы (силикагель) *L*-пролином с последующим двумерным проявлением достигнуто разделение энантиомеров всех исследуемых НПВС (*ибупрофена*, *кетопрофена* и *кеторолака*) (рис. 6) с высокими значениями факторов разрешения (от 2,29 до 10,35) (табл. 3). На рис. 7 представлена графическая зависимость факторов разрешения от концентрации *L*-пролина в составе неподвижной фазы. При её увеличении разделение энантиомеров улучшается.

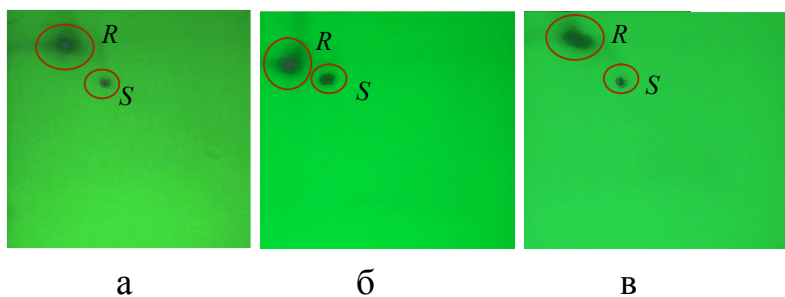


Рис. 6. Снимки модифицированных пластин (*L*-пролин (2%, масс.)) с нанесенными НПВС: а) кеторолак, б) кетопрофен, в) ибупрофен. ПФ:MeCN/MeOH/H₂O (5:1:1, объемн.) + AcOH (1%, объемн.).

Таблица 3. Значение коэффициентов энантиоселективности (α) и факторов разрешения (R_s) при разделении энантиомеров НПВС.

Концентрация <i>L</i> -пролина (%, масс.)	Ибупрофен		Кетопрофен		Кеторолак	
	α	R_s	α	R_s	α	R_s
3,5 %	1,65	2,29	1,65	3,18	2,72	7,62
7 %	1,84	2,57	1,86	3,33	2,45	8,86
15 %	2,19	2,93	1,97	3,68	3,33	10,00
20 %	2,06	3,31	2,07	5,50	3,24	10,35

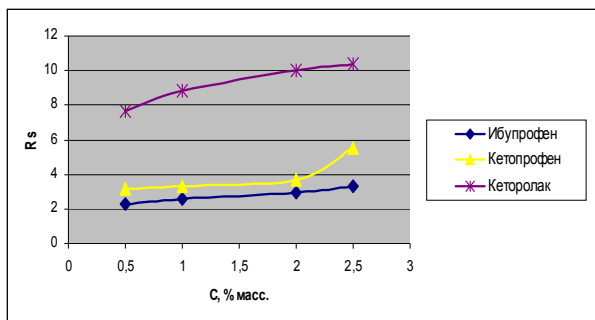
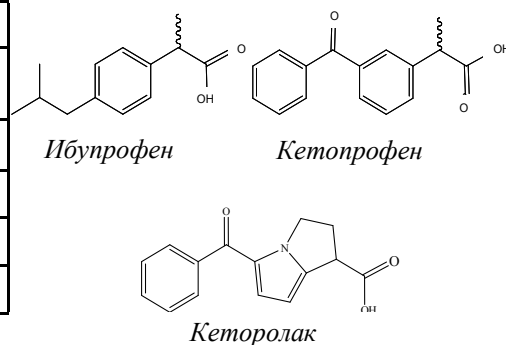


Рис. 7. Зависимость факторов разрешения (R_s) энантиомеров НПВС от концентрации *L*-пролина в модифицирующем растворе.

При наличии хирального селектора в ПФ и одномерном проявлении достигнуто разделение всех НПВС с использованием β -циклодекстрина и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина. Коэффициенты энантиоселективности в зависимости от концентрации хиральной добавки представлены в табл. 4. Как и в случае с *L*-пролином, рост концентрации хирального селектора приводил к улучшению разделения.

Таблица 4. Значения коэффициентов энантиоселективности (α) энантиомеров НПВС.

Концентрация 2-ГП- β -ЦД	α		
	Ибупрофен	Кетопрофен	Кеторолак
5 мМ	1,68	1,89	2,07
10 мМ	1,72	1,93	2,18
15 мМ	1,75	2,21	2,42

Условия
ПФ: MeCN/MeOH/H₂O (7,5:1,5:1,5, объёмн.) + AcOH (1%, объёмн.), добавка 2-ГП- β -ЦД. Неподвижная фаза – силикагель.

Энантиомеры кеторолака удалось разделить при одномерном проявлении с использованием элюирующей системы – C₆H₅CH₃/EtOH (1:1, объёмн.), содержащей *L*-пролин (2%, масс.) или β -циклодекстрин (3,3 мМ) (рис. 8, табл. 5).

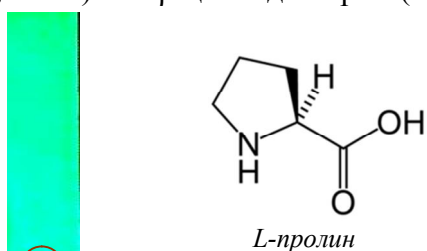
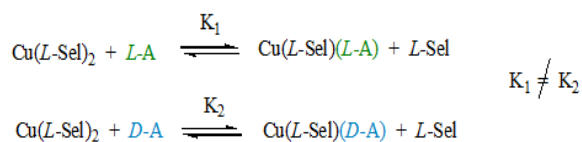


Рис. 8. Разделение энантиомеров кеторолака.

Условия: C₆H₅CH₃/EtOH (1:1, объёмн.) с добавкой *L*-пролина (2%, объёмн.). Неподвижная фаза – силикагель. Одномерное проявление.

Интересной задачей явилось выявление возможности применения принципа лигандного обмена при разделении энантиомеров НПВС методом ТСХ. В этих условиях могут формироваться тройные диастереомерные комплексы различной термодинамической устойчивости (схема 2) между ионом металла, *L*-аминокислотой и молекулой аналита.



где *L-Sel* – *L*-аминокислота, *L*-пролин или *L*-гидроксипролин

Схема 2. Схема лигандного обмена

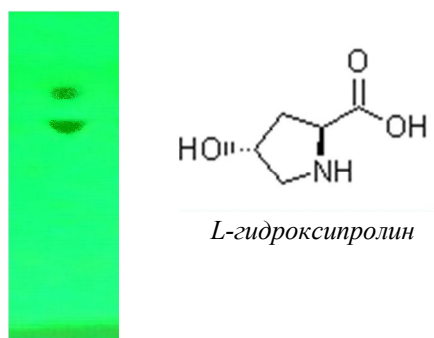


Рис. 9. Разделение энантимеров кетопрофена методом лигандо-обменной ТСХ.

Условия:

Комплекс Cu^{2+} с *L*-гидроксипролином в составе подвижной фазы.

ПФ: MeCN/MeOH/H₂O (7,5:1,5:1,5, объемн.) + AcOH (2%, объемн.). Двукратное проявление.

Таблица 6. Значение факторов разрешения и коэффициентов энантиоселективности при разделении НПВС при введении комплексов Cu (II) с *L*-аминокислотами.

Концентрация хирального селектора	R_s		A		
	ибупрофен	кетопрофен	ибупрофен	кетопрофен	кеторолак
Cu^{2+}/L-пролин					
(1мМ:2мМ)	3,14	2,04	2,41	3,05	4,58
(2мМ:4мМ)	2,59	2,17	3,28	2,82	3,31
(3мМ:6мМ)	1,41	2,46	1,94	2,98	2,85
Cu^{2+}/L-гидроксипролин					
(1мМ:2мМ)	3,12	3,23	2,98	2,19	3,18
(2мМ:4мМ)	3,95	2,20	3,52	2,40	2,66
(3мМ:6мМ)	2,93	2,71	1,74	2,51	1,00

Условия

ПФ: MeCN/MeOH/H₂O (7,5:1,5:1,5, объемн.)+AcOH (1%, объемн.); Неподвижная фаза – силикагель.

Таблица 5. Значение коэффициентов энантиоселективности (α) и факторов разрешения (R_s) при разделении энантимеров кеторолака.

Хиральный селектор	α	R_s
<i>L</i> -пролин (3,5 мМ)	1,23	2,61
β -циклодекстрин (3,3 мМ)	1,17	2,70

Условия

ПФ: C₆H₅CH₃/EtOH (1:1, объемн.) с добавкой хирального селектора. Неподвижная фаза – силикагель. Одномерное проявление.

Достигнуто разделение энантимеров ибупрофена, кетопрофена и кеторолака с использованием в качестве хирального селектора комплексов меди (Cu^{2+}) с аминокислотами (*L*-гидроксипролин, *L*-пролин) при двукратном проявлении (рис. 9, табл. 6). Мольное соотношение ионов меди и аминокислот в комплексе соответствовало 1:2, соответственно.

Достигнутые результаты на модельных системах позволили перейти к анализу реальных объектов. Подобраны условия экстракции для водных растворов нестероидных

противовоспалительных средств (схема 3). Полученные степени извлечения представлены в табл. 7. При использовании системы метанол/дихлорметан (2:1, объемн) удалось достичь 85%-ного извлечения НПВС. Последней системе и было отдано предпочтение, поскольку время, затрачиваемое на анализ в этом случае – наименьшее.

Таблица 7. Оценка степеней извлечения нестероидных противовоспалительных средств с использованием сорбционного концентрирования (сорбент Purosep 270 ($V = 2 \text{ см}^3$, $n=3$, $p=0,95$))

Элюент	Степень извлечения (%)
Метанол/дихлорметан (1:2)	$(28,2 - 43,5) \pm 2,2$
Метанол/дихлорметан (2:1)	$(74,8 - 84,5) \pm 2,3$
Метанол	$(83,0 - 94,8) \pm 2,8$
Образцы мочи с добавкой ибупрофена	
Метанол/дихлорметан (2:1)	$78,5 \pm 2,4$

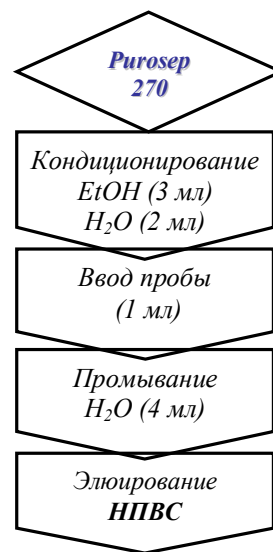


Схема 3. Схема пробоподготовки мочи для ТСХ определения НПВС

Проанализированы образцы мочи клинически здорового донора через 2 ч после приема препарата «Ибупрофен». После проведения сорбционного концентрирования энантимеры ибупрофена разделялись на пластинах, модифицированных *L*-пролином (15%, масс.) при двумерном проявлении ($\alpha=3,47$; $R_s=9,20$).

В **5-й главе** обсуждается перспективность подхода, объединяющего хроматографический и/или электрофоретический анализ с хемометрической обработкой стероидных профилей, отражающих колебания концентраций и соотношений компонентов в образцах клинически здоровых доноров и пациентов с эндокринными заболеваниями.

С учетом предложенной схемы определения стероидных гормонов получены ВЭТСХ-профили для образцов мочи здоровых доноров («норма») и пациентов с синдромом Иценко – Кушинга (СИК) («патология») (рис. 10). Независимо соответствующие стероидные профили получены и методами МЭХ и ВЭЖХ, выбранными в качестве референтных (рис. 11).

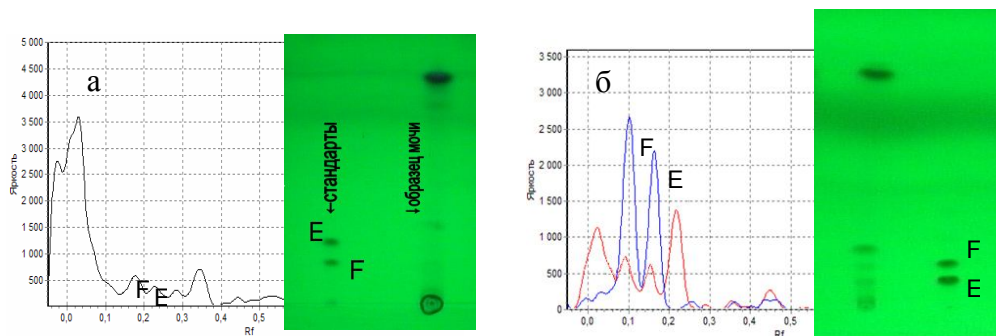


Рис. 10. ВЭТСХ хроматограммы эндогенных стероидных гормонов образцов мочи пациентов с «нормой» (а) и СИК (б). Условия: пластины "Sorbfil" ПТСХ-АФ-П-УФ, видеоденситометр «Sorbfil», 254 нм; элюент – толуол/этанол (9:1), добавка – додецилсульфат натрия (5мМ)

У здоровых доноров стероидный хроматографический и электрофоретический профиль не содержит каких-либо дополнительных аналитических сигналов (рис. 11в). В случае пациентов с синдромом Иценко – Кушинга в биологических образцах наблюдается повышенное содержание кортизола и кортикостерона (рис. 11а). Для больных с первичным гиперальдостеронизмом в некоторых случаях регистрируется неизвестный пик в области 11-дегидрокортикостерона (*соединение А*, время удерживания $\sim 11,8 \pm 0,2$ мин); отмечено повышение уровня кортизола и 11-дезоксикортизола (*соединение S*, время удерживания $\sim 12,8 \pm 0,2$ мин) (рис. 11б).

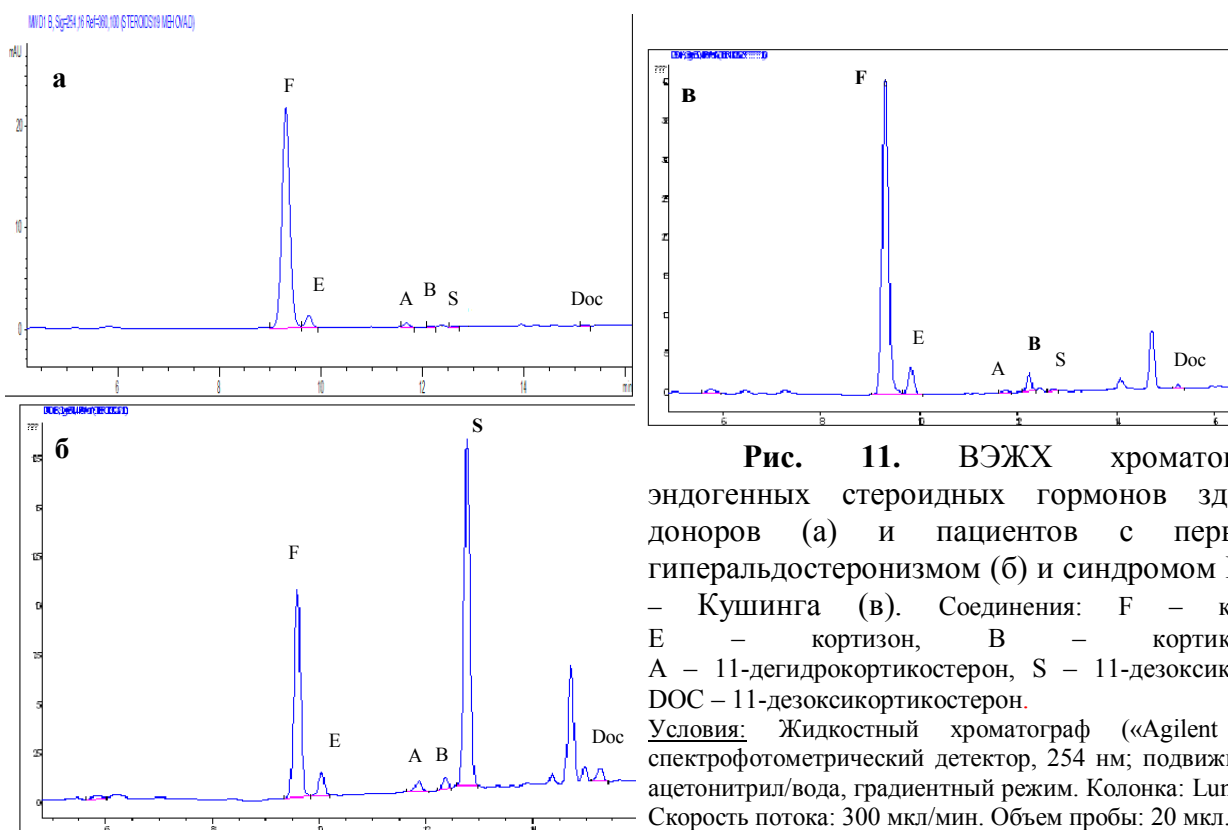


Рис. 11. ВЭЖХ хроматограммы эндогенных стероидных гормонов здоровых доноров (а) и пациентов с первичным гиперальдостеронизмом (б) и синдромом Иценко – Кушинга (в). Соединения: F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, A – 11-дегидрокортикостерон, S – 11-дезоксикортизол, DOC – 11-дезоксикортикостерон.
Условия: Жидкостный хроматограф («Agilent 1200»); спектрофотометрический детектор, 254 нм; подвижная фаза: ацетонитрил/вода, градиентный режим. Колонка: Luna, 5 мкм. Скорость потока: 300 мкл/мин. Объем пробы: 20 мкл.

Различие между всеми тремя «классами» (СИК, ПГА, «норма») зарегистрировано и на матричном графике (рис. 12). Цвет на графике характеризует интенсивность аналитического сигнала (синий – низкая, красный – высокая).

Проведена хемометрическая обработка стероидных профилей, полученных в условиях ВЭЖХ, ВЭТСХ и МЭЖХ методом главных компонент (МГК) (рис. 13 – 16). Отметим, что МГК в данном случае является просто способом представления структуры данных, а график счетов МГК – способом их визуализации. Объясненное количество дисперсии для каждой главной компоненты приведено в скобках на соответствующей оси.

Хроматографические и электрофоретические данные обработаны также методом формального независимого моделирования аналогий классов (SIMCA) в режиме одноклассового классификатора. С этой целью построена модель МГК для класса «норма», и все остальные образцы проецированы на нее.

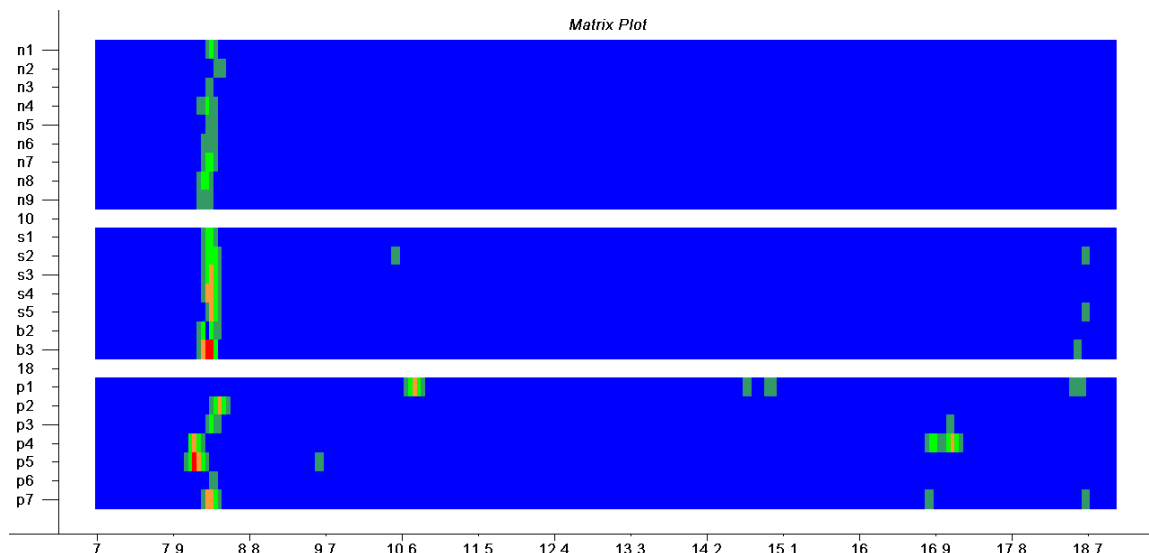


Рис. 12. Матричный график для образцов с «нормой» (n), СИК/БИК (s/b) и ПГА (p).

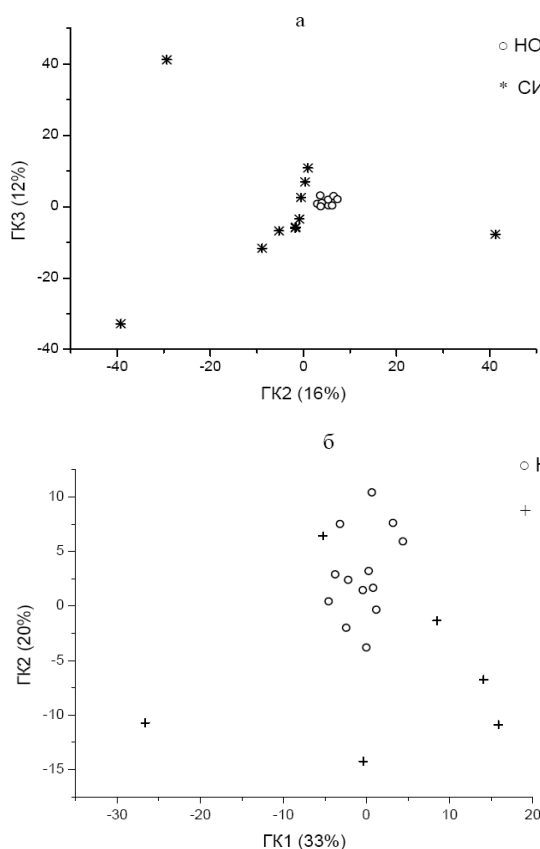


Рис. 13. Графики счетов МГК образцов сыворотки крови здоровых доноров (○) и больных СИК (*) (а) или (ПГА) (+) (б).

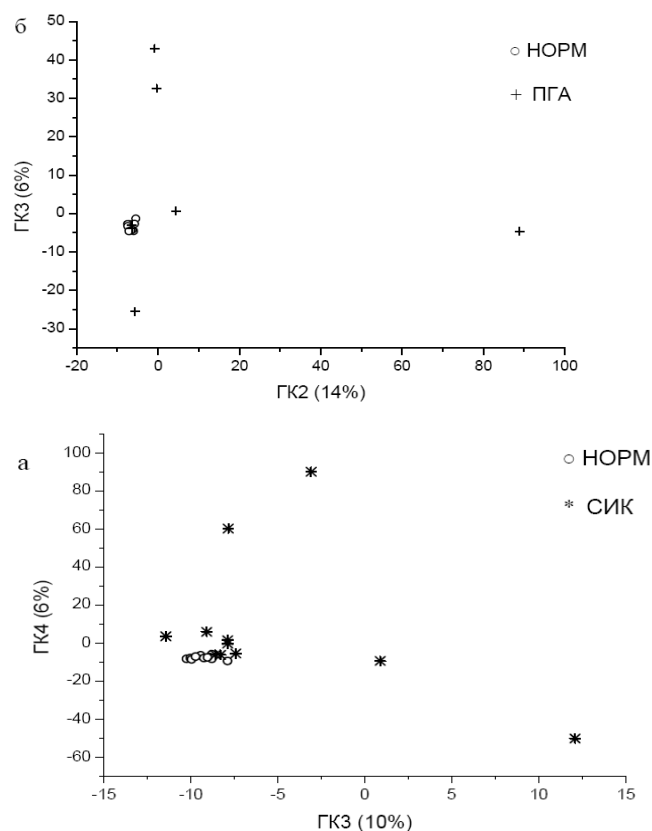


Рис. 14. Графики счетов МГК образцов мочи здоровых доноров (○) и больных СИК (*) (а) или ПГА (+) (б).

Установлено, что применение метода SIMCA к хроматографическим стероидным профилям дает возможность проводить классификацию образцов сыворотки крови на образцы без патологий и образцы с патологиями (СИК, ПГА). Точность классификации для образцов сыворотки крови на изученной выборке (16 образцов с СИК, 10 – с ПГА, 15 – с «нормой») составила 73 %. В случае образцов мочи (14 образцов с СИК, 8 – с ПГА, 11 – с «нормой»)

точность классификации составила 91% (ВЭЖХ-анализ).

Для ВЭТСХ-профилей четыре из пятнадцати образцов класса СИК ошибочно распознаны, как принадлежащие классу «норм». Все остальные – распознаны верно как образцы с патологиями при 95%-ной доверительной вероятности. Точность классификации составила 83%.

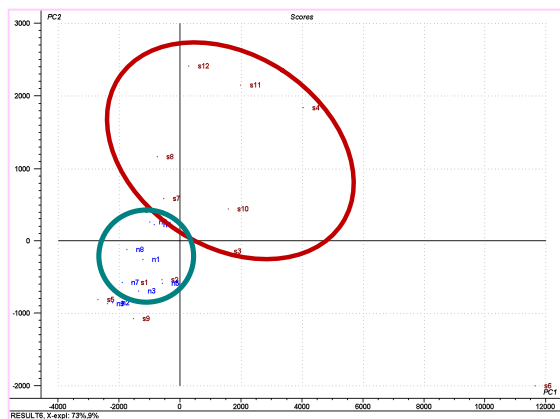


Рис. 15. График счетов образцов мочи (ВЭТСХ анализ) для парной МГК модели «норма-СИК».

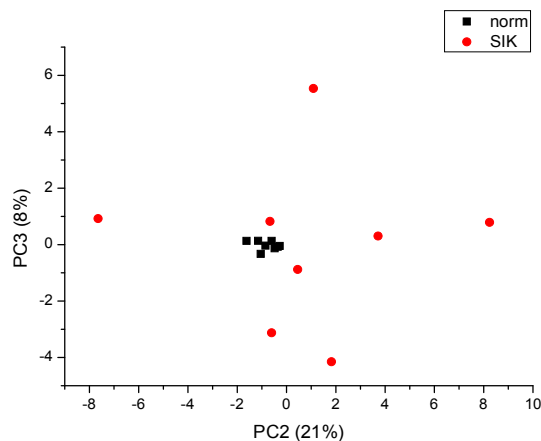


Рис. 16. График счетов образцов мочи (МЭКХ анализ) для парной МГК модели «норма-СИК».

Если строить МГК-модель по классу «норма» и с помощью SIMCA проводить классификацию «норма/патология» по МЭКХ-профилям, то один из образцов с СИК классифицируется как «нормальный» (что можно отметить на рис. 17) при доверительной вероятности 95%. Точность классификации для указанной выборки составила 88%.

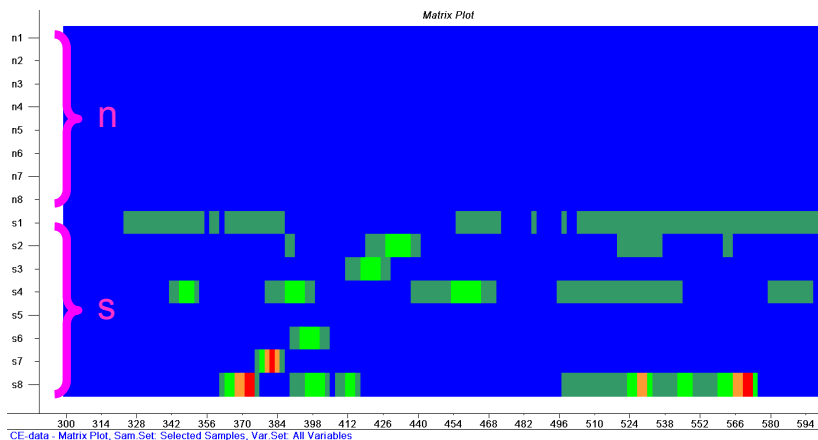


Рис. 17. Матричный график для образцов с «нормой» и СИК (n – норма, s – патология).

Для подтверждения работоспособности полученной нами модели проведена попытка идентификации образцов сыворотки крови (по ВЭЖХ-профилю, для пациентов, поступивших с подозрением на синдром Иценко – Кушинга), путем их отнесения к одному из установленных классов: «норма» или синдром/болезнь Иценко – Кушинга.

На рис. 18 приведены графики Кумана, иллюстрирующие расстояние от образца до двух классов («норма» и «патология»). В первом случае (1) образец не попадает ни в один из кластеров, по крайней мере, с учетом границ класса, построенных по имеющимся образцам.

Важно и то обстоятельство, что предполагаемая патология впоследствии также не была подтверждена традиционно используемыми в медицине методами диагностики. Во втором (2) – образец попадает в кластер с заболеванием Кушинга, что дополнительно подтверждает наличие патологии у пациента.

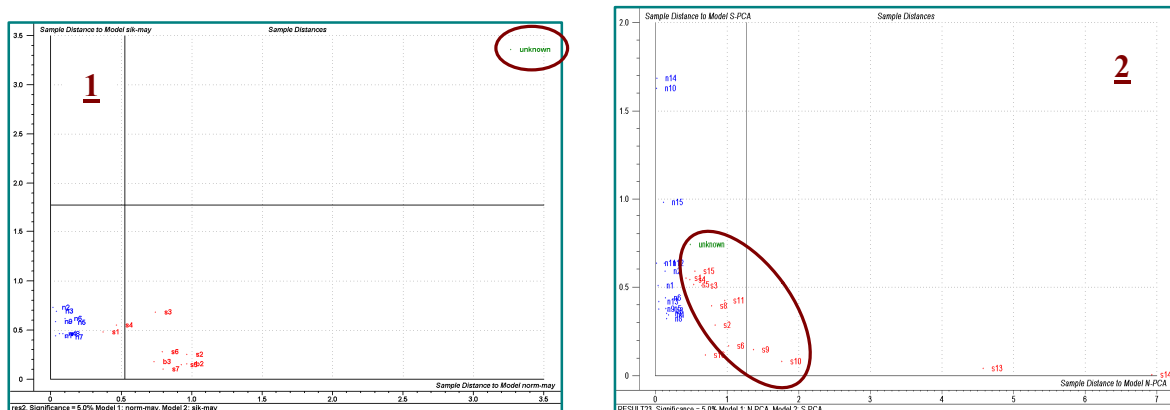


Рис. 18. Графики Кумана, построенные для двух классов («норма» и СИК) и неизвестного образца

Таким образом, подход, сочетающий результаты хроматографического анализа с последующей математической обработкой многомерных данных может оказаться информативным для получения независимого дополнительного диагностического критерия некоторых эндокринных нарушений.

ВЫВОДЫ

1. Предложена схема совместного определения эндогенных стероидов и их синтетических аналогов в образцах мочи методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием, включающая сорбционное концентрирование на сверхсшитом полистироле Purosep 270 с использованием элюирующей системы толуол/этанол (9:1) и добавкой 5 мМ додецилсульфата натрия (пределы обнаружения – 30 – 100 нг).

2. Установлено, что додецилсульфат натрия (ДДСН) и цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) в качестве модификаторов хроматографических фаз обеспечивают лучшую селективность разделения (значения факторов селективности 1,14 – 2,30) стероидных гормонов (кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортикостерон) и синтетических стероидных средств (дексаметазон, преднизолон) методом ВЭТСХ.

3. Разработана процедура пробоподготовки биологических жидкостей (сыворотка крови и моча) для ВЭТСХ определения стероидных гормонов и синтетических стероидных лекарств, включающая сорбционное концентрирование на сорбенте С18 (сыворотка крови) и сверхсшитом полистироле Purosep 270 (образцы мочи). Степень извлечения стероидных гормонов 75 – 95%.

4. Предложены различные варианты разделения энантиомеров нестероидных противовоспалительных средств (ибупрофена, кетопрофена и кеторолака) с введением хиральных селекторов (*L*-пролин, β -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин) в состав хроматографических фаз (хиральный селектор в стационарной фазе; в элюенте; введение хирального селектора в обе фазы) методом ВЭТСХ. Лучшие результаты по факторам разрешения (от 3,3 до 10,5) достигнуты в случае импрегнирования пластин *L*-пролином (20%, масс.) при двумерном проявлении.

5. Выявлены возможности хиральной лигандообменной высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ЛО ВЭТСХ) для разделения энантиомеров НПВС (модификация подвижной фазы комплексами Cu^{2+}/L -пролин или Cu^{2+}/L -гидроксипролин); получены высокие значения факторов энантиоселективности ($\sim 9,4$) и факторов разрешения ($\sim 4,4$).

6. Показано, что полученные методами ВЭТСХ, ВЭЖХ и МЭЖХ характеристические стероидные профили образцов сыворотки крови и мочи клинически здоровых доноров и больных в сочетании с хемометрической обработкой результатов анализа методами главных компонент и формального независимого моделирования аналогий классов могут быть рекомендованы для получения дополнительного диагностического критерия эндокринных заболеваний. Точность классификации 73% – 91% (ВЭЖХ); 73% (ВЭТСХ), 88% (МЭЖХ).

Основные материалы работы опубликованы в следующих работах:

1. Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, В.А. Даванков, Е.В. Обьедкова. Использование сверхшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе лекарств в биологических объектах методом ВЭТСХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т 10. Вып. 1. С. 5–14.
2. Л.А. Карцова, Е.В. Обьедкова. Хроматографические и электрофоретические профили биологически активных соединений для диагностики различных заболеваний // Журн. Анал. Химии. 2013. Т. 68. № 4. С. 316–324.
3. Л.А. Карцова, Е.В. Обьедкова, И.Д. Протасова. Разделение энантиомеров нестероидных противовоспалительных средств и β -блокаторов в условиях высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. Вып. 3. С. 257–265.
4. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Д.О. Кирсанов, А.А.Гольшев. Получение характеристических профилей стероидных гормонов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. Вып. 4. С. 500–505.
5. Е.В. Обьедкова, Е.А. Бессонова, Л.А. Карцова. Влияние органических модификаторов на селективность разделения лекарственных препаратов гидрофильной и гидрофобной природы методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Тезисы докладов Международной конференции по химии «Основные тенденции развития химии в начале XXI века». 2009. Санкт-Петербург, Россия. С. 509.
6. E. Obedkova, L.A Kartsova. Development of chromatographic and electrophoretic methods for determination of steroidal hormones in biological fluids // Conference abstracts of International Student Conference «Science and Progress». 2010. St.Petersburg – Peterhof, Russia. P. 27.

7. Л.А. Карцова, В.А. Даванков, Е.А. Бессонова, Е.В. Обьедкова. Использование сверхшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе остаточных лекарств в биологических объектах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнология». 2009. Самара, Россия. С. 100.
8. Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, Е.В. Обьедкова. «Методы off- и on-line концентрирования ионных и нейтральных биологически активных веществ в режиме капиллярного электрофореза» // IV Международная конференция «Экстракция органических соединений 2010» ЭОС-2010. 2010. Воронеж, Россия. С. 269.
9. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова. Получение характеристических стероидных профилей для диагностики эндокринных заболеваний методами ВЭЖХ и ВЭТСХ. Тезисы докладов V Всероссийской конференции студентов и аспирантов с международным участием «Химия в современном мире». 2011. Санкт-Петербург, Россия. С. 83.
10. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, Д.О. Кирсанов. Хроматографические характеристические стероидные профили для диагностики эндокринных заболеваний // Тезисы докладов XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Т. 4. 2011. Волгоград, Россия. С. 381.
11. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Бессонова Е.А., Кирсанов Д.О. Возможности диагностики эндокринных патологий по хроматографическим стероидным профилям // Тезисы докладов XIII Международной научной конференции «Физико-химические основы ионообменных процессов – ИОНИТЫ-2011». 2011. Воронеж, Россия. С. 488 – 489.
12. И.Д. Протасова, Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова. Выявление возможностей высокоэффективной тонкослойной хроматографии при разделении энантиомеров нестероидных противовоспалительных препаратов // Тезисы докладов XIII Международной научной конференции «Физико-химические основы ионообменных процессов-ИОНИТЫ-2011». 2011. Воронеж, Россия. С. 492 – 493.
13. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, Д.О. Кирсанов. Применение хроматографических методов (ОФ ВЭЖХ, ВЭТСХ) для определения стероидных гормонов в биологических жидкостях // Тезисы докладов VI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012». 2012. Санкт-Петербург, Россия. С. 83 – 84.
14. E.V. Obedkova, L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, D.O. Kirsanov. Chromatographic characteristic steroid profiles for diagnostics of endocrine diseases // Abstracts of International Conference of Young Chemists. ICYC-2012. 2012. Amman, Jordan. P. 88.
15. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, Д.О. Кирсанов. Применение хроматографических и электрофоретических методов для получения характеристических профилей стероидных гормонов // Труды Всероссийской научной молодежной школы-конференции «Химия под знаком СИГМА: исследования, инновации, технологии». 2012. Омск, Россия. С. 296.
16. Л.А. Карцова, Е.В. Обьедкова, Е.Г. Стрельникова, Д.О. Кирсанов. Возможности систем для жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза при определении стероидных гормонов эндо- и экзогенного происхождения в биологических жидкостях // Тезисы докладов IV Всероссийской конференции «Аналитические приборы». 2012. Санкт-Петербург, Россия. С. 38.
17. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, А.А. Голышев, Д.О. Кирсанов // Характеристические хроматографические и электрофоретические профили стероидных гормонов как дополнительный диагностический критерий эндокринных патологий // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов». 2012. Краснодарский край, Россия. С. 24.
18. Л.А. Карцова, И.Д. Протасова, Е.В. Обьедкова. Разделение энантиомеров биологически

- активных соединений в условиях высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов». 2012. Краснодарский край, Россия. С. 38.
19. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова. Характеристические хроматографические и электрофоретические профили биологически активных соединений // Сборник тезисов 1-ой зимней молодежной школы-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии». 2013. Санкт-Петербург, Россия. С. 83.
 20. Е.В. Обьедкова, И.Д. Протасова. Разработка способа определения стероидных гормонов, стероидных лекарственных и нестероидных противовоспалительных препаратов методом ВЭТСХ // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013». 2013. Санкт-Петербург, Россия. С. 65 – 66.
 21. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Л.И. Великанова, Д.О. Кирсанов. Метаболические профили стероидных гормонов как потенциальный диагностический критерий эндокринных заболеваний // Сборник материалов 1-й отчетной сессии научных подразделений СЗГМУ им. И.И. Мечникова «Фундаментальные исследования в современной медицине: достижения и перспективы». 2013. Санкт-Петербург, Россия. С. 23.
 22. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Д.О. Кирсанов. Характеристические хроматографические (ВЭЖХ, ВЭТСХ) и электрофоретические профили стероидных гормонов как дополнительный диагностический критерий эндокринных патологий // Материалы II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». 2013. Краснодар, Россия. С. 56.
 23. Е.В. Обьедкова, Л.А. Карцова, Л.И. Великанова, Д.О. Кирсанов. Разработка способа определения стероидных гормонов и нестероидных противовоспалительных препаратов в биологических жидкостях методом ВЭТСХ // Тезисы докладов Второго съезда аналитиков России. 2013, Москва, Россия. С. 398.
 24. E.V. Obedkova, L.A. Kartsova, L.I. Velikanova, D.O. Kirsanov. Development of the way of steroid hormones and non-steroidal anti-inflammatory drugs determination in biological fluids by HPTLC // Abstracts of 14th European Meeting on Environmental Chemistry. 2013. Budva, Montenegro. P. 55.
 25. L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, E.V. Obedkova, A.V. Nikolaev. New approaches for electrophoretic determination of biologically active compounds // Abstracts of 14th European Meeting on Environmental Chemistry. 2013. Budva, Montenegro. P. 117.
 26. Л.А. Карцова, Е.В. Обьедкова, Е.А. Бессонова, Д.О. Кирсанов, Л.И. Великанова. Патент на изобретение RU 2485512 С2 от 11.08.2011 «Способ диагностики патологий, связанных с эндокринными заболеваниями».

Автор признателен за помощь в проведении работы и предоставленные биологические образцы руководителю научно-исследовательской лаборатории хроматографии НИИ эндокринологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова Великановой Людмиле Иосифовне;