



УДК 543.544

Получение характеристических профилей стероидных гормонов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Объедкова Е.В., Карцова Л.А., Кирсанов Д.О., Гольшев А.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 5.04.2013 г.

Аннотация

В работе продемонстрирована возможность определения стероидных гормонов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с денситометрическим детектированием в образцах мочи здоровых доноров и пациентов с синдромом Иценко-Кушинга. Получены хроматографические стероидные профили, обработанные методом главных компонент с последующим анализом данных методом формального независимого моделирования аналогий классов.

Ключевые слова: хроматографические профили, высокоэффективная тонкослойная хроматография, стероидные гормоны, хемометрическая обработка, метод главных компонент.

The opportunity of steroid hormone determination in urea samples of healthy donors and patients with Cushing's syndrome by thin-layer chromatography with densitometric detection has been demonstrated. Chromatographic steroidal patterns processed by principal component analysis and soft independent modeling of class analogy have been obtained.

Keywords: chromatographic patterns, high-performance thin-layer chromatography, steroid hormones, chemometric treatment, principal component analysis

Введение

Актуальным направлением медицинской диагностики в настоящее время становится экспресс-определение различных заболеваний с использованием характеристических профилей биологически активных веществ (сахаров, пептидов, аминокислот и др.). Для их получения чаще всего используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭ) [1].

Определение уровня стероидных гормонов в организме человека позволяет судить о причине нарушений стероидогенеза при различных эндокринных патологиях. В настоящее время основными методами определения биологически активных соединений являются иммунологические и хроматографические. В последнем случае наряду с обращенно-фазовой ВЭЖХ начинает активно использоваться метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с

денситометрическим детектированием, позволяющий проводить экспрессный количественный анализ различных образцов и стандартов [2].

Серией предварительных экспериментов показана возможность классификации некоторых эндокринных патологий по ВЭЖХ-профилям стероидных гормонов с использованием методов многомерной обработки данных: метода главных компонент (МГК) и формального независимого моделирования аналогий классов. В соответствии с этими результатами нами была предпринята попытка получить характеристические ВЭТСХ-профили свободных форм природных глюкокортикоидов (свободный кортизол, свободный кортизон), вырабатываемых корковым веществом надпочечников, с целью различия образцов мочи пациентов с синдромом Иценко-Кушинга (СИК) и клинически здоровых доноров (рис. 1).

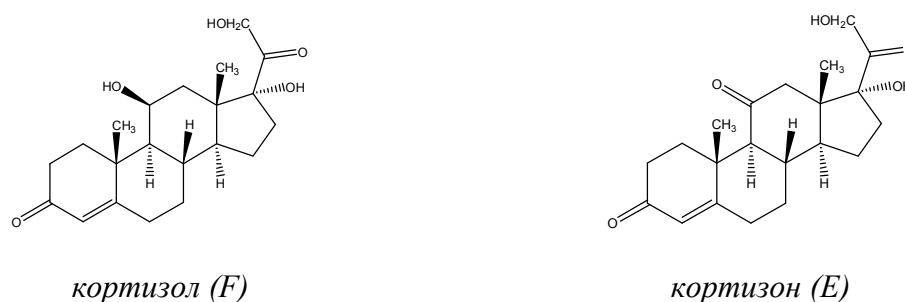


Рис. 1. Структурные формулы глюкокортикоидов – кортизола и кортизона

Эксперимент

Реагенты и материалы. Ацетонитрил (ч.д.а., «Криохром», СПб), этанол (ч.д.а., «Sigma»), дихлорметан (х.ч., «Acros Organics»), гидроксид натрия («Sigma»), толуол ч.д.а., «Вектон», Россия), метанол (ч.д.а., «Baker HPLC analyzed»), додецилсульфат натрия «Sigma»), сверхсшитый полистирол (Purosep 270, Россия), кортизол («Sigma», 98%), кортизон («Sigma», 98%).

В качестве реальных объектов использовались образцы суточной мочи контрольной группы («норма») (10) и группы пациентов с синдромом Иценко-Кушинга (13). Все образцы замораживались и хранились при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Оборудование и программное обеспечение. Детектирование стероидных гормонов осуществлялось с использованием видеоденситометра «Sorbfil-денситометр» (г. Краснодар). Обработка хроматографических профилей производилась в программном пакете The Unscrambler v 9.7 (САМО, Норвегия).

Пробоподготовка образцов мочи. Пробоподготовка образцов мочи осуществлялась с использованием метода твердофазной экстракции (ТФЭ). В качестве сорбционного материала для ТФЭ использовался сорбент марки Purosep 270 (объем сорбента - 2 см^3).

ТФЭ осуществлялась в 4 этапа: кондиционирование патрона этанолом (3 мл), введение пробы (3 мл), промывание сорбента последовательно 0,1 М водным раствором гидроксида натрия (2 мл), 40% (объемн.) водным раствором этилового спирта (2 мл), 20% (объемн.) водным раствором ацетонитрила (2 мл). Элюирующая смесь - дихлорметан/метанол (2:1) (3 мл). Экстракт упаривался, сухой остаток растворялся в 50 мкл ацетонитрила.

Условия ВЭТСХ-анализа. Для анализа применялись хроматографические пластинки "Sorbfil" ПТСХ-П-А-УФ (г. Краснодар). Подвижная фаза толуол:этанол

(9:1, объемн.) с добавкой додецилсульфата натрия - ДДСН (5 мМ), двукратное проявление. Видеоденситометрическое детектирование, 254 нм.

Получение и хемометрическая обработка метаболических стероидных профилей. Общая схема анализа образцов мочи включала: концентрирование и очистку пробы, анализ методом ВЭТСХ и количественную обработку полученных данных методом видеоденситометрии.

На рис. 2 б представлен снимок пластины с нанесенным образцом мочи в УФ свете после ее проявления в системе толуол-этанол (9:1, объемн.) с добавкой ДДСН (5 мМ).

На снимке видно соответствие разделившихся пятен смеси со стандартными образцами кортизола и кортизона.

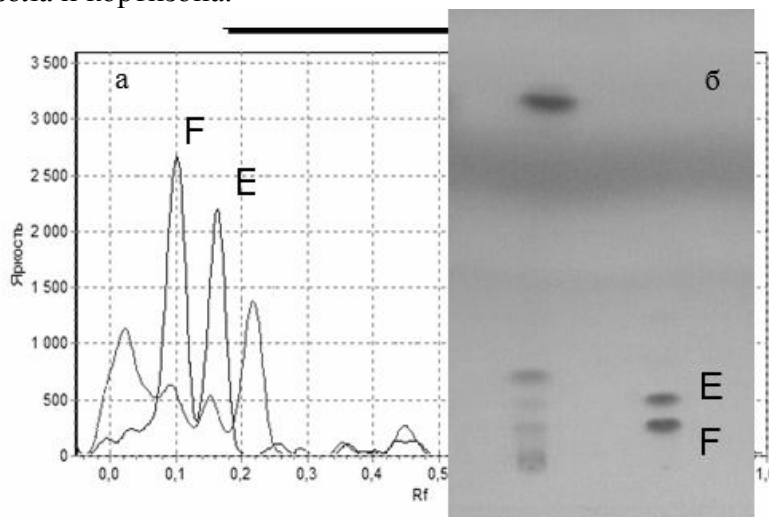


Рис. 2. Снимок пластины в ультрафиолетовом (УФ) свете после проявления. Элюирующая система: толуол-этанол (9:1, объемн.) с добавкой ДДСН (5 мМ). Все индивидуальные стероиды – стандартные образцы (1 – кортизол, 2 - кортизон)

Программный пакет TLC Quantitative Evaluation (Version 1.8) представлял полученные после УФ-облучения данные в виде зависимости интенсивности окрашенного пятна на ТСХ-пластине от концентрации аналитов (рис. 2 а).

Обработка хроматографических профилей производилась в программном пакете The Unscrambler v 9.7 (CAMO, Норвегия). Использовались алгоритмы PCA (*principal component analysis* – метод главных компонент, МГК) и SIMCA (*soft independent modeling of class analogy* – метод формального независимого моделирования аналогий классов). Подробное изложение математических основ этих методов описано в [3, 4].

Данные хроматограмм для каждого образца представлялись в числовом виде, как значение интенсивности сигнала детектора при соответствующем параметре удерживания. Обработывался диапазон значений Rf (0,05 – 0,4) с шагом 0,005.

Обсуждение результатов

Работы по проведению диагностики с использованием характеристических профилей биологически активных соединений объединены в одно новое направление под названием «метаболомика». Формально метаболомика определяется как «систематическое изучение уникальных химических „отпечатков

пальцев“, специфичных для процессов, протекающих в живых клетках» — точнее, изучение низкомолекулярных метаболитических профилей [5]. Метабомика направлена на изучение изменений эндогенных метаболитов вследствие патофизиологического воздействия на организм посредством объединения аналитических методов и многомерного анализа данных. Современные исследования в данной области характеризуются достаточно сложным набором многочисленных данных, хемометрическая обработка которых осуществляется с использованием многомерных статистических методов [6 – 7]. Наиболее часто используют метод главных компонент, который прост в реализации и интерпретации результатов эксперимента. В основе метода лежит построение матрицы, каждый элемент которой может быть представлен точкой в декартовой системе координат. Основная идея метода заключается в снижении размерности исходного набора многомерных данных за счет построения линейной комбинации переменных, которая наилучшим образом объясняет их разброс. Проекция точек данных приписывается отдельным объектам и переменным и отражает взаимные сходства и различия.

Востребованной задачей является выработка диагностических критериев различных эндокринных патологий, в частности синдрома Иценко-Кушинга, поскольку традиционные медицинские способы их диагностики – длительная и дорогостоящая процедура.

С целью различия образцов сыворотки крови и мочи больных синдромом Иценко-Кушинга и здоровых людей («норма») нами были получены и проанализированы характеристические профили стероидных гормонов, полученные методом ВЭЖХ. На двумерном графике счетов образцов сыворотки крови для парной МГК модели «норма-СИК/БИК» видно, что образцы класса «норма» образуют более компактный кластер по сравнению с образцами класса СИК/БИК (рис. 3). На следующем этапе исследования данные были проанализированы методом SIMCA в режиме одноклассового классификатора. Было установлено, что точность классификации на изученной выборке составила 96 % (1 образец из 24 ошибочно классифицирован как образец без патологий). В случае образцов мочи два из класса «синдром Иценко-Кушинга» ошибочно отнесены к классу «норма». Остальные образцы распознаны, как не принадлежащие классу «норма» при 5% уровне значимости (95% доверительной вероятности).

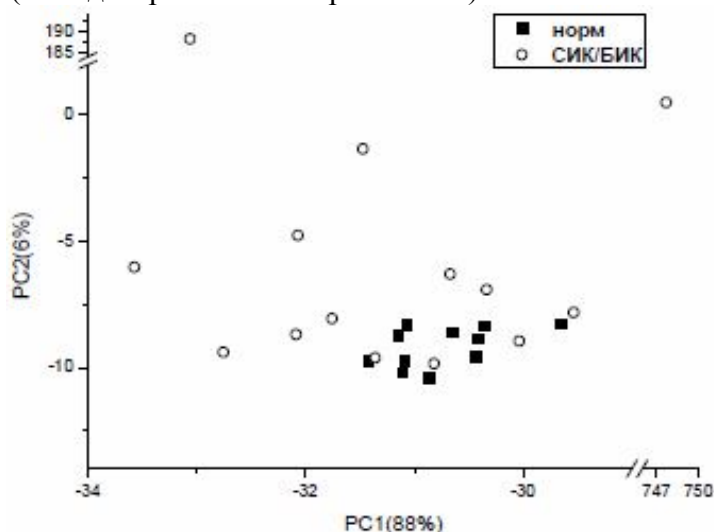


Рис. 3. График счетов образцов сыворотки крови (ВЭЖХ анализ) для парной МГК модели «норма-СИК/БИК»

Полученные результаты позволили предположить нам возможность получения аналогичных профилей в условиях ВЭТСХ. Получены и обработаны методом главных компонент стероидные профили образцов мочи пациентов с синдромом и болезнью Иценко-Кушенга и клинически здоровых доноров. Результаты проведенной обработки ВЭТСХ-хроматограмм представлены на рис. 4 - график счетов МГК-моделирования хроматографических сигналов в координатах первой-второй главных компонент.

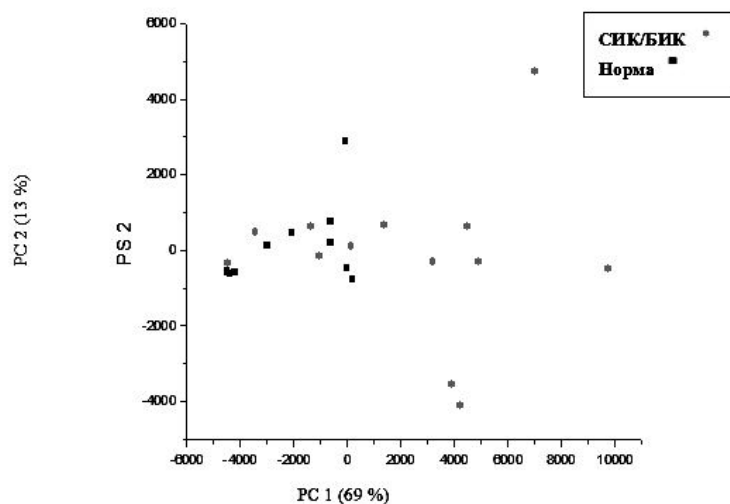


Рис. 4. График счетов образцов мочи (ВЭТСХ анализ) для парной МГК модели «норма-СИК/БИК»

Образцы класса «норм» формируют более компактный кластер по сравнению с образцами класса СИК. Дисперсия внутри класса «норм» гораздо ниже, чем в случае СИК. Однако, уверенно разделить кластеры на основании только МГК анализа не представляется возможным. Тем не менее, стоит отметить, что МГК в данном случае является просто способом представления структуры данных, а график счетов МГК – способом их визуализации.

Для дальнейшего анализа данных методом формального независимого моделирования аналогий классов построена модель МГК для класса «норм», и все остальные образцы были спроецированы на нее. По результатам такого проецирования четыре из тринадцати образцов класса СИК/БИК были ошибочно распознаны, как принадлежащий классу «норм». Все остальные - распознаны верно, как не принадлежащие классу «норм» при 5% уровне значимости (95% доверительной вероятности). Точность классификации составила 83%.

Несмотря на то, что имеющееся количество образцов представляет собой небольшую выборку, полученные результаты свидетельствуют о перспективности продолжения исследований в этой области.

Список литературы:

1. Карцова Л.А., Обьедкова Е.В. Хроматографические и электрофоретические профили биологически активных соединений для диагностики различных заболеваний // Журнал Аналитической химии. 2013. Т.68. №4. С.316.
2. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Обьедкова Е.В., Даванков В.А. Использование сверхсшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе

лекарств в биологических объектах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)// Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т. 10. Вып. 1. С. 5.

3. Esbensen K.H. Multivariate Data Analysis – in Practice, 5th edition. An Introduction to Multivariate Data Analysis and experimental Design / Oslo: Camo Software AS. 2010. 597 p.

4. Beebe K.R., Pell R.J., Seasholtz M.B. Chemometrics: a practical guide / New York: John Wiley & Sons. 348 p.

5. Daviss B. Growing pains for metabolomics // The Scientist. 2005. V. 19. P. 25.

6. Massart D.L. Chemometrics: a textbook / New-York: Elsevier. 1998.

7. Goicoechea H.C., Olivieri A.C. MULTIVAR. A program for multivariate calibration incorporating net analytesignal calculations // Trends Anal. Chem. 2000. V. 19. P. 599.

Карцова Людмила Алексеевна – д.х.н.,
проф. кафедры органической химии
Санкт-Петербургского государственного
университета, Санкт-Петербург, тел. (812) 428-
40-44

Объедкова Екатерина Валерьевна –
аспирант кафедры аналитической химии Санкт-
Петербургского государственного
университета, Санкт-Петербург

Кирсанов Дмитрий Олегович – доцент
кафедры радиохимии Санкт-Петербургского
государственного университета, Санкт-
Петербург

Гольшев Антон Александрович –
студент 5-го курса кафедры органической химии
Санкт-Петербургского государственного
университета, Санкт-Петербург

Kartsova Ludmila A. – Dr.Sc.Chem. the
professor of organic chemistry department of
chemical faculty, St. Petersburg state university, St.
Petersburg, email: kartsova@gmail.com

Obedkova Ekaterina V. – PhD student of
analytical chemistry department of chemical
faculty, St. Petersburg state university, St.
Petersburg, e-mail: obedkovaev@gmail.com

Kirsanov Dmitrii O. – docent of radiochemistry
St. Petersburg state university, St. Petersburg

Golishev Anton A. – five-year student of
organic chemistry department of chemical faculty,
St. Petersburg state university, St. Petersburg