Journal of Siberian Federal University. Chemistry 4 (2010 3) 408-412
~ ~ ~

УДК 615.357-07

Хромато-масс-спектрометрическое определение некоторых женских половых гормонов стероидного строения и их синтетических аналогов

Л.С. Соколова,
Е.Г. Струкова*, О.А. Дукова
Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia [1]

Received 3.12.2010, received in revised form 10.12.2010, accepted 17.12.2010

Показана возможность качественного и количественного определения некоторых женских половых стероидных гормонов и их аналогов в виде метиловых эфиров методом хромато-масс-спектрометрии. Рассчитаны пределы обнаружения исследуемых стероидных гормонов и их метиловых эфиров при использовании метода хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что после проведения реакции дериватизации предел количественного определения исследуемых веществ снижается в среднем в 3 раза.

Ключевые слова: женские половые гормоны стероидного строения, хромато-масс-спектрометрия, дериватизация, BSTFA.

Прогресс в области диагностики многих серьезных заболеваний базируется на развитии новых методологических подходов в химико-аналитической технологии. Так, хорошо известна чрезвычайно важная роль стероидных гормонов в биохимических процессах и патогенезе многих заболеваний. Диагностика заболеваний, связанных с нарушением синтеза и метаболизма стероидных гормонов в эндокринологии, гинекологии и онкологии, немыслима сегодня без определения содержания гормонов в организме. Постепенно возрастающее число больных бесплодием, которое часто связано с гормональными нарушениями, резко повышает актуальность проблемы, в том числе и в России. Именно поэтому в настоящее время интенсивно разрабатывают различные способы их определения в биоорганических субстанциях [1-3].

В анализе стероидов находят применение различные аналитические методы: хроматографические (включая газовую, жидкостную, колоночную и тонкослойную хроматографию), спектральные, электрохимические, иммунохимические и традиционные (весовые и титриметрические) [4-5]. Долгое время основным методом измерения содержания гормонов в крови был иммуноферментный метод анализа (ИФА) [6]. Однако после довольно длительного периода «всеобщего увлечения»

* Corresponding author E-mail address: helena_ter@mail.ru
[1] © Siberian Federal University. All rights reserved

определением гормонов в крови ИФА сегодня выявлены и серьезные недостатки этого метода, среди них:

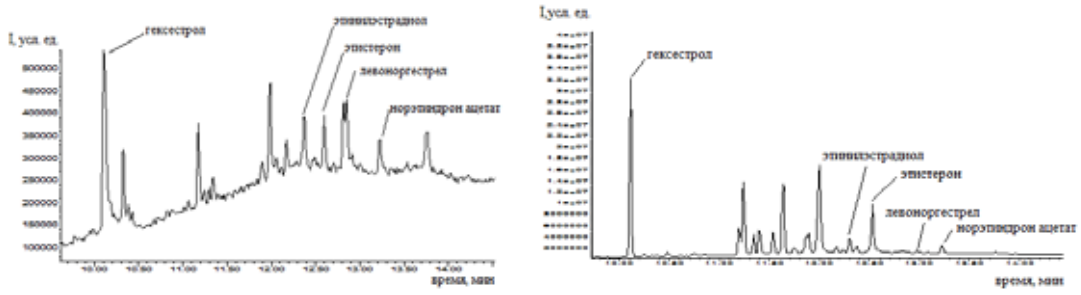
- моментальные колебания концентрации гормонов в крови, связанные с сиюминутным эмоциональным состоянием больного, циркадными ритмами или другими возможными физиологическими процессами в организме, приводящими к ложным выводам;
- недостаточная информативность метода, связанная с возможностью определения лишь некоторых гормонов из широкого спектра требуемых;
- значительные вариации нормативных показателей в зависимости от применяемой разновидности иммунологического метода, существенно снижающие достоверность и надежность интерпретации результатов;
- дорогостоящее аппаратурное оформление методологии;
- ассортимент доступных (особенно в условиях современной России) наборов реактивов, необходимых для использования с максимальной эффективностью данного метода, недостаточно широк, к тому же дороговизна и относительно небольшое время хранения таких реактивов накладывают дополнительные ограничения на их практическое применение. Хроматографические методы анализа лишены этих недостатков [7].

Ввиду вышесказанного целью данной работы является рассмотрение возможности определения некоторых гормонов хромато-масс-спектрометрическим методом анализа.

Материалы и методы. Таблетки гормонов (этинилэстрадиола, этистерона, гексестрола, норэтиндрон ацетата и левоноргестрела), каждую в отдельности, растворяли в 1 мл этилового спирта (96 %-го) при непрерывном перемешивании в течение 15 мин. Нерастворимые компоненты таблеток отфильтровывали через фильтр обеззоленный «Белая лента». Из полученных рабочих растворов готовили градуировочные растворы с концентрациями 50; 25; 10; 5; 1; 0,5 мкг/мл.

Дериватизация: в виалы помещали 0,5, 1, 5, 10, 25 мкл растворов гормонов в спирте с концентрацией 1 мг/мл, выпаривали досуха в токе теплого воздуха. К сухому остатку прибавляли по 50 мкл силилирующего агента БСТФА (N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид), выдерживали в термостате 30 мин при 80 ^{0}С. Далее пробы исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором (ГХ/МС).

Исследование спиртовых растворов гормонов и их производных осуществляли на газожидкостном хроматографе Agilent Technologies 7890 A с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5975 C. Колонка кварцевая HP-5MS 0,25мм × 0,25 мкм × 30 м (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана). Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1 мл/мин. Режим программирования температуры колонки: начальная температура термостата колонки 80 ^{0}С, выдержка при начальной температуре 1 мин, далее нагрев до температуры 200 ^{0}С со скоростью 40 ^{0}С/мин и до температуры 300 ^{0}С со скоростью 12,5 ^{0}С/мин, выдержка при конечной температуре 10 мин. Температура инжектора 250 ^{0}С. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока (Splitless); объем вводимой пробы 1 мкл. Ионизация электронным ударом (70 эВ). Время задержки растворителя 4,5 мин. Хромато-масс-спектрометрический анализ исследуемых растворов проводили по полному ионному току в режиме сканиро-



а б

Рис. 1. Хроматограммы смеси гормонов с=50 мкг/мл (а) и их ТМС-производных с=10мкг/мл (б), режим SCAN

вания (SCAN) в диапазоне масс от 50 до 600 а.е.м., в режиме мониторинга селективных ионов (SIM) по молекулярному иону анализируемого соединения.

Обсуждение результатов. В табл. 1 представлены экспериментально полученные времена удерживания для пяти стероидных гормонов.

В ходе работы рассчитали молекулярные массы триметилсилильных (ТМС) производных пяти анализируемых гормонов (табл. 2), расчет был подтвержден экспериментально, масс-спектры идентифицировали, используя коммерческие библиотеки NIST08, wiley07.

На рис. 1 представлены хроматограммы смеси пяти стероидных гормонов (а) и их ТМС-производных (б) в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 50 до 600 а.е.м.

Предел обнаружения и предел количественного определения для метода газовой хроматографии исследуемых гормонов, а также для их ТМС-производных установлены экспериментально и отражены в табл. 3 и 4 соответственно.

Таким образом, в предложенных условиях возможно качественное и количественное определение стероидных гормонов методом ГХ/МС. Показано, что с помощью реакции дериватизации можно снизить предел количественного определения исследуемых гормонов в среднем в 3 раза (в режиме SIM).

В ходе дальнейшей работы планируется разработка методик определения некоторых стероидных гормонов в биологических жидкостях, оптимизация процесса пробоподготовки, оценка степени извлечения и количественный расчет.

Таблица 1. Времена удерживания анализируемых гормонов

Название гормона	Брутто формула	Mr, г/моль	Время удерживания, мин
Гексестрол	$C_{18}H_{22}O_2$	270.40	10,1
Этинилэстрадиол	$C_{20}H_{24}O_2$	296.40	12,4
Этистерон	$C_{21}H_{28}O_2$	312.40	12,6
Левоноргестрел	$C_{21}H_{28}O_2$	312,12	12,8
Норэтиндрон ацетат	$C_{22}H_{28}O_3$	340,20	13,2

Таблица 2. Молекулярные массы ТМС-производных исследуемых гормонов

Название гормона	Mr ТМС-производного, г/моль
Гексестрол	414,0
Этинилэстрадиол	440,0
Этистерон	456,0
Левоноргестрел	384,0
Норэтиндрон ацетат	413,0

Таблица 3. Предел обнаружения и предел количественного определения стероидных гормонов без реакции дериватизации

Название гормона	Предел обнаружения, мкг/мл сигнал/шум = 3		Предел количественного определения, мкг/мл сигнал/шум = 10	
	SCAN	SIM	SCAN	SIM
Гексестрол	2	1	5	2
Этинилэстрадиол	25	5	50	15
Этистерон	10	5	25	15
Левоноргестрел	5	1,5	15	5
Норэтиндрон ацетат	10	5	25	15

Таблица 4. Предел обнаружения и предел количественного определения ТМС-производных стероидных гормонов

Название гормона	Предел обнаружения, мкг/мл сигнал/шум = 3		Предел количественного определения, мкг/мл сигнал/шум = 10	
	SCAN	SIM	SCAN	SIM
Гексестрол	1	0,5	3	1
Этинилэстрадиол	15	2,5	30	10
Этистерон	8	2	15	5
Левоноргестрел	2	0,5	7	1,5
Норэтиндрон ацетат	5	2	15	5

Список литературы

1. Герег Ш. Количественный анализ стероидов: Пер. с англ. / Ш.Герег. – М.: Мир, 1985.- 504 с.

2. Дедов И.И. Проблема химии гормонов и клиническая эндокринология / И.И.Дедов // Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева. – 2005. – Т.XLIX, №1. – С.8-10.

3. Антипов Е. Стероиды в жизни человека / Е.Антипов // The Chemical Journal. –2009.- С.39-41.

4. Карцова Л.А. Влияние организованных сред на хроматографическое и электрофоретическое определение лекарственных препаратов в биологических объектах / Л.А. Карцова, Е.Г. Стрельникова // Журн. аналит. химии. – 2009. – Т. 64, №2. – С 172-179.

5. Карцова Л.А. Определение стероидов в биологических объектах методом мицеллярной электрокинетической хроматографии / Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, №1. – С 76-84.

6. Долгов В.В. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях / В.В.Долгов, Н.Г. Ракова, В.Е. Колупаев, Н.С. Рытикова – М.-Тверь: Триада, 2007. – 320 с.

7. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов и др. – М.: Высш. шк. 1991. – 288 с.

Chromatography-Mass Spectrometry Determination Some of the Female Sex Hormones that Have the Steroid Structure and their Synthetic Analogues

Lidia S. Sokolova,
Elena S. Strukova and Olga A. Dukova
Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

It was shown the possibility of qualitative and quantitative determination of some of the female sex steroid hormones and their analogues in the form of methyl esters by the method of chromatography-mass spectrometry. It was calculated detection limits of investigated steroid hormones and their methyl esters using the method of gas chromatography-mass spectrometry. Found that after the derivatization's reaction the limit of quantification of these substances is reduced on average by 3 times.

Keywords: female sex hormones steroid structure, gas chromatography-mass spectrometry, derivatized, BSTFA.