

17-ГИДРОКСИКОРТИКОСТЕРОИДЫ Хроматография – спектрофотометрия PORTER-SILBER

КОД 11006 40 определений
Хранить при 15-30° С
Реагенты для измерения концентрации 17-Гидрохсикортикостероидов. Использовать только для работы «in vitro» в клинической лаборатории.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Образец обрабатывается каолином и пропускается через нейтральную адсорбционную смолу, в которой удерживаются 17-Гидрохсикортикостероиды (17-ГКС). Ненужные вещества удаляются промыванием и, затем, проводится количественное определение 17-ГКС спектрофотометрически с применением реакции Porter-Silber.

СОСТАВ

1 Реагент. 1x10 мл. Серная кислота 8 моль/л.
Едко (С): R3: Вызывает ожоги. S2637/39-45: в случае контакта с глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Предпочтительна работа в защитных перчатках, очках/маске. При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью.

2. Реагент. 1x90 мл. Натриевый фосфатный буфер 1 моль/л, рН 6,6, азид натрия 15 моль/л.

3. Реагент. 2x20 активированный каолин. 0,25 г.
Вредно (Х). S20/21/22: Опасно при вдыхании, контакте с кожей и глотании. S22. Не распылять. S24/25: Избегать контакта с кожей и глазами. S36/37/39 Предпочтительна работа в защитных перчатках, очках/маске.

4. Микроколонки. 2x20. Содержат предварительно взвешенное количество нейтральной смолы в буфере.

А. Реагент. 3x55 мл. Серная кислота 15 моль/л.
Едко (С): R3: Вызывает ожоги. S2637/39-45: в случае контакта с глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Предпочтительна работа в защитных перчатках, очках/маске. При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью.

В. Реагент. 2 для 55 мл порошок фенилгидразина 6 ммоль/л после восстановления.

Токсично (Т): Опасно для окружающей среды (N): R23/24/25-36/38-43-45-48/23//24/25-50-68: Токсично при вдыхании, контакте с кожей и глотании. Едко для глаз и кожи. Может вызывать раздражение при контакте с кожей. Канцерогенно. Токсично: опасность серьезных нарушений здоровья при длительном воздействии при вдыхании, контакте с кожей и глотании. Очень токсично для водных организмов. Возможный риск необратимых эффектов. S 45-53-61: При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью. Избегайте распыления вещества – следуйте инструкции по применению перед использованием. Избегайте попадания вещества во внешнюю среду. Обратитесь к специальным инструкциям/Листам безопасности.

S. Стандарт. 1x5 мл. Кортизол 1000 мг/л = 2770 мкмоль/л в этаноле.

Легковоспламеняемый (F): R11: Легковоспламеняем. S7 -16: Держите контейнер плотно закрытым. Держите далеко от источников пламени – Не курить.

ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре 15 – 30° С.

Реагенты и стандарт хранить до срока годности, указанного на этикетке при хранении плотно закрытыми и предотвращении загрязнения во время использования

Показатели загрязнения:

- Реагенты: Присутствие взвешенных частиц или мутность, ΔА бланка реагента свыше 0,900 (1 см кювета)
- Микроколонки: Отсутствие буфера выше верхнего фильтра колонки.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

- Безводный этанол (ч.д.а)
- Растворитель для элюции: разведенный безводный этанол по следующей методике: 70 мл этанола + 30 мл дистиллированной воды

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Рабочий реагент. Осторожно постучать по флакону с Реагентом В для осаждения порошка на дно. Открыть крышку и добавить содержимое во флакон с реагентом А. Закрыть крышку и встряхнуть до полного растворения. Раствор стабилен в течение 4 месяцев при 2 – 8° С в темноте.

Рабочий стандарт. Развести стандарт 17-ОН (S) 1/6 с этанолом (1 мл 17-ОН стандарта + 5 мл этанола). Стабильно 2 месяца при 2 – 8° С.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Спектрофотометр для измерений при 370, 410 и 450 нм.
- Водяная термобаня
- Настольная центрифуга

ОБРАЗЦЫ

Моча. Суточная моча, собранная по стандартной процедуре.

Хранить при 2 – 8° С. И использовать в течение 24 часов. Образцы могут храниться при 2 – 8° С максимально 7 дней или 1 месяц при -20° С, если довести рН до 3-6 концентрированной соляной кислотой (HCl). Перед использованием мочу следует отцентрифугировать или профильтровать.

ПРОЦЕДУРА

Приготовление образца

1. Добавить в одноразовую пробирку Реагент (3):

Образец	5,0 мл
Реагент (3)	2 капли

2. Перемешивать не менее 3 минут и затем поставить центрифугировать на 4000 об/мин в течение 5 минут.
3. Отобрать супернатант в центрифужную пробирку и добавить

Реагент (2)	2,0 мл
-------------	--------

4. Перемешать и центрифугировать на 4000 об/мин в течение 5 минут.

Хроматографическое разделение

5. Удалить верхнюю крышку колонки, а затем откройте нижний конец колонки. Используя закругленный конец пипетки, опустите верхний диск на поверхность смолы, избегая сильного давления. Дайте колонке полностью стечь.
6. Перенести супернатант из центрифужной пробирки в колонку и дайте колонке полностью стечь.
7. Добавить в колонку (примечание 1)

Дистиллированная вода	10,0 мл	Дайте колонке полностью стечь
Растворитель элюции	6,0 мл	Соберите элюат

Колориметрия

8. Перемешать элюат и налить в промаркированные пробирки с закручивающимися крышками.

Реагент	Стандарт	Образец	Образец
Бланк		Бланк	
Элюат	-	-	1,0 мл
Рабочий стандарт	-	0,1 мл	-
Растворитель элюции	1,0 мл	0,9 мл	-

9. Поставить пробирки на лед и осторожно добавить

Реагент (А)	-	-	1,0	-
Рабочий реагент	1,0 мл	1,0 мл	-	1,0 мл

10. Тщательно перемешать пробирки несколько раз и вновь поставить на лед для предохранения от перегрева.
11. Закрывать пробкой пробирки и поставить инкубировать на 15 минут при 60° С или 90 минут при 37° С.
12. Охлаждать пробирки до комнатной температуры (15 – 30° С) и измерить абсорбцию (А) образца и стандарта при 370, 410, 450 нм против Бланка образца и Реагент Бланка соответственно.

РАСЧЕТ

Концентрация 17-ГКС в образце рассчитывается по следующим формулам:

$$\frac{A_{\text{образца}}}{A_{\text{стандарта}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{SIC}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{C_{\text{st}}} \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{образца}}$$

ΔA рассчитывается с применением коррекции Аллена²:

$$\Delta A = 2 \times A_{410} - (A_{370} + A_{450})$$

Принимая во внимание, что объем образца (V_S) 5 мл, объем элюата (V_E) 6 мл, объем элюата для колориметрии (V_{EC}) 1 мл, объем стандарта в колориметрии (V_{SIC}) 0,1 мл, концентрация стандарта (C_{st}) 166,7 мг/л или 461,7 мкмоль/л (разведение стандарта 1/6), значение воспроизводимости (Rec) 0,664, для расчета концентрации может использоваться следующая формула:

$A_{\text{образца}}$	$\times 30,1 = \text{мг/л 17-ОН}$
$A_{\text{стандарта}}$	$\times 83,4 = \text{мкмоль/л 17-ОН}$

Количество 17-ОН в суточной моче рассчитывается по следующей формуле:

мг/л 17-ОН	$\times V_{\text{мочи/24 часа}} (\text{Л})$	мг /24 часа
мкмоль/л 17-ОН		мкмоль/л /24 часа

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Женщины: 2 – 8 мг/24 часа = 5,5 – 22.2 мкмоль/24 часа
Мужчины: 3 – 10 мг/24 часа = 8,3 – 27.7 мкмоль/24 часа
Данные величины ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать Контрольную мочу (код 18036, 18037) для верификации измерительных процедур
Каждая лаборатория должна выработать собственную схему внутреннего контроля качества и процедуры для коррекции действий в случае, если контроль качества не укладывается в приемлемые диапазоны.

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Предел обнаружения: 1.3 г/л = 3.4 ммоль/л.
- Предел линейности: 72 г/л = 200 ммоль/л. Для более высоких значений следует развести образец дистиллированной водой 1/2 и повторить измерение.
- Сходимость (внутри серии):

Средняя концентрация	CV	n
2.8 мг/л=7.8 мкмоль/л	9.3%	25
10.5 мг/л=29.0 мкмоль/л	9.7%	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
2.8 мг/л=7.8 мкмоль/л	11.2%	25
10.5 мг/л=29.0 мкмоль/л	9.1%	25

Чувствительность:

$$11,6 \text{ мА} \cdot \text{л/мг} = 4.19 \text{ мА} \cdot \text{л/мкмоль}$$

- Достоверность: Результаты, полученные с образцами с добавлением 17-ОН не показывали значительных отличий при сравнении с теоретически рассчитанными результатами. Детали сравнительных экспериментов доступны по требованию.
- Интерференция: Некоторые вещества и лекарства могут исказить результат⁴.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

17-Гидрооксикортикостероиды являются производными продуктами стероидных гормонов при метаболизме кортизола, характеризующимися наличием гидроксильной группы в 17 положении углерода. 17-Гидрооксикортикостероиды продуцируются в печени и выводятся с мочой.

Количество 17-ОН в моче является показателем количества кортизола, выделяемого корой надпочечников в кровь.

Повышенные уровни 17-Гидрооксикортикостероидов находят при синдроме Кушинга, как результат опухоли надпочечников, питуитарных опухолей, эктопических опухолей и других случаях, таких как ожирение, гипертония и беременность^{3,5}.

Пониженные уровни выявляются при болезни Адисона^{3,5}.

Клинический диагноз не должен основываться только лишь на результатах единичного теста, а должен устанавливаться на основе как клинических, так и лабораторных данных.

ПРИМЕЧАНИЕ

1. Процедуру можно прервать в данном пункте. Хранить закрытые пробирки следует при 2-8° С в течение максимум 3 дней.

БИБЛИОГРАФИЯ

2. Ariyoshi Y, Osawa Y. Improved Assay for Urinary 17-Hydroxycorticosteroids. *Clin Chem* 1976; 22:232-234.
3. Allen, W. M A simple method for analyzing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocrinol.* 1950; 10: 71-75
4. Tietz NW. clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997