

17-КЕТОСТЕРОИДЫ

Хроматография- спектрофотометрия ZIMMERMANN

КОД 11002 40 определений
Хранить при 15-30° С
Реагенты для определения концентрации 17-кетостероидов. Использовать только для работы «in vitro» в клинической лаборатории

ПРИНЦИП МЕТОДА

Проба подвергается кислотному гидролизу, и пропускается через нейтральную смолу, где 17-КС удерживаются. Водорастворимые и фенольные субстанции удаляются отмыванием, а 17-КС элюируются и определяются количественно с помощью реакции Zimmermann^{1,2}.

СОСТАВ

1. Реагент. 1 x 5 мл. Гексаметилентетрамин 0,7 моль/л, азид натрия 0,5 г/л.

Вредный(Хп): R42/43: Вызывает раздражение при вдыхании и контакте с кожей. S18-24-28.1: Держать и открывать контейнер осторожно. Предохраняйте кожу от контакта. При попадании на кожу немедленно промойте большим количеством воды.

2. Реагент. 1x500 мл. Гидроксид калия 1 моль/л в этаноле 3,4 моль/л.

Едко (С): R35: Может вызывать ожог. S26-36/37/39-45: в случае контакта с глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Пользуйтесь защитной одеждой, перчатками, очками/маской. При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью.

3. Реагент. 1 x 250 мл ангидрид этанола 99% (аналитическая степень/ч.д.а).

Легковоспламеняемый (F): R11: Легковоспламеняем. S7: Держите контейнер плотно закрытым. S16: Держите далеко от источников пламени – Не курить.

4. Микроколонки. 2x20 Содержат забуференную нейтральную смолу. **11208 2**

А. Реагент. 2 x 20 мл. m-Динитробензон, порошок, 60 ммоль/л в этаноле, после разведения.

Очень токсично (Т+), опасно для окружающей среды (N): R26/27/28-33-50/53: Очень токсично при вдыхании, контакте с кожей и глотании. Опасен для водных организмов, может вызвать эффект накопления в водной среде. S28.1-36/37-45-60-61: в случае контакта с кожей немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Пользуйтесь защитной одеждой, перчатками, очками/маской. При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью. Материал и/или контейнер должен утилизироваться как опасные отходы. Избегать попадания в окружающую среду. Следовать специальным инструкциям/предписаниям безопасности.

В. Реагент. 1 x 90 мл. Гидроксид калия 9 моль/л. *Едко (С): R22-35: Опасен при глотании. Может*

вызывать ожог. S26-36/3739-45: в случае контакта с глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Пользуйтесь защитной одеждой, перчатками, очками/маской. При несчастном случае или недомогании немедленно обратитесь за медицинской помощью.

С. Реагент. 1 x 230 мл. Дихлорметан 99%.

Вредно (Хп): R40: Возможен риск необратимых эффектов. Предохраняйте кожу и глаза от контакта. Пользуйтесь защитной одеждой, перчатками.

С. Стандарт. 1 x 5 мл Дегидроэпиандростерон (ДГЭА). 1000 мг/л = 3470 мкмоль/л, этанол. Первичный стандарт.

Легковоспламеняемый (F): R11: Легковоспламеняем. S7: Держите контейнер плотно закрытым. S16: Держите далеко от источников пламени – Не курить

ХРАНЕНИЕ

Хранить при 15-30°С

Реагенты и Стандарт ДГЭА стабильны до срока годности, указанного на этикетке при хранении плотно закрытыми и предотвращении загрязнения во время использования.

Показатели ухудшения свойств:

- Реагент: присутствие взвешенных частиц, мутность, абсорбция бланка реагента свыше 0,075 при 520 нм
- Микроколонки (4): Отсутствие буфера, покрывающего верхний диск.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКТИВЫ

- Концентрированная соляная кислота (в аналитической степени)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТА

Реагент А. Растворить сухой порошок в 20 мл Реагента 3. Стабилен 2 месяца при 2-8°С.

Токсично (Т), Легковоспламеняем (F): R11: Легковоспламеняем: R23/24/25: Токсичен при вдыхании, контакте с кожей и глотании. R52/53: Опасен для водных организмов, может вызвать эффект накопления в водной среде. Держать контейнер плотно закрытым. S16: Держите далеко от источников пламени – Не курить. S28.1-37-45: в случае контакта кожей немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Пользуйтесь защитной одеждой, перчатками, очками/маской. При несчастном случае

или недопомогани немедленно обратитесь за медицинской помощью

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Спектрофотометр или фотометр с фильтром 520 нм (515 – 525).
- Водяная термобаня
- Кипящая водяная баня
- Настольная центрифуга

ОБРАЗЦЫ

Моча. Суточная моча, собранная по стандартной процедуре.

Хранить при 2 – 8°C и использовать в течение 24 часов. Стабильность образца не более 15 дней при 2 – 8°C или 1 месяц при -20°C в случае, если их pH довести до 3-6 концентрированной соляной кислотой (HCl). Перед определением мочу следует отцентрифугировать или профильтровать.

ПРОЦЕДУРА

Гидролиз образца

1. Налить в пробирку

Образец	5,0 мл
Концентрированная HCl	1,0 мл
Реагент 1	1 капля

2. Тщательно перемешать и инкубировать пробирку в кипящей водяной бане в течение 10 минут. Затем охладить пробирку под проточной водой (примечание 1).

Хроматографическое разделение

3. Снять крышку с верхней части колонки и затем открыть нижнюю часть колонки. С помощью закругленного конца пипетки, опустить верхний диск к поверхности смолы, стараясь не оказывать давления. Дать колонке полностью стечь.
4. Налить содержимое пробирки (гидролизированный образец) в колонку и дать стечь.
5. Добавить в колонку:

Дистиллированная вода	2,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Реагент (2)	10,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Дистиллированная вода	2,0 мл	Дать колонке полностью стечь
Реагент (3)	4,0 мл	Собрать элюат

6. Тщательно перемешать элюат.

Колориметрия

7. Налить в подписанные пробирки с закручивающимися крышками:

	Бланк	Стандарт	Образец	
Элюат	-	-	-	1,0 мл
Реагент (3)	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл	-
Стандарт ДГЭА	-	25 мкл	-	-
Реагент (A)	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Реагент (B)	1,5 мл	1,0 мл	1,5 мл	1,5 мл

8. Тщательно перемешать, закрыть и инкубировать 25 минут при 25°C или 60 минут при 2-8°C. Затем добавить:

Реагент (C)	2,5 мл	2,5 мл	2,5 мл
-------------	--------	--------	--------

9. Тщательно перемешать и центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 минут.

10. Измерить абсорбцию (A) верхней фазы Образца и Стандарта против Бланка при 520 нм (примечание 2 и 3).

РАСЧЕТ

Концентрацию 17-кетостероидов в образце можно рассчитать по следующей общей формуле:

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

Принимая во внимание, что объем образца (V_S) 5 мл, объем элюата (V_E) 4 мл, объем элюата для колориметрии (V_{EC}) 1 мл, объем стандарта в колориметрии (V_{SIC}) 0,025 мл, концентрация стандарта (C_{st}) 3470 мкмоль/л или 1000 мг/л, значение воспроизводимости (Rec) 0,88, для расчета концентрации может использоваться следующая формула:

$\frac{A_{\text{образца}}}{A_{\text{стандарта}}}$	$\times 22,7 = \text{мг/л 17-КС}$
$\times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{SIC}}{V_{EC}} \times \frac{1}{C_{st} \times Rec}$	$\times 78,9 = \text{мкмоль/л 17-КС}$

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

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

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Женщины: 6-14 мг/24 часа = 21-49 мкмоль/24 часа
 Мужчины: 10-25 мг/24 часа = 35-87 мкмоль/24 часа
 Данные величины ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать Контрольную мочу (код 18036) 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: 2,85 мг/л = 9,9 мкмоль/л.
- Предел линейности: 173 мг/л = 600 мкмоль/л. Для более высоких значений следует развести образец дистиллированной водой 1/2 и повторить измерение.
- Сходимость (внутри серии):

Средняя концентрация	CV	n
4,32 мг/л=15 мкмоль/л	5,2%	25
25,65 мг/л=89 мкмоль/л	6,6%	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
4,32 мг/л=15 мкмоль/л	4,0%	25
25,65 мг/л=89 мкмоль/л	6,0%	25

- Чувствительность:
 $12,25 \text{ мА} \cdot \text{л/мг} = 3,52 \text{ мА} \cdot \text{л/мкмоль}$.

- Достоверность: Результаты, полученные с данными реагентами при добавлении 17-КС не показывали значительных отличий от теоретических концентраций. Детали сравнительных экспериментов доступны по требованию.
- Интерференция: Некоторые вещества и лекарства могут искажать результат⁴.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

17-Кетостероиды являются метаболитами предшественников, секретируемых надпочечниками, яичками и яичниками. Они характеризуются присоединением кетогруппы к углероду в 17 положении и экскретируются с мочой. У мужчин около 2/3 общих 17-КС мочи имеют надпочечниковое происхождение, в то время как у женщин практически все количество 17-КС секретируется надпочечниками. Измерение этих стероидных метаболитов используется при избытке продукции надпочечников андрогенов.

Уменьшение величин 17-КС обычно обнаруживается у мужчин с первичным гипогонадизмом (Синдром Клайнфельтера, кастрация), вторичным гипогонадизмом (пангипопитуитаризм) и у женщин с питуитарным гипoadренализмом (Болезнь Аддисона)⁵. Увеличение продукции 17-КС выявляется у пациентов с опухолями гонад (опухоли интерстициальных клеток, хорионэпителиома), гиперплазией надпочечников, карциномой надпочечников, Синдромом Кушинга и у некоторых женщин с гирсутизмом⁵.

Клинический диагноз не должен основываться только лишь на результатах единичного теста, а должен

устанавливаться на основе как клинических, так и лабораторных данных.

ПРИМЕЧАНИЕ

1. Отцентрифугируйте гидролизированный образец, если он содержит большое количество преципитатов (аналогично и Контроль мочи).
2. Если окажется, что верхняя фаза стала мутной, удалите ее и добавьте щепотку безводного сульфата натрия. Взболтайте и центрифугируйте.
3. Иногда может появляться в конце экстракции некоторых образцов темно-коричневая окраска, что приводит к ложно завышенным результатам. Когда это происходит, необходимо скорректировать абсорбцию образца, применяя коррекцию Тальбота: $A_{кор.} = (A_{520} - 0,6 \times A_{430})/0,73$

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bradlow HL. Extraction of steroid conjugates with a neutral resin. Steroids 1968; 11: 265-272
2. Zimmermann W. Z Eine Fabreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung. Physiol Chem 1935; 233:257-264.
3. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACCC Press, 1995
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACCC Press, 1997