

Комплексное определение профиля свободных и связанных эстрогенов методом капиллярного электрофореза времяпролетной масс-спектрометрии

Методическая информация

Клинические испытания

Авторы

Наоми Куэнбаум (Naomi Kuehnbaum) и
Филип Бриц-Маккиббин
(Philip Britz-McKibbin)
Факультет химии и химической
биологии Университета Макмастер,
Гамильтон, Канада

Джули Марр (Julie Marr)
и Дон Стикл (Dawn Stickle)
Agilent Technologies, Inc.
Уилмингтон, Делавэр

Введение

Биодоступность и биологическая активность эстрогенов строго контролируется процессами метаболической трансформации (фаза I/II), связанными с гидрокселированием, глюкуронидацией или сульфатированием, которые крайне важны для здоровья, развития и фертильности человека. Клинические данные все более свидетельствуют о том, что хроническое влияние различных диет, фармакологических и экологических факторов может приводить к изменениям в метаболизме эстрогена или экспрессии рецепторов эстрогена в клетках, тем самым повышая риск возникновения рака. Однако не существует специфичной, чувствительной и в то же время надежной методологии всестороннего определения профиля эстрогена, учитывая широкий динамический диапазон и химическое разнообразие эндогенных и экзогенных метаболитов эстрогена, присутствующих в сложных биологических жидкостях, таких как моча [1].



Agilent Technologies

Экспериментальная часть

Стандартные вещества и реактивы

Двенадцать стандартных образцов эстрогена были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США).

- Пять глюкуронидных конъюгатов:
 - эстрон-3-глюкуронид (E_13G)
 - 17 β -эстрадиол-3-глюкуронид (E_23G)
 - β -эстрадиол-17-глюкуронид (E_217G)
 - эстриол-3-глюкуронид (E_33G)
 - эстриол-16-глюкуронид (E_316G)
- Три сульфатных конъюгата:
 - эстрон-3-сульфат (E_13S)
 - β -эстрадиол-3-сульфат (E_23S)
 - эстриол-3-сульфат (E_33S)
- Четыре свободных эстрогена:
 - эстрон (E_1)
 - эстрадиол (E_2)
 - 16-этинилэстрадиол (EE_2)
 - эстриол (E_3)

Базовые растворы с концентрациями 3–15 мМ готовили разведением в смеси метанола и воды (1:1) и хранили при $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Креатинин, мочевиная кислота, хлорид натрия, мелатонин и ГЭПЭС также были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Базовые растворы с концентрацией 10 мМ готовили разведением в воде и хранили при $4\text{ }^\circ\text{C}$. Растворы стандартных образцов эстрогена, содержащие 15 мМ хлорида натрия, 1 мМ креатинина, 500 мкМ мочевиной кислоты, 150 мкМ мелатонина (маркера электроосмотического потока) и 150 мкМ ГЭПЭС (внутренний стандарт), готовились с использованием матрицы, имитирующей мочу. Бикарбонат аммония (Sigma Aldrich Inc.) приготавливали в виде базового водного раствора с концентрацией 500 мМ и использовали в качестве фонового электролита для разделения как по границе обволакивающей жидкости, так и капиллярным электрофорезом (КЭ). Все базовые растворы и обволакивающую жидкость готовили с использованием метанола для ВЭЖХ (Caledon Labs, Джорджтаун, Онтарио, Канада). Все водные буферы и базовые растворы готовили с использованием воды, очищенной с помощью системы ультраочистки воды Thermo Scientific Barnstead EasyPure II LF (Cole Parmer, Вернон Хиллс, штат Иллинойс, США).

Оборудование

Для всех экспериментов по методу КЭ-времяпролетной МС с ионизацией электроспреем использовалась система КЭ Agilent G7100A (Миссиссага, Онтарио, Канада), оснащенная электрораспылительным источником ионизации с коаксиальным интерфейсом обволакивающей жидкости и ортогональным времяпролетным масс-спектрометром для ЖХ-МС Agilent 6224 (Миссиссага, Онтарио, Канада). В качестве газа, поступающего в распылитель при ионизации электроспреем, и в качестве осушающего газа для МС применяли азот. Использовались системное ПО 3D-CE ChemStation (для КЭ) и Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition (для времяпролетной МС). Обработка

данных проводилась с помощью ПО MassHunter для качественного и количественного определения. Вся обработка данных, составление электрофореграмм и разработка моделей поверхности отклика проводилась с помощью программы Igor Pro 5.0 (Лейк Освего, штат Орегон, США).

Параметры КЭ-времяпролетной МС с ионизацией электроспреем

Во всех экспериментах использовали капилляр из немодифицированного плавленого кварца (Polymicro Technologies, штат Аризона, США) с внутренним диаметром 50 мкм и длиной 85 см, при температуре $20\text{ }^\circ\text{C}$. Если не указано иное, условия экспериментального плана были следующими:

- В качестве фонового электролита использовали буфер бикарбоната аммония 50 мМ, приведенный к pH 9,5 посредством гидроксида аммония.
- Пробу вводили при давлении 50 мбар в течение 5 секунд (приблизительно 5 нл), при этом подавалось напряжение 20 кВ.
- Обволакивающая жидкость представляла собой раствор бикарбоната аммония 5 мМ в смеси метанола и воды (80:20), скорость потока составляла 14 мкл/мин.
- Масс-спектрометр работал в режиме регистрации отрицательных ионов со следующими параметрами: напряжение на ионизирующем наконечнике в ионном источнике $-4,0\text{ кВ}$, температура осушающего газа $300\text{ }^\circ\text{C}$, скорость потока осушающего газа 4 л/мин, а скорость подачи газа в распылитель 10 л/мин.
- Настройки МС для экстракции ионов следующие: фрагментационная ячейка = -145 В , скиммер = -65 В и пиковое РЧ-напряжение 1 окт. = 750 В .
- Сканирование проводилось в диапазоне m/z 50–1100 с 6800 переходами/скан.
- Пурин и гексакис-(2,2,3,3-тетрафторпропоксид)-фосфазин (HP-0921) вводили в обволакивающую жидкость с концентрацией 0,02% (об.) и получали ионы сравнения с m/z 119,03632 и 981,9956 соответственно, используемые для коррекции по внутренней массе, при этом в большинстве случаев точность определения массы $< 2\text{ млн д}$.

Экспериментальный план

Экспериментальный план использовался, чтобы определить оптимальные условия ионизации электроспреем для максимально эффективной ионизации свободных эстрогенов и их анионных конъюгатов. Оптимизация проводилась с учетом трех факторов: напряжение на входе в капилляр (2,5–5,0 кВ), составляющая метанола в обволакивающей жидкости (40–80%) и скорость потока обволакивающей жидкости (4–20 мкл/мин), — поскольку они оказывают значительное влияние на стабильность спрея в случае коаксиально расположенного интерфейса обволакивающей жидкости, что влияет на эффективность разделения и чувствительность к концентрации в КЭ-МС из-за возможного всасывания и послекапиллярного разбавления соответственно [1]. Для систематической максимальной регистрируемости эстрогена

был разработан двухуровневый трехфакторный (± 1) (что соответствует 2^3) центральный композиционный план с шестью осевыми ($\pm 1,7$) и пятью центральными (0) условиями; общее число экспериментов было равно 20 [2]. Оценка откликов E_3 , $E_3\text{3S}$ и $E_3\text{3G}$ проводилась путем вычисления абсолютных площадей пиков или соотношений «сигнал — шум» (С/Ш) этих ионов в каждом эксперименте. Множественная линейная регрессия матрицы данных выполнялась с помощью программы Excel (Microsoft Inc., Редмонд, штат Вашингтон, США) и использовалась для построения эмпирической модели на основе трех главных факторов и их взаимодействий. Эта модель итерационно уточнялась путем исключения незначительных переменных ($P < 0,05$), которые практически не влияли на прогностическую точность в целом, о чем свидетельствуют изменения значения R^2 . Затем оптимизированные модели использовались для построения 3D-графиков поверхности отклика в экспериментальном пространстве для трех метаболитов эстриола. Были определены оптимальные параметры для максимального увеличения обнаружения эстрогена: напряжение на входе в капилляр равно $-4,0$ кВ, объемная доля метанола в обволакивающей жидкости — 80% и скорость потока обволакивающей жидкости — 14 мкл/мин.

Молекулярное моделирование и прогнозирование относительных времен миграции

Молекулярный объем (МО) рассчитывали как исключенный объем растворителя по методу Коннолли, после минимизации энергии с использованием метода молекулярной механики (ММ2) в ПО Chem3D Ultra 8.0. Значения rK_a для эстрогенов были взяты из справочника [3]. Они использовались для определения $Z_{эфф}$ в фоновом электролите (рН 9,5) с помощью уравнения Гендерсона — Гассельбаха. На основе этих двух физико-химических параметров (МО и $Z_{эфф}$) была построена модель относительного времени миграции (ОВМ) для 12 метаболитов эстрогена (обучающий набор) с использованием множественной линейной регрессии (МЛР) [4]. Затем была выполнена 12-кратная перекрестная проверка с произвольным выбором метаболита эстрогена (тестовый набор) для оценки общей устойчивости модели. Прогностическую точность модели оценивали по корреляции коэффициентов детерминации (R^2) для обучающего набора, средней корреляции коэффициентов детерминации для тестового набора (Q^2) и значений среднего абсолютного смещения прогнозируемого ОВМ относительно среднего ОВМ ($n = 30$), экспериментально измеренных методом КЭ-времяпролетной МС.

Сбор мочи и предварительная подготовка образца

Образцы мочи были взяты у трех здоровых женщин-добровольцев, которые не принимали систематически лекарства и которые предоставили письменное информированное согласие перед началом исследования. Образцы мочи собирали в стерильные емкости и до анализа хранили при -80 °С. Недавнее исследование показало, что конъюгаты эстрогена имеют превосходную долговременную стабильность, если образцы мочи хранятся в замороженном виде без добавления химических консервантов [5]. Образцы мочи центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 150g, затем анализировали непосредственно надосадочную

жидкость методом КЭ-времяпролетной МС после 10-кратного разведения в деионизированной воде. Надосадочную жидкость обработали также методом твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием патронов Oasis HLB (Waters Inc., Милфорд, США) с вакуумным коллектором. Протокол для ТФЭ человеческой мочи был составлен на основе недавней публикации Кин (Qin) и др. [6] с некоторыми изменениями, чтобы концентрированный растворитель был пригоден для анализа методом КЭ-времяпролетной МС. Перед экстракцией патрон HLB предварительно кондиционировали 1,0 мл метанола, а затем 1,0 мл воды и 1,0 мл водной ортофосфорной кислоты (0,3%, об.). 5,0 мл аликвоты надосадочной мочи смешали с 5,0 мл водной ортофосфорной кислоты (0,3%, об.), а затем поместили в патрон HLB. После загрузки образца патрон промывают 1,0 мл воды, а затем 1,0 мл смеси метанола, воды и уксусной кислоты (60:40:2 об.). Элюирование аналитов проводили с использованием 1,0 мл метанола без добавления 2% гидроксида аммония [6], который, как выяснилось, чрезмерно размывает полосу конъюгатов эстрогена вследствие электрокинетической дисперсии при КЭ-времяпролетной МС. Растворитель выпарили досуха в потоке азота при 50 °С, а полученный остаток растворили в 40 мкл смеси ацетонитрила и воды (75:25 об.), содержащей 50 мМ ГЭПЭС в качестве внутреннего стандарта. После загрузки 5,0 мл мочи и последующего доведения до 40 мкл эффективная концентрация эстрогенов в моче увеличилась приблизительно в 125 раз, показав хорошую степень извлечения в диапазоне 90–110% при использовании колонок HLB.

Калибровка метода и валидация анализа

Калибровочные стандарты готовили как стандарты в матрице, имитирующей мочу (15 мМ хлорида натрия, 1 мМ креатинина, 500 мкМ мочевого кислоты), на шести уровнях при 100-кратном концентрировании в диапазоне от 0,5 до 50 мкМ, используя 50 мкМ ГЭПЭС в качестве внутреннего стандарта, чтобы повысить прецизионность количественного определения, показателем которой является относительная площадь пика (ОПП), и улучшить идентификацию метаболита, показателем которой является относительное время миграции (ОВМ), для содержащихся в моче метаболитов. Это необходимо для корректировки долговременного дрейфа в источнике ионизации и случайных изменений в электроосмотическом потоке при использовании КЭ и времяпролетной МС соответственно [4]. Эффект ионной супрессии исследовали путем сравнения чувствительности (которой соответствует наклон калибровочной кривой) трех стандартов эстрогена (E_1 , $E_1\text{-3G}$, $E_1\text{-3S}$), приготовленных в имитирующих мочу растворах, и меченых стандартов в образцах подлинной мочи, которые были взяты у трех женщин-добровольцев в пременопаузе и затем 10-кратно разбавлены в деионизированной воде. Внутрисуточную воспроизводимость определяли путем повторных измерений стандартов эстрогена в имитирующих мочу образцах на трех различных уровнях концентрации (1, 5 и 15 мкМ), чтобы определить воспроизводимость метода ($n = 30$). Пределы обнаружения (С/Ш ≈ 3) и пределы количественного определения (С/Ш ≈ 10) для конъюгатов эстрогена определяли исходя из наклона калибровочной кривой и фонового шума, измеренного при соответствующих каждому иону значениях m/z .

Этическое одобрение

Данное исследование, включающее получение образцов мочи у женщин-добровольцев, получило одобрение Комитета по этике проведения исследования Университета Макмастер.

Таблица 1. Идентификация эстрогенов методом КЭ-времяпролетной МС на основе точно измеренной массы и относительного времени миграции (ОВМ), которое можно с большой точностью прогнозировать по двум физико-химическим свойствам, присущим конкретному иону.

Метаболиты эстрогена	Измеренные ОВМ ^а	m/z [М-Н] ⁻	$-z_{\text{эфф}}^{\text{б}}$ (рН 9,5)	МО ^с (ГЗ)	Прогнозируемые ОВМ ^г	Смещение (%)
Эстрадиол (E ₂)	0,687 ± 0,002	271,1704	0,11	262	0,692	+0,68
Этинилэстрадиол (EE ₂)	0,687 ± 0,002	295,1704	0,21	283	0,668	-2,74
Эстриол (E ₃)	0,688 ± 0,001	287,1653	0,13	268	0,692	+0,52
Эстрон (E ₁)	0,691 ± 0,002	269,1547	0,14	257	0,710	+2,74
Эстриол-3-глюкуронид (E ₃ 3G)	0,861 ± 0,005	463,1974	1,00	401	0,848	-1,49
Эстрадиол-3-глюкуронид (E ₂ 3G)	0,865 ± 0,001	447,2024	1,00	396	0,855	-1,16
Эстриол-16-глюкуронид (E ₃ 16G)	0,880 ± 0,001	463,1974	1,13	395	0,906	+2,98
Эстрон-3-глюкуронид (E ₁ 3G)	0,884 ± 0,001	445,1868	1,00	391	0,862	-2,54
Эстрадиол-17-глюкуронид (E ₂ 17G)	0,887 ± 0,002	447,2024	1,14	393	0,913	+2,90
Эстриол-3-сульфат (E ₃ 3S)	0,960 ± 0,001	367,1221	1,00	307	0,974	+1,49
Эстрадиол-3-сульфат (E ₂ 3S)	0,978 ± 0,001	351,1272	1,00	302	0,980	+0,27
Эстрон-3-сульфат (E ₁ 3S)	1,019 ± 0,001	349,1115	1,00	297	0,987	-3,14

а. Измеренные ОВМ для метаболитов были определены в имитирующих мочу образцах (n = 10), в которых погрешность составляет ±1.

б. Вычисленные по измерениям pKa при рН 9,5, где $z_{\text{эфф}} = 1/(10^{pH-pKa}+1)$.

в. Рассчитанные как исключенный объем растворителя по методу Коннолли в Chem3D Ultra 8.0 после минимизации энергии с использованием метода MM2.

г. Прогнозируемые значения ОВМ, определенные с использованием МЛР по двум физико-химическим свойствам ($z_{\text{эфф}}$, МО); уравнение модели имеет вид: $y = (0,8407 \pm 0,0062) + (0,173 \pm 0,010)z_{\text{эфф}} - (0,080 \pm 0,010)МО$, где в случае 12-кратной перекрестной проверки $R^2 = 0,9750$ и $Q^2 = 0,9543$.

Таблица 2. Показатели надежности анализа конъюгатов эстрогена методом КЭ-времяпролетной МС в режиме регистрации отрицательных ионов.

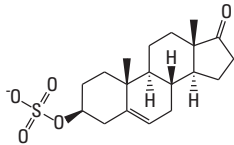
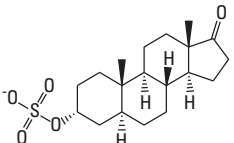
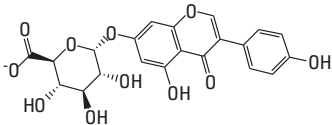
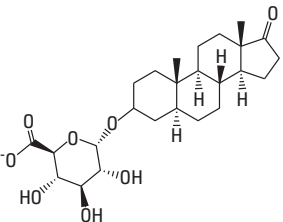
Метаболиты эстрогена	Измеренные ОВМ ^а	m/z [М-Н] ⁻	Предел обнаружения (С/Ш = 3, мкМ)	Линейность ^б (R ²)	Прецизионность ОПП ^в (CV, n = 30)	Прецизионность ОВМ ^в (CV, n = 30)
Эстриол-3-глюкуронид (E ₃ 3G)	0,861 ± 0,005	463,1974	0,17	0,991	10,9	0,09
Эстрадиол-3-глюкуронид (E ₂ 3G)	0,865 ± 0,001	447,2024	0,07	0,993	13,2	0,11
Эстриол-16-глюкуронид (E ₃ 16G)	0,880 ± 0,001	463,1974	0,15	0,988	11,8	0,11
Эстрон-3-глюкуронид (E ₁ 3G)	0,884 ± 0,001	445,1868	0,17	0,989	11,2	0,12
Эстрадиол-17-глюкуронид (E ₂ 17G)	0,887 ± 0,002	447,2024	0,13	0,997	10,8	0,17
Эстриол-3-сульфат (E ₃ 3S)	0,960 ± 0,001	367,1221	0,23	0,996	11,2	0,14
Эстрадиол-3-сульфат (E ₂ 3S)	0,978 ± 0,001	351,1272	0,12	0,997	8,6	0,06
Эстрон-3-сульфат (E ₁ 3S)	1,019 ± 0,001	349,1115	0,07	0,995	10,0	0,04

а. Измеренные ОВМ для метаболитов были определены в имитирующих мочу образцах, было сделано 10 повторных измерений при трех различных концентрациях (n = 30), в которых погрешность составляет ±1σ.

б. Калибровочные кривые были получены с использованием линейной регрессии средних значений нормализованных откликов ионов (n = 3) эстрогенов относительно внутреннего стандарта, на шести различных уровнях концентрации при 100-кратном концентрировании в диапазоне от 0,5 до 50 мкМ.

в. Прецизионность определяли путем проведения 10 повторных анализов стандартов эстрогена на трех различных уровнях концентрации (1, 5 и 15 мкМ).

Таблица 3. Идентификация предположительно содержащихся в моче конъюгатов стероидов на основе точно определенной массы (< 3 млн д.) и относительного времени миграции (ОВМ), определенных методом КЭ-времяпролетной МС, после предварительного 125-кратного концентрирования с использованием твердофазной экстракции

Метаболит, предположительно содержащийся в моче	Эмпирическая формула	Химическая 2D-структура	m/z [M-H] ⁻	$\delta_{\text{mass}}^{\text{a}}$ (млн д.)	Измеренное ОВМ
Дегидроэпиандростерон-3-сульфат (ДЭАС) ^б	C ₁₉ H ₂₈ O ₅ S		367,1576	-1,29	1,021 ± 0,002
Андростерон-3-сульфат ^а (А-3S)	C ₁₉ H ₃₀ O ₅ S		369,1740	0,27	1,015 ± 0,003
Генистеин-7-β-D-глюкуронид (Gen-7G)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁		445,0774	0,45	1,175 ± 0,017
Андростерон-3-β-D-глюкуронид (А-3G) ^б	C ₂₅ H ₃₈ O ₈		465,2506	-2,58	0,950 ± 0,002

а. Относится к погрешности измерения массы (δ_{mass}), вычисляется как относительная разница между измеренным (времяпролетная МС) и теоретическим m/z , полученным исходя из его предполагаемой химической структуры.

б. Предполагаемые конъюгаты стероидов, обнаруженные в моче, также обладают изотопическими ионами/ионами с низкой интенсивностью сигнала, а именно (эпи)тестостерон-3-сульфат ($m/z = 367,1585$), этиохоланолон-3-сульфат ($m/z = 369,1741$) или этиохоланолон-3-β-D-глюкуронид ($m/z = 465,2494$).

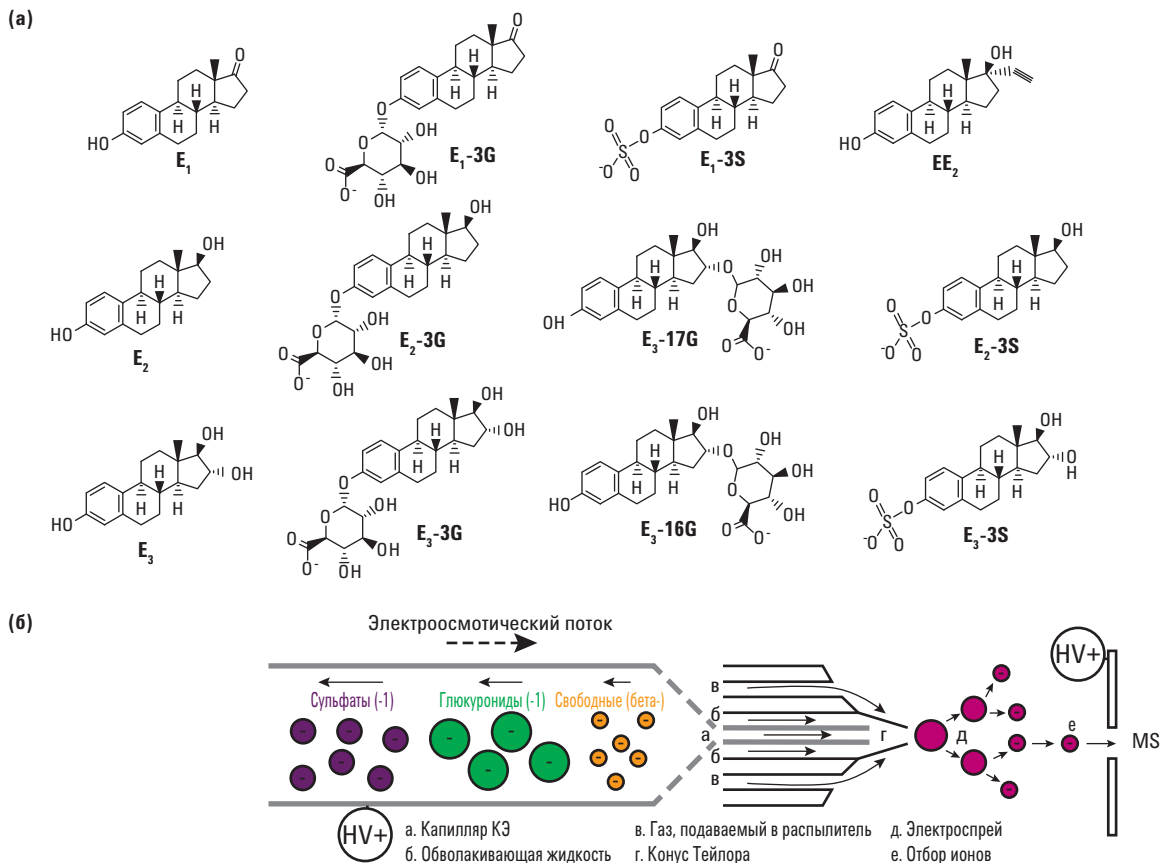


Рисунок 1. (а) В данной работе исследована химическая 2D-структура типовых слабикислых эстрогенов и их анионных конъюгатов, включая эстрон (E_1), эстрон-3-глюкуронид (E_13G), эстрон-3-сульфат (E_13S), 17 α -этинилэстрадиол (EE_2), 17 β -эстрадиол (E_2), 17 β -эстрадиол-3-глюкуронид (E_23G), 17 β -эстрадиол-17-глюкуронид (E_217G), 17 β -эстрадиол-3-сульфат (E_23S), эстриол (E_3), эстриол-3-глюкуронид (E_33G), эстриол-16-глюкуронид (E_316G) и эстриол-3-сульфат (E_33S). (б) Схематическое изображение разрешения анионных мочевых метаболитов методом КЭ-времяпролетной МС, основанного на их эффективной плотности заряда, где слабикислые эстрогены и их ионные конъюгаты десорбируются в газовую фазу через коаксиальный интерфейс обволакивающей жидкости.

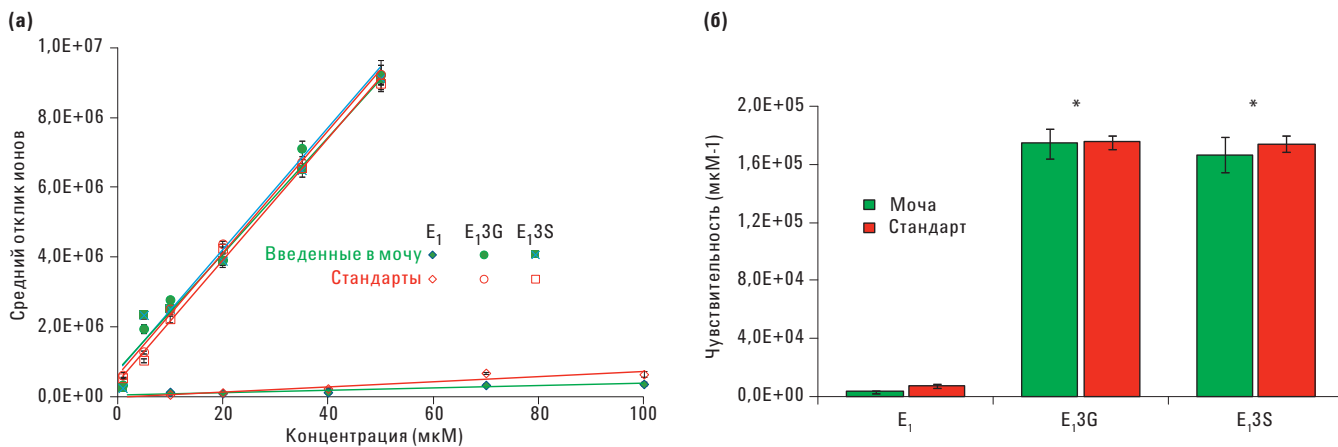


Рисунок 2. (а) Наложение репрезентативных калибровочных кривых для нативного и конъюгированного эстрогена (E_1), приготовленных в виде растворов стандартов в матрице, имитирующей мочу (15 мМ хлорида натрия, 1 мМ креатинина, 500 мкМ мочевой кислоты), и меченых стандартов в собранных образцах женской мочи ($n = 5$). (б) Гистограмма, на которой сравнивается наблюдаемая чувствительность для типовых эстрогенов, полученная на основании наклона калибровочных кривых после 10-кратного разбавления в деионизированной воде. В целом для конъюгатов эстрогенов в разбавленных образцах мочи никакой существенной ионной супрессии ($* P < 0,01$), вызванной матрицей, не наблюдалось. Обратите внимание на то, что отклик ионов в режиме регистрации отрицательных ионов для E_1 в 50 раз меньше, чем для более крупных и сильных ионных конъюгатов эстрогена.

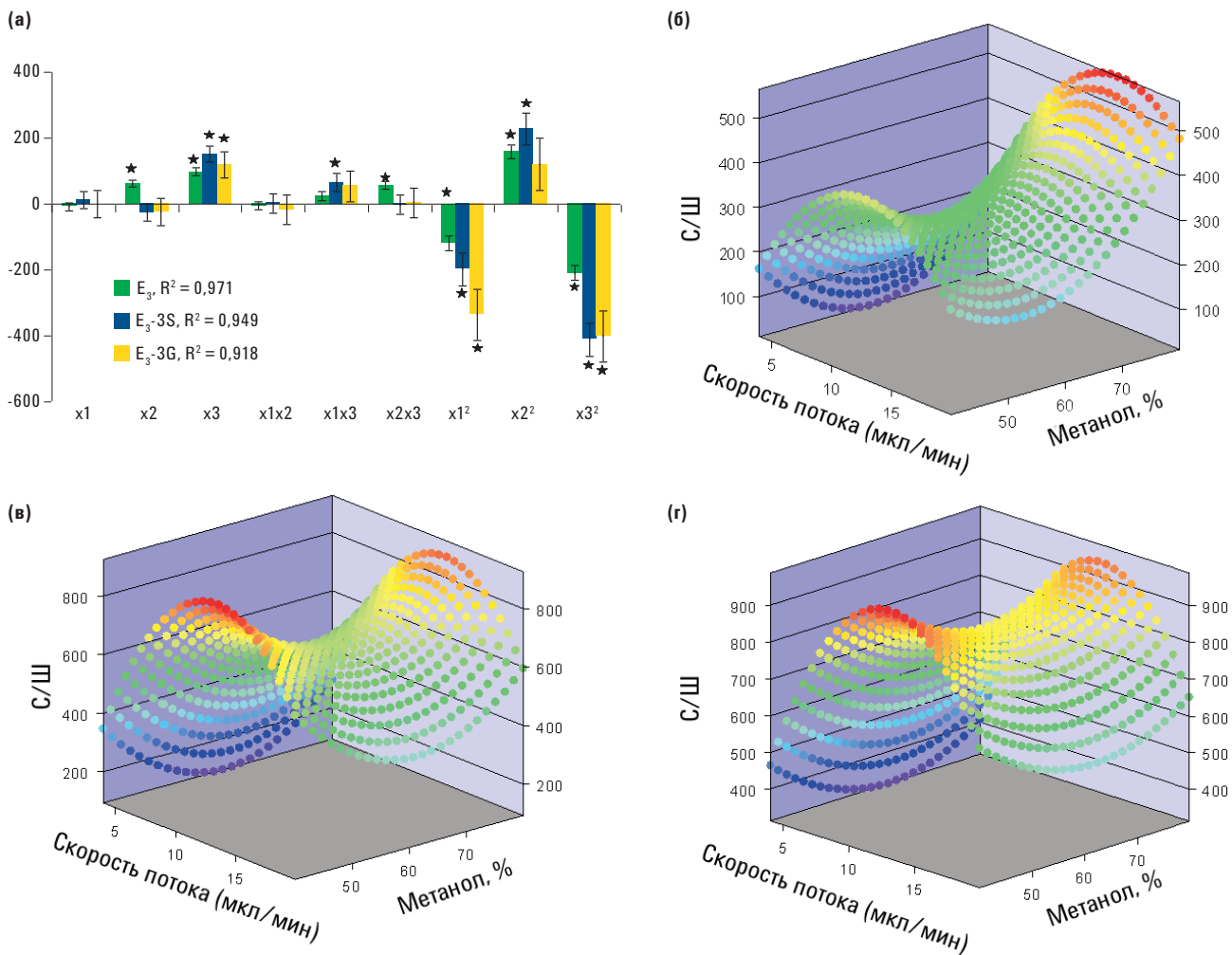


Рисунок 3. (а) Экспериментальный план оптимизации параметров ионизации эстрогенов в случае коаксиально расположенного интерфейса обволакивающей жидкости при использовании метода КЭ-времяпролетной МС с ионизацией электроспреем в режиме регистрации отрицательных ионов, где коэффициенты множественной линейной регрессии представляют собой три фактора (x_1 — напряжение на входе в капилляр, x_2 — составляющая метанола в обволакивающей жидкости, x_3 — скорость потока обволакивающей жидкости; * = значимый на уровне 95% CL), а также их члены второго порядка. Репрезентативные бимодальные кривые поверхности отклика представлены в виде функции сигнал/шум (С/Ш) для (б) E_3 ($m/z = 287,1653$), (в) E_3-3S ($m/z = 367,1221$) и (г) E_3-3G ($m/z = 463,1974$), где для увеличения эффективности ионизации эстрогенов оптимальными являются следующие параметры: подаваемое на конус напряжение равно 4,0 кВ, составляющая метанола в обволакивающей жидкости равна 80% при скорости потока 14 мкл/мин.

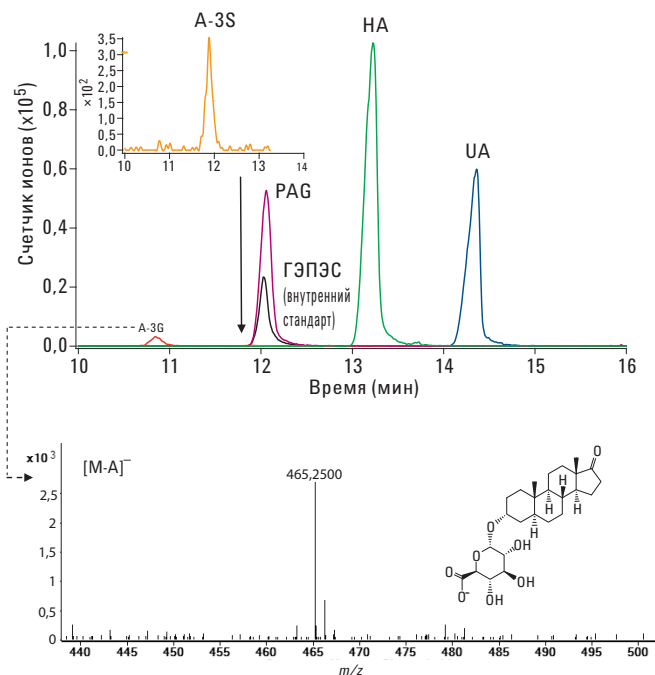


Рисунок 4. Наложенная репрезентативная электрофореграмма выделенных ионов основных мочевых метаболитов и конъюгатов стероидов с низкой интенсивностью сигнала в динамическом диапазоне 10^3 в образцах мочи женщин в перименопаузе, проанализированных методом КЭ-времяпролетной МС непосредственно после их 10-кратного разбавления в деионизированной воде. Аналиты обозначены следующими акронимами: андростерон-3-гликуронид (A-3G; $m/z = 465,2494$; $OBM = 0,910 \pm 0,015$), андростерон-3-сульфат (A-3S; $m/z = 369,1741$; $OBM = 0,994 \pm 0,010$), фенилацетилглутамин (PAG; $m/z = 263,1038$; $OBM = 1,001 \pm 0,012$), гиппуровая кислота (HA; $m/z = 178,0510$; $OBM = 1,105 \pm 0,010$), мочевая кислота (UA; $m/z = 167,0211$; $OBM = 1,200 \pm 0,008$) и ГЭПЭС в качестве внутреннего стандарта. Точная масса и изотопное соотношение, измеренные методом времяпролетной МС, совместно с OBM, спрогнозированными посредством КЭ, могут быть использованы, чтобы подтвердить наличие или исключить варианты изотопных/изомерных ионов, выбранных в результате поиска по базе данных (например, KEGG и база данных человеческих метаболитов). Надежное обнаружение конъюгатов эстрогена с низкой интенсивностью сигнала в разбавленных образцах мочи не беременных женщин оказалось невозможным из-за недостаточной чувствительности метода КЭ-времяпролетной МС в режиме регистрации отрицательных ионов во всем спектре (предел обнаружения $\approx 0,4$ мкМ).

Результаты и обсуждение

Оптимизация свободной от помех области

Моча в большом количестве содержит соли и метаболиты с высокой интенсивностью сигнала, включая Na^+ , Cl^- , мочевину и гиппуровую кислоту. При разработке метода КЭ оптимизация параметров фонового электролита (ФЭ) играет крайне важную роль для обеспечения воспроизводимых времен миграции без ионной супрессии эстрогенов с низкой интенсивностью сигнала, которую вызывают основные одноионно заряженные ионы.

КЭ обладает естественным обессоливающим свойством, которое выражается в том, что небольшие неорганические соли передвигаются с большей положительной подвижностью, чем большинство содержащихся в моче метаболитов. Таким образом чувствительность повышается, при этом отдельная предварительная подготовка образцов не требуется.



Рисунок 5. Состав мочи, демонстрирующий высокое содержание солей, нейтральных соединений и кислотных аналитов.

Разрешение изомеров конъюгатов эстрогена

Конъюгация на различных гидроксильных центрах приводит к образованию различных структурных изомеров конъюгатов эстрогена. Их разделение легко осуществляется путем оптимизации ФЭ ($\text{pH} > 9,5$) с помощью КЭ для частичной ионизации фенольных остатков E_217G и E_316G .

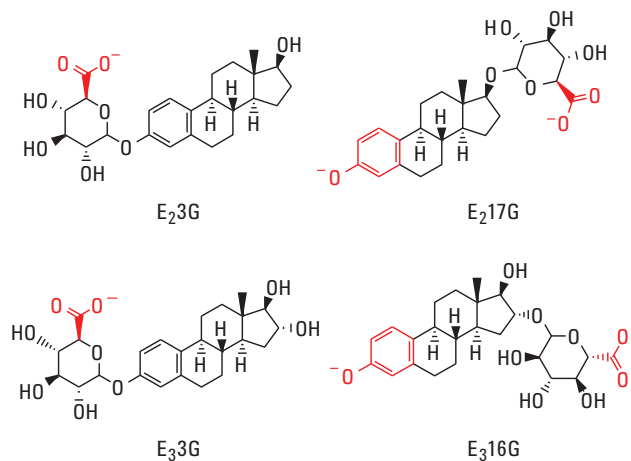


Рисунок 6. Репрезентативные структурные изомеры эстрогенов с глюкуронидацией эстрадиола (E_2) и эстриола (E_3) на различных центрах.

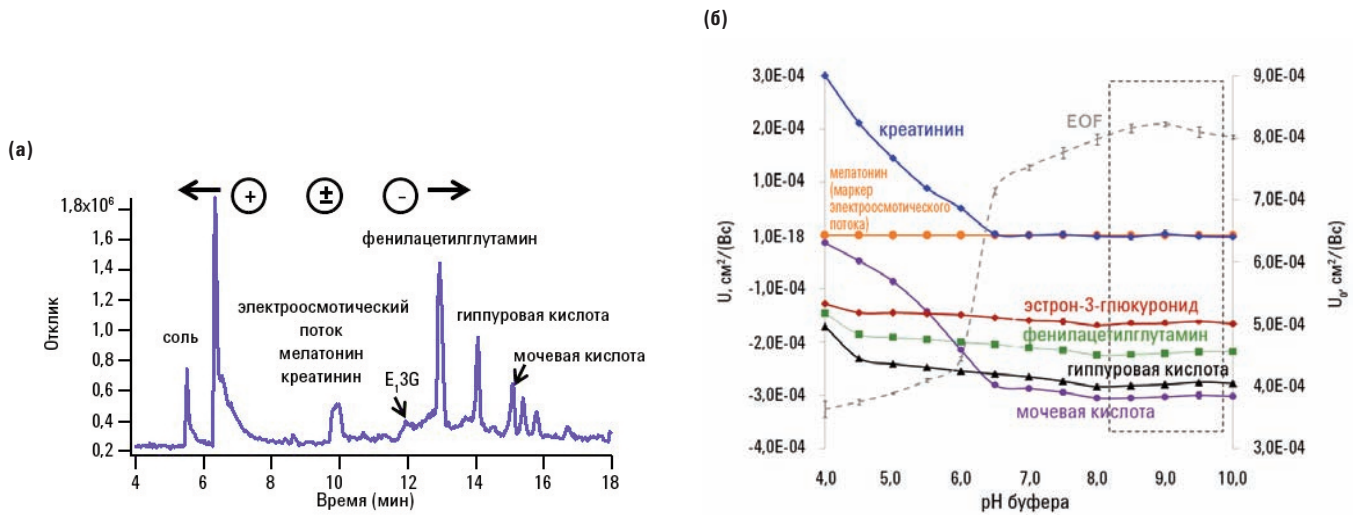


Рисунок 7. а. Общая электрофореграмма, на которой отображается порядок миграции основных мочевых метаболитов. б. График подвижности (U), отображающий разрешение метаболитов в моче в зависимости от изменений pH фонового электролита, для свободного от помех анализа эстрогенов (E_13G) методом КЭ-времяпролетной МС с ионизацией электроспреем.

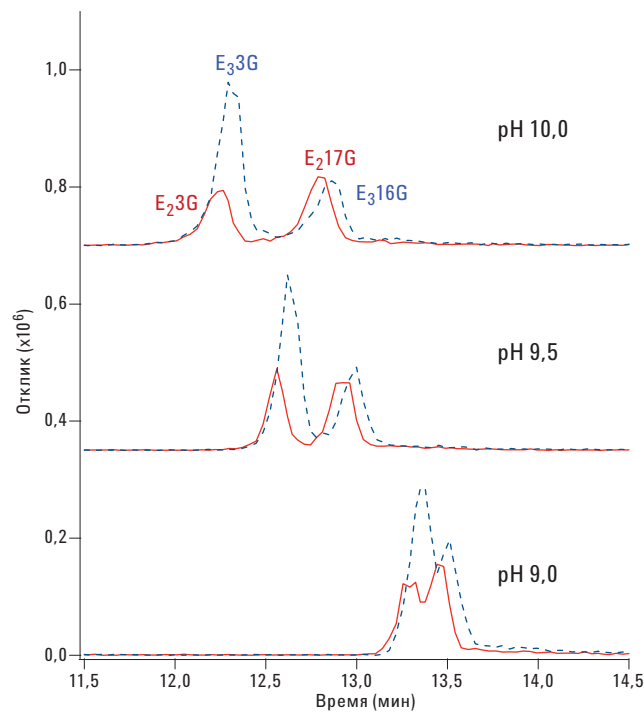


Рисунок 8. Разрешение двух пар изомеров глюкуронидированного эстрогена методом КЭ с повышением pH фонового электролита.

Однозначная идентификация по методу КЭ-времяпролетной МС с ионизацией электроспреем

Для идентификации неизвестных эстрогенов можно использовать полученные в процессе КЭ относительные времена миграции (ОВМ) наряду с точно измеренной массой, изотопными соотношениями и базами данных соединений. Прогнозируемые значения ОВМ определяют в отношении кварца по двум присущим аналиту физико-химическим свойствам (МО и рКа) с использованием множественной линейной регрессии.

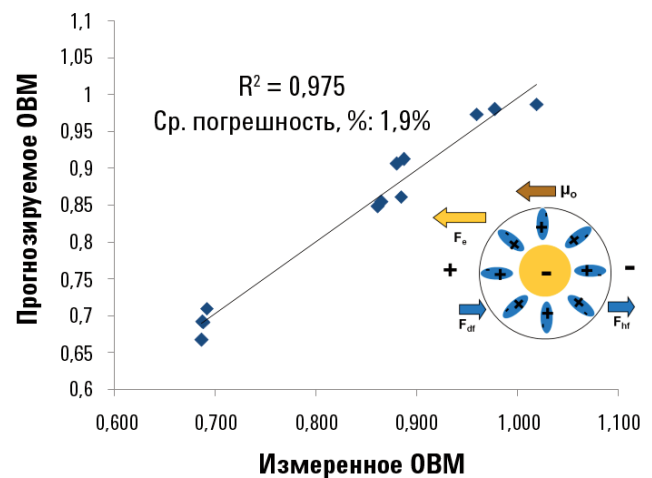


Рисунок 9. Корреляционный график прогнозируемых и измеренных значений ОВМ для типовых эстрогенов. Уравнение для определения ОВМ основано на двух внутренних параметрах: $RMT=0,99912-0,00133(MO)-0,38408(z_{эфф})$.

Комплексное определение профиля эстрогенов

При оптимальных условиях частично ионизированные свободные эстрогены благодаря слабой кислотности ($pK_a \approx 10,4$) легко отделяются от их ионных конъюгатов, тогда как глюкурониды отделяются от сульфатов из-за разницы в молекулярном объеме (МО). Разделение изомеров конъюгатов эстрогена по методу КЭ основано на различии их эффективных зарядов ($Z_{эфф}$).

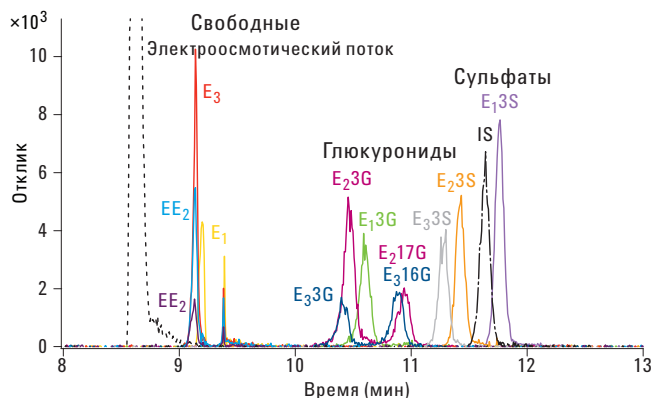


Рисунок 10. Электрофореграмма выделенных ионов, демонстрирующая разрешение меченых конъюгатов эстрогена с концентрацией 10 мкМ и свободных эстрогенов с концентрацией 20 мкМ при pH 9,5. Глюкуронидные конъюгаты полностью отделяются от сульфатных конъюгатов, включая основные структурные изомеры, в том числе E_23G и E_217G ($m/z = 447,2024$), а также E_33G и E_316G ($m/z = 463,1974$).

Таблица 4. Физико-химические свойства 11 типовых эстрогенов

Эстроген	Акроним	m/z [M-H] ⁻	МО (г3)	pK_a	$Z_{эфф}$ (pH = 9,5)
Эстрон	E ₁	269,1547	257	$10,34 \pm 0,05^3$	-0,13
Эстрадиол	E ₂	271,1704	262	$10,46 \pm 0,03^3$	-0,10
Эстриол	E ₃	287,11653	268	$10,38 \pm 0,02^3$	-0,12
Эстрон-3-сульфат	E ₁ 3S	349,1115	297	-3 ⁴	-1,00
Эстрадиол-3-сульфат	E ₂ 3S	351,1272	307	-3 ⁴	-1,00
Эстриол-3-сульфат	E ₃ 3S	367,1221	393	-3 ⁴	-1,00
Эстрон-3-глюкуронид	E ₁ 3G	445,1868	302	$\sim 3 \cdot 4^5$	-1,00
Эстрадиол-3-глюкуронид	E ₂ 3G	447,2024	396	$\sim 3 \cdot 4^5$	-1,00
Эстрадиол-17-глюкуронид	E ₂ 17G	447,2024	391	$\sim 3 \cdot 4^5, 10,46^3$	-1,10
Эстриол-3-глюкуронид	E ₃ 3G	463,1974	401	$\sim 3 \cdot 4^5$	-1,00
Эстриол-16-глюкуронид	E ₃ 16G	463,1974	395	$\sim 3 \cdot 4^5, 10,38^3$	-1,12

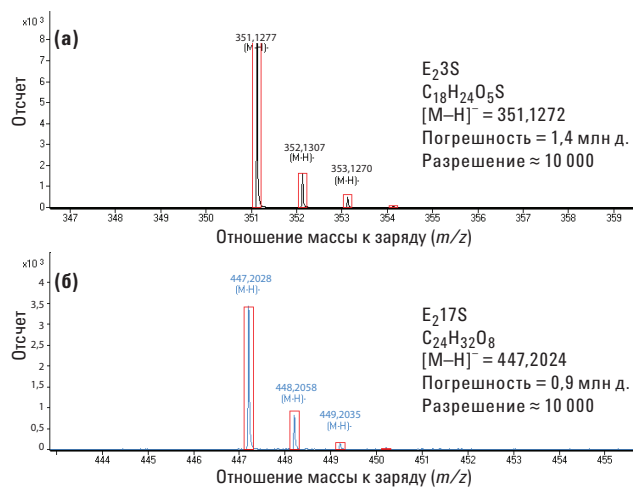


Рисунок 11. Спектры времяпролетной МС и соответствующие спрогнозированные изотопные соотношения (красные квадраты), основанные на эмпирических формулах а) эстрадиол-3-сульфата и б) эстрадиол-17-глюкуронида.

Выводы

Данная методическая информация представляет собой один из первых отчетов об анализе эстрогенов по методу КЭ, позволяющему непосредственно идентифицировать интактные высокополярные конъюгаты эстрогена с высокой селективностью и минимальной подготовкой образцов. Качественное определение неизвестных конъюгатов стероидов и их позиционных изомеров может быть реализовано методом времяпролетной МС с точным определением массы в сочетании с прогнозированием особенностей миграции ионов методом КЭ. Эта методика применима для решения задач в области клинической химии, экологического анализа и науки о продуктах питания.

Литература

1. N. L. Kuehnbaum, P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8063-8068. [Н. Л. Куэнбаум, П. Бриц-Маккиббин, журнал «Analytical chemistry», **2011**, № 83, с. 8063–8068]
2. M. Mokaddem; P.Gareil; J.-E. Belgaied; A. Varenne, *Electrophoresis* 2009, 30, 1692-1697. [М. Мокаддем, П. Гарейл, Д.-Е. Белгайд, А. Варенн, журнал «Electrophoresis», 2009, № 30, с. 1692–1697]
3. C. Kaiser; G. Segui-Lines; J. C. D'Amaral; A. S. Ptolemy; P.Britz-McKibbin, *Chem. Comm.* **2008**, 338-340. [С. Кайзер, Г. Сегуи-Линс, Д. С. Д'Амарал, А. С. Птолеми, П. Бриц-Маккиббин, журнал «Chemical Communications», **2008**, с. 338–340]
4. A. R. Hurwitz; S. T. Liu, *J. Pharmaceutical Sci.* **1977**, 66, 624-627. [А. Р. Гурвиц, С. Т. Лю, журнал «Pharmaceutical Science», **1977**, № 66, с. 624–627]
5. L. A. D'Agostino; K. P. Lam; P. Britz-McKibbin *J. Proteome Res.* **2011**, 10, 592-603. [Л. А. Д'Агостино, К. П. Лам, П. Бриц-Маккиббин, журнал «Proteome Research», **2011**, № 10, с. 592–603]
6. B. J. Fuhrman; X. Xu; R. T. Falk; S. E. Hankinson; T. D. Veenstra; L. K. Keefer; R. G. Ziegler, *Inter. J. Biol. Markers* **2010**, 25, 185-194. [Б. Д. Фурман, Х. Сю, Р. Т. Фальк, С. Е. Ханкинсон, Т. Д. Винстра, Л. К. Кифер; Р. Г. Циглер, междунар. журнал «Biological Markers», **2010**, № 25, с. 185–194]
7. F. Qin; Y.-Y. Zhao; M. B. Sawyer; X.-F. Li, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3404-3411. [Ф. Цинь, И.-И. Чжао, М. Б. Сойер, Х.-Ф. Ли, журнал «Analytical chemistry», **2008**, № 80, с. 3404–3411]

Дополнительные сведения

В настоящем документе приведены типичные результаты. Подробнее о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2012.
Напечатано в США
7 февраля 2012 г.
5990-9669RU



Agilent Technologies