

Jednoczesne oznaczenie mitotanu, jego metabolitu i siedmiu hormonów steroidowych w próbkach moczu za pomocą elektroforezy kapilarnej



Michał Pieckowski¹, Piotr Kowalski, Tomasz Bączek

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
Hallera 107, 80-416 Gdańsk

¹mpiec@gumed.edu.pl

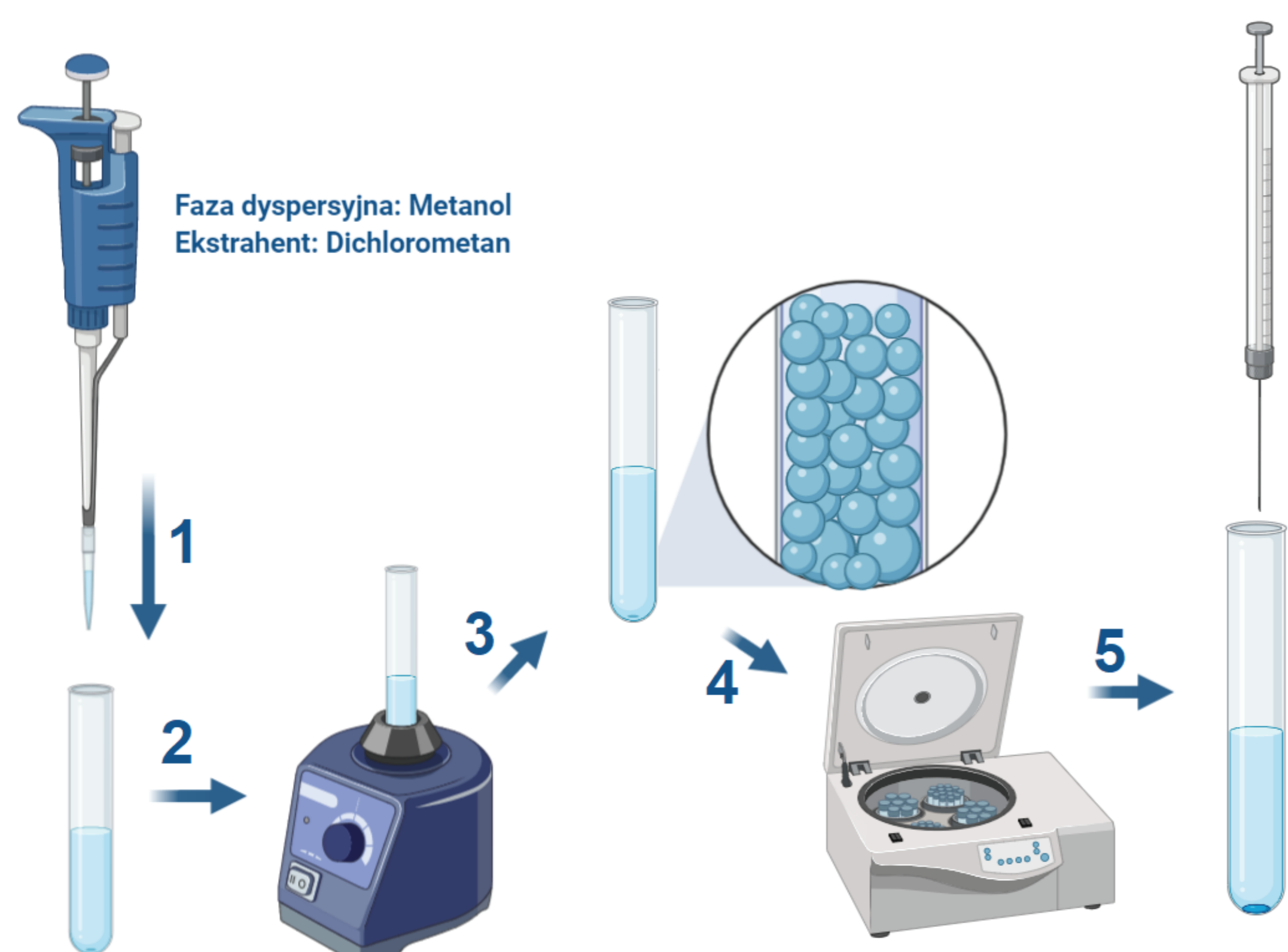
www.gumed.edu.pl

Wprowadzenie

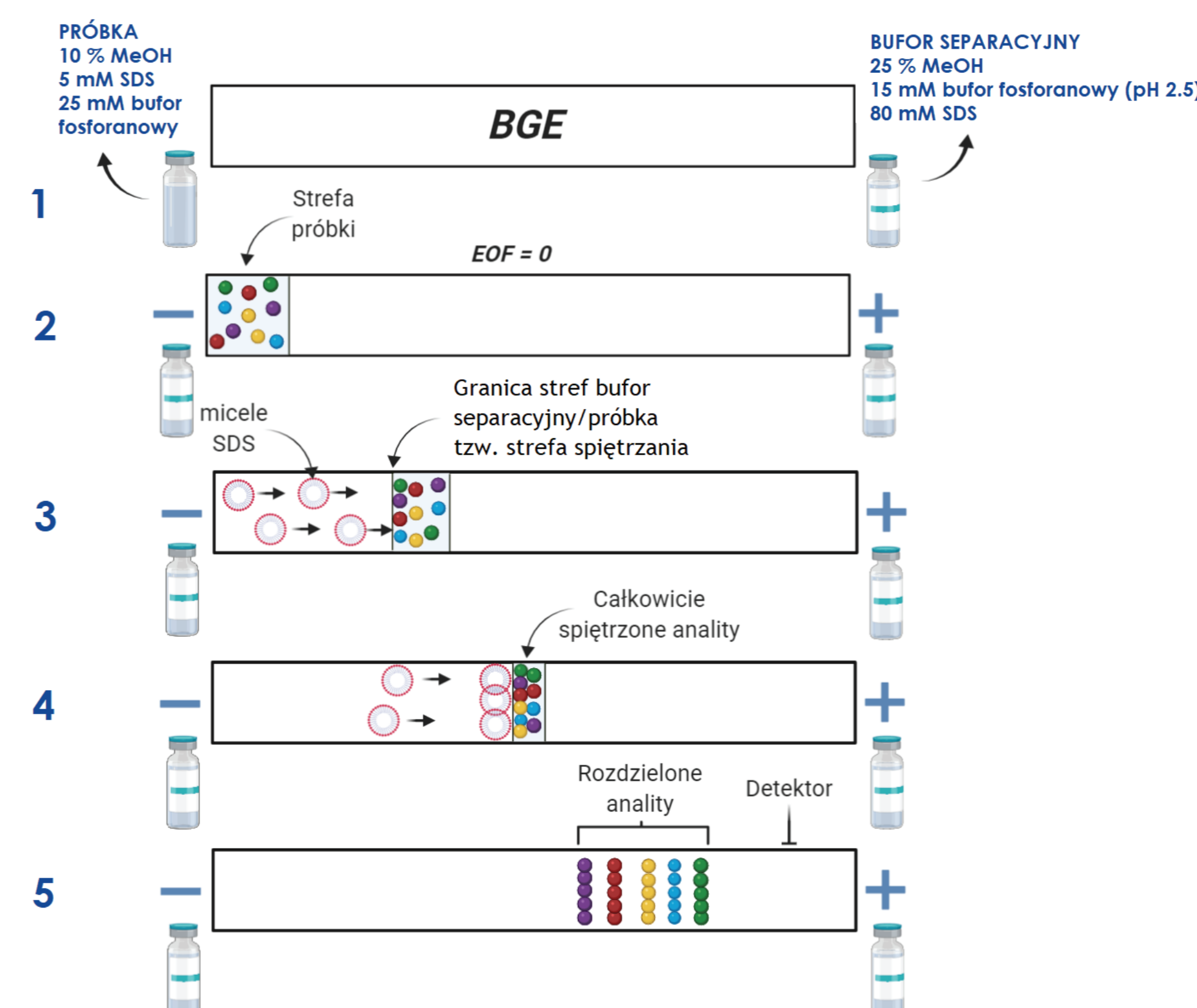
Mitotan (1,1-(dichlorodifenyl)-2,2-dichloroetan, o,p'-DDD) to chlorowany bicykliczny związek aromatyczny stosowany w leczeniu nieoperacyjnego raka kory nadnerczy oraz w celu zmniejszenia ryzyka nawrotu i przerzutów po resekcji guza. Mechanizm działania mitotanu opiera się zarówno na działaniu przeciwnowotworowym, jak i antyhormonalnym, jednak nie do końca poznano prawidłowe działanie cytotoksyczne mitotanu [1]. Mitotan wpływa na steroidogenezę, a także metabolizm hormonów kory nadnerczy poprzez inhibicję takich enzymów jak 20,22-desmolazy, 11 β -hydroksylazy, czy dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej [2]. Tak rozległy wpływ na gospodarkę hormonalną wymaga monitorowania poziomu steroidów u pacjentów leczonych mitotaniem. Z tego względu w niniejszej pracy podjęto się opracowania szybkiej i czułej mikroekstrakcji dyspersyjnej ciecz-ciecz (DLLME) mitotanu, jego metabolitu kwasu octowego 1,1-(o,p'-dichlorofenylu) (o,p'-DDA) i 7 hormonów steroidowych (progesteron, testosteron, epitestosteron, kortyzol, kortyzon, kostykosteron, aldosteron) z moczu wraz z separacją elektroforetyczną wykorzystującą detekcję UV i sweeping jako technikę prekoncentracji analitów on-line.

Metodologia

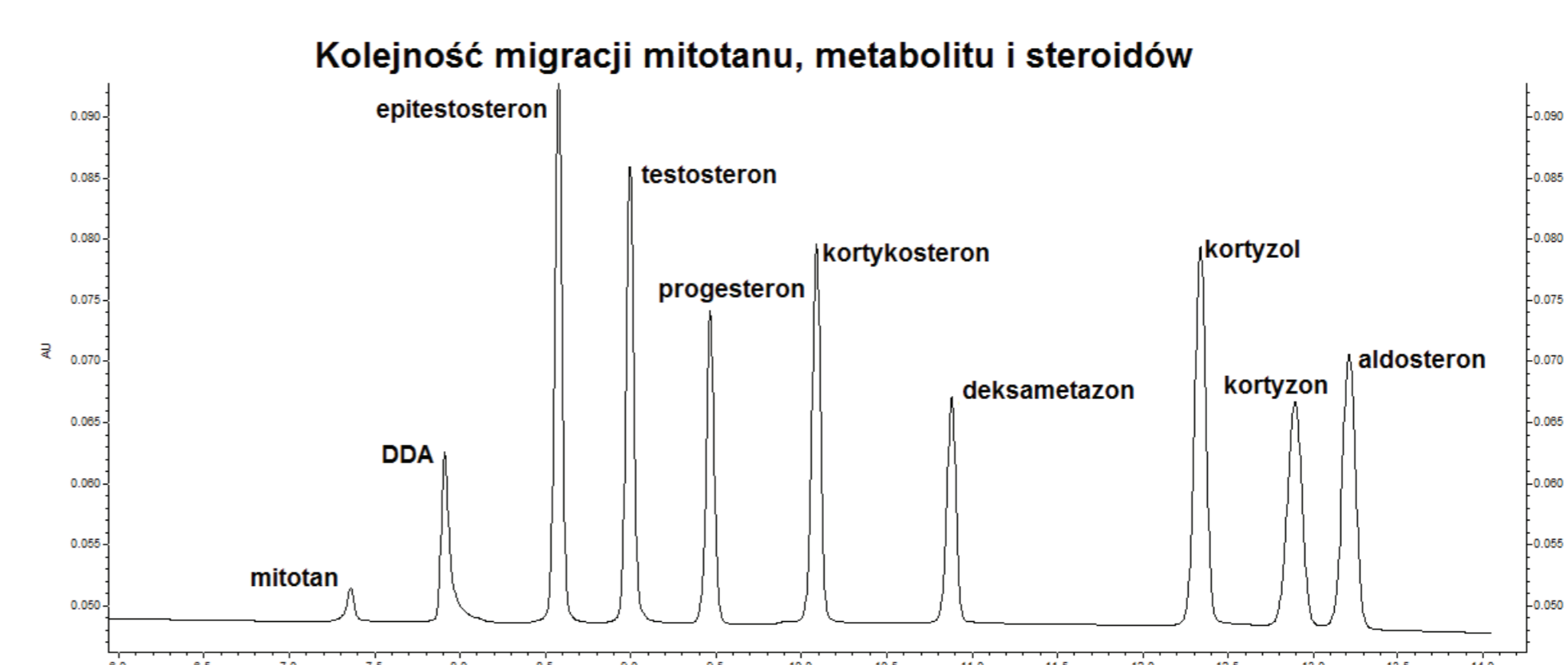
Zoptymalizowano wpływ typowych parametrów elektroforetycznych, takich jak długość dozowanej próbki, zastosowane napięcie, skład i pH buforu separacyjnego oraz stężenie modyfikatora organicznego. Zbadano również wpływ stężenia dodecylosiarczanu sodu (SDS) na potencjał zjawiska sweepingu. Stwierdzono, że granice wykrywalności analitów dla opracowanej metody DLMME-Sweeping mieściły się w zakresie 3 - 10 ng mL⁻¹, czyli były około 500-razy niższe niż w konwencjonalnej metodzie dozowania hydrodynamicznego (5 s, 0.5 psi) bez techniki prekoncentracji i zatężania poprzez odparowanie rozpuszczalnika. Wszystkie anality zostały całkowicie rozdzielone w mniej niż 12 minut przy użyciu niepowlekaney, krzemionkowej kapilary o średnicy wewnętrznej 50 μ m (ID) x 60 cm długości. Separację elektroforetyczną przeprowadzono w układzie 80 mM SDS, 25 % metanolu i 15 mM buforu fosforanowego (pH 2.5) w odróconej polaryzacji elektrod o napięciu -25 kV. Opracowana metoda została zwalidowana według najnowszych wytycznych FDA.



Ryc.1. Mikroekstrakcja dyspersyjna ciecz-ciecz (DLLME). 1 - Wprowadzenie mieszaniny dyspersyjnej do próbki moczu, 2 - Wortexowanie, 3 - Rozporszenie ekstrahentu w formie mikrokropel, 4 - Wirowanie, 5 - Pozyskanie odwirowanej fazy ekstrahentu za pomocą strzykawki tłokowej Hamiltona i odparowanie rozpuszczalnika.



Ryc.2. Mechanizm sweepingu. 1 – Sytuacja startowa, od strony wlotu do kapilary znajduje się próbka, a wylotu bufor separacyjny, 2 – Po wprowadzeniu hydrodynamicznym próbki do kapilary, przy wlocie próbkę zastąpił bufor separacyjny, następuje separacja w odwróconej polaryzacji elektrod, 3 – Micele SDS „zamiatają” anality i zakładają się w strefie spiętrzania, 4 – Anality zostały całkowicie spiętrzone, 5 – Właściwa separacja elektroforetyczna.



Ryc.3. Elektroferogram próbki sztucznego moczu wzbogaconej w anality o stężeniu 250 ng mL⁻¹. Skład próbki: 10 % metanol, 5 mM SDS, 25 mM bufor fosforanowy (pH 2.5). Deksametazon – wzorzec wewnętrzny. Analityczna długość fali UV = 243 nm

Wyniki i Dyskusja

1. W zastosowanej metodzie po raz pierwszy oznaczono mitotan i jego metabolit w próbkach moczu za pomocą elektroforezy kapilarnej.
2. Dotychczas metodami z wyboru dla ekstrakcji mitotanu była klasyczna ekstrakcja ciecz-ciecz, lub ekstrakcja do fazy stałej (SPE), proponowana w niniejszej pracy mikroekstrakcja dyspersyjna ciecz-ciecz nie była dotąd stosowana w oznaczeniu mitotanu i zapewnia dużo mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych.
3. Dzięki zastosowaniu lotnego ekstrahentu (dichlorometan) i stosunkowo bardzo niewielkiej objętości (50-60 μ L), redukcja objętości rozpuszczalnika jest szybka i zapewnia 20-krotne wzmocnienie sygnału, ponadto sweeping, jako technika prekoncentracji zapewnia 25-krotne wzmocnienie sygnału względem konwencjonalnego dozowania hydrodynamicznego (5 sek., 0.5psi), dzięki czemu uzyskano ok. 500-krotne wyższe wartości limitów na poziomie 3-10 ng mL⁻¹.

Bibliografia

- [1] Paragliola, R. M. i in. "Role of Mitotane in Adrenocortical Carcinoma – Review and State of the art", European Endocrinology, 2018, 14(2), 62.
- [2] Ghataore, L. i in. "Effects of mitotane treatment on human steroid metabolism: implications for patient management." Endocrine connections, 2012, 1(1), 37–47.