

УДК 54.062: 615.033

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.140

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНОВОГО РЕЦЕПТОРА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Николаев С.В. – к.в.н., научный сотрудник, Институт агробиотехнологий им. А.В. Журавского Коми научного центра УрО РАН

Ключевые слова: прогестероновый рецептор, прогестерон, 17-гидроксипрогестерона капронат, аглепристон, высокоэффективная жидкостная хроматография масс-спектрометрия. **Keywords:** progesterone receptor, progesterone, 17-hydroxyprogesterone capronate, aglepriston, high-performance liquid chromatography mass-spectrometry.



РЕФЕРАТ

Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) является комбинированным способом химического анализа и интегрирует независимые друг от друга операции жидкостной хроматографической дифференциации и масс-спектрометрического исследования, что позволяет эффективно определять концентрацию различных веществ в сложных по составу субстанциях. В работе установлены оптимальные параметры определения в плазме крови крупного рогатого скота прогестерона, 17-гидроксипрогестерона капроната (17-ОНРС) и аглепристона данным методом. Количественное определение указанных стероидов, осуществляли с применением внешнего стандарта (абсолютная калибровка). Для этого предварительно строили градуировочные зависимости с использованием эталонных разведений лекарственных веществ. В целях предупреждения воздействия на результат анализа составных компонентов крови практиковали способ матричной градуировки с включением в калибровочные растворы «чистой» плазмы, т.е. не содержащей определяемые соединения. Опытным путем установлено, что время выхода пика прогестерона происходит через 2,72 минуты, а оптимальным ион-прекурсором является $m/z=315,3$. В ходе проведенной работы доказано, что разработанный метод позволяет эффективно определять эндогенный уровень прогестерона в плазме крови у животных, по параметрам, заданным для синтетического аналога. Время выхода пика 17-ОНРС происходило через 4,20 минуты, а оптимальный ион-прекурсор имел массу 429,2 а.е.м. Первый этап по изучению кинетики 17-ОНРС в организме крупного рогатого скота показал, что стероид хорошо визуализируется на хроматограмме даже в невысоких концентрациях. Выход пика аглепристона наблюдался на 2,25 минуте, а оптимальный ион-прекурсор был равен 432,2 а.е.м. Хроматограмма даже при низких концентрациях стероида имела низкий уровень шума, а концентрация стероида в плазме крови через сутки после инъекции 20 мл 3% раствора аглепристона лактирующей корове составила 7,2 нг/мл. Таким образом, подобраны оптимальные параметры для определения концентрации в плазме крови крупного рогатого скота селективных модуляторов прогестеронового рецептора, что позволяет проводить дальнейшую детальную оценку фармакокинетических свойств данных стероидов после их применения.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение концентрации гормонов в крови является важным этапом оценки физиологического статуса и диагностики эндокринных заболеваний у животных. В связи с широким распространением бесплодия у крупного рогатого скота, особый интерес представляет количественное определение половых стероидов, а так же изучения фармакокинетики в организме после применения их синтетических аналогов [7]. Наиболее информативными методами количественного определения стероидных гормонов в биологическом материале принято считать иммуноферментный и радиоиммунологический анализ. Наряду с этим, указанные способы не лишены недостатков: отрицательным моментом использования иммунологических подходов можно считать перекрестную реакцию с близкими по строению веществами [2,4]. Так установлено, что антитела к прегн-4-ене-3,20-диону могут специфически взаимодействовать с такими метаболитами, как 17-гидроксипрогестерон (до 1%) и 11-гидроксипрогестерон (до 25%). Этот факт в свою очередь оказывает существенное влияние на конечный результат и интерпретацию полученных данных [2,3,5].

ВЭЖХ-МС является комбинированным способом и интегрирует независимые друг от друга операции жидкостной хроматографической дифференциации и масс-спектрометрического исследования. На основании полученных при анализе данных отслеживаются взаимосвязь между структурными особенностями ионов, образующихся в результате распада молекул при ионизации, что позволяет высокоточно и эффективно определять наличие и концентрацию различных веществ в сложных по составу субстанциях [6].

Целью исследований явилась разработка и подбор оптимальных параметров для определения селективных модуляторов прогестеронового рецептора в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена в лаборатории «Фармацевтическая биотехнология» Вят-

ского ГУ (г. Киров). Для определения стероидов в плазме крови был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Работу осуществляли на приборе LCMS-8040 с системой трёх квадруполов. Анализ проводили с использованием колонки «Dr. Maisch Reprosil-Pur Basic C18» 100 × 2 мм с размером зёрен неподвижной фазы 3 мкм (Германия). Формирующиеся при распаде протонированных молекулярных ионов-прекурсоров $[M+H]^+$ сигналы m/z ионов-продуктов обнаруживали в режиме переходов m/z (MRM) при положительной полярности ионизации.

Определение концентрации селективных модуляторов прогестеронового рецептора, осуществляли по методу внешнего стандарта с использованием экстрактов действующих веществ из лекарственных средств и предварительным построением градуировочных зависимостей. Калибровочные растворы готовили на химически чистом метаноле путем разведений до необходимой концентрации. В качестве стандартных образцов анализируемых стероидов использовали масляные растворы препаратов: 2,5% прогестерона, 3% аглепристона, 12,5% 17-ОНПС. Гормоны из лекарственной формы экстрагировали в метанол при обработке ультразвуком в условиях водяной бани и температуре 40°C в течение получаса. Для каждого синтетического стероида готовили серию из трех стандартных растворов.

Для нивелирования влияния на результат исследований химических компонентов крови применяли технику матричной градуировки с использованием нативной (чистой) плазмы, т.е. не содержащей определяемых соединений. С этой целью в микропробирки Эппендорфа помещали по 0,1 мл чистой плазмы крови и по 0,1 мл градуировочного раствора с заранее известным содержанием анализируемого вещества. Для полноты взаимодействия веществ смесь шуттелировали в течение 15 мин. Далее вносили по 0,8 мл метилового спирта с целью преципитации балластных компонентов и экстракции ана-

Таблица 1

Условия проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа плазмы крови в режиме MRM для исследуемых образцов

Параметр	Значение для определяемого соединения		
	Прогестерон	17-ОНРС	Аглепристон
<i>Жидкостной хроматограф</i>			
Объем вводимой пробы, мкл	5	5	5
Расход подвижной фазы, мл × мин	0,25	0,25	0,25
Состав подвижной фазы	Фаза А – вода очищенная тип I с добавкой муравьиной кислоты (0,1%); Фаза Б – ацетонитрил		
Режим элюирования, концентрация фазы Б	70% (0-0,01 мин); увеличение до 90% (0,01-5,0мин); 90% (5-10 мин)	70% (0-0,01 мин); увеличение до 90% (0,01-5,0мин); 90% (5-10 мин)	60% (0,01-0,2 мин); увеличение до 90% (0,2-6 мин); 90% (6-10 мин)
Температура термостата колонок, °С	35	35	35
Время выхода пика, мин	2,72	4,20	2,25
<i>Масс-спектрометр</i>			
Тип ионизации	Электроспрей (ESI), положительная полярность		
Напряжение на конусе иглы, кВ	4,5	4,5	4,5
Температура нагревательного блока, °С	400	400	400
Температура линии десольватации, °С	250	250	250
Расход газа-осушителя, л × мин ⁻¹	15	15	15
Расход газа-распылителя, л × мин ⁻¹	3	3	3
Ион-прекурсор, а.е.м.	[M+H] ⁺ m/z 315,3	[M+H] ⁺ m/z 429,2	[M+H] ⁺ m/z 432,2
Ионы-продукты, m/z	97,10 109,05 79,10	313,20 271,20 109,10	134,05 374,25 148,10
Энергия коллизии, эВ	-23,0 315,3 → 97,1 -26,0 315,3 → 109,05 -44,0 315,3 → 79,1	-14,0 429,2 → 313,2 -18,0 429,2 → 271,2 36,0 429,2 → 109,1	-33,0 432,2 → 134,05 -23,0 432,2 → 374,25 -27,0 432,2 → 148,10
Время измерения (Dwell Time), мс	100	100	100

лизируемых гормонов. Смесь повторно встряхивали в течение получаса. Выпавшие преципитаты осаждали центрифугированием при 15000 об/мин, а супернатант сливали, а затем пропускали через шприцевой фильтр. Подготовленные по описанной схеме стандартные разведения выполняли в трех повторениях для каждой пробы. Последующая обработка данных осуществлялась путем анализа пло-

щадей хроматографических пиков и построением калибровочных зависимостей.

Пробоподготовку исследуемой плазмы крови от животных участвующих в экспериментальной работе осуществляли по следующей схеме: в микропробирки помещали по 0,1 мл исследуемой плазмы и по 0,9 мл чистого метилового спирта. Смесь встряхивали в течение получаса при температуре 20оС, после коагулиро-

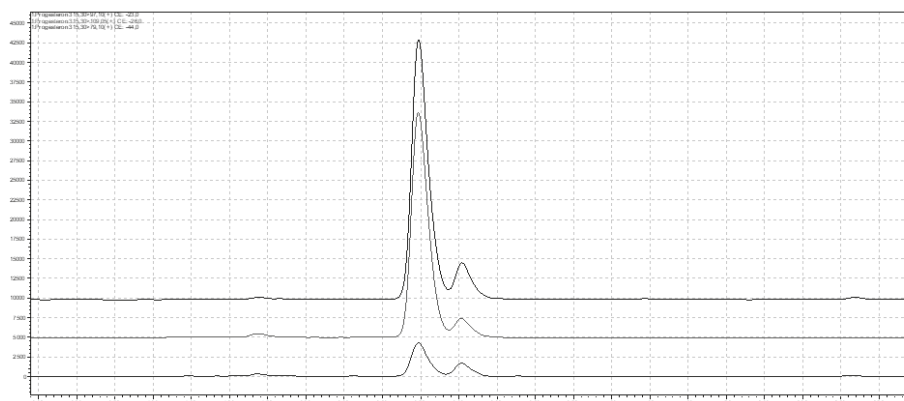


Рисунок 1. Визуализация выхода пиков прогестерона на хроматограмме при стандартном разведении прогестерона 2,5 нг/мл

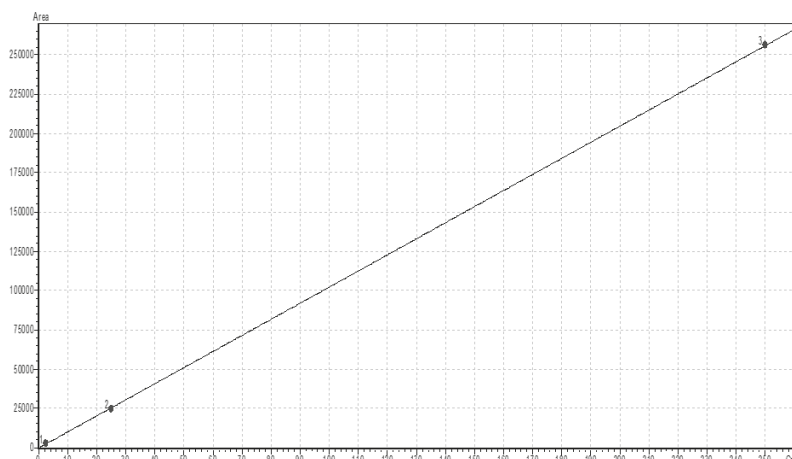


Рисунок 2. График калибровочной зависимости для определения прогестерона в плазме КРС методом ВЭЖХ МС/МС

ванные спиртом компоненты отделяли вышеописанным методом и помещали в вials прибора.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы LabSolutions LCMS 5.86.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

Оптимальные условия определения селективных модуляторов прогестеронового рецептора в плазме крови подобраны опытным путем, приведены в таблице 1.

Для определения уровня прогестерона,

построение калибровочных кривых осуществляли путем разведения препарата до концентраций прогестина 2,5, 25,0 и 250,0 нг/мл в плазме крови не половозрелого козла (самца). Анализ экспериментальных данных свидетельствует, что время выхода пика стероида при заданном режиме происходило через 2,72 минуты (рис. 1), а оптимальным ион-прекурсором являлся $m/z=315,3$. Стоит отметить присутствие еще одного, менее высокого пика после выхода основного, что по видимости обусловлено наличием

в крови близкого по химической и физической структуре соединения. Тем не менее, данный факт не оказывал препятствий при обсчете площади пика искомого соединения.

Калибровочная зависимость, выстроенная по полученным трем точкам стандартных разведений, характеризовался высокой корреляцией повторений ($r > 0,999$) и линейностью (рис. 2).

На следующем этапе, была изучена возможность определения эндогенного уровня прогестерона у животных разработанным способом. Для этого от коров в середине лютеиновой фазы ($n=10$) и в стадию полового возбуждения ($n=10$) была получена венозная кровь. В ходе проведенной работы установлено, что у крупного рогатого скота гормон эндогенного происхождения хорошо детектируется, по параметрам, заданным для синтетического аналога. Концентрация полового стероида соответствовала референтным значениям для лютеиновой и фолликулярной фазы, что указывает на объективность разработанной методики (табл.

2).

Для построения калибровочной зависимости на 17-ОНРС использовали разведения препарата с концентрацией 1,25, 12,5 и 125 нг/мл на нативной плазме коровы в трех повторениях. Хроматограмма показала, что время выхода пика 17-ОНРС при заданном режиме происходит через 4,20 минуты, а масса оптимального ион-прекурсора составляет 429,2 а.е.м (табл. 1, рис. 3).

Калибровочный график, выстроенный по трем точкам, характеризовался высокой корреляцией значений ($r > 0,999$) и линейностью (рисунок 4).

После построения зависимостей был осуществлен первый этап по изучению возможности контроля за концентрацией данного синтетического гормона в организме КРС. С этой целью лактирующей корове однократно внутримышечно вводили 6,25 г действующего вещества в виде 12,5% раствора (50 мл). Из подвздошной вены для исследований до инъекции, в течение первых 15 дней ежедневно, а так же на 28 и 40 день опыта отби-

Таблица 2
Концентрация прогестерона в крови у коров в лютеиновую и фолликулярную фазу полового цикла установленная методом ВЭЖХ-МС/МС, нг/мл

Показатель	Лютеиновая фаза	Фолликулярная фаза
M±m	3,38±0,18	0,29±0,06
Max	4,10	0,66
Min	2,62	0,09

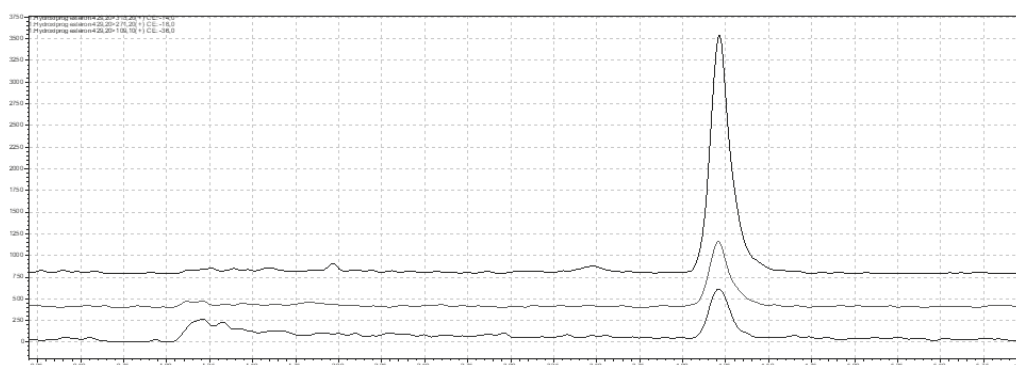


Рисунок 3. Визуализация выхода пиков 17-ОНРС при концентрации 12,5 нг/мл плазмы КРС

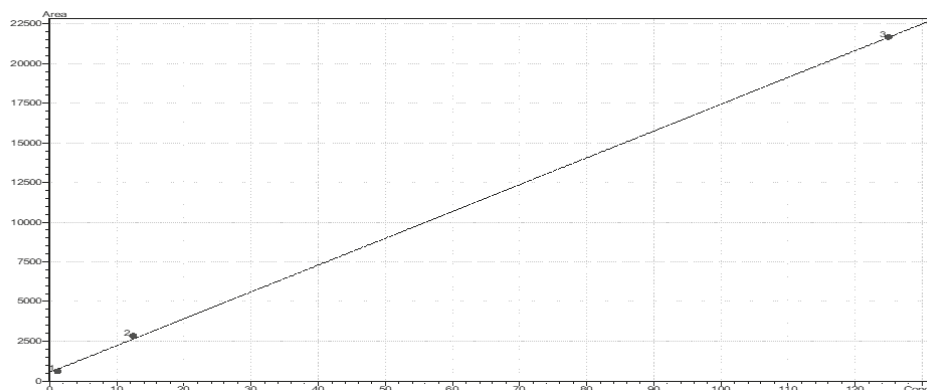


Рисунок 4. График калибровочной зависимости для определения 17-ОНРС в плазме КРС методом ВЭЖХ МС/МС

рали кровь. Полученные результаты показаны в таблице 3.

Согласно полученным данным, можно констатировать, что указанный прогестин хорошо детектируется прибором даже в низких концентрациях, и в заданных режимах, метод с успехом может использоваться для определения концентрации изучаемого стероида в плазме КРС (рис. 5).

Калибровка к аглепристону проводилась на плазме крупного рогатого скота при концентрации вещества в стандартных разведениях 1, 3 и 30 нг/мл. Выходы пиков наблюдались через 2,25 минуты, а оптимальный ион-прекурсор равнялся 432,2 а.е.м. Хроматограмма даже при низких концентрациях стероида имела низкий уровень шума (рис. 6). Построенный калибровочный график по 3 точкам характеризуется высокой корреляцией значений ($r=0,986$) и линейностью кривой.

После инъекции 20 мл 3% раствора аглепристона лактирующей корове, концентрация стероида в плазме на 2 день составила 7,2 нг/мл. Таким образом, разработанная методика позволяет провести дальнейшие исследования фармакокинетики вещества в организме крупного рогатого скота.

ВЫВОДЫ

Результаты работы показывают, что такие селективные модуляторы прогестеронового рецептора, как прогестерон, 17-

ОНРС и аглепристон хорошо детектируются методом ВЭЖХ МС/МС. Различные временные интервалы выхода пиков на хроматограмме дают возможность одновременно определять концентрацию указанных стероидов в пробе за один анализ, а установленные оптимальные условия позволяют проводить дальнейшее изучение фармакокинетических свойств после их применения.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Минобрнауки России № 0412-2019-0051 и проекта межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня «Российская Арктика: новые материалы, технологии и методы исследования».

DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF SELECTIVE PROGESTERONE RECEPTOR MODULATORS IN BLOOD PLASMA BY LC-MS/MS.
Nikolaev S. V. - Candidate of Veterinary Sciences, Researcher, Zhuravsky Institute of Agrobiotechnologies of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

ABSTRACT

High-performance liquid chromatography mass spectrometry is a hybrid method and combines independent processes of liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis, which makes it possible to effectively determine the concentration of

Таблица 3

Фармакокинетика 17-ОНРС в плазме крови при однократной инъекции 50 мл 12,5% раствора

Дни исследований	S пика	Концентрация 17-ОНРС в плазме крови (нг/мл)
До инъекции	498	0
1 день	19710	113,5
2 день	29835	173,4
3 день	20202	116,4
4 день	14467	82,4
5 день	10681	60,0
6 день	10559	59,3
7 день	10210	57,2
8 день	7662	42,1
9 день	6662	33,2
10 день	6152	32,2
11 день	5094	26,9
12 день	5070	26,8
13 день	4597	24,0
14 день	3214	15,8
15 день	2482	12,2
28 день	1746	7,1
40 день	1386	5,0

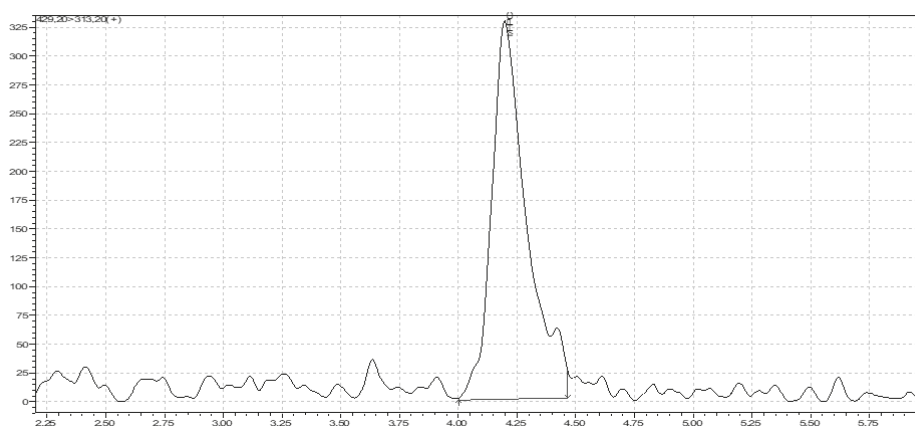


Рисунок 5. Визуализация выхода пика 17-ОНРС на хроматограмме (концентрации 12,2 нг/мл)

various substances in complex substances. The optimal parameters for the determination of progesterone, 17-hydroxyprogesterone capronate (17-ОНРС) and aglepriston in the blood plasma of cattle by this method have been established in the work. The quantitative determination of the

components was carried out by the method of an external standard using reference substances and preliminary construction of calibration dependencies (absolute calibration). To account for the effect on the result of the analysis of various components of blood plasma, the matrix calibration method was

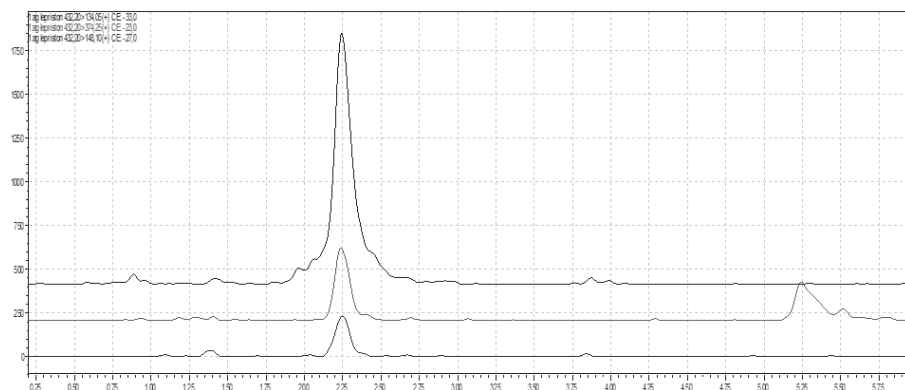


Рисунок 6. Визуализация выхода пиков аглепристона на хроматограмме (концентрации 1 нг/мл).

used using "pure" plasma, i.e., it did not contain detectable compounds. It was experimentally determined that the time of progesterone peak release is within 2.72 minutes, and the optimal precursor ion is $m/z = 315.3$. In the course of the work carried out, it was found that in the blood plasma of animals, endogenous progesterone is well detected by the developed method according to the parameters set for the synthetic analogue. The peak time of 17-OHPC occurred after 4.20 minutes, and the optimal precursor ion had a mass of 429.2 au. The first stage of studying the kinetics of 17-HPC in cattle showed that the steroid is well visualized on the chromatogram even in low concentrations. The outputs of the peaks of aglepriston were observed at 2.25 minutes, and the optimal precursor ion was equal to 432.2 au.m. The chromatogram even at low concentrations of the steroid had a low noise level, and the concentration of the steroid in the blood plasma a day after injection of 20 ml of 3% aglepriston solution to a lactating cow was 7.2 ng/ml. Thus, optimal parameters were selected for determining the concentration of selective progesterone receptor modulators in the blood plasma of cattle, which allows for further evaluation of the pharmacokinetic properties of these steroids after their use.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Enzyme linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence conformation of antinuclear antibodies / Copple S.S. [et all] // American society for

clinical pathology. – 2011. – Vol. 135. – P. 678-684.
 2. Garber, E. Detection of melamine using commercial enzyme linked immunosorbent assay technology / E. Garber // Journal of food protection. – 2008. – Vol. 71, № 3. – P. 590-594.
 3. Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, Dombrowski MP, Sibai B, Moawad AH, et al. . Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. N Engl J Med. (2003) 348:2379–85.
 4. Santhosh, C. R. (2006). Pharmacokinetics of 17 α -Hydroxy Progesterone Caproate in Cattle, Buffalo, Sheep and Goat (Doctoral dissertation, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar). <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/68575>
 5. Vittorio, A., Brigandi, A., Costabile, L., Abate, F.G., Balzano, E. and Perino, M., 17-alpha-Hydroxyprogesterone caproate and natural progesterone in assisted reproduction: a comparative study. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. (2004), 24:190-2.
 6. Бессонова Е.А. Хроматографическое и электрофоретическое определение стероидов и биогенных аминов в биологических объектах // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук Санкт-Петербург, 2004. – 20 с.
 7. Николаев С.В., Конопельцев И.Г. Пиометра у коров: распространение и терапия // Ветеринария. 2020. № 12. С. 39-43. DOI: 10.30896/0042-4846.2020.23.12.39-43