



Оригинальная статья / Research article

Разработка методики одновременного определения прегнанового стероида с гестагенной активностью гестобутаноила и двух его метаболитов в сыворотке крови крыс

Е. С. Степанова^{1*}, Л. М. Макаренкова¹, С. В. Горяинов¹, Т. А. Федотчева², Н. Л. Шимановский²

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова МЗ РФ), 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

* Контактное лицо: Степанова Елена Сергеевна. E-mail: stepanova_25@inbox.ru

ORCID: Е. С. Степанова – <https://orcid.org/0000-0003-2622-0434>; Л. М. Макаренкова – <https://orcid.org/0000-0002-7089-9792>; С. В. Горяинов – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Т. А. Федотчева – <https://orcid.org/0000-0003-4998-9991>; Н. Л. Шимановский – <https://orcid.org/0000-0001-8887-4420>.

Статья поступила: 13.01.2021

Статья принята в печать: 19.05.2021

Статья опубликована: 25.05.2021

Резюме

Введение. Гестобутаноил – синтетический прегнанный стероид с гестагенной активностью имеет два метаболита (АМОЛ и мегестрола ацетат), обладающих собственной фармакологической активностью. Из этого следует необходимость детального изучения кинетики метаболитов. Рационально объединить исследование фармакокинетики гестобутаноила и его метаболитов: АМОЛа и мегестрола ацетата. Одновременное определение нескольких аналитов в сыворотке крови экспериментальных животных (крыс) возможно осуществить при помощи современных аналитических методов хромато-масс-спектрометрии.

Цель. Разработать аналитическую методику одновременного определения гестобутаноила и двух его метаболитов в биологической матрице (сыворотке крови крыс).

Материалы и методы. Для определения гестобутаноила и двух его метаболитов в биологической матрице использовали следующие методы: ГХ-МС, ВЭЖХ-ESI-МС, ВЭЖХ-ESI-МС с дериватизацией аналитов, ВЭЖХ-APCI-МС.

Результаты и обсуждение. При работе с ГХ-МС хроматографические пики гестобутаноила, АМОЛа и мегестрола ацетата сильно размывались и накладывались друг на друга, что, по-видимому, обусловлено термолабильностью веществ. От метода ГХ-МС отказались в пользу ВЭЖХ. Аналиты разделялись при помощи ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования на колонке C18. Ионизация ESI не давала типичных протонированных ионов гестобутаноила и АМОЛа, а интенсивные сигналы их катионизированных ионов и ионов-фрагментов, которые наблюдались в спектрах АМОЛа и гестобутаноила, не могли обеспечить воспроизводимость спектров, поскольку условия их образования не подходят для рутинного анализа. Дериватизация аналитов с образованием оксимов и замещенных гидразонов не давала ожидаемых продуктов реакции для работы в ВЭЖХ-ESI-МС. APCI позволила убрать интенсивные катионизированные ионы из спектров гестобутаноила и АМОЛа и увеличить надежность метода. Методика ВЭЖХ-APCI-МС воспроизвелась на модельной сыворотке крови крыс.

Заключение. Разработана ВЭЖХ-МС-методика одновременного определения гестобутаноила, мегестрола ацетата и АМОЛа. Методика апробирована на модельной сыворотке крови крыс, содержащей все три аналита.

Ключевые слова: прегнанные стероиды, гестагены, гестобутаноил, АМОЛ, мегестрол ацетат, ВЭЖХ-МС, химическая ионизация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. А. Федотчева и Н. Л. Шимановский являются авторами патента на лекарственную форму таблетки Гестобутаноил® 0,002 г. С. В. Горяинов участвовал в работе над разделами ГХ-МС-анализ и ВЭЖХ-МС с дериватизацией аналитов. Е. С. Степанова и Л. М. Макаренкова участвовали в работе над разделами, включающими ВЭЖХ-МС-анализ с дериватизацией и различными типами ионизации. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-015-00195.

Для цитирования: Степанова Е. С., Макаренкова Л. М., Горяинов С. В., Федотчева Т. А., Шимановский Н. Л. Разработка методики одновременного определения прегнанового стероида с гестагенной активностью гестобутаноила и двух его метаболитов в сыворотке крови крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):112–118. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-112-118>

Development of Simultaneous Determination Method of a Pregnan Steroid with Gestagenic Activity – Gestobutanoil and Two its Metabolites in Rat Serum

Elena S. Stepanova^{1*}, Lyubov M. Makarenkova¹, Sergey V. Goryainov¹, Tatiana A. Fedotcheva²,
Nikolay L. Shimanovsky²

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

*Corresponding author: Elena S. Stepanova. E-mail: stepanova_25@inbox.ru

ORCID: Elena S. Stepanova – <https://orcid.org/0000-0003-2622-0434>; Lyubov M. Makarenkova – <https://orcid.org/0000-0002-7089-9792>; Sergey V. Goryainov – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Tatiana A. Fedotcheva – <https://orcid.org/0000-0003-4998-9991>; Nikolay L. Shimanovsky – <https://orcid.org/0000-0001-8887-4420>.

Received: 13.01.2021

Revised: 19.05.2021

Published: 25.05.2021

© Степанова Е. С., Макаренкова Л. М., Горяинов С. В., Федотчева Т. А., Шимановский Н. Л., 2021

© Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Goryainov S. V., Fedotcheva T. A., Shimanovsky N. L., 2021

Abstract

Introduction. Gestobutanoil is a synthetic pregnane steroid with gestagenic activity. Gestobutanoil has two pharmacologically active metabolites (AMOL and megestrol acetate). This implies the need for a detailed study of the kinetics of metabolites. It is rational to combine the study of the pharmacokinetics of gestobutanoil and its metabolites (AMOL and megestrol acetate). The simultaneous determination of several analytes in the rats' serum can be carried out using chromatography-mass-spectrometry.

Aim. Development of an analytical method for the simultaneous determination of gestobutanoil and two its metabolites in a biomatrix (rat serum).

Materials and methods. The following methods were used to determine gestobutanoil and two its metabolites in a biological matrix: GC-MS, HPLC-ESI-MS, HPLC-ESI-MS with derivatization, HPLC-APCI-MS.

Results and discussion. When working with GC-MS, the chromatographic peaks of gestobutanoil, AMOL, and megestrol acetate were strongly blurred and superimposed on each other, which is apparently due to the thermolability of the substances. The GC-MS method was abandoned in favor of HPLC. Analytes were separated by HPLC gradient elution on a C18 column. ESI ionization did not give typical protonated ions of gestobutanoil and AMOL, and the intense signals of their cationized ions and fragment ions, which were observed in the spectra of AMOL and gestobutanoil, could not ensure the reproducibility of the spectra, since the conditions of their formation are not suitable for routine analysis. Derivatization of analytes to form oximes and substituted hydrazones did not give the expected reaction products for HPLC-ESI-MS. APCI made it possible to remove intense cationized ions from the spectra of gestobutanoil and AMOL and to increase the reliability of the method. The HPLC-APCI-MS technique was reproduced on model rat blood serum.

Conclusion. An HPLC-MS method was developed for the simultaneous determination of gestobutanoil, megestrol acetate, and AMOL. The technique was tested on a model rat blood serum containing all three analytes.

Keywords: progestins, gestagens, gestobutanoil, AMOL, megestrol acetate, HPLC-MS, chemical ionization

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Tatiana A. Fedotcheva and Nikolay L. Shimanovsky are the authors of the patent for the dosage form of the tablet Gestobutanoil® 0.002 g. Sergey V. Goryainov did the GC-MS analysis and HPLC-MS with derivatization of analytes. Elena S. Stepanova and Lyubov M. Makarenkova participated in work on sections of HPLC-MS analysis with derivatization and various types of ionization. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

Acknowledgment. This work was supported by the RFBR grant No. 19-015-00195.

For citation: Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Goryainov S. V., Fedotcheva T. A., Shimanovsky N. L. Development of simultaneous determination method of a pregnan steroid with gestagenic activity - gestobutanoil and two its metabolites in rat serum. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):112–118. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-112-118>

ВВЕДЕНИЕ

Количественное определение эндогенных стероидных гормонов или их синтетических аналогов в рамках фармакокинетических исследований требует определенной подготовки и технической базы. В литературе для анализа стероидных гормонов в основном встречаются иммунохимические методы и методы хроматографии в сочетании с различными способами детектирования, включая масс-спектрометрию [1–4]. Стероидные гормоны являются производными циклопентанпергидрофенантрена, что придает их молекулам общие свойства липофильности и термолабильности. Впрочем, внутри группы стероидных гормонов физико-химические свойства могут различаться значительно за счет радикалов и функциональных групп, входящих в состав молекул. Данная особенность приводит к необходимости скринингового подхода к разработке методики их анализа. Фармакокинетические исследования предполагают рутинный анализ сложной биологической матрицы. Естественно, что разработка методики для подобных исследований направлена не только на соответствие валидационным требованиям и требованиям в отношении предела количественного определения, но и на достижение максимальной простоты проведения процедуры анализа.

В нашей работе анализом были прегнанные стероиды – производные 17-гидроксипрогестерона, обладающие гестагенной активностью [5, 6]: гестобутаноил (ГБ) и два его метаболита – мепрегенола ацетат (АМОЛ) и мегестрол ацетат (МА) [7, 8]. В исследованиях биологической активности гестобутаноил проявил гестагенный, контрацептивный и цитостатический эффекты [5, 6, 9]. Метаболит МА обладает доказанной фармакологической активностью, применяется как гестагенное, противоопухолевое и антикахеكتическое средство при онкологических заболеваниях и истощениях организма различного генеза, например СПИД, анорексия [10]. АМОЛ обладает гестагенной и контрацептивной активностью, что подтверждено в исследованиях на животных *in vivo* [6]. Структурно аналиты похожи (таблица 1). Разница состоит в различных радикалах, содержащихся в 3-м положении стероидного ядра их молекул.

Достоверную идентификацию и количественное определение аналитов мы предполагали получить при помощи хроматографического разделения и масс-детектирования.

Целью настоящего исследования было разработать универсальную аналитическую методику одновременного определения гестобутаноила и двух его метаболитов в биологической матрице.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция 17 α -ацетокси-3 β -бутаноилокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (ГБ) серия 280917, чистота $\geq 99,0\%$ (ВЭЖХ) и субстанция 17 α -ацетокси-3 β -гидрокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (АМОЛ) – продукт промежуточного синтеза субстанции ГБ, чистота $\geq 99,0\%$ (ВЭЖХ) – предоставлены ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, НИЛ молекулярной фармакологии, руководитель – чл.-корр. РАН, д. м. н. Н.Л. Шимановский; субстанция 17 α -гидрокси-6-метил-4,6-прегнадиен-3,20-дион-17-ацетата (МА) (Sigma, США).

Реактивы: Ацетонитрил LC/MS 99,9% (Optima LC/MS, США); вода (Optima LC/MS, США); реактив Жирара Т 98% (Sigma-Aldrich, США); гидроксилamina гидрохлорид 99% (Sigma-Aldrich, США).

Оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (Dionex, Германия) с масс-детектором MicrOTOF-Q II (Bruker, Германия). В работе использовали два источника ионизации: ионизацию методом распыления в электрическом поле (electrospray ionization, ESI) и химическую ионизацию при атмосферном давлении (atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Газовый хромато-масс-спектрометр модели GCMS-QP2020 (Shimadzu Corp., Япония).

Для дериватизации готовили два раствора: раствор реактива Жирара Т и раствор гидроксилamina. Реактив Жирара Т готовили путем растворения 0,5 г реактива в смеси метанол:уксусная кислота (лед.) (9:1). Раствор выдерживали на ультразвуковой бане до полного растворения крупинки реактива. Раствор гидроксилamina гидрохлорида готовили путем растворения 35 мг реактива в 3 мл воды, а затем к раствору добавляли 7 мл ацетонитрила.

Матричные растворы аналитов ГБ, МА и АМОЛа готовили в ацетонитриле в концентрации 0,1 мг/мл. Далее готовили два стандартных раствора – смесь аналитов в ацетонитриле. Стандартный раствор 1 с концентрацией АМОЛа 5000 нг/мл, ГБ 6000 нг/мл, МА 25 000 нг/мл; стандартный раствор 2 с концентрациями всех аналитов по 100 нг/мл. Для приготовления модельного образца к 180 мкл сыворотки добавляли 20 мкл стандартного раствора 1 или 2 и перемешивали. Пробоподготовка сыворотки заключалась в осаждении белков двукратным объемом ацетонитрила.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГХ-МС

Разделение проводили на колонке SH-Rxi-5ms 30 м \times 0,25 мм \times 0,25 мкм. Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий с постоянным потоком – 1,5 мл/мин; анализ осуществлялся в градиентном режиме. Температура колонки +40 °С (изотерма 1 мин), +300 °С (изотерма 12 мин), скорость подъема температуры 15 °С/мин. Общее время анализа – 30,0 мин. Тем-

пература испарителя +280 °С; температура ионного источника +200 °С; температура интерфейса +280 °С; режим ввода пробы – без деления потока – 1 мин; напряжение на детекторе – 0,84 кВ; ток эмиссии – 60 мкА; объем вводимой пробы – 0,1 мкл. Детектирование осуществляли в режиме полного ионного тока (SCAN) в диапазоне 40 m/z – 600 Да, со скоростью сканирования 1000 и результирующим временем 0,5 с.

На хроматограммах образцов присутствовали уширенные сигналы вместо пиков гауссовой формы, что, по-видимому, свидетельствует о термодеструкции этих соединений в инжекторе газового хроматографа.

ВЭЖХ-МС с ионизацией распылением в электрическом поле

Были подобраны условия хроматографического разделения АМОЛа, МА и ГБ. Три аналита разделялись на хроматограмме и имели разные времена удерживания при градиентном способе элюирования. Оптимизированные условия хроматографического разделения следующие: время 0,0 \rightarrow 8,0 \rightarrow 8,2 \rightarrow 14,0 \rightarrow 14,2 \rightarrow 20,0 мин; вода 50 \rightarrow 50 \rightarrow 10 \rightarrow 10 \rightarrow 50 \rightarrow 50%; ацетонитрил 50 \rightarrow 50 \rightarrow 90 \rightarrow 90 \rightarrow 50 \rightarrow 50%; при скорости потока элюента 0,3 мл/мин на колонке Thermo Scientific Acclaim 300-C18, 2,1 \times 150 мм, 3 мкм.

Условия детектирования: режим регистрации положительных ионов, температура источника 200 °С, напряжение на капилляре 4500 В, распыляющий (1,2 бар) и осушающий (5,0 л/мин) газ азот.

Масс-спектрометрическое детектирование аналитов выявило особенности их ионизации при распылении в электрическом поле (таблица 1). ГБ не образовывал ионов типа $[M + H]^+$, характерных для ионизации при распылении в электрическом поле (ESI). В спектре ГБ (рисунок 1) обнаруживались продукты фрагментации молекулы и катионизированные ионы типа $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$. Для количественного определения необходимо использовать наиболее интенсивный ион, воспроизводимо и надежно отображающий содержание аналита в пробе. Работа с катионизированными ионами редко может соответствовать этому требованию, поскольку использовать стандартизованную по содержанию катионов подвижную фазу в рутинном анализе без ущерба для оборудования затруднительно. Добавки солей в подвижную фазу могут привести к загрязнению камер детектора. Из-за нестабильности образования катионизированных ионов может страдать воспроизводимость спектра в целом.

АМОЛ, как и ГБ, подвергался фрагментации в источнике ионизации с образованием целого спектра ионов, в том числе катионизированных, и интенсивного фрагмента m/z 309,2. Такой же фрагмент имелся в спектре ГБ. В спектрах МА, единственного из трех аналитов, регистрировался характерный для ESI интенсивный основной ион типа $[M + H]^+$ m/z 385,2.

Таблица 1. Аналиты и их ионы в различных типах детекторов

Table 1. Analytes and their ions in different types of detectors

Название Name	Гестобутаноил (ГБ) Gestobutanoil (GB)	Меперегенаола ацетат (АМОЛ) Meperegenol acetate (AMOL)	Мегестрола ацетат (МА) Megestrol acetate (MA)
Структурная формула Structural formula			
Брутто формула Gross formula	$C_{28}H_{40}O_5$	$C_{24}H_{34}O_4$	$C_{24}H_{32}O_4$
Молекулярная масса Molecular mass	456,3	386,3	384,2
Ионы при ионизации в ESI Ions upon ionization in ESI	[M + Na] ⁺ m/z 479,3 [M + K] ⁺ 495,2 Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	[M + Na] ⁺ m/z 409,3 [M + K] ⁺ 425,2 Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	[M + H] ⁺ 385,2 Ион-фрагмент 325,2 Ion fragment 325.2
Ионы при ионизации в APCI Ions upon ionization in APCI	Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	[M + H] ⁺ 385,2 Ион-фрагмент 325,2 Ion fragment 325.2

Детектирование ГБ при помощи ВЭЖХ-ESI-МС показало: в спектрах ГБ и АМОЛ нет типичных для ESI ионов типа [M + H]⁺, что затруднило выбор целевого иона. Кроме того, данные молекулы легко фрагментировались в источнике ионизации, хотя распыление в электрическом поле относится к мягким способам ионизации и редко приводит к появлению спектра фрагментации. Основным недостатком данного метода было затруднение с выбором целевого иона, интенсивность которого надежно выражала бы количественное содержание аналита в пробе.

ВЭЖХ-МС с дериватизацией аналитов

Дериватизация аналитов возможна по их метилкетонным группам, содержащимся у всех аналитов в 17-м положении стероидного ядра молекулы, путем проведения реакции образования оксимов и гидразонов. Также МА имеет карбонильную группу в 3-м положении, которая может участвовать в данном типе реакций. В качестве дериватирующих веществ использовали два реактива: гидроксилamina гидрохлорид и реактив Жирара Т. Дериватизацию проводили

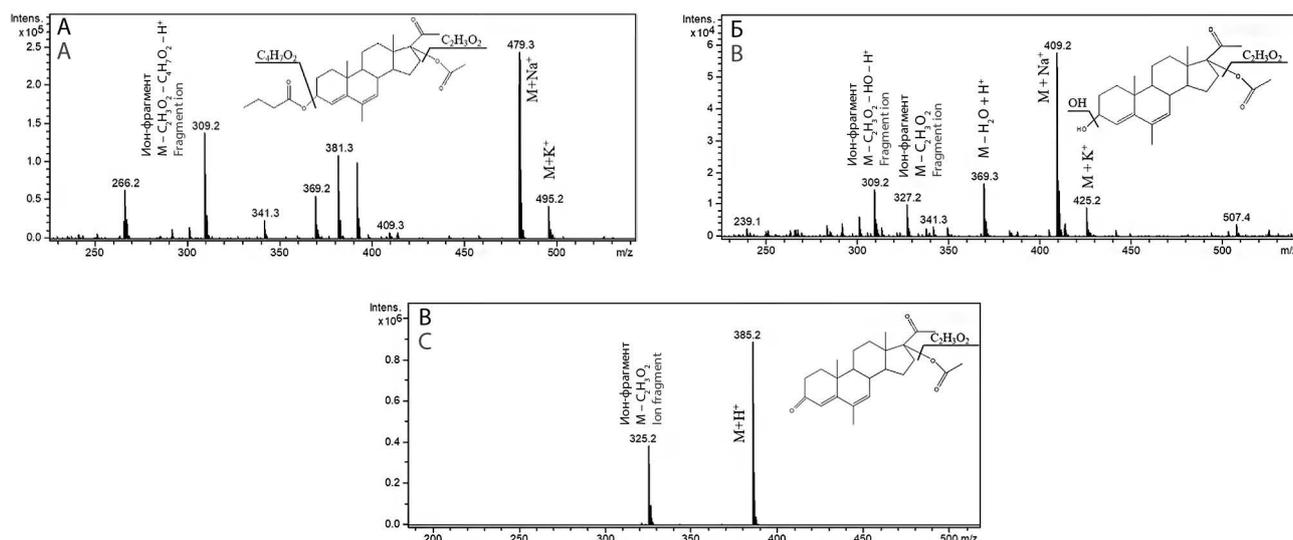


Рисунок 1. Масс-спектры аналитов при ионизации в ESI:

А – ГБ; Б – АМОЛ; В – МА

Figure 1. The ESI Mass spectra of analytes:

А – GB; Б – AMOL; В – MA

путем смешения раствора аналита и раствора гидроксиламина гидрохлорида или раствора реактива Жирара Т в соотношении 1:1. Дериватизацию проводили при нагревании до 60 °С в течение 30 мин.

Было установлено, что методика, используемая для ВЭЖХ-разделения аналитов, не подходит для разделения их дериватизированных молекул, поскольку в данных условиях они практически не удерживались на колонке. Для разделения дериватизированных аналитов использовали следующий градиентный режим: время 0,0 → 8,0 → 8,2 → 14,0 → 14,2 → 20,0 мин; вода 80 → 80 → 10 → 10 → 80 → 80 %; ацетонитрил 20 → 20 → 90 → 90 → 20 → 20 %; при скорости потока элюента 0,3 мл/мин на колонке Thermo Scientific Acclaim 300-C18, 2,1 × 150 мм, 3 мкм. Ионизация аналитов проводилась при помощи ESI. На основании расчетов после дериватизации с гидроксиламином мы могли бы ожидать появление в спектрах следующих ионов: МА с гидроксиламином $[M + H]^+$ m/z 400,2; АМОЛ с гидроксиламином $[M + H]^+$ m/z 402,2; ГБ с гидроксиламином $[M + H]^+$ m/z 472,2. Но это предположение было верным лишь для МА. АМОЛ и ГБ не имели собственных специфичных ионов (рисунок 2). При этом в спектрах АМОЛа и ГБ после дериватизации обнаруживались некоторые количества ионов m/z 400,2. Также была проведена дериватизация с реактивом Жирара Т. Ожидаемые ионы дериватов: МА m/z 498,2; АМОЛ m/z 501,2; ГБ m/z 572,2. В эксперименте с реактивом Жирара Т подтвердились результаты эксперимента с гидроксиламином. Только на хроматограмме дериватизированного МА была обнаружена ожидаемая масса 498,2 (рисунок 2). Анали-

ты ГБ и АМОЛ также имели на хроматограммах пики с массой 498,2.

Наличие одинаковых ионов в спектрах продуктов дериватизации ГБ, АМОЛа и МА указывает на невозможность дериватизации молекул по метилкетонным группам в 17-м положении циклопентанпергидрофенантрена. Взаимодействие дериватирующих агентов с МА, АМОЛом и ГБ, по-видимому, происходило через заместители у третьего атома углерода циклопентанпергидрофенантрена. У ГБ гидроксильная группа в 3-м положении защищена сложноэфирной связью, гидролиз которой в данных условиях был минимален, поскольку хроматограммы ГБ по выделенным ионам m/z 400,2 и 498,3 (рисунок 2) имеют небольшую интенсивность по сравнению с АМОЛом. Проведенный эксперимент показал, что дериватизация гидроксиламином и реактивом Жирара Т в данных условиях не подходит для одновременного определения ГБ, АМОЛа и МА в одной пробе.

ВЭЖХ-МС с химическим способом ионизации

Условия детектирования: режим регистрации положительных ионов, температура источника 210 °С, температура испарителя 400 °С, напряжение на капилляре 4000 В, коронный разряд 4000 нА, распыляющий (2,5 бар) и осушающий (4,5 л/мин) газ азот. Хроматографический режим такой же, как для ВЭЖХ-ESI-МС.

Спектры веществ в АРСІ, так же как и ESI-спектры, могут содержать протонированные ионы аналитов, но катионизированные ионы там практически не образуются. Данная особенность была подтверждена экспериментально. ГБ, АМОЛ и МА при ионизации в АРСІ имели практически те же спектры, что и в ESI, но ионы типа $[M + Na]^+$ и $[M + K]^+$ отсутствовали (таблица 1). Спектры аналитов при ионизации в АРСІ представлены на рисунке 3.

В качестве целевых ионов для АМОЛа и ГБ выбрали ионы-фрагменты с m/z 309,2, МА регистрировали в виде протонированной молекулы $[M + H]^+$ m/z 385,2.

Метод АРСІ-МС не требовал специальных условий для ионизации веществ и позволил избавиться от катионизированных ионов в спектрах ГБ и АМОЛа. При этом для работы с АРСІ подошла та же методика ВЭЖХ-разделения с теми же элюентами. Хроматограмма стандартного раствора 1 со смесью аналитов, разбавленного в 30 раз ацетнирилом, представлена на рисунке 4. Три аналита имели разные времена удерживания: t_R АМОЛа составило 8,2 мин; МА – 10,2 мин; ГБ – 16,2 мин.

Анализ сыворотки крови крыс

Апробация разработанной методики ВЭЖХ-АРСІ-МС была проведена на биоматрице – сыворотке крови интактных крыс. Были исследованы такие валидационные параметры, как специфичность и нижний предел количественного определения (НПКО). Были

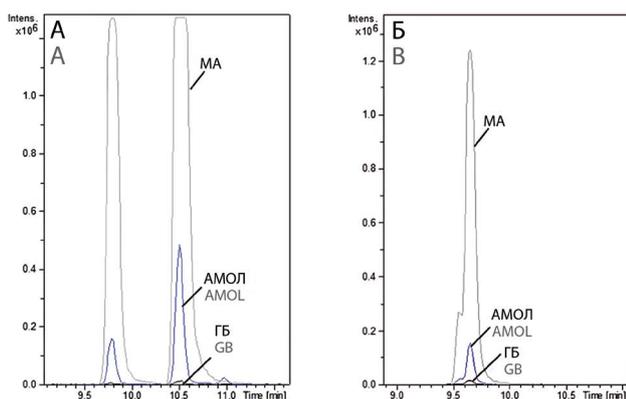


Рисунок 2. Наложенные хроматограммы продуктов дериватизации с А – гидроксиламином: по выделенным ионам m/z 400,2; Б – с реактивом Жирара Т по выделенным ионам m/z 498,3. На хроматограммах отмечены пики дериватов, полученные в индивидуальных растворах веществ МА, АМОЛ и ГБ

Figure 2. Overlaid chromatograms of derivatization products with А – hydroxylamine: for ions m/z 400.2; В – with Girard's reagent Т for ions m/z 498.3. The chromatograms show the derivatization products peaks in individual solutions of the substances МА, АМОЛ and GB

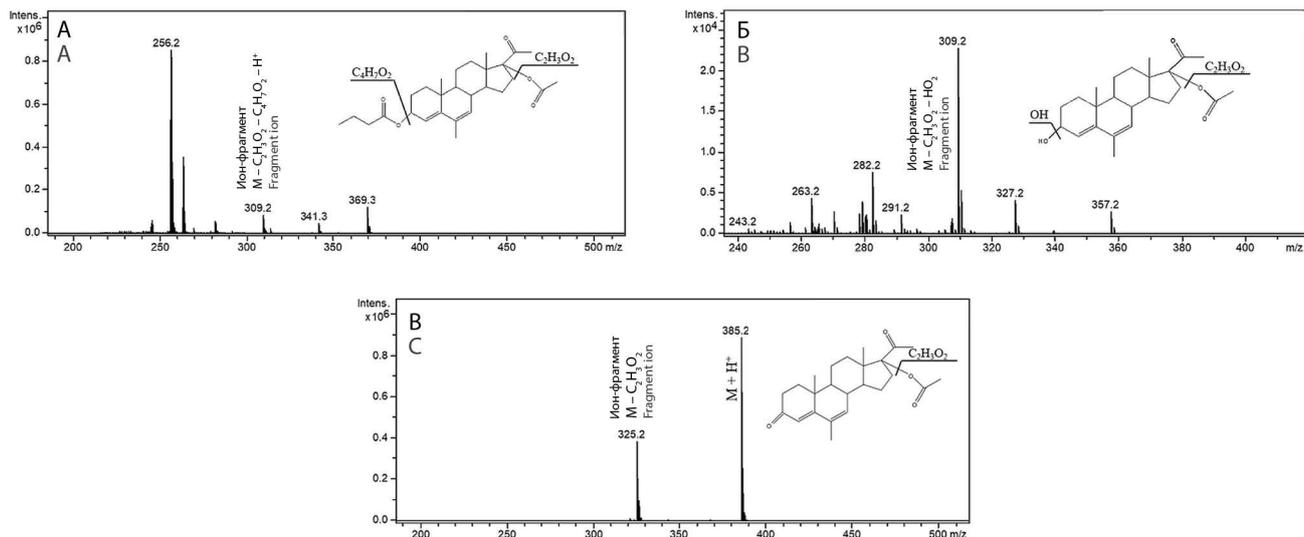


Рисунок 3. Масс-спектры аналитов при ионизации в APCI:

A – ГБ; Б – АМОЛ; В – МА

Figure 3. Mass spectra of analytes during ionization in APCI:

A – GB; B – AMOL; C – MA

проанализированы три пробы: интактная сыворотка и сыворотка крови с добавками стандартных растворов 1 и 2. Хроматограммы представлены на рисунке 4.

Сыворотка крови с добавкой стандартного раствора 1 показала воспроизведение времен удерживания аналитов по сравнению с хроматограммой стандартного раствора (рисунок 4, А, Б). В интактной сыворотке крови крыс не обнаружили эндогенных веществ, мешающих определению аналитов (рисунок 4, В). Сыворотка с добавкой стандартного раствора 2 (рисунок 4, Г) показала наличие трех пиков аналитов. Отношение S/N для НПКО должно составлять не менее 5/1. На рисунке 4, Г для ГБ, АМОЛа и МА отношение S/N составили более 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аналиты ГБ, АМОЛ и МА показали свою термоллабильность в анализе при помощи газовой хроматографии. Газовая хроматография приводила к невозможности разделения и детектирования аналитов. При помощи ВЭЖХ аналиты легко разделялись в градиентном режиме элюирования на колонке с привитой фазой C18. Были рассмотрены различные варианты масс-детектирования аналитов после хроматографического разделения. Ионизация при распылении в электрическом поле (ESI) показала наличие интенсивных сигналов катионизированных ионов в спектрах ГБ и АМОЛа и отсутствие типичных для ESI протонированных ионов, что затруднило выбор целевого иона. Была изучена возможность дериватизации молекул аналитов с целью повышения их способности к ионизации. Предложенная реакция образования оксимов и гидразонов с гидроксиламином и реак-

тивом Жирара Т не дала ожидаемых продуктов реакции АМОЛа и ГБ. Наиболее стабильным и удобным способом детектирования был определен способ химической ионизации, при котором у ГБ и АМОЛа в спектрах отсутствовали катионизированные ионы.

Апробация методики ВЭЖХ-APCI-МС на сыворотке крови крыс показала, что разработанная методика пригодна для одновременного определения трех аналитов ГБ, АМОЛа и МА в данной биоматрице.

ЛИТЕРАТУРА

- Fülöp I., Vari C.-E., Miklos A., Imre S. LC-MS/MS ESI methods for the determination of oestrogens and androgens in biological matrix – a minireview. *Farmacia*. 2017;65(4):485–493.
- Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D., Wang X. Quantitative-Profiling Method of Serum Steroid Hormones by Hydroxylamine-Derivatization HPLC-MS. *Natural Products and Bioprospecting*. 2019;9:201–208.
- Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(3–5):481–490. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.017.
- Taylor A. E., Keevil B., Huhtaniemi I. T. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):D1–12. DOI: 10.1530/EJE-15-0338.
- Sheina N. I., Parshin V. A., Kolesnikova V. V., Myalina L. I., Sazonova L. P., Fedotcheva T. A., Shimanovskii N. L. Generative function of female rats upon intragastric administration of tablets of the new steroid drug gestobutanol. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54:439–443. DOI: 10.1007/s11094-020-02219-6.
- Zeinalov O. A., Yaderets V. V., Stytsenko T. S., Petrosyan M. A., Andryushina V. A. Synthesis and biological activity of synthetic 17 α -hydroxyprogesterone derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46: 203–206.
- Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Rybakov Y. L., Gukasov V. M., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Votyakov V. A., Shimanovskii N. L. HPLC-MS method for simultaneous quantitative determination of an innovative russian gestagen and its metabolites in rat and rabbit blood sera. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;52(12):1016–1020. DOI: 10.1007/s11094-019-01944-x.

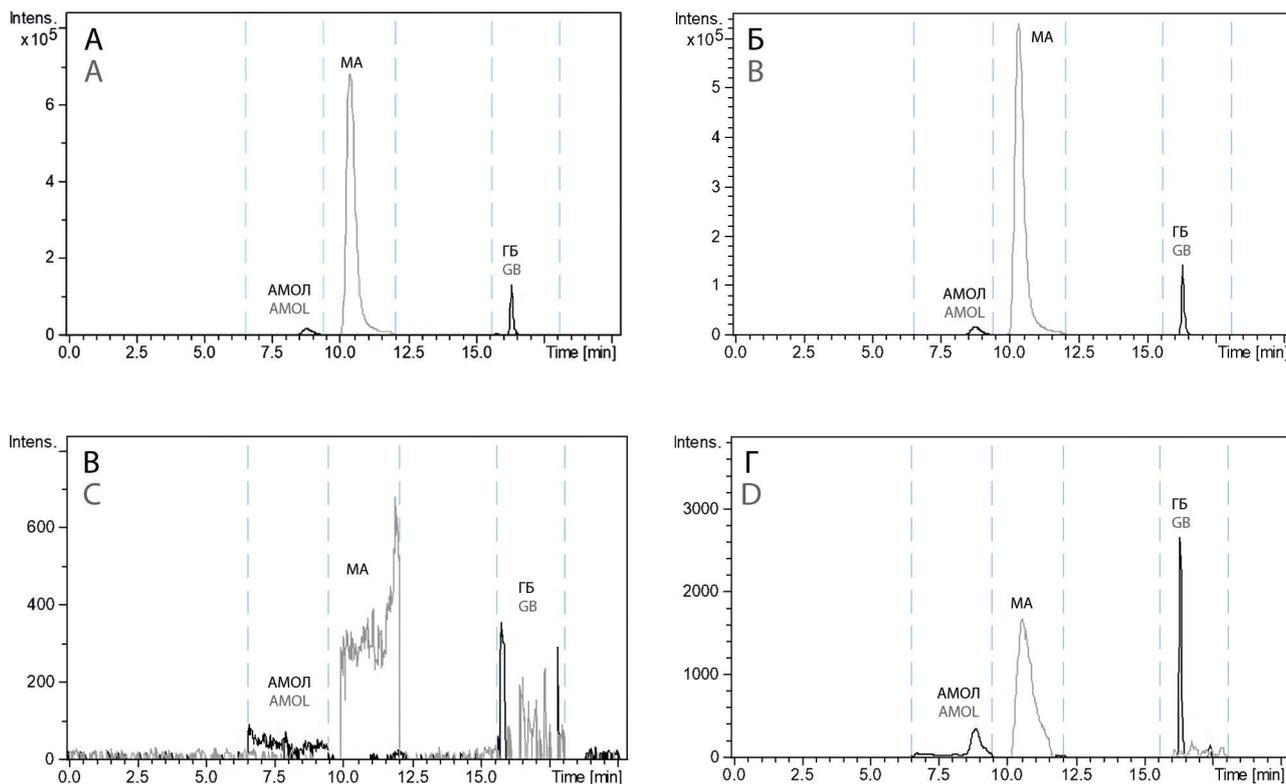


Рисунок 4. Хроматограммы:

A – стандартного раствора 1, разведенного в 30 раз ацетонитрилом; **Б** – сыворотки крови с добавкой стандартного раствора 1; **В** – интактной сыворотки крови; **Г** – сыворотки крови с добавкой стандартного раствора 2

Figure 4. Chromatograms:

A – standard solution 1, diluted 30 times with acetonitrile; **B** – blood serum with the addition of standard solution 1; **C** – intact blood serum; **D** – blood serum supplemented with standard solution 2

- Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Shimanovsky N. L. Metabolism of Gestobutanoil, a Novel Drug of Progestin Group. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019;11(3):48–53. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.06.
- Семейкин А. В., Федотчева Т. А., Свешникова Е. Д., Шилов Б. В., Смирнов А. С., Шимановский Н. Л. Цитостатическая активность и энергия лиганд-рецепторного взаимодействия нового отечественного гестагена гестобутаноила и его метаболитов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(11):3–8.
- Schindler A. E., Campagnoli C., Druckmann R., Huber J., Pasqualini J. R., Schweppe K. W., Thijssen J. H. H. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2008;61(1–2):171–80. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.11.013.
- Sheina N. I., Parshin V. A., Kolesnikova V. V., Myalina L. I., Sazonova L. P., Fedotcheva T. A., Shimanovskii N. L. Generative function of female rats upon intragastric administration of tablets of the new steroid drug gestobutanoil. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54:439–443. DOI: 10.1007/s11094-020-02219-6.
- Zeinalov O. A., Yaderets V. V., Stytsenko T. S., Petrosyan M. A., Andryushina V. A. Synthesis and biological activity of synthetic 17 α -hydroxyprogesterone derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46: 203–206.
- Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Rybakov Y. L., Gukasov V. M., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Votyakov V. A., Shimanovskii N. L. HPLC-MS method for simultaneous quantitative determination of an innovative russian gestagen and its metabolites in rat and rabbit blood sera. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;52(12):1016–1020. DOI: 10.1007/s11094-019-01944-x.
- Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Shimanovskii N. L. Metabolism of Gestobutanoil, a Novel Drug of Progestin Group. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019;11(3):48–53. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.06.
- Semeikin A. V., Fedotcheva T. A., Sveshnikova E. D., Shilov B. V., Smirnov A. S., Shimanovsky N. L. Cytostatic activity and ligand-receptor interaction energy of the new gestagen drug gestobutanoil and its metabolites. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(11):3–8. (In Russ.)
- Schindler A. E., Campagnoli C., Druckmann R., Huber J., Pasqualini J. R., Schweppe K. W., Thijssen J. H. H. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2008;61(1–2):171–80. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.11.013.

REFERENCES

- Fülöp I., Vari C.-E., Miklos A., Imre S. LC-MS/MS ESI methods for the determination of oestrogens and androgens in biological matrix – a minireview. *Farmacia*. 2017;65(4):485–493.
- Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D., Wang X. Quantitative-Profiling Method of Serum Steroid Hormones by Hydroxylamine-Derivatization HPLC-MS. *Natural Products and Bioprospecting*. 2019;9:201–208.
- Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(3–5):481–490. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.017.
- Taylor A. E., Keevil B., Huhtaniemi I. T. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):D1–12. DOI: 10.1530/EJE-15-0338.