

УДК 543.544.5.068.7;943.3; 615.074

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИЗОЛА И ЕГО МЕТАБОЛИТА В МОЧЕ КРЫС

М.И. Емельянов¹, В.В. Смирнов², А.А. Литвин¹, Г.Б. Колыванов¹, Е.В. Блынская^{1*}, С.Э. Кондаков³

¹НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН; ²НИИ иммунологии ФМБА России; ³кафедра химической кинетики химического факультета МГУ; e-mail: eaureus@mail.ru

Разработана методика совместного количественного определения кортизола и его метаболита (6-β-гидрокортизола) в моче крыс. Анализ проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-детектором. Предел количественного определения кортизола и его метаболита составил 1,0 и 2,5 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: кортизол, 6-β-гидрокортизол, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, количественное определение, межлекарственное взаимодействие.

В условиях современной фармакотерапии, использующей комбинации нескольких препаратов, крайне актуальным является определение возможности возникновения побочного действия активных веществ на разные органы и системы. Для изучения побочного действия комбинированных лекарственных средств на печень обычно исследуют влияние применяемых препаратов на метаболическую активность печеночных ферментов в комплексе и по отдельности [1]. Среди разных методов определения активности печеночных ферментов одной из наиболее перспективных является методика определения активности изоформы цитохрома P450 CYP3A4 *in vivo* по соотношению биомаркеров (кортизола к его метаболиту 6-β-гидрокортизолу).

Кортизол [(11β)-17,21-тригидроксипрегин-4-ен-3,20-дион] (рис. 1) является гормоном коры надпочечников, относится к классу стероидов (производных холестерина), к группе эндогенных соединений, наиболее удобных для изучения действия фармацевтических препаратов, поскольку участвует во многих биохимических процессах организма. Кортизол влияет на регуляцию обмена жиров, белков и углеводов, препятствует развитию воспалительной реакции, подавляет синтез антител, тормозит образование Т-лимфоцитов и стимулирует эритропоэз [2]. Биологическим метаболитом кортизола является 6-β-гидрокортизол [(6,11β)-17,21-тетрагидроксипрегин-4-ен-3,20-дион], образующийся в печени под действием изоформы цитохрома P450 3A4 путем гидроксирования атома углерода в положении 6 [3, 4].

Так как изофермент CYP3A4 содержится не только в печени, но и в клетках тонкого кишечника, то при введении внутрь маркерного субстрата определяют суммарную эффективность данного изофермента. При использовании эндогенного субстрата можно определить активность только печеночного изофермента CYP3A4, что делает метод более селективным. Однако до настоящего времени простых и быстрых методик совместного количественного определения кортизола и 6-β-гидрокортизола в литературе не описано.

Цель настоящей работы – разработка методики количественного определения кортизола и его метаболита в моче крыс на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектором для последующего изучения активности CYP3A4 при применении других фармацевтических препаратов.

Материалы и методы

Материалы. Кортизол (гидрокортизон) 98% H4001 («Sigma-Aldrich», Германия), 6-β-гидрокортизол

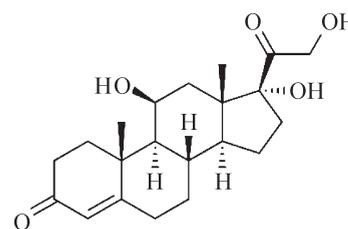


Рис. 1. Структурная формула кортизола (дигидрокортизона) [(11β)-17,21-тригидроксипрегин-4-ен-3,20-дион]

H6904 («Sigma-Aldrich», Германия), ацетонитрил для хроматографии марки «УФ» («Merck», Германия), эфир диэтиловый марки «х.ч.» («МедХимПром», Россия), изопропанол марки «х.ч.» («МедХимПром», Россия), метанол («Merck», Германия).

Методы. Пробы суточной мочи крыс анализировали с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Разделение проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1200 Series» с УФ-(G1316A TCC) и масс-детектором «6310 Ion Trap LC/MS». Обсчет хроматограм проводили с помощью программы «ChemStation» v 1.0.

Условия хроматографирования. В работе использовали хроматографическую колонку «Agilent XDB-C₁₈» (4,6×50 мм; 1,8 мкм). Для детектирования применяли УФ-детектор при длине волны 246 нм и масс-селективный детектор в режиме анализа SCAN с пределом обнаружения масс от 300–400 *m/z* (по-

лярность положительная; тип ионизации: MM-ES + APCI).

В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали воду, подкисленную муравьиной кислотой (1 мл муравьиной кислоты на 1 л воды, pH 4,5) и ацетонитрил в соотношении 55:45. Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Хроматографический анализ проводили при 20°C. Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане. Анализируемую пробу вводили при помощи автосамплера, объем вводимой пробы составлял 50 мкл.

Результаты и обсуждения

В ходе предварительных экспериментов было обнаружено, что в заданных режимах хроматографирования время удерживания кортизола и его метаболита составляет в среднем 2,6 и 4,6 мин соответственно, что позволяет разделить пики (рис. 2). Из представлен-

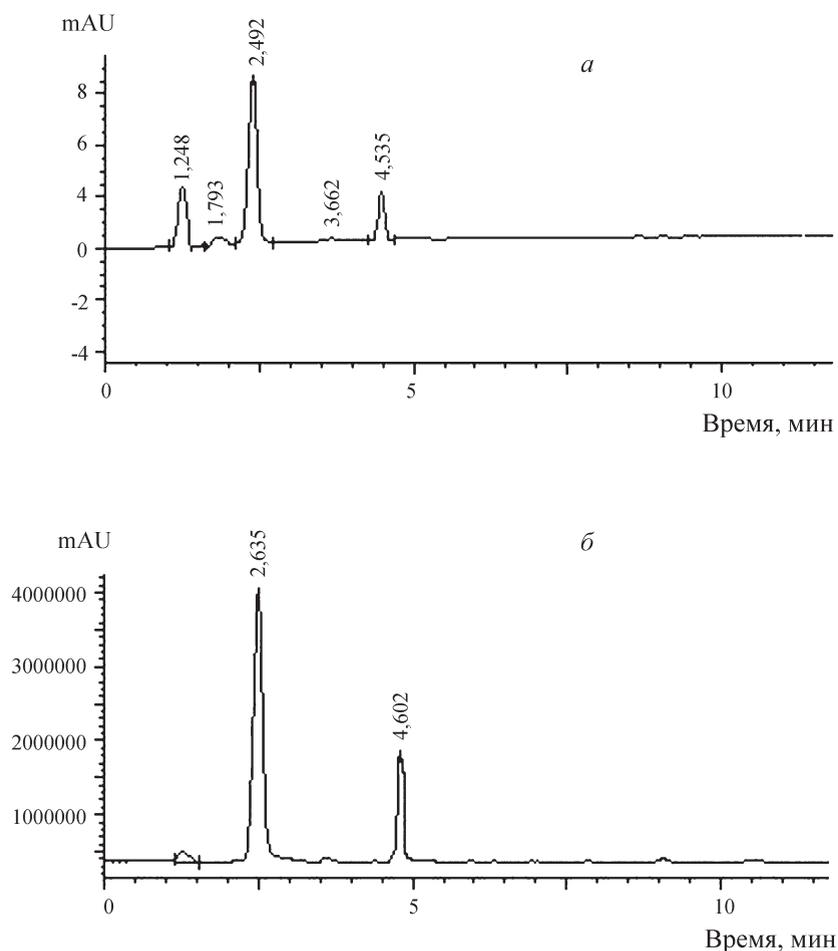


Рис. 2. Образец хроматограммы кортизола и его метаболита: а – УФ-детектирование, б – масс-детектирование

ных на рис. 2 данных видно, что использование разработанных условий проведения высокоэффективного жидкостного хроматографирования с масс-детектором позволяет избавиться от примесных пиков и добиться выраженного разделения определяемых веществ.

Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [5]. Линейность методики оценивали по семи калибровочным стандартам (1, 5, 10, 100, 250, 500, 1000, нг/мл). Стандарты готовили последовательным разведением ПФ матричных растворов кортизола и 6-β-гидрокортизола (100 мкг/мл в метаноле). Количество кортизола и его метаболита в хроматографических фракциях определяли методом абсолютной калибровки. В изучаемом диапазоне концентраций (C) отмечена линейная зависимость между концентрациями анализируемых соединений и соответствующими площадями хроматографических пиков (S), усредненное значение которых описывалось следующими уравнениями (n = 3):

для кортизола

$$S = 561,204 \times C + 6933,413 \quad (r = 0,9988);$$

для 6-β-гидрокортизола

$$S = 120,723 \times C + 801,848 \quad (r = 0,9999).$$

Разработанная методика метрологически охарактеризована на растворах стандартного образца кортизо-

ла и 6-β-гидрокортизола в моче крыс, не содержащей кортизола и 6-β-гидрокортизола. Мочу крыс, не содержащую кортизола и 6-β-гидрокортизола, получали путем трехкратной экстракции порции обычной мочи крыс смесью этилацетата и изопропанола (85:15).

Полученные результаты представлены в табл. 1, 2. Относительная ошибка определения кортизола для концентрации 2,5 нг/мл составила 8,4%. Относительная ошибка определения метаболита кортизола для концентрации 1,0 нг/мл составила 13,4%. Предел обнаружения кортизола и 6-β-гидрокортизола для разработанной методики составил 1,0 и 2,5 нг/мл соответственно.

Таким образом, разработанные условия проведения детектирования кортизола и его метаболита путем высокоэффективного жидкостного хроматографирования с масс-детектором позволяют добиться четкого разделения определяемых веществ. Методика может применяться для количественного определения кортизола и его метаболита в моче крыс и других млекопитающих для последующей оценки активности изоформы СУР3А4 при применении других фармацевтических препаратов и обладает рядом достоинств: малое время определения каждой пробы (около 6 мин) и простая пробоподготовка.

Т а б л и ц а 1

Метрологические характеристики методики определения кортизола

| Взято (нг/мл) | Найдено (нг/мл) | | | | | | \bar{x} | SD | $S_{\bar{x}}$ | $\Delta\bar{x}$ | ε% |
|---------------|-----------------|------|------|------|------|------|-----------|------|---------------|-----------------|------|
| 2,5 | 2,2 | 2,3 | 2,6 | 2,7 | 2,6 | 2,6 | 2,50 | 0,20 | 0,08 | 0,21 | 8,39 |
| 10,0 | 9,8 | 9,9 | 10,2 | 10,2 | 10,1 | 9,9 | 10,02 | 0,17 | 0,07 | 0,18 | 1,80 |
| 25,0 | 25,4 | 25,6 | 25,2 | 25,3 | 24,8 | 24,9 | 25,20 | 0,30 | 0,12 | 0,32 | 1,26 |

Примечание. \bar{x} – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение; $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение среднего результата; $\Delta\bar{x}$ – 95%-й доверительный интервал результата отдельного определения; ε% – относительная погрешность отдельного определения.

Т а б л и ц а 2

Метрологические характеристики методики определения 6-β-гидрокси-кортизола

| Взято (нг/мл) | Найдено (нг/мл) | | | | | | \bar{x} | SD | $S_{\bar{x}}$ | $\Delta\bar{x}$ | ε% |
|---------------|-----------------|------|------|-----|-----|-----|-----------|------|---------------|-----------------|-------|
| 1,0 | 0,9 | 1,2 | 0,9 | 1,1 | 1,2 | 1,1 | 1,07 | 0,14 | 0,06 | 0,14 | 13,44 |
| 5,0 | 4,7 | 4,8 | 4,9 | 4,9 | 5,1 | 5,1 | 4,92 | 0,16 | 0,07 | 0,17 | 3,42 |
| 10,0 | 10,2 | 10,1 | 10,1 | 9,7 | 9,7 | 9,8 | 9,93 | 0,23 | 0,09 | 0,24 | 2,38 |

Примечание. Обозначения см. в примечании к табл. 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жердев В.П., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б, Литвин А.А. // Тез. 5-й междунар. конф. «Биологический основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». М., 2010. С. 15.
2. Агаджанян Н.А., Смирнов В.М. Нормальная физиология. М., 2009.
3. Testa B., Kramer S.D. The biochemistry of drug metabolism: Principles, redox reactions, hydrolyses. Zurich, 2008.
4. Joellenbeck L., Qian Z., Zarba A. et al. // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 1992. 1. P. 567.
5. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств // Под ред. В.В. Береговых. М., 2008.

Поступила в редакцию 20.09.12

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CORTISOL AND ITS METABOLITE IN RAT URINE BY HPLC-MS METHOD

M.I. Emelyanov, V.V. Smirnov, A.A. Litvin, G.B. Kolyvanov, E.V. Blynskaya, S.E. Kondakov

(Zakusov Institute of Pharmacology RAMS; Research Institute of Immunology FMBA of Russia; Chemistry Dept. M.V.Lomonosov MSU)

The technique of quantitative determination of cortisol and its metabolite (6- β -hydroxycortisol) in rat urine was developed. The analysis was provided with high-performance liquid chromatography with mass-selective detector. The limits of quantification of cortisol and its metabolite were 1,0 and 2,5 ng/ml, respectively.

Keywords: cortisol, 6- β -hydroxycortisol, quantitative determination, HPLC-MS, drug interaction.

Сведения об авторах: Емельянов Михаил Игоревич – аспирант лаборатории фармакокинетики НИИ Фармакологии им. В. В. Закусова РАМН (Mihail.eml@mail.ru); Смирнов Валерий Валерьевич – зав. лабораторией клинической фармакологии № 73 НИИ иммунологии ФМБА России, канд. фарм. наук (vall@mail.mipt.ru); Литвин Александр Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, докт. биол. наук (litbiopharm@yandex.ru); Колыванов Геннадий Борисович – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, докт. биол. наук; Бlynская Евгения Викторовна – ст. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм, канд. фарм. наук (eaureus@mail.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. фарм. наук (kse@excite.chem.msu.ru).