



УДК 543.544.5.068.7+543.51+543.062

Методологические аспекты определения оксимов стероидных гормонов методом ВЭЖХ-МС/МС

© 2021 Дмитриева Е.В., Темердашев А.З., Азарян А.А.

Кубанский государственный университет, Краснодар

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3638

Рассмотрены методологические аспекты применения дериватизации стероидных гормонов с использованием гидроксилamina для дальнейшего количественного анализа производных андрогенов, эстрогенов, прогестиннов и глюкокортикоидов. Известно, что его использование позволяет значительно увеличить чувствительность масс-спектрометрического детектирования некоторых стероидных гормонов ввиду образования легко ионизирующихся оксимов стероидов, а реакция получения производных является простой.

Однако наряду с перечисленными достоинствами, при использовании данного способа происходит образование стереоизомеров, что приводит к расщеплению или полному разделению пиков дериватов на хроматограммах. Изменение программы градиентного элюирования не всегда позволяет получить один пик деривата без потери эффективности и селективности разделения остальных аналитов, присутствующих в пробе, что делает актуальным вопрос выбора «мишени» для анализа. Принимая во внимание наличие выраженных матричных эффектов при проведении определения стероидных гормонов и их производных в биологических жидкостях с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией, подобное поведение веществ при их хроматографическом разделении может быть использовано для повышения точности и надежности получаемых результатов благодаря интегрированию не всех пиков дериватов, а путем выбора одного, наименее подверженного матричным эффектам, обусловленным, например, коэлюированием компонентов пробы. Это связано с тем, что в процессе протекания реакции формирования их изоформ происходит воспроизводимо, с одинаковым выходом, независимо от концентраций и матрицы, в которой протекает процесс.

Приведены результаты определения некоторых оксимов стероидных гормонов, рассмотрены аспекты, влияющие на точность, воспроизводимость и чувствительность анализа на примере определения оксимов эстрона и 11α -гидроксипрогестерона в диапазоне концентраций от 2.5 до 1000 нг/см³. Идентификация производных и контроль полноты протекания реакции проводили с использованием стандартных образцов исследуемых соединений и масс-спектрометрии высокого разрешения. Показано, что данная процедура дериватизации позволяет добиться значительно большей чувствительности по сравнению с подходами, основывающимися на прямом определении стероидных гормонов с использованием ВЭЖХ-МС/МС. В случае необходимости чувствительность может быть повышена путем применения методов предварительного концентрирования и очистки образцов.

Ключевые слова: стероидные гормоны, дериватизация, гидроксилamin, определение.

Введение

Стероидные гормоны – класс соединений, получаемый из общего предшественника холестерина и выполняющий множество функций в организме человека, включая развитие и функционирование репродуктивной системы. Несмотря

на кажущееся структурное сходство, роли, выполняемые ими в организме, значительно отличаются, что привело к выделению нескольких классов стероидных гормонов, основываясь на общности некоторых регуляторных функций: андрогены, эстрогены, прогестины, минерало-

кортикоиды и глюкокортикоиды [1]. Это обстоятельство привело к тому, что их определение стало играть большую роль в целях клинической диагностики и допинг-контроля [2].

Учитывая значительный разброс их концентраций в биологических жидкостях (от десятых нг/см³ до тысяч нг/см³), разработка методик, способных охватить подобный широкий рабочий диапазон концентраций представляет большой интерес. Наиболее распространенным и удобным подходом в этих целях является применение дериватизации в сочетании с методами концентрирования – твердофазной, жидкость-жидкостной экстракции и т.д. [3-9].

Исходя из этих требований, сочетание хроматографических и масс-спектрометрических методов анализа представляется оптимальным: использование хроматографических методов позволяет добиться разделения изомеров, в то время как применение масс-спектрометрического детектирования имеет ряд таких преимуществ как возможность одновременного детектирования широкого спектра соединений, широкий динамический диапазон и высокая селективность [2]. Однако даже в случае высоких факторов концентрирования чувствительность может быть недостаточной ввиду невысокой эффективности ионизации некоторых соединений. Решением данной проблемы может стать получение легко ионизирующихся производных исследуемых соединений.

Примером такого подхода является применение гидросиламина в целях дериватизации соединений, содержащих одну или несколько карбонильных групп. Результатом их взаимодействия с гидросиламином является образование оксимов определяемых соединений, эффективность ионизации которых значительно выше благодаря возможности легкого протонирования атома азота. Для эстрогенов подобный подход позволяет увеличить чувствительность в десятки, а, порой, и в сотни раз. Недостат-

ком подобного подхода является образование нескольких стерических изомеров, при этом на хроматограммах может наблюдаться расщепленный пик изомеров соединения (который возможно интегрировать как один) либо несколько пиков. Оптимизация условий градиентного элюирования не всегда позволяет добиться образования одного или расщепленного пика без потери селективности или эффективности хроматографического разделения, поэтому целью данной работы является нахождение оптимального способа обработки результатов количественного анализа, обеспечивающего высокую чувствительность и селективность определения для некоторых стероидных гормонов.

Экспериментальная часть

Приборы и оборудование. В ходе проведения исследования использовали систему, состоящую из ультравысокоэффективного жидкостного хроматографа Bruker Elute и квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker MaXis Impact с источником электрораспылительной ионизации (Бремен, Германия). Разделение аналитов проводилось с использованием колонки Phenomenex Kinetex C18 (2.1 × 100 мм, 1.7 мкм) с соответствующей предохранительной колонкой с использованием системы 0.1% муравьиная кислота в воде (элюент А): 0.1% муравьиная кислота в метаноле. Использовали следующие условия градиентного элюирования: 1.00 мин – 95% А, 2.70 мин – 40% А, 4.00 мин – 40% А, 5.00 мин – 10% А, 7.50 мин – 10% А, 7.51 мин – 95% А, 9.00 мин – 95% А, при температуре термостата 40°C и скорости потока подвижной фазы 0.4 мл/мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования. Детектирование осуществлялось в следующих условиях: температура источника ионизации – 250°C, напряжение на капилляре – 4000 В, напряжение на экстрагирующей линзе – 500 В, давление газа-распылителя –

Таблица 1. Условия масс-спектрометрического детектирования определяемых оксимов стероидных гормонов

Table 1. Conditions for mass spectrometric detection of the determined oximes of steroid hormones

Аналит	Элементный состав	Моноизотопная масса, Да	[M+H] ⁺ , Да	Ошибка определения масс, ppm
Производное тестостерона	C ₁₉ H ₂₉ NO ₂	303.2198	304.2271	2.6
Производное дигидротестостерона	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂	305.2355	306.2428	0.7
Производное кортизона	C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₅	390.2155	391.2227	2.0
Производное кортизола	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₅	392.2311	393.2384	1.8
Производное прогестерона	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	344.2464	345.2537	2.0
Производное 11α-гидроксипрогестерона	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₃	360.2413	361.2486	1.9
Производное эстрона	C ₁₈ H ₂₃ NO ₂	285.1729	286.1802	1.7

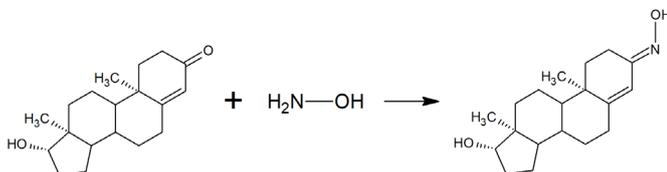


Рис. 1. Уравнение реакции между тестостероном и гидроксиламином.

Fig. 1. Equation for the reaction between testosterone and hydroxylamine.

100 кПа, расход газа-осушителя – 5 дм³/мин, скорость сканирования – 3 Гц, диапазон сканирования масс – 150–1000 Да, давление газа-мишени (азот) – 1.5 мторр. Условия детектирования представлены в табл. 1.

Реактивы и материалы. Стандартные образцы тестостерона, дигидротестостерона, кортизона, гидрокортизона (кортизола), эстрона, 11α-гидроксипрогестерона были приобретены у Sigma-Aldrich (США). Использовали метанол (J.T.Baker, Нидерланды) квалификации «для ВЭЖХ», муравьиную кислоту (Acros Organics, 98%). Воду (18.2 МΩ·см) получили с помощью системы Milli-Q. 50% водный раствор гидроксиламина приобрели также у Sigma-Aldrich (Германия).

Получение оксимов стероидных гормонов. Для получения производных стероидных гормонов термостатировали виалу, содержащую исследуемые аналиты с 10% раствором гидроксиламина в течение 2 ч при 70°C с последующим анализом.

Обсуждение результатов

Гидроксиламин является одним из самых удобных дериватирующих агентов для соединений, содержащих карбонильную группу: реакция с ним идет в водной среде даже при комнатной температуре и не требует специальных условий (контроля рН среды и т.д.). На рис. 1 приведено уравнение реакции получения оксима тестостерона. Аналогично протекают реакции и с другими стероидными гормонами.

К сожалению, данный подход имеет и ряд недостатков, один из которых был описан ранее – образование стереоизомеров, в результате чего хроматографические пики дериватов расщепляются. Как видно из рис. 2 (а-в) для тестостерона (1), дигидротестостерона (2), кортизона (3), кортизола (4), прогестерона (5) пики оксимов расщепляются, но не разделяются полностью, делая количественный анализ беспроблемным, позволяя интегрировать их как один пик.

В то же время для эстрона (рис. 3а) и 11α-гидроксипрогестерона (рис. 3б) наблю-

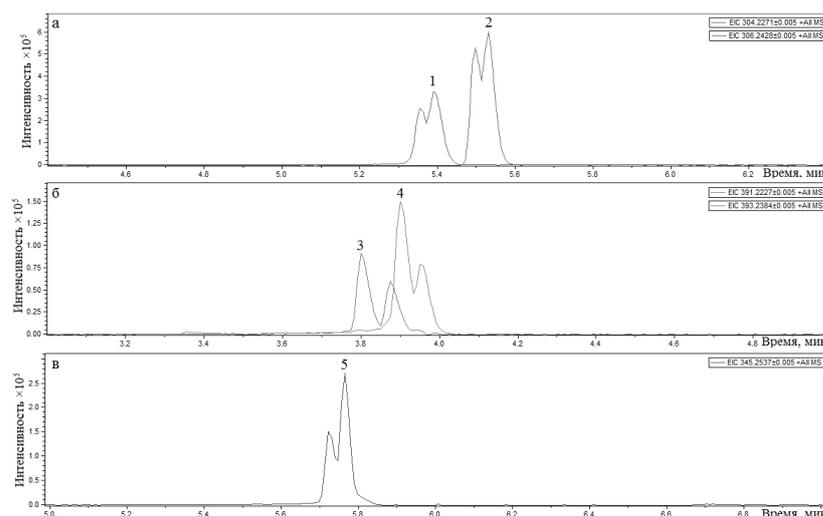


Рис. 2. Хроматограммы производных стероидных гормонов: 1 – тестостерона, 2 – 11 α -гидроксипрогестерона, 3 – кортизона, 4 – кортизола, 5 – прогестерона.

Fig. 2. Chromatograms of steroid hormone derivatives: 1 – testosterone, 2 – 11 α -hydroxyprogesterone, 3 – cortisone, 4 – cortisol, 5 – progesterone.

дается несколько полностью разрешенных пиков, соответствующих стереоизомерам производных. Оценка чувствительности проводилась с использованием растворов с концентрациями от 2.5 до 1000 нг/см³ (рис. 3 а,б).

В этом случае очевидным вариантом для проведения количественного анализа является интегрирование всех пиков, принадлежащих одному веществу с целью суммирования их площадей для проведения количественного анализа.

Подобный подход, а именно интегрирование нескольких пиков, является широко распространенным в эколого-

аналитической практике и используется при определении хлофена А-50. Однако в рассматриваемом случае целью анализа являются стереоизомеры одного соединения. В этом случае для проведения анализа интересным представляется оценка возможности применения только одного пика аналита, который будет наименее подвержен матричным воздействиям в реальном образце. Таким образом, построенная градуировочная зависимость с интегрированием пика только одного изомера позволит увеличить точность проводимого количественного анализа.

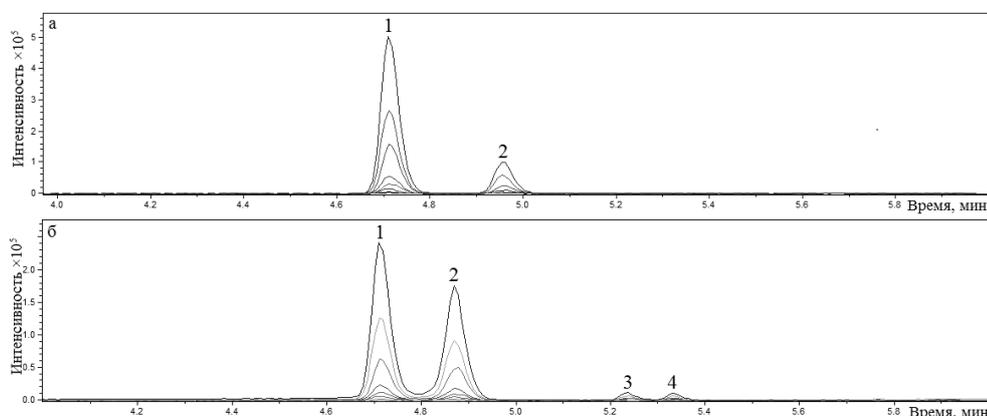


Рис. 3. Хроматограммы производных эстрона (а) и 11 α -гидроксипрогестерона (б) в диапазоне концентраций 2.5-1000 нг/см³.

Fig. 3. Chromatograms of derivatives of (a) estrone and (b) 11 α -hydroxyprogesterone within the concentration range of 2.5-1000 ng/cm³

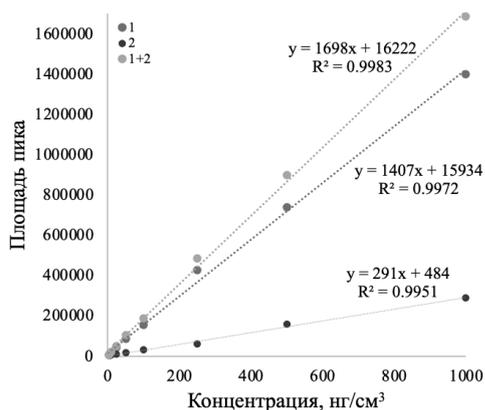


Рис. 4. Градуировочная зависимость концентрации оксима эстрона от площадей пиков.

Fig. 4. Calibration dependence of the estrone oxime concentration on peak areas.

Для этого на примере эстрона были построены градуировочные зависимости как суммы пиков всех форм, так и отдельных пиков (рис. 4). Из представленных данных видно, что получение воспроизводимых результатов для определения эстрона возможно как с использованием одного изомера, имеющего время удерживания 4.7 мин, так и суммы площадей двух пиков. Использование же исключительно второго пика для проведения количественного анализа, приводит к значительному уменьшению чувствительности.

Используя аналогичный подход к обработке результатов было установлено, что для 11 α -гидроксипрогестерона оптимальным является использование как пиков 1 и 2 по отдельности, так и суммы

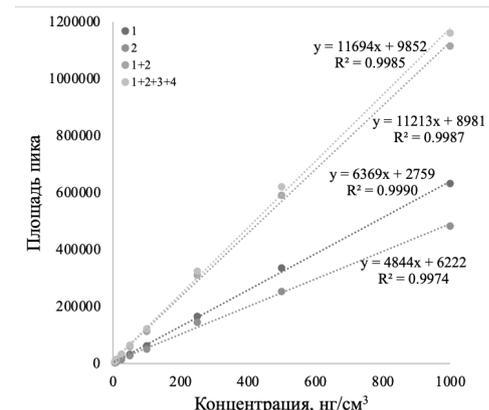


Рис. 5. Градуировочная зависимость концентрации оксима

11 α -гидроксипрогестерона от площадей пиков.

Fig. 5. Calibration dependence of the 11 α -hydroxyprogesterone oxime concentration on peak areas.

их интегралов (рис. 5). В то же время возможно пренебрежение пиками 3 и 4, так как их интенсивность является невысокой даже в стандартных растворах.

Заключение

Использование гидроксиламина в качестве дериватизирующего агента обладает множеством преимуществ, однако наиболее важным является значительное увеличение чувствительности определения. Главный недостаток дериватизации гидроксиламином – образование стереических изомеров, приводящих к расщеплению пиков, можно нивелировать интегрированием одного или суммы пиков, что было продемонстрировано на примере эстрона и 11 α -гидроксипрогестерона.

Инновационный проект выполнен при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП-20.1/4 с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета.

Список литературы

1. Whirlidge S., Cidlowski J.A. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 8th ed., Elsevier. 2019. Vol. 5. pp. 115-131.

2. Cook-Botelho J.C., Bachmann L., French D., Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory. Academic Press. 2017. Vol. 10. pp. 205-230.

3. Keski-Rahkonen P., Huhtinen K., Poutanen M., Auriola S. // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2011. Vol. 127(3-5). pp. 396-404.
4. Kushnir M.M., Blamires T., Rockwood A.L., Roberts W.L. et al. // *Clin. Chem.* 2010. Vol. 56(7). pp. 1138-1147.
5. Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D. et al. // *Nat. Prod. Bioprospect.* 2019. Vol. 9(3). pp. 201-208.
6. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Bergquist J., Varshavsky M., et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2008. Vol. 129(4). pp. 530-539.
7. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Roberts W.L., Pattison E.G. et al. // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52(1). pp. 120-128.
8. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Roberts W.L., Pattison E.G. et al. // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52(8). pp. 1559-1567.
9. Nelson R.E., Grebe S.K., OKane D.J., Singh R.J. // *Clin Chem.* 2004. Vol. 50(2). pp. 373-384.

Methodological aspects of determining oximes of steroid hormones by UHPLC-HRMS

© 2021 Dmitrieva E.V., Temerdashev A.Z., Azaryan A.A.

Kuban State University, Krasnodar

The study considers the methodological aspects of applying derivatisation of steroid hormones using hydroxylamine for further quantitative analysis of derivatives of androgens, estrogens, progestins, and glucocorticoids. It is known that hydroxylamine can significantly increase the sensitivity of mass spectrometric detection of some steroid hormones due to the formation of easily ionised oximes of steroids. What is more, the reaction for obtaining derivatives is simple.

However, alongside with the listed advantages, this method is accompanied by the formation of stereoisomers, which leads to the splitting or complete separation of the derivative peaks in chromatograms. Changing the gradient elution program does not always allow obtaining one derivative peak without affecting the efficiency and selectivity of the separation of the remaining analytes present in the sample. This makes the issue of choosing a “target” for analysis important. Determination of steroid hormones and their derivatives in biological fluids using the HPLC-MS (/MS) method with electrospray ionisation is accompanied by pronounced matrix effects. Such behaviour of substances during their chromatographic separation can be used to increase the accuracy and reliability of the results obtained due to the integration of not all peaks of derivatives, but by choosing one that is least susceptible to matrix effects caused, for example, by the coelution of sample components. This can be explained by the fact that during the reaction their isoforms are formed reproducibly, with the same yield regardless of the concentration and the matrix in which the process takes place.

The paper presents the results of the determination of some oximes of steroid hormones, considers the aspects influencing the accuracy, reproducibility, and sensitivity of the analysis on the example of determination of oximes of estrone and 11α -hydroxyprogesterone within the concentration range from 2.5 to 1000 ng/cm³. The identification of derivatives and the completeness of the reaction were controlled using standard samples of the studied compounds and high-resolution mass spectrometry. It was shown that the derivatisation procedure allows achieving a significantly higher sensitivity compared to approaches based on the direct determination of steroid hormones using HPLC-MS (/MS). If necessary, the sensitivity can be increased by the methods of preliminary concentration and purification of samples.

Keywords: steroid hormones, derivatisation, hydroxylamine, determination.

References

1. Whirledge S., Cidlowski J.A., Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management, 8th ed., Elsevier, 2019, Vol. 5, pp. 115-131. DOI: 10.1016/B978-0-323-47912-7.00005-6.
2. Cook-Botelho J.C., Bachmann L., French D., Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory, Academic Press, 2017, Vol. 10, pp. 205-230. DOI: 10.1016/B978-0-12-800871-3.00010-9.
3. Keski-Rahkonen P., Huhtinen K., Poutanen M., Auriola S., *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2011, Vol. 127(3-5), pp. 396-404. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.06.006.
4. Kushnir M.M., Blamires T., Rockwood A.L., Roberts W.L. et al., *Clin. Chem.*, 2010,

Vol. 56(7), pp. 1138-1147. DOI: 10.1373/clinchem.2010.143222.

5. Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D. et al., *Nat. Prod. Bioprospect.*, 2019, Vol. 9(3), pp. 201-208. DOI: 10.1007/s13659-019-0204-3.

6. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Bergquist J., Varshavsky M. et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 2008, Vol. 129(4), pp. 530-539. DOI: 10.1309/LC03BHQ5XJPJYEKG.

7. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Roberts W.L., Pattison E.G. et al., *Clin. Chem.*, 2006,

Vol. 52(1), pp. 120-128. DOI: 10.1373/clinchem.2005.052167.

8. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Roberts W.L., Pattison E.G. et al., *Clin. Chem.*, 2006, Vol. 52(8), pp. 1559-1567. DOI: 10.1373/clinchem.2006.068445.

9. Nelson R.E., Grebe S.K., OKane D.J., Singh R.J., *Clin Chem.*, 2004, Vol. 50(2), pp. 373-384. DOI: 10.1373/clinchem.2003.025478.

Дмитриева Екатерина Владимировна – аспирант кафедры аналитической химии, Кубанский государственный университет, Краснодар

Темердашев Азамат Зауалевич – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии, Кубанский государственный университет, Краснодар

Азрян Алиса Андреевна – к.х.н., старший преподаватель кафедры аналитической химии, Кубанский государственный университет, Краснодар

Dmitrieva Ekaterina V. – Ph.D. student, analytical chemistry department, Kuban State University, Krasnodar, e-mail: cathe-rine_dmitrieva@outlook.com

Temerdashev Azamat Z. – Ph. D. (chemistry), associate prof., department of analytical chemistry, Kuban State University, Krasnodar, e-mail: temerdashevaz@gmail.com

Azaryan Alice A. – Ph. D. (chemistry), lecturer, department of analytical chemistry, Kuban State University, Krasnodar, e-mail: lis_ka@mail.ru