

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЬЮГИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ СТЕРОИДОВ НА ПРИМЕРЕ ТРЕНБОЛОНА

Т.Соболевский, к.х.н., М.Дикунец, к.х.н., Г.Дудко, Г.Родченков, к.х.н., ФГУП АДЦ
dikunets@yandex.ru

В работе изучена фаза II метаболизма тренболонa путем прямого анализа мочи после приема препарата методом сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Полученные данные свидетельствуют о том, что глюкуронид эпитренболонa является основным метаболитом тренболонa. Кроме того, обнаружен пик с точной массой, формально соответствующей протонированной молекуле тренболонa, который идентифицирован как цистеинильный конъюгат (эпи)тренболонa. Наименьшая концентрация эпитренболонa во внутрилабораторных и внешних образцах контроля качества (полученных от ВАДА) составила около 0,5 нг/мл (в пересчете на агликон). Отношение площадей пиков цистеинильного и глюкуроно-конъюгатов в образцах мочи после приема препарата в большинстве случаев варьировалось от 0,1 до 0,8, а максимальное значение составило 25.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии со статистикой ВАДА за 2014 год, антидопинговыми лабораториями по всему миру сообщено о 57 неблагоприятных результатах анализа (adverse analytical finding, AAF) по тренболону, 239 – по станозололу, 123 – по метандиенону и 84 – по метенолону [1]. Такую ситуацию можно объяснить относительно непродолжительным временным интервалом детектирования основного метаболита тренболонa – эпитренболонa, определяемого большинством лабораторий [2, 3].

Традиционно, эпитренболон определяют в конъюгированной фракции методами жидкостной или газовой хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией [4, 5]. Оба эти подхода имеют ограничения: так, анализ методом ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает наилучшую чувствительность, но interfering влияние эндогенных компонентов матрицы затрудняет определение метаболита с низкими концентра-

циями [6]. Метод ГХ-МС/МС менее чувствителен, но обладает удовлетворительной селективностью и отвечает требованиям ВАДА к минимально необходимому уровню детектирования [7]. Работа [8] посвящена прямому определению глюкуронида эпитренболонa в разбавленной моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР) с пределом обнаружения на уровне 4 нг/мл.

Цель работы – изучение фазы II метаболизма тренболонa и оценки возможности обнаружения его конъюгированных метаболитов по сравнению с эпитренболоном, определяемым методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

In vitro метаболизм фазы II: микросомы печени человека (HLM), полученные от 150 доноров разного пола, производства BD Gentest (Woburn, MA,

USA). Инкубацию проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Образцы мочи: внутрилабораторные референсные образцы мочи, содержащие метаболит(ы) тренболон, 12 реальных проб спортсменов, три внешних образца контроля качества (EQAS).

Изучение приема: два здоровых волонтера мужского пола (34 года, индекс массы тела 20; 37 лет, индекс массы тела 22) перорально принимали 25 мг тренболон ацетата.

Пробоподготовка для прямого определения: пятикратное разбавление мочи в смеси вода/метанол 97/3 (об/об) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты с последующим центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 10 мин.

Пробоподготовка с применением твердофазной экстракции (ТФЭ): в каждую пробу мочи добавляли внутренний стандарт d3-тестостерон глюкуронид на уровне 50 нг/мл. 1 мл мочи наносили на предварительно кондиционированный картридж Oasis HLB (60 мг×3 мл, Waters, Milford, США). Картридж последовательно промывали 3 мл свежеприготовленной смеси гидроксид аммония/вода/метанол (2/93/5, об/об/об) и 3 мл смеси вода/метанол (70/30, об/об). Соединения элюировали 2×1,5 мл метанола. Элюат упаривали в токе азота при 55°C, сухой остаток перерастворяли в 50 мкл метанола и 50 мкл воды.

Пробоподготовка для ВЭЖХ-фракционирования: 20 мл мочи наносили на предварительно кондиционированный картридж Bond Elute LRC C18, 500 мг (Varian, США), который затем промывали 5 мл воды и элюировали стероиды 3×2 мл метанола. Элюат упаривали в токе азота при 55°C, сухой остаток перерастворяли в 60 мкл метанола и 40 мкл воды. Сбор фракций осуществляли с помощью ВЭЖХ системы Agilent 1100, оснащенной колонкой Waters SunFire C18 (250×4,6 мм; 5 мкм) и предколонкой с аналогичным собрантом (20×4,0 мм). Для лучшей стабильности времен удерживания и уменьшения сопротивления потоку колонку термостатировали при 35°C. Градиентное элюирование осуществляли водой (А) и ацетонитрилом (В) по следующей программе: 0 мин – 30% (В), 20–30 мин – 100% (В), 35–40 мин – 30% (В). Объем инъекции составлял 90 мкл, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, детектирование проводили при длине волны 197 нм.

Инструментальный анализ: СВЭЖХ-МСВР анализ выполняли на жидкостном хроматографе модели Acquity UPLC (Waters, США) с системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева

хроматографической колонки, дегазатором, соединенном с масс-спектрометрическим детектором модели Exactive (Thermo Scientific, Германия) с внешним источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком.

СВЭЖХ-МС/МС анализ выполняли на жидкостном хроматографе модели Acquity UPLC (Waters, США), оснащенный системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева хроматографической колонки, дегазатором и соединенным с масс-спектрометрическим детектором модели TSQ Vantage (Thermo Scientific, США) с внешним источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком.

Для хроматографического разделения веществ использовали колонку Acquity UPLC VEN C18 (2,1×100 мм, размер частиц 1,7 мкм), соединенную с предколонкой Acquity UPLC VEN C18 (2,1×5 мм; размер частиц 1,7 мкм) фирмы Waters. Подвижная фаза представляла собой 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде (А) и метаноле (В). Скорость потока – 0,35 мл/мин. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 10 мин. Для понижения общего рабочего давления системы использовали термостатирование колонки (60°C). Объем пробы – 5 мкл. Стандартная программа градиентного элюирования: 0–0,5 мин – 95% (А); 0,5–7,5 мин – 5% (А); 7,5–10,0. Оптимизированная программа градиентного элюирования: 0–0,5 мин – 5% (В); 1 мин – 30% (В); 7 мин – 58% (В); 7,01–9,51 мин – 95% (В); 9,52–10 мин – 5% (В).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация цистеинильного конъюгата тренболон

Анализ разбавленной мочи после перорального приема тренболон ацетата методом СВЭЖХ-МСВР показал, что помимо глюкуронида эпитренболон (теоретическая масса 447,2013 Да для [M+H]⁺) присутствует заметный сигнал с m/z 271,1689, относящейся к интактному тренболону (рис.1) с точностью масс более 2 ppm (теоретическая масса 271,1693 Да). Однако время удерживания пика (4,79 мин) не согласуется с временами удерживания тренболон и эпитренболон. На основании масс-спектрометрических данных можно предположить, что данный ион образуется за счет диссоциации в источнике протонированной молекулы с m/z 392,1886. В режиме отрицательной ионизации обнаружен ион-прекурсор, соответствующий депротонированной моле-

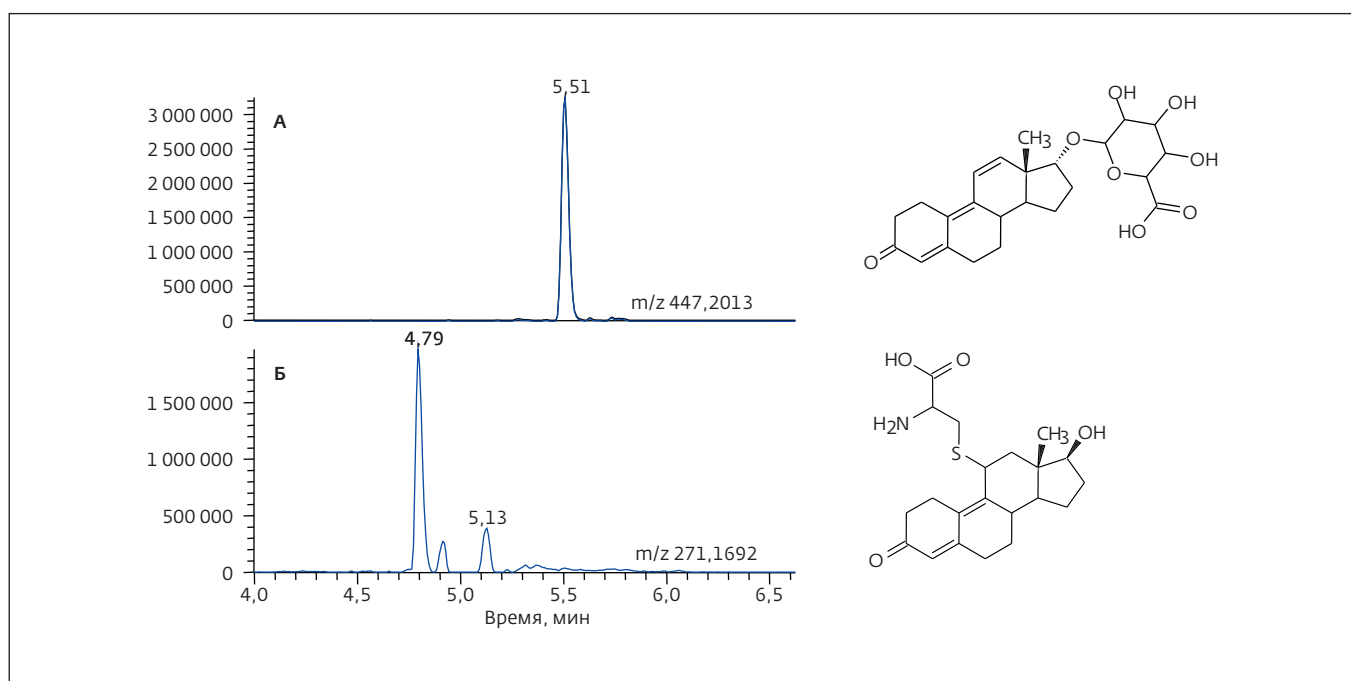


Рис.1. Масс-хроматограммы метаболитов тренболонa, полученные методом СВЭЖХ–МСВР

куле с m/z 390,1748 и имеющий наиболее интенсивный ион-продукт с m/z 303,1430 (рис.2).

Идентифицированный метаболит представляет собой конъюгат тренболонa или эпитренболонa с цистеином с теоретической массой 392,1890 Да для $[M+H]^+$ или 390,1745 Да для $[M-H]^-$. В моче присутствовали и другие изомерные соединения с идентичным значением m/z , образованные, по всей вероятности, за счет конъюгации цистеина в разные положения стероидного скелета, например, C11 или C12, а также в зависимости от расположения гидроксильной группы при C17 (α/β).

Известно, что образование цистеинильных конъюгатов в организме человека происходит при участии глутатионтрансфераз (ГТ) [9]. Некоторые ксенобиотики, образующие реакционно активные метаболиты, например, эпоксиды, подвергаются детоксикации посредством цепочки взаимодействий с ГТ. Как правило, ГТ-аддукты претерпевают катализируемый ферментами отрыв глутаминовой кислоты и глицина, что, в конечном счете, приводит к формированию цистеинильных конъюгатов. Насколько нам известно, существует только одна работа [10], в которой описана конъюгация тренболонa с глутатионом. Однако, образование конъюгатов тренболонa с цистеином весьма вероятно.

В 2010 году группа исследователей докладывала о ранее неизвестных метаболитах тестостеронa, высвобождающихся при проведении щелочного гидролиза и позднее идентифицированных как конъюгаты стероидов с цистеином [11]. Дальнейшие исследования продемонстрировали существование цистинильных конъюгатов болдионa, прогестеронa и кортизолa [12, 13]. Таким образом, конъюгация с цистеином является минорным, но важным путем биотрансформации стероидов, на который необходимо обратить внимание.

Установление структуры конъюгатов тренболонa

Для установления подлинности базового пика на масс-хроматограмме с m/z 447,2013 осуществляли инкубирование референсных стандартов тренболонa и эпитренболонa с микросомами печени человека в присутствии уридиндифосфоглюкуроновой кислоты в качестве кофактора. В результате эксперимента однозначно показано, что пик с временем удерживания 5,51 мин является глюкуронидом эпитренболонa (см. рис.1).

Для установления структуры цистеинильного конъюгата, образующегося в процессе биотрансформации в организме человека, был проведен

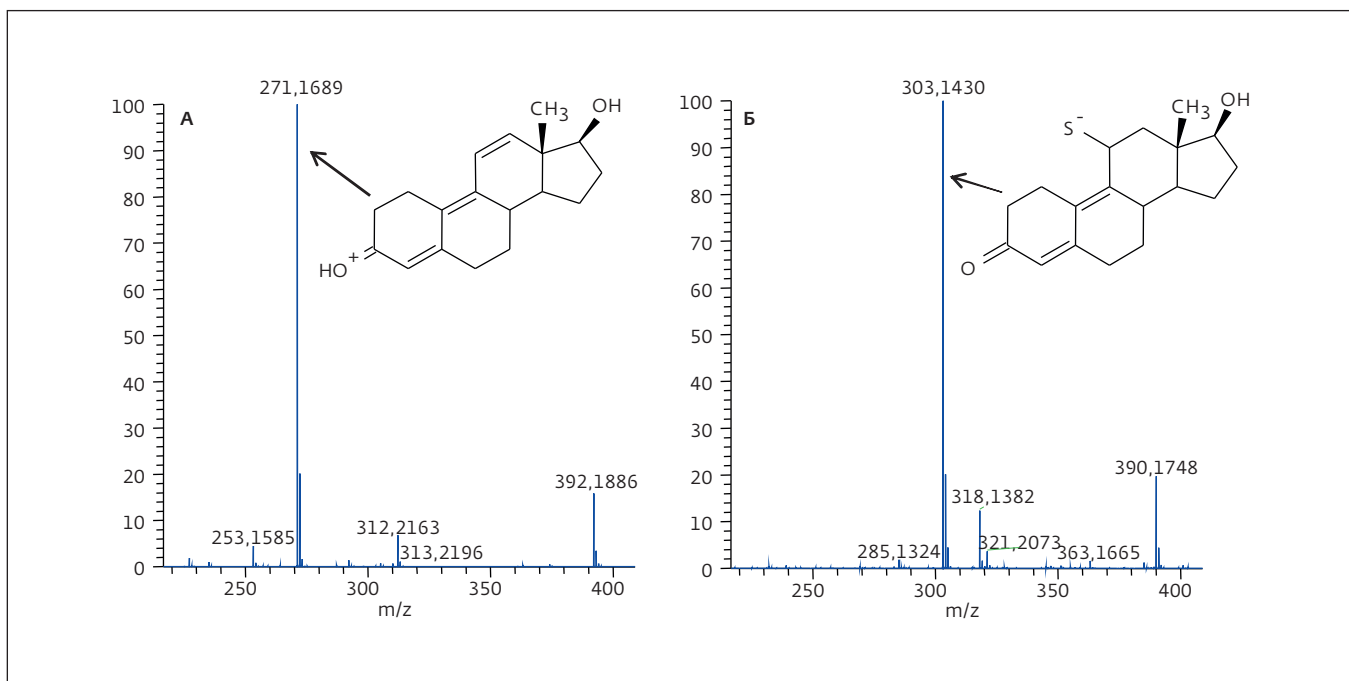


Рис.2. Масс-спектры диссоциации в источнике цистеинильного конъюгата тренболон в режиме положительной (А) и отрицательной (Б) ионизаций

синтез цистеинильных аддуктов тренболон его эпимера согласно методике, представленной в работе [12]. Для этого растворяли 1 эквивалент

стероида в трех объемах метанола, добавляли один объем раствора цистеина (100 мМ) в 6 М растворе гидроксида калия. Смесь инкубиро-

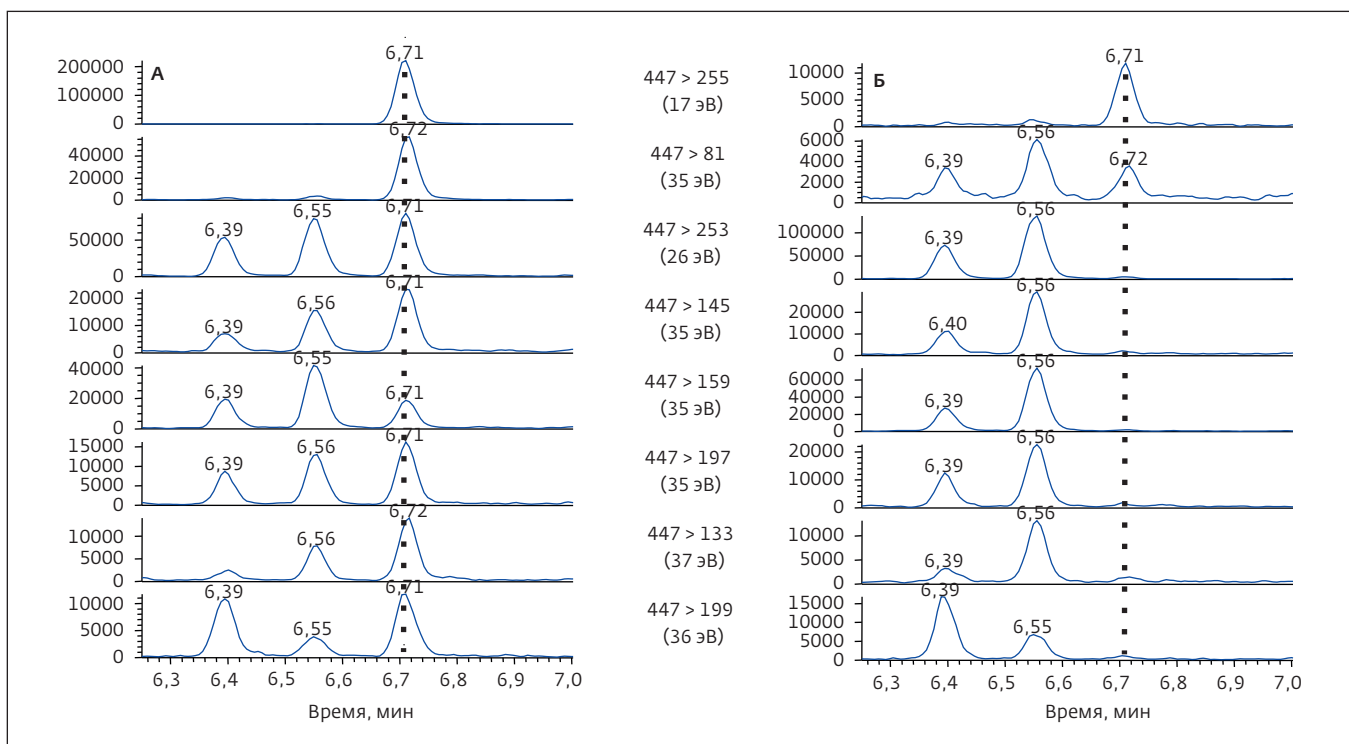


Рис.3. Определение глюкуронида эпитренболон с высокой (А) и низкой (Б) концентрациями в моче с использованием модифицированной программы градиентного элюирования

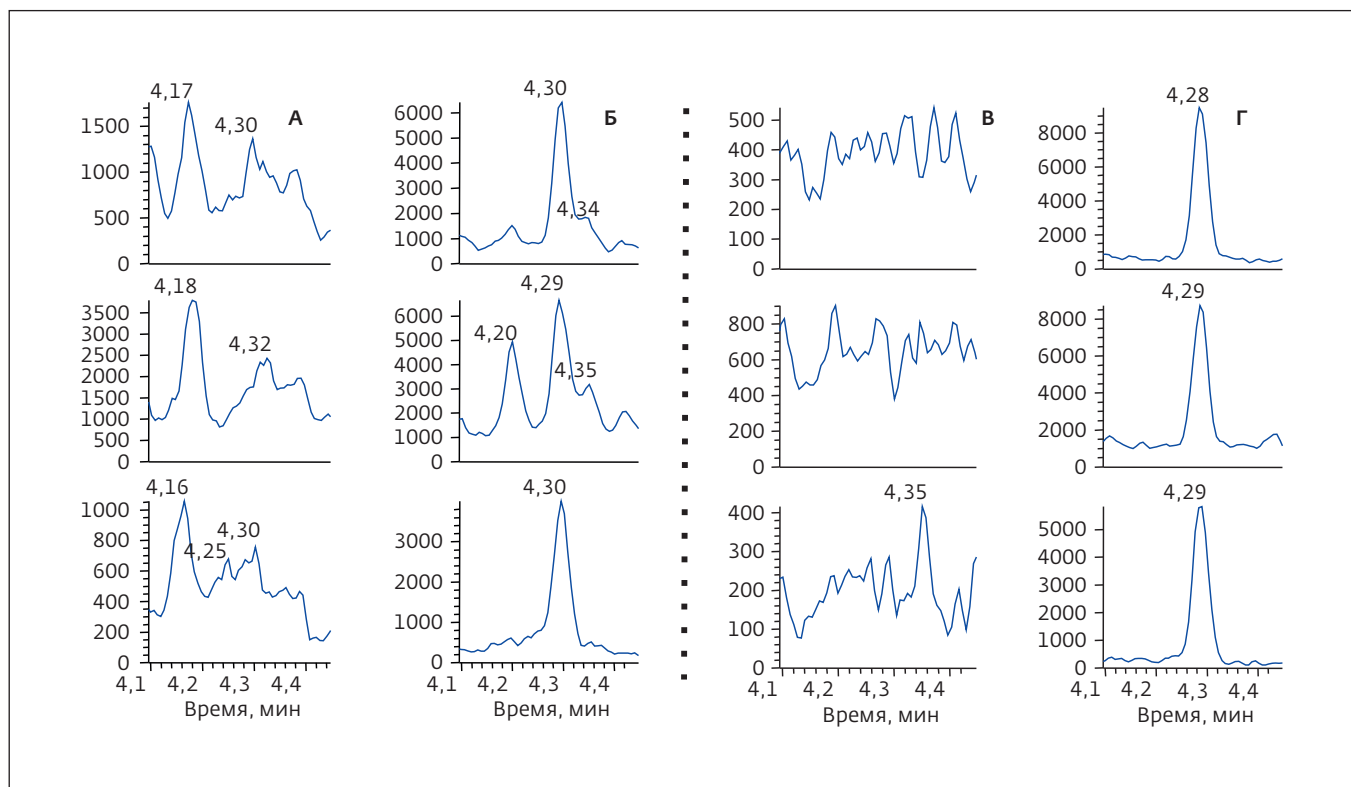


Рис.4. Сравнение стандартной (А, Б) и оптимизированной (В, Г) процедур ТФЭ при определении цистеинильного конъюгата тренболонна, где (А) и (Б) – бланковая (отрицательная) моча, (Б) и (Г) – моча после приема тренболонна

вали в термомиксере при интенсивном перемешивании в течение 2 ч. После этого органический растворитель удаляли в токе азота, а оставшийся водный раствор нейтрализовывали 6 М раствором соляной кислоты, фильтровали и очищали с использованием ТФЭ. Оказалось, что реакция тренболонна и эпитренболонна с цистеином, проведенная в соответствии с этой методикой, не приводит к образованию сколь угодно заметного количества цистеинильного аддукта.

После неудачного синтеза мы провели описанный в работе [11] щелочной гидролиз очищенной фракции, содержащей основной изомер цистеинильного конъюгата. Выделение цистеинильного конъюгата осуществляли методом препаративной ВЭЖХ. Данная стадия была необходима для отделения глюкуронидов тренболонна и эпитренболонна, способных гидролизиться в щелочной среде и усложнять интерпретацию результатов. Оказалось, что цистеинильный конъюгат устойчив и к щелочному гидролизу, и установить присоединяется ли цистеин к тренболону или эпитренболону так и не удалось. Возможно, процедуры, описанные в работах [11, 12], применимы только по отношению к стероидам,

у которых присоединение цистеина протекает по положению С7, а не С11 или С12, как в случае тренболонна.

Аналитические сложности определения конъюгатов в моче

На масс-хроматограмме образца по точной массе протонированной молекулы глюкуронида эпитренболонна практически не наблюдали интерференций, в то время как масс-хроматограммы, полученные с помощью масс-спектрометрии низкого разрешения, значительно искажены коэлюирующимися эндогенными соединениями. Для устранения таких интерференций стандартная градиентная программа элюирования была оптимизирована (0–0,5 мин – 5% (В); 1 мин – 30% (В); 7 мин – 58% (В); 7,01–9,51 мин – 95% (В); 9,52–10 мин – 5% (В)), что позволило разделить пик целевого компонента от мешающего влияния матрицы (рис.3).

Однако из-за недостатка селективных ионно-молекулярных реакций (SRM-переходов), имеющих сопоставимую интенсивность, при скрининговом анализе методом СВЭЖХ-МС/МС определение глюкуронида эпитренболонна сво-

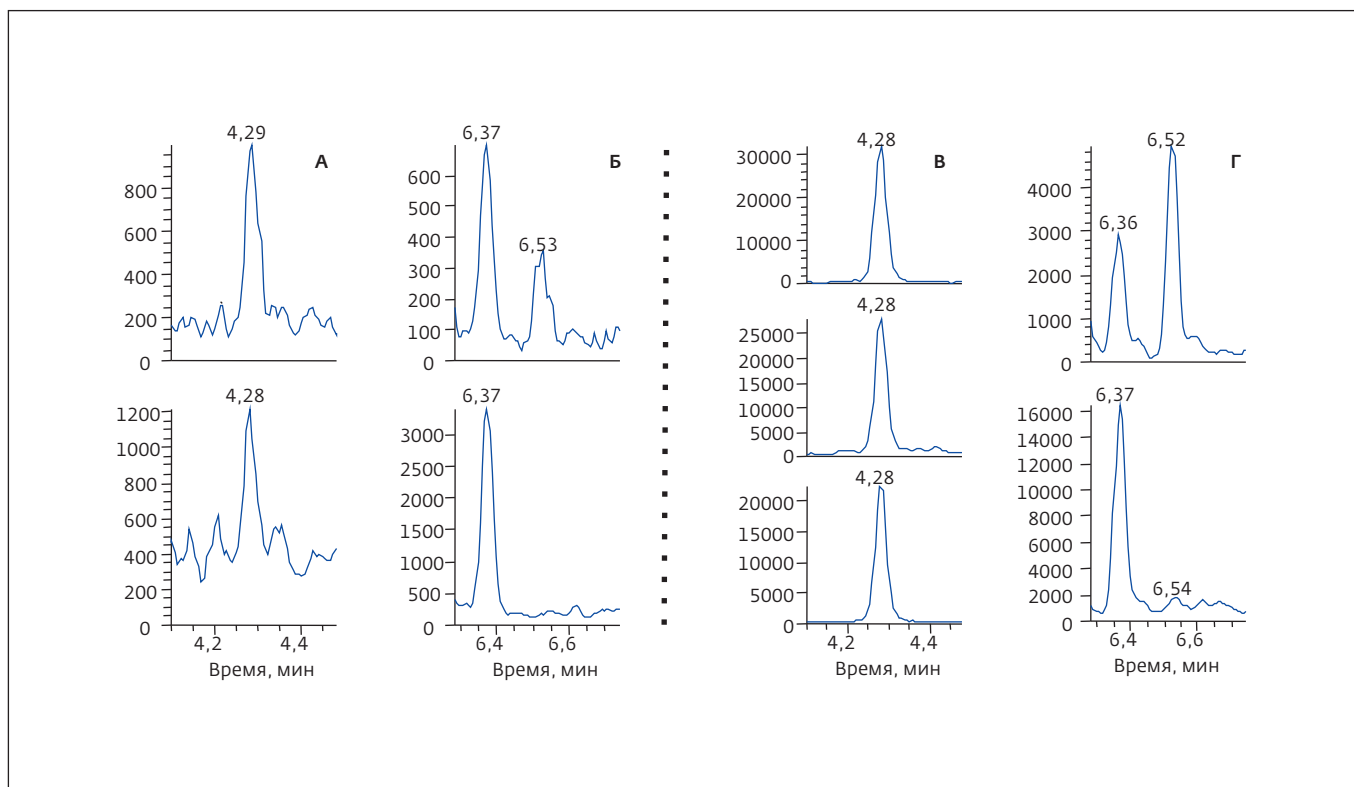


Рис.5. Масс-хроматограммы, полученные в режиме регистрации выбранных реакций, метаболитов тренболона при проведении скринингового (А, Б) и подтверждающего (В, Г) анализов, где (А) и (В) – цистеинильный конъюгат тренболона, (Б) и (Г) – глюкуроид эпитренболона

дится к использованию одного перехода $447 \rightarrow 255$ (17 эВ). В случае цистеинильного конъюгата селективность выбранных реакций $271 \rightarrow 227$ (19 эВ), $271 \rightarrow 209$ (24 эВ), $271 \rightarrow 194$ (30 эВ) и $271 \rightarrow 179$ (45 эВ) позволяет проводить достоверный скрининг в разбавленной моче. В то же время, масс-хроматограммы экстрактов образцов мочи после стандартной процедуры твердофазной экстракции оказались недостаточно чистыми для надежного определения цистеинильного конъюгата.

Первоначально для выделения метаболитов фазы II тренболона и очистки от мешающих компонентов биологической матрицы, а также одновременного концентрирования целевых соединений использовали полимерные сорбенты с обращенной фазой Oasis HLB, Strata-X и Bond Elut-Certify. В работе изучено извлечение цистеинильного и глюкуронового конъюгатов тренболона из мочи с помощью ТФЭ при использовании вышеперечисленных сорбентов. Одновременно при изучении влияния типа сорбента проводили оптимизацию состава промывочного раствора, который использовали для удаления мешающих компонентов матрицы. На рис.4

показано, что оптимизированная методика ТФЭ, включающая в себя две стадии промывки перед элюированием (см. экспериментальную часть) обеспечивает наилучшие результаты.

Возможности метода прямого анализа мочи и оптимизированного подтверждающего метода при обнаружении конъюгатов тренболона продемонстрированы на рис.5.

Для получения референсного стандарта цистеинильного конъюгата тренболона использовали ВЭЖХ-фракционирование. Такой подход позволяет провести очистку целевых соединений от мешающих компонентов матрицы, а последующее упаривание полученных фракций – к их концентрированию.

После установления фракции, содержащей цистеинильный конъюгат тренболона, с помощью ВЭЖХ-фракционирования и последующего концентрирования получен раствор цистеинильного конъюгата с оценочной концентрацией целевого соединения 10 нг/мкл. Полученный раствор использовали для оценки степени извлечения из мочи и подавления его ионизации компонентами матрицы. С использованием оптимизированной методики ТФЭ степень

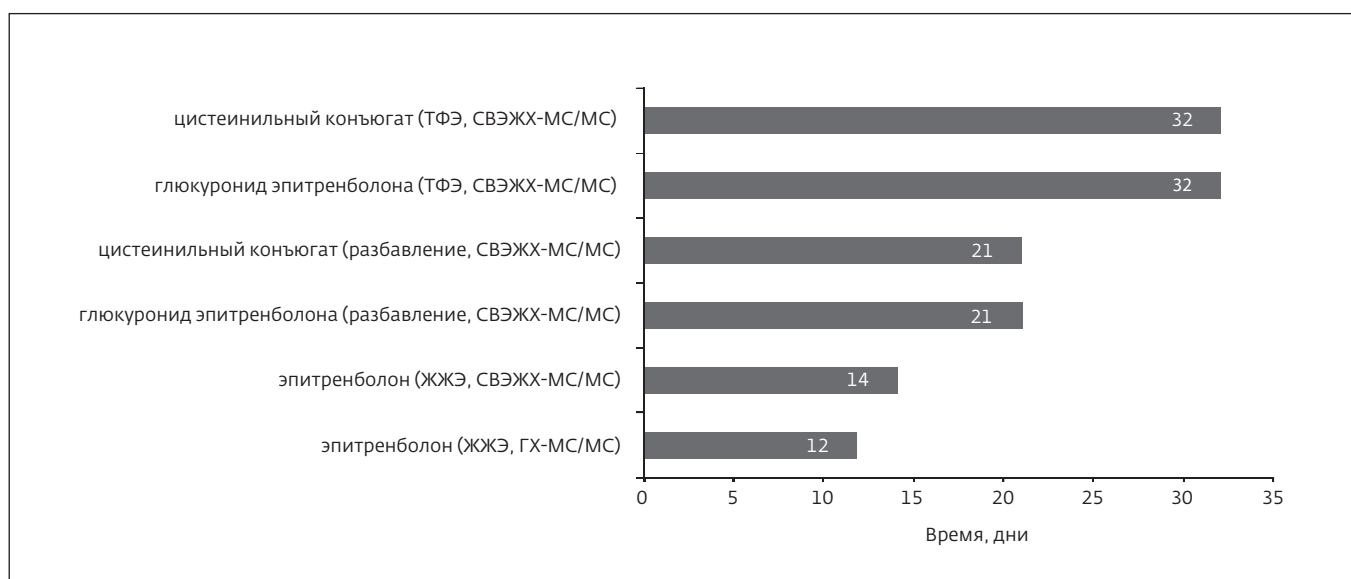


Рис.6. Длительность обнаружения метаболитов тренболоната различными методами

извлечения конъюгата составила $89,7 \pm 7,5\%$ ($n=5$). Наши исследования показали, что ионизация цисстеинильного конъюгата тренболоната в присутствии компонентов матрицы подавляется на $24,1 \pm 7,4\%$.

Для оценки времени обнаружения метаболитов тренболоната в моче различными методами изучена кинетика выведения метаболитов после приема тренболоната ацетата. Образцы мочи собирали раз в день в утренние часы. Сводные данные, представленные на рис.6, указывают на то, что прямой анализ метаболитов фазы II тренболоната обеспечивает наилучшую ретроспективность определения приема тренболоната, а использование ТФЭ еще больше расширяет временной интервал его обнаружения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам работы установлено, что глюкуронид эпитренболоната является основным метаболитом тренболоната. Прочие глюкурониды представляют собой изомерные стероиды, являющиеся продуктами окисления и гидроксирования исходного соединения, предположительно 16 ξ -гидрокси-эстра-4,9,11-триен-3,17-дион глюкуронид. Чувствительность метода прямого определения позволяет детектировать глюкуронид эпитренболоната на уровне 0,5 нг/мл (в пересчете на агликон).

Помимо глюкуронидов, были идентифицировано несколько цисстеинильных конъюга-

тов с одним наиболее интенсивным изомером, структура которого пока не установлена. Изучение кинетики выведения продемонстрировало, что наиболее долгоживущим метаболитом является цисстеинил-конъюгат, детектируемый как минимум в течение того же времени, что и глюкуронид эпитренболоната. Оба метаболита обнаружены спустя 32 дня после приема 25 мг тренболоната ацетата при условии проведения специальной процедуры ТФЭ для очистки образца.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 574 от 29 июля 2015 года по теме: "Разработка антидопинговой методики определения конъюгированных метаболитов стероидов и ряда других соединений".

ЛИТЕРАТУРА

- 2014 Anti-Doping Testing Figures Report [электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency [сайт]: URL: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada_2014_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf (access date 09.10.2015). Дата обращения: 09.10.2015.
- de Boer D., Gainza Bernal M.E., van Ooyen R.D., Maes R.A.A. The analysis of trenbolone and the human urinary metabolites of trenbolone acetate by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry. – *Biological Mass Spectrometry*, 1991, 20, p. 459.
- Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. – *Clinical Chemistry*, 1996, 42, p. 1001.

4. **Thevis M., Guddat S., Schänzer W.** Doping control analysis of trenbolone and related compounds using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. – *Steroids*, 2009, 74, p. 315.
5. **De Brabanter N., Van Gansbeke W., Geldof L., Van Eenoo P.** An improved gas chromatography screening method for doping substances using triple quadrupole mass spectrometry, with an emphasis on quality assurance. – *Biomedical Chromatography*, 2015, Vol. 26, p. 1416.
6. **Pozo O.J., Deventer K., Van Eenoo P., Delbeke F.T.** Presence of endogenous interferences in the urinary detection of selected anabolic steroids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. – *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21, p. 2785.
7. TD2015MRPL. Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances [электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency: [сайт]: URL: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_td2015mrpl_minimum_required_perf_levels_en.pdf. Дата обращения: 09.10.2015.
8. **Tudela E., Deventer K., Geldof L., Van Eenoo P.** Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. – *Drug Testing and Analysis*, 2015, 7, p. 95.
9. **Oakley A.** Glutathione transferases: a structural perspective. – *Drug Metab. Rev.*, 2001, 43, p. 138.
10. **Evrard P., Maghuin-Rogister G.** In vitro metabolism of trenbolone: study of the formation of covalently bound residues. – *Food Addit. Contam.*, 1988, 5, p. 59.
11. **Pozo O.J., Marcos J., Ventura R., Fabregat A., Segura J.** Testosterone metabolism revisited: discovery of new metabolites. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398, p. 1759.
12. **Pozo O.J., Gómez C., Marcos J., Segura J., Ventura R.** Detection and characterization of urinary metabolites of boldione by LC-MS/MS. Part II: Conjugates with cysteine and N-acetylcysteine. – *Drug Testing and Analysis*, 2012, 4, p. 78.
13. **Fabregat A., Kotronoulas A., Marcos J., Joglar J., Alfonso I., Segura J., Ventura R., Pozo O.J.** Detection, synthesis and characterization of metabolites of steroid hormones conjugated with cysteine. – *Steroids*, 2013, 78, p. 327.