Kortikoszteron meghatározása patkányszőr mintákból HPLC-MS módszerrel

Ferencz Elek¹, Boda Ferenc², Gáll Zsolt³, Kolcsár Melinda³, Donáth-Nagy Gabriella⁴, Vancea Szende⁴

¹Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem

²Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Általános és Szervetlen Kémia Tanszék

³Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Farmakológia és Klinikai Gyógyszerészet Tanszék

⁴Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Fizikai Kémia Tanszék

AUTHOR AFFILIATION

¹University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Târgu Mureș

²University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Târgu Mureș, Department of General and Inorganic Chemistry

³University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Târgu Mureș, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy

⁴University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Târgu Mureș, Department of Physical Chemistry

CORRESPONDING AUTHOR

Zsolt Gáll

University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Tîrgu Mureș, Department of Pharmacology and Clinical pharmacy
Gheorghe Marinescu street, no. 38
540139 Tîrgu Mureș, Romania
Email: zsolt.gall@umfst.ro

ARTICLE HISTORY

Received: 27-Jun-2019

Accepted: 8-Aug-2019

DOI: 10.2478/orvtudert-2019-0008

Determination of corticosterone from rat hair samples by HPLC-MS method

ABSTRACT

Corticosterone is an adrenocortical steroid hormone with glucocorticoid and mineralocorticoid effects. Based on previous studies, the plasma level of corticosterone correlates with the stress exposure of rodents. Because the half-life of corticosterone in blood is short, its plasma concentration can be used as an acute stress marker. But hair is accumulating the systemic and locally produced corticosterone, therefore it can be used to study chronic stress. However, the accurate quantification of corticosterone is an analytical challenge owing to the very low amount of hormone found in a complicated biological matrix. The high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) can provide the required selectivity and sensitivity for this purpose. Currently published methods for corticosterone quantification involve complicated sample preparation and long run time. Accordingly, the aims of the study were to simplify the extraction method of the corticosterone from rat hair samples and to develop an optimized HPLC-MS method for the accurate quantification. The rat hair samples were washed with methanol, dried and cut, then extracted with methanol at room temperature for 24 hours. The lipids were precipitated with formic acid aqueous solution and eliminated by centrifugation. The corticosterone was separated from other compounds with reverse phase chromatography using acetonitrile and 0,1% aqueous solution of formic acid as mobile phase. The detection was performed in positive SIM mode measuring the 347 m/z molecular ion. A six point calibration was performed in the range of 0,5-20 ng/ml, the accuracy was tested with quality control samples at two different concentration level. The total run time is only 4,2 minutes and the lower limit of quantification (LLOQ) is 0,5 ng/ml, with 10 pg absolute sensitivity. By determining the quantity of the hormone for a well-defined hair region, based on the speed of hair growth, we can characterize the retrospective stress exposure of the animals in different conditions.

Keywords: corticosterone, rat hair, stress, HPLC-MS

KIVONAT

A kortikoszteron a mellékvesekéregben termelődő szteroid hormon mineralo- és glükokortikoid hatásokkal egyaránt. A kortikoszteron-kortizol szervezetbeli aránya különbözhet fiziológiás és stresszes állapotok között, azonban rágcsálókban a fő glükokortikoid hatású hormonnak a kortikosz-

teront tartják. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy plazmakoncentrációja a rágcslókban kapcsolatban van az adott egyed stressz-szintjével. A hormon plazma felezési ideje igen rövid, így a vérszintből csak az akut stressz mértéke következtethető, krónikus stressznek való kitettség vizsgálata érdekében a rágcslók szőrében lévő mennyiséget érdemesebb meghatározni, mivel a szőrminta retrospektíven tükrözi a szteroid szintézist, akár helyi, akár keringésből felvett hormonról is legyen szó. Abból adódóan, hogy a szőr rendkívül komplex biológiai mátrix, és a hormon nagyon kis mennyiségben van jelen, egyaránt analitikai kihívás a kortikoszteron kivonása és mennyiségi meghatározása is. Az erre a célra kifejlesztett módszerek mintaelőkészítése gyakran bonyolult és költséges, a detektálási eljárásuk nem elég érzékeny, valamint analízis idejük meglehetősen hosszú. Jelen tanulmány célja a meglévő módszerek feltérképezése, a mintaelőkészítés leegyszerűsítése, valamint olyan nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer kifejlesztése, amely tömegspektrometriás detektálással kombinálva hatékonyabb, olcsóbb és könnyebben alkalmazható alap kutatás

céljából a patkányszőr minták hormon tartalmának meghatározására. A szőrminták metanolos tisztítása után sikeresen alkalmaztunk egyszerű metanolos kivonást 24 órán keresztül szobahőmérsékleten. A lipideket hangyasavoldat hozzáadásával csaptuk ki, majd centrifugálás segítségével távolítottuk el, és az így nyert mintákban lévő kortikoszteront fordított fázisú kromatográfiás oszlopon elválasztottuk a zavaró komponensektől, acetonitril és 0,1%-os hangyasav vizes oldatát használva mozgófázisként. A hormontartalmat pozitív ionizációs SIM (selected ion monitoring) módban mértük, mennyiségi meghatározás céljából pedig hat pontot tartalmazó kalibrációs egyenest készítettünk 0,5–20 ng/ml tartományban. Az analízis idő mindössze 4,2 perc mintánként, 10 pg abszolút érzékenység és 0,5 ng/ml meghatározási határ mellett. A szőrben található hormon mennyiségének meghatározása segítségünkre lehet az állatok krónikus stressznek való kitettségének utólagos értékelésében.

Kulcsszavak: kortikoszteron, patkányszőr, stressz, HPLC-MS

Bevezetés

Egyes állatfajokban, így rágcslókban is, a mellékvesekéreg *zona fasciculata* rétegében termelődő kortikoszteron a fő glükokortikoid, amelyet stressz-hormonként tartanak számon, ugyanis a vérben, vizeletben és szőrben lévő mennyisége korrelációt mutat az adott egyed stressz-szintjével [1,2]. Az emberi szervezetben a *zona glomerulosa*-ban termelődő kortikoszteron köztes termék a pregnenolon és aldoszteron között, a stresszhormon szerepét pedig elsősorban a *zona fasciculata*-ban képződő kortizol tölti be [1]. Bár rágcslókban is van jelentősége a kortizol stresszhelyzetben történő változásának és a kortikoszteron/kortizol arány változásainak [3], a kutatások többsége csak a kortikoszteron mérésekre vonatkozik patkányban és egérben. Ezek a glükokortikoid hormonok akut stressz hatására felszaporodnak a vérben, de mivel plazmafelezési idejük igen rövid, a krónikus stressznek való kitettség felmérésére nem megfelelő a vérszint mérése. Hívebben tükrözi a tartós stresszállapotot a haj vagy szőr kortizol- illetve kortikoszterontartalma [4]. A szőrben található számos interferens miatt kihívást jelent megfelelően szelektív és érzékeny módszert fejleszteni a minták előkészítésére és a kortikoszteron mennyiségi meghatározására. A bonyolult biológiai mátrix és a nagyon kis hormon mennyiségek miatt a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia tömegspektrometriás detektálással (*High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, HPLC-MS) jó választás lehet a megfelelő érzékenység és szelektivitás elérésének érdekében.

A szakirodalomban számos módszert leírtak különböző anyagok állati szőrből történő mennyiségi meghatározására. Minta-előkészítés során az állatoktól vett szőrt aprítás előtt rendszerint tisztítják, erre a célra leggyakrabban használt oldószerek: ultratiszta vagy deionizált víz, metanol, izopropanol, aceton és/vagy a diklórmétán. A szárítást követő aprítás történhet golyósmalom, vagy olló segítségével. A vizsgálandó anyagok szőrből való kivonására általában pufferoldatokat, metanolt, vagy ezek kombinációját alkalmazzák. A szőrmintákat a kivonószerezrel, jól meghatározott körülmények között inkubálják, majd a centrifugálás után nyert felülúszót inert nitrogén gázáram alkalmazásával, vagy szobahőmérsékleten szárazra párolják és a szárítási maradékot az alkalmazott kromatográfiás mozgófázisban rekonstruálják. Egyes esetekben a szőrben található interferensek mennyiségének csökkentése érdekében szilárd fázisú extrakciót (*solid phase extraction*, SPE) alkalmaznak, így csökkentve a mátrixhatást [4,5,6], vagy folyadék-folyadék kivonást végeznek a vizsgálandó anyag szelektív feldúsítása érdekében [8]. A szakirodalomban leírt módszerek eltérő kromatográfiás és detektálási paraméterei következtében hatékonyságuk, érzékenységük és alkalmazhatóságuk változó. Mivel a kortikoszteron apoláris molekula, elválasztására minden esetben fordított fázisú kromatográfiás oszlopokat alkalmaztak acetonitril, metanol és vizes pufferoldatok különböző arányú gradiens elúciójával. A meglévő módszerek lényegi különbsége a tömegspektrometriás detektálás módjából adódik. A legtöbb módszer esetében a pozitív MRM (*multiple reaction monitoring*) módot részesítették

előnyben és a 347 m/z molekulaionból történő fragmentálás után a 329 m/z leányiont detektálták mennyiségi meghatározás céljából [8,9]. Más módszerekben a 121 m/z leányiont detektálták [4,10], míg Huan Li és munkatársai a 311 m/z leányiont használta meghatározás céljából [12]. Fragmentálás nélkül is végezhető kortikoszteron mennyiségi meghatározása, Krzysztof Banka és munkatársai pozitív SIM módot alkalmaztak. Ebben az esetben a szerves savak pufferként történő alkalmazása, mint mozgófázis kerülendő, mivel ezek a kortikoszteron molekulával származékot képezhetnek, és fragmentálás hiányában hibás eredményeket adhatnak mennyiségi meghatározás esetén [13]. Ez a jelenség részben kiküszöbölhető kis kollíziós energia alkalmazásával, amely a keletkezett származékot elbontja, viszont ahhoz túl kevés, hogy az eredeti molekulát fragmentálja. Ivan Miksik és munkatársai együtt vizsgálták a kortikoszteront és annak metabolitjait, ezért TIC (*total ion chromatogram*) módot alkalmaztak detektálás során, viszont ennek az érzékenysége és szelektivitása jóval alulmarad az MRM módhoz képest [14]. Egy másik jelentős különbség a meglévő módszerek között az analízisidő, ami egy analitikai módszer gazdaságossága és hatékonysága szempontjából rendkívül fontos. A szakirodalmat áttekintve 5 perctől 65 percig terjednek az analízisidők. A hosszabb analízisidejű módszerek általában több szteroid-hormon, vagy egy hormon prekursorainak és metabolitjainak együttes vizsgálatát foglalja magába. Krzysztof Banka és munkatársai 49 perces analízis idő mellett párhuzamosan határoztak meg kortikoszteront, kortizolt és kortizont [13], míg Ivan Miksik és munkatársai kortikoszteron metabolitokat választottak el és vizsgáltak 65 perces analízis idő alatt [14]. Az egyszerre több anyagot vizsgáló módszerek hátránya az alacsonyabb érzékenység és az a tény, hogy a biológiai mintákban az egyes hormonok különböző koncentrációtartományban vannak jelen, ennek következtében megtörténhet, hogy egy nagy mennyiségben jelenlévő anyag negatívan befolyásolja egy nagyságrendekkel alacsonyabb koncentrációjú komponens mennyiségi meghatározását. Analízisidő szempontjából a leghatékonyabb módszert Huan Li és munkatársai dolgozták ki, akik 5 perces módszer segítségével határozták meg a kortikoszteront. Ők azonban speciális UFLC (*ultra fast liquid chromatography*) berendezést használtak, ennek megfelelő 1.8 μm méretű részecskékel töltött oszloppal [12], így ez a módszer nem adoptálható konvencionális HPLC berendezésre. A két végelettől eltekintve az átlagos módszerek megközelítőleg 15 perces analízisidőt vesznek igénybe [8,10,14]. Az abszolút érzékenység tekintetében

figyelembe kell vennünk a meghatározási határt (*lower limit of quantification*, LLOQ) és a HPLC rendszerbe injektált mennyiséget is. Mivel a szűrben nagyon kis mennyiségben van jelen a kortikoszteron, a kivonást és beszárítást követően visszamaradt anyagot a lehető legkisebb oldószermennyiségben kell visszaoldani a koncentráció növelésének érdekében, emiatt a kromatográfiás oszlopra injektálható mennyiség is szűk határok között mozoghat. Ahhoz, hogy a meghatározási határ megfelelően alacsony legyen, megfelelő szelektivitással el kell tudnunk választani a vizsgálandó anyagot az egyéb zavaró komponensektől, amit az optimális kromatográfiás paraméterek és az érzékeny detektálás tesz lehetővé. Theresa Koal és munkatársai 0,03 ng/ml-es meghatározási határ mellett 0,6 pg abszolút érzékenységet értek el. Ehhez azonban nagyban hozzájárult a minta-előkészítés során használt szilárd fázisú extrakció alkalmazása, amely nagy mértékben leegyszerűsítette a vizsgálandó minta mátrixát [9]. Tian Yu és munkatársai szintén szilárd fázisú extrakció alkalmazásával 1 pg abszolút érzékenységet értek el [5]. Huan Li és munkatársai által fejlesztett módszer abszolút érzékenysége 5 pg, valamint a meghatározási határ 1 ng/ml, azonban vizsgálataikat plazmamintákon végezték, így nem összevethető a szőrminták analízisével [12].

Jelen munka célja egy, az eddigieknél hatékonyabb és egyszerűbb, szőrmintákra specifikus HPLC-MS módszer kidolgozása, valamint a mintaelőkészítési folyamat költséghatékonnyá tétele és leegyszerűsítése volt.

Anyag és módszer

Anyag

A referencia-standardként használt >98% tisztaságú kortikoszteront a Cayman Chemical Company-tól, a HPLC tisztaságú metanolt és acetonnitrilt a Sigma-Aldrich és Merck, valamint az analitikai reagens tisztaságú hangyasavat a Scharlau cégektől szereztük be. A szintén HPLC tisztaságú ultraszűrt vizet Millipore Direct Q10 típusú berendezés segítségével állítottuk elő. Mérésekhez 0,40 mg/ml koncentrációjú standard kortikoszteron törzsolatot készítettünk, metanolt használva oldószerként, majd ezt hígítottuk tovább a megfelelő munkaoldatok készítése során, szintén metanollal. A biológiai minták előkészítése során Sigma 2-15 típusú centrifugát, Mettler-Toledo ABS-54-S analitikai mérleget, Falc-Instruments Mix 20 vortexet, és Biohit Proline márkájú félautomata pipettákat használtunk.

Szörminták

A kísérlethez összesen 36 felnőtt, hím, Wistar patkányt használtunk fel. Az állatok testfelületének egy jól meghatározott részéről a kísérlet megkezdése előtt 3 héttel a szőrt eltávolítottuk, majd a frissen kinőtt szőrt mintavételeztük és ebből határoztuk meg a bazális kortikoszteron szintet. Ezt követően a kísérleti állatokat különböző stressz faktoroknak tettük ki három héten át egy rögzített és standardizált protokoll szerint, majd ismét eltávolítottuk az adott felületről a szőrt kortikoszteron mennyiségi meghatározásra. Mivel a kortikoszteronszint nagy egyedi variabilitást mutat, így a szörminták kortikoszteron mennyisége csak saját kontrolljukhoz képest értelmezhető. A szörmintákat szobahőmérsékleten tároltuk. A kísérleti tervet a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta (8 / 17.01.2018) és a kísérleti állatok tartása és a velük való foglalkozás során betartottuk az európai uniós irányelveket (Directive 2010/63/EU).

HPLC-MS rendszer

A kromatográfiás elválasztás megvalósítására Agilent 1100 típusú HPLC rendszert (G1379A gáztalanító, G1311A kvaterner pumpa, G1330B automata minta-adagoló termosztát, G1329A automata mintaadagoló,

G1316A oszloptér termosztát), detektorként Agilent Triple Quad (G6410A) típusú tömegspektrométert alkalmaztunk. Az adatok kiértékelése a MassHunter szoftver segítségével történt. A kromatográfiás elválasztás és a tömegspektrometriás detektálás paramétereit az **1. táblázatban** foglaltuk össze. A detektálás során pozitív SIM (selected ion monitoring) módot alkalmaztunk (**1. ábra**), mivel előnyösebbnek találtuk a fragmentálással szemben.

Eredmények és megbeszélés

Minta-előkészítés

A szörmintákat metanollal mostuk kétszer 2 percig, majd szobahőmérsékleten szárítottuk, és ollóval aprítottuk. A kortikoszteron kivonását mintaként 100 mg szőrből végeztük, 4 ml metanollal, 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten, majd a felülúszókat szárazra pároltuk, és 200 µl metanolban oldottuk vissza. 150 µl metanolos mintaoldathoz 20 µl 0,1%-os hangyasavat adtunk a zsírok kicsapása érdekében, majd 10 percig centrifugáltuk őket 10000 fordulat/perc sebességgel. Az így keletkezett tiszta felülúszóból 20 µl-t injektáltunk a HPLC rendszerbe.

Szelektivitás

A módszer szelektivitását a kortikoszteronnal szemben a tömegspektrometriás detektálás biztosította. Sok detektor önmagában egyáltalán nem, vagy igen kevésbé biztosít szelektív mérést, azonban a tömegspektrométer kivételt képez, biztosítva a kellő specificitást. Mivel a kivonás során és szárazra párolt minták rekonstruálása során is metanolt használtunk oldószerként, a mérések során a vak mintaoldat metanol volt. Biológiai minták esetén a vak minta általában a vizsgált anyagot nem tartalmazó biológiai mátrix, ám erre ebben az esetben nem volt lehetőség, mivel a szőr természetes körülmények között is tartalmaz kortikoszteront, így nem lehetséges olyan kivonat készítése, ami tartalmazza a többi mátrix-alkotót a kortikoszteron kivételével. A vak mintaoldat kromatogramján nem észlelhető interferencia a meghatározandó anyag, a kortikoszteron retenció idejénél: 3,47 percnél (**2. ábra**).

Meghatározási határ

Jelen esetben a meghatározási határnak a kalibrációs egyenes legalsó pontját tekintettük, figyelembe véve a nemzetközi irányelvekben szereplő minimális jel/zaj arányt, amely a meghatározási határ esetén nagyobb kell

1. táblázat: Kromatográfiás és tömegspektrometriás paraméterek

Kromatográfiás paraméterek	
Kromatográfiás oszlop	Kinetex® 2,6 µm Polar, C18, 100 Å, 100x 4,6 mm
Mozgófázis	acetonitril-0,1%-os hangyasav 40:60, izokratikus elúció
Mozgófázis hozama	0,6 ml/perc
Analízis idő	4,2 perc
Oszloptér hőmérséklet	30 °C
Mintatartó hőmérséklete	20 °C
Injektált térfogat	20 µL
Tömegspektrometriás detektálás paraméterei	
Ionizáció típusa	ESI, pozitív
Porlasztó gáznyomás	50 psi
N ₂ gáz hozama	10 L/perc
Száritási hőmérséklet	350 °C
Feszültség	4000 V
Detektálás típusa	SIM (selected ion monitoring)
Detektált ion	347 m/z

1. ábra. A kortikoszteron szerkezeti képlete és pozitív SIM módban rögzített tömegspektruma

legyen mint 10. Ennél kisebb jel/zaj arány esetén az egyes mérések közötti szórás túl nagy, ezért nem megbízhatóak mennyiségi meghatározás céljából. Esetünkben 0,5 ng/ml-es koncentrációjú kalibrációs standard injektálása esetén a jel/zaj arány 12,2 (**3. ábra**), így a meghatározási határ (LLOQ) 0,5 ng/ml. Abszolút érzékenységekben kifejezve, az injektált térfogat figyelembevételével, ez azt jelenti, hogy a módszer 10 pg kortikoszteron pontos meghatározására képes.

a kortikoszteron koncentráció (ng/ml) és y =görbe alatti terület. A regressziós koefficiens négyzete (R^2) 0,98. Mivel az adott pontok megfelelően illeszkednek a lineáris egyenesre, a módszer lineárisnak tekinthető a 0,5-20 ng/ml tartományban.

Pontosság és precizitás

A módszer pontosságát és precizitását két különböző koncentráció esetében ellenőriztük, két QC (*quality control*) próba segítségével ($QC_A=8$ ng/ml, $QC_B=15$ ng/

Kalibrációs görbe és linearitás

Azt, hogy a detektált jel lineárisan változik a koncentráció függvényében kalibrációs görbe segítségével bizonyítottuk, hat különböző koncentrációjú standard oldat felhasználásával, 0,5-20 ng/ml tartományban. A MassHunter szoftver a legkisebb négyzetek módszerét alkalmazza a kalibrációs egyenes, illetve egyenlet becslésére, figyelembe véve a kalibrációs pontoknak az egyenes két oldalán történő véletlenszerű eloszlását is. A mérésünknek megfelelő kalibrációs egyenes egyenlete $y=1688,2392x-338,5314$, ahol x

2. ábra. Vak mintaoldat (fekete) és 8 ng/ml koncentrációjú standard kortikoszteron oldat (piros) kromatogramja

3. ábra. A meghatározási határ (LLOQ- piros) 0,5 ng/ml injektálása esetén a jel/zaj arány 12,2; vak minta (fekete)

ml), öt párhuzamos injektálás eredményét felhasználva. Nemzetközi irányelvek szerint biológiai minták esetén erre $\pm 15\%$ a megengedett határ. QC_A esetén 9,15% míg QC_B esetén 3,60% az átlag eltérés. A rendszer precizitását a párhuzamos injektálások eredményeinek szórásával jellemezhetünk, amely QC_A esetén 0,078 és QC_B esetén 2,425% CV.

Alkalmazás

Az optimalizált módszer alkalmazható az általunk kidolgozott minta-előkészítési módnak alávetett patkányszőr minták kortikoszteron tartalmának mennyiségi meghatározására. A módszert sikeresen alkalmaztuk a normál

körülmények között tartott (kontroll csoport), illetve meghatározott ideig krónikus stressznek kitett állatok szőrmintáinak vizsgálatára (**4. ábra**). A kísérletek során 35 állattól származó 70 mintát vizsgáltunk. A kapott adatok értékelésénél kizártuk azokat, amelyek a meghatározási határ alatt voltak. A mért értékek 0,5926-5,9588 ng/ml tartományban találhatóak, $1,7967 \pm 1,0179$ ng/ml átlagértékkel, mely átszámolva $6,772 \pm 4,685$ pg/g száraztömegre vonatkoztatva. Eredményeink jól tükrözik a szőrminták kortikoszteron tartalmára jellemző egyedek közötti nagy variabilitását és a kapott értékek megfelelnek a szakirodalmi adatoknak [16].

4. ábra. Vak mintaoldat (fekete) és valós patkányszőr minta 5.9588 ng/ml (piros) kortikoszteron tartalommal

Következtetések

Mintaelőkészítés során sikerült kiküszöbölünk a költséges szilárd fázisú extrakciót azzal, hogy a mátrixban található lipofil karakterű anyagokat a visszaoldást követően 0,1%-os hangyasav oldat hozzáadásával kicsaptuk és centrifugálással eltávolítottuk. Ezáltal jóval egyszerűbb és költséghatékonyabb módszert dolgoztunk ki, ami hozzájárul ahhoz, hogy nagyszámú minta vizsgálatára legyen alkalmas. Továbbá, a mások által használt diklórmetánal történő folyadék-folyadék kivonás alkalmazására sem volt szükség, így környezetvédelmi szempontból is előnyösnek mondható a minta-előkészítési folyamat.

Az elvégzett mérések alapján a módszer pontosnak, precíznek és 0,5 - 20 ng/ml tartományban lineárisnak bizonyult, így alkalmas a továbbiakban szőrmin-ták kortikoszteron mennyiségének meghatározására. Fehérjekicsapáson átesett plazmaminták vizsgálatára is alkalmas, segítségével követni lehet a kortikoszteron kinetikáját, illetve a szőrből való akkumuláció és a plazmaszint közötti összefüggést, különböző stressz faktoroknak kitett állatok esetén. Az 4,2 perces analízis idő nagy mennyiségű minta költséghatékony és gyors elemzését teszi lehetővé, valamint a 0,5 ng/ml-es meghatározási határ alkalmassá teszi a módszert a nagy mennyiségű zavaró komponens mellett jelen lévő kis kortikoszteron mennyiség pontos meghatározására. A plazmaszint és szőrből található kortikoszteron mennyiség közti összefüggések megállapítása hozzásegíthet krónikus stressz folyamatok megértéséhez és nyomon követéséhez. Továbbá, lehetővé teszi a különböző stresszfaktorok egyenkénti jelentőségének felbecslését, azaz annak megállapítását, hogy melyek azok a tényezők, amelyek nagymértékben befolyásolják a kortikoszteron szekréciót, illetve melyek a kevésbé fontos, vagy elhanyagolható tényezők.

Köszönetnyilvánítás

Jelen kutatást a MOGYE 17800/12/22.12.2015 számú belső pályázata támogatta.

(This work was supported by the Internal Research Grants of the University of Medicine and Pharmacy of Tîrgu Mureş, Romania, Grant no. 17800/12/22.12.2015). Boda Ferenc köszöni Magyarország Collegium Talentum 2018 programjának támogatását.

Rövidítések jegyzéke

HPLC - high performance liquid chromatography (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
 MS - mass spectrometry (tömegspektrometria)
 SPE - solid phase extraction (szilárd fázisú extrakció)
 UFLC - ultra fast liquid chromatography (ultragyors folyadékkromatográfia)
 LLOQ - lower limit of quantification (meghatározási határ)
 QC - quality control (minőség ellenőrző minta)
 TIC - total ion chromatogram
 MRM - multiple reaction monitoring
 SIM - selected ion monitoring
 ESI - electrospray ionization

Irodalom

1. Erickson K, Drevets W, Schulkin J. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci Biobehav Rev* 2003, 27(3):233-246.
2. Yu S, Holsboer F, Almeida OFX. Neuronal actions of glucocorticoids: Focus on depression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, 108(3-5):300-309.
3. Gong S, Miao Y-L, Jiao G-Z, Sun M-J, Li H, Lin J, et al. Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. *PLoS One* 2015, 10(2):e0117503.
4. Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 2012, 37(5):589-601.
5. Yu T, Xu H, Wang W, Li S, Chen Z, Deng H. Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC-APCI-MS/MS. *J Chromatogr B* 2015, 1002:267-276.
6. Nisbet LA, Venson R, Wylie FM, Scott KS. Application of a Urine and Hair Validated LC-MS-MS Method to Determine the Effect of Hair Color on the Incorporation of 25B-NBOMe, 25C-NBOMe and 25I-NBOMe into Hair in the Rat. *J Anal Toxicol* 2017, 41(6):559-565.
7. Chen Z, Li J, Xu G, Yang J, Zhang J, Deng H. Simultaneous measurements of cortisol and cortisone in urine and hair for the assessment of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity among methadone maintenance treatment patients with LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B* 2014, 969:77-84.
8. Deshmukh NI, Zachar G, Petrőczy A, Székely AD, Barker J, Naughton DP. Determination of stanozolol and 3'-hydroxystanozolol in rat hair, urine and serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem Cent J* 2012, 6(1):162.
9. Koal T, Schmiederer D, Pham-Tuan H, Röhring C, Rauh M. Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012, 129(3-5):129-138.
10. Juck M, Long W. Determination of Hormones in Serum by LC/MS/MS Using Agilent Bond Elut Plexa SPE Application Note. n.d.

11. Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo VD, Cuomo G, De Iasio R, Baccini M, et al. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: Comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults. *Steroids* 2011, 76(3):244–253.
12. Li H, Liu X, Poh Y, Wu L, Zhou Q-G, Cai B-C. Rapid determination of corticosterone in mouse plasma by ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2014, 28(12):1860–1863.
13. Banka K; Buszewicz G; Teresinski G; Madro R. Cortisol, cortisone and corticosterone determination in biological materials by liquid chromatography mass spectrometry. *Problems of Forensic Sciences* 2008, 73: 44–52.
14. Mikšík I, Vylitová M, Pácha J, Deyl Z. Separation and identification of corticosterone metabolites by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, 726(1–2):59–69.
15. Travers S, Martinerie L, Bouvattier C, Boileau P, Lombès M, Pussard E. Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017, 165(Pt B):202–211.
16. Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, Armario A. Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *FASEB J.* 2015, 29(3):859–67.