

На правах рукописи



Дмитриева Екатерина Владимировна

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРОИДНЫХ
ГОРМОНОВ И СЕЛЕКТИВНЫХ МОДУЛЯТОРОВ АНДРОГЕННЫХ
РЕЦЕПТОРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

1.4.2 – Аналитическая химия (химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Краснодар
2023

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Научный руководитель: **Темердашев Азамат Зауалевич**
доктор химических наук, доцент, профессор кафедры
аналитической химии ФГБОУ ВО «Кубанский
государственный университет»

Официальные оппоненты: **Карцова Людмила Алексеевна**
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский государственный
университет», профессор кафедры органической химии

Апполонова Светлана Александровна
кандидат химических наук, ФГАОУ ВО «Первый
Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, заведующая
лабораторией фармакокинетики и метаболомного
анализа, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится 18 мая 2023 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.2.320.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Стероидные гормоны являются важными регуляторами биохимических процессов в организме человека, а изменение их концентраций может приводить к развитию различных заболеваний, поэтому возникает необходимость разработки методик их определения в биологических жидкостях. Для определения стероидных гормонов в клинической диагностике чаще всего используют кровь, отражающую концентрации аналитов в реальном времени, и мочу для оценки их усредненных концентраций за несколько часов. Недостатком анализа крови является инвазивность отбора проб, необходимость привлечения квалифицированного персонала, поэтому для определения аналитов в качестве альтернативной матрицы для анализа часто рассматривают слюну. Однако крайне низкие концентрации аналитов требуют разработки экспрессных, более высокочувствительных и селективных способов определения стероидных гормонов в слюне человека.

Помимо клинической диагностики определение стероидных гормонов в моче используется в допинг-контроле в качестве маркеров для подтверждения факта употребления запрещенных Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) соединений, включая как стероидные гормоны, так и их синтетические аналоги – селективные модуляторы андрогенных рецепторов (САРМ). Селективные модуляторы андрогенных рецепторов разработаны в качестве альтернативы стероидным гормонам для гормон-заместительной терапии, обладают анаболическим действием и сниженными побочными эффектами. Данные соединения не прошли полный цикл клинических испытаний, но их приобретение возможно через интернет, поэтому возникает необходимость разработки методик их определения.

Применение хроматографических методов с масс-спектрометрическим детектированием представляется наиболее перспективным для одновременного определения нескольких соединений в биологических жидкостях человека. Ограничением метода газовой хроматографии является необходимость дериватизации для повышения летучести аналитов, существенно увеличивающей продолжительность анализа, поэтому для их определения в настоящее время используют ультра-высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС).

Для достижения высокой чувствительности, воспроизводимости и правильности результатов УВЭЖХ-МС анализа необходимы подходящие для данного метода способы пробоподготовки. Используемые в настоящее время варианты пробоподготовки для определения соединений зачастую являются продолжительными, трудоемкими и требуют использования больших объемов растворителей, снижают пропускную способность аналитических лабораторий, а также требуют разработки экспрессных, чувствительных методик их определения.

Диссертационное исследование выполнялось в рамках реализации проектов Госзадания Минобрнауки РФ № FZEN-2020-0022, РФФИ (№ 22-13-20018), Кубанского научного фонда (№ НИП-20.1/4) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

Цель диссертационного исследования – разработка аналитических схем высокочувствительного и селективного хроматографического определения стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях человека.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

– обоснование и выбор хроматографического метода определения аналитов;

- разработка методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека с применением дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции;
- влияние дериватизации стероидных гормонов гидроксиламином на УВЭЖХ-МС определение аналитов в моче человека;
- применение твердофазной аналитической дериватизации стероидных гормонов при их УВЭЖХ-МС определении в моче человека;
- разработка методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в слюне человека с применением жидкость-жидкостной экстракции аналитов;
- разработка методик определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека и установление границ их применимости при анализе реальных образцов;
- определение некоторых производных арил-пропионамида дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией, используемых в качестве САРМ.

Научная новизна диссертационного исследования.

1. Разработаны аналитические схемы экспрессного, высокочувствительного и селективного УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче и слюне человека.
2. Разработаны аналитические схемы высокочувствительного и селективного УВЭЖХ-МС определения САРМ в моче человека.

Практическая значимость. Разработанная методика определения стероидных гормонов в моче человека «Массовая концентрация тестостерона и кортизола в моче человека. Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием» метрологически аттестована и внесена в Федеральный реестр методик измерений МИ 02067847.10–2022 для практического применения в профильных лабораториях.

Разработанные методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов и САРМ в биологических жидкостях могут быть применены в клиническом анализе и допинг-контроле.

Положения, выносимые на защиту:

- методика УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека с дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией;
- результаты оценки влияния дериватизации стероидных гормонов гидроксиламином на УВЭЖХ-МС определение аналитов;
- методика УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека с твердофазной аналитической дериватизацией;
- методика УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в слюне человека;
- методики определения САРМ в моче человека.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивалась использованием современных методов физико-химического анализа, научного оборудования для хроматографических и масс-спектрометрических исследований, удовлетворительной согласованностью полученных результатов с литературными данными. Разработанные методики определения стероидных гормонов по своим метрологическим характеристикам отвечают требованиям Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и ВАДА.

Апробация работы. Результаты работы обсуждены на Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017 г.), III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (Краснодар, 2017 г.), V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2018 г.), 25th International Symposium on Separation Sciences (Лодзь, 2019 г.), III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2019 г.), IV Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография

и капиллярный электрофорез» с международным участием (Краснодар, 2020 г.), MENDELEEV 2021 The XII International Conference On Chemistry For Young Scientists (Санкт-Петербург, 2021 г.), VI Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2021 г.), Четвертом съезде аналитиков России (Москва, 2022 г.).

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликованы 11 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в Web of Science и Scopus, а также 9 тезисов докладов в материалах научных конференций, получен патент РФ на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 43 таблицы и 32 рисунка, состоит из введения, литературного обзора, 3 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы из 237 наименований.

Личный вклад автора состоял в обобщении, систематизации данных по теме диссертации, выполнении теоретических и экспериментальных исследований для разработки методик определения стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях человека, обработке данных, подготовке докладов и выступлениях на конференциях, практической апробации полученных результатов. Формулировка целей и задач исследования, а также оформление публикаций выполнены совместно с научным руководителем.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования.

В литературном обзоре анализируются подходы по определению стероидных гормонов и САРМ в биологических жидкостях человека, обсуждаются преимущества и недостатки хроматографических методов с масс-спектрометрическим детектированием для этих целей. Обсуждены наиболее общепринятые способы подготовки проб биологических жидкостей для определения изучаемых соединений, рассмотрены их преимущества и недостатки.

В экспериментальной части описаны объекты исследования, реактивы и материалы, основное и вспомогательное научное оборудование, методы и методики анализа. Приводятся результаты исследований, посвященные УВЭЖХ-МС определению стероидных гормонов в моче человека с применением дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции и твердофазной аналитической дериватизации, обсуждаются преимущества дериватизации на патроне для твердофазной экстракции при определении стероидных гормонов. Представлены результаты исследований, посвященных определению стероидных гормонов в слюне человека методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС). Показана возможность УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче человека с использованием различных способов пробоподготовки.

Объекты исследования. Объектами исследования были моча и слюна мужчин и женщин в возрасте от 20 до 45 лет. Добровольцы были проинформированы о деталях эксперимента и дали устное согласие на участие в исследовании.

Реактивы и материалы. Исследования проводили с использованием стандартных образцов тестостерона, дигидротестостерона, кортизона, кортизола, кортикостерона, 17 α -эстрадиола, эстрона, эстриола, прогестерона, 11 α -гидроксипрогестерона и метилтестостерона (все Sigma Aldrich, США), андарина (S-4), лигандрола (LGD-4033),

миостопа (YK-11), остарина (S-22), радарина (RAD-140), сармастола (AC-262536), S-23, ибутаморена (МК-677), лаксогенина и реверола (SR-9009) (все Shanghai Soyoung Biotech, Китай). Твердофазную экстракцию аналитов осуществляли с использованием патронов для твердофазной экстракции Oasis HLB (Waters, Ирландия), Strata C18-E (Phenomenex, США), Isolute C18 (EC) (Biotage, Швеция), Varian Bond Elut C8 (Agilent, США). Для дериватизации аналитов использовали 50% водный раствор гидроксилamina (Sigma-Aldrich, США).

Научное оборудование. Исследования проводили с использованием ультра-высокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США), состоящего из бинарного градиентного насоса HPG-3400RS, автоматического дозатора WPS-3000 и термостата TCC-3000, соединенного с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum Access Max (Thermo Scientific, США), а также ультра-высокоэффективного жидкостного хроматографа Elute (Bruker, Германия), состоящего из бинарного градиентного насоса HPG 1300, автоматического дозатора и термостата Elute UHPLC, соединенного с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром Maxis Impact (Bruker, Германия).

Определение стероидных гормонов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией

Для определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека наиболее часто применяют твердофазную и жидкость-жидкостную экстракцию, однако данные способы являются продолжительными, трудоемкими, требуют использования больших объемов токсичных растворителей. Для преодоления этих ограничений при разработке методики определения стероидных гормонов в моче применили дисперсионную жидкость-жидкостную микроэкстракцию аналитов, где в образец вводили смесь экстрагента и диспергента с образованием эмульсии, обладающей большой поверхностью контакта фаз, ускоряющей экстракцию. При выборе условий микроэкстракции установили ряд требований к растворителю: экстрагент должен эффективно извлекать исследуемые соединения, иметь более высокую плотность по сравнению с водным образцом, высокую растворимость в диспергенте и низкую в анализируемом образце; диспергент должен хорошо смешиваться с образцом и экстрагентом и обеспечивать образование эмульсии. В качестве экстрагентов для извлечения 17 α -эстрадиола, эстриола, эстрона, тестостерона, дигидротестостерона, кортизона, кортизола, прогестерона, 11 α -гидроксипрогестерона из мочи человека применили хлорированные органические растворители (ди-, три-, тетрачлорметан), удовлетворяющие вышеприведенным требованиям, а в качестве диспергентов – ацетон, метанол, этанол и ацетонитрил. На эффективность экстракции аналитов может влиять ряд факторов: тип экстрагента, тип диспергента, объем экстрагента и объем диспергента.

Поскольку стероидные гормоны в моче человека, в основном, находятся в конъюгированной форме, перед проведением экстракции осуществляли их деконъюгацию с использованием фермента β -глюкуронидазы *E. coli* в течение 30 мин при 50 °С и pH 6,5. Проведенные экспериментальные исследования с различными сочетаниями экстрагента и диспергента показали, что использование хлороформа и ацетонитрила обеспечивает наибольшие степени извлечения аналитов при pH 9. Влияние объемов экстрагента и диспергента, времени перемешивания и высаливающего эффекта хлорида натрия на степени извлечения аналитов изучали с применением плана Бокса-Бенкена (таблица 1). Расчеты проводили в ПО STATISTICA 10 (Statsoft) для оценки влияния различных факторов (независимых переменных) на аналитический сигнал (например, площадь пика – зависимая переменная) на 3 уровнях и оценивали взаимодействие между ними.

Использование плана Бокса-Бенкена позволило сократить количество экспериментов при оптимизации уровней независимых переменных по сравнению с их последовательной оптимизацией.

Таблица 1 – Уровни независимых переменных, используемые в плане Бокса-Бенкена, при определении стероидных гормонов в моче

Независимая переменная	Уровень		
	-1	0	+1
Объем диспергента, мкл	600	850	1100
Объем экстрагента, мкл	100	150	200
Количество хлорида натрия, мг	0	150	300
Время перемешивания, с	5	15	30

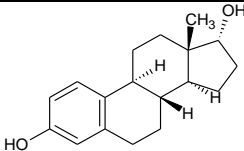
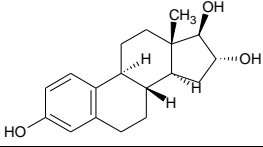
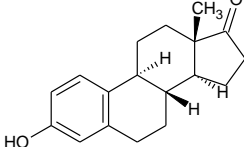
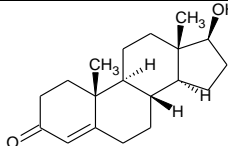
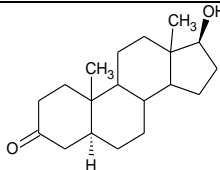
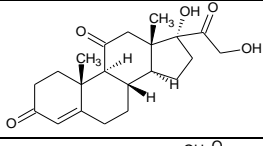
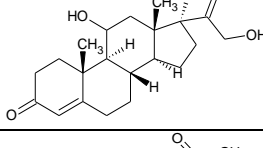
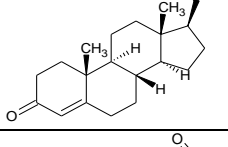
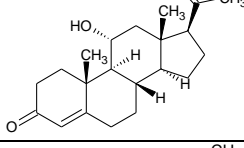
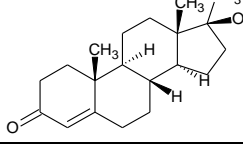
После оптимизации условий пробоподготовки использовали следующую схему анализа мочи: к аликвоте мочи объемом 3 мл добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (метилтестостерон) и 1 мл фосфатного буферного раствора, содержащего фермент β -глюкуронидазу *E. coli* и термостатировали пробирку при 50 °С в течение 30 мин в твердотельном нагревателе пробирок. После охлаждения до комнатной температуры в образец вносили 1 мл боратного буферного раствора (рН 9) и 150 мг хлорида натрия и перемешивали для растворения соли. Затем шприцем в образец вводили смесь трихлорметана (150 мкл) и ацетонитрила (1100 мкл) для образования эмульсии. Полученную смесь перемешивали в течение 15 с и центрифугировали 10 мин при 4000 об./мин. Органическую фазу переносили в виалу шприцем, упаривали досуха в токе азота и сухой остаток перерастворяли в 100 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) и анализировали методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием.

Разделение анализов проводили на аналитической колонке Phenomenex Kinetex C18 (100 мм × 2,1 мм, 1,7 мкм), оснащенной соответствующей предохранительной колонкой. В качестве подвижной фазы использовали систему 0,1% муравьиная кислота в метаноле – 0,1% муравьиная кислота в воде в режиме градиентного элюирования при температуре термостатирования колонки 40 °С и скорости потока подвижной фазы 0,4 мл/мин.

Условиями масс-спектрометрического детектирования анализов были: источник ионизации – электрораспылительная ионизация; температура в источнике ионизации – 250 °С; напряжение на капилляре – 4000 В; напряжение на экстрагирующей линзе – 500 В; давление газа-распылителя (азот) – 0,1 мПа; расход газа-осушителя – 5 л/мин; скорость сканирования – 3 Гц; диапазон сканирования масс – 150–1000 Да. Обработку результатов осуществляли с ПО Bruker Data Analysis 4.4. Параметры детектирования исследуемых стероидных гормонов представлены в таблице 2.

Разработанную методику определения стероидных гормонов в моче валидировали с использованием синтетической мочи с учетом эндогенной природы стероидных гормонов в соответствии с рекомендациями Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA). Пределы обнаружения и определения анализов, а также линейные диапазоны их определения сведены в таблицу 3. Предел обнаружения анализов устанавливали по соотношению сигнал : шум равном 3, а предел определения соответствовал наименьшей концентрации, определяемой с погрешностью в пределах 15%.

Таблица 2 – Параметры хроматомасс-спектрометрического детектирования исследуемых стероидных гормонов

Аналит	Структурная формула	[M+H] ⁺ , Да	Погрешность определения массы, ppm	t _R , мин
17α-Эстрадиол		273,1849	4,2	5,3
Эстриол		289,1798	3,8	4,0
Эстрон		271,1693	3,9	4,4
Тестостерон		289,2162	3,8	5,4
Дигидротестостерон		291,2319	4,1	5,8
Кортизон		361,2010	3,0	4,1
Кортизол		363,2166	3,0	4,2
Прогестерон		315,2319	4,4	5,9
11α-Гидроксипрогестерон		331,2268	2,7	4,9
Метилтестостерон ¹		303,2319	4,3	5,6

¹ – внутренний стандарт

Таблица 3 – Аналитические характеристики методики хроматомасс-спектрометрического определения стероидных гормонов

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2
17 α -Эстрадиол	10	50	50–500	0,996
Эстриол	10	50	50–500	0,996
Эстрон	10	50	50–500	0,995
Тестостерон	0,25	1,0	1,0–500	0,998
Дигидротестостерон	0,5	2,5	2,5–500	0,998
Кортизон	0,25	1,0	1,0–500	0,998
Кортизол	0,25	1,0	1,0–500	0,997
Прогестерон	0,5	2,5	2,5–500	0,997
11 α -Гидроксипрогестерон	0,5	2,5	2,5–500	0,997

Определение стероидных гормонов в моче человека с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции показало, что такая пробоподготовка имеет преимущества по сравнению с твердофазной и жидкость-жидкостной экстракцией – простота и высокая скорость пробоподготовки, высокие факторы концентрирования (концентрирование аналитов в 30 раз) и использование малых объемов органических растворителей (150 мкл трихлорметана и 1100 мкл ацетонитрила).

С другой стороны, чувствительность методики оказалась недостаточной для эстрогенов и связана с их низкой эффективностью ионизации в источнике электрораспылительной ионизации. Для преодоления данного недостатка изучили возможность дериватизации после дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции аналитов. В качестве дериватирующего агента выбрали гидроксилламин, поскольку он обеспечивает высокую чувствительность определения за счет возможности легкого протонирования атома азота в источнике электрораспылительной ионизации, а реакция получения производных является простой и не требует специальных условий. Кроме того, возможен ввод реакционной смеси в хроматограф без дополнительных стадий очистки после получения производных. Схема получения оксимов стероидных гормонов при использовании гидроксилламина в качестве дериватирующего агента приведена на рисунке 1.

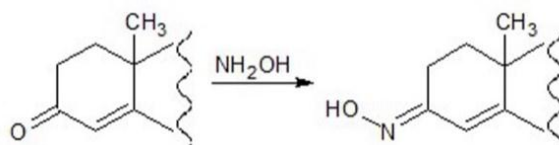


Рисунок 1 – Схема образования оксимов стероидных гормонов при дериватизации гидроксилламином

УВЭЖХ-МС детектирование и деконъюгацию стероидных гормонов при анализе реальных образцов мочи проводили с учетом вышеописанных условий. Полноту образования оксимов кетостероидов оптимизировали концентрацией гидроксилламина, температурой и временем термостатирования. Время реакции варьировали в диапазоне от 30 до 120 мин, температуру – от комнатной до 70 °С, а концентрацию гидроксилламина от 2,5% до 10%. Полноту протекания реакции оценивали по наличию пиков производных и отсутствию пиков исходных соединений на хроматограммах, используя ионы, указанные в таблице 4.

Таблица 4 – Условия УВЭЖХ-МС детектирования аналитов

Аналит	Брутто-формула	Моноизотопная масса, Да	[M+H] ⁺ , Да	Погрешность определения массы, ppm	t _R , мин
Тестостерон	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288,2089	289,2162	0,7	5,2
Производное тестостерона	C ₁₉ H ₂₉ NO ₂	303,2198	304,2271	2,6	5,4
Дигидротестостерон	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290,2246	291,2319	0,7	5,5
Производное дигидротестостерона	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂	305,2355	306,2428	2,6	5,6
Кортизон	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,1937	361,2010	0,3	3,8
Производное кортизона	C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₅	390,2155	391,2227	2,0	3,8
Гидрокортизон	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362,2093	363,2166	-0,3	3,9
Производное гидрокортизона	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₅	392,2311	393,2384	1,8	3,9
Прогестерон	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,2246	315,2319	1,6	5,7
Производное прогестерона	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂	344,2464	345,2537	2,0	5,8
11α-Гидроксипрогестерон	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330,2195	331,2268	0,3	4,5
Производное 11α-гидроксипрогестерона	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₃	360,2413	361,2486	1,9	4,9
Эстрон	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,1620	271,1693	3,7	4,9
Производное эстрона	C ₁₈ H ₂₃ NO ₂	285,1729	286,1802	1,7	5,0
Метилтестостерон ¹	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302,2246	303,2319	1,6	5,4
Производное метилтестостерона ¹	C ₂₀ H ₃₁ NO ₂	317,2355	318,2428	2,5	5,5

¹ – внутренний стандарт

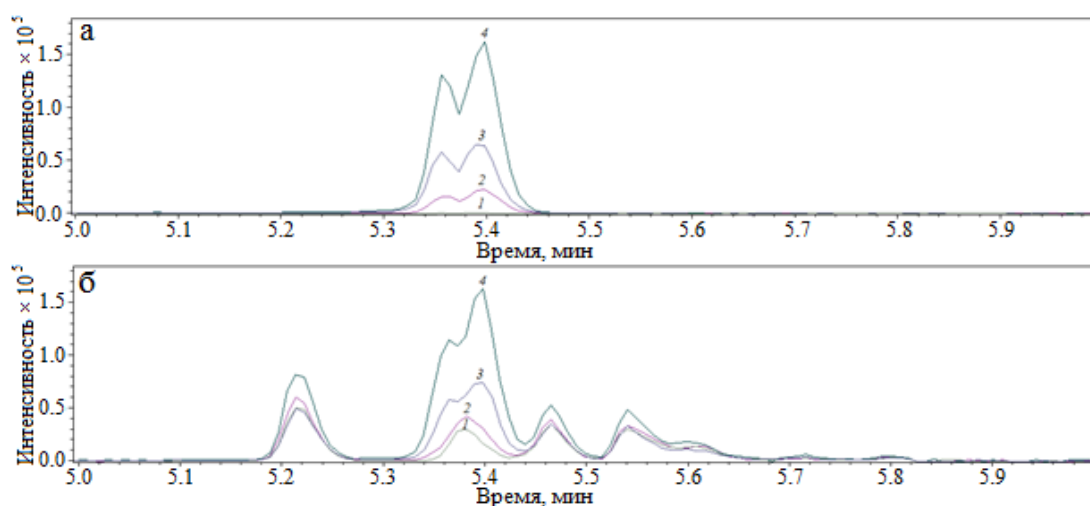
10% раствор гидроксиламина (по объему) обеспечивал полноту протекания реакции при 70 °С и времени термостатирования 90 мин, поэтому данные условия выбрали как оптимальные для дальнейших экспериментов. При меньших значениях концентрации дериватизирующего агента, времени и температуре термостатирования на хроматограммах наблюдали пики исходных соединений или моно- и дизамещенных производных (для кортизона, кортизола, прогестерона и 11α-гидроксипрогестерона).

Для дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции оксимов стероидных гормонов использовали 1 мл образца из-за их более высокой эффективности ионизации. Оптимизировали типы экстрагента и диспергента, их объемы, высаливающий эффект хлорида натрия от 0 до 100 мг, рН среды (содержание тетрабората натрия от 0 до 10 мг) и время перемешивания. Оптимальными были следующие условия пробоподготовки: в микроцентрифужную пробирку емкостью 2 мл вносили 1 мл образца с внутренним стандартом метилтестостероном (100 нг/мл) и 0,3 мл фосфатного буферного раствора (рН 6,5), содержащего фермент β-глюкуронидазу *E. coli*, образец инкубировали в течение 30 мин при 50 °С. После охлаждения до комнатной температуры шприцем добавляли в образец смесь 150 мкл хлороформа и 500 мкл ацетона для образования эмульсии, перемешивали 15 с и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Нижний слой переносили в виалу, упаривали досуха в токе азота, сухой остаток растворяли в 100 мкл 10% раствора гидроксиламина в смеси метанол–вода (1 : 1, по объему), виалу термостатировали в течение 90 мин при 70 °С, затем проводили анализ в описанных ранее условиях. Установленные пределы обнаружения, определения и линейные диапазоны для кетостероидов представлены в таблице 5.

Применение гидроксилamina значительно повысило чувствительность методики от 2,5 до 100 раз (для эстрона). Основной недостаток его применения в качестве дериватирующего агента – возможное расщепление пиков на хроматограммах из-за образования нескольких стереоизомеров, что видно на примере тестостерона в модельном и реальном образце мочи (рисунок 2). Преодолеть это ограничение возможно оптимизацией элюирования или использованием различных подходов к интегрированию пиков.

Таблица 5 – Аналитические характеристики методики определения стероидных гормонов

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2
Тестостерон	0,10	0,25	0,25–100	0,999
Дигидротестостерон	0,10	0,25	0,25–100	0,999
Кортизон	0,25	1,0	1,0–100	0,997
Гидрокортизон	0,25	1,0	1,0–100	0,995
Прогестерон	0,25	0,5	0,5–100	0,996
1 α -Гидроксипрогестерон	0,25	0,5	0,5–100	0,998
Эстрон	0,10	0,25	0,25–100	0,996



а – модельный раствор, б – реальный образец мочи

Рисунок 2 – Хроматограммы по выделенному иону (m/z 304,2271) с добавками 0 (1), 10 (2), 50 (3), 100 (4) нг/мл тестостерона

Последовательное проведение экстракции и дериватизации аналитов увеличило продолжительность пробоподготовки, поэтому изучили возможность объединения стадий экстракции и дериватизации твердофазной аналитической дериватизацией на патроне для ТФЭ.

Определение стероидных гормонов в моче твердофазной аналитической дериватизацией

Для достижения высокой чувствительности за счет концентрирования и дериватизации аналитов наряду с уменьшением времени подготовки проб к анализу изучили возможность применения твердофазной аналитической дериватизации для определения кетостероидов. В качестве дериватирующего агента использовали гидроксилamin, поскольку реакция получения производных является простой и возможен прямой анализ элюата методом обращенно-фазовой УВЭЖХ-МС.

Для концентрирования аналитов использовали патроны для ТФЭ Strata C-18-E (100 мг, 1 мл). Кондиционирование и уравнивание патрона проводили 1 мл метанола и 1 мл дистиллированной воды с учетом рекомендаций производителя, после чего образец загружали на патрон. Оптимизировали состав промывочного раствора после загрузки образца с использованием водно-метанольных смесей с содержанием метанола от 5% до 50% по объему, а также объем элюента, необходимый для количественной десорбции аналитов с патрона для ТФЭ. При использовании 30% метанола смыв аналитов с сорбента не наблюдался, а при более высоких его содержаниях в промывочном растворе десорбировались кортизон и кортизол, поэтому в дальнейших исследованиях использовали эти условия десорбции. Объем 0,5 мл метанола оказался достаточным для количественной десорбции аналитов.

При оптимизации условий дериватизации аналитов на патроне для твердофазной экстракции изучили влияние концентрации дериватирующего агента, температуры и времени термостатирования. Объем дериватирующего агента 90 мкл является достаточным для полного смачивания сорбента. Влияние концентрации водного раствора гидроксиламина оценивали в диапазоне от 1% до 25% по объему. Термостатирование патрона осуществляли при температурах от 25 до 80 °С и времени термостатирования 15–120 мин. Полноту протекания реакции получения производных оценивали по отсутствию пиков исходных соединений и/или монозамещенных производных кортизона, кортизола, прогестерона и 11 α -гидроксипрогестерона. При использовании 90 мкл 20% раствора гидроксиламина и термостатировании патрона для ТФЭ в течение 60 мин при 80 °С на хроматограммах отсутствовали пики исходных соединений и монозамещенных оксимов кортизона, кортизола, прогестерона и 11 α -гидроксипрогестерона, что подтверждает полноту протекания реакции. После элюирования аналитов упаривали элюат в токе азота и перерастворяли сухой остаток в 150 мкл смеси метанол-вода (1 : 1, по объему) для анализа методом УВЭЖХ-МС.

Оптимальная схема твердофазной аналитической дериватизации для определения стероидных гормонов в моче показана на рисунке 3.

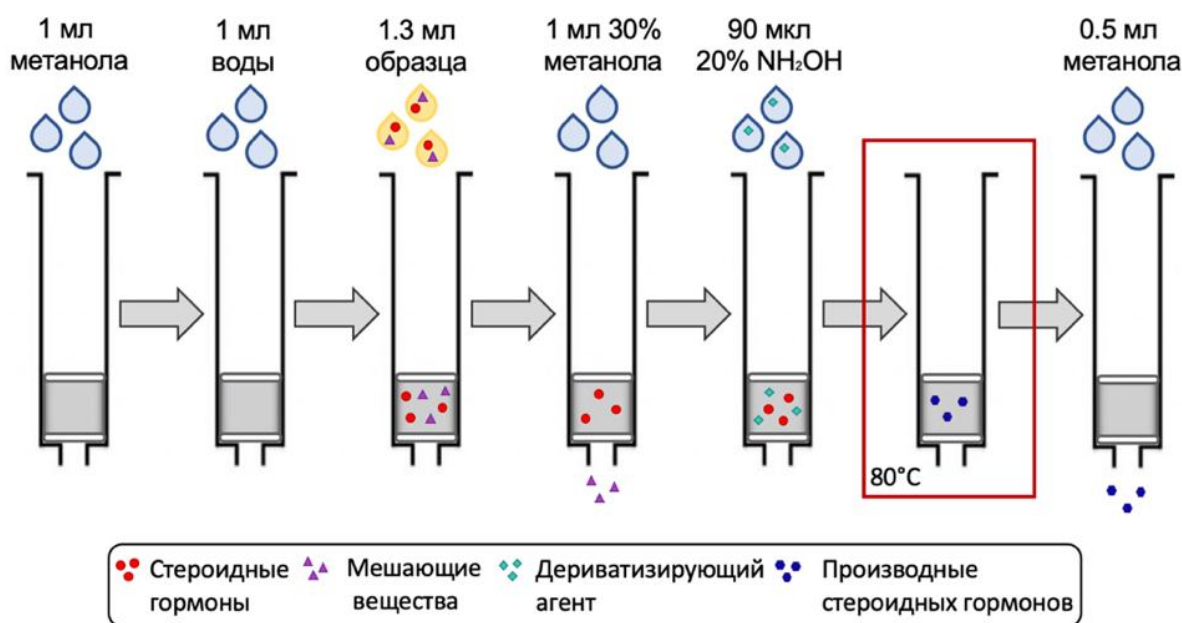


Рисунок 3 – Схема твердофазной аналитической дериватизации стероидных гормонов в моче человека

При анализе реальных образцов перед проведением твердофазной аналитической дериватизации осуществляли деконъюгацию стероидных гормонов в условиях, описанных ранее с использованием 0,3 мл фосфатного буферного раствора, содержащего фермент β -глюкуронидазу *E. coli* и внутренний стандарт метилтестостерон с концентрацией 167 нг/мл. Поскольку в качестве дериватирующего агента использовали гидроксилламин, образующий несколько стереоизомеров, что может приводить к расщеплению пиков на хроматограмме, оптимизировали условия хроматографического разделения аналитов.

Для проведения хроматографического анализа изучали две аналитические колонки: Phenomenex Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) и Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) с соответствующими предохранительными колонками. Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) в качестве твердого носителя имеет поверхностно-пористый силикагель («core-shell»), эндкепированный триметилсилильными функциональными группами, а в Phenomenex Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) сорбент имеет полярную поверхность и октадецильные функциональные группы. В качестве подвижной фазы использовали систему из 0,1% муравьиной кислоты в метаноле и 0,1% муравьиной кислоты в воде в режиме градиентного элюирования при температуре термостатирования колонки 40 °С. Квадруполь-времяпролетное детектирование аналитов проводили в оптимизированных ранее условиях.

Аналитическая колонка Phenomenex Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) обеспечила более высокую эффективность разделения и частичное расщепление пиков кортизона и кортизола, которые легко можно интегрировать как один, поэтому ее использовали в дальнейших экспериментах. Разработанную методику валидировали в соответствии рекомендациями Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) по валидации биоаналитических методик с использованием синтетической мочи. Параметры чувствительности методики представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Аналитические характеристики методики определения стероидных гормонов в моче человека

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Диапазон линейности, нг/мл	R^2
Тестостерон	0,25	1,0	1,0–100	0,999
Дигидротестостерон	0,25	1,0	1,0–100	0,998
Кортизон	0,5	2,5	2,5–100	0,999
Кортизол	0,5	2,5	2,5–100	0,996
Эстрон	0,5	2,5	2,5–100	0,999
Прогестерон	0,25	1,0	1,0–100	0,999
11 α -Гидроксипрогестерон	0,25	1,0	1,0–100	0,999

Данные таблицы 6 свидетельствуют о том, что использование твердофазной аналитической дериватизации для определения стероидных гормонов является более перспективным. Кроме того, поскольку дериватизация аналитов протекает на поверхности сорбента, производные аналитов образуются за меньший период времени, чем в растворе, что проиллюстрировано на рисунке 4. Помимо уменьшенного времени анализа, данный способ обладает высокой чувствительностью и низким матричным эффектом.

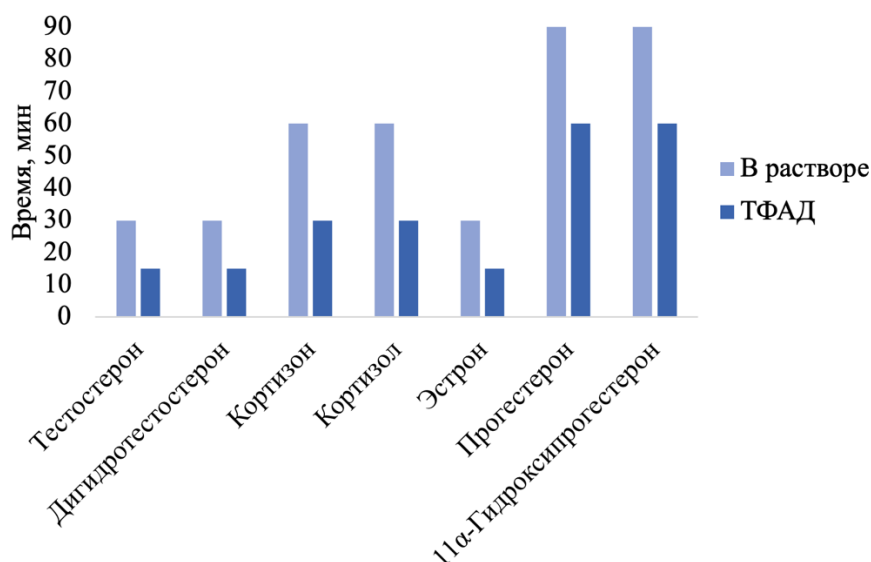


Рисунок 4 – Сравнение оптимального времени дериватизации аналитов гидроксиламином в растворе и на патроне для ТФЭ

Определение стероидных гормонов в слюне жидкость-жидкостной экстракцией

В диагностических целях для определения стероидных гормонов в реальном времени часто используют кровь. Недостатком анализа крови является инвазивность отбора проб и наличие болевых ощущений, поэтому в качестве альтернативной матрицы для определения стероидных гормонов часто рассматривают слюну. Основными преимуществами такого подхода являются неинвазивность и простота пробоотбора, стабильность образцов при комнатной температуре, а также отсутствие необходимости привлечения квалифицированного персонала для отбора проб.

Проведенные исследования показали хорошую корреляцию данных при определении стероидных гормонов в крови и слюне. Для достижения высокой чувствительности и селективности определения аналитов использовали систему, состоящую из ультра-высокоэффективного жидкостного хроматографа и тройного квадрупольного масс-спектрометра. Хроматографическое разделение аналитов проводили с использованием аналитической колонки Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) и 0,1% муравьиной кислоты в воде–0,1% муравьиной кислоты в метаноле в качестве компонентов подвижной фазы в режиме градиентного элюирования при температуре термостатирования 40 °С и скорости потока подвижной фазы 0,4 мл/мин. Условия детектирования стероидов в режиме мониторинга выбранных реакций представлены в таблице 7. Влияние объема экстрагента, времени перемешивания и значения рН на степени извлечения аналитов изучили с использованием плана Бокса-Бенкена.

Оптимизированная пробоподготовка представляла следующую схему: к 1 мл образца слюны добавляли внутренний стандарт (метилтестостерон с конечной концентрацией 20 нг/мл). В образец вносили 1,5 мл метил-трет-бутилового эфира, перемешивали 30 с, центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об./мин, затем вымораживали водную фазу при -35 °С с последующим переносом органической фазы в другую пробирку. Органическую фазу упаривали досуха при 60 °С и сухой остаток перерастворяли в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1 по объему). В этих условиях степени извлечения аналитов составляли 91–98%.

Таблица 7 – Условия тандемного масс-спектрометрического детектирования стероидных гормонов в слюне с использованием нагреваемого источника электрораспылительной ионизации

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	Напряжение на экстрагирующей линзе, В	t_R , мин
Тестостерон	289,2	79,2	38	82	4,98
		97,2 ¹	22		
		109,2	25		
Кортизон	361,2	105,2	38	79	3,59
		121,1	27		
		163,1 ¹	22		
Кортизол	363,2	121,1 ¹	24	86	3,81
		267,1	17		
		309,1	15		
Кортикостерон	347,2	91,2	48	68	4,47
		121,1 ¹	24		
		293,2	15		
Прогестерон	315,2	79,2	39	76	5,35
		97,2 ¹	21		
		109,2	26		
11 α -Гидроксипрогестерон	331,2	105,2	38	74	4,65
		121,1 ¹	25		
		271,2	16		
Метилтестостерон ²	303,2	79,2	40	83	5,14
		97,2	25		
		109,2 ¹	27		

¹ – ион, используемый для количественной оценки, ² – внутренний стандарт

Экспериментально установленные пределы обнаружения и определения стероидных гормонов в слюне, а также линейный диапазон методики определения сведены в таблицу 8.

Таблица 8 – Аналитические характеристики методики определения стероидных гормонов в слюне с применением жидкость-жидкостной экстракции

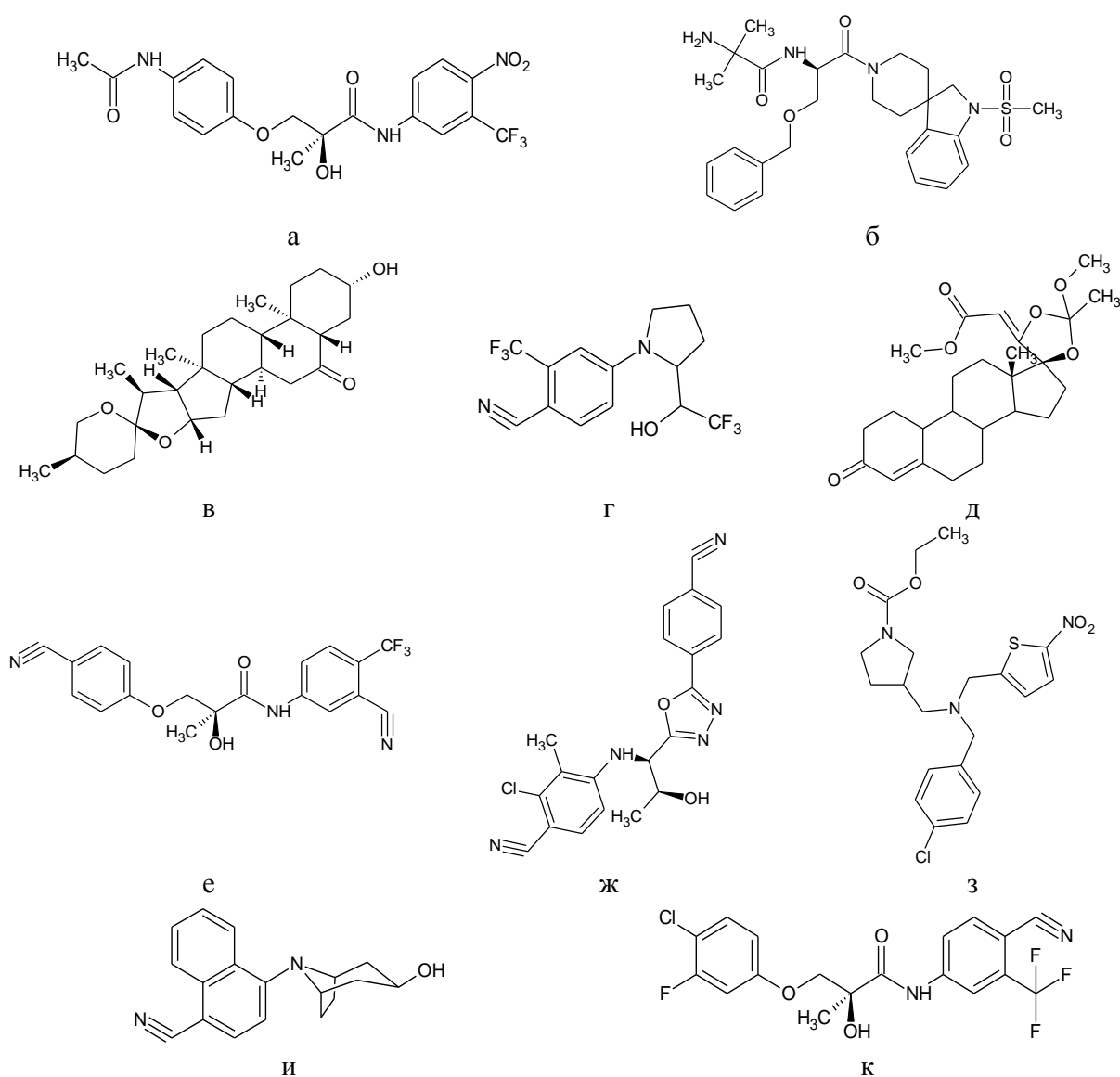
Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2
Тестостерон	0,05	0,10	0,10–50	0,999
Кортизон	0,25	0,5	0,5–50	0,995
Гидрокортизон	0,25	0,5	0,5–50	0,999
Кортикостерон	0,25	0,5	0,5–50	0,996
Прогестерон	0,05	0,10	0,10–50	0,999
11 α -Гидроксипрогестерон	0,05	0,10	0,10–50	0,999

Возможность одновременного чувствительного определения стероидных гормонов различных классов в слюне делает этот объект исследования перспективным для диагностических целей, имеющим большое количество преимуществ по сравнению с кровью.

Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче

Селективные модуляторы андрогенных рецепторов – соединения, впервые описанные в 1998 г. как альтернатива стероидным гормонам в гормон-заместительной терапии, обладающие повышенной анаболической активностью и сниженными побочными (андрогенными) эффектами. Несмотря на то, что данные соединения не прошли полный цикл клинических испытаний, САРМ получили распространение на «черном» рынке благодаря вышеперечисленным свойствам, поэтому с 2008 г. внесены в Запрещенный список Всемирного антидопингового агентства. Эта же проблема является причиной разработки методик их определения и контроля в биологических жидкостях человека.

На примере определения ряда селективных модуляторов андрогенных рецепторов (рисунок 5) в моче человека изучили возможность анализа разбавленного образца, поскольку предложенная пробоподготовка является простой, экспрессной, не приводит к потерям аналитов, а также не требует использования большого количества реагентов.



а – андарин; б – ибутаморен; в – лаксогенин; г – лиандрол; д – миостоп; е – остарин; ж – радарин; з – реверол; и – сармастол; к – S-23

Рисунок 5 – Структурные формулы определяемых САРМ

УВЭЖХ-МС/МС анализ мочи человека проводили с использованием аналитической колонки Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм). В качестве компонентов подвижной фазы использовали 0,1% муравьиную кислоту в метаноле и 0,1% муравьиную кислоту в воде в режиме градиентного элюирования. Оптимальная скорость потока составила 0,45 мл/мин, а температура термостата – 40 °С. Для представителей класса производных арил-пропионамида (андарина, остарина и S-23) более предпочтительно детектирование в виде отрицательно заряженных ионов. Андарин способен образовывать и протонированный, и депротонированный молекулярный ион, при этом детектирование депротонированного иона повышает чувствительность его определения в два раза, а остарин и S-23 не способны образовывать протонированный молекулярный ион в этих условиях. Остальные аналиты не могут быть детектированы в виде отрицательно заряженных ионов.

Оптимизированная пробоподготовка представляла следующую схему: в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносили 100 мкл мочи и 900 мкл смеси ацетонитрил–вода (70 : 30, по объему), содержащей внутренние стандарты (метилтестостерон – для миостоп, индапамид – для остальных аналитов), перемешивали с центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об./мин. Надосадочный слой переносили в стеклянные виалы для анализа. Условия детектирования приведены в таблице 9. Установленные пределы обнаружения и определения САРМ в моче методом УВЭЖХ-МС/МС сведены в таблицу 10.

Таблица 9 – Условия тандемного масс-спектрометрического детектирования селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	t_R , мин	Напряжение на экстрагирующей линзе, В
Андарин	442,1	190,0	23	3,25	101
		148,0	29		
		108,1 ¹	32		
	440,0	150,0	23		-63
		260,9 ¹	24		
		204,9	31		
Ибутаморен	529,2	263,0	15	2,55	77
		267,1 ¹	19		
		235,0	22		
Лаксогенин	445,3	283,0	18	6,70	65
		191,0 ¹	19		
		145,0	36		
Лигандрол	339,1	240,0	24	4,41	88
		220,0 ¹	27		
		199,0	28		
Миостоп	399,2	357,1	10	6,48	57
		325,1 ¹	16		
		307,1	23		
Остарин	388,0	268,9	21	3,53	-46
		118,0 ¹	40		
		185,0	40		
Радарин	394,0	223,0 ¹	13	3,40	82
		170,0	30		

Продолжение таблицы 9

Реверол	438,1	125,0 ¹	30	6,51	56
Сармастол	279,1	169,1	23	4,48	55
		195,1	24		
		193,1 ¹	36		
S-23	414,7	268,8	22	5,39	-67
		144,8 ¹	23		
		184,9	39		
Индапамид ²	366,0	132,1 ¹	16	2,63	75
		91,2	34		
		117,1	36		
Метил-тестостерон ²	303,3	109,2 ¹	29	4,66	55
		97,2	30		
		79,2	32		

¹ – ион, используемый для количественной оценки, ² – внутренний стандарт

Таблица 10 – Аналитические характеристики методики определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче

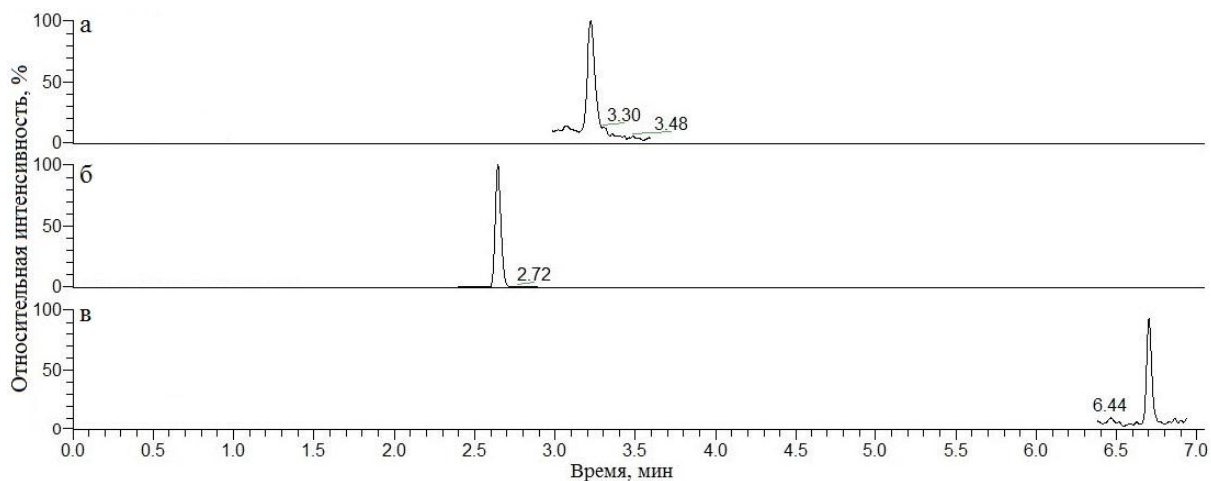
Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R ²
Андарин	2,5 ¹	25	25–2500	0,999
	5 ²		25–2500	0,998
Ибутаморен	10	50	50–2500	0,999
Лаксогенин	25	50	50–2500	0,997
Лигандрол	25	50	50–2500	0,997
Миостоп	7,5	25	25–2500	0,996
Остарин	2,5	25	25–2500	0,999
Радарин	25	50	50–2500	0,999
Реверол	5	25	25–2500	0,998
Сармастол	7,5	25	25–2500	0,997
S-23	2,5	10	10–2500	0,998

¹ – в режиме регистрации отрицательных ионов, ² – в режиме регистрации положительных ионов

Предложенную пробоподготовку применили при анализе образцов мочи спустя 12 часов после однократного перорального употребления 15 мг вещества. Результаты показали, что содержания андарина, ибутаморена и лаксогенина в пробах находятся в линейном диапазоне градуировочной зависимости (рисунок 6). Содержания остальных соединений были ниже предела обнаружения, поэтому для повышения чувствительности их определения изучили возможность применения твердофазной экстракции с целью концентрирования аналитов.

С учетом структур определяемых аналитов были выбраны следующие патроны для ТФЭ: Varian Bond Elut C8 (100 мг, 1 мл), Biotage Isolute C18 (EC) (100 мг, 1 мл) и Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл). После загрузки образца патрон промывали смесью метанола и воды (5 : 95, по объему). Затем сушили патрон для ТФЭ в токе азота, аналиты элюировали 0,5 мл метанола; элюат упаривали в токе азота, сухой остаток перерастворяли в смеси метанол–дистиллированная вода (1 : 1, по объему) для проведения анализа. Выбранные для ТФЭ патроны обладают близким, гидрофобным механизмом удерживания аналитов и извлекают

большинство соединений, кроме ибутаморена, для которого степени извлечения были значительно выше на патроне Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл), поэтому для дальнейших исследований использовали данный патрон. Установленные пределы обнаружения и определения САРМ, а также линейные диапазоны градуировочных зависимостей представлены в таблице 11.



а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин

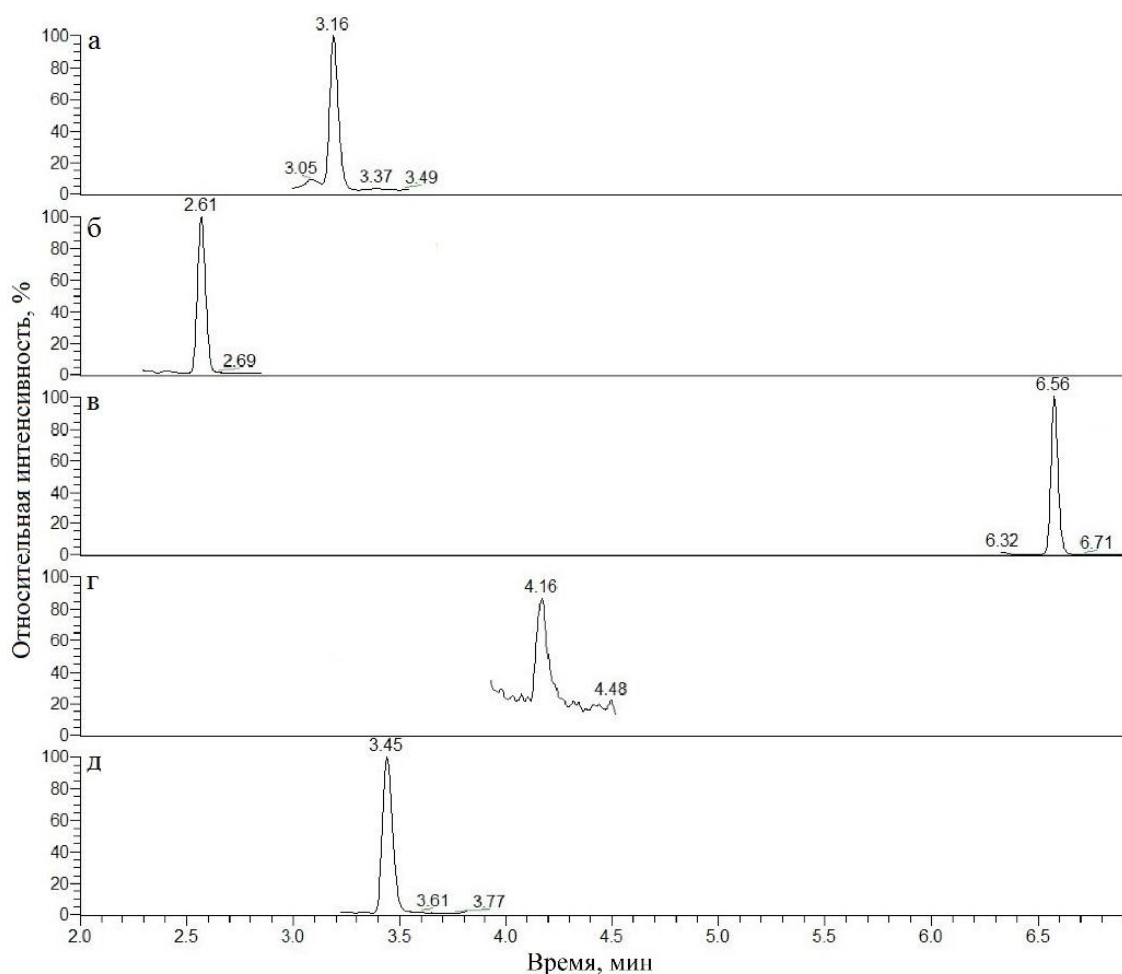
Рисунок 6 – Хроматограммы реальных образцов мочи спустя 12 ч после употребления 15 мг действующего вещества

Таблица 11 – Аналитические характеристики методики определения САРМ (Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл))

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2
Андарин	0,5	2,5	2,5–50	0,999
Ибутаморен	0,25	0,5	0,5–50	0,999
Лаксогенин	0,25	1,0	1,0–50	0,997
Лигандрол	0,5	2,5	2,5–50	0,999
Миостоп	0,5	2,5	2,5–50	0,998
Остарин	0,10	0,5	0,5–25	0,998
Радарин	0,25	1,0	1,0–50	0,997
Реверол	0,25	0,5	0,5–50	0,996
Сармастол	0,25	0,5	0,5–50	0,998
S-23	0,10	0,5	0,5–50	0,998

Предложенную методику определения САРМ применили для анализа образцов мочи, полученных спустя 12 часов после однократного перорального употребления 15 мг действующего вещества. В ходе эксперимента установили, что содержания андарина, остарина, лигандрола и лаксогенина в моче находились в линейном диапазоне градуировочных зависимостей. Для образца мочи, содержащего ибутаморен, необходимо разбавление пробы в 20 раз для достижения концентрации, находящейся в линейном диапазоне. Полученные хроматограммы приведены на рисунке 7. Содержания остальных аналитов (миостоп, радарин, реверол, сармастол, S-23) в реальных пробах после однократного приема действующего вещества оказались ниже предела обнаружения, поэтому для этих соединений требуется разработка методик определения их метаболитов.

Некоторые ограничения твердофазной экстракции, как трудоемкость и длительность пробоподготовки, использование больших объемов растворителей и одноразовых патронов для ТФЭ, указывают на целесообразность разработки более простых и чувствительных методик определения САРМ, позволяющих преодолеть данные ограничения.



а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – остарин

Рисунок 7 – Хроматограммы образцов мочи спустя 12 ч после употребления 15 мг действующего вещества

Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией

Нами изучена возможность использования дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для определения САРМ, относящихся к производным арил-пропионамида – андарина и остарина. Проведены исследования по оптимизации условий подготовки проб к хроматографическому анализу.

УВЭЖХ разделение аналитов проводили на колонке Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), в качестве компонентов подвижной фазы в режиме градиентного элюирования использовали 0,1% муравьиную кислоту в метаноле и 0,1% муравьиную кислоту в воде. Скорость потока подвижной фазы составила 0,45 мл/мин при температуре термостатирования 40 °С; объем анализируемого образца – 10 мкл. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме мониторинга выбранных реакций с применением нагреваемого источника электрораспылительной ионизации в режиме регистрации

отрицательно заряженных ионов, что более предпочтительно для селективных модуляторов андрогенных рецепторов, относящихся к производным арил-пропионамида, поскольку образуется высокоинтенсивный $[M-H]^-$ ион (таблица 12).

Таблица 12 – Условия детектирования аналитов в режиме мониторинга выбранных реакций

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	Напряжение на экстрагирующей линзе, В	t_R , мин
Андарин	440,0	150,0	23	-63	3,27
		204,9	31		
		260,9 ¹	24		
Остарин	388,0	118,0 ¹	40	-46	3,59
		185,0	40		
		268,9	21		
S-23 ²	414,8	144,9 ¹	21	-57	4,43
		184,9	42		
		269,0	22		

¹ – ион, используемый для количественной оценки, ² – внутренний стандарт

В качестве внутреннего стандарта применили САРМ S-23, обладающий близкими физико-химическими свойствами, но более подверженный метаболизму в организме человека, что исключает его присутствие в образцах мочи и устраняет его влияние на результаты анализа. При оптимизации условий дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции устанавливали оптимальные тип и объем экстрагента и диспергента, влияние высаливающего эффекта, времени перемешивания, pH и разбавления образца на получаемые результаты.

В качестве экстрагентов использовали ди-, три- и тетрахлорметан, диспергентов – ацетон, метанол, этанол и ацетонитрил. Наилучшие результаты получили с использованием метанола и хлороформа. Влияние pH изучали от 4 до 8, поскольку диапазон значений pH в реальных образцах мочи может меняться от 4,5 до 7,8; высаливающий эффект устанавливали добавлением хлорида натрия (0–10%). Разбавление образца мочи более чем в 5 раз не рассматривали по причине значительного снижения чувствительности методики. При анализе 1 мл образца мочи оптимальный объем хлороформа составил 90 мкл, метанола – 300 мкл. Оптимальное время перемешивания составило 15 с, а содержание хлорида натрия – 10%. Содержащую аналиты органическую фазу после центрифугирования переносили в вials шприцем, упаривали досуха и перерастворяли в 100 мкл смеси метанол–вода (1 : 1 по объему), поскольку хлороформ несовместим с обращенно-фазовой УВЭЖХ. Пределы обнаружения для андарина и остарина составили 0,05 нг/мл, а пределы определения – 0,5 нг/мл. Градуировочные зависимости линейны в диапазоне 0,5–50 нг/мл с коэффициентами детерминации 0,998.

Дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция перспективна при определении САРМ в моче с высокой чувствительностью (пределы обнаружения 50 пг/мл) и позволяет устранить ряд недостатков, таких как трудоемкость и длительность пробоподготовки, а также использование больших объемов растворителей, присущих традиционным способам пробоподготовки.

ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности схем определения стероидных гормонов в моче человека, УВЭЖХ-МС обоснована как метод анализа, а дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция как способ пробоподготовки, оценено влияние объемов экстрагента и диспергента, рН среды, высаливающего эффекта и времени перемешивания на степени извлечения аналитов.

2. Показана эффективность дериватизации стероидных гормонов гидроксиламином в растворе для определения аналитов в моче человека после проведения дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции, обеспечившей высокую чувствительность их определения с пределами обнаружения в диапазоне от 0,10 до 0,25 нг/мл.

3. Изучены условия твердофазной аналитической дериватизации стероидных гормонов с использованием гидроксиламина в качестве дериватирующего агента для их определения. Дериватизация аналитов гидроксиламином на патроне для твердофазной экстракции протекает быстрее по сравнению с их дериватизацией в растворе при тех же параметрах чувствительности методики.

4. Разработана методика определения стероидных гормонов в слюне человека в диапазоне концентраций от 0,10–0,5 до 50 нг/мл в условиях их экстракционного извлечения метил-трет-бутиловым эфиром со степенями извлечения аналитов 91–98%.

5. Рассмотрено влияние способов пробоподготовки – разбавления и твердофазной экстракции, на аналитические характеристики УВЭЖХ-МС определения САРМ в моче человека. После разбавления испытуемого образца определяются андарин, ибутаморен и лаксогенин на уровне 2,5–25 нг/мл, а при твердофазной экстракции за счет концентрирования аналитов на патроне Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл) определяются также лигандрол и остарин на уровне 0,10–0,5 нг/мл.

6. Изучено влияние различных факторов на УВЭЖХ-МС/МС определение относящихся к производным арил-пропионамида САРМ с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции. Использование смеси из 90 мкл хлороформа и 300 мкл метанола позволило достичь пределы обнаружения аналитов на уровне 50 пг/мл со степенями извлечения 95–99%, а изменение рН мочи в диапазоне 4–8 не оказывало влияния на получаемые результаты.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ:

1. Применение УВЭЖХ-МС/МС для определения в моче некоторых анаболических агентов и ноотропов / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Э. М. Гашимова // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – № 1. – С. 28–34.

2. Использование твердофазной экстракции для определения используемых в спорте лекарственных средств в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Э. М. Гашимова // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 236–244.

3. Определение андарина (S-4), селективного модулятора андрогенных рецепторов, и ибутаморена (МК-677), непептидного секретаргога гормона роста, в моче ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Э. М. Гашимова // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73. – № 7. – С. 523–528.

4. A novel approach to the quantification of urinary aryl-propionamide-derived SARMS by UHPLC–MS/MS / A. Temerdashev, **E. Dmitrieva**, A. Azaryan, E. Gashimova // *Biomedical Chromatography*. – 2020. – V. 34. – № 1. – e4700.
5. Темердашев, А. З. Методы определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов / А. З. Темердашев, **Е. В. Дмитриева** // *Журнал аналитической химии*. – 2020. – Т. 75. – № 7. – С. 579–596.
6. Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-HRMS detection / **E. Dmitrieva**, A. Temerdashev, A. Azaryan, E. Gashimova // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2020. – Vol. 1159. – 122390.
7. **Дмитриева, Е. В.** Методологические аспекты определения оксимов стероидных гормонов методом УВЭЖХ-МС/МС / Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев, А. А. Азарян // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2021. – Т. 21. – № 4. – С. 540–546.
8. **Дмитриева, Е. В.** Определение кетостероидов в моче человека с применением дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции и ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии высокого разрешения / Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев, А. К. Осипова // *Журнал аналитической химии*. – 2021. – Т. 76. – № 11. – С. 1004–1011.
9. Temerdashev, A. Analytics for steroid hormone profiling in body fluids / A. Temerdashev, **E. Dmitrieva**, I. Podolskiy // *Microchemical Journal*. – 2021. – V. 168. – P. 106395.
10. Solid-phase analytical derivatization as a tool for the quantification of steroid hormones in human urine with HPLC-Q-ToF detection / **E. V. Dmitrieva**, A. Z. Temerdashev, M. O. Zorina, Y.-Q. Feng [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2022. – V. 214. – 114736.
11. **Дмитриева, Е. В.** Определение стероидных гормонов в слюне человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев // *Журнал аналитической химии*. – 2022. – Т. 77. – № 12. – С. 1073–1079.
12. Патент № 2764363 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/493, А61В 5/20. Способ определения производных стероидных гормонов в моче : № 2021111154 : заявл. 19.04.2021 : опубл. 17.01.2022 / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет».
13. Применение метода СВЭЖХ-МС/МС в целях количественного анализа селективных модуляторов андрогенных рецепторов (SARM) в моче / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Э. М. Гашимова // *Третий съезд аналитиков России. Сборник тезисов докладов*. – Москва. – 2017. – С. 192.
14. ВЭЖХ-МС/МС определение некоторых селективных модуляторов андрогенных рецепторов (SARM) в моче / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Н. В. Киселева // *III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием. Сборник тезисов докладов*. – Краснодар. – 2017. – С. 58.
15. Изучение возможности применения твердофазной экстракции с последующим УВЭЖХ-МС/МС определением в моче селективных модуляторов андрогенных рецепторов (SARM) / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Э. М. Гашимова // *V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. Сборник тезисов докладов*. – Краснодар. – 2018. – С. 145.

16. A novel approach to the quantification of SARMs in human urine by UHPLC-MS/MS / **E. Dmitrieva**, A. Temerdashev, A. Azaryan, E. Gashimova [et al.] // 25th International Symposium on Separation Sciences. Book of abstracts. – Lodz. – 2019. – P. 140.

17. Способ определения некоторых селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС / **Е. В. Дмитриева**, А. З. Темердашев, А. А. Азарян, Э. М. Гашимова [и др.] // III Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием. Сборник тезисов докладов. – Краснодар. – 2019. – С. 48.

18. **Дмитриева, Е. В.** Применение дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для определения стероидных гормонов в моче человека с использованием УВЭЖХ-МСВР / Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев, А. А. Азарян // IV Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием. Сборник тезисов докладов. – Краснодар. – 2020. – С. 90.

19. **Dmitrieva, E. V.** Quantification of ketosteroids in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction and UHPLC-Q-TOF detection / E. V. Dmitrieva, A. Z. Temerdashev, A. A. Azaryan // XII International conference on Chemistry for young scientists. Book of abstracts. – Saint Petersburg. – 2021. – P. 67.

20. **Дмитриева, Е. В.** Использование дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для определения производных стероидных гормонов в моче человека / Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев, А. А. Азарян // VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. – Краснодар. – 2021. – С. 204.

21. **Дмитриева, Е. В.** Хромато-масс-спектрометрическое определение стероидных гормонов в моче человека с применением твердофазной аналитической дериватизации / Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев, А. А. Азарян // Четвертый съезд аналитиков России. Сборник тезисов докладов. – Москва. – 2022. – С. 500.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность сотрудникам лаборатории хроматомасс-спектрометрии УНПК «Аналит» за оказанную помощь и содействие в проведении исследований.

Дмитриева Екатерина Владимировна

Хроматомасс-спектрометрическое определение стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Подписано в печать 15.03.2022

Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная. Печать цифровая.

Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 5167.1

Издательско-полиграфический центр

Кубанского государственного университета

350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149.