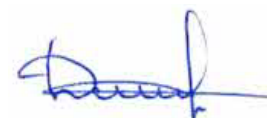


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет»

На правах рукописи



ДМИТРИЕВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

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

1.4.2 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
доцент Темердашев А.З.

Краснодар

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Аналитический обзор	9
1.1 Определение стероидных гормонов в биологических жидкостях человека.....	9
1.1.1 Матрицы, используемые для определения стероидных гормонов	12
1.1.2 Методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека	15
1.1.2.1 Определение стероидных гормонов методом газовой хроматомасс-спектрометрии.....	19
1.1.2.2 Определение стероидных гормонов методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии.....	27
1.2 Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях человека	35
1.2.1 Роль андрогенов в функционировании организма	35
1.2.2 Предпосылки появления САРМ.....	36
1.2.3 Классификация селективных модуляторов андрогенных рецепторов	37
1.2.4 Определение САРМ в биологических жидкостях	41
1.2.4.1 ВЭЖХ-МС определение аналитов в нативном виде.....	42
1.2.4.2 ВЭЖХ-МС определение метаболитов САРМ.....	47
1.3 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования	54
2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов	56
2.1 Реактивы, материалы и оборудование	56
2.2 УВЭЖХ-МС определение стероидных гормонов в биологических жидкостях	60
2.2.1 Определение стероидных гормонов в моче человека дисперсионной жидкость-жидкостной мирозэкстракцией	60
2.2.1.1 Условия детектирования аналитов.....	61
2.2.1.2 Подготовка проб мочи к УВЭЖХ-МС анализу	64

2.2.1.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией	70
2.2.2 Определение стероидных гормонов в моче человека дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией и дериватизацией гидроксиламином	73
2.2.2.1 Условия образования оксимов стероидных гормонов	74
2.2.2.2 Условия дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции и дериватизации аналитов.....	76
2.2.2.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией и дериватизацией гидроксиламином.....	79
2.2.2.4 Анализ реальных образцов мочи.....	81
2.2.3 УВЭЖХ-МС определение стероидных гормонов в моче человека твердофазной аналитической дериватизацией	85
2.2.3.1 Условия элюирования аналитов.....	85
2.2.3.2 Условия твердофазной аналитической дериватизации стероидных гормонов	87
2.2.3.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче твердофазной аналитической дериватизацией	90
2.2.3.4 Анализ реальных образцов мочи.....	93
2.2.4 УВЭЖХ-МС/МС определение стероидных гормонов в слюне человека жидкость-жидкостной экстракцией	96
2.2.4.1 Условия УВЭЖХ-МС/МС детектирования аналитов	96
2.2.4.2 Условия жидкость-жидкостной экстракции аналитов.....	98
2.2.4.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения стероидных гормонов в слюне.....	101
2.2.4.4 Анализ реальных образцов слюны.....	103
2.3 УВЭЖХ-МС/МС определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека.....	104

2.3.1 УВЭЖХ-МС/МС определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека разбавлением испытуемого образца	116
2.3.1.1 Условия подготовки проб мочи к анализу	116
2.3.1.2 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче разбавлением испытуемого образца	116
2.3.1.3 Апробация методики УВЭЖХ-МС определения САРМ на реальных образцах мочи	120
2.3.2 УВЭЖХ-МС/МС определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека твердофазной экстракцией.....	121
2.3.2.1 Условия твердофазной экстракции САРМ.....	121
2.3.2.2 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче твердофазной экстракцией.....	123
2.3.2.3 Апробация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ твердофазной экстракцией на реальных образцах мочи.....	126
2.3.3 УВЭЖХ-МС/МС определение САРМ в моче человека дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией	127
2.3.3.1 Условия УВЭЖХ-МС/МС детектирования САРМ	127
2.3.3.2 Условия дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции САРМ	129
2.3.3.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией	133
ВЫВОДЫ	137
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	140

ВВЕДЕНИЕ

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.

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.

В процессе выполнения диссертационного исследования разработаны аналитические схемы экспрессного, высокочувствительного и селективного УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче и слюне человека; аналитические схемы высокочувствительного и селективного УВЭЖХ-МС определения САРМ в моче человека.

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» была 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.

На защиту вынесены следующие положения:

– 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.

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

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.).

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

1 Аналитический обзор

1.1 Определение стероидных гормонов в биологических жидкостях человека

Стероидные гормоны представляют собой состоящие из четырех конденсированных колец (циклопентанпергидрофенантрен, стеран) молекулы: трех шестичленных углеродных колец и одного пятичленного углеродного кольца [1]. Они синтезируются из общего предшественника холестерина, содержащего 27 атомов углерода, а пять основных классов стероидных гормонов, а именно прогестогены, глюкокортикоиды, минералокортикоиды, андрогены и эстрогены, имеют в своей структуре от 18 до 21 атомов углерода (рисунок 1).

Синтез стероидных гормонов происходит во многих органах человека, включая надпочечники, органы малого таза, головной мозг, жировую ткань и другие, посредством ряда ферментативных реакций [2]. Несмотря на близость их химических структур, благодаря значительному метаболизму, каждый стероидный гормон может образовывать широкий спектр активных и неактивных метаболитов [3].

Основные классы, вовлеченные в метаболизм I фазы ферментов – цитохромы P450 (CYP450) и гидроксистероиддегидрогеназы (HSD). Ферменты CYP450 катализируют реакции гидроксирования и расщепления, а ферменты HSD приводят к окислению и восстановлению стероидов. При метаболизме I фазы уменьшается активность, увеличивается полярность соединений [2]. Для стероидных гормонов свойственен значительный метаболизм II фазы с образованием глюкуронидов и сульфатов в печени и почках, увеличивающий их полярность и способствующий легкому выведению их организма человека [4–6]. Более 90% стероидных гормонов в моче человека находятся в форме глюкуронидов и сульфатов [3]. В то же время стероидные гормоны частично выводятся из организма человека в неконъюгированной форме [2]; так, около 3% от общего содержания кортизола в моче находится в свободной форме [7].

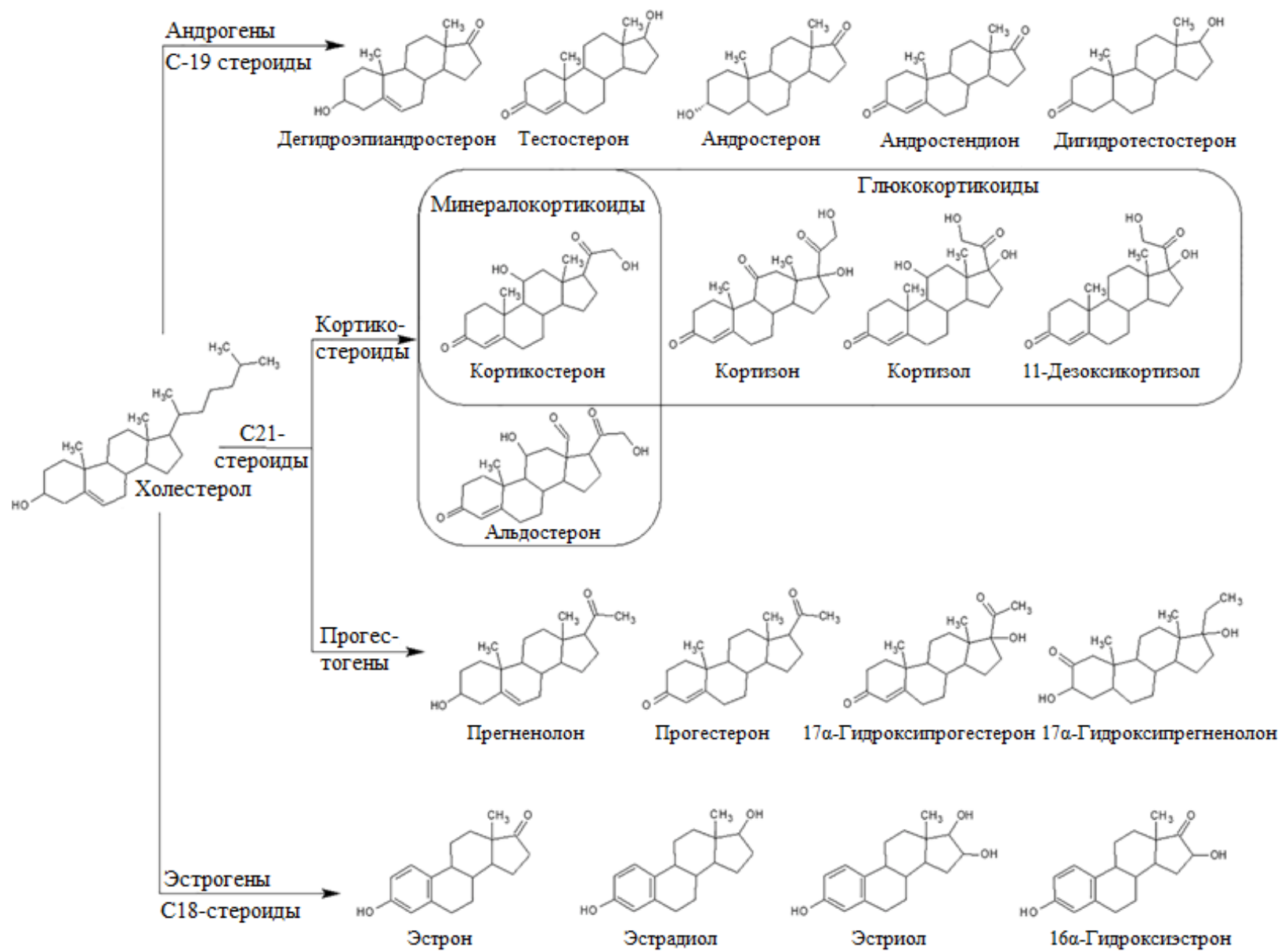


Рисунок 1 – Классификация стероидных гормонов

Стероидные гормоны регулируют важнейшие физиологические процессы в организме человека, включая его развитие и репродуктивные возможности. Несмотря на то, что уровни стероидных гормонов в организме человека меняются на протяжении всей жизни, существенные отклонения от референсных значений могут указывать на развитие различных заболеваний [8–11], поэтому возникает необходимость в разработке высокочувствительных и селективных методик их определения в биологических жидкостях человека [4].

Исследования [12–28] показали, что эндогенные эстрогены играют важную роль в развитии онкологии, например рака груди [12–14], эндометрия, предстательной железы [15, 16], яичников, щитовидной железы, изменение их концентраций может также указывать на остеопороз [17, 18], а также наличие легочной артериальной гипертензии [19, 20]. Определение андрогенов является важным для диагностики таких андроген-зависимых заболеваний как гирсутизм, акне, алопеция, синдром поликистозных яичников у женщин [21–23], гипогонадизм и рак предстательной железы у мужчин [16, 24, 25]; кортизол в биологических жидкостях определяют для диагностики синдрома Кушинга [26–28], болезни Аддисона [7] и синдроме мнимого избытка минералокортикоидов [28]. Более того, определение стероидных гормонов в биологических жидкостях требуется при проведении гормон-заместительной терапии [8].

Допинг-контроль является другой важной областью, в которой определение стероидных гормонов в моче человека необходимо как части биологического паспорта спортсмена, поскольку отклонение в концентрациях и их соотношениях для некоторых стероидов, в частности тестостерона и эпитестостерона, может указывать на злоупотребление запрещенными Всемирным антидопинговым агентством препаратами [3, 29–31]. Помимо соотношения уровней тестостерона и его эпитестостерона используют соотношение концентраций других стероидных гормонов. Например, соотношение андростерона и этиохоланолона позволяет установить факт злоупотребления тестостерона, дигидротестостерона (ДГТ), дегидроэпиандростерона и ингибиторов альфа-редуктазы [32].

1.1.1 Матрицы, используемые для определения стероидных гормонов

Определение стероидных гормонов проводят в различных биологических матрицах, таких, как кровь, моча, слюна, тканях (мозг, кожа), волосы, семенная жидкость [31, 33]. На результаты определения стероидных гормонов могут оказывать влияние различные биологические факторы – пол, возраст, циркадный ритм, а также фаза менструального цикла и беременность у женщин [34, 35].

Изначально для определения стероидных гормонов в диагностических целях в 1950-х гг. использовали мочу, поскольку применяемое аналитическое оборудование обладало недостаточной чувствительностью для анализа крови. Содержание в моче солей является более высоким, а белков – более низким по сравнению с кровью. Моча является удобной биологической жидкостью с точки зрения пробоотбора – он является неинвазивным и безболезненным. Стероидные гормоны в ней находятся как в свободном, так и конъюгированном виде в диапазоне концентраций от пг/мл до нг/мл [36]. При анализе мочи важным является время отбора проб, потому что концентрации стероидных гормонов меняются в течение суток [34]. Значительное число исследований, посвященных определению стероидных гормонов в моче для диагностики заболеваний, показало применимость данной матрицы для неинвазивной диагностики практически всех заболеваний, связанных со стероидными гормонами [1, 37].

Важным аспектом при анализе является стабильность образцов мочи, поскольку эндогенные стероидные гормоны могут деградировать под действием микроорганизмов и неправильных условий хранения. Для оценки возможной деградации образцов мочи ВАДА рекомендует применять в качестве маркеров процесса определение 5α -андростан-3,17-диона и 5β -андростан-3,17-диона и контроль содержания свободного тестостерона выше 5%. Для стабилизации образцов мочи используют азид натрия, хлорид ртути, антибиотики, их смеси и другие способы [38–40].

Использование крови также является распространённым для определения стероидных гормонов. В отличие от мочи, показывающей усредненные концентрации стероидов за несколько часов–сутки, кровь позволяет определять концентрации аналитов в реальном времени [4]. Поскольку отбор проб крови является болезненным и требует привлечения квалифицированного персонала, в последние годы все чаще рассматривают слюну в качестве альтернативы крови. Возможность применения слюны в качестве альтернативной матрицы обусловлена высокими корреляциями между концентрациями ряда стероидных гормонов в плазме и слюне [41–44], что связано с механизмом попадания стероидных гормонов в слюну человека.

Авторы [45] установили, что неконъюгированные стероидные гормоны попадают в слюну путем диффузии через клетки слюнных желез ввиду их липофильной природы, их концентрации не зависят от скорости секреции слюны, а, следовательно, могут отражать концентрацию свободных стероидов в плазме. Конъюгированные стероидные гормоны из-за высокой полярности попадают в слюну посредством ультрафильтрации через плотные соединения между ацинарными клетками, поэтому их концентрации в слюне сильно зависят от скорости потока [42, 45, 46], что усложняет их использование для рутинных исследований. Важно отметить, что слюна, в отличие от крови, отражает содержание активных стероидных гормонов, не связанных с белками [41, 47–52].

Основным недостатком слюны в качестве объекта исследования является необходимость применения высокочувствительных методов для определения стероидных гормонов [53], поскольку их концентрации в слюне составляют около 1–5% от концентраций в сыворотке крови в зависимости от соединения. Так, содержание кортизола в слюне является наибольшим (приблизительно 5%), а для тестостерона и эстрадиола они составляют около 2 и 1% в крови, соответственно, что может быть связано с отличающейся гидрофильностью, различием в сродстве к гормон-связывающим глобулинам в сыворотке, а также содержанием свободных гормонов в сыворотке крови [50]. Поскольку отбор проб является

наиболее важным аспектом, определяющим получаемые результаты, этой стадии было уделено значительное внимание исследователей.

Коммерчески доступные контейнеры, такие как Salivette®, являются одними из наиболее широко используемых для получения образцов слюны. Тем не менее, исследования показывают, что содержащийся в них тампон, пропитываемый слюной при жевании, может оказывать влияние на получаемые результаты. Хотя применение синтетического тампона не оказывает значительного влияния при определении кортизола, концентрации других стероидных гормонов, в частности тестостерона, изменяются при его использовании [54]. Использование хлопкового тампона приводит к сорбции аналитов, вызывающей искажение результатов, поэтому оптимальным представляется прямой отбор проб слюны [49].

Прямой отбор проб можно проводить со стимулированием секреции слюны (лимонной кислотой, жевательной резинкой без сахара, парафином) или без него. При использовании жевательной резинки наблюдали увеличение концентрации тестостерона и кортизола, что затрудняет ее использование [49, 54]. Стимулирование слюны различными методами приводило к изменению концентрации кортизона, поэтому при определении стероидного профиля оптимален отбор нестимулированной слюны в обычные полипропиленовые пробирки [43, 54].

Кроме того, анализируемая слюна не должна содержать кровь, которая может попасть в образец из-за различных повреждений полости рта, например, при чистке зубов. Принимая во внимание, что концентрации стероидных гормонов в слюне по сравнению с кровью значительно ниже, в случае их попадания в слюну будет наблюдаться значительное завышение получаемых результатов. В присутствии 0,1–0,2% крови в образце слюна будет приобретать розовый оттенок, что позволяет визуально оценить загрязнение анализируемого образца [42].

При определении глюкокортикоидов также необходимо учитывать влияние фермента 11β -гидроксистероиддегидрогеназы II, под действием которого в слюнных железах происходит конверсия кортизола в неактивную кетоформу (кортизон) [49]. Это приводит к расхождениям в получаемых результатах, поэтому необходимо определять не только активную форму (кортизол), но и его неактивную кетоформу.

Серьезной проблемой, возникающей при разработке методик определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека, является отсутствие холостых матриц ввиду эндогенной природы данных соединений. Поэтому при валидации методики зачастую используют коммерчески доступные растворители и приготовленные в лаборатории искусственные биологические жидкости. Интересным представляется подход, основанный на добавлении изотопно-меченых стандартов аналитов с известной концентрацией в реальные образцы для валидации методики, что позволяет получить холостой образец, обеспечивающий наиболее правильные результаты [34, 55], однако данный способ является крайне дорогостоящим и изотопно-меченые стандарты имеются не для всех соединений.

1.1.2 Методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека

Впервые стероидные гормоны начали определять с использованием газохроматографических методов в 50-е гг. прошлого века, а с середины 60-х – с применением газовой хроматомасс-спектрометрии [4, 6, 56]. Использование масс-спектрометрии позволило получить структурную информацию об анализе, что повысило специфичность анализа [1].

В 70-х гг. прошлого века начали широко применять иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на связывании антигена (аналита) с антителом [19], обладающий высокой чувствительностью [57] и производительностью. Однако иммуноферментный анализ имеет ряд существенных недостатков,

ограничивающих его применение, такие как возможность определения одного аналита за анализ, неудовлетворительная специфичность [1, 4, 9, 58–60], воспроизводимость [6], а также так называемый «хук-эффект», приводящий к занижению результатов на высоких уровнях концентраций [1, 57].

Преимуществами ГХ-МС являются возможность одновременного определения нескольких стероидных гормонов с высокой эффективностью [56] и относительно невысокая стоимость анализа, существенным недостатком – необходимость дериватизации аналитов, что значительно увеличивает длительность пробоподготовки, а также невозможность детектирования конъюгированных стероидных гормонов [1, 4, 61, 62], поскольку они являются труднолетучими и термически нестабильными [5, 63].

Развитие гибридного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием позволило определять стероидные гормоны без дериватизации, а также дало возможность определять конъюгированные стероидные гормоны [30, 61]. В то же время, в биологических жидкостях присутствует большое число стереоизомеров, обладающих близкой липофильностью, что затрудняет их разделение на традиционных аналитических колонках с октадецильной фазой. Использование поверхностно-пористых сорбентов («core-shell»), обеспечивающих более высокую эффективность разделения [64], а также применение альтернативных сорбентов, например, бифенила и пентафторфенила, позволили преодолеть эти ограничения. Кроме того, возможно применение масс-спектрометрии высокого разрешения или тройных квадрупольных масс-спектрометров в режиме мониторинга выбранных реакций для более селективного детектирования [4, 6, 65]. Недостатком ВЭЖХ-МС является подверженность метода матичным эффектам, приводящая к изменению эффективности ионизации аналитов, поэтому адекватная пробоподготовка играет ключевую роль в получении правильных результатов. Другими ограничениями ВЭЖХ являются более низкое разрешение по сравнению с ГХ, особенно для стереоизомеров, незначительная фрагментация ввиду мягкой

ионизации молекул и низкая эффективность ионизации для некоторых стероидных гормонов (имеющие двойную связь между C₅ и C₆) [1].

Авторами [66] представлены результаты сравнения чувствительности методов газовой хроматомасс-спектрометрии/тандемной масс-спектрометрии с источником электронной ионизации и высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии/тандемной масс-спектрометрии с источником электрораспылительной ионизации, а также данные по определению комплексов стероидных гормонов с ионами серебра и ВЭЖХ-МС/МС детектированием для определения андрогенных анаболических стероидов в целях допинг-контроля. Метод газовой тандемной хроматомасс-спектрометрии и определение комплексов стероидных гормонов с ионами серебра с детектированием методом ВЭЖХ-МС/МС в целом обеспечили наибольшую чувствительность определения соединений, в то время как высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия оказалась более предпочтительной для стероидных гормонов, имеющих в своей структуре 4,9,11-триеновый фрагмент.

Сравнение результатов определения эстрогенов в моче методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием и иммуноферментного анализа показало, что ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает более воспроизводимые и достоверные результаты по сравнению с иммуноферментным анализом, особенно на низких уровнях концентраций [12]. В других исследованиях [67, 68] сравнивали результаты определения эстрадиола в сыворотке крови методами газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием и иммуноферментного анализа. Концентрации, полученные методом ИФА, оказывались завышенными и менее воспроизводимыми по сравнению с ГХ-МС/МС при определении тестостерона в сыворотке крови [16]. Результаты определений, полученные для эстрадиола иммуноферментным анализом с использованием восьми тестов различных производителей, также имели недостаточную правильность и воспроизводимость [69].

Сопоставление результатов, полученных при определении кортизола методами хроматомасс-спектрометрии и иммуноферментного анализа, показало, что концентрации кортизола приблизительно в 2 раза выше в методе ИФА по сравнению с хроматомасс-спектрометрией [27]. Благодаря более высокой специфичности методов хроматомасс-спектрометрии рекомендуют использовать их для определения кортизола [26, 70]. В то же время, чувствительности масс-спектрометрии может быть недостаточно для определения ультра-следовых концентраций кортизола в клинической диагностике [71].

Несмотря на преимущества инструментальных методов анализа отметим, что иммуноферментный анализ все еще находит широкое применение в клинической диагностике, поскольку применение хроматомасс-спектрометров ограничено их стоимостью и сложностью обслуживания [72]. Иммуноферментный анализ, напротив, является относительно дешевым и простым [60].

Масс-спектрометрия ионной подвижности является менее распространенным, но перспективным методом детектирования стероидных гормонов. Данный метод позволяет разделять ионы не только по соотношению их массы к заряду, но и размеру и формам исследуемых соединений, что позволяет снизить спектральный шум и химические интерференции, а также разделить изомеры [4, 29]. В то же время применение масс-спектрометрии ионной подвижности затруднено для разделения эпимеров стероидных гормонов [65].

Использование внутреннего стандарта является общепринятым при определении стероидных гормонов в биологических жидкостях человека методами хроматомасс-спектрометрии, что позволяет учесть потери аналитов при подготовке проб к анализу и матричные эффекты. Внутренний стандарт с известной концентрацией вносят в образец на начальном этапе пробоподготовки. При обработке результатов в качестве аналитического сигнала используют отношение сигналов аналита и внутреннего стандарта. В качестве внутренних стандартов используют соединения, обладающие близкими физико-химическими

свойствами, например, андростандиол, стигмастерол, метилтестостерон и другие. Использование стабильных изотопно-меченых соединений является более предпочтительным, поскольку они обладают идентичными свойствами с аналитами. Обычно замещают атомы водорода (^1H), углерода (^{12}C) и реже кислорода (^{16}O) на дейтерий (^2H), ^{13}C и ^{18}O соответственно. В молекулу необходимо ввести как минимум две, а лучше три изотопные метки, чтобы избежать интерференций с естественными изотопами стероидов. Использование большого числа изотопных меток может привести к изменению хроматографического поведения. Недостатком дейтерированных внутренних стандартов является возможность потери изотопной метки во время проведения пробоподготовки (например, при изменении pH). ^{13}C -стандарты являются стабильными, однако их сложнее синтезировать и они доступны не для всех стероидов [1, 19, 34].

1.1.2.1 Определение стероидных гормонов методом газовой хроматомасс-спектрометрии

Газовая хроматография долгие годы оставалась предпочтительным методом определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека благодаря высокому разрешению, чувствительности, возможности одновременного определения нескольких стероидных гормонов, а также наличию библиотек масс-спектров соединений в случае использования электронной ионизации.

При ГХ-МС анализе предъявляются требования термической стабильности и летучести аналита. Конъюгаты стероидных гормонов не удовлетворяют ни одному из этих требований, поэтому перед инструментальным анализом необходима соответствующая подготовка проб к анализу.

Хотя природа и количество исследуемых соединений варьируется, аналитическая схема ГХ-МС детектирования стероидных гормонов является

близкой: гидролиз глюкуронидов и сульфатов, экстракция аналитов с последующим упариванием, перерастворением экстракта и дериватизация подходящим реагентом. В зависимости от матрицы пробоподготовка может быть более или менее трудоемкой. Например, если стероидные гормоны присутствуют в анализируемой матрице в свободной форме, то исключают стадию гидролиза. В то же время дериватизация является неотъемлемым этапом пробоподготовки [3].

Деконъюгацию метаболитов второй фазы для получения свободных стероидных гормонов можно проводить ферментативным и химическим (неферментативным) путем [63]. Химический гидролиз, например, соляной или серной кислотой, применяли с середины 60-х гг. прошлого века вплоть до распространения ферментативного гидролиза [34], поскольку он приводит к деградации некоторых аналитов и увеличению матричных эффектов [61]. Ферментативный гидролиз проводится в более мягких условиях по сравнению с химическим. Существуют несколько источников ферментов, наиболее распространенными из которых являются бактерии (*Escherichia coli* (*E. coli*)) и моллюски (*Helix pomatia* (*H. pomatia*)). Ферменты моллюсков позволяют провести гидролиз как глюкуронидов, так и сульфатов, в то же время фермент *E. coli* высоко специфичен к глюкуронидам. Гидролиз глюкуронидов в настоящее время часто проводят несмотря на то, что он может привести к неточным результатам ввиду того, что соотношение глюкуронидов и сульфатов может меняться под действием ряда эндогенных (особенностей метаболизма) и экзогенных факторов (употребление алкоголя). Это связано с тем, что использование фермента *H. pomatia* приводит к неполному гидролизу сульфатов, деградации аналитов и образованию артефактов, а реакция ферментативного гидролиза является более длительной по сравнению с *E. coli*, которая протекает за несколько минут [63].

В качестве альтернативы возможно использование метанолиза (сольволиза). В этих условиях при добавлении смеси ацетилхлорида и метанола образуется активный интермедиат $[\text{CH}_3\text{OH}_2]^+\text{Cl}^-$, приводящий к гидролизу как глюкуронидов, так и сульфатов. Однако при использовании данного подхода наблюдали

уменьшение интенсивности пиков изотопно-меченых внутренних стандартов, чего не было при ферментативном гидролизе [18].

Для извлечения стероидных гормонов из биологических жидкостей используют множество различных способов, из которых твердофазная (ТФЭ) и жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) являются наиболее распространенными [34].

Жидкость-жидкостная экстракция является простым и дешевым способом извлечения стероидных гормонов из биологических жидкостей человека и основана на распределении аналитов между двумя несмешивающимися жидкостями, чаще всего водной и органической. В качестве экстрагентов используют такие растворители, как метил-трет-бутиловый эфир, диэтиловый эфир, этилацетат, дихлорметан, н-пентан, а также смеси различных растворителей [19, 31, 61].

Твердофазная экстракция основана на сорбции соединений на заполненном сорбентом патроне с его последующей промывкой и элюированием соединений с целью их очистки от матричных компонентов и концентрирования аналитов. Для концентрирования стероидных гормонов наиболее часто применяют гидрофобные сорбенты (октильная, октадецильная фаза), с гидрофильно-гидрофибным балансом, а также смешанные сорбенты, например, гидрофобные и ионообменные сорбенты.

С целью увеличения летучести и повышения эффективности ионизации свободных стероидных гормонов проводят их дериватизацию. Дериватирующий агент должен быстро и просто обеспечивать образование одного стабильного производного для каждого стероида с высоким и воспроизводимым выходом реакции в мягких условиях [73]. Обычно дериватизацию проводят по гидроксильной и карбонильной группам [3]. Получение силильных производных является наиболее распространенным для содержащих гидроксильную группу соединений. Чтобы получить триметилсилильные производные стероидных гормонов применяют множество

дериватирующих агентов [63], например, N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамид (МСТФА), N,O-бис-триметилсилил-трифторацетамид (БСТФА), N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил)-трифторацетамид (МТБСТФА). Для повышения скорости получения ТМС-производных стероидных гормонов, особенно содержащих несколько гидроксильных групп, вносят также триметилхлорсилан (1%) [74], триметилиодсилан и другие катализаторы [3]. Силилирующие реагенты чувствительны к влаге, поэтому обычно используют избыток реагента [18]. Для одновременной дериватизации гидроксильных и карбонильных групп используют смесь дериватирующего агента (МСТФА), катализатора (NH_4I или триметилиодсилана) и восстанавливающего агента (например, этантиол) [61, 75]. Пентафторпропионовые и трет-бутилдиметилсилильные производные стероидных гормонов образуются быстрее по сравнению с триметилсилильными и дериваты менее подвержены гидролизу, однако при использовании данных реагентов наблюдали неполную дериватизацию, приводящую к снижению чувствительности анализа [76].

Ацилирование – другой часто используемый метод дериватизации соединений, содержащих гидроксильную группу. Реакции ацилирования могут осуществляться с использованием трех основных типов реагентов: ацилгалогенидов, ангидридов кислот или реакционноспособных ацильных производных, таких как ацилированные имидазолы. Ацилгалогениды являются высоко реакционноспособными, однако галогеноводороды, образующиеся в ходе реакции, необходимо нейтрализовывать. Также предпочтительно удаление избытка ацилирующего реагента при ГХ-МС анализе. Реакции с ангидридами кислот в присутствии акцептора кислоты, например пиридина, являются наиболее подходящими, поскольку легко убрать избыток реагента [3, 73]. Ацетилирование стероидных гормонов уксусным ангидридом в пиридине широко используется в газовой хроматомасс-спектрометрии изотопного отношения [3, 77], поскольку силилирующие реагенты из-за отложения кремния на медной проволоке

несовместимы с данным методом, что приводит к неполному сгоранию аналитов [5].

Для дериватизации карбонильных групп наиболее часто используют реакции конденсации с аминами с образованием оксимов и гидразонов. Наиболее часто для этих целей применяют метоксиамин, гидроксиламин и N,N-диметилгидразин. Зачастую дериватизация по карбонильной группе является первым этапом двухступенчатой дериватизации, после чего проводят дериватизацию по гидроксильной группе [3, 73].

Несмотря на очевидные преимущества дериватизации, она имеет несколько ограничений – увеличение длительности и стоимости анализа, возможность образования нескольких производных, особенно при неполном протекании реакции [6].

Примеры определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека методом ГХ-МС приведены в таблице 1.

Таблица 1 – ГХ-МС определение стероидных гормонов в биологических жидкостях человека

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
Андростендион, дегидроэпиандростерон, дигидротестостерон, тестостерон, эстрон, эстрадиол, прогестерон	Кровь	Осаждение белков, ТФЭ (Agilent Bond Elut C18), последовательная дериватизация перфторотри-н-бутиламино и 2,3,4,5,6-пентафторбензоил хлоридом	Agilent DB-5MS (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм); газ-носитель – гелий (0,9 мл/мин); температура термостата 120–310 °С	Квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр (ХИ)	0,003–1,66 нг/мл	0,01(5)–5(250) нг/мл	[78]
Прогестерон, дегидроэпиандростерон, андростендиол, андростендион, тестостерон, дигидротестостерон, андростерон, 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол, эстрон, эстрадиол	Сыворотка крови	ЖЖЭ, ТФЭ (Phenomenex Strata SI-1 Silica), дериватизация (пентафторбензил гидроксиламин – для прогестерона и андростендиона; пентафторбензил хлорид – для остальных аналитов)	Agilent DB-17HT (30 м × 0,25 мм, 0,15 мкм); газ-носитель – гелий (1 мл/мин); температура термостата 190–350 °С	Тройной квадрупольный масс-спектрометр (ХИ)	–	1(100)–400(20000) пг/мл	[9]

Продолжение таблицы 1

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
5 кортикоидов	Сыворотка, моча	ТФЭ (Waters Oasis HLB), дериватизация смесью МСТФА, иодида аммония и дитиотреитола	Hewlett-Packard HP-1 (12 м × 0,2 мм, 0,33 мкм); газ-носитель – гелий; температура термостата 200–315 °С	Квадрупольный масс-спектрометр (ЭИ)	1–3 нг/мл	1,8(4,2)–500 нг/мл	[79]
19 эстрогенов	Моча	ТФЭ (Waters Oasis HLB), ферментативный гидролиз <i>H. pomatia</i> , ЖЖЭ, дериватизация этилхлорформиатом и пентафторпропионовым ангидридом	Restek MXT-1 (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм); газ-носитель – гелий; температура термостата 270–330 °С	Квадрупольный масс-спектрометр (ЭИ)	0,01–0,10 нг/мл	0,02(0,5)–40 нг/мл	[17]

Продолжение таблицы 1

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
33 стероидных гормона	Моча	ТФЭ (Waters Oasis HLB), ферментативный гидролиз <i>H. pomatia</i> , ЖЖЭ, последовательная дериватизация метоксиамином и N-(триметилсилил)имидазолом	Agilent J&W CP-Sil 5 CB (25 м × 0,25 мм, 0,12 мкм); газ-носитель – гелий (2 мл/мин); температура термостата 50–270 °С	Тройной квадрупольный масс-спектрометр (ЭИ)	–	–	[80]

1.1.2.2 Определение стероидных гормонов методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии

Поскольку перед определением стероидных гормонов методом газовой хроматомасс-спектрометрии в пробах биологических жидкостей обычно проводят гидролиз (если стероидные гормоны находятся в конъюгированной форме), экстракцию и дериватизацию аналитов, подготовка образцов к анализу является длительной и трудоемкой. Также возможны существенные потери аналитов на всех этапах пробоподготовки, что может привести к невысокой сходимости результатов анализа различными лабораториями [32] и является серьезным недостатком метода ГХ-МС. Многие ограничения, присущие газовому хроматомасс-спектрометрическому детектированию, преодолеваются с применением ВЭЖХ-МС анализа. Данный метод может быть использован для определения более широкого круга аналитов с отличающимися физико-химическими свойствами по сравнению с ГХ-МС, он обладает высокой чувствительностью, разрешающей способностью, более высокой скоростью анализа, благодаря развитию УВЭЖХ, и возможностью автоматизации [28, 57].

Существующими ограничениями ВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека являются широкий динамический диапазон концентраций аналитов в биологических матрицах, недостаточная чувствительность приборов, а также неудовлетворительная эффективность ионизации аналитов [6].

В отличие от ГХ-МС дериватизация в ВЭЖХ-МС не обязательна, хотя и применяется достаточно часто, для увеличения эффективности ионизации аналитов [8, 36, 81, 82], особенно эстрогенов [83, 84], поскольку в молекулу вводится легко ионизируемая функциональная группа (таблица 2), позволяющая повысить чувствительность методики определения [3]. Наиболее часто применяемым дериватирующим агентом является дансил хлорид, но он приводит к неспецифичной фрагментации в масс-спектрометре, дансильные

производные чувствительны к свету, а побочные продукты реакции могут оказывать мешающее влияние при проведении анализа [20]. Другим перспективным реагентом, применяемым для дериватизации стероидных гормонов, содержащих кето-группу, является гидроксилламин, в этом случае реакция получения производных является быстрой, не требует специальных условий и протекает количественно. Сравнение результатов определения 10 стероидных гормонов различных классов, полученных при проведении дериватизации гидроксилламином и без получения производных после жидкость-жидкостной экстракции, показало, что дериватизация позволяет увеличить эффективность ионизации аналитов в 3,9–202,6 раз. Недостатком данного реагента является возможность образования нескольких стереоизомеров [85].

Таблица 2 – Дериватирующие агенты, используемые при определении стероидных гормонов методом ВЭЖХ-МС [86]

Функциональная группа	Дериватирующий реагент	Реакция	Изменение моноизотопной массы, Да	Ссылка
Карбонильная	Реактив Жирара «Т»	$R=O \rightarrow R-C_7H_8N_3O$	+134,0713	[87, 88]
	2-Гидразинопиридин	$R=O \rightarrow R-C_5H_5N_3$	+91,0535	[89–92]
	4-(N,N-диметиламиносульфонил)-7-гидразино-2,1,3-бензоксадиазол	$R=O \rightarrow R-C_8H_9N_5O_3S$	+239,2589	[93]
	2-Гидразино-1-метилпириин	$R=O \rightarrow R-C_6H_8N_3$	+106,1524	[94–96]
	Гидроксилламин	$R=O \rightarrow R-NOH$	+15,0191	[85, 97]
Гидроксильная	Дансил хлорид	$R-OH \rightarrow R-OC_{12}H_{12}NO_2S$	+233,0511	[98–101]
	p-Нитробензоил хлорид	$R-OH \rightarrow R-OC_7H_4NO_3$	+149,0113	[19, 102]
	Пиколиновая кислота	$R-OH \rightarrow R-OC_6H_4NO$	+105,0215	[103–105]
	Пиридин-3-сульфонил хлорид	$R-OH \rightarrow R-OC_5H_4NO_2S$	+140,9963	[106]

Еще одним преимуществом ВЭЖХ-МС является возможность определять не только свободные, но и конъюгированные стероидные гормоны в биологических жидкостях человека, т.е. проводить прямой анализ образца [30, 32, 107], позволяя установить точные концентрации метаболитов второй фазы в биологических жидкостях. Концентрации конъюгированных стероидных гормонов могут быть использованы для установления факта употребления экзогенных стероидных гормонов [108]. Несмотря на то, что в некоторых методиках проводили прямое ГХ-МС определение конъюгированных стероидных гормонов после их дериватизации, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием оказалась более подходящей альтернативой как в режиме ионизации отрицательно заряженных частиц из-за кислотности фрагмента глюкуронида, так и в режиме ионизации положительно заряженных частиц из-за сродства к протону кето-групп стероидных гормонов [32].

Примеры определения стероидных гормонов методом ВЭЖХ-МС приведены в таблице 3.

Таблица 3 – ВЭЖХ-МС определение стероидных гормонов в биологических жидкостях

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
9 эстрогенов	Плазма	ТФЭ (Waters Oasis MCX), дериватизация 1-(5-фтор-2,4-динитрофенил)-4-метилпиперазином	Ace Excel 2 C18-PFP (150 × 2,1 мм, 2 мкм), подвижная фаза – вода : ацетонитрил, подкисленные 0,1% муравьиной кислотой (0,5 мл/мин); температура термостата 25 °С	Ионная ловушка (ЭРИ+)	1–6 пг/мл	2(10)–2000 пг/мл	[20]
Эстрадиол, тестостерон, дигидротестостерон	Сыворотка крови	ЖЖЭ (метил-трет-бутиловый эфир), дериватизация 1,2-диметилимидазол-5-сульфонил хлоридом	Phenomenex Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), подвижная фаза – вода : метанол (0,38 мл/мин); температура термостата 50 °С	Тройной квадрупольный (ФИАД+)	–	0,5(100)–800(16000) пг/мл	[83]
10 стероидных гормонов	Сыворотка крови	ЖЖЭ (метил-трет-бутиловый эфир), дериватизация гидроксиламином	Saifen GP-C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм), подвижная фаза – вода : метанол, подкисленные 0,1% муравьиной кислотой (0,5 мл/мин); температура термостата 40 °С	Квадруполь-времяпролетный (ЭРИ+)	–	0,05(5)–100 нг/мл	[85]

Продолжение таблицы 3

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
Тестостерон	Слюна	ЖЖЭ (метил-трет-бутиловый эфир)	Phenomenex Kinetex C8 (100 × 3 мм, 2,6 мкм), подвижная фаза – вода : метанол, содержащие 2 ммоль/л ацетат аммония и 0,1% муравьиную кислоту; температура термостата 45 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	5 пмоль/л	–	[109]
Тестостерон, кортизол	Слюна	ЖЖЭ (этилацетат)	Imatake Cadenza CD-C18 (150 × 3 мм, 3 мкм), подвижная фаза – 10 ммоль/л формиат аммония : метанол (0,2 мл/мин); температура термостата 40 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	–	5(10)–1000 пг/мл	[50]
Эстрон, эстрадиол, эстриол	Слюна	ТФЭ (Waters Oasis HLB)	Waters Acquity BEH C18 (100 × 2,1 мм, 2,5 мкм), подвижная фаза – 0,1 ммоль/л NH ₄ F в воде : ацетонитрил (0,45 мл/мин); температура термостата 30 °С	Ионная ловушка (ЭРИ–)	0,5 пг/мл	1,0–250(1000) пг/мл	[110]

Продолжение таблицы 3

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
Тестостерон, дегидроэпиандростерон	Слюна	ТФЭ (Phenomenex Strata-X), дериватизация 2-гидразино-1-метилпиридином	YMC-Pack Pro C18 RS (150 × 2 мм, 5 мкм), подвижная фаза – 10 ммоль/л формиат аммония в воде : метанол (0,2 мл/мин); температура термостата 40 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	5 пг/мл	10–400 пг/мл	[111]
Кортизон, кортизол	Моча	ЖЖЭ (дихлорметан)	Supelco LC-181 (33 × 4,6 мм), подвижная фаза – вода : метанол (1 мл/мин)	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	6 нмоль/л	7–828 нмоль/л	[112]
11 стероидных гормонов	Моча	ТФЭ (Waters Oasis HLB)	Waters Acquity BEH C18 (150 × 2,1 мм, 1,7 мкм), подвижная фаза – вода : ацетонитрил, содержащие 0,01% муравьиную кислоту (0,3 мл/мин); температура термостата 25 °С	Квадруполь– времяпролетный (ЭРИ–)	1,0–5 нг/мл	2(500)–200(8000) нг/мл	[108]

Продолжение таблицы 3

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
Тестостерон, эпитестостерон	Моча	ТФЭ (Varian C-18 BondElut LRC)	Hypersil BDS C18 (150 × 1 мм, 3 мкм), подвижная фаза – 43% метанол : ацетатный буфер (7,5 ммоль/л ацетат аммония, 0,11% уксусная кислота) (0,05 мл/мин); температура термостата 37 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	6,7 нмоль/л	–	[30]
Кортизол, кортизон	Моча	Он-лайн ТФЭ (Agilent Zorbax Extend-C18 (2,1 × 12,5 мм, 5 мкм))	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 50 мм, 1,8 мкм), подвижная фаза – вода : метанол, подкисленные 0,1% муравьиной кислотой; температура термостата 50 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	4–5 нмоль/л	5(6)–625(1125) нмоль/л	[28]
14 стероидных гормонов	Моча	Ферментативный гидролиз (<i>H. Pomatia</i>), ЖЖЭ (метил-трет-бутиловый эфир : этилацетат, 5 : 1)	Waters Acquity VEN C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), подвижная фаза – 0,1% муравьиная кислота в воде : ацетонитрил (0,35 мл/мин); температура термостата 40 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	0,2–1 нг/мл	0,2–200(20000) нг/мл	[37]

Продолжение таблицы 3

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Условия разделения	Условия детектирования	Предел обнаружения	Линейный диапазон	Ссылка
39 стероидных гормонов	Моча	Ферментативный гидролиз (<i>H. Pomatia</i>), ТФЭ (Waters Oasis PRiME HLB)	Waters Acquity BEH C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), подвижная фаза – вода : метанол, содержащие 0,01% муравьиную кислоту и 1 ммоль/л формиат аммония (0,4 мл/мин); температура термостата 40 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+)	0,03–90 нг/мл	0,1(300)–100(10000) нг/мл	[113]
Прогестерон, прегненолон, эстрон, эстриол, эстрадиол	Моча	Ферментативный гидролиз (<i>H. Pomatia</i>), ТФЭ (Macherey Nagel Chromabond C18 Hydra)	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 мм, 5 мкм), подвижная фаза – вода : вода–ацетонитрил (5 : 95, по объему), содержащие 0,1% аммиак (1 мл/мин); температура термостата 12 °С	Тройной квадрупольный (ЭРИ+, ЭРИ–)	0,06–0,81 нг/мл	0,19(2,69)–100(200) нг/мл	[114]
Тестостерон, эпитестостерон, андростерон, этиохоланолон	Моча	Фильтрование	Varian Omnispher C18 (100 × 2 мм, 3 мкм), подвижная фаза – вода : метанол, содержащие 0,1% муравьиную кислоту и 1 ммоль/л ацетат аммония (0,25 мл/мин)	Тройной квадрупольный (ЭРИ+, ЭРИ–)	0,25–1 нг/мл	0,25(25)–20(4000) нг/мл	[32]
		ЖЖЭ (этилацетат)			0,05–0,25 нг/мл	0,125(25)–20(4000) нг/мл	

1.2 Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях человека

1.2.1 Роль андрогенов в функционировании организма

Андрогенный рецептор – один из членов надсемейства ядерных рецепторов, активируемый лигандами (андрогенами) [115, 116]. В организме человека главным циркулирующим андрогеном является тестостерон, образующий более активный метаболит дигидротестостерон под действием фермента 5 α -редуктазы в некоторых тканях (рисунок 2) [117–120].

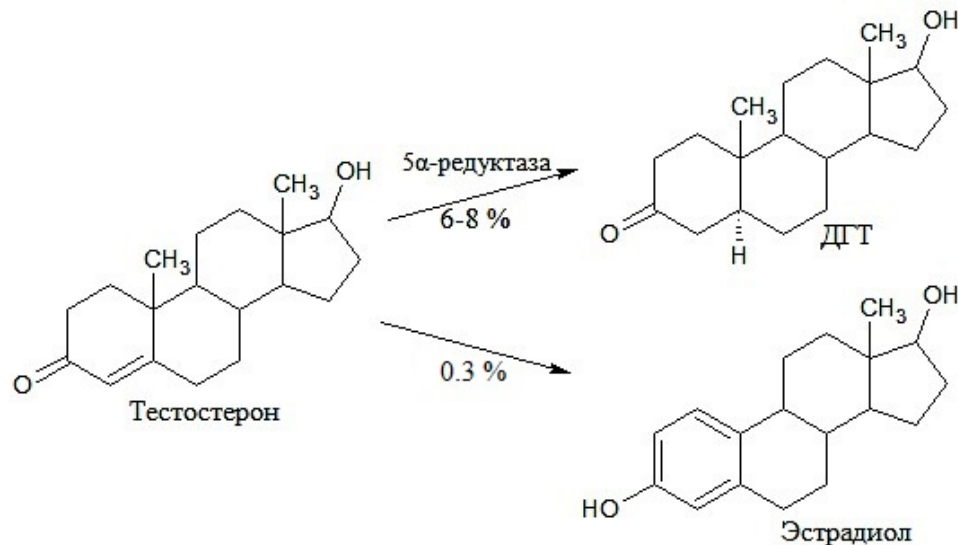


Рисунок 2 – Пути метаболизма тестостерона

Андрогены крайне важны для развития и поддержания вторичных половых признаков у мужчин [121, 122]. В случае нарушения уровней экспрессии возникает необходимость в восполнении их недостатка, однако серьезные побочные эффекты терапии тестостероном [123], которые связывают с действием ДГТ и эстрадиола, образующегося по реакции ароматизации (рисунок 2) [124], а также отсутствие препаратов с пероральной биодоступностью и удовлетворительными фармакокинетическими профилями способствовали поиску более селективных лигандов андрогенных рецепторов, которые потенциально

смогли бы активировать андрогенный рецептор определенных тканях, например, в мышцах и костях, и обладать уменьшенной активностью, либо ее полным отсутствием, в других, в частности, в органах малого таза, сердце и печени, т.е. являлись бы смешанными агонистами/антагонистами [125–127].

1.2.2 Предпосылки появления SARМ

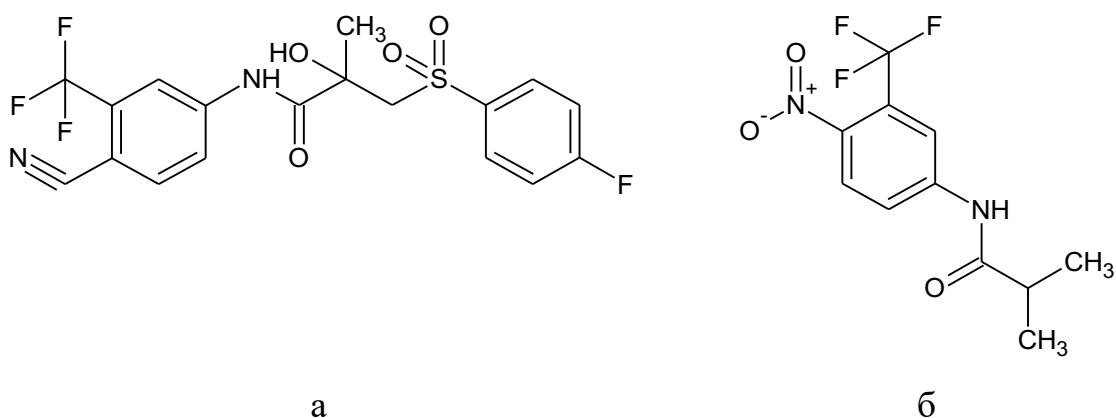
Первые попытки синтеза селективных лигандов андрогенных рецепторов относятся к 1940-м [128] – началу 1950-х [121] годов и основаны на структурной модификации эндогенных стероидных гормонов. Традиционно данные препараты выделяют в отдельную группу экзогенных стероидов, поскольку при их биотрансформации в организме человека происходит образование эндогенных стероидных гормонов.

Нестероидные лиганды являются более удобными при поиске фармакофоров и их дальнейшим структурным модификациям, поэтому они и были предложены для преодоления таких ограничений стероидных лигандов, как невысокая специфичность к андрогенному рецептору, низкая пероральная биодоступность и неудовлетворительные фармакокинетические профили [129].

Первые антагонисты андрогенных рецепторов были описаны в начале 1970-х гг., но они обладали недостаточной тканеселективностью. Интерес к ним возродился в 1980-х–1990-х гг., после успешного применения селективных модуляторов эстрогенных рецепторов (СЭРМ) для восполнения дефицита эстрогенов у женщин в климактерическом периоде [121, 130].

В 1998 г. были представлены результаты исследований по поиску нестероидных андрогенов двух независимых исследовательских групп из университета Теннесси и фармацевтической компании Ligand Pharmaceuticals. Группой ученых из университета Теннесси под руководством Джеймса Далтона на основе уже известных структур антагонистов андрогенных рецепторов – бикалутамида и флутамида (рисунок 3) – был описан класс SARМ – производных

арил-пропионамида [129], а исследователями из Ligand Pharmaceuticals был представлен класс производных хинолина [124, 131, 132].



а – бикалутамид, б – флутамид

Рисунок 3 – Структурные формулы антагонистов андрогенных рецепторов

1.2.3 Классификация селективных модуляторов андрогенных рецепторов

С момента открытия первых САРМ описано более десятка проявляющих анаболическую активность фармакофоров, которые легли в основу различных классов САРМ (таблица 4). Структурные формулы некоторых наиболее известных представителей данных классов представлены на рисунке 4. Данные соединения объединяет то, что они не являются субстратами для 5 α -редуктазы или реакции ароматизации [133].

Таблица 4 – Классификация основных представителей САРМ

Класс	САРМ	Элементный состав	Молекулярная масса, Да	Ссылка	Номер на рисунке 4
Производные арил-пропионамида	S-1	C ₁₇ H ₁₄ F ₄ N ₂ O ₅	402,0839	[134]	1
	S-4 (GTx-007, андарин)	C ₁₉ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₆	441,1148	[135]	2
	S-9	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₃ N ₂ O ₅	418,0543	[136]	3
	S-22 (GTx-024, остарин)	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₃	389,0987	[137]	4

Продолжение таблицы 4

Класс	САРМ	Элементный состав	Молекулярная масса, Да	Ссылка	Номер на рисунке 4
Производные арил-пропионамида	S-23	$C_{18}H_{13}ClF_4N_2O_3$	416,0550	[138]	5
Производные хинолина	LGD-2226	$C_{14}H_9F_9N_2O$	392,0571	[139]	6
	LGD-2941	$C_{17}H_{16}F_6N_2O_2$	394,1116	[140]	7
	LGD-3303	$C_{16}H_{14}ClF_3N_2O$	342,0747	[140]	8
	LG-121071	$C_{15}H_{15}F_3N_2O$	296,1136	[141]	9
	PF-06260414	$C_{14}H_{14}N_4O_2S$	302,0837	[142]	10
Производные тетрагидрохинолина	S-40503	$C_{15}H_{23}N_3O_3$	293,1739	[140]	11
	S-49288	$C_{25}H_{26}N_4O$	398,2107	[143]	12
	S-101479	$C_{26}H_{24}F_2N_4O_3$	478,1816	[143]	13
Производные гидантоина	BMS-564929	$C_{14}H_{12}ClN_3O_3$	305,0567	[144]	14
Производные диарил-гидантоина	DT-200	$C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$	389,0987	[145]	15
	GLPG0634	$C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$	389,0987	[146]	16
Производные пирролидина-бензонитрила	LGD-4033 (VK-5211, лигандрол)	$C_{14}H_{12}F_6N_2O$	338,0854	[147]	17
Производные тропанола	AC-262536 (сармастол)	$C_{18}H_{18}N_2O$	278,1419	[140]	18
	ACP-105	$C_{16}H_{19}ClN_2O$	290,1186	[140]	19
Производные фенил-пиразол-карбоксамиды	JNJ-28330835	$C_{14}H_{10}F_6N_4O$	364,0759	[148]	20
Производные фенил-оксадиазола	RAD-140 (радарин)	$C_{20}H_{16}ClN_5O_2$	393,0993	[149]	21
Производные бензоимидазола	JNJ-37654032	$C_{11}H_7Cl_2F_3N_2O$	309,9888	[148]	22
Производные индола	RAD-35010	$C_{13}H_{11}ClF_3NO$	289,0481	[150]	23
	LY-2452473	$C_{23}H_{23}N_3O_2$	373,1790	[151]	24
	GSK2881078	$C_{14}H_{13}F_3N_2O_2S$	330,0650	[152]	25
Производные пиридинил-метанамида	2-FPA	$C_{17}H_{19}FN_2O$	286,1481	[140]	26
Производные фенил-метанамида	MK-3984	$C_{17}H_{12}F_7NO_2$	395,0756	[146]	27
Производные тиофена	NEP28	$C_{10}H_{10}BrF_3N_2S$	325,9700	[153]	28
Стероидные	YK-11 (миостоп)	$C_{25}H_{34}O_6$	430,2355	[154]	29
	MK-0773	$C_{27}H_{34}FN_5O_2$	479,2697	[155]	30

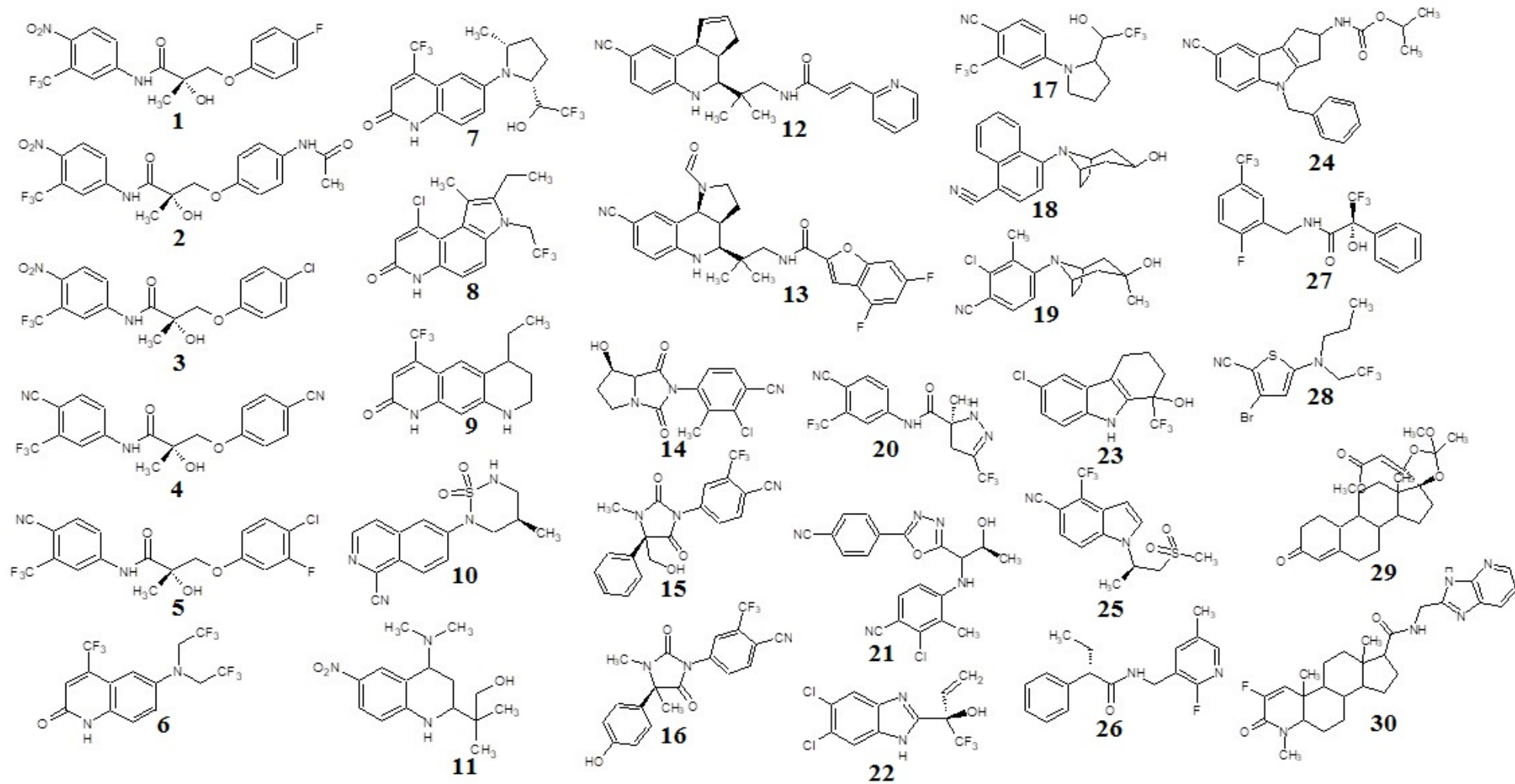


Рисунок 4 – Структурные формулы SARМ разных классов

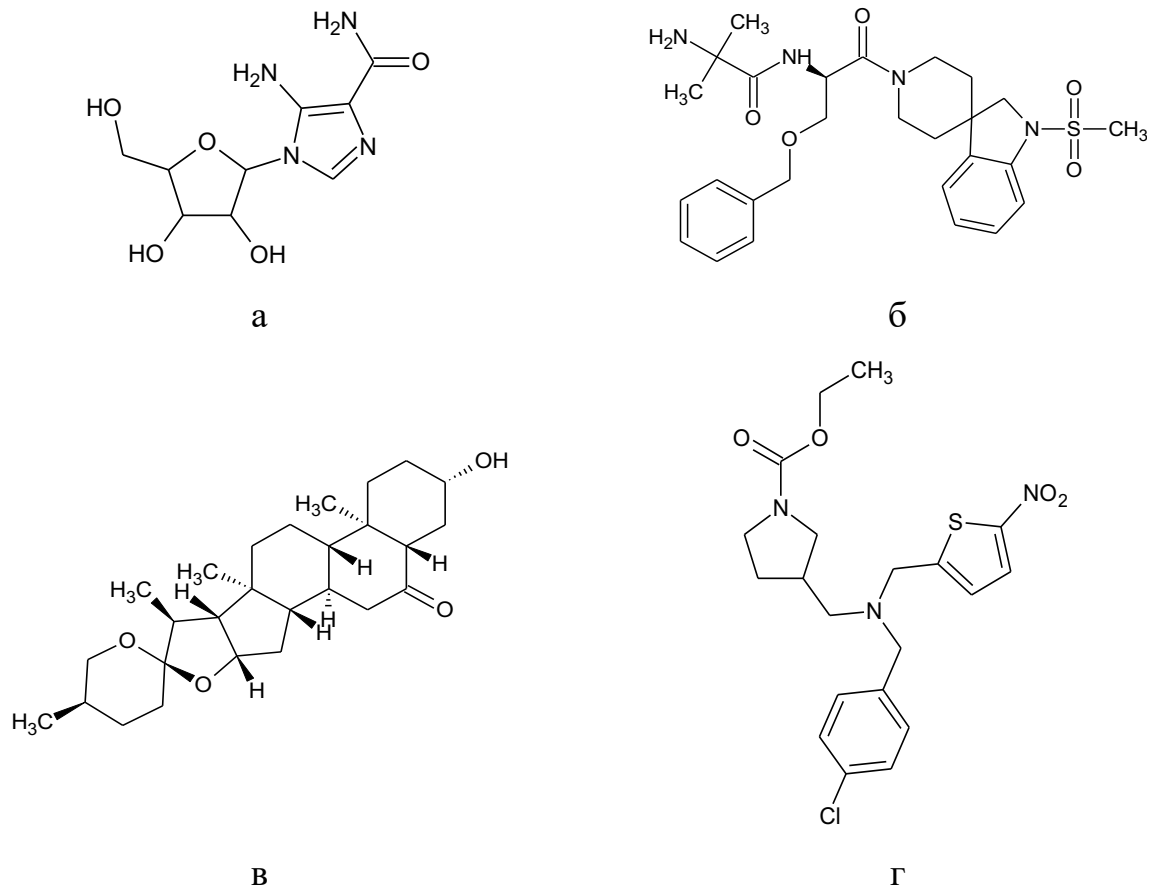
Несмотря на значительное количество уже описанных классов САРМ, поиск фармакофоров, обладающих анаболической активностью, продолжается и по сей день. При этом считается, что «идеальный» САРМ должен обладать высокой специфичностью к андрогенному рецептору, иметь улучшенную пероральную биодоступность и фармакокинетические профили и, самое главное, селективно активировать андрогенный рецептор в определенных органах и тканях [121, 156].

Помимо гормон-заместительной терапии, рассматривается возможность применения САРМ для лечения ряда заболеваний, таких как: остеопороз [157, 158], кахексия [159, 160], атрофия мышц [161] гипогонадизм [162], доброкачественная гиперплазия предстательной железы [163], а также в качестве мужских контрацептивов [121, 126].

Принимая во внимание анаболическое действие САРМ, высока вероятность злоупотребления ими профессиональными спортсменами, что послужило причиной их внесения в Запрещенный список ВАДА в 2008 г. [164].

К настоящему моменту большинство САРМов не прошли клинические испытания, тем не менее уже несколько лет возможно их незаконное приобретение через интернет, поэтому возникает необходимость в разработке методик их контроля.

Учитывая их популярность на «черном» рынке, на сегодняшний день под видом САРМ распространяют препараты, относящиеся к другим классам соединений. Так, лаксогенин, эффективность которого не была доказана, относится к классу фитостероидов (брасиностероидов) [165], ибутаморен (МК-677) – непептидный секретагог гормона роста [166, 167], реверол (SR-9009) является Rev-Erba агонистом [168], а АICAR (акадезин) – агонистом аденозинмонофосфат (АМФ) активируемой протеинкиназы [169] (рисунок 5).



а – AICAR, б – ибупрофен, в – лаксогенин, г – реверол

Рисунок 5 – Структурные формулы соединений, реализуемых под видом САРМ

Следует отметить, что несмотря на отличные от САРМ механизмы действия, данные препараты приводят к близким эффектам на организм, поэтому многие из них также включены в перечень запрещенных ВАДА к употреблению препаратов.

1.2.4 Определение САРМ в биологических жидкостях

На сегодняшний день газовая и высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия остается наиболее широко используемым методом определения ксенобиотиков в биологических жидкостях человека.

Несмотря на наличие библиотек масс-спектров в газовой хроматомасс-спектрометрии при использовании электронной ионизации, позволяющих

провести первичную идентификацию аналитов в случае, если спектры исследуемых аналитов уже имеются в библиотеке, данный метод не лишен недостатков – он не может быть использован для анализа полярных и труднолетучих молекул без проведения реакций дериватизации, позволяющих повысить летучесть соединения, но существенно увеличивающих общее время анализа, и неприменим для анализа макромолекул [170].

Метод высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, также сочетающий в себе чувствительность и селективность определения со значительно меньшим временем анализа, позволяет определять аналиты без перевода их в газовую фазу и, следовательно, может быть использован для анализа макромолекул, а также термически лабильных веществ.

Основными биологическими матрицами, применяемыми для определения запрещенных препаратов в целях допинг-контроля, являются кровь и моча. Хотя образцы крови обычно лучше отражают фармакокинетику препаратов, моча является более предпочтительной матрицей при проведении скрининга различных ксенобиотиков, поскольку она обеспечивает более широкое окно для их обнаружения [31]. Кроме того, содержания интактных соединений и их метаболитов, как правило, выше в моче [171, 172], а получение образцов является более простым и безболезненным.

При разработке методик определения ксенобиотиков в биологических жидкостях человека, одним из главных вопросов становится форма, в которой необходимо определять аналит, будь то нативное соединение или метаболиты. Ответ на данный вопрос базируется на основе сведений о биотрансформации соединения в организме человека.

1.2.4.1 ВЭЖХ-МС определение аналитов в нативном виде

Наиболее простыми способами пробоподготовки при определении аналита в нативном виде являются разбавление образца и осаждение белков.

Однозначным преимуществом данных подходов является отсутствие потерь аналита при проведении подготовки проб к анализу, однако подобная пробоподготовка приводит к получению «грязных» проб [171], поэтому данные процедуры обычно используют при скрининговом анализе для идентификации соединений. В случае определения соединения в нативном виде необходимо учитывать матричные эффекты, способные как усиливать, так и уменьшать эффективность ионизации аналита [173–176], что можно осуществить при использовании внутреннего стандарта. Существенным ограничением данных способов подготовки проб к анализу является отсутствие стадии концентрирования, что приводит к невысокой чувствительности методик.

Для очистки проб от матричных компонентов и концентрирования аналитов в нативном виде также используют твердофазную экстракцию. Для концентрирования САРМ описаны ряд полимерных сорбентов (сополимеры стирола/дивинилбензола и N-винилпирролидона/дивинилбензола) и сорбентов с неполярными привитыми фазами (C8, C18) (таблица 5).

Иногда с применением данных процедур помимо нативных соединений можно определить и некоторые метаболиты с высокими концентрациями в образцах. Принимая во внимание высокую подверженность метаболизму большинства САРМ, для их определения в биологических жидкостях человека зачастую требуется разработка методик определения метаболитов.

Таблица 5 – ВЭЖХ-МС определение САРМ в нативном виде в биологических жидкостях

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Колонка	Подвижная фаза	Детектирование	Предел обнаружения, нг/мл	Ссылка
S-4	Моча человека	Разбавление образца	Nucleodur C18 Pyramid (2 × 50 мм, 3 мкм)	5 ммоль/л ацетатный буфер, содержащий 0,1% ледяную уксусную кислоту / ацетонитрил	Тройной квадрупольный / линейная ионная ловушка	1	[177]
S-4, S-22, метаболит S-22, S-23, S-24	Моча человека	Разбавление образца	Nucleoshell RP18plus (2 × 50 мм, 2,7 мкм)	5 ммоль/л ацетатный буфер, содержащий 0,1% уксусную кислоту / ацетонитрил	Орбитальная ловушка	< 0,1	[178]
S-1, S-4, S-22	Лошадиная моча	Разбавление образца	Waters Aquity UPLC ВЕН C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / метанол	Квадруполь-времяпролетный	–	[179]
Производные арил-пропионамида	Моча человека	ТФЭ (PAD-1)	Macherey-Nagel C-18 Isis (4 × 70 мм)	5 ммоль/л ацетатный буфер, содержащий 0,1% уксусную кислоту / ацетонитрил	Тройной квадрупольный	1	[125]
S-22, S-23 и их метаболиты	Лошадиная моча	ТФЭ (PAD-1)	XTerra RP18 Isis (2,1 × 150 мм, 3,5 мкм)	5 ммоль/л ацетатный буфер, содержащий 0,1% уксусную кислоту / метанол	Ионная ловушка	–	[180]

Продолжение таблицы 5

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Колонка	Подвижная фаза	Детектирование	Предел обнаружения, нг/мл	Ссылка
Производные бензоимидазола и гидантоина	Моча человека	ТФЭ (PAD-1)	Macherey-Nagel Pyramid (4 × 70 мм, 5 мкм)	5 ммоль/л ацетатный буфер, содержащий 0,1% уксусную кислоту / ацетонитрил : метанол (1 : 1, по объему)	Ионная ловушка	1	[181]
S-1, S-4, S-22	Лошадиная моча	ТФЭ (C18; HLB)	Waters Aquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / метанол	Квадруполь-времяпролетный	–	[179]
15 CAPM	Моча человека, лошади, крупного рогатого скота, собаки	ЖЖЭ (метил-трет-бутиловый эфир)	Phenomenex Luna Omega Polar C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / 0,1% муравьиная кислота в метаноле	Тройной квадрупольный	0,01–0,75	[182]
S-40503	Плазма человека	Осаждение белков	Macherey-Nagel Sphinx (4 × 70 мм, 5 мкм)	5 ммоль/л ацетатный буфер, содержащий 0,1% уксусную кислоту / метанол	Ионная ловушка	8,3	[183]

Продолжение таблицы 5

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Колонка	Подвижная фаза	Детектирование	Предел обнаружения, нг/мл	Ссылка
S-1, S-4, S-22 и их метаболиты	Лошадиная плазма	Осаждение белков	Waters Aquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / метанол	Квадруполь-времяпролетный	–	[184]
S-1	Плазма крыс	Осаждение белков	Waters Nova-pak C18 (3,9 × 150 мм, 4 мкм)	вода / ацетонитрил	Ионная ловушка	< 0,3	[185]
S-1, S-4, S-9, S-24	Плазма человека	Осаждение белков	Hypersil gold C18 (2,1 × 50 мм, 1,7 мкм)	0,2% муравьиная кислота в воде / ацетонитрил	Орбитальная ловушка	10	[186]
S-4	Лошадиная плазма	ТФЭ (C8/SCX)	SunFire C18 (2,1 × 100 мм, 3,5 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / 0,1% муравьиная кислота в метаноле	Орбитальная ловушка	–	[187]

1.2.4.2 ВЭЖХ-МС определение метаболитов САРМ

При разработке методик определения метаболитов для новых препаратов первоначальная задача состоит в установлении потенциальных аналитов с учетом метаболизма ксенобиотиков в организме человека.

Поскольку по этическим причинам проведение контролируемых исследований для установления метаболизма новых препаратов с привлечением людей *in vivo* исключено, то на ранних стадиях исследований метаболизма препаратов используют относительно простые системы *in vitro*.

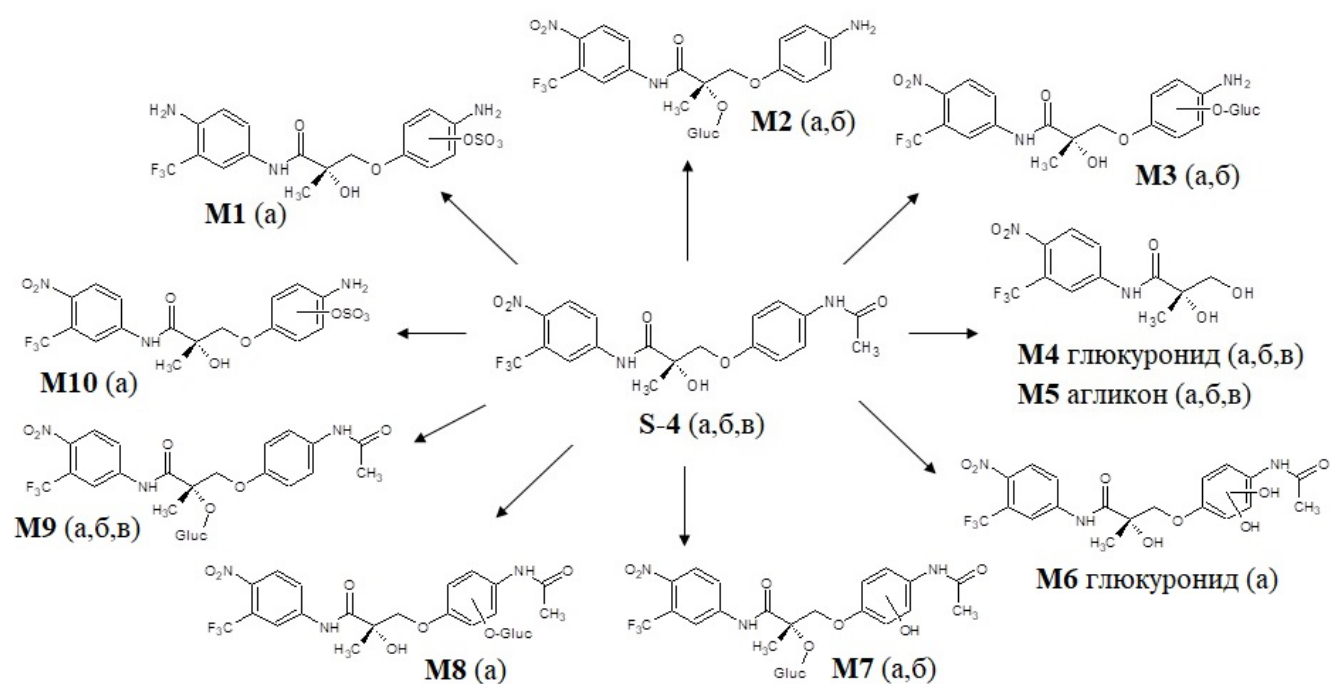
Наиболее часто используемыми моделями *in vitro* являются рекомбинантные ферменты, субклеточные фракции (фракции микросом, цитозоля, S-9) и клеточные органеллы (гепатоциты, фрагменты печени) [188–190].

Проведение исследований *in vitro* позволяет оценить такие важные аспекты метаболизма как токсичность и кросс-реакции с другими соединениями [191]. Однако данные системы обычно имеют ограниченную ценность – они отражают только один или несколько аспектов метаболизма, не показывая полной картины [192, 193].

По этой причине пути метаболизма также устанавливаются *in vivo* на лабораторных животных. В настоящее время наблюдается тенденция к проведению первичных клинических испытаний на крысах, поскольку они являются сравнительно дешевыми и не требуют большого количества тестируемого соединения. Исследования на крысах позволяют оценить такие возможные проблемы, как низкое всасывание или высокий клиренс, приводящие к неудовлетворительной фармакокинетике [193]. Метаболические пути, установленные на лабораторных животных, являются отправной точкой для установления метаболитов у людей. Тем не менее, метаболиты и токсические действия у животных и людей зачастую отличаются [194].

Например, для производного арил-пропионамида андарина были всесторонне изучены метаболиты с использованием моделей *in vitro* и *in vivo* на

животных и людях, а также с использованием штамма *Cunninghamella elegans* (*C. elegans*) (таблица 6, рисунок 6). При сравнении метаболитов, найденных у человека, с остальными моделями видны значимые различия в результатах. Очевидно, что в случае несовпадения результатов *in vitro* и *in vivo*, превалирует результат, полученный *in vivo* у человека.



а – [195], б – [196], в – [197]

Рисунок 6 – Идентифицированные метаболиты андарина (S-4) в моче человека

Одновременное развитие знаний о метаболизме ксенобиотиков и компьютерных технологий за последние десятилетия привело к разработке и внедрению моделей *in silico* не только для обработки и интерпретации данных о метаболитах, но и предсказания подверженных метаболизму сайтов в молекуле (MetaboLynx, METEOR, MetaSite) [198]. Однако многие исследователи считают, что это всего лишь один из множества инструментов для установления путей метаболизма ксенобиотиков и не должен использоваться как «черный ящик», но может быть полезен при совмещении эмпирических подходов вместе с опытом и знаниями исследователя [199].

Таблица 6 – Метаболиты андарина (S-4), найденные у человека, при применении различных моделей *in vitro* и *in vivo*

Метаболит, найденный в моче человека	Процесс биотрансформации	<i>C. elegans</i> [200]	<i>in vitro</i> микросомы печени			<i>in vivo</i> моча		
			лошади [201]	быка [202]	человека [203]	крысы [204]	собаки [204]	лошади [179]
S-4	Интактное соединение	+	+	+	+	+	+	+
M1	Восстановление нитрогруппы, деацетилирование и сульфонирование	–	–	–	–	–	–	–
M2	Деацетилирование и глюкуронидация	–	–	–	–	–	–	–
M3	Деацетилирование, моногоксилирование и глюкуронидация	–	–	–	–	–	–	–
M4	Отщепление В-кольца и глюкуронидация	–	–	–	–	–	–	–
M5	Отщепление В-кольца	+	+	+	+	–	–	+
M6	Дигидроксилирование и глюкуронидация	–	–	–	–	–	–	–
M7	Моногоксилирование и глюкуронидация	–	–	–	–	–	–	–
M8	Моногоксилирование и глюкуронидация	–	+	–	+	–	–	–
M9	Глюкуронидация	–	+	–	+	–	–	–
M10	Деацетилирование и сульфонирование	–	–	–	–	–	–	–

Основным методами идентификации и установления структур метаболитов являются газовая и жидкостная хроматомасс-спектрометрия, которые позволяют не только установить молекулярную массу целевого соединения, но и его структуру, исходя из данных о его фрагментации. Вместе с тем сопоставление молекулярной массы интактного соединения и метаболита может указать на путь метаболизма, поскольку метаболические процессы обычно приводят к характерным изменениям молекулярных масс [205]. Некоторые из подобных изменений масс и соответствующих им процессов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Значения изменения масс аналитов при протекании некоторых реакций биотрансформации [206–208]

Биотрансформация	Изменение в молекулярной формуле	Изменение массы, Да
Реакции первой фазы		
Потеря нитрогруппы	$- \text{NO}_2 + \text{H}$	-44,9851
Декарбоксилирование	$- \text{CO}_2$	-43,9898
Восстановление нитрогруппы	$+ \text{H}_2 - \text{O}_2$	-29,9742
Дезэтилирование	$- \text{C}_2\text{H}_4$	-28,0312
Дезметилирование	$- \text{CH}_2$	-14,0157
Дегидрирование (окисление)	$- \text{H}_2$	-2,0157
Гидрирование (восстановление)	$+ \text{H}_2$	+2,0157
Метилирование	$+ \text{CH}_2$	+14,0157
Гидроксилирование	$+ \text{O}$	+15,9949
Гидратация	$+ \text{H}_2\text{O}$	+18,0106
Реакции второй фазы		
Сульфонирование	$+ \text{SO}_3$	+79,9568
Глюкуронидация	$+ \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	+176,0321

При проведении анализа методом газовой хроматомасс-спектрометрии обычно используют как источники электронной ионизации, дающий информативные с точки зрения установления структуры спектры, так и химической ионизации в качестве подтверждающего метода, необходимого для получения интенсивного пика молекулярного иона. Существенным недостатком

данного метода является необходимость проведения экстракции и дериватизации метаболитов, что значительно усложняет пробоподготовку и увеличивает общее время анализа [205]. Поэтому перспективным является использование жидкостной хроматомасс-спектрометрии.

Поскольку ионизация с применением источников ионизации при атмосферном давлении является мягкой, то в основном образуется пик молекулярного иона, протонированного или депротонированного [209], который является малоинформативным при определении структуры. Для получения фрагментарных ионов используют высокоэнергетическую соударительную диссоциацию с применением тройных квадрупольных, либо квадруполь-времяпролетных, масс-спектрометров или ионных ловушек. Для большинства САРМ фрагментация была подробно описана [125, 154, 210–213].

Более того, зная изменения молекулярных масс при определенных процессах биотрансформации, удобным представляется использование тандемного масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации нейтральной потери («neutral loss»). Например, для метаболитов второй фазы величина нейтральной потери 176 Да будет соответствовать отрыву глюкуронового остатка, а 80 Да – сульфогруппы.

В качестве пробоподготовки для определения САРМ в моче человека традиционно используют процедуру ферментативного гидролиза с последующей жидкость-жидкостной экстракцией и определением аналитов методом ВЭЖХ-МС (таблица 8), аналогичную процедуре определения анаболических стероидов. На первой стадии проводят инкубацию мочи с ферментом [63] при оптимальных для данного фермента рН и температуре [214]. В настоящее время наиболее часто применяют фермент β -глюкуронидазу *E. coli*, приводящую к гидролизу глюкуронидов. После экстрагируют деконъюгаты метаболитов диэтиловым или метил-трет-бутиловым эфиром в щелочной среде с последующим упариванием органического слоя и перерастворением в подходящем растворителе, в качестве которого, например, может выступать подвижная фаза.

Таблица 8 – ВЭЖХ-МС определение метаболитов CAPM в моче

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Колонка	Подвижная фаза	Детектирование	Предел обнаружения, нг/мл	Ссылка
LGD-4033 и метаболиты	Моча человека	Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ	Restek Raptor Biphenyl (2 × 100 мм, 2,7 мкм)	25 ммоль/л формиат аммония, содержащий 0,1% муравьиную кислоту / ацетонитрил	Тройной квадрупольный	–	[215]
S-4 и метаболиты	Моча человека	Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ	Phenomenex Synergi MAX (2 × 50 мм, 5 мкм)	–	Тройной квадрупольный/линейная ионная ловушка	0,1	[197]
S-4 и метаболиты	Моча человека	Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ	Aquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / 0,1% муравьиная кислота в метаноле	Квадруполь-времяпролетный	–	[196]
Производные тетрагидрохинолина	Моча человека	Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ	Zorbax XDB-C8 (4,6 × 150 мм, 5 мкм)	5 ммоль/л ацетат аммония, содержащий 0,1% уксусную кислоту / ацетонитрил : метанол (1 : 1, по объему)	Ионная ловушка	0,2–0,6	[216]
Производные хинолина	Моча человека	Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ	Macherey-Nagel Sphinx (4,0 × 70 мм, 5 мкм)	5 ммоль/л ацетат аммония, содержащий 0,1% уксусную кислоту / ацетонитрил	Ионная ловушка	0,05–1	[210]

Продолжение таблицы 8

Аналит	Матрица	Пробоподготовка	Колонка	Подвижная фаза	Детектирование	Предел обнаружения, нг/мл	Ссылка
S-1, S-4, S-22 и метаболиты	Лошадиная моча	Ферментативный гидролиз, ТФЭ (HLB)	Aquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / метанол	Квадруполь-времяпролетный	–	[179]
LGD-4033 и метаболиты	Лошадиная моча	Ферментативный гидролиз, ТФЭ (HLB)	Aquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле	Квадруполь-времяпролетный	2,6	[217]
S-22 и метаболиты	Моча крупного рогатого скота	Ферментативный гидролиз, ТФЭ (HLB)	Aquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм)	0,1% муравьиная кислота в воде / 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле	Тройной квадрупольный	–	[218]

Таким образом, селективные модуляторы андрогенных рецепторов являются активно развивающимся классом веществ, новые представители которого появляются и в настоящее время. Поскольку САРМ запрещены Всемирным антидопинговым агентством, возникает необходимость в своевременной разработке методик их контроля, особенно в биологических жидкостях. Для этих целей эффективным является использование методов хроматомасс-спектрометрии [219].

1.3 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Анализ литературных данных, посвященных определению стероидных гормонов и селективных модуляторов андрогенных рецепторов, показал, что существующие подходы и методы их определения имеют ряд недостатков, включая недостаточную чувствительность, длительность и трудоемкость. Так, повышение чувствительности методик определения аналитов возможно дериватизацией, но последовательное проведение процедур экстракции и дериватизации является сложным. Общепринятые способы пробоподготовки – жидкость-жидкостная и твердофазная экстракция, требуют использования больших объемов токсичных растворителей, поэтому актуальной является разработка методик, соответствующих критериям зеленой химии, в частности, применяя дисперсионную жидкость-жидкостную микроэкстракцию. С учетом анализа литературных данных можно полагать, что перспективной является возможность создания схем анализа, объединяющих эти этапы в один с применением различных способов подготовки проб к анализу в сочетании с современными методами физико-химического анализа.

Целью диссертационного исследования является 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.

2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов

2.1 Реактивы, материалы и оборудование

При проведении экспериментальных исследований использовали следующее научное оборудование и вспомогательную технику:

- жидкостный хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США), состоящий из бинарного градиентного насоса HPG-3400RS, автоматического дозатора WPS-3000 и термостата TCC-3000, соединенный с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum Access Max (Thermo Scientific, США);
- жидкостный хроматограф Elute (Bruker, Германия), состоящий из бинарного градиентного насоса HPG 1300, автоматического дозатора и термостата Elute UHPLC, соединенный с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром Maxis Impact (Bruker, Германия);
- аналитическую колонку Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) (Phenomenex, США);
- аналитическую колонку Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) (Phenomenex, США);
- аналитическую колонку Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) (Phenomenex, США);
- аналитическую колонку Accucore C18 (100 × 2,1 мм, 2,6 мкм) (Thermo, США);
- предохранительные колонки SecurityGuard ULTRA C18 AJ0-8782 (Phenomenex, США);
- предохранительные колонки SecurityGuard ULTRA Phenyl AJ0-8788 (Phenomenex, США);
- патроны для твердофазной экстракции Oasis HLB (30 мг, 1 мл) (Waters, Ирландия);

- патроны для твердофазной экстракции Strata C18-E (100 мг, 1 мл) (Phenomenex, США);
- патроны для твердофазной экстракции Isolute C18 (EC) (100 мг, 1 мл) (Biotage, Швеция);
- патроны для твердофазной экстракции Varian Bond Elut C8 (100 мг, 1 мл) (Agilent, США);
- одноканальные механические дозаторы Biohit Proline с фиксированным объемом дозирования: 25 мкл; 50 мкл; 100 мкл; 250 мкл (Sartorius, Финляндия);
- одноканальные механические дозаторы Sartorius mLINE с варьируемым объемом дозирования: 2–20 мкл; 10–100 мкл; 100–1000 мкл; 1000–5000 мкл (Sartorius, Финляндия);
- наконечники для дозаторов Optifit Tip: 0,5–200 мкл; 10–1000 мкл; 100–5000 мкл (Sartorius, Финляндия);
- весы аналитические Pioneer PA64C (Ohaus, США);
- твердотельный нагреватель пробирок Isotemp 2001FS (Fisher Scientific, США);
- сушильный шкаф Memmert (Германия);
- центрифуга D-78532 (Hettich, Германия);
- орбитальный перемешиватель ХН-D (Premiere, Китай)
- колбы мерные объемом 10 мл, 25 мл, 50 мл, 100 мл, исполнения 1, класс точности 2 (МиниМед, Россия);
- пробирки типа Эппендорф, 1,5 мл (Минимед, Россия);
- пробирки типа Эппендорф, 2,0 мл (ООО «Лабсоюз», Россия);
- пробирки типа Эппендорф 15 мл (Eppendorf, Германия).

Экспериментальные исследования проводили с использованием следующих реактивов:

- 50% водный раствор гидроксиламина (Sigma-Aldrich, США);
- деионизованную воду, 18,2 МОм·см (Millipore, Франция);

- метиловый спирт, для ВЭЖХ (J.T. Baker, Польша);
- ацетонитрил, для УФ-ИК-ВЭЖХ (Panreac, Испания);
- этиловый спирт, х.ч. (Вектон, Россия);
- этилацетат, 99% (ЭКОС-1, Россия);
- гексан, 99% (ЭКОС-1, Россия);
- ацетон, х.ч. (Вектон, Россия);
- дихлорметан, х.ч. (Вектон, Россия);
- трихлорметан, х.ч. (Вектон, Россия);
- тетрахлорметан, ос.ч. (ЭКОС-1, Россия);
- муравьиную кислоту, 98% (AcrosOrganics, США);
- уксусную кислоту, х.ч. (Вектон, Россия);
- соляную кислоту, ос.ч. (Лаверна, Россия);
- β-глюкуронидазу *Escherichia coli* (Roche Diagnostics, Германия);
- сульфат натрия, х.ч. (Вектон, Россия);
- мочева кислота, х.ч. (Вектон, Россия);
- цитрат натрия дигидрат, х.ч. (Вектон, Россия);
- креатинин, х.ч. (Вектон, Россия);
- мочевины, х.ч. (Вектон, Россия);
- хлорид калия, х.ч. (Вектон, Россия);
- хлорид натрия, х.ч. (Вектон, Россия);
- хлорид кальция, х.ч. (Вектон, Россия);
- хлорид аммония, х.ч. (Вектон, Россия);
- оксалат калия моногидрат, х.ч. (Вектон, Россия);
- сульфат магния гептагидрат, х.ч. (Вектон, Россия);
- дигидрофосфат натрия дигидрат х.ч. (НеваРеактив, Россия);
- гидрофосфат натрия дигидрат, х.ч. (НеваРеактив, Россия);
- дигидрофосфат калия, х.ч. (НеваРеактив, Россия);
- тетраборат натрия, х.ч. (Реактив, Россия);
- гидроксид натрия, ч.д.а. (Реактив, Россия).

В ходе исследований для идентификации и определения аналитов использовали стандартные образцы:

- стандартный образец метилтестостерона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец тестостерона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец тестостерона-d3, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец эпитестостерона-d3, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец дигидротестостерона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец кортизона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец кортизола, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец кортикостерона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец 17 α -эстрадиола, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец эстрона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец эстриола, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец прогестерона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец 11 α -гидроксипрогестерона, 99% (Sigma Aldrich, США);
- стандартный образец индапамида, 99% (Sigma-Aldrich, США);
- стандартный образец фипронила, 99% (НПК «Блок», Россия);
- стандартный образец андарина (S-4), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец лигандрола (LGD-4033), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец миостопа (YK-11), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец остарина (S-22), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец радарина (RAD-140), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);

- стандартный образец сармастола (АС-262536), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец S-23, 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец ибутаморена (МК-677), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец лаксогенина, 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай);
- стандартный образец реверола (SR-9009), 99% (Shanghai Soyoung Biotech, Китай).

2.2 УВЭЖХ-МС определение стероидных гормонов в биологических жидкостях

2.2.1 Определение стероидных гормонов в моче человека дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией

Подготовку проб мочи для определения стероидных гормонов традиционно проводят с использованием твердофазной и жидкость-жидкостной экстракции, однако поскольку данные способы имеют ряд недостатков, важной является разработка альтернативных способов, позволяющих преодолеть их. Для устранения этих недостатков изучили возможности дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции при определении стероидных гормонов различных классов в моче человека, а именно 17α -эстрадиола, эстриола, эстрона, тестостерона, дигидротестостерона, кортизона, кортизола, прогестерона, 11α -гидроксипрогестерона [220]. Преимуществами данного способа являются высокие факторы концентрирования и скорость пробоподготовки, простота и использование небольших объемов органических растворителей.

2.2.1.1 Условия детектирования аналитов

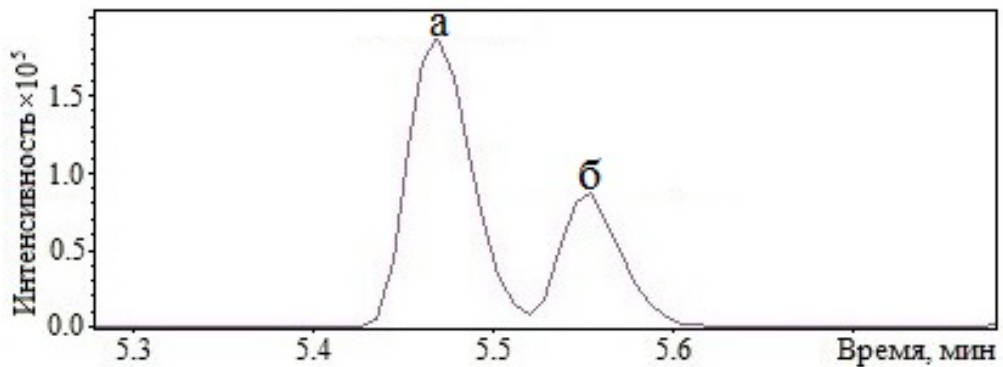
На первом этапе исследования изучили условия детектирования аналитов методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием.

Поскольку исследуемые соединения являются слабополярными, для разделения аналитов использовали аналитическую колонку Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), оснащенную соответствующей предохранительной колонкой, а в качестве подвижной фазы рассматривали систему 0,1% муравьиная кислота в метаноле – 0,1% муравьиная кислота в воде.

В процессе проведенных хроматографических исследований установили, что скорости потока подвижной фазы и температуры термостатирования колонки являются лимитирующими условиями градиентного элюирования аналитов (таблица 9), поскольку обеспечивают высокую эффективность разделения исследуемых соединений за короткое время, включая тестостерон и его эпимер (рисунок 7). Оптимальная скорость потока подвижной фазы составила 0,4 мл/мин при температуре термостата колонок 40 °С. Объем вводимой пробы был 10 мкл, а температура в автоматическом дозаторе поддерживалась на уровне 5 °С.

Таблица 9 – Условия градиентного элюирования аналитов

Время, мин	0,1% муравьиная кислота в метаноле, %	0,1% муравьиная кислота в воде, %
0,0	5	95
1,00	5	95
2,70	60	40
4,00	60	40
5,00	90	10
7,50	90	10
7,51	5	95
9,00	5	95



а – тестостерон, б – эпитестостерон

Рисунок 7 – Хроматограмма изотопно-меченых стандартов тестостерона и эпитестостерона при оптимальных условиях элюирования, приведенных в таблице 9

Возможность определения тестостерона и эпитестостерона является важной с точки зрения допинг-контроля, поскольку соотношение этих соединений может указывать на применение запрещённых ВАДА препаратов.

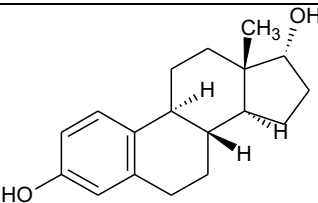
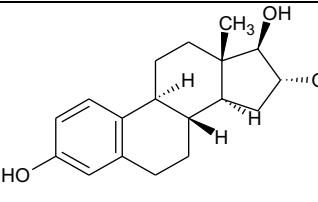
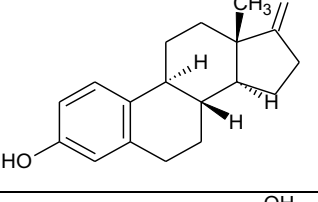
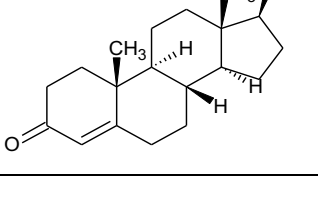
После оптимизации условий элюирования проводили оптимизацию масс-спектрометрического детектирования исследуемых стероидных гормонов. Вначале изучили влияние способа ионизации (электрораспылительная ионизация и химическая ионизация при атмосферном давлении) на аналитические сигналы аналитов. Источник химической ионизации при атмосферном давлении обеспечивал незначительно более высокую эффективность ионизации, однако в дальнейших экспериментах применяли источник электрораспылительной ионизации, поскольку он более широко используется в допинг-контроле, аналитической токсикологии и клинической диагностике.

Оптимальные условия определения аналитов представлены в таблицах 10 и 11, которые использовали в дальнейших исследованиях. Обработку результатов осуществляли с использованием ПО Bruker Data Analysis 4.4.

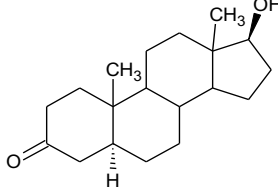
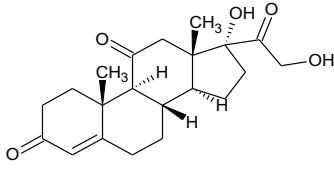
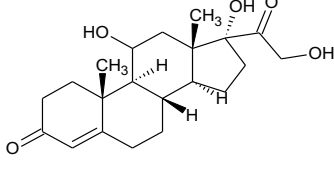
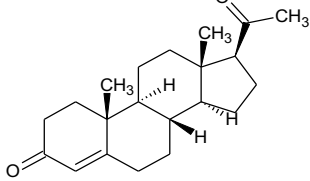
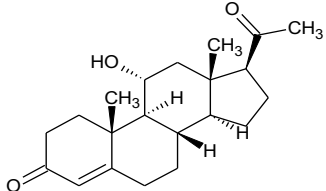
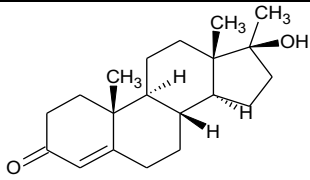
Таблица 10 – Условия квадруполь-времяпролетного масс-спектрометрического детектирования аналитов с источником электрораспылительной ионизации

Параметр	Значение
Температура в источнике ионизации, °С	250
Напряжение на капилляре, В	4000
Напряжение на экстрагирующей линзе, В	500
Давление газа-распылителя (азот), мПа	0,1
Расход газа-осушителя, л/мин	5
Скорость сканирования, Гц	3
Диапазон сканирования масс, m/z	150–1000
Давление газа-мишени, мторр	1,5

Таблица 11 – Некоторые хроматомасс-спектрометрические характеристики определения стероидных гормонов

Аналит	Структурная формула	$[M+H]^+$, Да	Погрешность определения массы, ppm	t_R , мин
17 α -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

Продолжение таблицы 11

Аналит	Структурная формула	[M+H] ⁺ , Да	Погрешность определения массы, ppm	t _R , мин
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

Примечание: ¹ – внутренний стандарт.

2.2.1.2 Подготовка проб мочи к УВЭЖХ-МС анализу

Оптимизацию условий подготовки проб к анализу можно проводить с применением нескольких подходов. Чаще всего применяют подход, основанный на изменении одного параметра при постоянных других. Однако в этом случае

существует сложность его оптимизации, т.к. имеется возможность взаимодействия между переменными. Другим недостатком является необходимость проведения большого числа опытов при оптимизации нескольких переменных [221, 222].

Альтернативным способом оптимизации условий является многофакторный анализ, в котором одновременно варьируют несколько переменных. В этом случае крайне важным является правильное установление граничных значений (наименьшего и наибольшего) для каждой переменной, поскольку неправильно выбранный диапазон приведет к получению результатов невысокого качества [221].

При оптимизации условий подготовки проб к анализу использовали оба подхода, учитывая преимущества и недостатки каждого из них.

Поскольку стероидные гормоны в моче человека, в основном, находятся в конъюгированной форме, то для определения свободных стероидов перед экстракцией необходимо проводить их деконъюгацию. В данном исследовании осуществляли ферментативный гидролиз ферментом β -глюкуронидазы *E. coli*. Для нахождения оптимальных условий ферментативного гидролиза изучали его зависимость от времени (30, 60, 90 мин) и температуры (40, 45, 50, 55 °С) термостатирования. Гидролиз проводили с использованием фосфатного буферного раствора с рН 6,5, который обеспечивает высокую активность фермента β -глюкуронидазы *E. coli*.

Эксперимент проводили следующим образом: в образец мочи объемом 1 мл вносили внутренний стандарт метилтестостерон и фосфатный буферный раствор, содержащий фермент β -глюкуронидазу *E. coli*. Ферментативный гидролиз проводили при различных температурах и времени, затем проводили дисперсионную жидкость-жидкостную микроэкстракцию аналитов в оптимальных условиях. Сравнение аналитических сигналов (отношение площади аналита к площади внутреннего стандарта), полученных в различных условиях показало, что ферментативный гидролиз при 50 °С в течение 30 мин является

достаточным для получения свободных стероидов. При уменьшении температуры термостатирования требовалось большее время для деконъюгации исследуемых стероидов.

Как уже было отмечено ранее, в дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции используют 2 типа растворителей: экстрагент и диспергент, которые должны удовлетворять ряду требований. Так, экстрагент должен быть способен извлекать исследуемые аналиты, иметь более высокую плотность по сравнению с водным образцом, а также высокую растворимость в диспергенте и низкую в анализируемом образце. Диспергент должен хорошо смешиваться как с образцом, так и с экстрагентом и обеспечивать образование эмульсии.

На эффективность экстракции аналитов может оказывать влияние значительное число факторов. Влияние факторов обычно находится в следующей последовательности (по уменьшению): тип экстрагента, тип диспергента, объем экстрагента и объем диспергента [223, 224], поэтому прежде всего изучали влияние этих факторов на степени извлечения аналитов.

В качестве экстрагентов рассматривали хлорированные органические растворители (ди-, три-, тетрахлорметан), удовлетворявшие всем вышеперечисленным требованиям, а в качестве диспергентов – ацетон, метанол, этанол и ацетонитрил.

Для изучения влияния типов экстрагента и диспергента, в 3 мл синтетической мочи, содержащей исследуемые аналиты и внутренний стандарт с концентрациями 500 нг/мл, вносили 1 мл фосфатного буферного раствора с pH 6,5, а затем при помощи шприца вносили смесь экстрагента и диспергента (объем экстрагента – 100 мкл, объем диспергента – 1 мл), после чего пробирку перемешивали на орбитальном перемешивателе в течение 15 с и центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об./мин, затем переносили нижний органический слой в виалу, упаривали его досуха и перерастворяли в 100 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) для анализа. Упаривание экстракта и перерастворение сухого остатка в смеси метанол–вода необходимо ввиду

невозможности анализа трихлорметана обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией.

При использовании дихлорметана с метанолом или этанолом не происходило образование фазы экстрагента, а трихлорметан и этанол или ацетонитрил обеспечивали наиболее высокие степени извлечения, поэтому эти две смеси растворителей использовали в последующих экспериментах для выявления оптимальной.

Влияние pH на степени извлечения устанавливали добавлением буферного раствора в диапазоне pH 4–11. Ацетатные буферные растворы с pH 4, 5 и 6 готовили смешением точных объемов 1 М уксусной кислоты и 1 М раствора гидроксида натрия в различных соотношениях. Фосфатные буферные растворы с pH 7 и 8 готовили смешиванием точных объемов 0,067 М гидрофосфата натрия и 0,067 М гидрофосфата калия. Боратный буферный раствор (pH 9) готовили, используя 0,05 М раствор тетрабората натрия и 0,1 М соляной кислоты, а буферные растворы с pH 10 и 11 получали, смешивая 0,05 М раствор тетрабората натрия и 0,1 М раствор гидроксида натрия.

Для установления оптимального значения pH к 3 мл синтетической мочи или реального образца мочи, содержащего добавки исследуемых стероидных гормонов и внутреннего стандарта на уровне 500 нг/мл, добавляли 1 мл буферного раствора (pH 4–11) или 1 мл дистиллированной воды, затем проводили дисперсионную жидкость-жидкостную микроэкстракцию с использованием смеси трихлорметан : этанол или трихлорметан : ацетонитрил (объем экстрагента – 100 мкл, объем диспергента – 1 мл). Наибольшие степени извлечения получили для смеси трихлорметан/ацетонитрил при pH 9 (рисунок 8).

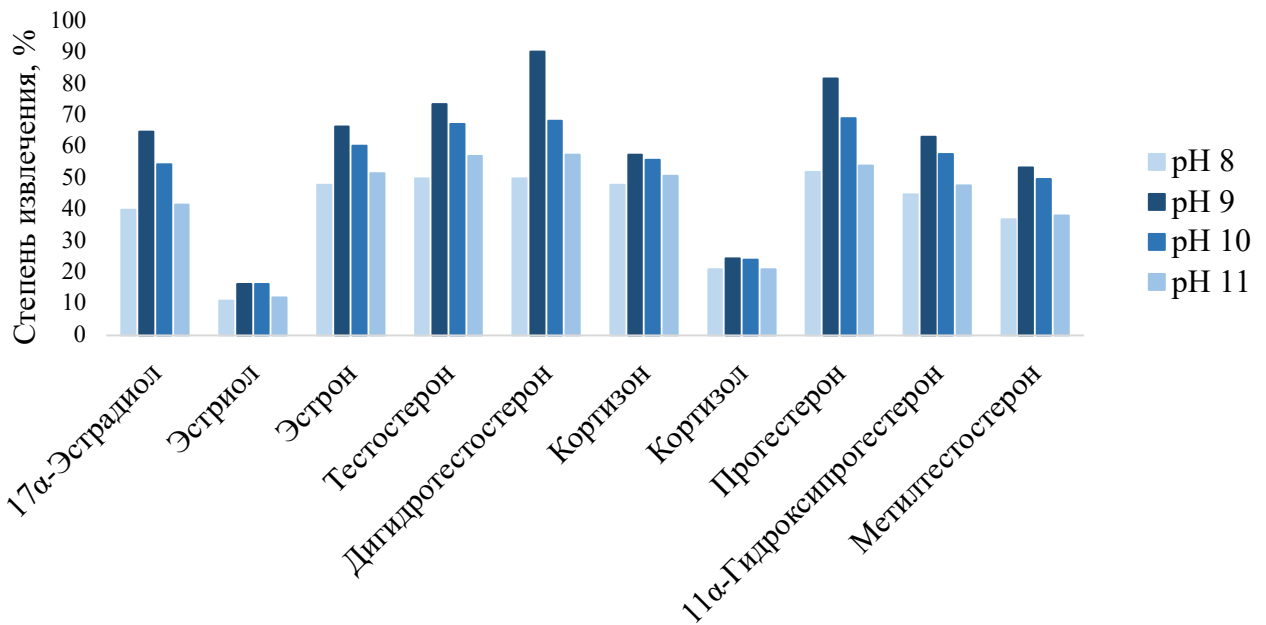


Рисунок 8 – Степени извлечения стероидных гормонов из мочи с буферными растворами pH 8–11

После выявления оптимальных типов экстрагента и диспергента, а также pH, изучили влияние их объемов, времени перемешивания и высаливающего эффекта хлоридом натрия. Эксперимент проводили с использованием плана Бокса-Бенкена в ПО STATISTICA 10 (Statsoft), который используется для оценки влияния различных факторов (независимых переменных) на аналитический сигнал (например, площадь пика – зависимая переменная) на 3 уровнях и оценили взаимодействие между ними. Уровни переменных, используемые в данном эксперименте, представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Независимые переменные (факторы) при планировании эксперимента в плане Бокса-Бенкена

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

Количество экспериментов рассчитывается исходя из уравнения (1):

$$N = 2k(k-1) + C_p, \quad (1)$$

где k – количество независимых переменных, а C_p – количество центральных точек.

Эксперимент проводили с использованием синтетической мочи, применяя оптимизированные ранее условия. Установили, что все модели значимы, поскольку коэффициенты детерминации R^2 и скорректированные коэффициенты детерминации R^2_{adj} превышали 0,9 для всех аналитов, что указывает на высокую адекватность моделей. Поскольку определяемые аналиты имели различные физико-химические свойства, оптимальные значения уровней исследуемых независимых переменных отличались для разных аналитов, поэтому для некоторых переменных (объем диспергента, содержание хлорида натрия) выбирали компромиссные значения. Наибольший эффект на степени извлечения оказывал объем экстрагента, оптимальное значение которого составило 150 мкл для всех аналитов. Оптимальный объем диспергента составил 1100 мкл для большинства соединений, добавление 150 мг хлорида натрия повышало степени извлечения кортизона, кортизола и эстрогена, но не оказывало влияния на другие аналиты. Время перемешивания не влияло на степени извлечения аналитов в выбранном диапазоне. По результатам этих исследований в дальнейших экспериментах использовали 150 мкл трихлорметана, 110 мкл ацетонитрила, 150 мг хлорида натрия и 15 с орбитального перемешивания.

Таким образом, оптимальная схема подготовки проб мочи выглядела следующим образом: к аликвоте мочи объемом 3 мл добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта 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 образца до комнатной температуры в него вносили 1 мл боратного буферного раствора (pH 9) и 150 мг хлорида натрия, образец перемешивали для растворения соли. Затем при помощи шприца в образец быстро вводили смесь трихлорметана

(150 мкл) и ацетонитрила (1100 мкл) для образования эмульсии. Образец перемешивали на орбитальном перемешивателе 15 с и центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об./мин. Органический слой переносили в виалу при помощи шприца, упаривали досуха в токе азота и перерастворяли сухой остаток в 100 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) для анализа.

Эти условия позволили получить степени извлечения в диапазоне 70–95% для всех аналитов.

2.2.1.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией

Так как стероидные гормоны являются эндогенными соединениями, для валидации методики их определения использовали синтетическую мочу [225] с учетом рекомендаций Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) [226].

Для установления пределов обнаружения и определения методики, а также диапазона линейности использовали синтетическую мочу, содержащую исследуемые стероидные гормоны на следующих уровнях концентраций: 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 нг/мл, а также внутренний стандарт с постоянной концентрацией 200 нг/мл. Этот диапазон концентраций был выбран исходя из естественных уровней концентраций стероидных гормонов в организме человека. Кроме того, проводили анализ холостого образца для исключения риска перекрестного загрязнения.

Предел обнаружения аналита устанавливали по соотношению сигнал : шум равному 3, предел определения соответствовал наименьшей его концентрации, определяемой с погрешностью 15%. Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Некоторые аналитические характеристики методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека

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

Растворы контроля качества (РКК) готовили отдельно от градуировочных растворов со следующими концентрациями: нижний предел определения (0,5–25 нг/мл), низкая (50 нг/мл), средняя (100 нг/мл) и высокая (500 нг/мл) концентрация для установления правильности и воспроизводимости методики. Проводили анализ данных растворов в течение одного и нескольких дней ($n = 6$).

Воспроизводимость определения устанавливали как относительное стандартное отклонение (s_r), выраженное в процентах, а правильность (e_r) находили по уравнению (2):

$$e_r = ((c_{\text{опр}} - c_{\text{теор}}) / c_{\text{теор}}) \times 100, \quad (2)$$

где e_r – правильность, $c_{\text{опр}}$ – найденная концентрация, $c_{\text{теор}}$ – введенная концентрация.

Результат определения аналита признавали удовлетворительным, если величина стандартного отклонения s_r и правильности e_r не превышали 20% для раствора контроля качества, соответствующего нижнему пределу определения, и 15% для остальных РКК. В таблице 14 представлены полученные результаты.

Таблица 14 – Правильность и воспроизводимость методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче ($n = 18$)

Аналит	Концентрация РКК, нг/мл	В один день		В разные дни	
		e_r , %	s_r , %	e_r , %	s_r , %
17 α -Эстрадиол	25	-19,1	14,4	-19,5	19,6
	50	-14,3	11,3	-14,4	14,5
	100	-8,9	9,7	-9,3	12,1
	500	1,2	7,6	1,1	13,3
Эстриол	25	-16,5	16,2	-16,1	19,8
	50	-10,8	11,1	-10,2	10,9
	100	-5,0	8,8	-4,0	9,0
	500	-0,9	7,6	1,4	8,9
Эстрон	25	-15,1	17,8	-17,2	18,2
	50	-13,6	11,2	-14,2	14,2
	100	-5,5	6,6	-6,9	7,8
	500	2,3	4,2	-1,2	5,6
Тестостерон	0,5	-11,2	13,7	-14,8	15,5
	50	-6,2	10,2	-7,1	13,5
	100	3,7	4,4	1,2	4,3
	500	2,9	2,3	3,2	1,3
Дигидротестостерон	1,0	-11,6	13,4	-13,2	16,9
	50	-7,2	10,3	-7,5	11,3
	100	3,5	5,4	3,7	6,7
	500	2,6	1,1	3,0	2,4
Кортизон	0,5	-13,9	14,4	-14,7	16,3
	50	-6,4	10,9	-6,8	10,6
	100	2,0	3,7	3,2	4,7
	500	2,5	0,9	1,9	2,2
Кортизол	0,5	-14,5	15,1	-15,2	16,1
	50	-6,6	9,9	-6,8	10,3
	100	-1,1	3,5	2,4	4,2
	500	0,7	1,2	1,7	1,3
Прогестерон	1,0	-13,2	15,9	-16,1	18,4
	50	-9,8	11,8	-8,7	12,7
	100	1,4	6,6	1,7	8,1
	500	2,5	5,3	1,1	6,1
11 α -Гидроксипрогестерон	1,0	-15,6	18,2	-14,8	17,6
	50	-4,4	10,6	-5,8	11,2
	100	1,6	7,3	3,3	7,7
	500	4,3	5,7	0,8	5,8

Селективность валидируемой методики оценивали путем анализа реальных образцов мочи, в которые вносили добавки исследуемых соединений. Площади пиков увеличивались пропорционально внесенным добавкам, а их форма не менялась. Кроме того, ошибка определения масс не превышала 5 ppm, что также свидетельствует о высокой селективности методики.

Возможное влияние компонентов матрицы на результаты определения также изучили методом «введено-найдено» и анализом дистиллированной воды с добавками аналитов, матричные эффекты не превышали 15% для всех аналитов.

Стабильность образцов в автоматическом дозаторе при 5 °С изучали в течение 48 часов, результаты определения при этом отличались менее, чем на 15%. Вероятность перекрестного загрязнения исключили анализом холостого раствора после анализа РКК высокой концентрации.

Разработанная методика ВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче является простой, имеет высокие факторы концентрирования, чувствительность и степени извлечения. Кроме того, благодаря использованию небольших объемов органических растворителей она соответствует критериям зеленой химии [220].

2.2.2 Определение стероидных гормонов в моче человека дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией и дериватизацией гидроксиламином

Проведенные исследования по определению стероидных гормонов в моче человека с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции показали, что данный способ обладает рядом преимуществ по сравнению с твердофазной и жидкость-жидкостной экстракцией. Однако чувствительность методики для эстрогенов оказалась недостаточно высокой – пределы обнаружения и определения аналитов составили 10 и 50 нг/мл. Это связано с низкой эффективностью ионизации аналитов в источнике электрораспылительной ионизации. Для преодоления данного недостатка изучили

возможность применения дериватизации после дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для повышения чувствительности определения кетостероидов (эстрона, тестостерона, дигидротестостерона, кортизона, кортизола, прогестерона, 11 α -гидроксипрогестерона) [227, 228].

В качестве дериватирующего агента выбрали гидроксилламин, поскольку он обеспечивает высокую чувствительность определения благодаря 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. Гидроксилламин использовали ранее [85, 229, 230] для определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека с высокой чувствительностью. Схема получения оксимов стероидных гормонов при использовании гидроксилламина в качестве дериватирующего агента приведена на рисунке 9:

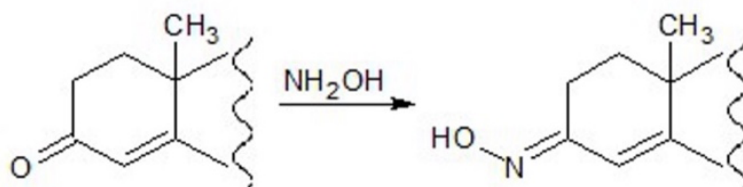


Рисунок 9 – Схема образования оксимов стероидных гормонов при дериватизации гидроксилламином

УВЭЖХ-МС детектирование и деконъюгацию стероидных гормонов при анализе реальных образцов мочи проводили с использованием описанных выше условий.

2.2.2.1 Условия образования оксимов стероидных гормонов

Для достижения полноты протекания реакции образования окимов кетостероидов оптимизировали концентрацию гидроксилламина, температуру и

время термостатирования. Время реакции варьировали в диапазоне от 30 до 120 мин (30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 мин), температуру – от 20 до 70 °С с интервалом 10 °С, концентрацию гидроксиламина от 2,5 до 10%. Полноту протекания реакции устанавливали по наличию пиков производных и отсутствию пиков исходных соединений на хроматограммах по ионам, указанным в таблице 15.

Таблица 15 – 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

Примечание: ¹ – внутренний стандарт.

При концентрации гидроксиламина 10% (по объему) обеспечивается полнота протекания реакции при 70 °С и времени термостатирования 90 мин, данные условия выбрали для дальнейших экспериментов. В случае более низкой концентрации дериватирующего агента и меньших времени и температуре термостатирования на хроматограммах наблюдали исходные соединения или

моно- и дизамещенные производные, например, для кортизона, кортизола, прогестерона и 11 α -гидроксипрогестерона. Важно отметить, что при использовании гидроксилamina в качестве дериватирующего агента происходит образование син- и анти-форм оксимов стероидных гормонов, что может приводить либо к получению расщепленного пика, либо нескольким пикам на хроматограмме. В таблице 15 указаны хроматографические пики, которые использовались для количественного анализа.

2.2.2.2 Условия дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции и дериватизации аналитов

Ввиду эндогенной природы стероидных гормонов для них отсутствуют холостые матрицы, поэтому оптимизацию условий их экстракции проводили с использованием синтетической мочи.

В качестве диспергентов рассматривали ацетон, метанол, этанол и ацетонитрил, хорошо растворимые как в образце, так и экстрагенте, и способствующие образованию большой поверхности контакта фаз. Ди-, три- и тетрахлорметан использовали в качестве экстрагентов, поскольку они имеют низкую растворимость в водном образце, а также более высокую плотность, тем самым удовлетворяя критериям, предъявляемым к данным растворителям.

Поскольку оксимы стероидных гормонов имеют более высокую эффективность ионизации по сравнению с исходными молекулами в источнике электрораспылительной ионизации, в данном исследовании использовали 1 мл образца мочи для анализа.

Для нахождения оптимального сочетания экстрагента и диспергента проводили следующий эксперимент: к 1 мл синтетической мочи, содержащей исследуемые соединения и внутренний стандарт с концентрациями 100 нг/мл, добавляли 300 мкл фосфатного буферного раствора (pH 6,5). Затем при помощи шприца в образец вводили смесь экстрагента (100 мкл) и диспергента (500 мкл),

после чего перемешивали смесь на орбитальном перемешивателе в течение 15 с и центрифугировали 10 мин при 10000 об./мин. Нижнюю фазу упаривали досуха в токе азота и добавляли раствор гидроксиламина (метанол–вода (1 : 1, по объему)) для получения производных с последующим термостатированием и анализом образца.

Две системы растворителей – ацетон : трихлорметан и ацетонитрил : трихлорметан, обеспечивали степени извлечения аналитов, превышающие 70%. Степени извлечения исследуемых глюкокортикоидов (кортизона и кортизола) ацетонитрилом несколько выше, а ацетон повышает степени извлечения остальных соединений, поэтому был выбран для дальнейших экспериментов в качестве диспергента, а трихлорметан – в качестве экстрагента.

Влияние других факторов, которые могут оказывать влияние на степени извлечения аналитов, оценивали с использованием плана Бокса-Бенкена в ПО STATISTICA 10 (Statsoft).

Рассматривали четыре фактора: объем трихлорметана (50, 100 и 150 мкл), объем ацетона (450, 500 и 550 мкл), количество хлорида натрия для оценки высаливающего эффекта (0, 50 и 100 мг) и количество тетрабората натрия (0, 5 и 10 мг) для изучения влияния рН на степени извлечения аналитов. Для этого к 1 мл синтетической мочи, содержащей исследуемые соединения и внутренний стандарт (метилтестостерон, 100 нг/мл), хлорид натрия (0, 50 и 100 мг) и тетраборат натрия (0, 5 и 10 мг) добавляли 0,3 мл фосфатного буферного раствора, затем шприцем вводили смесь трихлорметана и ацетона. Смесь перемешивали на орбитальном перемешивателе в течение 15 с, поскольку отсутствие перемешивания приводило к неудовлетворительным степеням извлечения аналитов, и центрифугировали 10 мин при 10000 об./мин. Нижнюю фазу упаривали досуха в токе азота и добавляли 10% раствор гидроксиламина (метанол–вода (1 : 1)) для получения производных с последующим термостатированием и анализом образца.

Использование плана Бокса-Бенкена позволило установить уровни факторов, обеспечивающие количественное извлечение всех аналитов. Все рассмотренные модели оказались статистически значимыми ($R_{adj}^2 > 0.9$), что указывает на высокую адекватность полученных результатов. Поскольку физико-химические свойства определяемых соединений отличаются, в некоторых случаях выбирали компромиссные значения уровней факторов. В результате установили, что добавление хлорида натрия и тетрабората натрия незначительно влияет на степени извлечения, а объем экстрагента оказывает большое влияние – с его увеличением степени извлечения возрастают, поэтому выбрали объем 150 мкл. Объем диспергента 500 мкл обеспечил наиболее высокие степени извлечения. В этих условиях степени извлечения аналитов составили 79–98%, при этом степени извлечения глюкуронидов оказались самыми низкими по сравнению с остальными соединениями.

По результатам проведенных исследований выбрали оптимальные условия пробоподготовки: в микроцентрифужную пробирку емкостью 2 мл внести 1 мл образца, содержащего внутренний стандарт метилтестостерон (100 нг/мл), и 0,3 мл фосфатного буферного раствора (pH 6,5), содержащего фермент β -глюкуронидазу *E. coli*, и инкубировать образец в течение 30 мин при 50 °С. После охлаждения образца до комнатной температуры быстро ввести в него смесь хлороформа и ацетона (150 и 500 мкл соответственно) при помощи шприца для образования эмульсии, перемешать на орбитальном перемешивателе 15 с и центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин. Нижний слой перенести в виалу, упарить досуха в токе азота, сухой остаток растворить в 100 мкл 10% раствора гидроксиламина (метанол–вода (1 : 1)) и термостатировать виалу в течение 90 мин при 70 °С с последующим анализом.

2.2.2.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией и дериватизацией гидроксиламином

Предложенный способ валидировали с учетом рекомендаций Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) по валидации биоаналитических методик. При валидации методики использовали синтетическую мочу ввиду сложности получения воспроизводимой матрицы с концентрациями стероидных гормонов ниже предела обнаружения.

Градуировочные зависимости строили в диапазоне концентраций 0,1–100 нг/мл (0,10, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл). Предел обнаружения устанавливали как концентрацию аналита, обеспечивающую соотношение сигнал : шум не менее 3, а предел определения соответствовал концентрации, определяемой с погрешностью менее 15%. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Некоторые аналитические характеристики методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека

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
11 α -Гидроксипрогестерон	0,25	0,5	0,5–100	0,998
Эстрон	0,10	0,25	0,25–100	0,996

Перекрестное загрязнение оценивали путем анализа холостого раствора после анализа 100 нг/мл раствора образца, при этом на хроматограмме холостого

раствора не наблюдали пиков, соответствующих определяемым соединениям, что свидетельствует об отсутствии перекрестного загрязнения.

Правильность и воспроизводимость устанавливали анализом растворов контроля качества низкой (2,5 нг/мл), средней (10 нг/мл) и высокой (50 нг/мл) концентрации в течение одного и разных дней. Воспроизводимость выражали как относительное стандартное отклонение (s_r), а правильность (e_r) находили по разнице между найденной и теоретической концентрациями. Полученные результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Правильность и воспроизводимость УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека ($n = 15$)

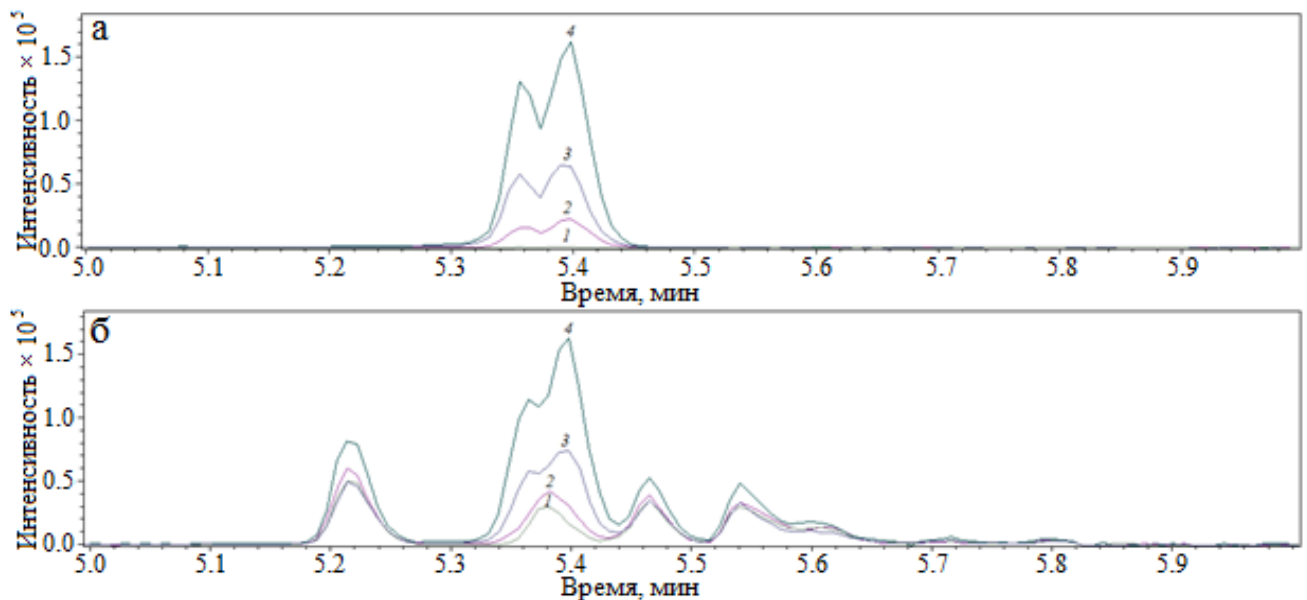
Аналит	Концентрация РКК, нг/мл	В один день		В разные дни	
		e_r , %	s_r , %	e_r , %	s_r , %
Тестостерон	2,5	-11,2	13,2	-12,6	14,1
	10	-3,5	8,2	-5,1	10,8
	50	2,1	5,6	2,6	7,9
Дигидротестостерон	2,5	-11,7	11,6	-13,7	12,8
	10	-4,2	7,2	-5,6	9,1
	50	1,5	4,1	2,4	5,4
Кортизон	2,5	-14,2	13,4	-14,6	14,1
	10	-5,1	9,2	-6,7	9,6
	50	2,6	5,1	1,7	6,5
Гидрокортизон	2,5	-12,5	13,2	-14,6	13,8
	10	-8,3	8,6	-7,5	10,5
	50	1,1	4,2	2,6	6,0
Прогестерон	2,5	-12,7	11,8	-13,2	14,5
	10	-5,5	7,9	-4,6	9,8
	50	0,6	3,6	3,2	5,3
11 α -Гидроксипрогестерон	2,5	-13,5	14,3	-14,5	14,8
	10	-4,8	9,1	-5,2	10,2
	50	1,8	5,7	4,3	6,7
Эстрон	2,5	-12,4	12,0	-13,9	13,4
	10	-5,0	6,6	-7,8	8,5
	50	1,4	2,5	1,3	4,7

Стабильность проб растворов контроля качества в автоматическом дозаторе, прошедших через все этапы пробоподготовки, оценивали в течение 48 ч

при 5 °С. Установили, что отклонения в результатах не превышали 15%, что указывает на стабильность образцов. Длительную стабильность оценивали в течение месяца путем проведения трех циклов заморозки (–20 °С) и разморозки образцов контроля качества до комнатной температуры. В полученных результатах не было значительных отличий.

2.2.2.4 Анализ реальных образцов мочи

Предложенную методику УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче использовали при анализе реальных образцов с применением стандартной добавки. Для этого в образец мочи добавляли три смеси аналитов с концентрациями каждого 10, 50 и 100 нг/мл. На рисунке 10 в качестве примера приведены хроматограммы модельного образца и образца мочи с добавкой тестостерона (10, 50 и 100 нг/мл). Степени извлечения составили 76–95%, относительное стандартное отклонение не превышало 15%, что указывает на пригодность методики для анализа реальных образцов [227, 228].

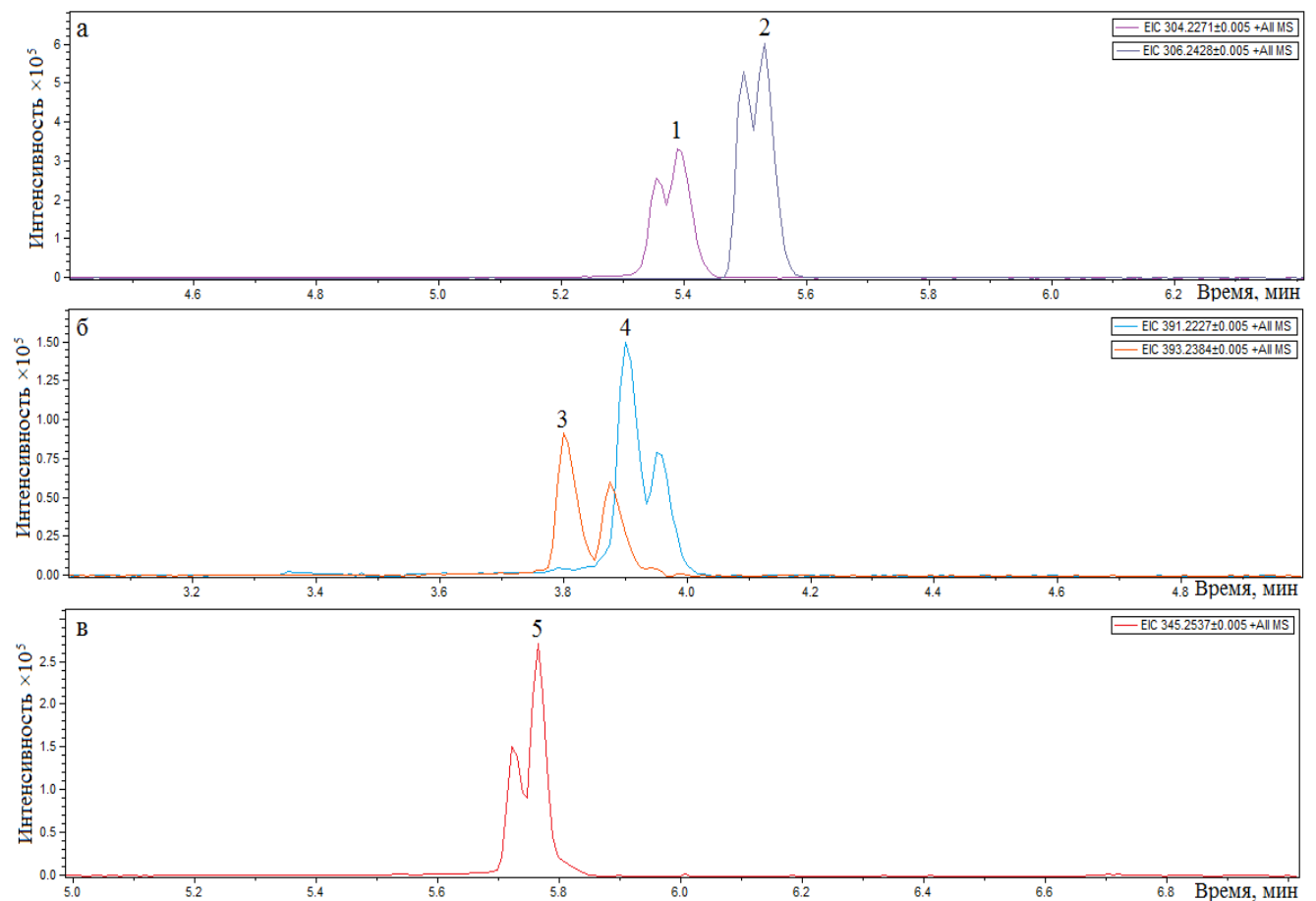


а – образец синтетической мочи, б – образец реальной мочи

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

Как видно, применение гидроксилamina позволяет значительно повысить чувствительность методики. Основной недостаток использования данного дериватирующего агента – возможное расщепление пиков на хроматограммах из-за образования нескольких стереоизомеров [231].

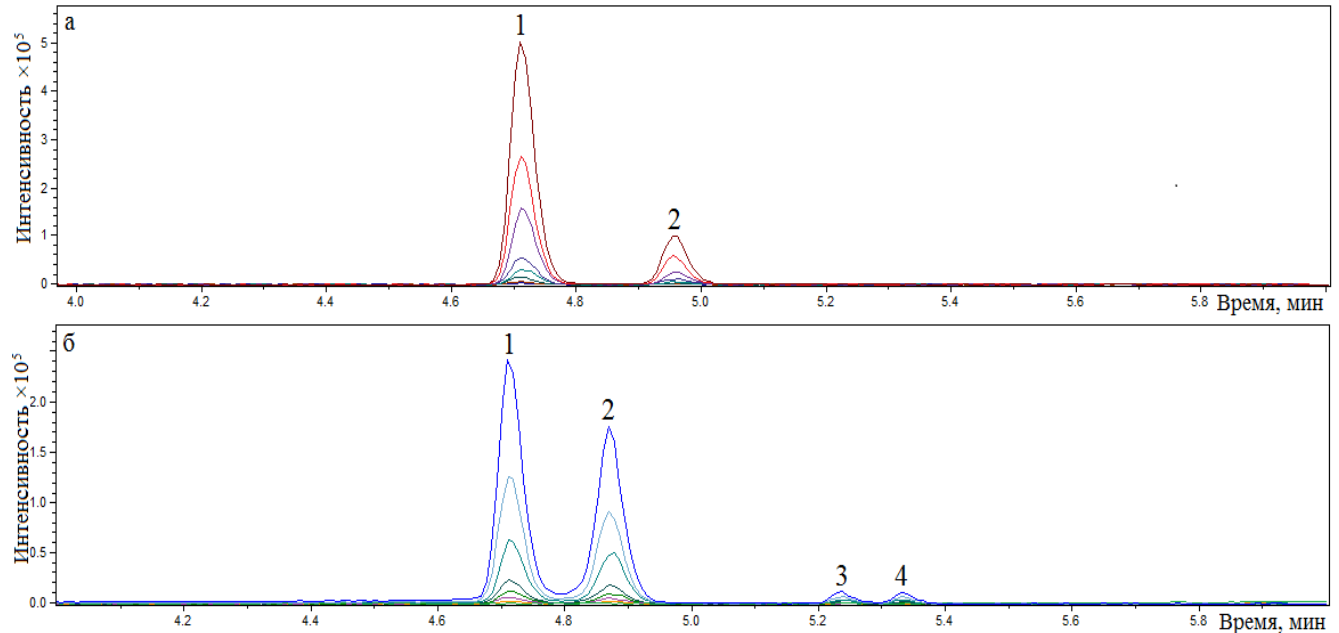
На рисунке 11 пики оксимов тестостерона (1), дигидротестостерона (2), кортизона (3), кортизола (4), прогестерона (5) расщепляются, но не разделяются полностью, делая количественный анализ возможным, позволяя интегрировать их как один пик.



1 – тестостерон, 2 – гидроксипрогестерон, 3 – кортизон, 4 – кортизол, 5 – прогестерон

Рисунок 11 – Хроматограммы оксимов стероидных гормонов

В то же время для эстрона и 11α -гидроксипрогестерона (рисунок 12) наблюдается несколько полностью разрешенных пиков, соответствующих стереоизомерам производных.



а – эстрон, б – 11α -гидроксипрогестерон

Рисунок 12 – Хроматограммы оксимов стероидных гормонов в диапазоне концентраций 2,5–1000 нг/мл

В этом случае очевидным вариантом для количественного анализа является интегрирование всех пиков, принадлежащих одному веществу. Однако, поскольку данные пики соответствуют стереоизомерам одного соединения, изучали возможность применения для количественного анализа только одного пика аналита, наименее подверженного матричным воздействиям в реальном образце, что позволит увеличить точность проводимого количественного анализа.

Для этого на примере эстрона построили градуировочные зависимости как суммы пиков всех форм, так и отдельных пиков (рисунок 13). Из представленных данных видно, что получение воспроизводимых результатов для определения эстрона возможно как с использованием одного изомера, имеющего время удерживания 4,7 мин, так и суммы площадей двух пиков. Использование же

исключительно второго пика для проведения количественного анализа, приводит к значительному уменьшению чувствительности.

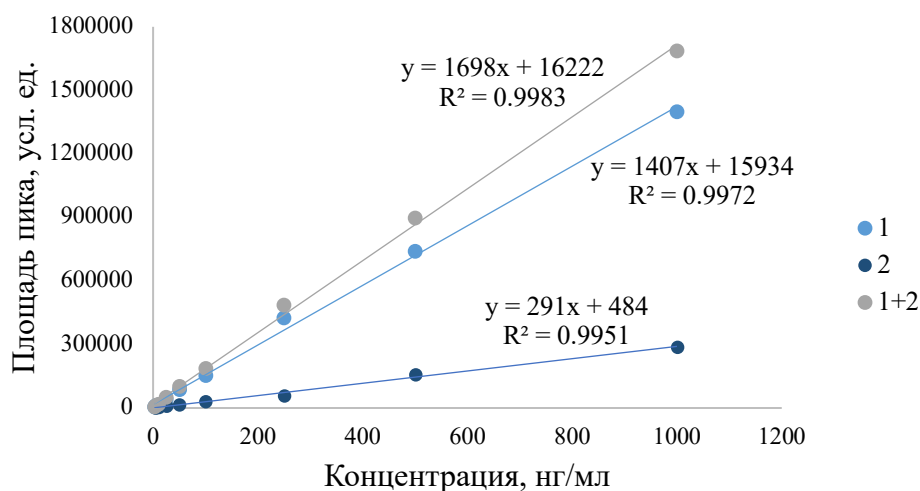


Рисунок 13 – Градуировочная зависимость, построенная по хроматограммам, для оксима эстрона в диапазоне концентраций 2,5–1000 нг/мл

Применяя аналогичный подход по обработке результатов, установили, что для 11 α -гидроксипрогестерона оптимально использование как пиков 1 и 2 по отдельности, так и суммы их интегралов (рисунок 14). В то же время возможно пренебрежение пиками 3 и 4, так как их интенсивность невысокая.

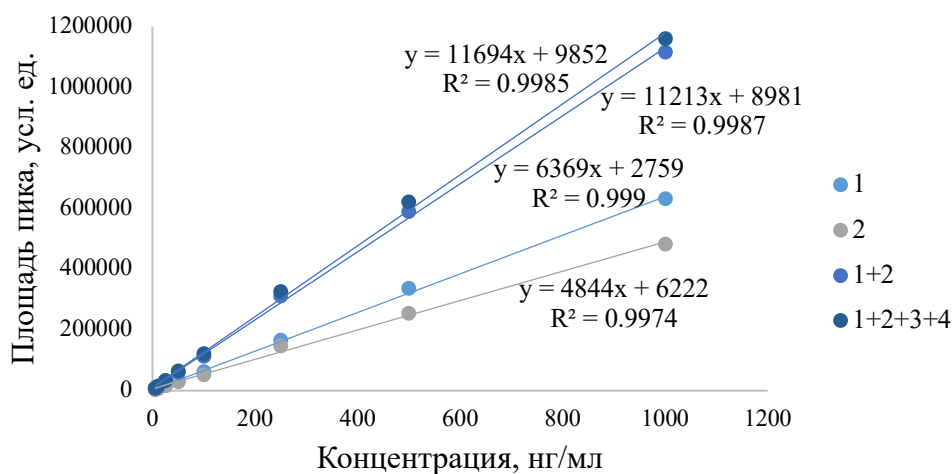


Рисунок 14 – Градуировочная зависимость, построенная по хроматограммам, для оксима 11 α -гидроксипрогестерона в диапазоне концентраций 2,5–1000 нг/мл

Можно заключить, что использование дериватизации гидроксиламином позволяет существенно повысить чувствительность методики, особенно для эстрогена, а для преодоления недостатка в виде расщепленных пиков можно использовать различные подходы к интегрированию пиков либо оптимизировать условия градиентного элюирования [231].

В то же время, последовательное проведение экстракции и дериватизации приводит к увеличению сложности и длительности пробоподготовки, поэтому рассмотрели возможность применения твердофазной аналитической дериватизации, которая позволила бы объединить стадии экстракции и дериватизации в один этап.

2.2.3 УВЭЖХ-МС определение стероидных гормонов в моче человека 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 [232]. В качестве дериватирующего агента использовали гидроксиламин, поскольку реакция получения производных стероидных гормонов является простой, а полученные соединения имеют высокую эффективность ионизации, представляется также возможным напрямую анализировать элюат методом обращенно-фазовой УВЭЖХ-МС.

2.2.3.1 Условия элюирования аналитов

В первую очередь оптимизировали условия хроматографического разделения оксимов стероидных гормонов с целью уменьшения расщепления пиков производных стероидных гормонов на хроматограмме.

Использовали две аналитические колонки: Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) и Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) с соответствующими предохранительными колонками. Гидрофобная аналитическая колонка Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) в качестве твердого носителя имеет поверхностно-пористый силикагель («core-shell»), эндкепированный триметилсилильными функциональными группами, в то время в аналитической колонке Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) сорбент имеет полярную поверхность и октадецильные функциональные группы, влияя на удерживание аналитов.

В качестве подвижной фазы использовали систему, состоящую из 0,1% муравьиной кислоты в метаноле – 0,1% муравьиной кислоты в воде в режиме градиентного элюирования при температуре термостатирования колонки 40 °С для обоих колонок. Квадруполь-времяпролетное детектирование аналитов проводили в оптимизированных ранее условиях.

В оптимальных условиях аналитическая колонка Luna Omega Polar C18 (100 × 2,1 мм, 1,6 мкм) приводила к получению более высокой эффективности разделения и приводила к частичному расщеплению пиков только для кортизона и кортизола, которые легко можно было интегрировать как один, поэтому использовали ее в дальнейших экспериментах. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 18, а условия УВЭЖХ-МС детектирования указаны в таблице 19.

Таблица 18 – Условия градиентного элюирования аналитов

Время, мин	0,1% муравьиная кислота в воде, %	0,1% муравьиная кислота в метаноле, %	Скорость потока, мл/мин
0,00	90	10	0,35
1,00	90	10	
2,70	50	50	
4,00	50	50	
5,00	10	90	
7,50	10	90	
7,51	90	10	
9,00	90	10	

Таблица 19 – Условия УВЭЖХ-МС детектирования аналитов

Аналит	Брутто-формула	Моноизотопная масса, Да	$[M+H]^+$, Да	Погрешность определения массы, ppm	t_R , мин
Производное тестостерона	$C_{19}H_{29}NO_2$	303,2198	304,2271	2,3	6,2
Производное дигидротестостерона	$C_{19}H_{31}NO_2$	305,2355	306,2428	1,0	6,4
Производное кортизона	$C_{21}H_{30}N_2O_5$	390,2155	391,2227	1,3	5,8, 5,9
Производное кортизола	$C_{21}H_{32}N_2O_5$	392,2311	393,2384	1,5	5,7, 5,8
Производное эстрона	$C_{18}H_{23}NO_2$	285,1729	286,1802	1,4	6,1
Производное прогестерона	$C_{21}H_{32}N_2O_2$	344,2464	345,2537	2,0	6,5
Производное 11 α -гидроксипрогестерона	$C_{21}H_{32}N_2O_3$	360,2413	361,2486	1,4	6,1
Производное метилтестостерона ¹	$C_{20}H_{31}NO_2$	317,2355	318,2428	1,9	6,3

Примечание: ¹ – внутренний стандарт.

2.2.3.2 Условия твердофазной аналитической дериватизации стероидных гормонов

Для концентрирования аналитов использовали патроны для твердофазной экстракции Strata C-18-E (100 мг, 1 мл). В соответствии с рекомендациями производителя патрон кондиционировали 1 мл метанола и уравновешивали 1 мл дистиллированной воды. После этого загружали образец синтетической мочи объемом 1 мл, содержащий исследуемые стероидные гормоны с концентрацией 100 нг/мл, а также 0,3 мл фосфатного буферного раствора (рН 6,5), содержащий внутренний стандарт метилтестостерон с концентрацией 100 нг/мл.

Проводили оптимизацию состава промывочного раствора после загрузки образца с использованием водно-метанольных смесей с содержанием метанола от

5% до 50% (по объему), а также объема элюента, необходимого для количественной десорбции аналитов с патрона для ТФЭ.

При использовании 30% метанола не наблюдалось смыва аналитов с сорбента, в то время как при более высоких содержаниях метанола в промывочном растворе десорбировались кортизон и кортизол, поэтому в дальнейших исследованиях использовали 30% метанол.

Для элюирования аналитов использовали различные объемы метанола от 0,5 до 3,0 мл. Объем 0,5 мл оказался достаточным для количественной десорбции аналитов, что показано на рисунке 15.

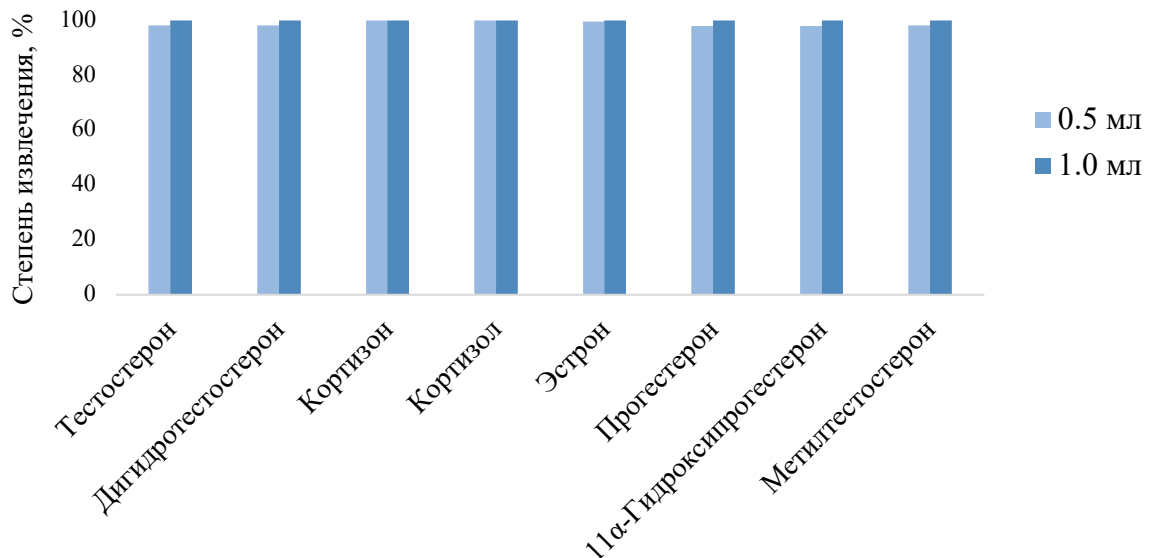


Рисунок 15 – Влияние объема элюента на степени извлечения аналитов

При оптимизации условий дериватизации аналитов на патроне для твердофазной экстракции рассматривали влияние концентрации дериватизирующего агента, температуры и времени термостатирования. Объем дериватизирующего агента составлял 90 мкл, поскольку он оказался достаточным для полного смачивания сорбента.

Для оценки влияния концентрации на условия дериватизации аналитов использовали водные растворы гидроксиламина с концентрациями в диапазоне от

1 до 25% (1, 2,5, 5, 10, 15, 20 и 25% по объему). Термостатирование патрона проводили в диапазоне от 25 до 80 °С с интервалом 10 °С при 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин. Использовали 1 мл синтетической мочи, содержащей стероидные гормоны с концентрацией 100 нг/мл, и 0,3 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,5, в котором присутствовал внутренний стандарт.

Полноту протекания реакции получения производных оценивали по отсутствию пиков исходных соединений и/или монозамещенных производных кортизона, кортизола, прогестерона и 11 α -гидроксипрогестерона. Оптимальными условиями получения оксимов стероидных гормонов оказались 90 мкл 20% раствора гидроксиламина проводили при температуре и времени термостатирования 80 °С и 60 мин соответственно. В этих условиях отсутствовали пиков исходных соединений и монозамещенных оксимов кортизона, кортизола, прогестерона и 11 α -гидроксипрогестерона.

Оптимальная схема твердофазной аналитической дериватизации показана на рисунке 16.

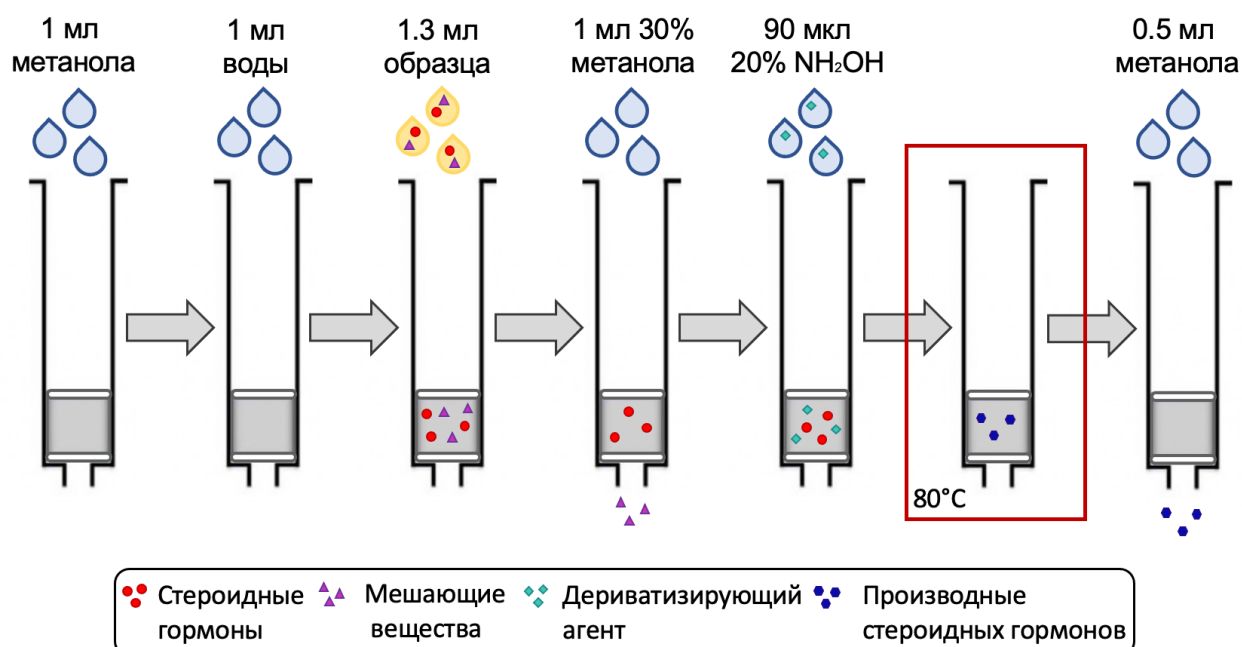


Рисунок 16 – Схема твердофазной аналитической дериватизации для определения стероидных гормонов в моче человека

После элюирования аналитов упаривали элюат и перерастворяли сухой остаток в 150 мкл раствора метанол–вода (1 : 1, по объему) для последующего УВЭЖХ-МС анализа.

При анализе реальных образцов перед проведением твердофазной аналитической дериватизации проводили деконъюгацию стероидных гормонов в условиях, описанных ранее (с использованием фосфатного буферного раствора, содержащего фермент β -глюкуронидазу *E. coli* и внутренний стандарт метилтестостерон с концентрацией 167 нг/мл).

2.2.3.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче твердофазной аналитической дериватизацией

Разработанную методику ВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче валидировали с учетом рекомендаций Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) по валидации биоаналитических методик с использованием синтетической мочи.

Для установления пределов обнаружения и определения методики, а также диапазона линейности использовали синтетическую мочу, содержащую исследуемые стероидные гормоны в следующих концентрациях: 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50 и 100 нг/мл, а также внутренний стандарт с постоянной концентрацией 50 нг/мл. Кроме того, проводили анализ холостого образца с целью исключения вероятности перекрестного загрязнения. Предложенная методика характеризуется высокой чувствительностью (таблица 20).

Градуировочные зависимости строили как отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта с постоянной концентрацией от концентрации аналита. Предел обнаружения соответствовал наименьшей обнаруживаемой концентрации аналита (соотношение сигнал : шум равно 3), нижний предел определения – концентрация аналита, определяемая с погрешностью менее 20%, а предел определения – с погрешностью менее 15%.

Таблица 20 – Некоторые аналитические характеристики методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека

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

Отдельно от градуировочных растворов для оценки правильности и воспроизводимости разработанной методики готовили и проводили анализ растворов контроля качества с концентрацией, соответствующей нижнему пределу определения (0,5–1,0 нг/мл), низкой (2,5 нг/мл), средней (10 нг/мл) и высокой (50 нг/мл). Анализ РКК проводили в течение одного и нескольких дней.

Воспроизводимость выражали как относительное стандартное отклонение (s_r), выраженное в процентах, а правильность (e_r) находили по разнице между экспериментально полученной и теоретической концентрациями.

Результат признавали удовлетворительным, если значения правильности и воспроизводимости не превышали 20% для раствора контроля качества, соответствующего нижнему пределу определения, и 15% для остальных РКК (таблица 21).

Таблица 21 – Оценка правильности и воспроизводимости методики УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче человека ($n = 15$)

Аналит	Концентрация РКК, нг/мл	В один день		В разные дни	
		e_r , %	s_r , %	e_r , %	s_r , %
Тестостерон	0,5	-18,8	16,5	-19,3	17,2
	2,5	-12,6	13,3	-12,8	14,2
	10	6,4	8,2	8,7	9,3
	50	5,1	2,3	7,4	4,6
Дигидротестостерон	0,5	-17,1	15,3	-17,0	15,8
	2,5	-10,3	12,7	-9,6	13,1
	10	1,6	4,1	2,3	6,5
	50	4,6	2,1	3,5	4,7
Кортизон	1,0	-15,7	16,2	-17,8	17,5
	2,5	-12,5	10,1	-13,9	11,4
	10	11,7	5,7	12,1	5,9
	50	7,9	4,3	8,2	5,0
Кортизол	1,0	-17,2	16,4	-17,9	17,8
	2,5	-14,0	11,6	-14,8	12,2
	10	8,7	9,8	9,1	8,4
	50	4,6	3,2	5,3	4,3
Эстрон	1,0	-16,7	17,9	-17,8	19,0
	2,5	-10,5	13,5	-10,6	13,6
	10	6,2	8,0	7,3	7,4
	50	1,9	3,0	3,5	2,9
Прогестерон	0,5	-19,0	16,1	-18,7	18,3
	2,5	-10,6	13,5	-10,9	13,6
	10	7,7	5,3	8,1	10,2
	50	2,0	3,9	3,3	5,5
11 α -Гидроксипрогестерон	0,5	-18,4	17,7	-19,3	18,7
	2,5	-9,6	12,8	-10,7	13,4
	10	6,2	7,0	7,4	8,3
	50	2,7	3,1	4,5	4,8

Степени извлечения аналитов устанавливали путем сравнения площадей хроматографических пиков в модельных растворах (дистиллированная вода) и образцов с аналогичными концентрациями, прошедших через все стадии пробоподготовки. Полученные значения степеней извлечения лежали в диапазоне 82–97%, что является достаточным для чувствительного определения исследуемых соединений.

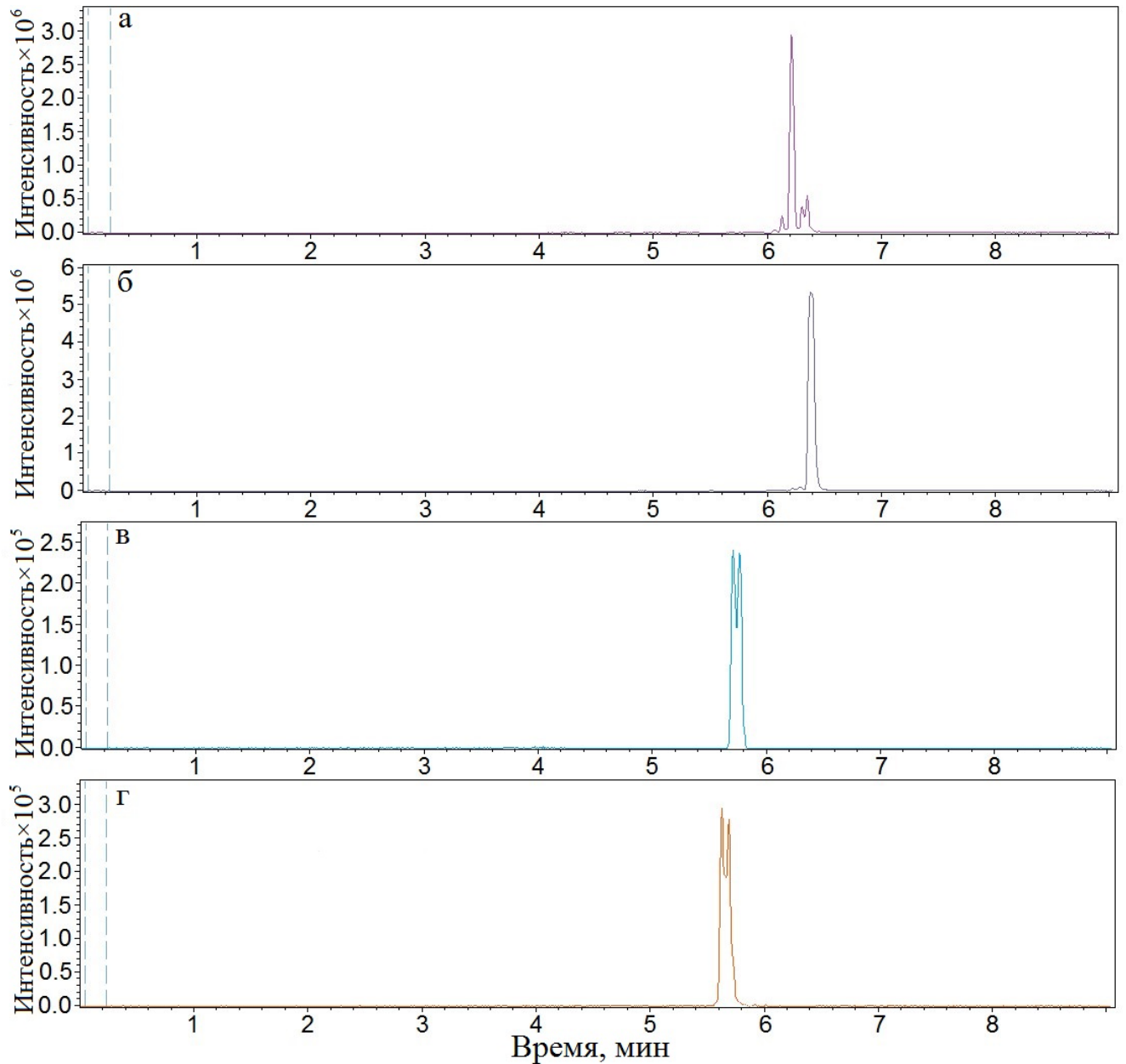
Стабильность прошедших через все этапы пробоподготовки РКК в автоматическом дозаторе оценивали в течение 48 часов (интервал 6 часов) при 5 °С в темноте. Изменения в результатах составили 6–14% для всех аналитов, что указывает на высокую стабильность оксимов стероидных гормонов при хранении. Длительную стабильность оценивали в течение месяца путем проведения трех циклов заморозки (–20 °С) и разморозки образцов контроля качества до комнатной температуры. Отклонения в результатах от свежеприготовленных образцов не превышали 15%.

Селективность методики оценивали методом «введено-найдено» на реальных образцах мочи, оценивая форму и площади пиков исследуемых аналитов. Однако, поскольку в образцах мочи присутствует большое количество стереоизомеров, исключить вероятность присутствия мешающих компонентов невозможно, даже с использованием УВЭЖХ-МСВР.

2.2.3.4 Анализ реальных образцов мочи

Разработанную методику УВЭЖХ-МС определения стероидных гормонов в моче применили для анализа трех реальных образцов мочи, полученных от мужчин в возрасте от 20 до 45 лет. Подготовку проб мочи проводили в описанных ранее оптимальных условиях. Кроме того, проводили анализ реальных образцов, в которые вносили РКК, для оценки матричных эффектов. Хроматограмма образца мочи показана на рисунке 17, а рассчитанные концентрации аналитов приведены

в таблице 22. Полученные результаты определений показывают возможность применения разработанной методики для анализа реальных образцов мочи [232].



а – тестостерон (m/z $304,2271 \pm 0,005$), б – дигидротестостерон (m/z $306,2428 \pm 0,005$), в – кортизон (m/z $391,2227 \pm 0,005$), г – кортизол (m/z $393,2384 \pm 0,005$)

Рисунок 17 – Хроматограмма по выделенным ионам реального образца мочи

Таблица 22 – Результаты определения аналитов в реальном образце мочи методом «введено-найдено»

Аналит	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл
Тестостерон	0	3,0
	0,5	3,4
	2,5	5,2
	10	14
	50	55
Дигидротестостерон	0	3,8
	0,5	4,2
	2,5	6,2
	10	15
	50	55
Кортизон	0	6,3
	1,0	7,1
	2,5	8,3
	10	17
	50	58
Кортизол	0	2,9
	1,0	3,4
	2,5	5,1
	10	14
	50	54
Эстрон	0	н.о. ¹
	1,0	0,8
	2,5	2,2
	10	12
	50	54
Прогестерон	0	н.о.
	0,5	0,4
	2,5	2,3
	10	11
	50	53
11 α -Гидроксипрогестерон	0	н.о.
	0,5	0,4
	2,5	2,3
	10	11
	50	53

Примечание: ¹ – не обнаружено.

Таким образом, использование твердофазной аналитической дериватизации показывает целесообразность ее применения при определении стероидных гормонов. За счет фактора дериватизации на поверхности сорбента затрачиваемое время получения производных меньше, чем ее протекания в растворе (рисунок 18). Помимо сокращения времени анализа, методика характеризуется высокой чувствительностью и низким матричным эффектом.

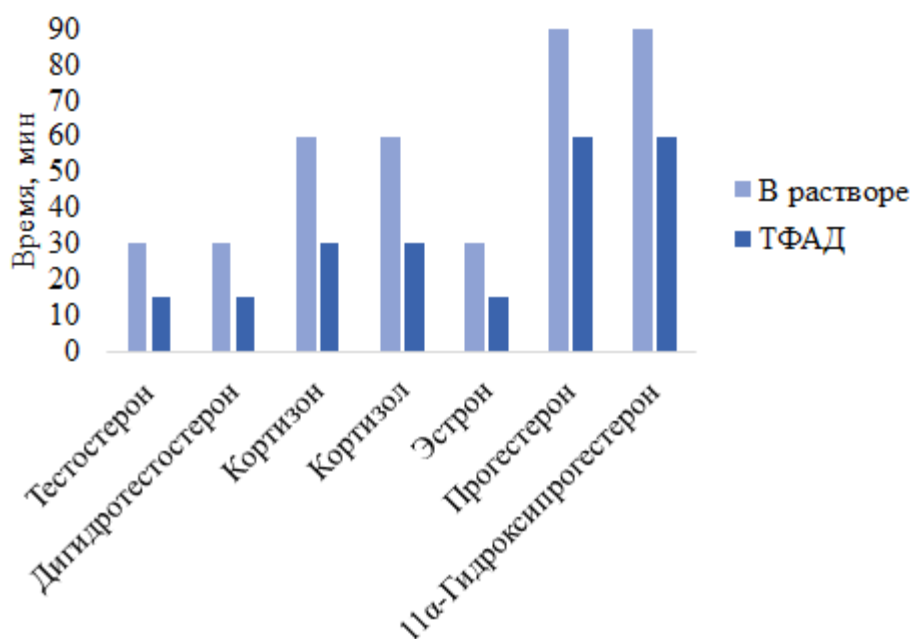


Рисунок 18 – Сравнение оптимального времени дериватизации гидроксиламином в растворе и на патроне для ТФЭ

2.2.4 УВЭЖХ-МС/МС определение стероидных гормонов в слюне человека жидкость-жидкостной экстракцией

2.2.4.1 Условия УВЭЖХ-МС/МС детектирования аналитов

Для достижения высокой чувствительности и селективности детектирования аналитов использовали систему, включающую ультра-высокоэффективный жидкостный хроматограф и тройной квадрупольный масс-спектрометр. Хроматографическое разделение аналитов проводили с

использованием аналитической колонки Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм), условия градиентного элюирования оптимизировали с использованием 0,1% муравьиной кислоты в воде – 0,1% муравьиной кислоты в метаноле в качестве компонентов подвижной фазы. Оптимальные условия градиентного элюирования при температуре термостатирования 40 °С и объеме вводимой пробы 10 мкл представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Условия градиентного элюирования аналитов

Время, мин	0,1% муравьиная кислота в воде	0,1% муравьиная кислота в воде, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,0	90	10	0,4
1,0	90	10	
2,0	50	50	
3,2	50	50	
5,0	10	90	
7,9	10	90	
8,0	90	10	
9,5	90	10	

Условия детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций оптимизировали путем напуска определяемых веществ в камеру источника нагреваемой электрораспылительной ионизации с использованием шприцевого ввода в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Условия ионизации аналитов в источнике нагреваемой электрораспылительной ионизации приведены в таблице 24.

Таблица 24 – Условия ионизации аналитов в нагреваемом электрораспылительном источнике ионизации

Параметр	Значение
Температура испарителя, °С	400
Температура трансферного капилляра, °С	320
Напряжение на источнике ионизации, кВ	4
Расход газа распылителя (азот), усл. ед.	60
Расход вспомогательного газа (азот), усл. ед.	10

Оптимизированные условия определения аналитов в режиме мониторинга выбранных реакций сведены в таблицу 25. В качестве газа-мишени использовали аргон с давлением 1,5 мторр.

Таблица 25 – Некоторые характеристики масс-спектрометрического детектирования стероидных гормонов 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
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		
1 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		

Примечание: ¹ – ион, используемый для количественной оценки, ² – внутренний стандарт.

2.2.4.2 Условия жидкость-жидкостной экстракции аналитов

Ди-, три- и тетрахлорметан, этилацетат, гексан и метил-трет-бутиловый эфир использовали для извлечения аналитов из образцов слюны. Оптимальный растворитель находили по результатам проведения следующего эксперимента: в 1

мл модельного образца (дистиллированная вода), содержащего исследуемые соединения с концентрацией 50 нг/мл, добавляли 1 мл экстрагента, перемешивали 30 с на орбитальном перемешивателе, центрифугировали образец 10 мин при 4000 об./мин, отбирали фазу экстрагента при помощи шприца, упаривали ее досуха и перерастворяли ее в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) для инструментального анализа. Этилацетат, хлороформ и метил-трет-бутиловый эфир обеспечивали количественное извлечение всех аналитов (>70%). Для дальнейших исследований выбрали метил-трет-бутиловый эфир, который обладал меньшей токсичностью по сравнению с хлорированными растворителями, невысокой температурой кипения – 55 °С, что обеспечило его быстрое упаривание.

Оптимальный объем выбранного экстрагента, рН и время перемешивания на орбитальном перемешивателе устанавливали многофакторным анализом (план Бокса-Бенкена). Фосфатный буферный раствор (рН 8) готовили в колбе на 100 мл с использованием 0,067 М растворов дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия. Боратный буферный раствор (рН 10) готовили с применением 0,05 М раствора тетрагидробората натрия и 0,1 М раствора гидроксида натрия в колбе на 100 мл. Обработку полученных результатов проводили с использованием ПО STATISTICA 10 (Statsoft). Уровни независимых переменных (факторов) представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Уровни оптимизируемых факторов (план Бокса-Бенкена)

Фактор	Уровень		
	-1	0	+1
Объем экстрагента, мл	500	1000	1500
рН	6	8	10
Время перемешивания, с	15	30	45

Для нахождения оптимальных уровней исследуемых факторов в модельный образец (1 мл, концентрация аналитов 50 нг/мл) добавляли 0,3 мл буферного

раствора (рН 8 и 10) или 0,3 мл дистиллированной воды (рН 6). Затем в образец добавляли метил-трет-бутиловый эфир и перемешивали его на орбитальном перемешивателе 30 с. После этого водный слой вымораживали при $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ и переносили эфир, содержащий аналиты, в пробирку для упаривания на твердотельном нагревателе при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим перерастворением сухого остатка в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) для анализа.

Все полученные модели оказались значимыми, поскольку скорректированные коэффициенты детерминации R^2_{adj} превышали 0,9. Так как свойства определяемых соединений отличаются, то и оптимальные уровни факторов исследуемых аналитов также имели разные значения. Объем метил-трет-бутилового эфира оказывал наибольшее влияние на степени извлечения аналитов: с увеличением объема экстрагента степень извлечения возрастала, для дальнейших исследований был выбран объем 1,5 мл, который, в совокупности с другими факторами, обеспечивал высокие степени извлечения аналитов. Время перемешивания также оказывало влияние на степени извлечения аналитов, при этом значение 30 с было оптимальным для всех аналитов. Увеличение рН среды не приводило к получению более высоких степеней извлечения аналитов, поэтому в последующих исследованиях буферный раствор не добавляли.

Таким образом, оптимизированную пробоподготовку проводили в следующих условиях: к 1 мл образца слюны добавляли внутренний стандарт (метилтестостерон с конечной концентрацией 20 нг/мл). Затем в него вносили 1,5 мл метил-трет-бутилового эфира, перемешивали на орбитальном перемешивателе 30 с, центрифугировали 10 мин при 4000 об./мин, вымораживали водную фазу при $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим переносом органической фазы в другую пробирку и ее упариванием досуха при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ с перерастворением сухого остатка в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему). В этих условиях степени извлечения аналитов составляли 91–98%. Степени извлечения рассчитывали как отношение площади пика соединения в растворе, прошедшем через все стадии пробоподготовки, к площади пика этого соединения в модельном растворе.

2.2.4.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения стероидных гормонов в слюне

Поскольку стероидные гормоны являются эндогенными соединениями, для них отсутствуют матрицы, не содержащие целевых аналитов, поэтому валидация методики проводилась на модельных растворах (дистиллированная вода), а также с использованием метода «введено-найдено» на реальных образцах с учетом рекомендаций Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) по валидации биоаналитических методик.

Для установления пределов обнаружения и определения методики и линейного диапазона использовали модельные растворы, содержащие исследуемые стероидные гормоны на следующих уровнях концентраций – 0,05, 0,10, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50 нг/мл, а также внутренний стандарт с постоянной концентрацией 20 нг/мл.

Предел обнаружения аналита соответствовал концентрации, обнаруживаемой при соотношении сигнал : шум 3, а пределу определения соответствовала концентрация, устанавливаемая с погрешностью 15% (таблица 27).

Таблица 27 – Аналитические характеристики методики УВЭЖХ-МС/МС определения стероидных гормонов в слюне

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
11α-Гидроксипрогестерон	0,05	0,10	0,10–50	0,999

Правильность и воспроизводимость находили анализом растворов контроля качества на трех уровнях концентраций: низком (1,0 нг/мл), среднем (5 нг/мл) и высоком (25 нг/мл) в течение одного и нескольких дней. Воспроизводимость выражали через относительное стандартное отклонение (s_r), а правильность (e_r) устанавливали как разницу между экспериментально полученной и теоретической концентрацией аналита (таблица 28).

Таблица 28 – Результаты оценки правильности и воспроизводимости методики УВЭЖХ-МС/МС определения стероидных гормонов в слюне методом «введено–найдено» ($n = 15$)

Аналит	Концентрация РКК, нг/мл	В один день		В разные дни	
		e_r , %	s_r , %	e_r , %	s_r , %
Тестостерон	1,0	8,5	8,3	11,2	12,5
	5	6,1	4,0	7,8	8,6
	25	5,7	3,7	7,2	9,0
Кортизон	1,0	-10,6	11,8	-12,6	14,1
	5	-5,7	6,7	-7,4	12,3
	25	3,1	6,0	3,9	8,8
Гидрокортизон	1,0	-13,8	11,9	-14,7	12,4
	5	-9,0	7,3	-8,5	9,6
	25	5,5	6,0	4,3	7,5
Кортикостерон	1,0	-13,1	11,4	-12,2	14,8
	5	-3,0	5,9	3,4	8,6
	25	2,4	2,8	2,6	5,0
Прогестерон	1,0	-10,9	11,0	-9,7	11,3
	5	-5,7	8,1	-4,2	10,8
	25	1,1	1,7	3,9	5,4
11 α -Гидроксипрогестерон	1,0	9,5	11,4	10,3	11,8
	5	4,0	7,5	5,2	8,7
	25	1,3	3,9	2,6	4,4

Стабильность реальных образцов слюны, содержащих исследуемые аналиты, оценивали в течение месяца с проведением двух циклов заморозки ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) и разморозки до комнатной температуры. Результаты показали, что аналиты стабильны в течение этого времени, поскольку полученные результаты отличались менее чем на 15% от первоначальных. Стабильность растворов в автоматическом дозаторе оценивали в течение 36 часов при температуре $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Результаты показали, что образцы остаются стабильными в данном временном диапазоне. Возможность перекрестного загрязнения оценивали путем анализа холостого раствора после анализа образца с концентрацией стероидных гормонов 50 нг/мл . Установили, что на хроматограмме холостого образца отсутствуют пики, соответствующие целевым соединениям.

2.2.4.4 Анализ реальных образцов слюны

Образцы смешанной слюны получали естественной секрецией. Перед отбором проб добровольцы (мужчины и женщины в возрасте 20–45 лет) не употребляли еду и воздерживались от курения в течение часа, а за 10 мин ополаскивали рот водой. Анализ образцов проводили сразу после отбора проб. Образцы слюны хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Перед проведением анализа образцы в течение 10 мин центрифугировали при 10000 об./мин . Анализ проводили методом «введено-найдено» добавлением растворов контроля качества низкой ($1,0\text{ нг/мл}$), средней (5 нг/мл) и высокой (25 нг/мл) концентраций. В результате проведенных исследований установили, что матричные компоненты не оказывают существенного влияния на получаемые результаты, поскольку погрешность определения была меньше 15%.

Разработанная и валидированная методика определения стероидных гормонов методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в слюне человека обеспечивает одновременное чувствительное определение стероидных гормонов различных классов, делает слюну перспективной матрицей для диагностических

целей, обладающей большим количеством преимуществ по сравнению с анализом крови [233].

2.3 УВЭЖХ-МС/МС определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека

Использование разбавления образца в качестве пробоподготовки мочи человека, характеризующейся экспрессностью, доступностью не приводит к потерям аналитов, не требует использования большого числа реагентов при УВЭЖХ-МС/МС определении селективных модуляторов андрогенных рецепторов, представленных на рисунке 19 [234, 235]. В то же время ее чувствительность ввиду отсутствия стадии концентрирования аналитов невысокая. С целью повышения чувствительности определения исследуемых соединений применили твердофазную экстракцию с различными патронами с гидрофобным механизмом удерживания ввиду невысокой полярности исследуемых соединений [236].

Прежде всего изучили условия УВЭЖХ-МС/МС детектирования для достижения оптимальной эффективности и селективности разделения аналитов с наибольшей чувствительностью определения. Разделение исследуемых аналитов проводили на аналитической колонке Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм). Для достижения оптимальных параметров хроматографического разделения изменяли состав элюента и программу элюирования, температуру термостатирования колонки и скорость потока подвижной фазы.

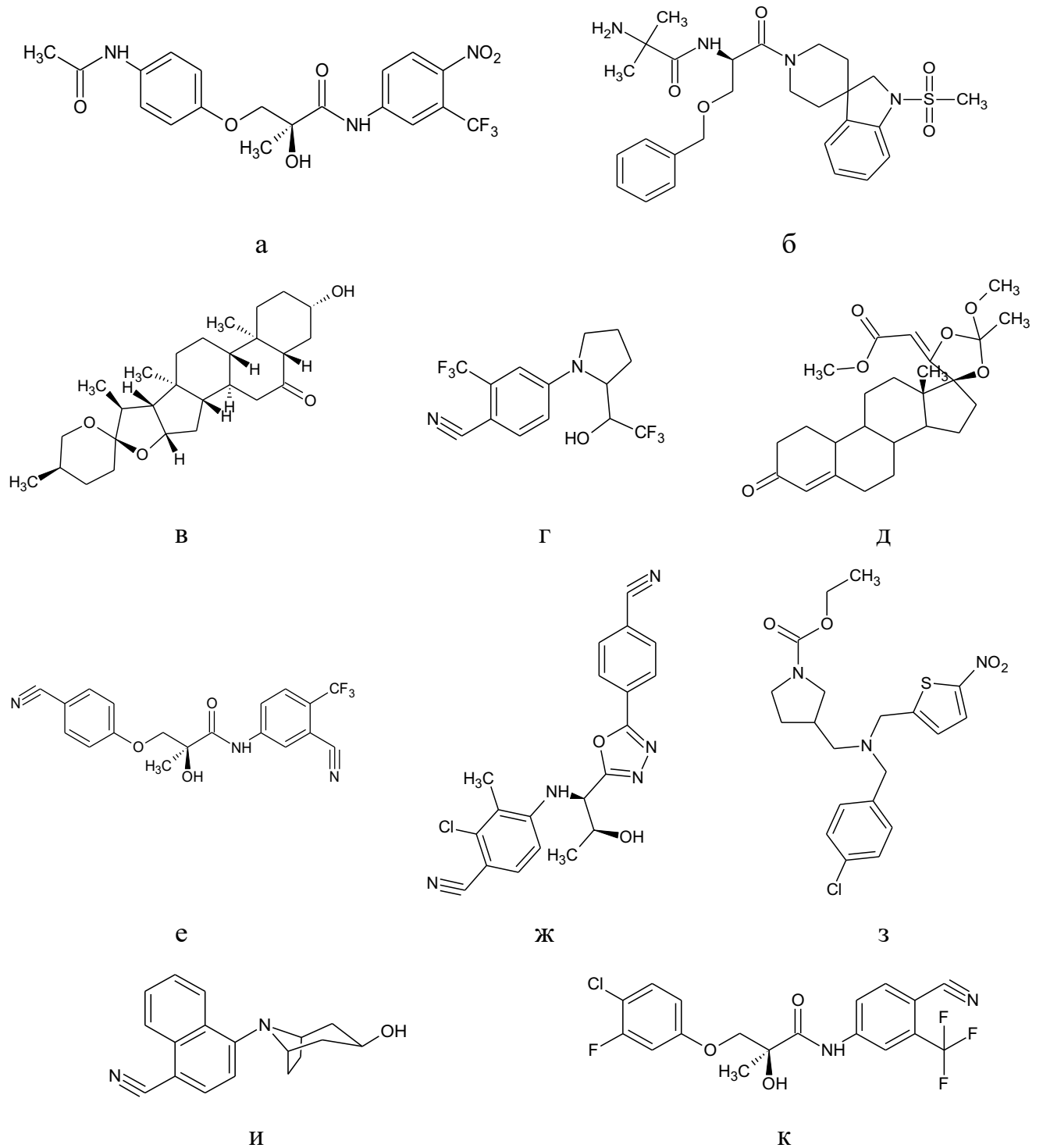


Рисунок 19 – Структурные формулы определяемых САРМ

В качестве подвижной фазы для УВЭЖХ выбрали систему 0,1% муравьиная кислота в метаноле – 0,1% муравьиная кислота в воде, обеспечивающую

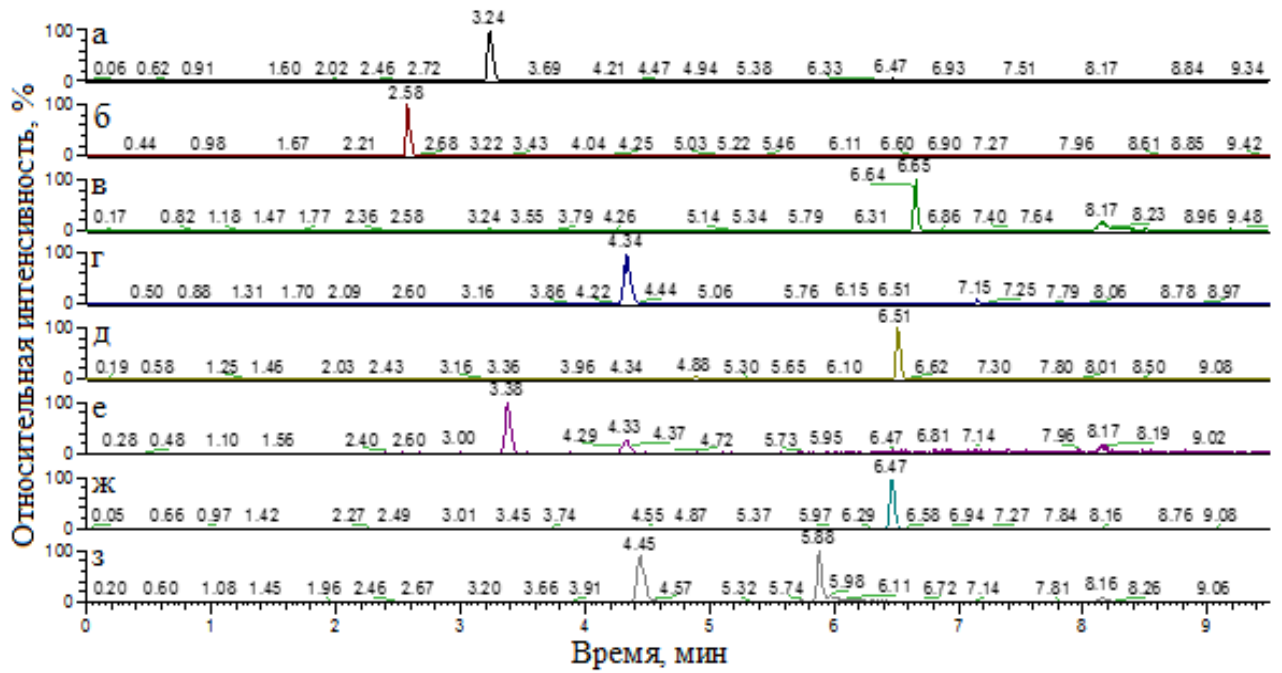
удовлетворительное разделение всех аналитов за достаточно короткое время. Подкисление подвижной фазы было необходимо для увеличения выхода протонированных ионов при использовании источника нагреваемой электрораспылительной ионизации.

Скорость подвижной фазы варьировали от 0,3 до 0,6 мл/мин. Оптимальная скорость потока составила 0,45 мл/мин. Использование более низких скоростей потока проводило к ухудшению эффективности системы, а при более высоких наблюдалось высокое давление на входе в колонку. Оптимальная температура термостата составила 40 °С, при которой обеспечивалась возможность работы при скорости потока подвижной фазы 0,45 мл/мин без превышения допустимого давления насоса.

Условия градиентного элюирования приведены в таблице 29, а полученные в данных условиях хроматограммы представлены на рисунках 20 и 21. До и после ввода пробы игла автосамплера промывалась раствором ацетонитрил–метанол–вода (50 : 30 : 20, по объему).

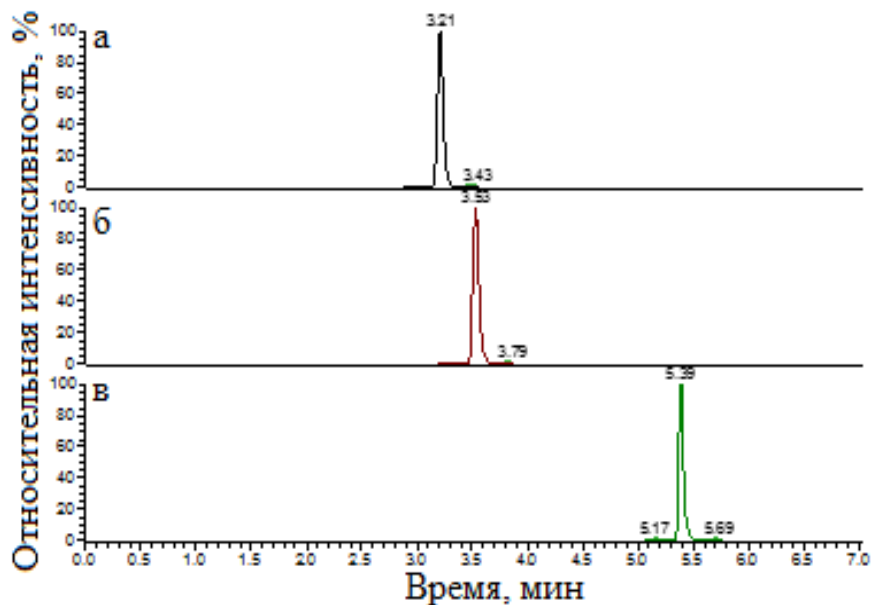
Таблица 29 – Условия градиентного элюирования САРМ при скорости потока 0,45 мл/мин

Время, мин	0,1% муравьиная кислота в метаноле, %	0,1% муравьиная кислота в воде, %
0	5	95
1,0	5	95
1,7	60	40
3,5	60	40
6,5	90	10
9,0	90	10
9,0	5	95
10,5	5	95



а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – миостоп,
е – радарин, ж – реверол, з – сармастол

Рисунок 20 – Хроматограмма по полному ионному току в режиме регистрации
положительных ионов



а – андарин, б – остарин, в – S-23

Рисунок 21 – Хроматограмма по полному ионному току в режиме регистрации
отрицательных ионов

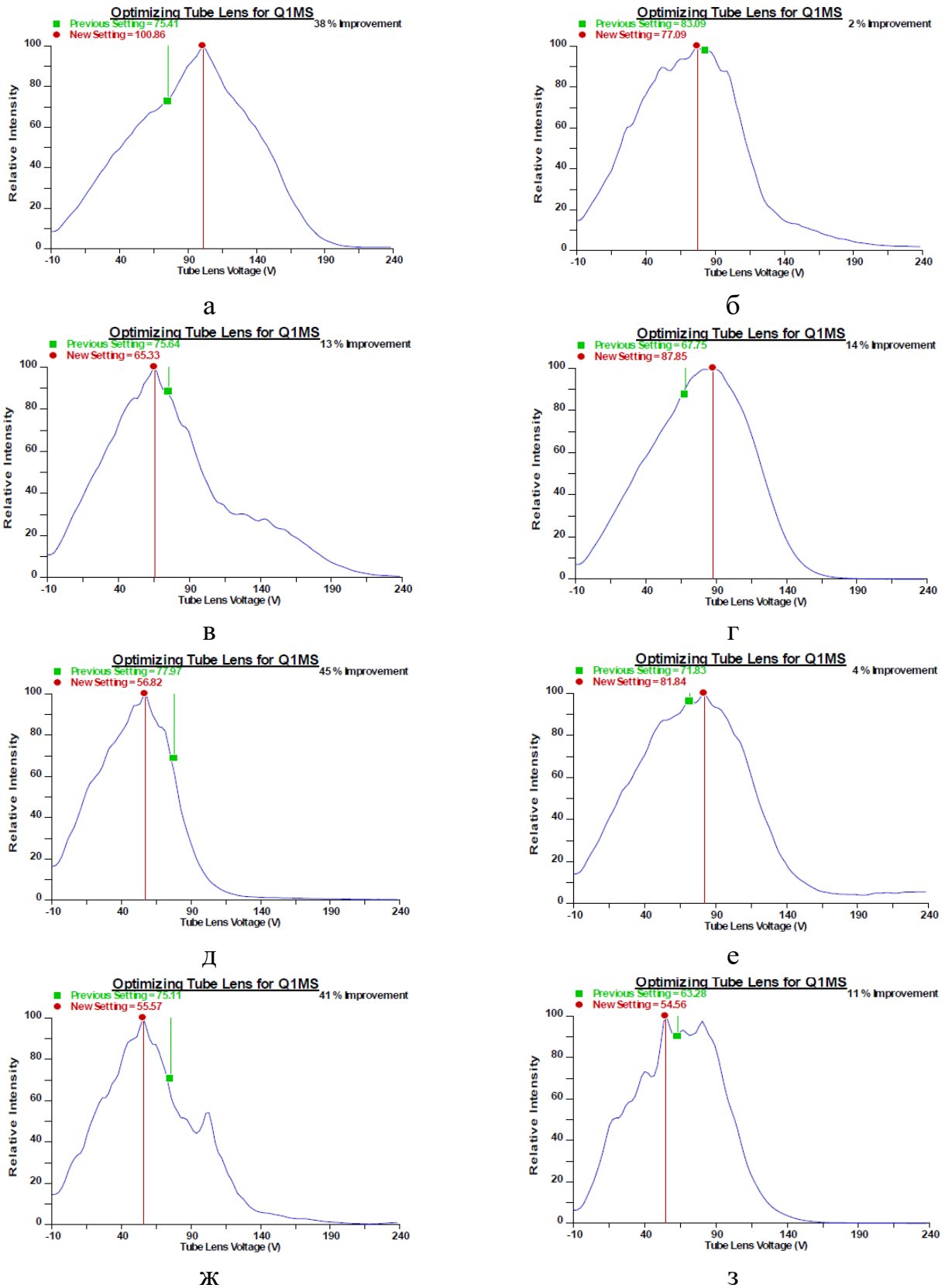
Для производных арил-пропионамида (андарина, остарина и S-23) более предпочтительным является детектирование в виде отрицательно заряженных ионов. Андарин способен образовывать как протонированный, так и депротонированный молекулярный ион, при этом детектирование депротонированного иона приводит к увеличению чувствительности его определения в два раза, в то время как остарин и S-23 вообще не способны образовывать протонированный молекулярный ион в данных условиях. Остальные аналиты не могут быть детектированы в виде отрицательно заряженных ионов.

Исходя из структур определяемых аналитов использовали источник нагреваемой электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов. Параметры источника ионизации представлены в таблице 30. Оптимизацию условий МС/МС детектирования проводили напуском аналитов в источник нагреваемой электрораспылительной ионизации.

Таблица 30 – Условия масс-спектрометрического детектирования САРМ

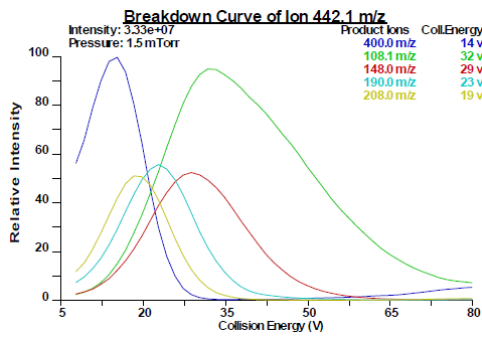
Параметр	Значение	
	Положительные	Отрицательные
Режим регистрации ионов	Положительные	Отрицательные
Температура испарителя, °С	400	
Температура трансферного капилляра, °С	320	
Напряжение на источнике ионизации, В	4000	-3000
Расход газа-распылителя, усл. ед.	60	
Расход вспомогательного газа, усл. ед.	10	
Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона), мторр	1,5	

При оптимизации условий режима регистрации положительных ионов устанавливали следующие параметры: напряжение на экстрагирующей линзе (рисунок 22), энергию перехода ионов-предшественников в ионы-продукты (рисунок 23) и давление газа-мишени (аргон) в ячейке соударений (рисунок 24).

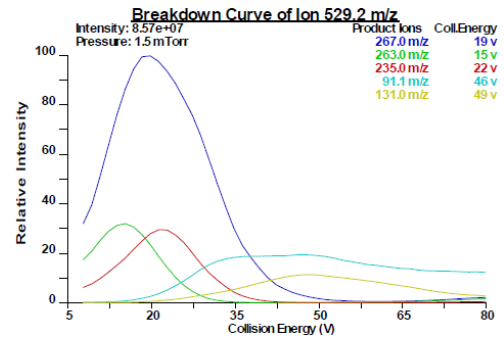


а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – миостоц, е – радарин, ж – реверол, з – сармастол

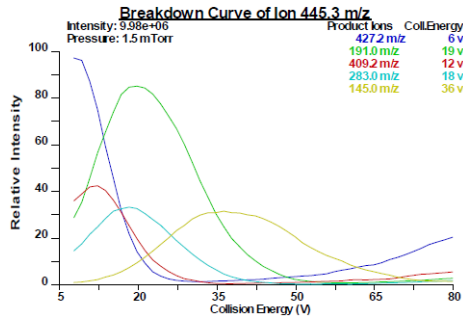
Рисунок 22 – Экспериментальные значения напряжения на экстрагирующей линзе



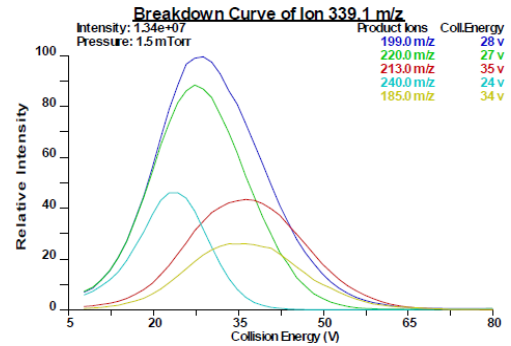
а



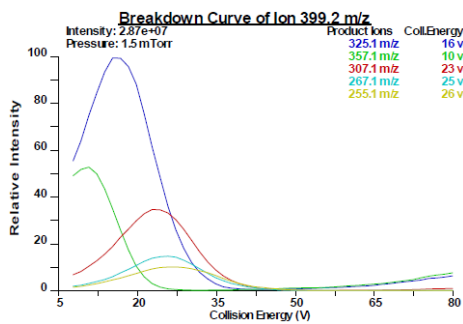
б



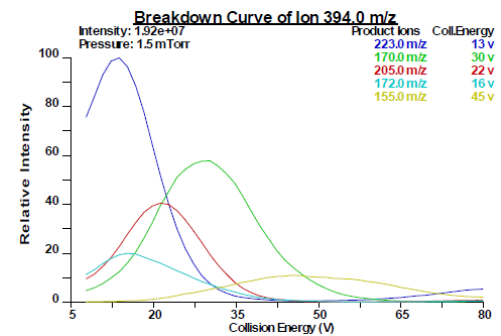
в



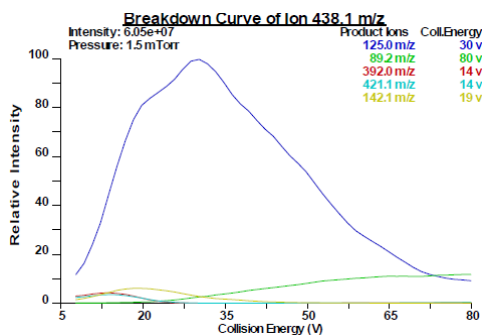
г



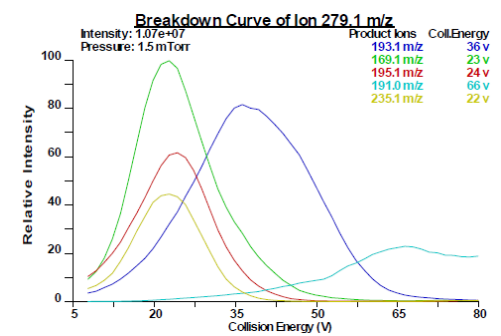
д



е



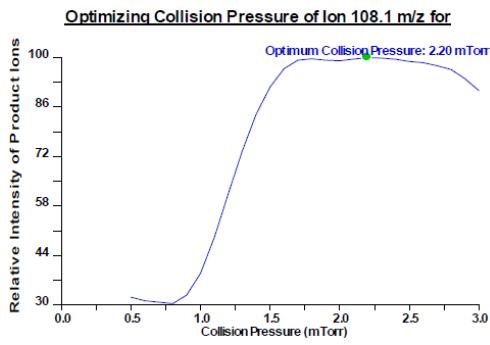
ж



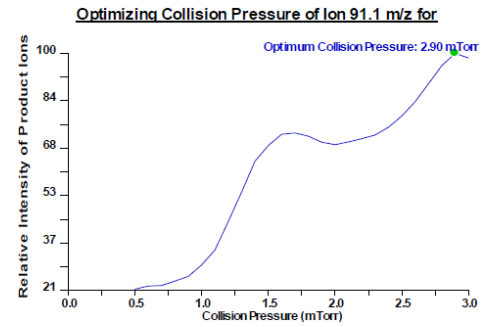
з

а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – миостоп,
е – радарин, ж – реверол, з – сармастол

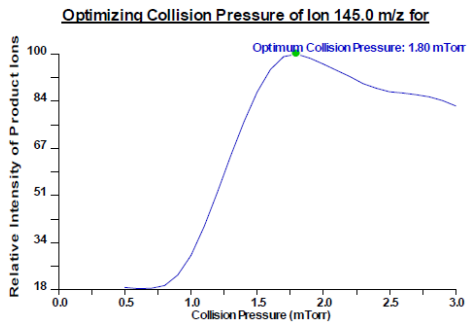
Рисунок 23 – Экспериментальные значения энергии перехода
ионов-предшественников в ионы-продукты



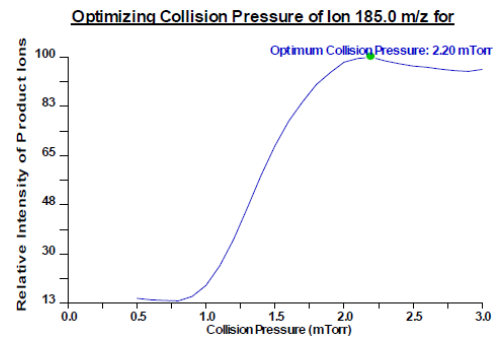
а



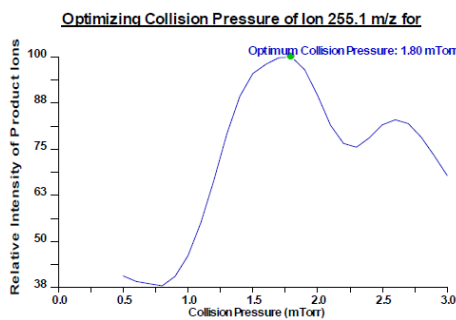
б



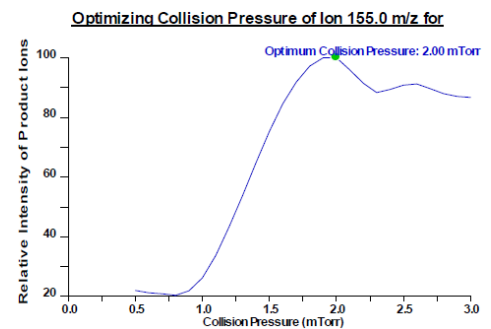
в



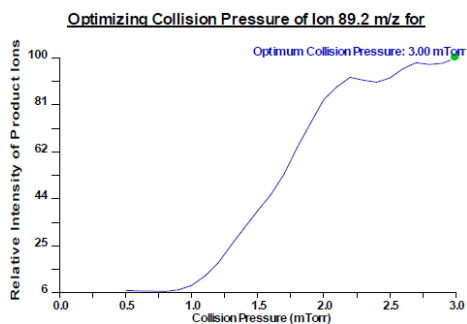
г



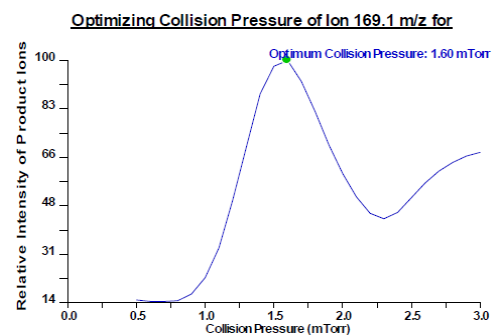
д



е



ж

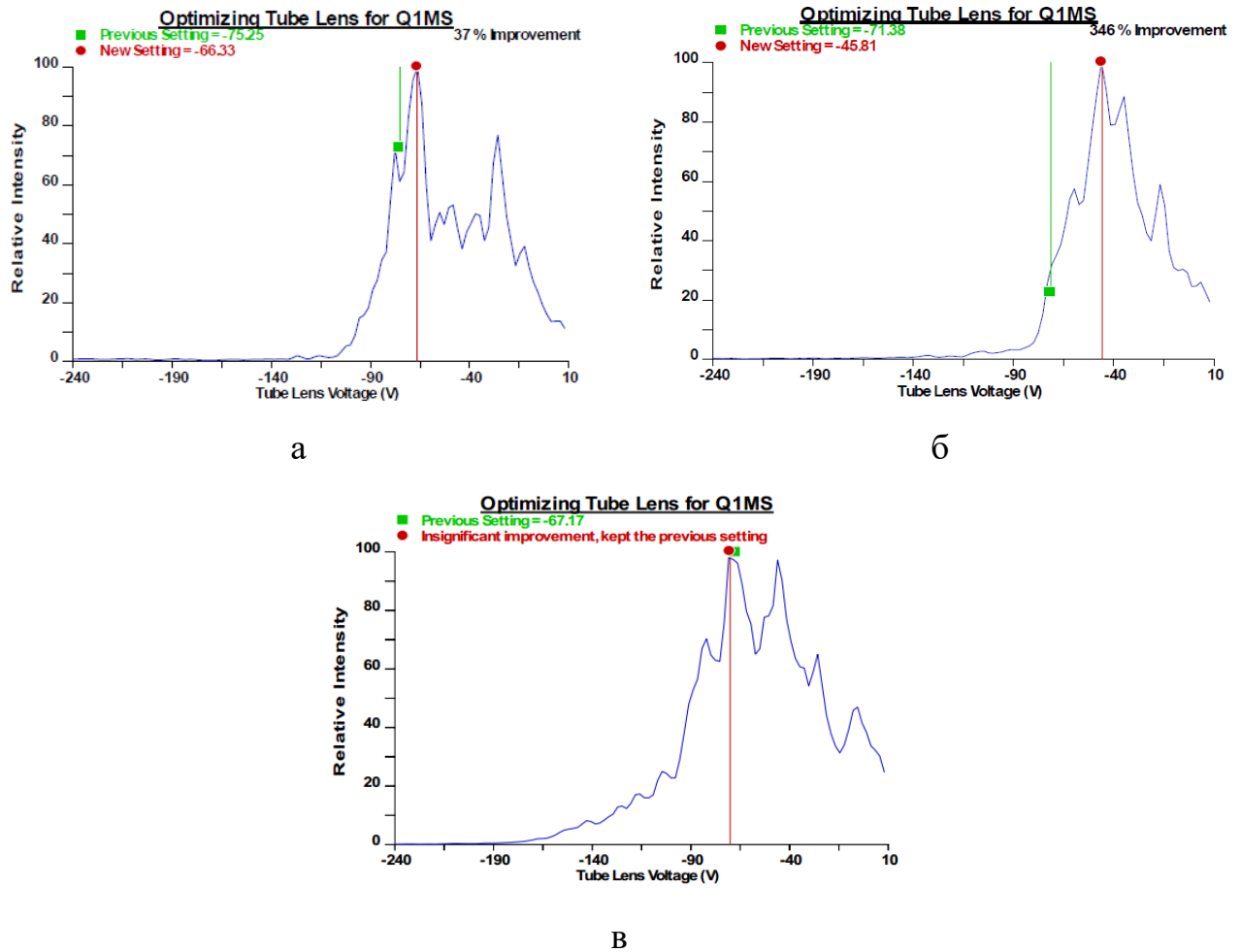


з

а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – миостоп,
е – радарин, ж – реверол, з – сармастол

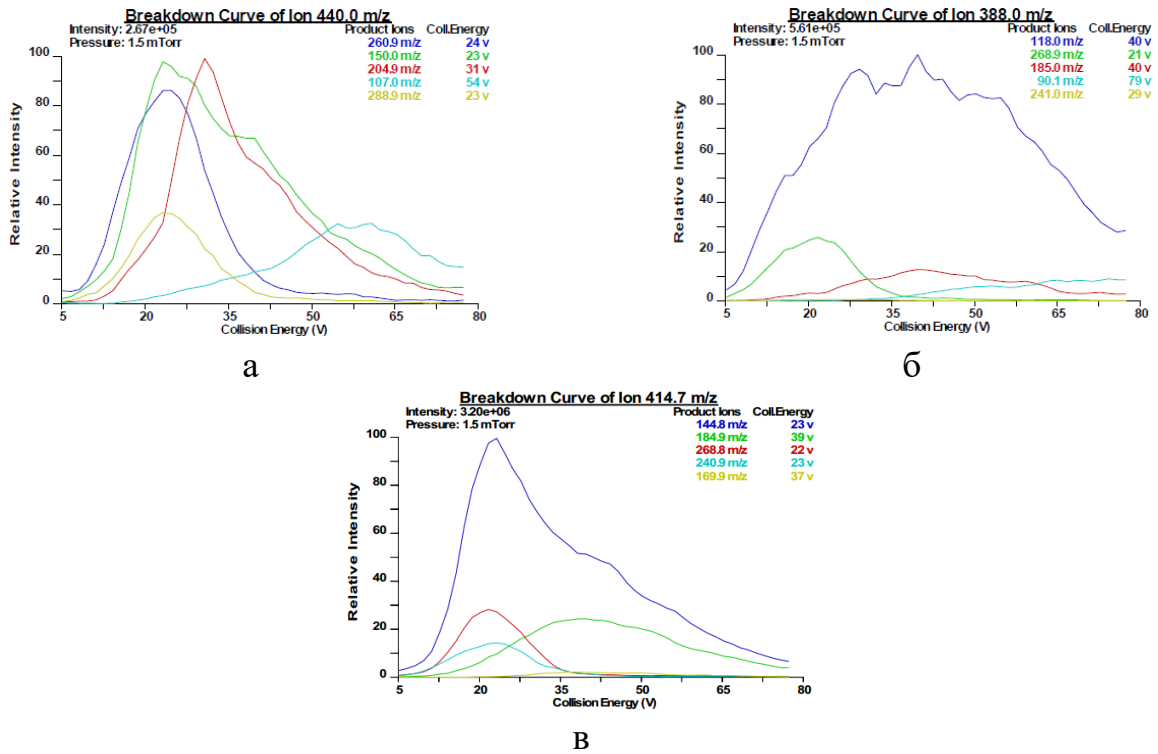
Рисунок 24 – Экспериментальные значения давления газа-мишени в ячейке соударений

При оптимизации условий режима регистрации отрицательных ионов устанавливали значения параметров, аналогичные указанным выше для режима регистрации положительных ионов: напряжение на экстрагирующей линзе (рисунок 25), энергию перехода ионов-предшественников в ионы-продукты (рисунок 26) и давление газа-мишени (аргон) в ячейке соударений (рисунок 27).



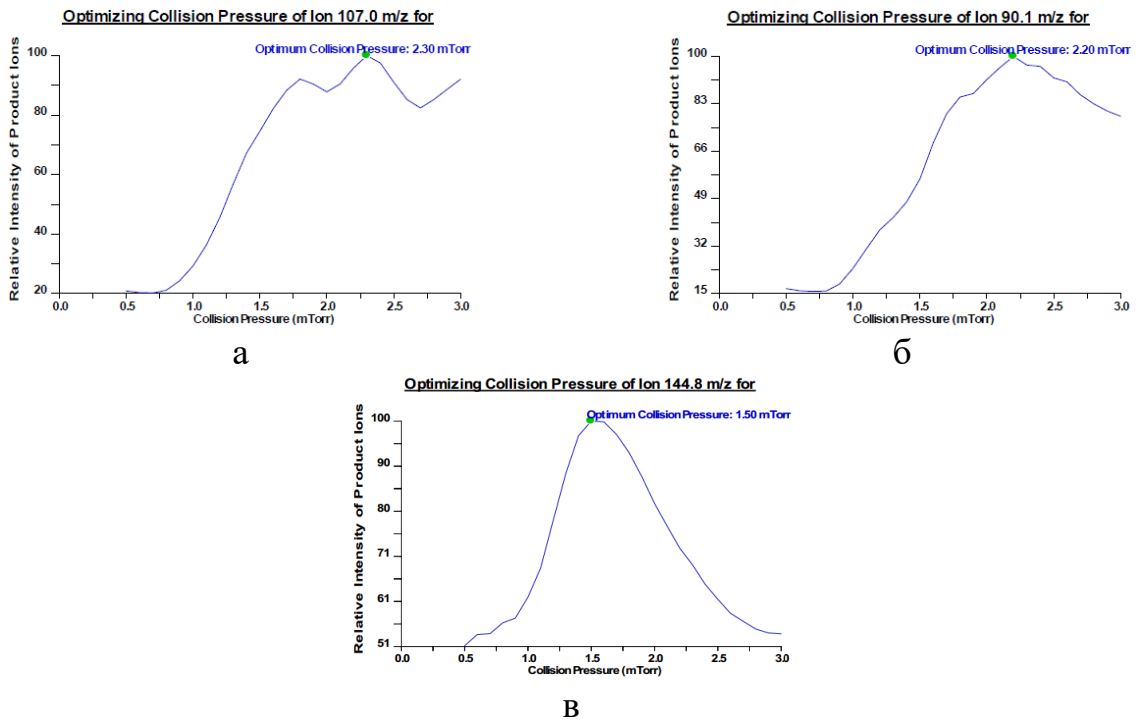
а – андарин, б – остарин, в – S-23

Рисунок 25 – Экспериментальные значения напряжения на экстрагирующей линзе



а – андарин, б – остарин, в – S-23

Рисунок 26 – Экспериментальные значения энергии перехода ионов-предшественников в ионы-продукты



а – андарин, б – остарин, в – S-23

Рисунок 27 – Экспериментальные значения давления газа-мишени (аргон) в ячейке соударений

Увеличение давления газа-мишени в ячейке соударений приводит к возрастанию аналитического сигнала ионов-продуктов, поскольку возрастает вероятность соударительной диссоциации, однако при слишком большом давлении эффективность фрагментации уменьшается вследствие затруднения прохождения ионов через ячейку соударений.

На основании экспериментальных данных по оптимизации хроматографического разделения и некоторых параметров масс-спектрометра составили программу масс-спектрометрического мониторинга нескольких реакций (MRM), параметры которой приведены в таблице 31.

Таблица 31 – Некоторые характеристики УВЭЖХ-МС/МС детектирования аналитов

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	32		
	440,0	150,0	23		-63
		260,9	24		
		204,9	31		
Ибутаморен	529,2	263,0	15	2,55	77
		267,1	19		
		235,0	22		
Лаксогенин	445,3	283,0	18	6,70	65
		191,0	19		
		145,0	36		
Лигандрол	339,1	240,0	24	4,41	88
		220,0	27		
		199,0	28		

Продолжение таблицы 31

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	t_R , мин	Напряжение на экстрагирующей линзе, В
Миостоп	399,2	357,1	10	6,48	57
		325,1	16		
		307,1	23		
Остарин	388,0	268,9	21	3,53	-46
		118,0	40		
		185,0	40		
Радарин	394,0	223,0	13	3,40	82
		170,0	30		
Реверол	438,1	125,0	30	6,51	56
Сармастол	279,1	169,1	23	4,48	55
		195,1	24		
		193,1	36		
S-23	414,7	268,8	22	5,39	-67
		144,8	23		
		184,9	39		
Индапамид	366,0	132,1	16	2,63	75
		91,2	34		
		117,1	36		
Метил-тестостерон ¹	303,3	109,2	29	4,66	55
		97,2	30		
		79,2	32		
Фипронил ¹	434,8	329,9	19	4,85	-45
		250,0	28		
		183,0	40		

Примечание: ¹ – внутренний стандарт.

В описанных условиях на хроматограммах отсутствуют пики с временами удерживания, аналогичные определяемым анализам и мешающие их определению.

2.3.1 УВЭЖХ-МС/МС определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека разбавлением испытуемого образца

2.3.1.1 Условия подготовки проб мочи к анализу

Пробоподготовку мочи к анализу осуществляли по следующей схеме: в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносили 100 мкл образца мочи и 900 мкл смеси ацетонитрил–вода (70 : 30, по объему), содержащей внутренний стандарт индапамид, перемешивали с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об./мин. Надосадочный слой переносили в стеклянные вials для анализа.

В качестве одного из компонентов разбавителя выбрали ацетонитрил, поскольку он приводит к осаждению белков, находящихся в реальных образцах, что, в свою очередь, служит причиной проведения дальнейшего центрифугирования. Присутствие в смеси разбавителя воды необходимо для уменьшения элюирующей силы анализируемого раствора, поскольку хроматографическое разделение проводили в режиме обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, где элюентом первой ступени выступала вода, в сравнении с которой ацетонитрил обладает гораздо более высокой элюирующей силой и его использование в чистом виде привело бы к уменьшению эффективности системы – размыванию пиков.

2.3.1.2 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче разбавлением испытуемого образца

При проведении качественного и количественного анализа проб учитывали критерии ВАДА, согласно которым времена удерживания аналита и стандартного вещества не должны отличаться больше, чем на 0,1 мин или на 1% от времени

удерживания стандартного образца (в зависимости от того, какой из показателей меньше).

Для построения градуировочных зависимостей использовали прием введения аналитов в холостую пробу мочи в следующих концентрациях – 1,0 2,5, 5, 7,5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 и 2500 нг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали индапамид с концентрацией в конечном образце 500 нг/мл. Градуировочные растворы анализировали с целью установления диапазона линейности ($n = 6$), каждый раствор анализировали дважды. Градуировочные кривые строили как зависимость отношения площадей пиков (площадь аналита/площадь внутреннего стандарта) от концентрации аналитов и обрабатывали как линейные зависимости для установления коэффициента детерминации.

Значения пределов обнаружения и определения аналитов устанавливали экспериментально (таблица 32), при этом коэффициент детерминации для всех аналитов, детектируемых в режиме регистрации положительных ионов, составил 0,999, а в режиме регистрации отрицательных ионов 0,995. Полученные в разные дни градуировочные зависимости показали удовлетворительную сходимость. Вывод о наличии вещества в пробе делали при соотношении сигнал/шум 3 : 1, при количественной оценке значение сигнал/шум всегда превышало 10 : 1.

Таблица 32 – Экспериментально установленные значения пределов обнаружения и определения САРМ

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл
Андарин	2,5 ¹	25
	5 ²	
Ибутаморен	10	50
Лаксогенин	25	50
Лигандрол	25	50
Миостоп	7,5	25

Продолжение таблицы 32

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл
Остарин	2,5	25
Радарин	25	50
Реверол	5	25
Сармастол	7,5	25
S-23	2,5	10

Примечания: ¹ – в режиме регистрации отрицательных ионов, ² – в режиме регистрации положительных ионов.

Определение андарина в режиме регистрации отрицательных ионов обеспечивает более низкий предел обнаружения, но по причине меньшей воспроизводимости получаемых результатов и уменьшения линейного диапазона использовали ион $[M+H]^+$.

Для изучения селективности методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче делали добавки всех аналитов на уровне предела обнаружения в холостые пробы мочи, и анализировали их параллельно с холостыми образцами мочи без добавок, что позволило убедиться в отсутствии мешающих влияний на времена удерживания, соответствующих аналитам. В таблице 33 представлены величины матричных эффектов, представляющие собой усредненные значения, полученные в результате серии экспериментов. Вычисление матричных эффектов проводилось сопоставлением относительных аналитических сигналов в матрице и чистых растворах (отношение площади аналита к площади внутреннего стандарта). Из представленных данных видно, что компоненты матрицы мочи оказывают значительное влияние на результаты анализа, а значит пренебрегать ими нельзя.

Таблица 33 – Оценка матричных эффектов

Аналит	Матричные эффекты
Андарин	104,3±2,2 ¹
	107±3 ²
Ибутаморен	112±4
Лаксогенин	107±4
Лигандрол	114±4
Миостоп	105,3±2,1
Остарин	113±4
Радарин	121±5
Реверол	114±3
Сармастол	111±3
S-23	106±3

Примечания: ¹ – в режиме регистрации отрицательных ионов, ² – в режиме регистрации положительных ионов.

При исследовании стабильности условий хранения реальных образцов осуществляли несколько циклов заморозки/разморозки образцов с последующим приготовлением пробы и хранением образца в размороженном состоянии в течение двух часов в каждом цикле. При трехкратном повторении процедуры заморозки/разморозки образцов с последующим приготовлением пробы наблюдали стабильность результатов, дальнейшие испытания не проводили.

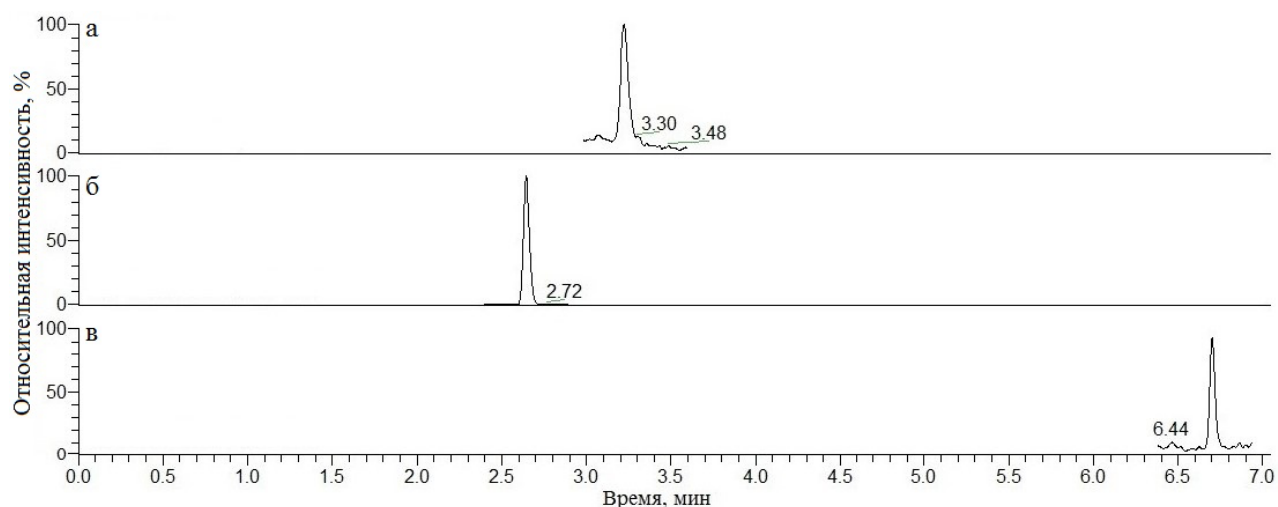
Для определения точности анализа готовили несколько растворов контроля качества с низкой (100 нг/мл), средней (500 нг/мл) и высокой (1000 нг/мл) концентрациями. РКК анализировали в течение одного дня по три раза. Междудневную точность контролировали определением концентраций РКК в разные дни. Концентрации РКК рассчитывали по градуировочным зависимостям, полученным в день анализа РКК. Результат признавали удовлетворительным, если погрешность определения не превышала 15% (таблица 34).

Таблица 34 – Оценка стабильности градуировочных характеристик путем анализа РКК

Вещество	Введено, нг/мл	В один день			В разные дни		
		Найдено, нг/мл	e_r , %	s_r , %	Найдено, нг/мл	e_r , %	s_r , %
Андарин	100	92,1±1,2	-7,8	0,8	94±4	-5,8	2,6
	500	532±12	6,4	1,4	535±16	7,0	1,8
	1000	1038±20	3,8	1,2	104±3	4,2	1,5
Ибутаморен	100	90,8±2,4	-9,2	1,7	93±6	-7,2	4,0
	500	516±20	3,1	2,4	515±20	3,1	2,4
	1000	1012±56	1,2	3,4	1009±54	0,9	3,1
Лаксогенин	100	93±8	-7,2	5,4	9,3±0,8	-7,3	5,2
	500	504±9	0,8	1,1	494±21	-1,3	2,7
	1000	987±49	-1,3	3,1	964±50	-3,6	3,2

2.3.1.3 Апробация методики УВЭЖХ-МС определения САРМ на реальных образцах мочи

Предложенную методику ВЭЖХ-МС определения САРМ апробировали на реальных образцах, содержащих определяемые аналиты, спустя 12 часов после однократного употребления 15 мг вещества. Результаты показали, что андарин, ибутаморен и лаксогенин в пробах определяются предложенной методикой (рисунок 28) [234, 235].



а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин

Рисунок 28 – Хроматограммы реальных образцов

Содержания остальных аналитов – лигандрола, миостопа, остарина, радарина, реверола, сармастола и S-23, в реальных пробах после однократного приема оказались ниже предела их обнаружения. Данный факт свидетельствует о том, что эти соединения практически полностью метаболизируют в организме человека или находятся на уровне очень низких концентраций, а для их определения необходимо либо применение стадии концентрирования (например, твердофазной экстракции), либо разработка методик определения метаболитов.

2.3.2 УВЭЖХ-МС/МС определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека твердофазной экстракцией

2.3.2.1 Условия твердофазной экстракции САРМ

Несмотря на то, что разбавление образца является наиболее простым и удобным способом подготовки проб, не приводящим к потерям аналитов, данный способ обладает невысокой чувствительностью ввиду отсутствия стадии концентрирования. Для повышения чувствительности методики определения САРМ изучили возможность концентрирования применением твердофазной экстракции аналитов.

Перед проведением ТФЭ в пробы мочи вносили внутренние стандарты для получения более воспроизводимых результатов определений. Для всех аналитов нестероидной природы в качестве внутреннего стандарта использовали фипрониол. Для лаксогенина, имеющего стероидную структуру, в качестве внутреннего стандарта применяли метилтестостерон с конечными концентрациями 5 нг/мл. Учитывая структурные формулы целевых аналитов, использовали 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).

Патрон для ТФЭ последовательно кондиционировали и уравнивали метанолом и деионизованной водой, соответственно, учитывая рекомендации

производителя. Объем загрузки образцов мочи оптимизировали добавкой смеси аналитов в холостые образцы мочи с целью определения объема до проскока. Установили, что проскок определяемых веществ не появляется при загрузке образцов мочи вплоть до 3 мл на всех используемых патронах при содержании аналитов в образцах 100 нг/мл. Патрон промывали смесью метанола и воды в различных соотношениях для достижения лучшей очистки проб от компонентов матрицы без потерь целевых аналитов. Для стадии промывки в качестве оптимальной выбрали смесь метанол–вода (5 : 95, по объему), поскольку с увеличением содержания метанола происходила десорбция целевых аналитов. После промывки сушили патрон для ТФЭ в токе азота, элюировали определяемые аналиты метанолом; элюат упаривали в токе азота и перерастворяли сухой остаток в смеси метанол–деионизованная вода (1 : 1, по объему), полученный раствор анализировали. Оптимальный объем элюента (метанола) установили путем проведения процедуры ТФЭ с использованием различных патронов (концентрация аналитов – 10 нг/мл). Для десорбции аналитов использовали 0,5, 1,0 и 1,5 мл метанола.

Результаты, полученные в эксперименте по оптимизации объема элюента, представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Степень извлечения целевых аналитов с патронов для ТФЭ ($n = 6$)

Патрон	Аналит	Степень извлечения, %		
		0,5 мл	1,0 мл	1,5 мл
С8	Андарин	97±6	98±7	98±7
	Ибутаморен	99±10	100±10	100±10
	Лаксогенин	111±12	111±12	111±12
	Лигандрол	106±9	106±9	106±9
	Остарин	107±9	107±10	107±10

Продолжение таблицы 35

Патрон	Аналит	Степень извлечения, %		
		0,5 мл	1,0 мл	1,5 мл
С18	Андарин	94±9	96±9	96±9
	Ибутаморен	109±12	112±14	113±15
	Лаксогенин	112±12	115±16	115±16
	Лигандрол	108±11	108±11	108±11
	Остарин	102±9	105±10	106±10
HLB	Андарин	105±6	106±7	107±7
	Ибутаморен	104±15	114±16	114±16
	Лаксогенин	115±16	115±16	115±16
	Лигандрол	112±14	112±14	112±14
	Остарин	109±11	111±12	111±12

Как видно, для полного извлечения определяемых соединений с патронов для ТФЭ достаточным объемом является 0,5 мл метанола.

2.3.2.2 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче твердофазной экстракцией

Для построения градуировочных зависимостей в холостые образцы мочи вносили стандартные растворы аналитов со следующими конечными концентрациями: 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25 и 50 нг/мл. Для каждого из патронов построили по 3 градуировочные зависимости, все точки градуировочных кривых были получены в результате двух повторных определений. Чтобы оценить влияние матричных компонентов, в аналогичных условиях анализировали градуировочные растворы, полученные путем внесения определяемых аналитов в образец воды вместо мочи.

При анализе градуировочных растворов были найдены величины пределов обнаружения (как соотношение сигнал/шум равное 3 : 1), а по градуировочным зависимостям были оценены пределы определения (минимальная концентрация аналита, определяемая с погрешностью менее 15%), а также значения матричных эффектов. Полученные результаты представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Некоторые аналитические характеристики методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ

Патрон	Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R ²	Матричные эффекты, %
С8	Андарин	0,5	1,0	1,0–50	0,999	89±10
	Ибутаморен	0,5	1,0	1,0–50	0,999	104±6
	Лаксогенин	0,25	1,0	1,0–50	0,996	108±8
	Лигандрол	0,5	2,5	2,5–50	0,999	105±7
	Остарин	0,10	0,5	0,5–25	0,998	92±8
С18	Андарин	0,5	1,0	1,0–50	0,999	90±10
	Ибутаморен	0,5	1,0	1,0–50	0,998	109±8
	Лаксогенин	0,5	1,0	1,0–50	0,997	112±12
	Лигандрол	0,5	2,5	2,5–50	0,999	110±11
	Остарин	0,10	0,5	0,5–25	0,998	94±8
HLB	Андарин	0,5	2,5	2,5–50	0,999	95±6
	Ибутаморен	0,25	0,5	0,5–50	0,999	105±7
	Лаксогенин	0,25	1,0	1,0–50	0,997	113±12
	Лигандрол	0,5	2,5	2,5–50	0,999	101±6
	Остарин	0,10	0,5	0,5–25	0,998	94±7

Из полученных данных можно заключить, что использование патрона Oasis HLB приводит к наиболее приемлемым результатам, хотя использование остальных патронов также приводит к удовлетворительным результатам. Подобные результаты могут быть связаны с близким, гидрофобным, механизмом удерживания аналитов на исследуемых патронах.

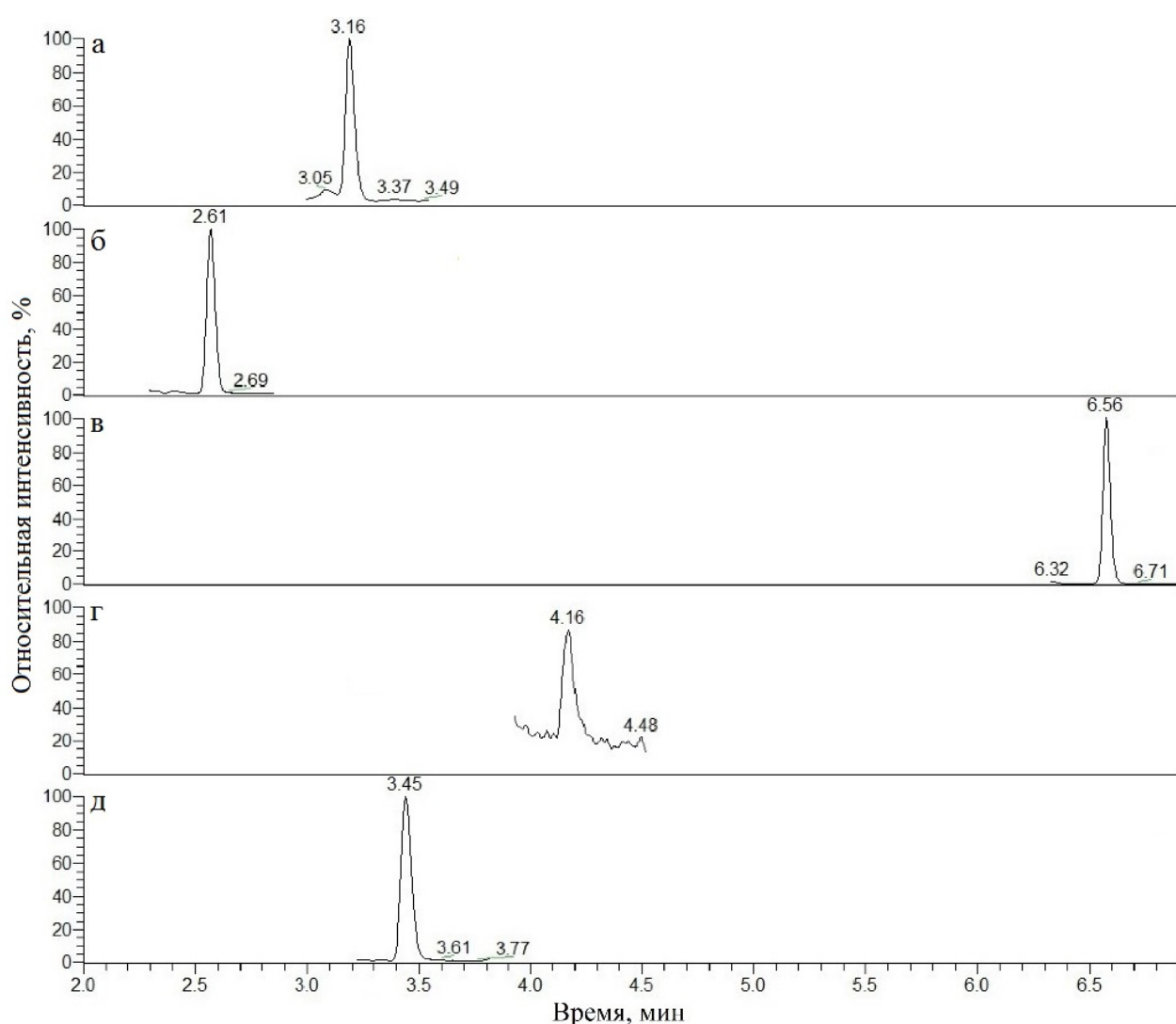
Для оценки правильности и воспроизводимости методики готовили растворы контроля качества, содержащие аналиты с низкой, средней и высокой концентрациями. Измерения проводили в течение одного дня и в различные дни. Результаты, полученные с использованием патрона Oasis HLB, приведены в таблице 37.

Таблица 37 – Оценка стабильности градуировочных характеристик методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ путем анализа РКК с использованием концентрирующего патрона Oasis HLB

Аналит	Введено, нг/мл	В один день			В разные дни		
		Найдено, нг/мл	e_r , %	s_r , %	Найдено, нг/мл	e_r , %	s_r , %
Андарин	5	5,2±0,6	1,6	9,1	5,31±0,22	6,2	14,2
	10	9,9±0,4	-1,4	3,9	10,1±1,3	1,3	12,3
	25	25,3±1,4	1,2	3,3	26±3	3,9	13,5
Ибутаморен	2,5	2,52±0,14	0,8	4,5	2,4±0,3	-5,2	14,0
	10	9,8±0,3	-1,9	3,4	10,3±0,9	-3,1	13,2
	25	25,2±1,3	0,8	3,2	25±3	1,3	14,1
Лаксогенин	2,5	2,5±0,4	1,6	13,7	2,38±0,20	-4,8	9,8
	10	10,2±0,8	2,0	8,3	10,0±0,6	0,4	9,6
	25	23,9±1,2	-4,4	5,2	24,1±1,8	-3,6	8,7
Лигандрол	5	5,1±0,3	2,0	7,3	5,2±0,4	3,2	9,1
	10	9,9±0,3	-1,1	3,2	10,0±0,7	0,4	14,5
	25	25,0±1,2	1,1	2,9	25±3	1,5	14,6
Остарин	1,0	0,89±0,09	-8,9	13,0	1,14±0,09	11,4	14,3
	5	5,21±0,22	5,2	5,1	5,45±0,24	8,9	10,9
	10	10,36±0,12	3,6	1,4	10,7±0,7	7,4	8,1

2.3.2.3 Апробация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ твердофазной экстракцией на реальных образцах мочи

Разработанную методику УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ апробировали на образцах мочи, полученных от добровольцев, которые перорально употребили 15 мг исследуемого аналита. Пробы были получены спустя 12 часов после употребления. Полученные хроматограммы приведены на рисунке 29 [236].



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

Рисунок 29 – Хроматограммы реальных образцов спустя 12 часов после употребления 15 мг действующего вещества

В ходе проведения анализа установили, что содержания андарина, остарина, лигандрола и лаксогенина в моче добровольцев находились в линейном диапазоне градуировочных зависимостей, в то время как для анализа содержащего ибутаморен образца мочи необходимо было разбавление в 20 раз для достижения концентрации, находящейся в линейном диапазоне. Содержание других аналитов – миостопа, радарина, реверола, сармастола и S-23, в реальных пробах после однократного приема оказалось ниже предела их обнаружения, поэтому для детектирования данных соединений необходима разработка методики определения метаболитов.

2.3.3 УВЭЖХ-МС/МС определение САРМ в моче человека дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией

Для преодоления ограничений, имеющих в описанных ранее методиках, а именно, недостаточной чувствительности и высоким матричным эффектам, присущим пробоподготовке с разбавлением образца, а также большим объемам используемых растворителей и высокой стоимости пробоподготовки в случае твердофазной экстракции, изучили возможность применения дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов, относящихся к производным арил-пропионамида, а именно андарина и остарина [237]. Преимуществами данного способа являются простота, небольшой расход растворителей наряду с высокими факторами концентрирования.

2.3.3.1 Условия УВЭЖХ-МС/МС детектирования САРМ

Для детектирования соединений использовали систему, состоящую из ультравысокоэффективного жидкостного хроматографа и тройного квадрупольного масс-спектрометра. Хроматографическое разделение аналитов

проводили на аналитической колонке Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм) в режиме градиентного элюирования с использованием системы 0,1% муравьиная кислота в метаноле – 0,1% муравьиная кислота в воде (таблица 38). Скорость потока подвижной фазы составила 0,45 мл/мин при температуре термостатирования 40 °С; объем анализируемого образца составил 10 мкл.

Таблица 38 – Условия градиентного элюирования аналитов

Время, мин	0,1% муравьиная кислота в воде, %	0,1% муравьиная кислота в метаноле, %
0,0	95	5
1,0	95	5
1,7	40	60
3,0	40	60
4,0	10	90
5,5	10	90
5,5	95	5
7,0	95	5

Применение нагреваемой электрораспылительной ионизации в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов для САРМ, относящихся к производным арил-пропионамида, более предпочтительно, за счет образования высокоинтенсивного $[M-H]^-$ (таблица 39).

Таблица 39 – Условия масс-спектрометрического детектирования САРМ

Параметр	Значение
Режим регистрации ионов	Отрицательный
Температура испарителя, °С	400
Температура трансферного капилляра, °С	320
Напряжение на источнике ионизации, В	–3000
Расход газа-распылителя, усл. ед.	60
Расход вспомогательного газа, усл. ед.	10
Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона), мторр	1,5

Для достижения более высокой чувствительности определения использовали детектирование в режиме мониторинга выбранных реакций, условия детектирования представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Некоторые характеристики масс-спектрометрического 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
S-4	440,0	150,0	23	-63	3,27
		204,9	31		
		260,9 ¹	24		
S-22	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		

Примечание: ¹ – ион, используемый в количественном анализе, ² – внутренний стандарт.

2.3.3.2 Условия дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции САРМ

При оптимизации условий дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции прежде всего установили оптимальные типы экстрагента и диспергента, которые должны удовлетворять ряду требований. Экстрагент должен извлекать определяемые соединения, иметь низкую растворимость в водном образце, а также более высокую плотность, чем вода, поэтому в качестве экстрагентов использовали ди-, три- и тетрахлорметан. Диспергент должен иметь хорошую растворимость в воде и экстрагенте и приводить к образованию эмульсии, обладающей большой поверхностью контакта фаз, что приводит к увеличению скорости экстракции, поэтому в качестве диспергентов использовали ацетон, метанол, этанол и ацетонитрил.

Для нахождения оптимального сочетания экстрагента и диспергента проводили следующий эксперимент: в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вносили 1 мл образца мочи, содержащего исследуемые аналиты с концентрацией 100 нг/мл, при помощи шприца вносили смесь, состоящую из 450 мкл диспергента и 50 мкл экстрагента, после чего перемешивали образец на орбитальном перемешивателе в течение 10 с, поскольку отсутствие перемешивания негативно сказывалось на степенях извлечения; без перемешивания они не превышали 40%. Наилучшие результаты получили для смеси метанол–хлороформ, при этом степени извлечения составляли от 57% до 68%.

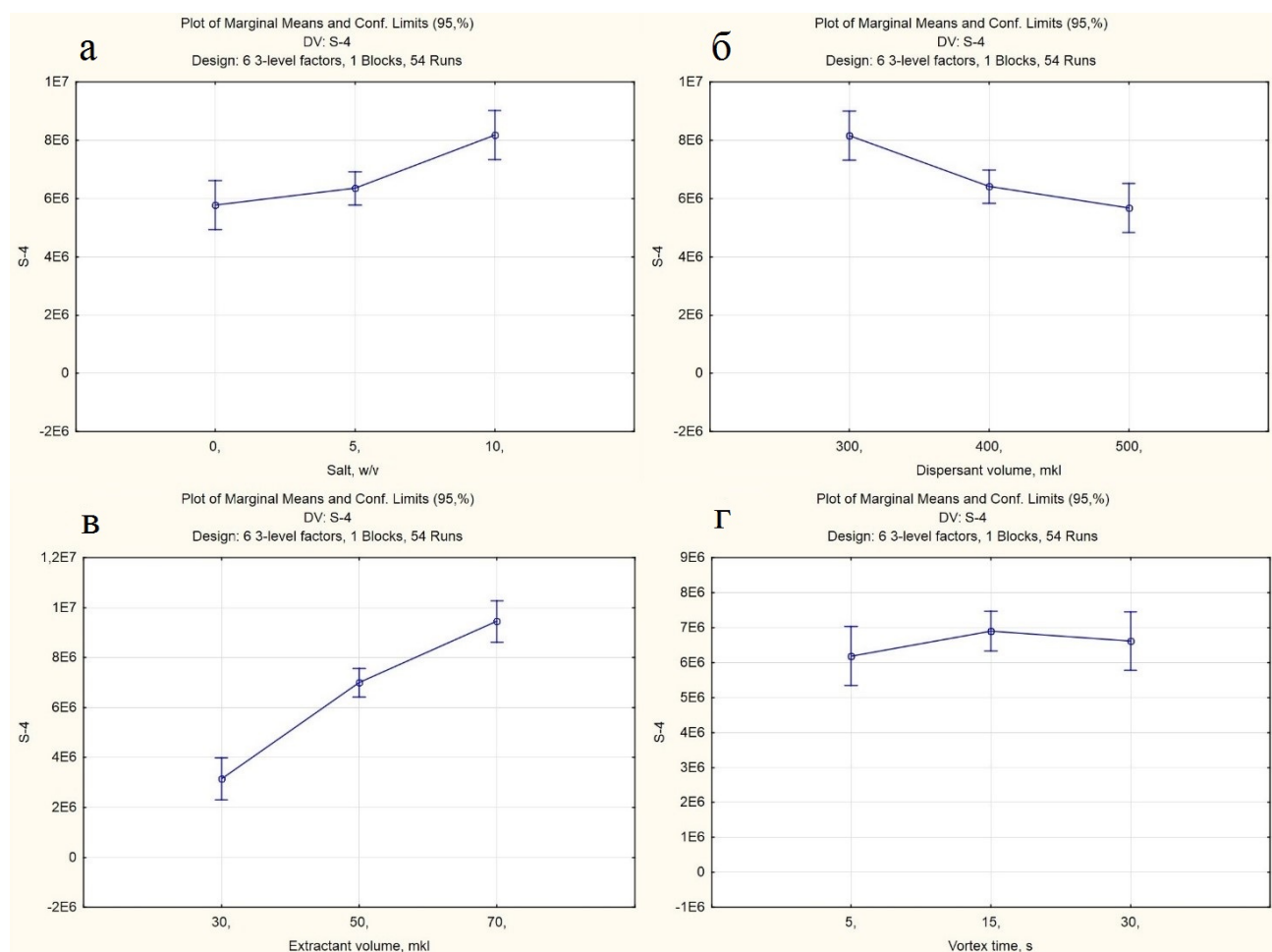
Влияние объемов экстрагента, диспергента, высаливающего эффекта, времени перемешивания на орбитальном перемешивателе, рН и разбавления образца на получаемые результаты изучали с использованием плана Бокса-Бенкена. Для нахождения влияния различных факторов, а также их уровней проводили 54 эксперимента, при этом каждую независимую переменную варьировали на 3 уровнях (таблице 41), что также позволило изучить возможность взаимодействия между этими переменными. В качестве зависимой переменной выступала площадь пика аналита. Значение рН изменяли путем добавления 0,1 М раствора соляной кислоты или гидроксида натрия.

Таблица 41 – Уровни факторов в плане Бокса-Бенкена

Фактор	Уровень		
	-1	0	+1
Объем диспергента, мкл	300	400	500
Объем экстрагента, мкл	30	50	70
Время перемешивания, с	5	15	30
Фактор разбавления	1	2	5
рН	4	6	8
Содержание NaCl, мг	0	50	100

В данном эксперименте влияние рН изучали в диапазоне от 4 до 8 для оценки влияния отклонений рН в реальных образцах, поскольку диапазон значений рН в образцах мочи может изменяться от 4,5 до 7,8. Разбавление образца мочи более чем в 5 раз не рассматривали по причине значительного снижения чувствительности методики. Кроме того, высаливающий эффект изучали в диапазоне от 0–10%, поскольку более высокое содержание хлорида натрия требовало более длительного времени для растворения соли даже при перемешивании.

Полученные модели оказались значимыми, поскольку коэффициенты детерминации, а также скорректированные коэффициенты детерминации R^2_{adj} превышали 0,9. Среди изучаемых независимых переменных с применением плана Бокса-Бенкена объемы экстрагента и диспергента наряду со временем перемешивания оказались статистически значимыми ($p < 0,05$). Высаливающий эффект влиял исключительно на извлечение андарина, при этом наилучшие результаты получены при 10% содержании хлорида натрия (рисунок 30), в то время как на остальные аналиты он не оказывал влияния. В дальнейших экспериментах этот фактор не оптимизировали, поскольку хлорид натрия имеет ограниченную растворимость в моче. Кроме того, содержание соли варьируется в различных образцах мочи и зависит от большого количества факторов, поэтому невозможно получить постоянную концентрацию соли в моче. Влияние остальных факторов на извлечение андарина показано на рисунке 30.



а – содержание NaCl, б – объем диспергента, в – объем экстрагента, г – время орбитального перемешивания

Рисунок 30 – Влияние различных факторов на площадь пика андарина

С учетом полученных с использованием плана Бокса-Бенкена результатов исследований использовали центральный композиционный план для нахождения оптимальных уровней независимых переменных в более узком диапазоне на 5 уровнях (таблица 42).

Таблица 42 – Уровни факторов для центрального композиционного плана

Фактор	Уровень				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Объем экстрагента, мкл	36	50	70	90	104
Объем диспергента, мкл	216	250	300	350	384
Время перемешивания, с	2	7	15	22	28

Полученные модели также были статистически значимыми ($R^2_{adj} > 0,9$).

Как и ожидалось, на степени извлечения аналитов большее влияние оказывал объем экстрагента. Из рисунка 31 видно, что объем 90 мкл является оптимальным для эффективного извлечения аналитов.

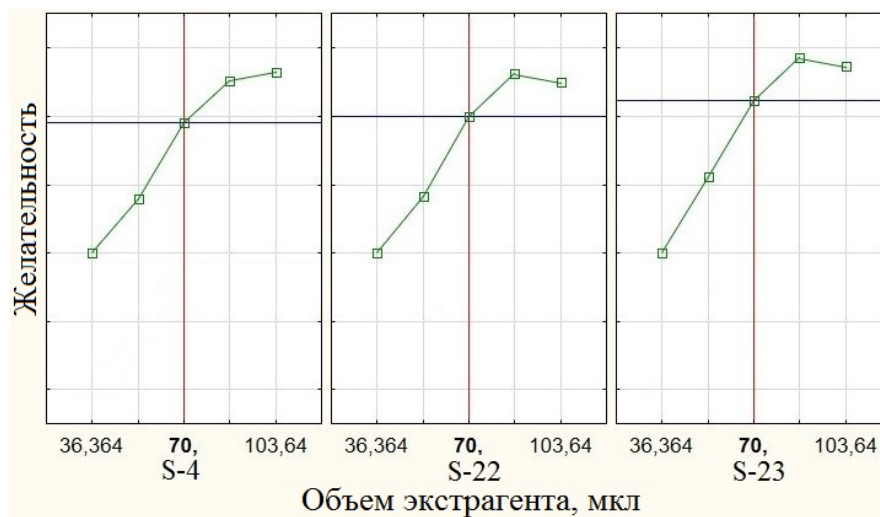


Рисунок 31 – Влияние объема экстрагента на степени извлечения аналитов

Оптимальным объемом диспергента оказались 300 мкл, время орбитального перемешивания 15 с и содержание хлорида натрия 10%.

При анализе методом ВЭЖХ экстрагент должен быть совместим с хроматографической системой, поэтому после переноса экстрагента в виалу, упаривали его в токе азота и перерастворяли в 100 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему), поскольку хлороформ несовместим с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией.

2.3.3.3 Валидация методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ в моче дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракцией

Разработанную методику валидировали в соответствии с рекомендациями Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA).

Для установления пределов обнаружения и определения методики УВЭЖХ-МС/МС определения САРМ, а также диапазона линейности применяли образцы мочи, не содержащие исследуемые соединения, в которые вносили добавки стандартных растворов аналитов с известными концентрациями. Готовили растворы с концентрациями – 0,05, 0,10, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25 и 50 нг/мл, а также внутренний стандарт (S-23) с постоянной концентрацией 10 нг/мл. S-23 выбирали в качестве внутреннего стандарта ввиду близости его физико-химических свойств к исследуемым анализам, но подвергнутому более полному взаимодействию с организмом человека, что исключает возможность его обнаружения в реальных образцах в неизменной форме на данных уровнях концентраций.

Предел обнаружения устанавливали по соотношению сигнал : шум равному 3, предел определения соответствовал наименьшей концентрации аналита, определяемой с погрешностью 15%. Пределы обнаружения и определения для андарина и остарина составили соответственно 0,05 и 0,5 нг/мл. Градуировочные зависимости оказались линейны в диапазоне 0,5–50 нг/мл, коэффициенты детерминации составили 0,998.

Правильность и воспроизводимость находили путем анализа растворов контроля качества на трех уровнях концентраций: низком (1,0 нг/мл), среднем (5 нг/мл) и высоком (25 нг/мл) в течение одного и нескольких дней. Воспроизводимость выражали через относительное стандартное отклонение (s_r), а правильность (e_r) устанавливали по разнице между экспериментально установленной и теоретической концентрациями. Хроматограмма раствора контроля качества низкой концентрации представлена на рисунке 32.

Результат признавали удовлетворительным, если значения правильности и воспроизводимости не превышали 20% для раствора контроля качества, соответствующего нижнему пределу определения, и 15% для остальных РКК. В таблице 43 представлены полученные результаты.

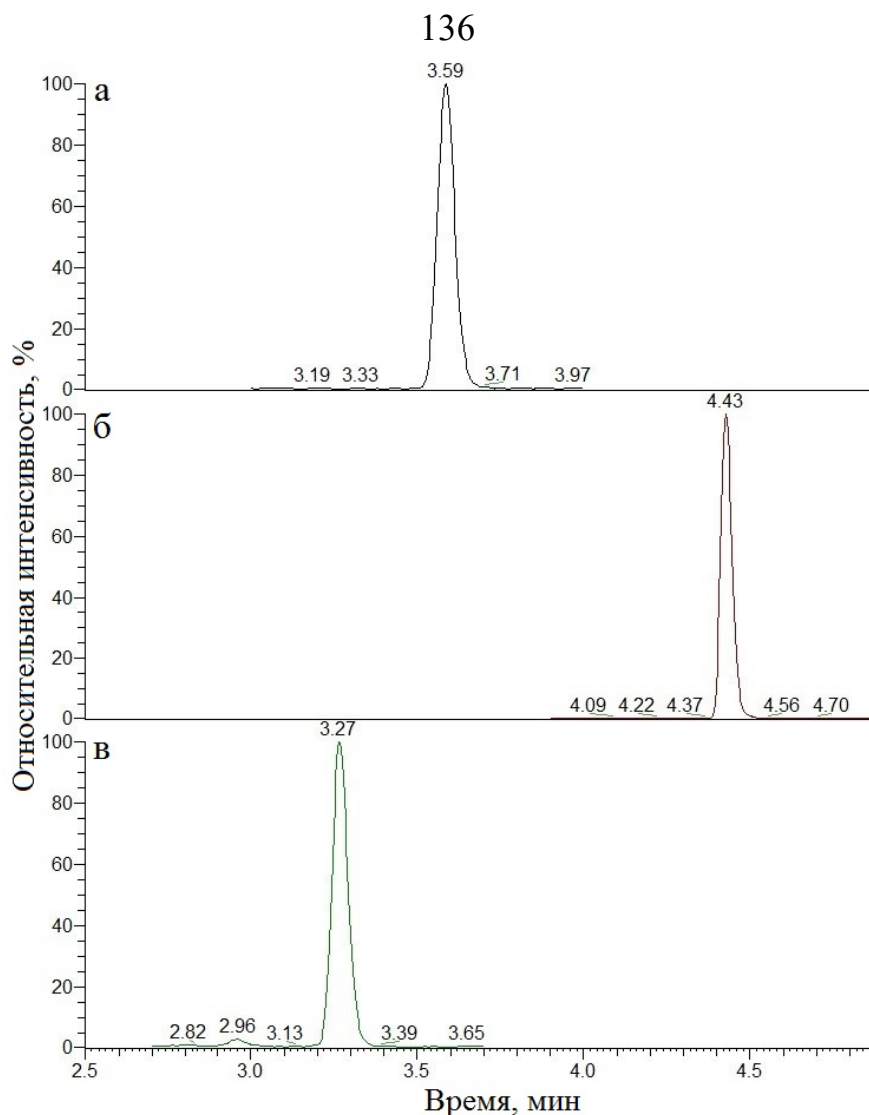
Таблица 43 – Оценка правильности и воспроизводимости методики ($n = 18$)

Аналит	Концентрация РКК, нг/мл	В один день		В разные дни	
		$e_r, \%$	$s_r, \%$	$e_r, \%$	$s_r, \%$
S-4	1,0	-4,9	13,7	-4,6	12,5
	2,5	3,0	8,8	-2,9	11,9
	25	3,8	4,7	1,7	9,4
S-22	1,0	-13,2	12,2	-12,0	13,6
	2,5	3,5	6,8	11,7	13,2
	25	6,5	9,3	8,7	11,6

Степени извлечения аналитов оценивали анализом холостых образцов мочи, содержащих исследуемые соединения с известной концентрацией и прошедших через все этапы пробоподготовки, и модельных растворов соединений, содержащих аналиты с аналогичной концентрацией. Отношение площадей пиков, полученных при анализе реальных образцов и модельных растворов, показало, что степени извлечения находятся в диапазоне 95–99%.

Матричные эффекты оценивали путем сравнения результатов, полученных при анализе образцов мочи и дистиллированной воды, в которые вносили исследуемые соединения с известной концентрацией (РКК с низкой, средней и высокой концентрациями) и проводили дисперсионную жидкость-жидкостную микроэкстракцию. Результаты показали, что матричные компоненты не мешают определению аналитов.

Оценка стабильности растворов, прошедших через все этапы пробоподготовки, в автоматическом дозаторе в течение 36 часов при 20 °С показала, что образцы остаются стабильными в данных условиях, поскольку изменение площадей пиков аналитов не превышало 15% от изначального. Стабильность реальных образцов мочи, содержащих исследуемые аналиты, оценивали в течение 1 месяца путем проведения 3 циклов заморозки (-20 °С) и разморозки. Аналиты были стабильны в данных условиях, поскольку площади пиков изменялись менее, чем на 15%.



а – S-22, б – S-23 (внутренний стандарт), в – S-4

Рисунок 32 –Хроматограмма раствора контроля качества низкой концентрации

Перекрестное загрязнение также является важным фактором, способным приводить к получению ложноположительных результатов, поэтому проводили анализ холостого раствора после анализа раствора контроля качества высокой концентрации. На хроматограмме холостого раствора отсутствовали пики с временами удерживания, соответствующие анализам, что указывает на отсутствие перекрестного загрязнения.

Разработанная методика определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС отвечает критериям зеленой химии благодаря использованию небольших объемов токсичных растворителей [237].

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 гидроксилamina 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 СОКРАЩЕНИЙ

- БСТФА – N,O-бис-триметилсилил-трифторацетамид
- ВАДА – Всемирное антидопинговое агентство
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГХ – газовая хроматография
- ДГТ – дигидротестостерон
- ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
- МС – масс-спектрометрия
- МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения
- МС/МС – тандемная масс-спектрометрия
- МСТФА – N-метил-N-триметилсилил-трифторацет
- МТБСТФА – N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил)-трифторацетамид
- РКК – раствор контроля качества
- САРМ – селективный модулятор андрогенных рецепторов
- СЭРМ – селективный модулятор эстрогенных рецепторов
- Т – тестостерон
- ТФАД – твердофазная аналитическая дериватизация
- ТФЭ – твердофазная экстракция
- УВЭЖХ – ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография
- ФИАД – фотоионизация при атмосферном давлении
- ХИ – химическая ионизация
- ЭИ – электронная ионизация
- ЭРИ – электрораспылительная ионизация
- СYP450 – цитохромы P450
- FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- HSD – гидроксистероиддегидрогеназа
- MRM – мониторинг нескольких реакций

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis / S.A. Wudy, G. Schuler, A. Sánchez-Guijo [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 179. – P. 88–103.
- 2 Schänzer, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids / W. Schänzer // *Clin. Chem.* – 1996. – Vol. 42. – № 7. – P. 1001–1020.
- 3 Marcos, J. Derivatization of steroids in biological samples for GC–MS and LC–MS analyses / J. Marcos, O.J. Pozo // *Bioanalysis.* – 2015. – Vol. 7. – № 19. – P. 2515–2136.
- 4 Evaluation of steroidomics by liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry as a powerful analytical strategy for measuring human steroid perturbations / F. Jeanneret, D. Tonoli, M.F. Rossier [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – Vol. 1430. – P. – 97–112.
- 5 Conjugated steroids: analytical approaches and applications / R.L. Gomes, W. Meredith, C.E. Snape [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – Vol. 393. – № 2. – P. 453–458.
- 6 From a single steroid to the steroidome: Trends and analytical challenges // E. Olesti, J. Boccard, G. Visconti [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 206. – art. 105797.
- 7 Turpeinen, U. Determination of cortisol in serum, saliva and urine / U. Turpeinen, E. Hämäläinen // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 27. – № 6. – P. 795–801.
- 8 Conklin, S.E. Advancements in the gold standard: Measuring steroid sex hormones by mass spectrometry / S.E. Conklin, C.E. Knezevic // *Clin. Biochem.* – 2020. – Vol. 82. – P. 21–32.
- 9 Caron, P. A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal

precursors, androgens and estrogens, using low serum volume / P. Caron, V. Turcotte, C. Guillemette // *Steroids*. – 2015. – Vol. 104. – P. 16–24.

10 High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry / J.L. Quanson, M.A. Stander, E. Pretorius [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2016. – Vol. 1031. – P. 131–138.

11 Mellon, S.H. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance / S.H. Mellon, L.D. Griffin // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 13. – № 1. – P. 35–43.

12 Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens / J.M. Faupel-Badger, B.J. Fuhrman, X. Xu [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2010. – Vol. 19. – № 1. – P. 292–300.

13 Diurnal variation of testosterone and estradiol: a source of bias in comparative studies on breast cancer / S. Panico, P. Pisani, P. Muti [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 1990. – Vol. 13. – № 5. – P. 423–426.

14 Khedr, A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of ten estrogen metabolites at sub-picogram levels in breast cancer women / A. Khedr, A.M. Alahdal // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2016. – Vol. 1031. – P. 181–188.

15 Giese, R.W. Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances / R.W. Giese // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – Vol. 1000. – № 1–2. – P. 401–412.

16 Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children / J. Taieb, B. Mathian, F. Millot [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – № 8. – P. 1381–1395.

17 A novel GC-MS method in urinary estrogen analysis from postmenopausal women with osteoporosis / J.-Y. Moon, K.J. Kim, M.H. Moon [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2011. – Vol. 52. – № 8. – P. 1595–1603.

18 Choi, M.H. Bringing GC-MS profiling of steroids into clinical applications / M.H. Choi, B.C. Chung // *Mass Spectrom. Rev.* – 2015. – Vol. 34. – № 2. – P. 219–236.

19 Current strategies for quantification of estrogens in clinical research / N. Denver, S. Khan, N.Z.M. Homer [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 192. – art. 105373.

20 Derivatization enhances analysis of estrogens and their bioactive metabolites in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry / N. Denver, S. Khan, I. Stasinopoulos [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – Vol. 1054. – P. 84–94.

21 Serum testosterone levels decrease in middle age in women with the polycystic ovary syndrome / S.J. Winters, E. Talbott, D.S. Guzick [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73. – № 4. – P. 724–729.

22 Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome and control women using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / C.C. Keefe, M.M. Goldman, K. Zhang // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 4. – art. e93805.

23 Keevil, B. Steroid mass spectrometry for the diagnosis of PCOS / B. Keevil // *Med Sci (Basel).* – 2019. – Vol. 7. – № 7. – art. 78.

24 Michaud, J.E. Testosterone and prostate cancer: an evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk / J.E. Michaud, K.L. Billups, A.W. Partin // *Ther. Adv. Urol.* – 2015. – Vol. 7. – № 6. – P. 378–387.

25 Testosterone treatment and the risk of aggressive prostate cancer in men with low testosterone levels / T.J. Walsh, M.M. Shores, C.A. Krakauer [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13. – № 6. – art. e0199194.

26 Casals, G. Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry? / G. Casals, F.A. Hanzu // *Ann. Lab. Med.* – 2020. – Vol. 40. – № 4. – P. 285–296.

27 Measurement of urinary free cortisol by tandem mass spectrometry and comparison with results obtained by gas chromatography-mass spectrometry and two

commercial immunoassays / L. Wood, D.H. Ducroq, H.L. Fraser [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* – 2008. – Vol. 45. – P. 380–388.

28 Cortisol and cortisone ratio in urine: LC-MS/MS method validation and preliminary clinical application / G. Antonelli, C. Artusi, M. Marinova [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2014. – Vol. 52. – № 2. – P. 213–220.

29 Determination of testosterone and epitestosterone glucuronides in urine by ultra performance liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry / G. Kaur-Atwal, J.C. Reynolds, C. Mussell [et al.] // *Analyst.* – 2011. – Vol. 136. – P. 3911–3916.

30 Borts, D.J. Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry / D.J. Borts, L.D. Bowers // *J. Mass Spectrom.* – 2000. – Vol. 35. – № 1. – P. 50–61.

31 Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review / F. Gosetti, E. Mazzucco, M.C. Gennaro [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2013. – Vol. 927. – P. 22–36.

32 Direct quantification of steroid glucuronides in human urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / O.J. Pozo, P. Van Eenoo, W. Van Thuyne [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – Vol. 1183. – № 1–2. – P. 108–118.

33 Gas chromatography/mass spectrometry based hair steroid profiling may reveal pathogenesis in hair follicles of the scalp / H.-J. Jung, S.J. Kim, W.-Y. Lee [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2011. – Vol. 25. – № 9. – P. 1184–1192.

34 The evolution of methods for urinary steroid metabolomics in clinical investigations particularly in childhood / J.W. Honour, E. Conway, R. Hodgkinson [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 181. – P. 28–51.

35 Preclinical challenges in steroid analysis of human samples / U. Ceglarek, M. Werner, L. Kortz [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 121. – № 3–5. – P. 505–512.

36 Analysis of steroids in urine by gas chromatography-capillary photoionization-tandem mass spectrometry / P. Pöhö, K. Scholz, N. Kärkkäinen [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2019. – Vol. 1598. – P. 175–182.

37 Zhou, Y. Determination of hormones in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry / Y. Zhou, Z. Cai // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2020. – Vol. 34. – № S1. – art. e8583.

38 Urine stability and steroid profile: towards a screening index of urine sample degradation for anti-doping purpose / M. Mazzarino, M.G. Abate, R. Alocci [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 683. – № 2. – P. 221–226.

39 Stabilization of human urine doping control samples: a current opinion / M. Tsivou, D.G. Georgakopoulos, H.A. Dimopoulou [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401. – № 2. – P. 553–561.

40 Stabilization of human urine doping control samples: II. microbial degradation of steroids / M. Tsivou, D. Livadara, D.G. Georgakopoulos [et al.] // *Anal. Biochem.* 2009. – Vol. 388. – № 1. – P. 146–154.

41 Determination of salivary testosterone and androstendione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / U. Turpeinen, E. Hämäläinen, M. Haanpää [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2012. – Vol. 413. – № 5–6. – P. 594–599.

42 Wood, P. Salivary steroid assays - research or routine? / P. Wood // *Ann. Clin. Biochem.* – 2009. – Vol. 46. – № Pt 3. – P. 183–196.

43 Higashi, T. Salivary hormone measurement using LC/MS/MS: specific and patient-friendly tool for assessment of endocrine function / T. Higashi // *Biol. Pharm. Bull.* – 2012. – Vol. 35. – № 9. – P. 1401–1408.

44 Salivary testosterone: a reliable approach to the diagnosis of male hypogonadism / A.L. Arregger, L.N. Contreras, O.R. Tumilasci [et al.] // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2007. – Vol. 67. – № 5. – P. 656–662.

45 Vining, R.F. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation / R.F. Vining, R.A. McGinley, R.G. Symons // *Clin. Chem.* – 1983. – Vol. 29. – № 10. – P. 1752–1756.

46 Lewis, J.G. Steroid analysis in saliva: an overview / J.G. Lewis // *Clin. Biochem. Rev.* – 2006. – Vol. 27. – № 3. – P. 139–146.

47 A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for salivary testosterone with adult male reference interval determination / P.R. Macdonald, L.J. Owen, F.C. Wu [et al.] // *Clin. Chem.* – 2011. – Vol. 57. – № 5. – P. 774–775.

48 Hofman, L.F. Human saliva as a diagnostic specimen / L.F. Hofman // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131. – № 5. – P. 1621S–1625S.

49 Gröschl, M. Current status of salivary hormone analysis / M. Gröschl // *Clin. Chem.* – 2008. – Vol. 54. – № 11. – P. 1759–1769.

50 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for simultaneous measurement of salivary testosterone and cortisol in healthy men for utilization in the diagnosis of late-onset hypogonadism in males / F. Matsui, E. Koh, K. Yamamoto [et al.] // *Endocr. J.* – 2009. – Vol. 56. – № 9. – P. 1083–1093.

51 Gao, W. Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay / W. Gao, T. Stalder, C. Kirschbaum // *Talanta.* – 2015. – Vol. 143. – P. 353–358.

52 Salivary estradiol and progesterone levels in conception and nonconception cycles in women: evaluation of a new assay for salivary estradiol / Y.-c. Lu, G.R. Bentley, P.H. Gann [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1999. – Vol. 71. – № 5. – P. 863–868.

53 Ellison, P.T. Human salivary steroids: Methodological considerations and applications in physical anthropology / P.T. Ellison // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 1988. – Vol. 31. – № S9. – P. 115–142.

54 Testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone levels in human unstimulated, stimulated and parotid saliva / R.M. Büttler, E. Bagci, H.S. Brand [et al.] // *Steroids.* – 2018. – Vol. 138. – P. 26–34.

55 Suhr, A.C. Isotope inversion experiment evaluating the suitability of calibration in surrogate matrix for quantification via LC-MS/MS—Exemplary

application for a steroid multi-method / A.C. Suhr, M. Vogeser, S.H. Grimm // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – Vol. 124. – P. 309–318.

56 Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) / N. Krone, B.A. Hughes, G.G. Lavery [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 121. – № 3–5. – P. 496–504.

57 Advances in the analytical methodologies: Profiling steroids in familiar pathways-challenging dogmas / L.M. Bloem, K.-H. Storbeck, P. Swart [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 153. – P. 80–92.

58 Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits / F.Z. Stanczyk, M.M. Cho, D.B. Endres [et al.] // *Steroids.* – 2003. – Vol. 68. – № 14. – P. 1173–1178.

59 Stanczyk, F.Z. Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies / F.Z. Stanczyk, J. Jurow, A.W. Hsing // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2010. – Vol. 19. – № 4. – P. 903–906.

60 Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry / A.W. Hsing, F.Z. Stanczyk, A. Bélanger [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2007. – Vol. 16. – № 5. – P. 1004–1008.

61 Analytical strategies based on mass spectrometric techniques for the study of steroid metabolism / C. Gomez, A. Fabregat, Ó.J. Pozo [et al.] // *Trends Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 53. – P. 106–116.

62 Wozniak, B. LC-MS/MS fast analysis of androgenic steroids in urine / B. Wozniak, I. Matraszek-Zuchowska, J. Zmudzki // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 403. – № 10. – P. 2965–2972.

63 Analysis of conjugated steroid androgens: deconjugation, derivatisation and associated issues / R.L. Gomes, W. Meredith, C.E. Snape [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2009. – Vol. 49. – № 5. – P. 1133–1140.

64 McDonald, J.G. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases / J.G. McDonald, S. Matthew, R.J. Auchus // *Horm. Cancer.* – 2011. – Vol. 2. – № 6. – P. 324–332.

65 Ion mobility-mass spectrometry separation of steroid structural isomers and epimers / C.D. Chouinard, C.R. Beekman, R.H.J. Kemperman [et al.] // *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* – 2017. – Vol. 20. – P. 31–39.

66 Sensitivity of GC-EI/MS, GC-EI/MS/MS, LC-ESI/MS/MS, LC-Ag(+) CIS/MS/MS, and GC-ESI/MS/MS for analysis of anabolic steroids in doping control / E. Cha, S. Kim, H.J. Kim [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7. – № 11–12. – P. 1040–1049.

67 Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women / J.S. Lee, B. Ettinger, F.Z. Stanczyk [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91. – № 10. – P. 3791–3797.

68 Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy / R.J. Santen, L. Demers, S. Ohorodnik [et al.] // *Steroids.* – 2007. – Vol. 72. – № 8. – P. 666–671.

69 Performance characteristics of eight estradiol immunoassays / D.T. Yang, W.E. Owen, C.S. Ramsay [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2004. – Vol. 122. – № 3. – P. 332–337.

70 McCann, S.J. Measurement of urinary free cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with the urine adapted ACS:180 serum cortisol chemiluminescent immunoassay and development of a new reference range / S.J. McCann, S. Gillingwater, B.G. Keevil // *Ann. Clin. Biochem.* – 2005. – Vol. 42. – № Pt 2. – P. 112–118.

71 Accuracy of immunoassay and mass spectrometry urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome / G. Aranda, M. Careaga, F.A. Hanzu [et al.] // *Pituitary.* – 2016. – Vol. 19. – № 5. – P. 496–502.

72 Taylor, A.E. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow / A.E. Taylor, B. Keevil, I.T. Huhtaniemi // *Eur. J. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 173. – № 2. – P. D1–12.

73 Segura, J. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents / J. Segura, R. Ventura, C. Jurado // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1998. – Vol. 713. – № 1. – P. 61–90.

74 Ding, W.-H. Derivatization procedures for the detection of estrogenic chemicals by gas chromatography/mass spectrometry / W.-H. Ding, C.-C. Chiang // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 17. – № 1. – P. 56–63.

75 Determination of natural and synthetic oestrogens in surface water using gas chromatography-mass spectrometry / B. Woźniak, A. Kłopot, I. Matraszek-Żuchowska [et al.] // *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* – 2014. – Vol. 58. – P. 603–611.

76 Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS) / M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, R. López [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 38. – № 9. – P. 917–923.

77 Ueki, M. Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry / M. Ueki, M. Okano // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 1999. – Vol. 13. – № 22. – P. 2237–2243.

78 Luque-Córdoba, D. Development of a quantitative method for determination of steroids in human plasma by gas chromatography-negative chemical ionization-tandem mass spectrometry // D. Luque-Córdoba, M.A. López-Bascón, F. Priego-Capote // *Talanta.* – 2020. – Vol. – 220. – art. 121415.

79 Measurement of corticoids in the patients with clinical features indicative of mineralocorticoid excess / M.H. Choi, J.R. Hahm, B.H. Jung [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2002. – Vol. 320. – № 1–2. – P. 95–99.

80 Determination of reference intervals for urinary steroid profiling using a newly validated GC-MS/MS method / W.H.A. de Jong, E. Buitenwerf, A.T. Pranger [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2017. – Vol. 56. – № 1. – P. 103–112.

81 Doping control analysis of anabolic steroids in equine urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry / A.S.Y. Wong, G.N.W. Leung, D.K.K. Leung [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9. – № 9. – P. 1320–1327.

82 Progress on keto groups derivatization of steroid hormones in gas chromatography-mass spectrometry analysis / K. Fang, X.-J. Pan, B. Huang [et al.] // *Chin. J. Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 38. – № 5. – P. 743–751.

83 Measurement of estradiol in human serum by LC-MS/MS using a novel estrogen-specific derivatization reagent / P. Keski-Rahkonen, R. Desai, M. Jimenez [et al.] // *Anal. Chem.* 2015. – Vol. 87. – № 14. – P. 7180–7186.

84 Wang, Q. Ultra-high sensitivity analysis of estrogens for special populations in serum and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: Assay considerations and suggested practices / Q. Wang, C. Mesaros, I.A. Blair // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 162. – P. 70–79.

85 Quantitative-profiling method of serum steroid hormones by hydroxylamine-derivatization HPLC-MS / Q. Liu, Q. Chi, R.-T. Fan [et al.] // *Nat. Prod. Bioprospect.* – 2019. – Vol. 9. – № 3. – P. 201–208.

86 Temerdashev, A. Analytics for steroid hormone profiling in body fluids / A. Temerdashev, E. Dmitrieva, I. Podolskiy // *Microchem. J.* – 2021. – Vol. 168. – art. 106395.

87 Development, validation and application of a stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization/selected reaction monitoring/mass spectrometry (SID-LC/ESI/SRM/MS) method for quantification of keto-androgens in human serum / D. Tamae, M. Byrns, B. Marck [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 138. – P. 281–289.

88 Sample-multiplexing by derivatization using multiple analogous reagents for enhancing throughput in LC/ESI-MS/MS assay of steroids: Plasma 17 α -hydroxyprogesterone as an example / M. Kamemura, M. Yokota, S. Ogawa [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2020. – Vol. 1146. – art. 122117.

89 Multiplexed analysis of steroid hormones in saliva by LC-MS/MS with 2-hydrazinopyridine derivatization / N. Nadarajah, Ø. Skadberg, J. Adaway [et al.] // *Clin. Mass Spectrom.* – 2017. – Vol. 4–5. – P. 1–10.

90 Quantification of 2-hydrazinopyridine derivatized steroid hormones in fathead minnow (*Pimephales promelas*) blood plasma using LC-ESI+/MS/MS / D. Hala, M.D. Overturf, L.H. Petersen [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2011. – Vol. 879. – № 9–10. – P. 591–698.

91 Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS / L. Sosvorova, J. Vitku, T. Chlupacova [et al.] // *Steroids.* – 2015. – Vol. 98. – P. 1–8.

92 Simultaneous determination of androgens and prostaglandins in human urine using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / E. Im, B.L. Lew, M.Y. Lee [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2019. – Vol. 1109. – P. 45–53.

93 Mitamura, K. Derivatization in liquid chromatography/mass spectrometric analysis of neurosteroids / K. Mitamura, K. Shimada // *Se Pu.* – 2001. – Vol. 19. – № 16. – P. 508–512.

94 Derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine enhances sensitivity of analysis of 5 α -dihydrotestosterone in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry / A.M. Faqehi, S.G. Denham, G. Naredo [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2021. – Vol. 1640. – art. 461933.

95 Higashi, T. 2-Hydrazino-1-methylpyridine: a highly sensitive derivatization reagent for oxosteroids in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry / T. Higashi, A. Yamauchi, K. Shimada // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2005. – Vol. 825. – № 2. – P. 214–222.

96 A highly sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantification of cholesterol ozonolysis products secosterol-A and secosterol-B after derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine / S. Tomono, N. Miyoshi, M. Ito [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2011. – Vol. 879. – № 26. – P. 2802–2808.

97 Quantitative MALDI-MS assay of steroid hormones in plasma based on hydroxylamine derivatization / Z. Song, H. Gao, W. Xie [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2021. – Vol. 616. – art. 114089.

98 Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of plasma norgestrel acetate and estradiol in healthy postmenopausal women / S.G. Nair, D.P. Patel, M. Sanyal [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2018. – Vol. 32. – № 2. – art. e4086.

99 An LC-MS/MS analysis for seven sex hormones in serum / T.-F. Yuan, J. Le, Y. Cui [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – Vol. 162. – P. 34–40.

100 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma / R.E. Nelson, S.K. Grebe, D.J. OKane [et al.] // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol. 50. – № 2. – P. 373–384.

101 Tai, S.S.-C. Development and evaluation of a reference measurement procedure for the determination of estradiol-17 β in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry / S.S.-C. Tai, M.J. Welch // *Anal. Chem.* – 2005. – Vol. 77. – № 19. – P. 6359–6363.

102 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) of steroid hormone metabolites and its applications / T.M. Penning, S.-H. Lee, Y. Jin [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 121. – № 3–5. – P. 546–555.

103 Simultaneous determination of dihydrotestosterone and its metabolites in mouse sera by LC-MS/MS with chemical derivatization / S. Gorityala, S. Yang, M.M. Montano [et al.] // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2018. – Vol. 1090. – P. 22–35.

104 Measurement of steroid hormones by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with small amounts of hair / Y. Hobo, J. Nishikawa, Y. Miyashiro [et al.] // *Steroids.* – 2020. – Vol. 164. – art. 108732.

105 Ke, Y. A highly sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of serum androstane-3 α ,17 β -diol and androstane-3 β ,17 β -diol in post-

menopausal women / Y. Ke, A. Dury, F. Labrie // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2019. – Vol. 1113. – P. 30–36.

106 Xu, L. Analysis of steroidal estrogens as pyridine-3-sulfonyl derivatives by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry / L. Xu, D.C. Spink // *Anal Biochem.* – 2008. – Vol. 375. – № 1. – P. 105–114.

107 Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens / Z.-h. Liu, G.-n. Lu, H. Yin [et al.] // *Trends Anal. Chem.* – 2015. – Vol. 64. – P. 149–164.

108 Quantification of glucuronidated and sulfated steroids in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry / F. Badoud, E. Grata, J. Boccard [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400. – № 2. – P. 503–516.

109 Salivary testosterone measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry in adult males and females / B.G. Keevil, P. MacDonald, W. Macdowall [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* – 2014. – Vol. 51. – № Pt 3. – P. 368–378.

110 Li, X.S. Simultaneous determination of three estrogens in human saliva without derivatization or liquid-liquid extraction for routine testing via miniaturized solid phase extraction with LC-MS/MS detection / X.S. Li, S. Li, G. Kellermann // *Talanta.* – 2018. – Vol. 178. – P. 464–472.

111 Simultaneous determination of salivary testosterone and dehydroepiandrosterone using LC-MS/MS: Method development and evaluation of applicability for diagnosis and medication for late-onset hypogonadism / Y. Shibayama, T. Higashi, K. Shimada [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2009. – Vol. 877. – № 25. – P. 2615–2623.

112 Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone / R.L. Taylor, D. Machacek, R.J. Singh // *Clin. Chem.* – 2002. – Vol. 48. – № 9. – P. 1511–1519.

113 Son, H.H. Development and validation of an LC-MS/MS method for profiling 39 urinary steroids (estrogens, androgens, corticoids, and progestins) / H.H.

Son, W.S. Yun, S.-H. Cho // *Biomed. Chromatogr.* – 2020. – Vol. 34. – № 2. – art. e4723.

114 Álvarez-Sánchez, B. Ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of conjugated female steroids as pretreatment for their analysis by LC–MS/MS in urine / B. Álvarez-Sánchez, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castroa // *Analyst.* – 2009. – Vol. 134. – P. 1416–1422.

115 The nuclear receptor superfamily: the second decade / D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato [et al.] // *Cell.* – 1995. – Vol. 83. – № 6. – P. 835–839.

116 Gao, W. Chemistry and structural biology of androgen receptor / W. Gao, C.E. Bohl, J.T. Dalton // *Chem. Rev.* – 2005. – Vol. 105. – № 9. – P. 3352–3370.

117 McEwan, I.J. Androgen receptor modulators: a marriage of chemistry and biology / I.J. McEwan // *Fut. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 5. – № 10. – P. 1109–1120.

118 Androgen receptor: an overview / C. Chang, A. Saltzman, S. Yeh [et al.] // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1995. – Vol. 5. – № 2. – P. 97–125.

119 Chengalvala, M. Selective androgen receptor modulators / M. Chengalvala, T. Oh, A.K. Roy // *Expert Opin. Ther. Patents.* – 2003. – Vol. 13. – P. 59–66.

120 Davey, R.A. Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside / R.A. Davey, M. Grossmann // *Clin. Biochem. Rev.* – 2016. Vol. 37. – № 1. – P. 3–15.

121 Gao, W. Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs) / W. Gao, G.T. Dalton // *Drug. Discov. Today.* – 2007. – Vol. 12. – № 5–6. – P. 241–248.

122 Palvimo, J.J. The androgen receptor / J.J. Palvimo // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 352. – № 1–2. – P. 1–3.

123 Narayanan, R. Development of selective androgen receptor modulators (SARMs) / R. Narayanan, C.C. Coss, J.T. Dalton // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 465. – P. 134–142.

124 Discovery of a potent, orally active, nonsteroidal androgen receptor agonist: 4-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-6-(trifluoromethyl)-8-pyridono[5,6-g]-quinoline (LG121071)

/ L.G. Hamann, N.S. Mani, R.L. Davis [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42. – № 2. – P. 210–212.

125 Thevis, M. Screening for metabolically stable aryl-propionamide derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes / M. Thevis, M. Kamber, W. Schänzer // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2006. – Vol. 20. – № 5. – P. 870–876.

126 A selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception / J. Chen, D.J. Hwang, C.E. Bohl [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 312. – № 2. – P. 546–553

127 Choi, S.M. Comparative safety evaluation of selective androgen receptor modulators and anabolic androgenic steroids / S.M. Choi, B.M. Lee // *Expert Opin. Drug Saf.* – 2015. – Vol. 14. – № 11. – P. 1773–1785.

128 Bhasin, S. Selective androgen receptor modulators (SARMs) as function promoting therapies / S. Bhasin, R. Jasuja // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2009. – Vol. 12. – № 3. – P. 232–240.

129 Discovery of nonsteroidal androgens / J.T. Dalton, A. Mukherjee, Z. Zhu [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 244. – № 1. – P. 1–4.

130 Discovery of diarylhydantoin as new selective androgen receptor modulators / F. Nique, S. Hebbe, C. Peixoto [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – № 19. – P. 8225–8235.

131 New nonsteroidal androgen receptor modulators based on 4-(trifluoromethyl)-2(1H)-pyrrolidino(3,2g) quinolinone / J.P. Edwards, S.J. West, C.L. Pooley [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1998. – Vol. 8. – № 7. – P. 745–750.

132 Negro-Vilar, A. Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium / A. Negro-Vilar // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1999. – Vol. 84. – № 10. – P. 3459–3462.

133 Chen, J. Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators / J. Chen, J. Kim, J.T. Dalton // *Mol. Interv.* – 2005. – Vol. 5. – № 3. – P. 173–188.

134 The para substituent of S-3-(phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamides is a major structural determinant of in vivo disposition and activity of selective androgen receptor modulators / J. Kim, D. Wu, D.J. Hwang [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 315. – № 1. – P. 230–239.

135 Pharmacokinetics of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator / J.D. Kearbey, D. Wu, W. Gao [et al.] // *Xenobiotica.* – 2004. – Vol. 34. – № 3. – P. 273–280.

136 Design, synthesis, and biological characterization of metabolically stable selective androgen receptor modulators / C.A. Marhefka, W. Gao, K. Chung [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47. – № 4. – P. 993–998.

137 Absorption, distribution, metabolism and excretion of the novel SARM GTx-024 [(S)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-cyanophenoxy)-2-hydroxy-2-methylpropanamide] in rats / J. Kim, R. Wang, K.A. Veverka [et al.] // *Xenobiotica.* – 2013. – Vol. 43. – № 11. – P. 993–1009.

138 Preclinical characterization of a (S)-N-(4-cyano-3-trifluoromethyl-phenyl)-3-(3-fluoro, 4-chlorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-propanamide: a selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception / A. Jones, J. Chen, D.J. Hwang [et al.] // *Endocrinology.* – 2009. – Vol. 150. – № 1. – P. 385–395.

139 An orally active selective androgen receptor modulator is efficacious on bone, muscle, and sex function with reduced impact on prostate / J.N. Miner, W. Chang, M.S. Chapman [et al.] // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148. – № 1. – P. 363–373.

140 Zhang, X. Deciphering the selective androgen receptor modulators paradigm / X. Zhang, Z. Sui // *Expert. Opin. Drug. Discov.* – 2013. – Vol. 8. – № 2. – P. 191–218.

141 In vitro metabolism studies on the selective androgen receptor modulator (SARM) LG121071 and its implementation into human doping controls using liquid chromatography-mass spectrometry / A. Knoop, O. Krug, M. Vincenti [et al.] // *Eur. J. Mass. Spectrom. (Chichester).* – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P. 27–36.

142 Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation after single and multiple ascending doses of a novel selective androgen receptor modulator in healthy subjects / I. Bhattacharya, S. Tarabar, Y. Liang [et al.] // *Clin. Ther.* – 2016. – Vol. 38. – № 6. – P. 1401–1416.

143 Mechanism of the tissue-specific action of the selective androgen receptor modulator S-101479 / K. Furuya, N. Yamamoto, Y. Ohyabu [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2013. – Vol. 36. – № 3. – P. 442–451.

144 Synthesis and SAR of novel hydantoin derivatives as selective androgen receptor modulators / X. Zhang, G.F. Allan, T. Sbriscia [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2006. – Vol. 16. – № 22. – P. 5763–5766.

145 Identification of a 4-(hydroxymethyl)diarylhydantoin as a selective androgen receptor modulator / F. Nique, S. Hebbe, N. Triballeau [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – № 19. – P. 8236–8247.

146 Selective androgen receptor modulators for the prevention and treatment of muscle wasting associated with cancer / J.T. Dalton, R.P. Taylor, M.L. Mohler [et al.] // *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* – 2013. – Vol. 7. – № 4. – P. 345–351.

147 Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010–2013 / O. Krug, A. Thomas, K. Walpurgis [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 70. – № 11. – P. 1303–1311.

148 A selective androgen receptor modulator with minimal prostate hypertrophic activity enhances lean body mass in male rats and stimulates sexual behavior in female rats / G.F. Allan, P. Tannenbaum, T. Sbriscia [et al.] // *Endocrine.* – 2007. – Vol. 32. – № 1. – P. 41–51.

149 Design, synthesis, and preclinical characterization of the selective androgen receptor modulator (SARM) RAD140 / C.P. Miller, M. Shomali, C.R. Lyttle [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 2. – № 2. – P. 124–129.

150 Synthesis of potent, substituted carbazoles as selective androgen receptor modulators (SARMs) / C.P. Miller, P. Bhaket, N. Muthukaman [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – № 24. – P. 7516–7520.

151 Disposition and metabolism of LY2452473, a selective androgen receptor modulator, in humans / P. Yi, J.F. Rehmel, K. Cassidy [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* – 2012. – Vol. 40. – № 12. – P. 2354–2364.

152 Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs) Part III: Discovery of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzotrile derivative 2f as a clinical candidate / K. Aikawa, M. Asano, K. Ono [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 25. – № 13. – P. 3330–3349.

153 A novel selective androgen receptor modulator, NEP28, is efficacious in muscle and brain without serious side effects on prostate / K. Akita, K. Harada, J. Ichihara [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 720. – № 1-3. – P. 107–114.

154 Thevis, M. Detection of SARMs in doping control analysis / M. Thevis, W. Schänzer // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 464. – P. 34–45.

155 Discovery of the selective androgen receptor modulator MK-0773 using a rational development strategy based on differential transcriptional requirements for androgenic anabolism versus reproductive physiology / A. Schmidt, D.B. Kimmel, C. Bai [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – № 22. – P. 17054–17064.

156 Design, synthesis, and in vivo SAR of a novel series of pyrazolines as potent selective androgen receptor modulators / X. Zhang, X. Li, G.F. Allan [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 50. – № 16. – P. 3857–3869.

157 Bone anabolic effects of S-40503, a novel nonsteroidal selective androgen receptor modulator (SARM), in rat models of osteoporosis / K. Hanada, K. Furuya, N. Yamamoto [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – Vol. 26. – № 11. – P. 1563–1569.

158 Cilotti, A. Male osteoporosis and androgenic therapy: from testosterone to SARMs / A. Cilotti, A. Falchetti // *Clin. Cases Miner. Bone. Metab.* – 2009. – Vol. 6. – № 3. – P. 229–233.

159 Fearon, K.H. Selective androgen receptor modulators in cancer cachexia? / K.H. Fearon // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol. 14. – № 4. – P. 271–272.

160 Srinath, R. Enobosarm (GTx-024, S-22): a potential treatment for cachexia / R. Srinath, A. Dobs // *Future Oncol.* – 2014. – Vol. 10. – № 2. – P. 187–194.

161 2-Chloro-4-[[[(1R,2R)-2-hydroxy-2-methyl-cyclopentyl]amino]-3-methylbenzonitrile a transdermal selective androgen receptor modulator (SARM) for muscle atrophy / A. Saeed, G.M. Vaught, K. Gavardinas [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 59. – № 2. – P. 750–755.

162 Cadilla, R. Selective androgen receptor modulators in drug discovery: Medicinal chemistry and therapeutic potential / R. Cadilla, P. Turnbull // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6. – № 3. – P. 245–270.

163 Anti-androgenic effects of S-40542, a novel non-steroidal selective androgen receptor modulator (SARM) for the treatment of benign prostatic hyperplasia / H. Nejishima, N. Yamamoto, M. Suzuki [et al.] // *Prostate.* – 2012. – Vol. 72. – № 14. – P. 1580–1587.

164 World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard. URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf (дата обращения: 13.02.2023).

165 Bajguz, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants / A. Bajguz, A. Tretyn // *Phytochemistry.* – 2003. – Vol. 62. – № 7. – P. 1027–1046.

166 MK-0677 (ibutamoren mesylate) for the treatment of patients recovering from hip fracture: A multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIb study / A. Adunsky, J. Chandler, N. Heyden [et al.] // *Arch. Gerontol. Geriatr.* – 2011. – Vol. 53. – № 2. – P. 183–189.

167 Constanzer, M. Determination of a novel growth hormone secretagogue (MK-677) in human plasma at picogram levels by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry / M. Constanzer, C. Chavez-Eng, B. Matuszewski // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1997. – Vol. 693. – № 1. – P. 131–137.

168 In vitro metabolic studies of Rev-Erb agonists SR9009 and SR9011 / L. Geldof, K. Deventer, K. Roels [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. – № 10. – P. 1676–1692.

169 AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics / V.A. Narkar, M. Downes, T.Y. Ruth [et al.] // *Cell.* – 2008. – Vol. 134. – № 3. – P. 405–415.

170 Role of liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology / A.H. Wu, R. Gerona, P. Armenian [et al.] // *Clin. Toxicol. (Phila).* – 2012. – Vol. 50. – № 8. – P. 733–742.

171 Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods / V. Viette, M. Fathi, S. Rudaz [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2011. – Vol. 49. – № 7. – P. 1091–1103.

172 Anizan, S. The potential role of oral fluid in antidoping testing / S. Anizan, M.A. Huestis // *Clin. Chem.* – 2014. – Vol. 60. – № 2. – P. 307–322.

173 An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry / H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini [et al.] // *Mass. Spectrom. Rev.* – 2011. – Vol. 30. – № 3. – P. 491–509.

174 Taylor, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry / P.J. Taylor // *Clin. Biochem.* – 2005. – Vol. 38. – № 4. – P. 328–334.

175 Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects / A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* – 2009. – Vol. 877. – № 23. – P. 2198–2207.

176 Matuszewski, B.K. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS / B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75. – № 13. – P. 3019–3030.

177 High-throughput screening for various classes of doping agents using a new dilute-and-shoot liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target

approach / S. Guddat, E. Solymos, A. Orlovius [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2011. – Vol. 3. – № 11–12. – P. 836–850.

178 Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection high performance liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry / C. Görgens, S. Guddat, A. Thomas [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 131. – P. 482–496.

179 Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes / A. Hansson, H. Knych, S. Stanley [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7. – № 8. – P. 673–683.

180 Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens / M. Thevis, E. Gerace, A. Thomas [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2010. – Vol. 2. – № 11–12. – P. 589–598.

181 Determination of benzimidazole- and bicyclic hydantoin-derived selective androgen receptor antagonists and agonists in human urine using LC–MS/MS / M. Thevis, M. Kohler, A. Thomas [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – Vol. 391. – № 1. – P. 251–261.

182 Development and validation of a semi-quantitative ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for screening of selective androgen receptor modulators in urine / E. Ventura, A. Gadaj, G. Monteith [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2019. – Vol. 1600. – P. 183–196.

183 Doping control analysis of emerging drugs in human plasma – identification of GW501516, S-107, JTV-519, and S-40503 / M. Thevis, S. Beuck, A. Thomas [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2009. – Vol. 23. – № 8. – P. 1139–1146.

184 Investigation of the selective androgen receptor modulators S1, S4 and S22 and their metabolites in equine plasma using high-resolution mass spectrometry / A. Hansson, H. Knych, S. Stanley [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2016. – Vol. 30. – № 7. – P. 833–842.

185 Pharmacokinetics and metabolism of a selective androgen receptor modulator in rats: implication of molecular properties and intensive metabolic profile to investigate ideal pharmacokinetic characteristics of a propanamide in preclinical study / D. Wu, Z. Wu, J. Yang [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* – 2006. – Vol. 34. – № 3. – P. 483–494.

186 Comprehensive plasma-screening for known and unknown substances in doping controls / A. Thomas, S. Guddat, M. Kohler [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2010. – Vol. 24. – № 8. – P. 1124–1132.

187 Detection of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) in a routine equine blood doping control sample / A.T. Cawley, C. Smart, C. Greer [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2016. – Vol. 8. – № 2. – P. 257–261.

188 Jia, L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments / L. Jia, X. Liu // *Curr. Drug Metab.* – 2007. – Vol. 8. – № 8. – P. 822–829.

189 Present and future in vitro approaches for drug metabolism / S. Ekins, B.J. Ring, J. Grace [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 2000. – Vol. 44. – № 1. – P. 313–324.

190 Wrighton, S.A. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies / S.A. Wrighton, B.J. Ring, M. Vandenbranden // *Toxicol. Pathol.* – 1995. – Vol. 23. – № 2. – P. 199–208.

191 Gómez-Lechón, M.J. An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture / M.J. Gómez-Lechón, J.V. Castell, M.T. Donato // *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2008. – Vol. 4. – № 7. – P. 837–854.

192 Pelkonen, O. In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions? / O. Pelkonen, H. Raunio // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2005. – Vol. 1. – № 1. – P. 49–59.

193 Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development / D. Zhang, G. Luo, X. Ding [et al.] // *Acta. Pharm. Sin. B.* – 2012. – Vol. 2. – № 6. – P. 549–561.

194 Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals / H. Olson, G. Betton, D. Robinson [et al.] // Regul. Toxicol. Pharmacol. – 2000. – Vol. 32. – № 1. – P. 56–67.

195 Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes / M. Thevis, A. Thomas, G. Fuschöller [et al.] // Rapid. Commun. Mass. Spectrom. – 2010. – Vol. 24. – № 15. – P. 2245–2254.

196 SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report / E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy [et al.] // Forensic. Sci. Int. – 2011. – Vol. 213. – № 1–3. – P. 104–108.

197 Starcevic, B. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample / B. Starcevic, B.D. Ahrens, A.W. Butch [et al.] // Drug. Test. Anal. – 2013. – Vol. 5. – № 5. – P. 377–379.

198 Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies / R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne [et al.] // J. Mass. Spectrom. – 2003. – Vol. 38. – № 4. – P. 357–372.

199 Prakash, C. Analytical strategies for identifying drug metabolites / C. Prakash, C.L. Shaffer, A. Nedderman // Mass. Spectrom. Rev. – 2007. – Vol. 26. – № 3. – P. 340–369.

200 The fungus *Cunninghamella elegans* can produce human and equine metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) / A. Rydevik, M. Thevis, O. Krug [et al.] // Xenobiotica. – 2013. – Vol. 43. – № 5. – P. 409–420.

201 Characterization of in vitro synthesized equine metabolites of the selective androgen receptor modulators S24 and S4 / O. Krug, A. Thomas, S. Beuck [et al.] // J. Equine. Vet. Sci. – 2012. – Vol. 32. – № 9. – P. 562–568.

202 Selective androgen receptor modulators: in vitro and in vivo metabolism and analysis / E. de Rijke, M.L. Essers, J.C. Rijk [et al.] // Food. Addit. Contam. A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. – 2013. – Vol. 30. – № 9. – P. 1517–1526.

203 Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes / T. Kuuranne, A. Leinonen, W. Schänzer [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* – 2008. – Vol. 36. – № 3. – P. 571–581.

204 In vivo metabolism and final disposition of a novel nonsteroidal androgen in rats and dogs / M.A. Perera, D. Yin, D. Wu [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* – 2006. – Vol. 34. – № 10. – P. 1713–1721.

205 Peters, F.T. In vitro approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds / F.T. Peters, M.R. Meyer // *Drug Test. Anal.* – 2011. – Vol. 3. – № 7–8. – P. 483–495.

206 Tolonen, A., Turpeinen, M. & Pelkonen, O. Liquid chromatography–mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening / A. Tolonen, M. Turpeinen, O. Pelkonen // *Drug Discov. Today.* – 2009. – Vol. 14. – № 3–4. – P. 120–133.

207 Detection and characterization of metabolites in biological matrices using mass defect filtering of liquid chromatography/high resolution mass spectrometry data / M. Zhu, L. Ma, D. Zhang [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2006. – Vol. 34. – № 10. – P. 1722–1733.

208 Integration of knowledge-based metabolic predictions with liquid chromatography data-dependent tandem mass spectrometry for drug metabolism studies: application to studies on the biotransformation of indinavir / M.R. Anari, R.I. Sanchez, R. Bakhtiar [et al.] // *Anal. Chem.* – 2004. – Vol. 76. – № 3. – P. 823–832.

209 Ma, S. Application of mass spectrometry for metabolite identification / S. Ma, S.K. Chowdhury, K.B. Alton // *Curr. Drug Metab.* – 2006. – Vol. 7. – № 5. – P. 503–523.

210 Screening for 2-quinolinone-derived selective androgen receptor agonists in doping control analysis / M. Thevis, M. Kohler, J. Maurer [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2007. – Vol. 21. – № 21. – P. 3477–3486.

211 Mass spectrometric characterization of the selective androgen receptor modulator (SARM) YK-11 for doping control purposes / M. Thevis, T. Piper, J. Dib [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2017. – Vol. 31. – № 14. – P. 1175–1183.

212 Mass spectrometry of hydantoin-derived selective androgen receptor modulators / M. Thevis, M. Kohler, N. Schlörer [et al.] // *J. Mass. Spectrom.* – 2008. – Vol. 43. – № 5. – P. 639–650.

213 Thevis, M. Mass spectrometry of selective androgen receptor modulators / M. Thevis, W. Schänzer // *J. Mass. Spectrom.* – 2008. – Vol. 43. – № 7. – P. 865–876.

214 Enzymatic hydrolysis of conjugated steroid metabolites: search for optimum conditions using response surface methodology / V. Ferchaud, P. Courcoux, B. Le Bizec [et al.] // *Analyst.* – 2000. – Vol. 125. – № 12. – P. 2255–2259.

215 Cox, H.D. Detection of LGD-4033 and its metabolites in athlete urine samples / H.D. Cox, D. Eichner // *Drug. Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9. – № 1. – P. 127–134.

216 Doping control analysis of tricyclic tetrahydroquinoline-derived selective androgen receptor modulators using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / M. Thevis, M. Kohler, A. Thomas [et al.] // *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* – 2008. – Vol. 22. – № 16. – P. 2471–2478.

217 Equine in vivo-derived metabolites of the SARM LGD-4033 and comparison with human and fungal metabolites / A. Hansson, H. Knych, S. Stanley [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2018. – Vol. 1074–1075. – P. 91–98.

218 Analytical strategies to detect enobosarm administration in bovines / N. Cesbron, A. Sydor, M. Penot [et al.] // *Food Addit. Contam. A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* – 2017. – Vol. 34. – № 4. – P. 632–640.

219 Темердашев, А.З. Методы определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов / А. З. Темердашев, Е. В. Дмитриева // *Журн. аналит. химии.* – 2020. – Т. 75. – № 7. – С. 579–596.

220 Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-
HRMS detection / E. Dmitrieva, A. Temerdashev, A. Azaryan [et al.] // J. Chromatogr.
B Analyt. Technol. Biomed. Life Scie. – 2020. – Vol. 1159. – art. 122390.

221 Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical
chemistry / M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira [et al.] // Talanta. – 2008. –Vol.
76. – № 5. – P. 965–977.

222 Ebrahimi-Najafabadi, H. Experimental design in analytical chemistry–part I:
theory / H. Ebrahimi-Najafabadi, R. Leardi, M. Jalali-Heravi // J. AOAC Int. – 2014. –
Vol. 97. – № 1. – P. 3–11.

223 Rezaee, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method / M.
Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji // J. Chromatogr. A. – 2010. – Vol. 1217. – № 16. –
P. 2342–2357.

224 Rykowska, I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction
(DLLME) based on ionic liquids: A review / I. Rykowska, J. Ziemblińska, I. Nowak //
J. Mol. Liq. – 2018. – Vol. 259. – P. 319–339.

225 Sarigul, N. A new artificial urine protocol to better imitate human urine /
N. Sarigul, F. Korkmaz, İ. Kurultak // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9. – art. 20159.

226 FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US
Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA).
URL: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf> (дата
обращения: 13.02.2022).

227 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 // Журн. аналит.
химии. – 2021. – Т. 76. – № 11. – С. 1004–1011.

228 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».

229 Simultaneous analysis by LC-MS/MS of 22 ketosteroids with hydroxylamine derivatization and underivatized estradiol from human plasma, serum and prostate tissue // M.R. Häkkinen, T. Murtola, R. Voutilainen [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2019. – Vol. 164. – P. 642–652.

230 Fast and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry assay for seven androgenic and progestagenic steroids in human serum / P. Keski-Rahkonen, K. Huhtinen, M. Poutanen [et al.] // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 127. – № 3–5. – P. 396–404.

231 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.

232 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 [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2022. – Vol. 214. – art. 114736.

233 Дмитриева, Е.В. Определение стероидных гормонов в слюне человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием / Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев // Журн. аналит. химии. – 2022. – Т. 77. – № 12. – С. 1073–1079.

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

235 Определение андарина (S-4), селективного модулятора андрогенных рецепторов, и ибутаморена (МК-677), непептидного секретатога гормона роста, в моче ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией с tandemным масс-

спектрометрическим детектированием / Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2018. – Т. 73. – № 7. – С. 523–528.

236 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 [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 236–244.

237 A novel approach to the quantification of urinary aryl-propionamide-derived SARMs by UHPLC–MS/MS / A. Temerdashev, E. Dmitrieva, A. Azaryan [et al.] // Biomed. Chromatogr. – 2020. – Vol. 34. – №. 1. – art. e4700.