

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОСТЕРОИДОВ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ДИСПЕРСИОННОЙ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИИ И УЛЬТРА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ–МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© 2021 г. Е. В. Дмитриева^а *, А. З. Темердашев^а, А. К. Осипова^а

^аКубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

*e-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 07.05.2021 г.

Принята к публикации 13.05.2021 г.

Предложен способ определения некоторых кетостероидов в моче человека, включающий ферментативный гидролиз с применением β-глюкуронидазы *E. coli* с последующими дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией, дериватизацией аналитов гидроксиламином и детектированием методом обращенно-фазовой ультра ВЭЖХ–квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии. Оптимизация условий экстракции и получения производных исследуемых соединений позволила установить, что наивысшие степени извлечения достигаются при использовании смеси ацетон–хлороформ в качестве диспергента и экстрагента, а полнота протекания реакции дериватизации – при термостатировании пробы при 70°C в течение 90 мин. Предложенный способ характеризуется высокой чувствительностью (пределы обнаружения в диапазоне 0.1–0.25 нг/мл) и широким линейным диапазоном.

Ключевые слова: стероидные гормоны, ДЖЖМЭ, моча, дериватизация, гидроксиламин, ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

DOI: 10.31857/S0044450221110037

Стероидные гормоны являются регуляторами различных физиологических и биохимических процессов в организме человека. Все стероидные гормоны образуются из общего предшественника холестерина при протекании реакций гидроксирования, окисления и восстановления. Среди стероидных гормонов выделяют следующие классы: эстрогены, андрогены, прогестины, минералокортикоиды, глюкокортикоиды, витамин D и его метаболиты [1, 2]. Определение данных соединений в биологических жидкостях человека требуется, прежде всего, в целях клинической диагностики ввиду их участия в патогенезе многих заболеваний и генетических нарушений [2, 3].

Обычно стероидные гормоны определяют в моче (усредненные концентрации за несколько часов–сутки), крови и слюне (определение в реальном времени) [4]. Результаты определения стероидов в реальном времени могут колебаться из-за эпизодического характера секреции гормонов [5, 6], а также циркадных ритмов [7], в то время как состав мочи не подвержен подобным коле-

баниям. Другими преимуществами мочи в качестве объекта анализа являются неинвазивность процедуры и простота получения больших объемов образца [8].

Стероидные гормоны проявляют биологическую активность на очень низких уровнях концентраций (нано- и пиколярных) [3, 9, 10], поэтому для их определения требуется применение высокочувствительных методов.

Применяют различные способы подготовки проб мочи к анализу: жидкостно-жидкостную экстракцию [11–13], сорбционную микроэкстракцию на покрытия мешалки [14], проточную твердофазную микроэкстракцию [15], автоматизированную твердофазную экстракцию [16], дисперсионную жидкостно-жидкостную микроэкстракцию (ДЖЖМЭ) [8] и др. [17]. Среди перечисленных способов наиболее многообещающим является ДЖЖМЭ ввиду простоты, высоких факторов концентрирования и соответствия критериям “зеленой химии” [18]. В случае необходимости повышения чувствительности определения

Таблица 1. Условия масс-спектрометрического детектирования

Параметр	Значение
Температура в источнике ионизации, °С	250
Напряжение на капилляре, В	4000
Напряжение на экстрагирующей линзе, В	500
Давление газа-распылителя, мПа	0.1
Расход газа-осушителя, л/мин	5
Скорость сканирования, Гц	3
Диапазон сканирования масс, Да	150–1000
Давление газа-мишени, мТорр	1.5

стероидных гормонов возможно использование дериватизации для увеличения эффективности ионизации. Так, в обзорах [9, 19, 20] рассмотрено применение различных дериватирующих агентов для малых молекул, в частности для стероидных гормонов. Некоторые из используемых реагентов коммерчески недоступны, в то время как другие, например дансил хлорид, приводят к уменьшению селективности хроматографического разделения и неспецифичной фрагментации дериватов [21]. Это обуславливает дополнительные требования к реагенту в случае применения дериватизации при подготовке проб.

Цель данного исследования – разработка простого, экспрессного и высокочувствительного способа определения стероидных гормонов различных классов, соответствующего критериям “зеленой химии”.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Использовали стандартные образцы тестостерона, дигидротестостерона, кортизона, гидрокортизона (кортизола), эстрогена, прогестерона, 11 α -гидроксипрогестерона и метилтестостерона (внутренний стандарт) (Sigma-Aldrich, Германия); β -глюкуронидазу *Escherichia coli* (*E. coli*) (Roche Diagnostics, Германия); 50%-ный водный раствор гидроксиламина (Sigma-Aldrich, Германия). Ацетонитрил (Biosolve, Израиль) и метанол (J.T. Baker, Великобритания) для ВЭЖХ, муравьиную кислоту (98%) (Acros Organics), воду (18.2 М Ω см, Milli-Q) использовали для приготовления растворов и в качестве компонентов подвижной фазы. Ацетон, этанол, дихлорметан, трихлорметан и тетрахлорметан (99.9%), соляную кислоту (99%), муравьиную кислоту (98%), хлорид натрия, дигидрофосфат калия, сульфат натрия, мочевую кислоту, мочевины, креатинин, цитрат натрия, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид аммония, оксалат калия, сульфат магния, дигидрофосфат натрия, гидрофосфат натрия, азид натрия, тетраборат натрия (бура) (99%) приобретали у фирмы “Вектон” (Россия).

Приготовление стандартных растворов. Стандартные растворы стероидных гормонов с концентрацией 1 мг/мл готовили в метаноле, градуировочные растворы и растворы контроля качества получали разбавлением стандартных растворов в метаноле. Фосфатный буферный раствор (50 мл, рН 6.5) готовили из дигидрофосфата калия, гидрофосфата натрия и азиды натрия. Синтетическую мочу для оптимизации условий пробоподготовки готовили в соответствии с протоколом [22]. Все растворы хранили при 4°C.

Приборы и оборудование. Для определения аналитов использовали систему, состоящую из ультра высокоэффективного жидкостного хроматографа Bruker Elute и квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker MaXis Impact с источником электрораспылительной ионизации (табл. 1) под управлением программного обеспечения Bruker Compass NuStar 4.1. Для разделения аналитов применяли колонку Phenomenex Kinetex C18 (100 \times 2.1 мм, 1.7 мкм) с соответствующей предколонкой. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в метаноле (элюент Б) в режиме градиентного элюирования (1.00 мин – 95% А, 2.70 мин – 40% А, 4.00 мин – 40% А, 5.00 мин – 10% А, 7.50 мин – 10% А, 7.51 мин – 95% А, 9.00 мин – 95% А) при скорости потока подвижной фазы 0.4 мл/мин и температуре термостата 40°C. Образцы находились в автосамплере при 5°C, для анализа использовали 10 мкл образца.

Исследуемые образцы. Образцы мочи получали от здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет, консервировали азидом натрия и хранили при –20°C.

Выбор дериватирующего агента. В качестве дериватирующего агента выбрали гидроксиламин, поскольку он обеспечивает высокую чувствительность определения, 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. Гидроксиламин использовали ранее для определения стероидных гормонов в биологических жидкостях человека с высокой чувствительностью [3, 23, 24]. На схеме 1 приведена реакция получения производных при использовании гидроксиламина в качестве дериватирующего агента.

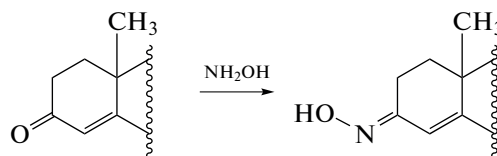
**Схема 1.** Образование оксимов стероидных гормонов при дериватизации гидроксиламином.

Таблица 2. Условия масс-спектрометрического детектирования аналитов

Аналит	Брутто-формула	Моноизотопная масса, Да	[M+H] ⁺ , Да	Погрешность определения массы, ppm	Время удерживания, 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*	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.2246	303.2319	1.6	5.4
Производное метилтестостерона*	C ₂₀ H ₃₁ NO ₂	317.2355	318.2428	2.5	5.5

* Внутренний стандарт.

Основной недостаток использования гидроксиламина — возможное расщепление пиков на хроматограммах из-за образования нескольких стереоизомеров. Однако в том случае, когда за счет оптимизации условий градиентного элюирования не удастся добиться образования одного пика без ухудшения селективности, возможно интегрирование расщепленного пика без ухудшения аналитических характеристик методики.

Оптимизация условий дериватизации. Для достижения полноты протекания реакции оптимизировали такие параметры, как концентрация гидроксиламина, температура и время термостабилизации. Время реакции варьировали в диапазоне от 30 до 120 мин, температуру — от комнатной до 70°C, а концентрацию гидроксиламина между 0.4 и 3.2 М. Полноту протекания реакции оценивали по наличию пиков производных и отсутствию пиков исходных соединений на хроматограммах (табл. 2).

Оптимизация условий дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции. Для нахождения

оптимального сочетания экстрагента и диспергента проводили следующий эксперимент: к 1 мл синтетической мочи, содержащей исследуемые соединения и внутренний стандарт с концентрациями по 100 нг/мл, добавляли 300 мкл фосфатного буферного раствора (рН 6.5). Затем при помощи шприца в образец вводили смесь экстрагента (100 мкл) и диспергента (500 мкл), после чего перемешивали смесь на вортексе 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)) для получения производных с последующим термостабилизацией и анализом образца.

В качестве диспергентов рассматривали ацетон, метанол, этанол и ацетонитрил, которые хорошо растворяются как в образце, так и в экстрагенте и способствуют образованию большой поверхности контакта фаз. Ди-, три- и тетрахлорметан использовали в качестве диспергентов, поскольку они плохо растворяются в водном образце, а также имеют более высокую плотность, тем самым удовлетворяя

критериям, предъявляемым к данным растворителям.

Для достижения наивысших степеней извлечения использовали многофакторный подход — план Бокса-Бенкена [25–28], который используется для оценки влияния различных факторов (независимых переменных) на аналитический сигнал (например, площадь пика — зависимая переменная), а также позволяет оценить взаимодействие между факторами.

Рассматривали четыре фактора: объем экстрагента (50, 100 и 150 мкл), объем диспергента (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 pH на степени извлечения. Для обработки полученных результатов использовали ПО STATISTICA 10 (Statsoft).

Эксперимент проводили следующим образом: к 1 мл синтетической мочи, содержащей исследуемые соединения и внутренний стандарт (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 экстрагента и диспергента. Смесь перемешивали на вортексе в течение 15 с (без перемешивания степени извлечения целевых соединений неудовлетворительные) и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Нижнюю фазу упаривали досуха в токе азота и добавляли раствор гидроксиламина (метанол—вода (1 : 1)) для получения производных с последующим термостатированием и анализом образца.

Стоит отметить, что при анализе реальных образцов перед процедурой микроэкстракции проводили деконъюгацию глюкуронидов в условиях, оптимизированных нами ранее [8]: 30 мин при 50°C в присутствии фосфатного буферного раствора (pH 6.5) и фермента β-глюкуронидазы *E. coli*.

После выбора оптимальных условий пробоподготовки оценивали аналитические характеристики методики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий дериватизации. Установили, что использование концентрации гидроксиламина не менее 1.6 М обеспечивает полноту протекания реакции при температуре термостатирования 70°C и времени реакции не менее 90 мин, поэтому данные условия выбрали для дальнейших экспериментов. При более низкой концентрации дериватирующего агента и меньших времени и температуре на хроматограммах наблюдали исходные соединения или моно- и дизамещенные дериваты, например, для кортизона, кортизола, прогестерона и 11α-гидрокси-прогестерона.

Оптимизация условий дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции. При оптимизации типов экстрагента и диспергента установили, что две комбинации растворителей, а именно: ацетон—трихлорметан и ацетонитрил—трихлорметан, обеспечивают достаточные степени извлечения. При использовании ацетонитрила степени извлечения исследуемых глюкокортикоидов (кортизона и кортизола) несколько выше, в то время как ацетон приводит к увеличению степени извлечения остальных соединений, поэтому его выбрали для дальнейших экспериментов в качестве диспергента, а трихлорметан — в качестве экстрагента.

Использование плана Бокса-Бенкена позволило установить уровни факторов, обеспечивающие количественное извлечение всех аналитов. Все полученные модели были статистически значимыми ($R_{adj}^2 > 0.9$), что указывает на высокую адекватность полученных результатов. Ввиду оптимизации условий для соединений с различными физико-химическими свойствами, в некоторых случаях выбирали компромиссные значения. В результате установили, что добавление хлорида и тетрабората натрия мало влияет на степени извлечения, в то время как объем экстрагента оказывает большое влияние — с увеличением объема степени извлечения возрастают, поэтому выбрали величину 150 мкл. Влияние объема диспергента на степени извлечения меньше, величина 500 мкл обеспечивает наиболее высокие степени извлечения. В этих условиях степени извлечения аналитов составили 79–98%, при этом степени извлечения глюкокортикоидов оказались самыми низкими по сравнению с остальными соединениями.

Таким образом, выбрали следующие оптимальные условия пробоподготовки: в микроцентрифужную пробирку емк. 2 мл добавляют 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*, образец инкубируют в течение 30 мин при 50°C. После охлаждения образца до комнатной температуры в него вводят смесь хлороформа и ацетона (150 и 500 мкл соответственно) при помощи шприца, перемешивают на вортексе 15 с и центрифугируют 10 мин при 10000 об/мин. Нижний слой переносят в виалу, упаривают досуха в токе азота, сухой остаток растворяют в 100 мкл 1.6 М раствора гидроксиламина (метилловый спирт—вода (1 : 1)) и термостатируют виалу в течение 90 мин при 70°C с последующим анализом.

Валидация разработанного способа. Предложенный способ валидировали в соответствии с критериями FDA по валидации биоаналитических методик [29]. При валидации методики ис-

Таблица 3. Чувствительность методики и линейный диапазон

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2
Тестостерон	0.1	0.25	0.25–100	0.999
Дигидротестостерон	0.1	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	0.1	0.25	0.25–100	0.996

пользовали 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 (0.1, 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 : 1, а предел определения соответствовал

концентрации, определяемой с погрешностью менее 15%. Результаты представлены в табл. 3.

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.

Правильность и воспроизводимость устанавливали при помощи анализа растворов контроля качества низкой (2.5 нг/мл), средней (10 нг/мл) и

Таблица 4. Аналитические характеристики методики ($n = 15$)

Аналит	Концентрация раствора контроля качества, 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

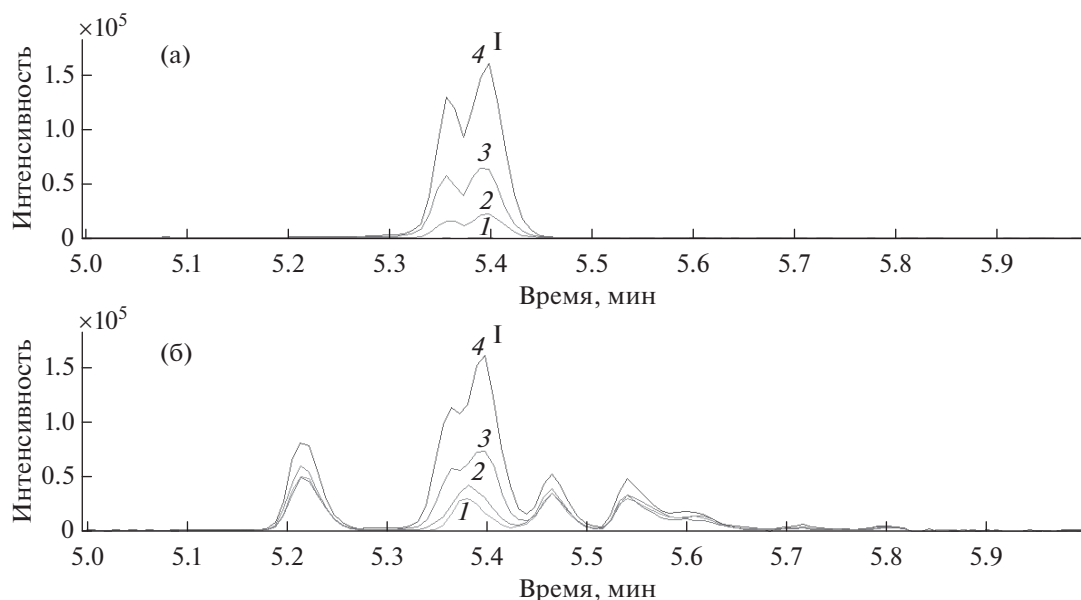


Рис. 1. Хроматограммы по выделенному иону (m/z 304.2271) модельного образца (а) и образца мочи (б) с добавками 0 (1), 10 (2), 50 (3), 100 (4) нг/мл тестостерона (1).

высокой (50 нг/мл) концентрации в течение одного и разных дней. Воспроизводимость выражали как относительное стандартное отклонение (s_r), а правильность находили по уравнению (1):

$$e_r = ((c_{\text{опр}} - c_{\text{теор}}) / c_{\text{теор}}) \times 100, \quad (1)$$

полученные результаты представлены в табл. 4.

Стабильность проб растворов контроля качества в автосамплере, прошедших через все этапы пробоподготовки, оценивали в течение 48 ч при 5°C. Установили, что отклонения в результатах не превышали 15%. Длительную стабильность оценивали в течение месяца путем проведения трех циклов заморозки (–20°C) и разморозки образцов контроля качества до комнатной температуры. В полученных результатах не было значительных отличий.

Анализ реальных образцов. Предложенный способ использовали для анализа реальных образцов с применением метода стандартной добавки. Для этого в образец мочи добавляли смеси аналитов трех концентраций (10, 50 и 100 нг/мл). На рис. 1 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 свидетельствует о пригодности методики для анализа реальных образцов.

Таким образом, разработан чувствительный, простой и воспроизводимый способ определения кетостероидов. Дериватизация с гидросиламином позволила значительно повысить чувствительность методики для большинства соединений по сравнению с нашей предыдущей работой [8], особенно для эстрогена. Анализ реальных образцов показал возможность применения предложенного способа для определения кетостероидов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norman A.W. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd Ed. New Delhi, India: Academic Press, 2003. P. 3166.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00606-4>
2. BIASON-LAUBER A. Disorders of steroid synthesis and metabolism / Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases / Eds. Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., Gibson K.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003. P. 551.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-55878-8_35

3. *Häkkinen M.R., Murtola T., Voutilainen R., Poutanen M., Linnanen T., Koskivuori J., Lakka T., Jääskeläinen J., Auriola S.* Simultaneous analysis by LC–MS/MS of 22 ketosteroids with hydroxylamine derivatization and underivatized estradiol from human plasma, serum and prostate tissue // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 164. P. 642. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.035
4. *Márta Z., Bobály B., Fekete J., Magda B., Imre T., Mészáros K.V., Bálint M., Szabó P.T.* Simultaneous determination of thirteen different steroid hormones using micro UHPLC–MS/MS with on-line SPE system // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 150. P. 258. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.014
5. *West C.D., Mahajan D.K., Chavré V.J., Nabors C.J., Tyler F.H.* Simultaneous measurement of multiple plasma steroids by radioimmunoassay demonstrating episodic secretion // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1973. V. 36. № 6. P. 1230. doi.org/
https://doi.org/10.1210/jcem-36-6-1230
6. *Oerter K.E., Guardabasso V., Rodbard D.* Detection and characterization of peaks and estimation of instantaneous secretory rate for episodic pulsatile hormone secretion // *Comput. Biomed. Res.* 1986. V. 19. № 2. P. 170. doi.org/
https://doi.org/10.1016/0010-4809(86)90014-5
7. *Chung S., Son G.H., Kim K.* Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1812. № 5. P. 581. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.003
8. *Dmitrieva E., Temerdashev A., Azaryan A., Gashimova E.* Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC–HRMS detection // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020. V. 159. Article 122390. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122390
9. *Higashi T., Ogawa S.* Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI–MS/MS quantification of steroids in biological samples: A review // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2016. V. 162. P. 57. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.003
10. *Higashi T.* Trace determination of steroids causing age-related diseases using LC/MS combined with detection-oriented derivatization // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2006. V. 54. № 11. P. 1479. doi.org/
https://doi.org/10.1248/cpb.54.1479
11. *He G., Wu Y., Lu J.* Doping control analysis of 13 steroids and structural-like analytes in human urine using Quadrupole-Orbitrap LC–MS/MS with parallel reaction monitoring (PRM) mode // *Steroids.* 2018. V. 131. P. 1. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.12.011
12. *Pitarch-Motellón J., Sancho J.V., Ibáñez M., Pozo O., Roig-Navarro A.F.* Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1515. P. 172. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.006
13. *Rincon A.V., Ostner J., Heistermann M., Deschner T.* Measuring urinary cortisol and testosterone levels in male Barbary macaques: A comparison of EIA and LC–MS // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019. V. 281. P. 117. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.05.017
14. *Huang X., Yuan D., Huang B.* Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection // *Talanta.* 2008. V. 75. № 1. P. 172. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.052
15. *Saito K., Yagi K., Ishizaki A., Kataoka H.* Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 52. № 5. P. 727. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.027
16. *Andersen D.W., Linnet K.* Screening for anabolic steroids in urine of forensic cases using fully automated solid phase extraction and LC–MS–MS // *J. Anal. Toxicol.* 2014. V. 38. № 9. P. 637. doi.org/
https://doi.org/10.1093/jat/bku098
17. *Denver N., Khan S., Homer N.Z.M., MacLean M.R., Andrew R.* Current strategies for quantification of estrogens in clinical research // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2019. V. 192. Article 105373. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.022
18. *Leong M.-I., Fuh M.-R., Huang S.-D.* Beyond dispersive liquid–liquid microextraction // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1335. P. 2. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021
19. *Higashi T., Shimada K.* Derivatization of neutral steroids to enhance their detection characteristics in liquid chromatography–mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. № 4. P. 875. doi.org/
https://doi.org/10.1007/s00216-003-2252-z
20. *Zhang T.-Y., Li S., Zhu Q.-F., Wang Q., Hussain D., Feng Y.-Q.* Derivatization for liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry analysis of small-molecular weight compounds // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 119. Article 115608. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.019
21. *Kushnir M.M., Rockwood A.L., Bergquist J., Varshavsky M., Roberts W.L., Yue B., Bunker A.M., Meikle A.W.* High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol // *Am. J. Clin. Pathol.* 2008. V. 129. № 4. P. 530. doi.org/
https://doi.org/10.1309/LC03BHQ5XJPJYEKG
22. *Sarigul N., Korkmaz F., Kurultak İ.* A new artificial urine protocol to better imitate human urine // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Article 20159. doi.org/
https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4
23. *Keski-Rahkonen P., Huhtinen K., Poutanen M., Auriola S.* Fast and sensitive liquid chromatography–mass spectrometry assay for seven androgenic and progestagenic steroids in human serum // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2011. V. 127. № 3–5. P. 396. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.06.006
24. *Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D., Wang X.* Quantitative-profiling method of serum steroid hormones by hydroxylamine-derivatization HPLC–MS // *Nat. Prod. Bioprospect.* 2019. V. 9. № 3. P. 201. doi.org/
https://doi.org/10.1007/s13659-019-0204-3

25. *Mousavi L., Tamiji Z., Khoshayand M.R.* Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method — A review // *Talanta*. 2018. V. 190. P. 335. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.002>
26. *Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandão G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S., dos Santos W.N.L.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 597. № 2. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
27. *Ebrahimi-Najafabadi H., Leardi R., Jalali-Heravi M.* Experimental design in analytical chemistry — Part I: Theory // *J AOAC Int*. 2014. V. 97. № 1. P. 3. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.sgeebrahimi1>
28. *Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escaleira L.A.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry // *Talanta*. 2008. V. 76. № 5. P. 965. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
29. Food and Drug Administration Guidance. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, 2018 (02.04.2021).