

УДК 543.63+543.544.5.068.7

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2022 г. Е. В. Дмитриева<sup>а</sup>, \*, А. З. Темердашев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Кубанский государственный университет  
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

\*e-mail: catherine\_dmitrieva@outlook.com

Поступила в редакцию 10.02.2022 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 21.02.2022 г.

Разработан способ одновременного определения стероидных гормонов различных классов (андрогенов, прогестинов и глюкокортикоидов) в слюне человека с использованием жидкостно-жидкостной экстракции и детектированием методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии. Установлено, что наиболее подходящим растворителем для извлечения целевых аналитов является метил-*трет*-бутиловый эфир. Объем экстрагента и другие факторы, влияющие на извлечение аналитов из анализируемой матрицы, оптимизировали с применением многофакторного анализа (план Бокса–Бенкена). В оптимальных условиях степени извлечения аналитов составили более 90%, а пределы обнаружения лежали в диапазоне 50–250 пг/мл, что указывает на высокую чувствительность предложенной методики.

**Ключевые слова:** стероидные гормоны, слюна, определение, жидкостно-жидкостная экстракция, УВЭЖХ-МС/МС.

**DOI:** 10.31857/S0044450222120027

Содержание стероидных гормонов в биологических жидкостях человека является важным показателем состояния его здоровья. В случае если наблюдается изменение их концентраций, можно предполагать развитие различных заболеваний, поэтому определение стероидных гормонов имеет важную диагностическую ценность.

Стероидные гормоны традиционно определяют в моче и плазме человека. При анализе мочи получают усредненные концентрации стероидных гормонов за несколько часов – сутки, а состав плазмы отражает концентрации данных соединений в реальном времени. Недостатком анализа плазмы является инвазивность отбора проб и наличие болевых ощущений, поэтому в настоящее время в качестве альтернативной матрицы для определения стероидных гормонов все чаще рассматривается слюна. Ее основными преимуществами являются неинвазивность [1] и простота процедуры пробоотбора, стабильность образцов при комнатной температуре, а также отсутствие необходимости привлечения квалифицированного персонала для отбора проб [2].

Проведенные к настоящему времени исследования показывают возможность применения слюны для определения стероидных гормонов. Так, изменение содержания кортизола в слюне позволяет диагностировать синдром Кушинга [3], определение прогестерона позволяет определить фолликулярную и лютеиновую фазы цикла у женщин [2], изменение уровней тестостерона может указать на развитие андрогензависимых заболеваний как у мужчин (дефицит андрогенов, гипогонадизм) [2, 4], так и у женщин (гирсутизм, поликистоз яичников) [3, 5].

Возможность применения слюны в качестве альтернативной матрицы обусловлена высокими корреляциями между концентрациями ряда стероидных гормонов в плазме и слюне [3, 6], что связано с механизмом попадания стероидных гормонов в слюну человека. Установлено [7], что неконъюгированные стероидные гормоны попадают в слюну путем диффузии через клетки слюнных желез ввиду их липофильной природы, и их концентрация не зависит от скорости секреции слюны, а следовательно, может отражать содержание свободных (не связанных с белками) стероидов в плазме [2, 3, 8–10].

Основным недостатком слюны в качестве объекта исследования является необходимость применения высокочувствительных методов для определения данных соединений, поскольку их содержание в слюне значительно ниже по сравнению с плазмой [11]. Наиболее простым способом анализа слюны является иммуноферментный анализ, однако он недостаточно селективен, что может приводить к получению завышенных результатов, особенно на низких уровнях концентраций. Кроме того, данный способ позволяет определять лишь один показатель за анализ, что является его ограничением при определении стероидного профиля. Альтернативный способ – использование хроматографических методов с масс-спектрометрическим детектированием, обладающих высокими чувствительностью и селективностью, особенно с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM).

Учитывая крайне низкие концентрации стероидных гормонов в слюне человека, для их надежного определения необходимо применение концентрирования. Наиболее часто для этого используют жидкостно-жидкостную экстракцию [3]. При

этом большинство исследований направлено на определение ограниченного перечня соединений [3, 4, 8, 10, 12, 13] и не дает полного представления о стероидном профиле человека, применение которого наиболее эффективно при диагностировании заболеваний. Одновременное определение стероидных гормонов различных классов дает более точную информацию о гормональном статусе по сравнению с единичным показателем [14].

Цель данной работы – разработка унифицированной методики определения стероидных гормонов различных классов (андрогенов, прогестинов, глюкокортикоидов) в слюне человека методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и методы.** Стандартные образцы тестостерона, кортизона, гидрокортизона (кортизола), кортикостерона, прогестерона,  $11\alpha$ -гидроксипрогестерона (схема 1) и метилтестостерона (внутренний стандарт) приобретали у Sigma-Aldrich (США).

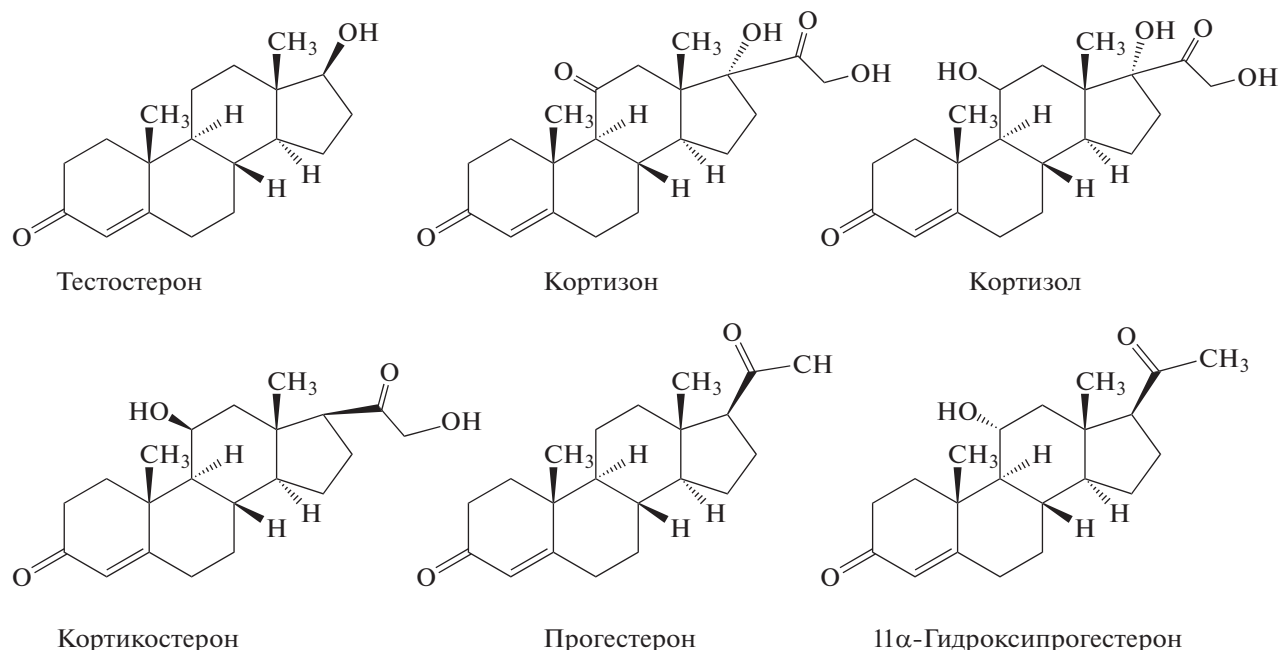


Схема. 1. Структурные формулы определяемых соединений.

Метил-*трет*-бутиловый эфир (для ВЭЖХ-ИК-УФ, 99.9%) и метанол (для ВЭЖХ) приобретали у PanReac (Испания) и J.T. Baker (Великобритания) соответственно. Использовали дихлорметан, трихлорметан и тетрахлорметан, этилацетат, гексан (99%) (ЭКОС-1, Россия), а также дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия,

тетрагидроборат натрия и гидроксид натрия (99%) для приготовления буферных растворов (Вектон, Россия).

**Приборы и оборудование.** Для УВЭЖХ-МС/МС-анализа использовали систему, состоящую из ультравысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate-3000 и тройного

квадрупольного масс-спектрометра Thermo TSQ Access Max (San-Jose, USA). Для разделения аналитов применяли аналитическую колонку Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм), оснащенную соответствующей предохранительной колонкой в режиме градиентного элюирования при температуре термостатирования 40°C (табл. 1).

Для ионизации исследуемых соединений использовали нагреваемый источник ионизации электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов (табл. 2). Аналиты детектировали в режиме мониторинга выбранных реакций посредством соударительной диссоциации иона-предшественника (газ-мишень аргон, давление 1.5 мТорр) и определения ионов-продуктов (табл. 3). Условия детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций оптимизировали путем напуска определяемых веществ в камеру источника ионизации с использованием шприцевого ввода.

**Приготовление стандартных растворов.** Стандартные растворы стероидных гормонов с концентрацией 1 мг/мл готовили в метаноле и хранили при 4°C в течение месяца. Градуировочные растворы с концентрациями 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 нг/мл готовили последовательным разбавлением стандартных растворов в метаноле и хранили при 4°C в течение месяца. Растворы контроля качества с концентрациями 10, 50 и 250 нг/мл готовили отдельно от градуировочных растворов в метаноле. Рабочий раствор внутреннего стандарта метилтестостерона с концентрацией 200 нг/мл в метаноле хранили в холодильной камере при 4°C.

Фосфатный буферный раствор (рН 8) готовили с использованием 0.067 М растворов дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия. Для приготовления боратного буферного раствора (рН 10) применяли 0.05 М раствор тетрагидробората натрия и 0.1 М раствора гидроксида натрия.

**Отбор проб 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 –20°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор условий отбора проб слюны для анализа.** Поскольку результаты анализа зависят от условий отбора проб слюны, предварительно рассмотрели влияние различных факторов на концентрации стероидных гормонов.

Коммерчески доступные контейнеры, такие как Salivette®, являются одними из наиболее ши-

**Таблица 1.** Условия градиентного элюирования аналитов (скорость потока подвижной фазы 0.4 мл/мин)

Время, мин	0.1%-ная муравьиная кислота в воде (элюент А)	0.1%-ная муравьиная кислота в метаноле (элюент Б)
0.0	90	10
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

**Таблица 2.** Параметры 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

роко используемых для получения образцов слюны. Тем не менее исследования показали, что содержащийся в них тампон, пропитываемый слюной при жевании, может влиять на результаты определения гормонов. Так, применение синтетического тампона существенно не влияет на результаты определения кортизола, в то время как концентрации других стероидных гормонов, в частности тестостерона, изменяются при его использовании [1]. Применение хлопкового тампона приводит к сорбции аналитов и, соответственно, к искажению результатов, поэтому оптимальным является прямой отбор проб слюны [2].

Прямой отбор проб можно проводить со стимулированием секреции слюны (например, лимонной кислотой, жвачкой без сахара, парафином) или без него. При использовании жвачки наблюдали увеличение концентрации тестостерона и кортизола, что затрудняет ее использование. Стимулирование слюноотделения различными методами приводило к изменению концентрации кортизола, поэтому при определении стероидного профиля оптимальным является отбор нестимулированной слюны в обычные полипропиленовые пробирки [1].

Другим важным требованием является отсутствие крови в слюне из-за механических повреждений в полости рта, например, при чистке зу-

**Таблица 3.** Условия масс-спектрометрического детектирования 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 <sup>a</sup>	22		
		109.2	25		
Кортизон	361.2	105.2	38	79	3.59
		121.1	27		
		163.1 <sup>a</sup>	22		
Кортизол	363.2	121.1 <sup>a</sup>	24	86	3.81
		267.1	17		
		309.1	15		
Кортикостерон	347.2	91.2	48	68	4.47
		121.1 <sup>a</sup>	24		
		293.2	15		
Прогестерон	315.2	79.2	39	76	5.35
		97.2 <sup>a</sup>	21		
		109.2	26		
11 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон	331.2	105.2	38	74	4.65
		121.1 <sup>a</sup>	25		
		271.2	16		
Метилтестостерон <sup>б</sup>	303.2	79.2	40	83	5.14
		97.2	25		
		109.2 <sup>a</sup>	27		

<sup>a</sup> Ион, используемый для количественной оценки, <sup>б</sup> внутренний стандарт.

бов. Поскольку концентрации стероидных гормонов в слюне значительно ниже по сравнению с содержанием в крови, в случае ее попадания в слюну получаемые результаты будут значительно завышены. В случае присутствия в образце слюны 0.1–0.2% крови она приобретает розовый оттенок, что позволяет визуально оценить загрязнение анализируемого образца [6].

Кроме того, при определении глюкокортикоидов необходимо учитывать влияние фермента 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы II, под действием которого в слюнных железах происходит конверсия кортизола в неактивную кетоформу (кортизон) [2]. Это приводит к расхождениям в получаемых результатах, поэтому необходимо определять не только активную форму (кортизол), но и его неактивную кетоформу.

**Оптимизация условий жидкостно-жидкостной экстракции.** При оптимизации типа экстрагента рассматривали следующие растворители: ди-, три- и тетрахлорметан, этилацетат, гексан и метил-*трет*-бутиловый эфир. К 1 мл модельного образца (дистиллированная вода), содержащего исследуе-

мые соединения с концентрацией 50 нг/мл, добавляли 1 мл экстрагента, перемешивали в течение 30 с на ворткексе, центрифугировали образец 10 мин при 4000 об/мин, шприцем отбирали фазу экстрагента, упаривали ее досуха и вновь растворяли в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему).

Этилацетат, хлороформ и метил-*трет*-бутиловый эфир обеспечивали количественное извлечение всех аналитов (>70%). Для дальнейших исследований выбрали метил-*трет*-бутиловый эфир ввиду его невысокой температуры кипения (55°C), а также меньшей токсичности по сравнению с хлорированными растворителями.

Оптимальный объем экстрагента, pH и время перемешивания на ворткексе устанавливали с применением многофакторного анализа (план Бокса–Бенкена). Для обработки полученных результатов использовали ПО STATISTICA 10 (Statsoft). Уровни факторов представлены в табл. 4.

Для нахождения оптимальных уровней исследуемых факторов в модельный образец (1 мл, концентрация аналитов 50 нг/мл) добавляли 0.3 мл буферного раствора (pH 8 и 10) или 0.3 мл

**Таблица 4.** Уровни оптимизируемых факторов (план Бокса–Бенкена)

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

дистиллированной воды (pH 6). Затем в образец добавляли метил-*трет*-бутиловый эфир и перемешивали его на вортексе в течение 30 с. После этого водный слой вымораживали при  $-35^{\circ}\text{C}$  и переносили эфир, содержащий аналиты, в пробирку для упаривания на твердотельном нагревателе при  $60^{\circ}\text{C}$  с последующим растворением сухого остатка в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) для анализа.

Все полученные модели оказались значимыми, поскольку скорректированные коэффициенты детерминации ( $R_{\text{adj}}^2$ ) превышали 0.9. Поскольку свойства определяемых соединений отличаются, оптимальные уровни факторов также имели разные значения для исследуемых аналитов. Объем метил-*трет*-бутилового эфира оказывал наибольшее влияние на степени извлечения аналитов: с увеличением объема экстрагента степень извлечения возрастала, поэтому для дальнейших исследований выбрали объем 1.5 мл, который в совокупности с другими факторами обеспечивал высокие степени извлечения аналитов. Время перемешивания также влияет на степени извлечения аналитов, при этом значение 30 с оптимально для всех аналитов. Увеличение pH среды не приводило к получению более высоких степеней извлечения аналитов, поэтому в последующих экспериментах буферный раствор не добавляли.

Таким образом, пробоподготовку проводили в следующих условиях: к 1 мл образца слюны добавляли внутренний стандарт (метилтестостерон с конечной концентрацией 20 нг/мл). Затем вносили 1.5 мл метил-*трет*-бутилового эфира, перемешивали на вортексе в течение 30 с, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, вымораживали водную фазу при  $-35^{\circ}\text{C}$  с последующим переносом органической фазы в другую пробирку и ее упариванием досуха при  $60^{\circ}\text{C}$  с растворением 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.

Валидация разработанного способа. Стероидные гормоны являются эндогенными соединениями, для них отсутствуют матрицы, не содержащие целевых аналитов, поэтому валидацию методики проводили на модельных растворах (дистиллированная вода), а также с использованием метода введено–найденно на реальных образцах с учетом критериев Food and Drug Administration (США) по валидации биоаналитических методик [15].

Градуировочные зависимости строили в диапазоне концентраций 0.05–50 нг/мл (0.05, 0.10, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 25, 50 нг/мл). Предел обнаружения соответствовал концентрации, обнаруживаемой при соотношении сигнал/шум, равном 3, в то время как пределу определения соответствовала концентрация аналита, устанавливаемая с погрешностью 15%. Полученные результаты представлены в табл. 5.

Правильность и воспроизводимость контролировали путем анализа растворов контроля качества на трех уровнях концентраций: низком (1 нг/мл), среднем (5 нг/мл) и высоком (25 нг/мл) в течение одного и нескольких дней. Воспроизводимость оценивали с помощью относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ), а правильность с применением уравнения (1):

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

где  $e_r$  – относительная погрешность. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Стабильность реальных образцов слюны, содержащих исследуемые аналиты, оценивали в течение месяца с проведением двух циклов заморозки ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) и разморозки до комнатной темпе-

**Таблица 5.** Аналитические характеристики методики

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	$R^2$
Тестостерон	0.05	0.1	0.1–50	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	0.1	0.1–50	0.999
11 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон	0.05	0.1	0.1–50	0.999

**Таблица 6.** Результаты оценки правильности и воспроизводимости методики способом введено–найдено ( $n = 15$ ,  $P = 0.95$ )

Аналит	Концентрация раствора контроля качества, нг/мл	В один день		В разные дни	
		$e_r, \%$	$s_r, \%$	$e_r, \%$	$s_r, \%$
Тестостерон	1	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	-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	-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	-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	-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 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон	1	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

ратуры. Аналиты сохраняли стабильность в течение этого времени, поскольку полученные результаты отличались менее чем на 15% от первоначальных, что согласуется с результатами [10].

Стабильность растворов в автосамплере оценивали в течение 36 ч при 5°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 с MRM-переходами, аналогичными целевым соединениям.

**Анализ реальных образцов.** Предложенный способ использовали для анализа реальных образцов, полученных от добровольцев. Перед проведением анализа образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. Анализ проводили методом введено–найдено путем добавления растворов контроля качества низкой (1 нг/мл), средней (5 нг/мл) и высокой (25 нг/мл) концентраций. Установили, что матричные компоненты существенно не влияют на получаемые результаты, поскольку погрешность определения составила <15%.

\*\*\*

Таким образом, разработан и валидирован простой и чувствительный (пределы обнаружения в диапазоне 0.05–0.25 нг/мл) способ определения стероидных гормонов методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в слюне человека. Возможность одновременного чувствительного определения стероидных гормонов различных классов делает слюну перспективной матрицей для диагностических целей, обладающей большим количеством преимуществ по сравнению с кровью.

*Инновационный проект выполнен при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП-20.1/4.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Büttler R.M., Bagci E., Brand H.S., den Heijer M., Blankenstein M.A., Heijboer A.C. Testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone levels in human unstimulated, stimulated and parotid saliva // *Steroids*. 2018. V. 138. P. 26.  
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.05.013>

2. *Gröschl M.* Current status of salivary hormone analysis // *Clin. Chem.* 2008. V. 54. № 11. P. 1759. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108910>
3. *Turpeinen U., Hämäläinen E., Haanpää M., Dunkel L.* Determination of salivary testosterone and androstenedione by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta.* 2012. V. 413. № 5–6. P. 594. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.029>
4. *Shibayama Y., Higashi T., Shimada K., Odani A., Mizokami A., Konaka H., Koh E., Namiki M.* 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 // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. V. 877. № 25. P. 2615. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.051>
5. *Baxendale P.M., Jacobs H.S., James V.H.* Plasma and salivary androstenedione and dihydrotestosterone in women with hyperandrogenism // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1983. V. 18. № 5. P. 447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1983.tb02874.x>
6. *Wood P.* Salivary steroid assays – Research or routine? // *Ann. Clin. Biochem.* 2009. V. 46. P. 183. <https://doi.org/10.1258/acb.2008.008208>
7. *Vining R.F., McGinley R.A., Symons R.G.* Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation // *Clin. Chem.* 1983. V. 29. № 10. P. 1752.
8. *Macdonald P.R., Owen L.J., Wu F.C., Macdowall W., Keevil B.G.* A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for salivary testosterone with adult male reference interval determination // *Clin. Chem.* 2011. V. 57. № 5. P. 774. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.154484>
9. *Hofman L.F.* Human saliva as a diagnostic specimen // *J. Nutr.* 2001. V. 131. № 5. P. 1621S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1621S>
10. *Matsui F., Koh E., Yamamoto K., Sugimoto K., Sin H.-S., Maeda Y., Honma S., Namiki M.* 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 // *Endocr. J.* 2009. V. 56. № 9. P. 1083. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k09e-186>
11. *Ellison P.* Human salivary steroids: Methodological considerations and applications in physical anthropology // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1988. V. 31. P. 115. <https://doi.org/10.1002/AJPA.1330310507>
12. *Jensen M.A., Hansen A.M., Abrahamsson P., Nørgaard A.W.* Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2011. V. 879. № 25. P. 2527. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.005>
13. *Ney L.J., Felmingham K.L., Bruno R., Matthews A., Nichols D.S.* Simultaneous quantification of endocannabinoids, oleoylethanolamide and steroid hormones in human plasma and saliva // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020. V. 1152. Article 122252. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122252>
14. *Gomez-Gomez A., Miranda J., Feixas G., Betegon A.A., Crispi F., Gratacós E., Pozo O.J.* Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Steroid Biochem. Mol.* 2020. V. 197. Article 105520. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105520>
15. Food and Drug Administration Guidance. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (02.02.2022).