APP NOTE-12/2020GCMS



Стероидный профиль слюны человека методом газовой хромато-масс-спектрометрии с помощью системы **«Маэстро-αMS»**.

Колунтаев Д. А. *к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

Ключевые слова

Газовая хромато-масс-спектрометрия, стероидный профиль, слюна, гормоны, Маэстро-αMC, SIM Wizard®, iDwellTime.

Резюме

Девять стероидных гормонов (дегидроэпиандростенедион, андростенедон, эстрадиол, тестостерон, прегненолон, прогестерон, 17-гижроксипрогестерон, кортизон, кортизол) были детектированы с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии с моноквадрупольным масс-детектором Маэстро-αMC. В качестве дериватизирующего агента была выбрана смесь *N*-метил-*N*-триметилсилилтрифтроацетамид (MSTFA), иодид аммония и дитиоэритритиол (100:2:1,5, v/w/w). В ходе работы были получены триметилсилильные производные (TMS-). Целью данного исследования была разработка и оптимизация условий подготовки пробы и детектирования стероидного профиля слюны человека.

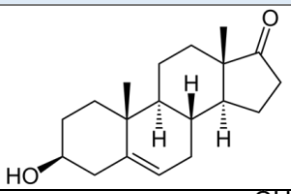
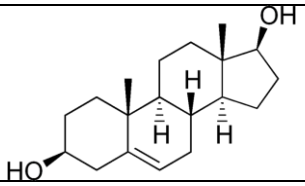
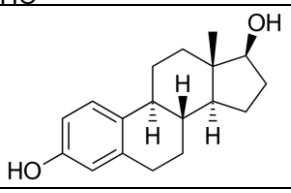
Введение

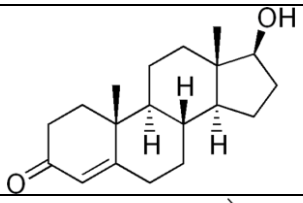
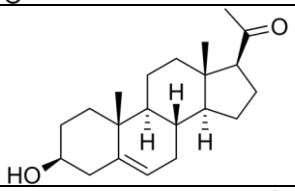
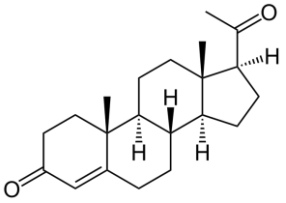
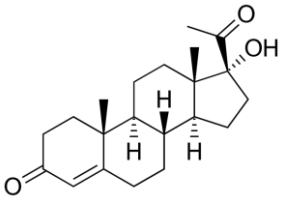
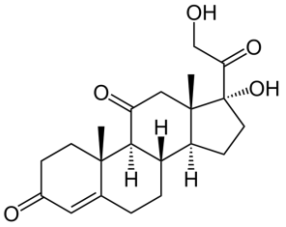
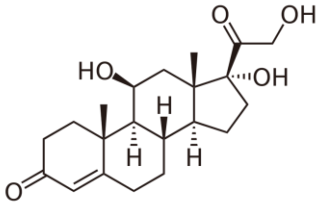
С появлением новых аналитических методов, позволяющих определять низкие концентрации различных химических веществ, в клинической практике заметно выросли и интересы к исследованиям различных биологических матриц, отличающихся от ранее широко применяемых (кровь, моча). Наиболее ярким примером является исследование слюны человека. Это подтверждает и рост научных статьей и публикаций за последние несколько лет, в которых отмечается использование слюны, как легкодоступной биологической жидкости человека [1 – 5].

Преимущество проведения анализа различных химических веществ в слюне заключается в безболезненном и не повреждающем кожные покровы способе сбора образцов, что очень важно для людей, например, страдающих гемофилией или боящихся венепункции. Кроме этого, реакция в ответ на венепункцию может повлиять на уровень глюкокортикоидов, что следует учитывать при диагностике болезни Иценко-Кушинга. Ежедневный сбор слюны для определения фазы менструального цикла, циркадного ритма, фармакокинетики лекарственных средств возможен в домашних условиях, а также во время спортивных соревнований, что говорит об удобстве использования слюны, как биологической матрицы для проведения анализа [5].

Интерес врачей к исследованию слюны подогревается также её потенциальной ценностью для диагностики системных и локальных патологических состояний. Многочисленные наблюдения демонстрируют взаимосвязь заболеваний слюнных желез, а также состава слюны с заболеваниями других органов и их систем, такими как поражения надпочечников и поджелудочный железы, острыми и хроническими респираторными заболеваниями, сахарным диабетом и др. [6, 7]. Отмечается, что слюнные железы активно участвуют в поддержании общего гормонального гомеостаза благодаря присущей им внутрисекреторной функции [6, 8, 9]. Поэтому уже давно предпринимаются попытки определения в слюне стероидных гормонов (табл. 1), которые, как полагают, представляют собой свободную фракцию стероидных гормонов крови [10, 11].

Табл. 1. Перечень стероидных гормонов, их характеристики и структурные формулы.

Названием стероида	*Молекулярная формула*	*Молекулярный вес, г/моль*	*Структура*
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	$C_{19}H_{28}O_2$	288,424	
Androstenedion	$C_{19}H_{26}O_2$	290.44	
Estradiol (17β-)	$C_{18}H_{24}O_2$	272.38	

Testosteron	$C_{19}H_{28}O_2$	288.431	
Pregnenolon	$C_{21}H_{32}O_2$	316.483	
Progesteron	$C_{21}H_{30}O_2$	314.5	
17α-Hydroxyprogesterone	$C_{21}H_{30}O_3$	330.46	
Cortison	$C_{21}H_{28}O_5$	360,45	
Cortisol	$C_{21}H_{30}O_5$	362.460	

Изо дня в день человек подвергается многочисленным стрессорным воздействиям, в ответ на которые в организме происходит выброс катехоламинов и стероидных гормонов. Определение катехоламинов в слюне, вследствие их нестабильности и низкой концентрации, практически невозможно. Поэтому наиболее правильным решением является анализ уровня **кортизола**, повышение которого характерно для хронического стресса. Забор образцов слюны в отличие от забора крови не вызывает у обследуемого психологического напряжения. Поэтому, исследование уровня кортизола в слюне для психологической оценки стресс-неустойчивых пациентов, более предпочтительно. Но следует также учитывать и то, что концентрация кортизола в слюне значительно ниже, чем в плазме крови, что зачастую выступает как ограничивающий фактор в определении корреляции между уровнем этого гормона и развитием хронического стресса [5].

Определение кортизола в слюне используют не только для оценки стрессорных состояний, но и в целях диагностики таких патологических процессов, как явление гиперкортицизма (*синдром Иценко - Кушинга)*. Синдром гиперкортицизма проявляется в избыточном образовании гормонов коры надпочечников, и наиболее часто эндогенный гиперкортицизм обусловлен повышенной выработкой в гипофизе адренокортикотропного

гормона. Он может возникнуть на фоне передозировки глюкокортикоидов при лечении различных заболеваний (экзогенный гиперкортицизм). Достаточно часто гиперсекреция кортизола наблюдается при ожирении, хронической алкогольной интоксикации, беременности и некоторых психических и неврологических заболеваниях (функциональный гиперкортицизм). У пациентов с гиперкортицизмом секреция кортизола повышена круглосуточно. Именно поэтому круглосуточный мониторинг уровня кортизола удобнее проводить по слюне, а не по плазме крови. Существенным моментом для этих пациентов является то, что для такого исследования не требуется их госпитализация, а сбор слюны можно проводить и в домашних условиях для последующего анализа в лаборатории.

При врождённой гиперплазии коры надпочечников *(изменение строения тканей, сопровождающееся увеличением в них количества составляющих их клеток)* в слюне определяются высокие концентрации предшественника *кортизола* – **17-гидроксипрогестерона**, уровень которого следует анализировать в слюне трижды в день. Данный показатель позволяет судить о качестве заместительной терапии врождённой гиперплазии надпочечников кортизолом, преднизолоном и дексаметазоном. При многих формах врожденной гиперплазии коры надпочечников усиливается секреция в этих эндокринных железах андрогенов. Это приводит к вирилизации пациенток женского пола. Поэтому в дополнении к исследованию 17-гидроксипрогестерона в слюне можно определять уровень **андростендиона**.

Появлению типичных признаков половой зрелости предшествует повышение активности надпочечников, отражающееся на уровне **дегидроэпиандростерон** (ДГЭА). ДГЭА образуется в коре надпочечников и частично в половых железах из *17-гидроксипрогестерона* и через фосфолипидный слой мембран эпителиальных клеток расположенных рядом кровеносных сосудов свободно попадает в полость рта и слюну. При этом низкий уровень ДГЭА в слюне обнаруживают при задержке полового созревания, а его повышение наблюдается при преждевременном половом созревании. Стоит также отметить, что согласно литературным данным, наблюдается отсутствие корреляции между уровнями ДГЭА в образцах слюны и плазмой крови. Также количественная характеристика ДГЭА является маркером стресса в психологических исследованиях и в спортивной медицине.

Определение женских и мужских половых гормонов (андрогены, эстрогены и прогестерон) в слюне имеет важную клиническую значимость. По исследованию концентрации **эстрадиола** и **прогестерона** в слюне определяют фазы овуляционного цикла. Также определение концентраций прогестерона является важным показателем оценки функции яичников. В частности, концентрация прогестерона в слюне в фолликулярную фазу значительно меньше, а в периовуляционный период его концентрация достигает пиковых значений. Стоит отметить, что определение прогестерона в слюне (реже эстрадиола) необходимо проводить в комплексе с выявлением уровня этих гормонов в моче.

Многие исследования показали, что концентрация **тестостерона** в слюне хорошо коррелирует с концентрацией свободной фракции тестостерона в организме. Количество тестостерона в слюне используется для выявления мужского гипогонадизма или эугонадизма.

Андростендион образуется в надпочечниках и гонадах и является промежуточным продуктом при синтезе как тестостерона, так и эстрона. У женщин секреция и скорость образования андростендиона выше таковых для тестостерона, причем значительно выражена вненадпочечниковая конверсия андростендиона в тестостерон. Наиболее

высокие уровни андростендиона определяются утром. Повышенные уровни свидетельствуют о врожденной вирилизирующей гиперплазии надпочечников, синдроме поликистозных яичников, стромальном гипертекозе яичников, дефиците 3β-гидрокси-стероиддегидрогеназы и других случаях гирсутизма (оволосение по мужскому типу) у женщин, при вирилизирующих опухолях надпочечников или яичников. В слюне женщин в норме концентрация андростендиона невысока, а при гирсутизме она возрастает в 2-6 раз. У мужчин в слюне уровень этого гормона не отличается от такового у женщин.

Целью настоящего исследования является разработка чувствительного и мультикомпонентного метода определения стероидных гормонов в слюне человека, для чего предложено использовать метод газовой хромато-масс-спектрометрии, который является универсальным аналитическим решением, позволяющим получить быстрый и высокочувствительный результат. Селективность метода делают его применение особенно выгодным при работе со сложными биологическими образцами, где желательно исключение сильного влияния матричных интерферирующих компонентов пробы. Процесс силилирования целевых гормонов является универсальным методом, используемым для придания им свойств летучести органических соединений, что в свою очередь обеспечивает подъём чувствительности и ГХ-МС метода.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Метанол, изо-пентан, бидистиллированная вода – все используемые в эксперименте реагенты имели классификацию, как особо чистые или марку качества «HPLC grade». В качестве процедуры дериватизации использовали реакцию силилирования с образованием триметилсилильных производных с помощью дериватизирующего агента MSTFA с иодидом аммония NH_4I, а также дитиоэритритиолом (DTE) в качестве катализатора (соотношение компонентов в смеси MSTFA/NH_4I/DTE 100%/2%/1.5% (v/w/w)). В качестве внутреннего стандарта использовали стандарт метиловый эфир тестостерона.

Для приготовления смеси стандартных веществ использовали раздельные стандарты каждого стероида, с чистотой веществ не менее 99%. Смесь стандартных растворов приготавливали в метаноле с первичной концентрацией 1 мг/мл для каждого соединения.

Процедура сбора слюны и экстракции стероидов

Для исследования и апробации методики использовали образцы слюны, полученные из аккредитованной лаборатории института аналитической токсикологии[1].

Методы сбора слюны и её хранения влияют на уровень гормонов в слюне. Существуют различные способы получения слюны. Они включают сбор данной биологической жидкости без стимуляции и с применением таких стимуляторов как парафин, лимонная кислота и др. Однако, анализируя стимулированную слюну следует помнить об эффекте разведения, обусловленном большим содержанием воды по сравнению с не стимулированной слюной. В связи с этим пробы отбирали без дополнительной стимуляции с помощью влаговпитывающего хлопкового тампона (рис. 1), помещённого в защечное пространство полости рта (в течение 5 мин).

[1] *Основан в 2010 году; независимая клинико-диагностическая лаборатория, ключевым направлением деятельности которой является разработка и внедрение новых методов масс-спектрометрии в медицине и диагностике.*

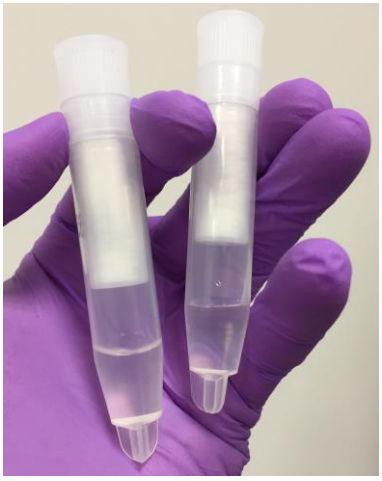


Рис. 1. Специализированный картридж для отбора слюны с влаговпитывающим хлопковым тампоном (после центрифугирования картриджа).

Отбор проб проводился в утреннее время специалистами в соответствии с принятым регламентом процедуры отбора слюны. В случае, когда немедленный анализ был невозможен, образцы слюны замораживали или хранили при температуре -5°C ÷ -18°C.

Образец слюны объемом 1,0 мл помещали в пробирку на 10 мл и к исследуемому образцу добавляли 20,0 мкл раствора внутреннего стандарта тестостерона метилового эфира (1,0 мкг/мл (ppm) в метаноле). Раствор наносили на подготовленный кондиционированный картридж для твёрдофазной экстракции вместимостью 1 мл и под действием вакуума избавлялись от воды, связывая при этом целевые компоненты с полярной фазой сорбента. Для элюирования компонентов с сорбента использовали 1,0 мл метанола, после чего полученную органическую фазу сушили с помощью ротационного испарителя Eppendorf (Concentrator 5301) в течение 40 мин при 60°C.

Дериватизация

К высушенному остатку добавляли 50 мкл силилирующего реагента (MSTFA + 2.0% NH_4I + 1.5% DTE, v/w/w), после чего виалу помещали в термостат при 90°C в течение 10 мин. Полученную дериват инжектировали в хроматограф в объёме 2,0 мкл.

Газовая хроматография и масс-спектрометрия

Масс-спектры и сигналы структурно-характеристических ионов были получены на приборе Маэстро-αMC (ООО «Интерлаб», Россия). Ионизацию молекул выполняли в источнике ионов электронной ионизации с энергией ионизирующих электронов 70 эВ при температуре 230°C. Масс-спектры полного сканирования (m/z 50-700) были получены с целью идентификации и изучения структурно-характеристических ионов целевых соединений. Разделение смеси стероидов осуществляли с помощью капиллярной колонки из плавленого кварца RTx-5MS (*Restek, Cat# 12623*).

Параметры работы хроматографической системы и режимы работы масс-детектора представлены в таблице 2 и 3, соответственно.

Табл. 2. Параметры инструментального метода.

Оборудование	
ГХ-МС система	ООО Интерлаб, «Маэстро-αMC», Россия
Испаритель	Split/Splitless прямой лайнер: *Topaz (Restek) Cat#23300* (4 mm x 6,3 x 78,5),
Хроматографическая колонка	RTx-5MS (30m x 0,25mm; 250um)
Параметры хроматографического разделения	
Объём пробы	2,0 мкл
Режим испарителя	Ввод пробы в режиме **Splitless**, время работы режима 1,0 мин, далее поток 70 мл/мин.
Экономия газа-носителя	20 мл/мин после 5,0 мин

T° испарителя	300°C
Режим работы испарителя	Режим Constant Flow
Градиент t° печи	160°C в течение 0,0 мин; 18,0°C/мин до 250°C, удержание 0,0 мин; 5,0°C/мин до 310°C, удержание 2,0 мин;
Скорость газа-носителя	(He) 1,0 мл/мин
T° интерфейса МС	300°C
Параметры детектирования	
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*
T° источника	250°C
Задержка растворителя	8.0 мин
Режимы сканирования	SIM (параметры указаны ниже)
Параметр Dwell Time	Принцип расчёта согласно методу iDwell® Time, схема сегментирования сканирования:

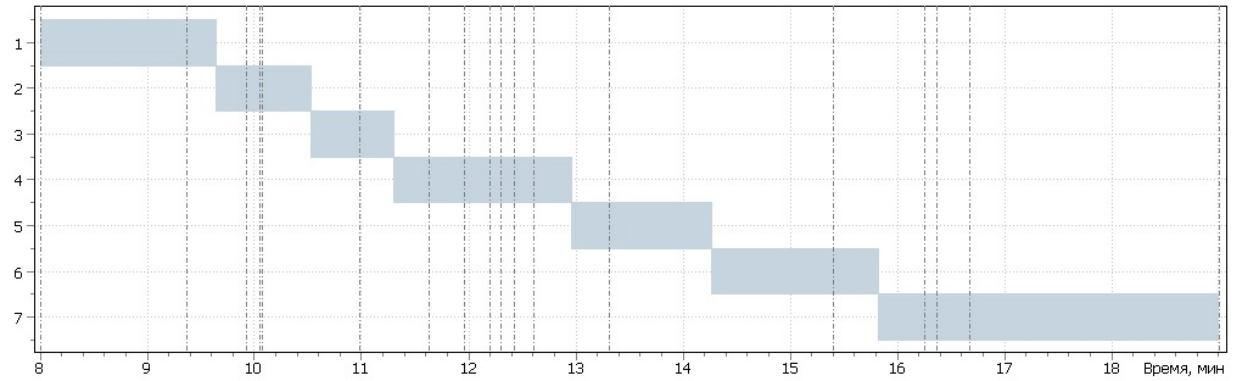
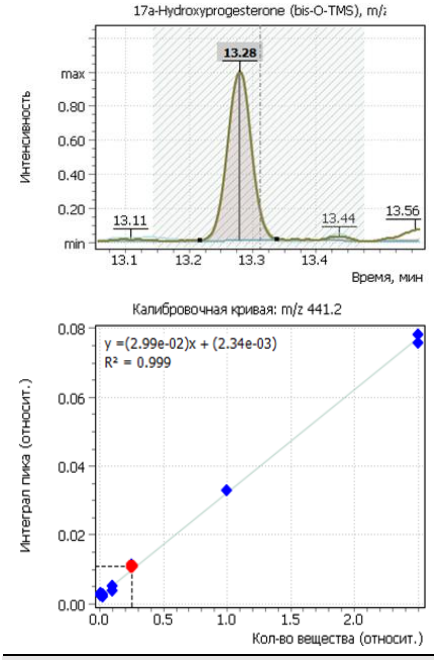
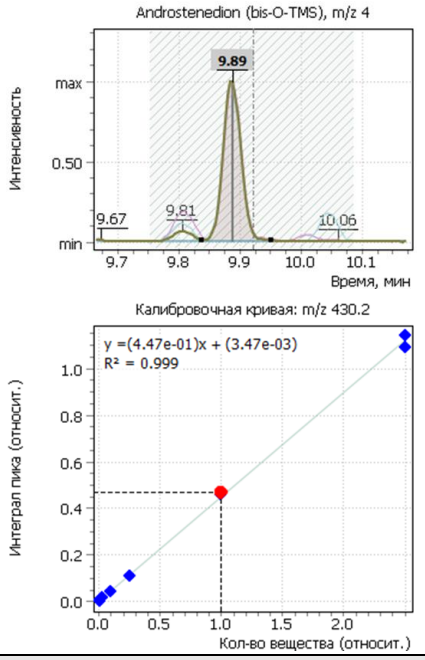
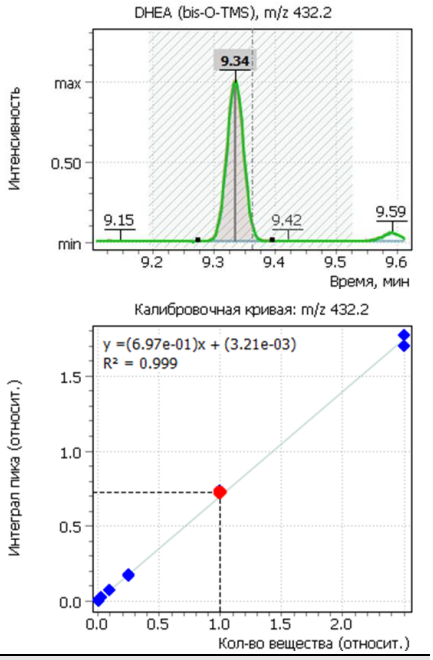
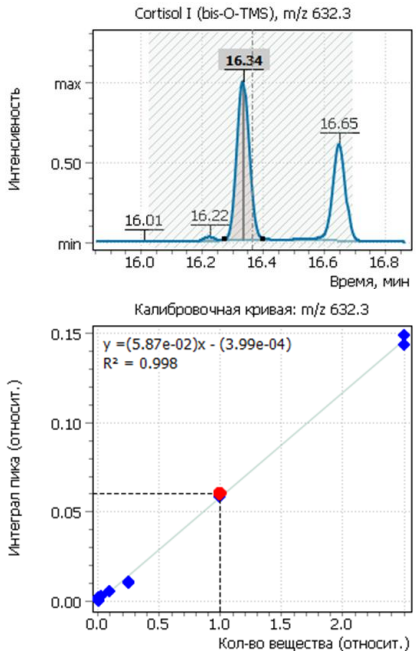
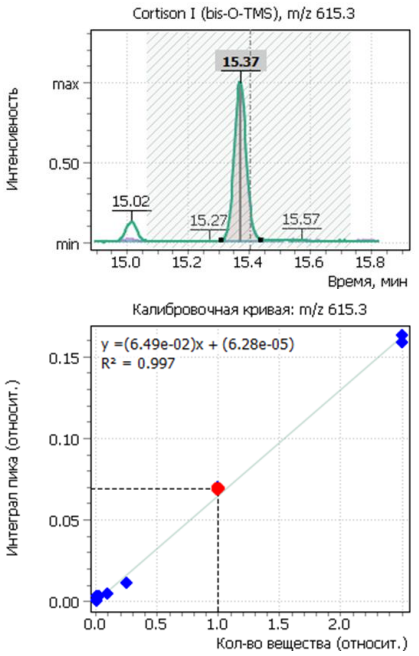
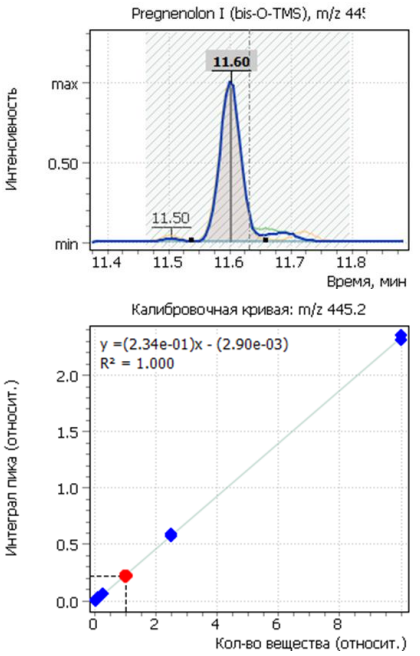


Табл. 3. Времена элюирования искомых пиков целевых ионов и параметры их сканирования.

№	*Перечень производных стероидов*	*Главный ион (Quant)*	*Подтв. ион (Qual-1)*	*Подтв. ион (Qual-2)*	*Время элюирования, мин*
1	DHEA (bis-O-TMS)	*432.2*	*417.2*	*434.2*	9.36
2	Androstenedion (bis-O-TMS)	*430.2*	*415.2*	*431.2*	9.92
3	Estradiol (17β-) (bis-O-TMS)	*416.2*	*285.1*	-	10.04
4	Testosteron (bis-O-TMS)	*432.2*	*431.2*	-	10.07
5	methyl-ester-Testosteron (bis-O-TMS) ISTD	*446.3*	*301.2*	-	10.98
6	Pregnenolon I (tris-O-TMS)	*445.2*	*460.2*	*446.2*	11.63
7	Pregnenolon II (tris-O-TMS)	*445.2*	*460.2*	*446.2*	11.96
8	Progesteron I (tris-O-TMS)	*458.2*	-	-	12.19
9	Progesteron II (tris-O-TMS)	*458.2*	*443.2*	*157.1*	12.29
10	17α-Hydroxyprogesteron (mono-TMS)	*474.2*	*431.2*	*433.2*	12.42
11	Progesteron III (tris-O-TMS)	*443.2*	*458.2*	-	12.60
12	17α-Hydroxyprogesteron (bis-O-TMS)	*546.3*	*301.2*	*441.2*	13.31
13	Cortison (bis-O-TMS)	*615.3*	*630.3*	-	15.4
14	Cortisol I (tetrakis-O-TMS)	*632.3*	*634.3*	-	16.36
15	Cortisol II (tetrakis-O-TMS)	*632.3*	*634.3*	-	16.67

Линейность

Калибровочные кривые для всех анализируемых соединений были получены путем их экстракции с последующей дериватизацией из 1,0 мл бидистиллированной воды. Диапазон концентраций для всех соединений составлял от 0,05 нг/мл до 50 нг/мл воды (построение по 7 калибровочным уровням). Отношение интегралов пика стандартного вещества к пику внутреннего стандарта использовали для количественного определения содержания соединения в слюне.

17α-Гидроксипрогестерон	***Андростенедион***	***Дегидроэпиандростерон***
		
Кортизол	***Кортизон***	***Прегненолон***
		

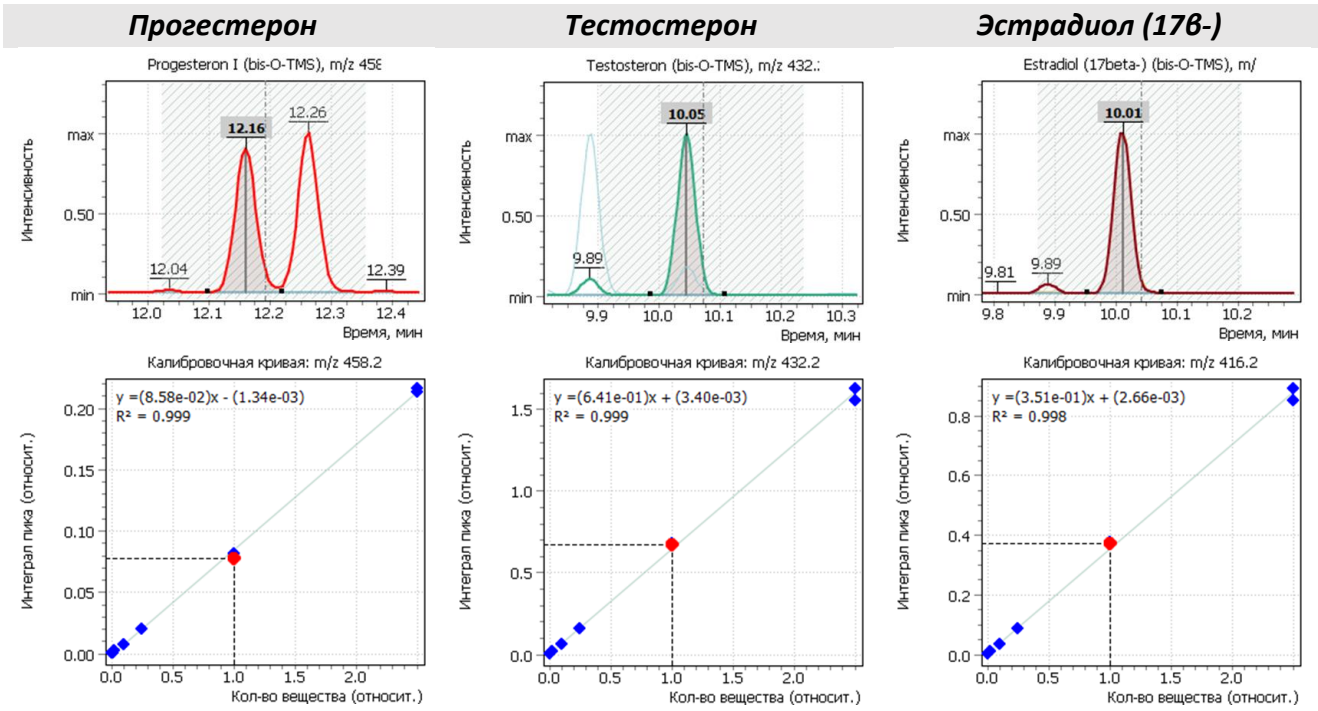


Рис. 2. Сигналы целевых ионов стероидных гормонов, участвующих в построение калибровочных зависимостей.

Общая процедура измерения стероидов в биологических образцах

Стероидные гормоны представляют собой молекулы (MW ≈ 300-350 Да), характеризующиеся большим диапазоном полярности, за счёт чего их анализ и процедура извлечения представляет серьезную и трудоёмкую аналитическую задачу.

Для поиска лучшей процедуры комплексного извлечения свободных стероидов из слюны были протестированы несколько подходов жидкостно-жидкостной экстракции с использованием н-пентана в качестве органического сорбента, жидкостно-жидкостной экстракции в условиях подщелачивания смеси карбонатом натрия и другие комбинации органических растворителей. Также в ходе работы тестировали подход извлечения стероидов по принципу твёрдо-фазной экстракции с использованием сорбента C18 (AccuBond SPE ODS-C18, Agilent Technologies, *Cat# 188-1310*). На рисунке 3 представлена точечная диаграмма сравнения различных подходов к извлечению стероидов из образца слюны. Большинство стероидов показывают максимальную степень извлечения именно в результате твёрдо-фазной экстракции. При этом стоит обратить внимание на то, что *прегненолон* и *прогестерон* лучше извлекались при использовании жидкостно-жидкостной экстракции в смеси н-пентан/метанол. Также отметим поведение молекул *кортизола* и *кортизона*: их извлечение было получено только в случае использования твёрдофазной экстракции. Во всех остальных случаях оба стероида оставались в водной фазе, за счёт своей высокой полярности.

По результатам проведённого исследования к дальнейшей работе была принята процедура твёрдо-фазной экстракции свободных стероидов из слюны с использованием обращённой фазы на основе силикагеля с октадецильной группой (ODS-C18) и предложена следующая схема элюирования:

1) **Стадия кондиционирования сорбента.** Химическую активацию твёрдого сорбента проводили раствором 30% ацетонитрила и 70% вода. Элюат отбрасывали.
2) **Загрузка образца.** 1,0 мл образца вносили на сорбент. Элюат отбрасывали.

3) **Стадия элюирования искомых соединений.** В качестве элюирующей жидкости использовали 1,0 мл метанола. Элюат собирали во флакон.

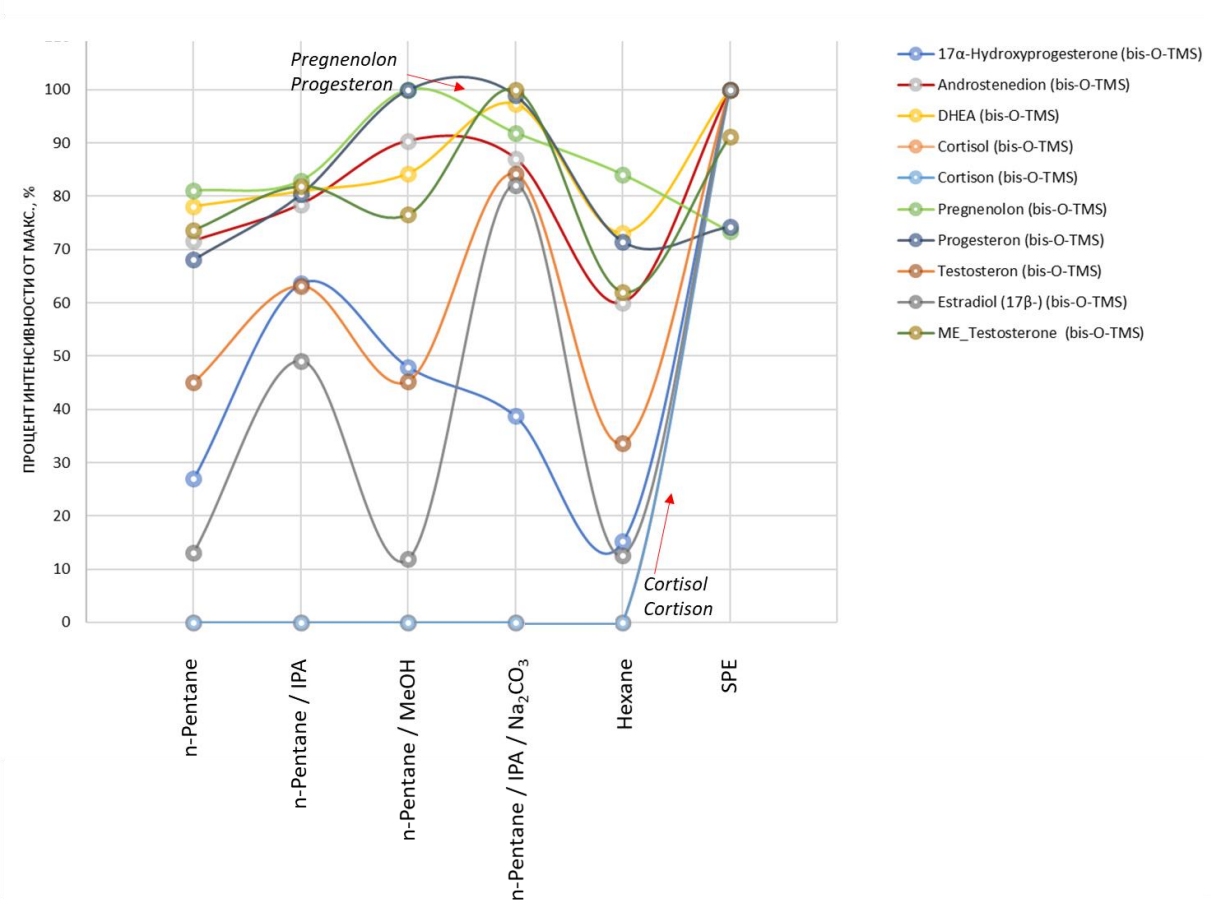


Рис. 3. Диаграмма сравнения различных подходов к извлечению стероидов из образца слюны.

Строгость подхода к отбору слюны и важность выполнения пациентом всех подготовительных условий перед сдачей образца наиболее сильно отражается на качестве проведения стадии дериватизации сухого остатка стероидов. Силилирующий агент MSTFA очень чувствителен к воде, поэтому высушенный остаток экстракта слюны должен быть максимально обезвожен. Наличие остатков пищи в слюне или же белковых фракций надёжно удерживают воду, даже при условии использования вакуумного штатива. На рисунке 4 представлена хроматограмма пробы слюны с нарушением правил процедуры сбора образца и хроматограмма с успешно проведённой процедурой дериватизации пробы. Как видно из рисунка, при нарушении процедуры интенсивность сигнала фоновых соединений резко возрастает, а интенсивность целевых соединений снижается, что является следствием низкой степени качества дериватизации молекул. Данный эффект исключает возможность дальнейшей работы с полученными данными и выполнения корректного расчёта количественного содержания свободных стероидов в пробе.

Надёжным решением, которое позволило исключить случаи низкой эффективности дериватизации, стало использование вакуумного концентратора - Eppendorf concentrator 5301. В основе работы данного устройства лежит принцип испарения растворителя из пробы при повышенной температуре (60°C) и пониженном давлении без заморозки исходного раствора. Благодаря чему процесс испарения протекает быстро, и образцы не подвергаются

воздействию повышенных температур, что особенно важно при работе с термочувствительными биологическими материалами.

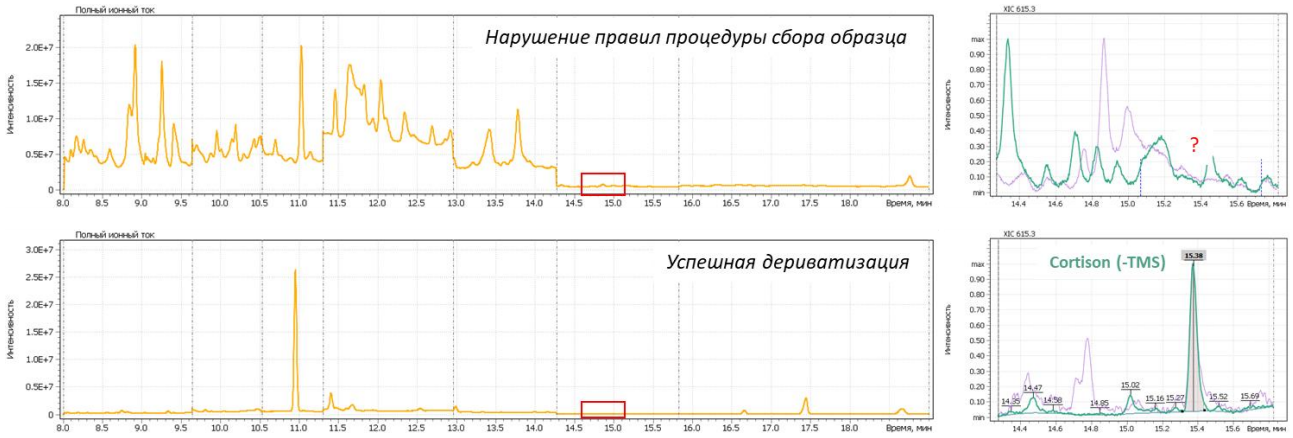
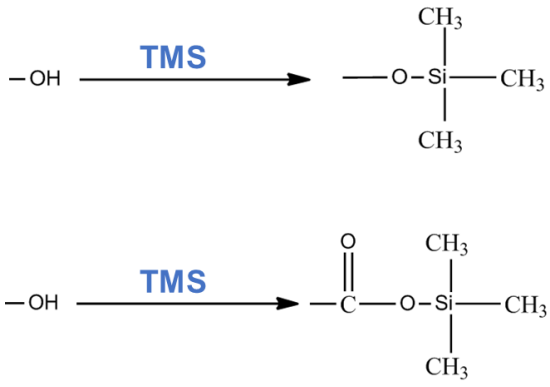


Рис. 4. Хроматограммы полного ионного тока образца с низким качеством процесса дериватизации (верхний рисунок) и образца с правильно подготовленной пробой для выполнения процедуры дериватизации.

Дериватизация силилирующими агентами подразумевает под собой силилирование по различным функциональным группам молекулы. Стероидные соединения, как представлено в таблице 1, содержат более одной производной функциональной группы. В частности, *эстрадиол* содержит гидроксильную группу ароматического кольца и одну гидроксильную группу алифатического кольца. *Прогестерон* содержит две карбонильные группы, а *тестостерон* содержит карбонильную группу и гидроксильную группу алифатического кольца.



Различные структуры гормонов подразумевают возможность получения и различных производных в ходе дериватизации, которые будут иметь различные физико-химические свойства и соответственно выражаться на хроматограмме группами пиков, соответствующих одному и тому же исходному веществу.

Рис. 5. Принцип дериватизиации силилирующим агентом (пример MSTFA, н-метил-н-(триметилсилил)трифторацетамид).

В ходе разработки метода быстрой дериватизации стероидов с несколькими функциональными группами важной задачей исследования также было подобрать концентрации и соотношения катализирующих агентов, температуру и время их реакции для максимально полного механизма их дериватизации. Для решения данного вопроса было предложено использовать результаты работы Jin-Aa Oh и др. [12], где была продемонстрирована возможность получения быстрой и полной реакции дериватизации с использованием смеси MSTFA/NH_4I (100:2), содержащей 1,5% дитиоэритритиола, в течение 10 минут при 90°C. Такая смесь позволила полностью преобразовать свободные стероиды в TMS-замещённые производные по максимально возможному количеству функциональных групп. Работоспособность метода дериватизации также была подтверждена в ходе выполнения работы, что представлено на рисунках ниже.

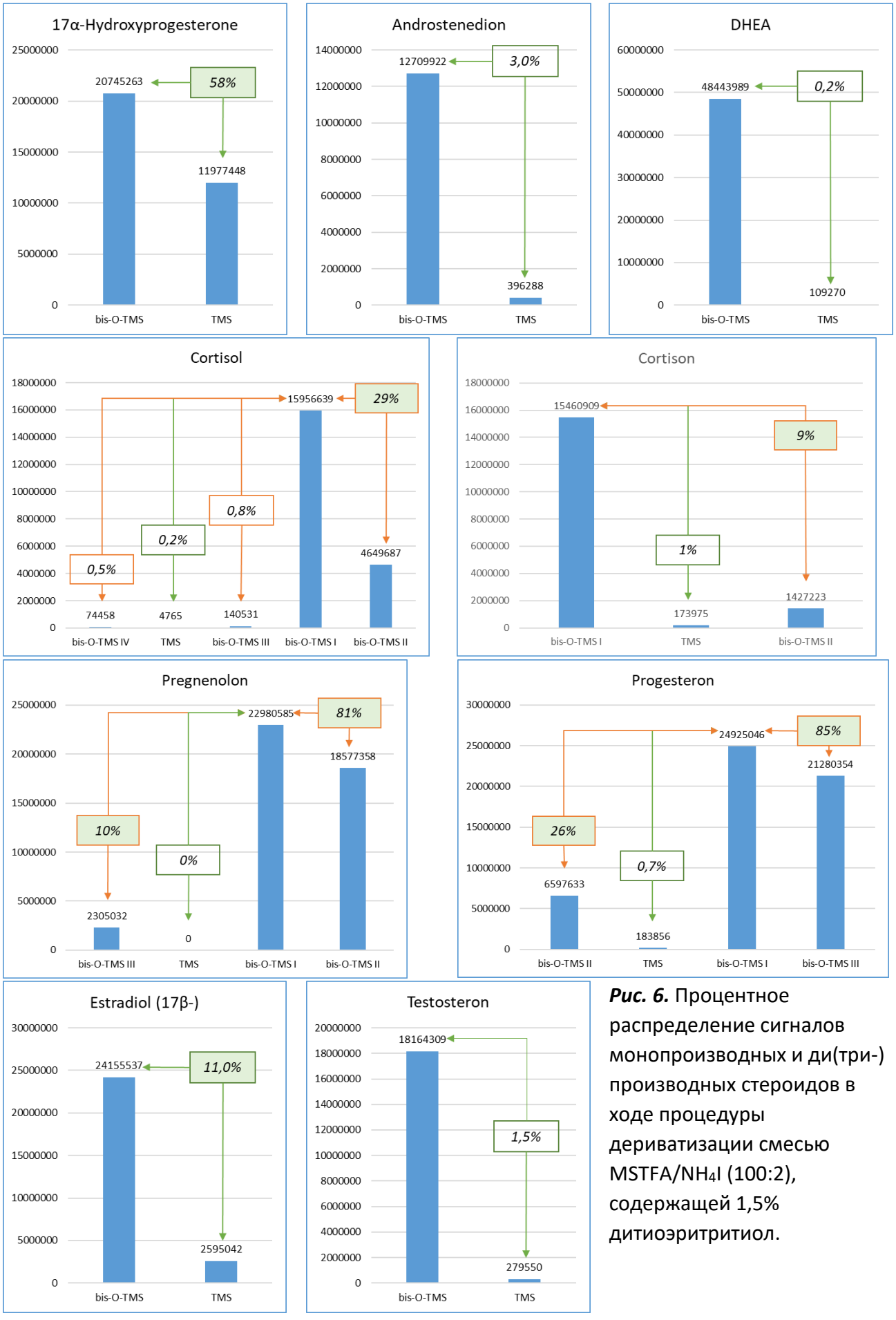
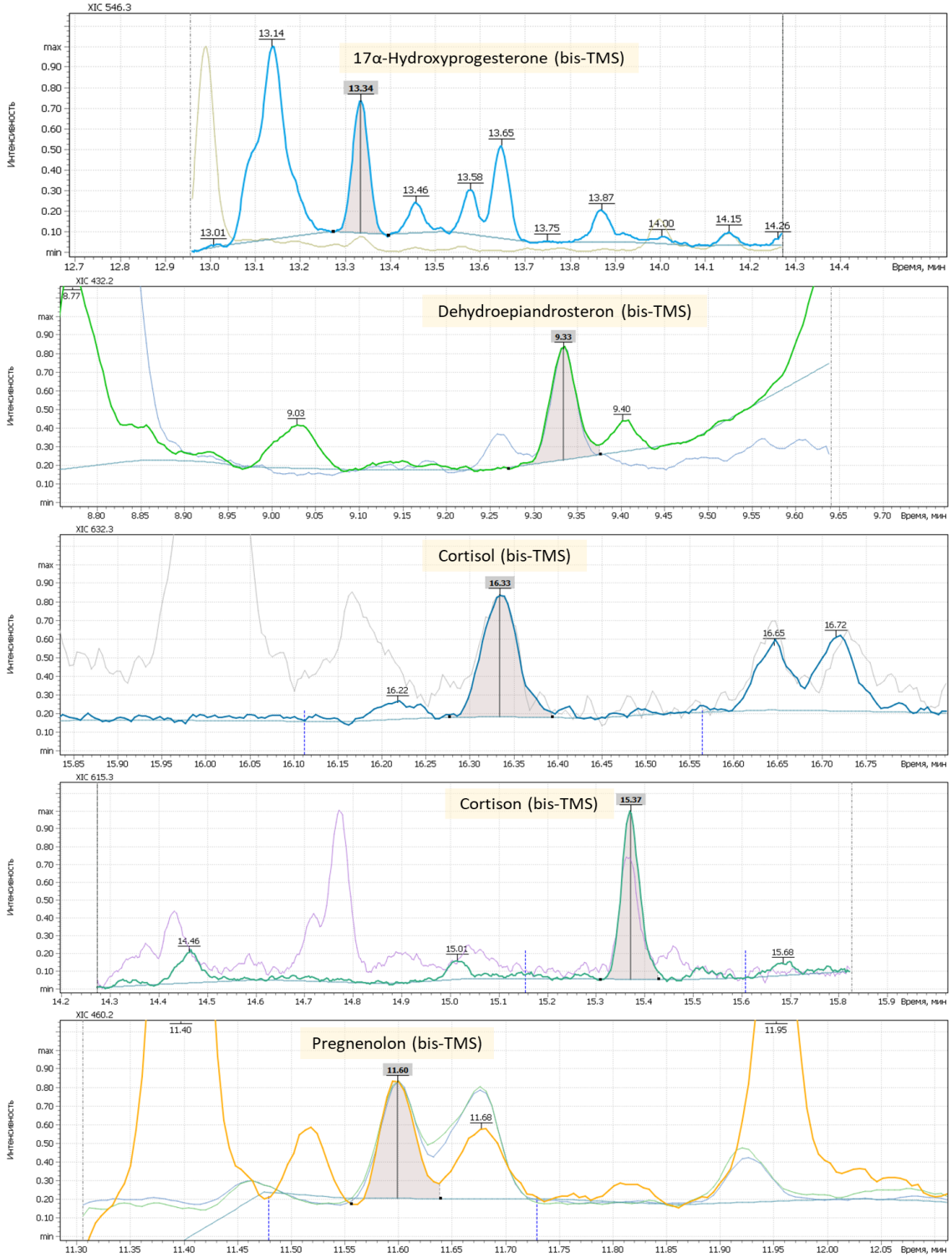


Рис. 6. Процентное распределение сигналов монопроизводных и ди(три-) производных стероидов в ходе процедуры дериватизации смесью MSTFA/NH_4I (100:2), содержащей 1,5% дитиоэритритиол.

На рисунке 6 представлена наглядная иллюстрация того, что выбранный метод дериватизации работает по максимально возможному количеству функциональных групп в целевых молекулах. Результаты позволили определить правильный набор сигналов для их дальнейшей регистрации. В частности, в работе с целевыми соединениями принимались только производные, процентное распределение которых составляло более 20% от наиболее интенсивного производного.

Обсуждение процедуры анализа

На рисунке 7 показаны хроматограммы выделенных ионных токов целевых соединений стероидов в реальной пробе слюны человека.



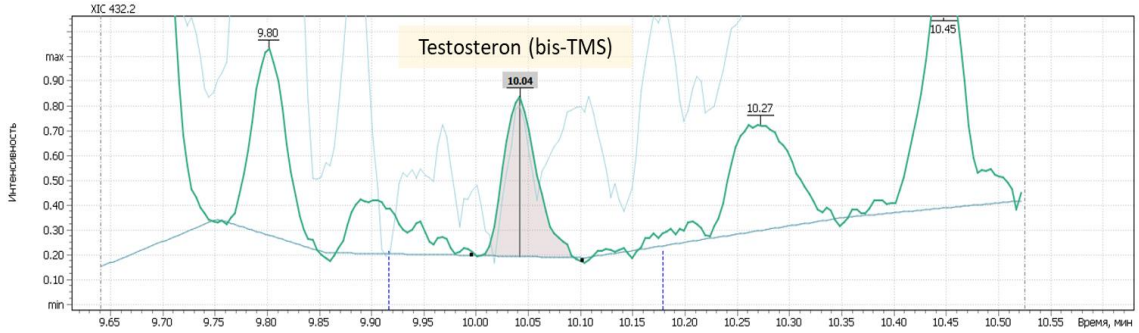


Рис. 7. Масс-хроматограммы целевых соединений стероидных гормонов в реальной пробе слюны после процедуры пробоподготовки.

На рисунке 8 представлены масс-хроматограммы производного эстрадиола в стандартном растворе, бланке (модельный образец воды), а также в образце слюны мужчины. Дополнительно представлена масс-хроматограмма образце слюны с дополнительным внесением эстрадиола.

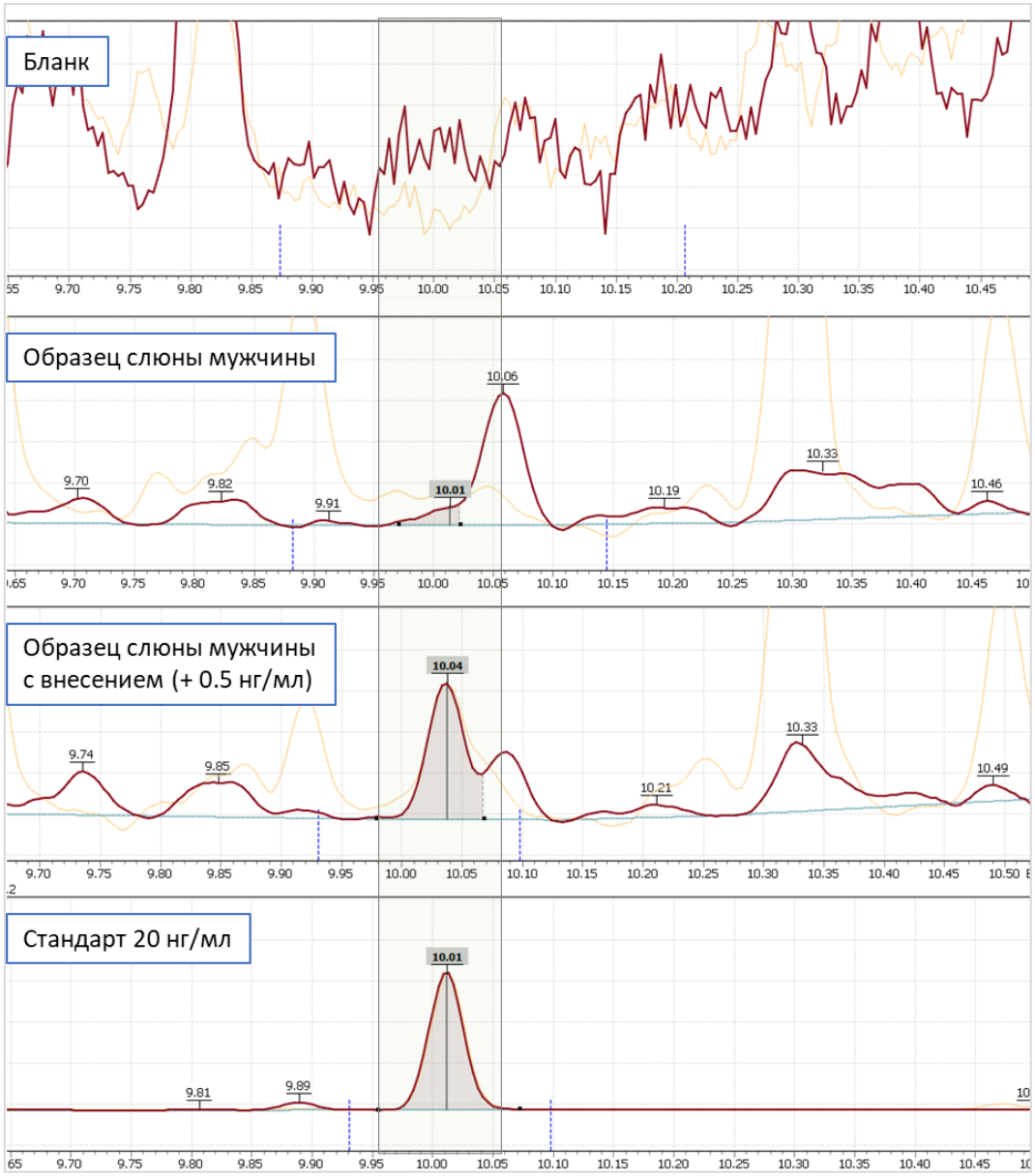


Рис. 8. Сопоставление ионного сигнала целевого соединения эстрадиол в чистом бланке, в реальном образце слюны, в реальном образце слюны с дополнительным внесением эстрадиола и сигнал стандарта в бидистиллированной воде.

Пределы качественного (LOD) и количественного (LOQ) определения стероидов с помощью системы моноквадрупольного масс-детектора Маэстро-αMC были рассчитаны с использованием модельной матрицы воды с известными уровнями концентраций целевых соединений. Расчёты проводили согласно утверждённой Европейской AOAC директиве [13]. Полученные данные представлены в таблице 4.

Табл. 4. Перечень производных стероидов, их линейность и пределы качественного (LOD) и количественного (LOQ) обнаружения.

#	*Перечень производных стероидов*	R^2, линейность	LOD, нг/мл	LOQ, нг/мл
1	17α-Hydroxyprogesteron (bis-O-TMS)	0.997	3.4	10.2
2	17α-Hydroxyprogesteron (mono-TMS)	0.999	2.9	8.9
3	Androstenedion (bis-O-TMS)	0.999	3.2	9.7
4	DHEA (bis-O-TMS)	0.999	3.6	10.8
5	Cortisol I (tetrakis-O-TMS)	0.998	2.8	8.5
6	Cortisol II (tetrakis -O-TMS)	0.998	2.7	8.2
7	Cortison (bis-O-TMS)	0.997	2.9	8.6
8	Pregnenolon I (tris-O-TMS)	0.995	3.9	11.8
9	Pregnenolon II (tris-O-TMS)	0.996	3.4	10.2
10	Progesteron I (tris-O-TMS)	0.994	4.0	12.1
11	Progesteron II (tris-O-TMS)	0.994	4.0	12.1
12	Progesteron III (tris-O-TMS)	0.994	4.5	13.4
13	Testosteron (bis-O-TMS)	0.999	2.1	6.3
14	Estradiol (17β-) (tris-O-TMS)	0.999	2.5	7.6

Дополнительно, в контексте работы были выполнены несколько тестирований реальных образцов слюны. При этом образцы собирали, как у мужчин, так и у женщин, для наблюдения за корреляцией между гормонами, соответствующими женщинам (*эстрогены (эстрадиол и др.), прогестогены (прегненолон, прогестерон и др.)*) и мужчинам (*андрогены (тестостерон и др.)*).

На рисунке 9 представлено сравнение сигнала наиболее активного эстрогенного (женского) полового гормона – эстрадиол (17-бета-эстрадиол). Наглядно показано, что в образце женской слюны сигнал *эстрадиола* значительно выше, чем в образце мужской.

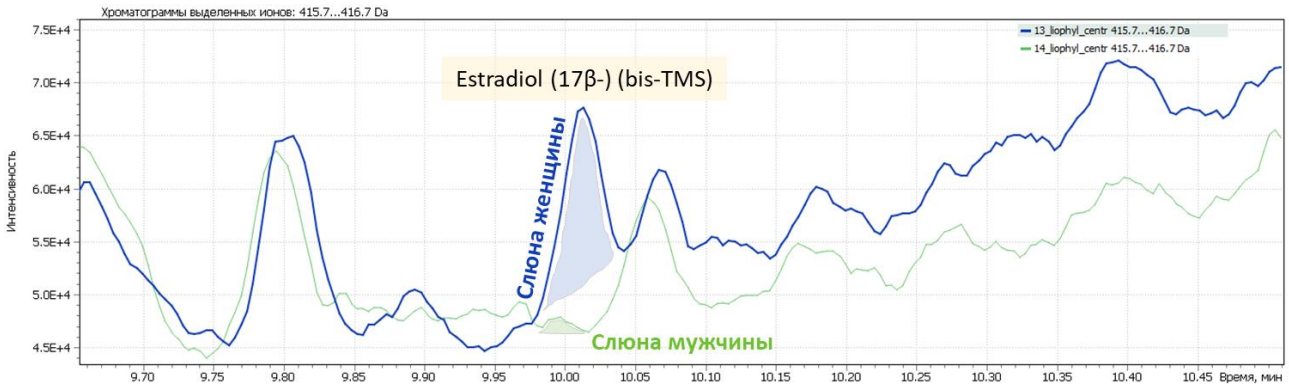


Рис. 9. Сравнение пробы слюны мужчины и женщины на примере содержания стероидного гормона эстрадиола.

На следующем рисунке представлена обратная ситуация, когда за целевой сигнал принимали соединение *тестостерон* и также сравнивали его содержание в слюне женщины и слюне мужчины. Очевидно, что сигнал тестостерона у мужчин практически в 2 раза выше, чем у женщин, что и представлено на рисунке ниже.

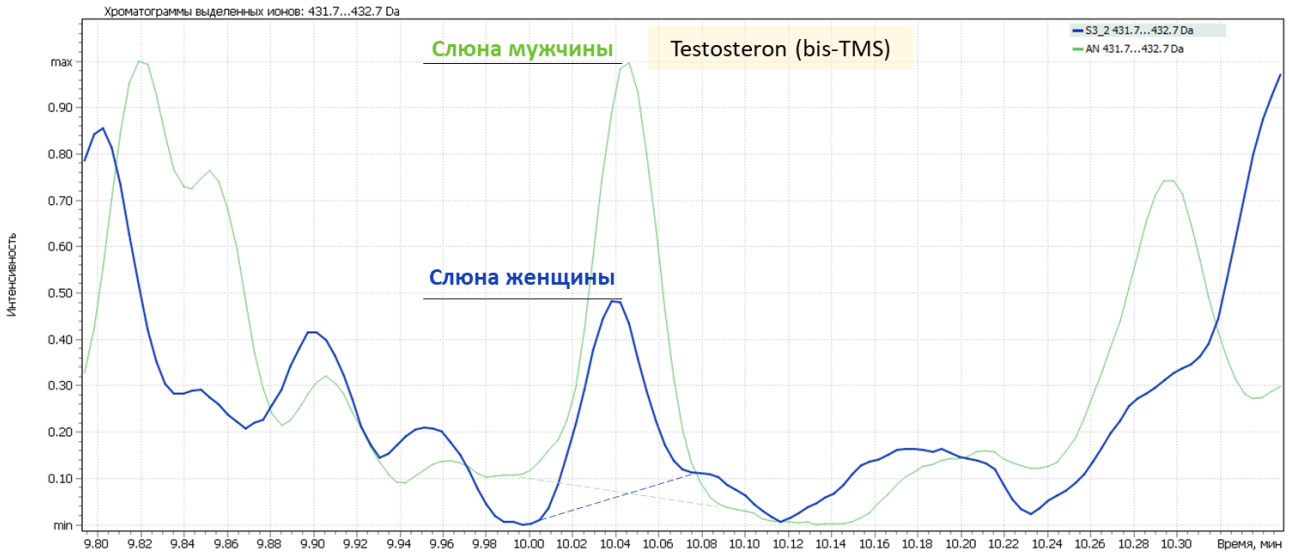


Рис. 10. Сравнение пробы слюны мужчины и женщины на примере содержания стероидного гормона тестостерона.

Выводы

Имеется целый ряд факторов, ограничивающих повсеместное использование слюны в различных сферах здравоохранения. В большинстве своём это связано со сложностью перехода на новые методы исследований в силу отсутствия справочных референтных значений уровня гормонов в слюне с указанием типа стимуляции слюны, пола, возраста, времени суток и используемой аналитической системы. [5] Настоящая статья является одним из примеров применения дешёвых моноквадрупольных масс-детекторов в направлении исследования стероидных гормонов.

Как результат работы, был разработан мультикомпонентный, чувствительный метод анализа стероидных гормонов в слюне человека. Силилированные производные стероидов, содержащие несколько функциональных групп, в результате дериватизации содержали минимальное количество вариантов производных, а также показали хорошие хроматографические свойства. Твёрдо-фазная экстракция соединений из слюны позволила достичь высокой степени извлечения компонентов.

Стоит отметить, что в настоящее время масс-спектрометрические методы становятся «золотым стандартом» для точного профилирования стероидов, и, не исключено, что их появление и широкое внедрение потребует повторного анализа ранее опубликованных данных. Согласно проведённому литературному анализу на первых этапах работы, очевидно, что необходимо приложить еще немало усилий для признания важности проводимых исследований в клинических условиях. Необходимо сводить к минимуму ошибки сбора слюны и её хранения, исключать приём лекарственных препаратов непосредственно перед сбором образца, поскольку это может затруднить достоверную оценку стероидного профиля. Таким образом в первую очередь, необходимо обращать внимание на создание и утверждение единого протокола сбора слюны, времени испытаний

и аналитических исследований, а также внедрение и доступность информации о полученных результатах, что также широко обсуждается и в литературных источниках [5].

Разработанный аналитический метод с использованием масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC (ООО «Интерлаб») позволяет реализовать, как ежедневый рутинный контроль стероидного профиля слюны человека, так и проводить крупномасштабные исследования, направленные на поиск корреляций с возможными заболеваниями человека.

Литература

1. *Arregger AL, Contreras LN, Tumilasci OR, Aquilano DR, Cardoso* EML: Salivary testosterone: a reliable approach to the diagnosis of male hypogonadism. Clin Endocrinol 2007, 67:656-662.
2. *Cardoso E, Persi G, Gonzalez N*: Assessment of adrenal function by measurement of salivary steroids in response to corticotrophin in patients infected with human immunodeficiency virus. Steroids 2007, 72:328-334.
3. *Yasuda M, Honma S, Furuya K*: Diagnostic significance of salivary testosterone measurement revisited: using liquid chromatography/mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. J Men Heal 2008, 5:56-63.
4. *Shibayama Y, Higashi T, Shimada K*: 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 2009, 877:2615-2623.
5. *Вавилова, Т.П.* Возможности и перспективы исследования гормонов в слюне / Т.П. Вавилова, И.Г. Островская, А.Е. Медведев. - Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 3, с. 295-307.
6. *Рыбакова М.Г.* Функциональная морфология больших слюнных желез в норме и при патологии эндокринной системы: Дисс. д.м.н.- Л., 1984.- 529с
7. *Афанасьев В.В.* Сиаладенит (этиология, патогенез, клиника, диагностика и лечение). Эксперим.-клинич. исслед.: Дисс. д.м.н. - Москва, 1993. - 372с
8. *Dechaume M.* Endocrinologie des glandes salivaires // Presse med.- 1958 -Vol 66, № 26.- P.584-586
9. *Godlowski Z.Z., Calandra J.C.* Salivary glands as endocrine organs. // J Appl Physiol. 1960 Jan; 15:101-5.
10. *Гончаров Н.П., Кация Г.В., Добрачева А.Д., Нижник А.Н., Колесникова Г.С., Хербст В., Вестерманн Ю.* Свободный тестостерон в слюне как диагностический маркер андрогенного статуса мужчин. // Андрология и генитальная хирургия. - 2006 №3.-С. 33-38.
11. *Дедов И.И., Гончаров Н.П., Кация Г.В., Малышева Н.М.* Современные биотехнологии определения тестостерона для оценки репродуктивной функции мужчин. –М: Издательство «АдамантЪ», 2010. -36 с.
12. *Jin-Aa Oh, Ho-Sang Shin*: Rapid determination of natural steroidal hormones in saliva for the clinical diagnoses. Chemistry Central Journal 2012, 6:22
13. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food, 2016