ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ВАЛИДАЦИИ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ОБРАЩЁННО-ФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНОЙ МАСС-СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ АНАЛИТА

Сутурина Л.В.,
Бельских А.В.,
Шолохов Л.Ф.,
Рашидова М.А.,
Данусевич И.Н.,
Лазарева Л.М.,
Наделяева Я.Г.,
Беленькая Л.В.,
Аталян А.В.,
Вильсон Н.И.,
Игумнов И.А.,
Иевлева К.Д.,
Егорова И.Ю.,
Баирова Т.А.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Сутурина Лариса Викторовна,
e-mail: Lsuturina@mail.ru

Статья получена: 23.05.2022
Статья принята: 02.12.2022
Статья опубликована: 29.12.2022

РЕЗЮМЕ

Обоснование. *Исследование тестостерона является основным методом выявления гиперандрогенизма, одного из важных критериев диагностики синдрома поликистозных яичников (СПКЯ). Жидкостная тандемная масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС) рассматривается в настоящее время как наиболее предпочтительный метод определения тестостерона у женщин, а его валидация является необходимым этапом для обеспечения воспроизводимых результатов исследования андрогенов в клинической практике и при проведении популяционных исследований распространённости СПКЯ.*

Цель работы. *Разработать и валидировать метод определения общего тестостерона в сыворотке крови с использованием высокоэффективной ЖХ-МС/МС для диагностики гиперандрогенемии при проведении эпидемиологического исследования распространённости синдрома поликистозных яичников и его фенотипов в Восточной Сибири (ESPEP STUDY).*

Материалы и методы. *Определение тестостерона в сыворотке крови проводилось с применением трёхквадрупольного тандемного масс-спектрометра LCMS-8060 (Shimadzu, Япония). Метод разработан с применением самостоятельно приготовленных образцов очищенной сыворотки крови человека, свободной от тестостерона, с известным содержанием исследуемого аналита. При апробации методики использованы образцы сыворотки крови женщин репродуктивного возраста.*

Результаты. *В ходе разработки метода оптимальные хроматографические условия получили при использовании колонки Kromasil 100-2.5-C18 (2,1 мм × 100 мм; AkzoNobel, Нидерланды), при изократическом режиме элюирования с применением подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты. Общая скорость потока составила 0,35 мл/мин. Нижний предел количественного определения составил 5 нг/дл со средней точностью 100,2 %. При апробации метода в тестовой популяционной выборке из 1138 женщин репродуктивного возраста (средний возраст – 34,3 ± 6,3 года) медиана концентрации тестостерона составила 26,9 нг/дл.*

Заключение. *Предложенный метод определения тестостерона в сыворотке крови обладает приемлемой точностью, линейностью и воспроизводимостью, характеризуется простой и быстрой пробоподготовкой и может использоваться при проведении популяционных эпидемиологических исследований распространённости СПКЯ и его фенотипов и в клинической практике.*

Ключевые слова: *тестостерон, валидация, ВЭЖХ-МС/МС, гиперандрогенизм, СПКЯ*

Для цитирования: Сутурина Л.В., Бельских А.В., Шолохов Л.Ф., Рашидова М.А., Данусевич И.Н., Лазарева Л.М., Наделяева Я.Г., Беленькая Л.В., Аталян А.В., Вильсон Н.И., Игумнов И.А., Иевлева К.Д., Егорова И.Ю., Баирова Т.А. Опыт разработки и валидации метода определения тестостерона в сыворотке крови женщин репродуктивного возраста с использованием высокоэффективной жидкостной обращённо-фазовой хроматографии с тандемной масс-селективной детекцией аналита. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(6): 92-101. doi: 10.29413/ABS.2022-7.6.9

THE EXPERIENCE IN THE DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR TESTOSTERONE MEASUREMENT IN BLOOD SERUM OF PREMENOPAUSAL WOMEN USING HPLC-MS/MS

Suturina L.V.,
Belskikh A.V.,
Sholokhov L.F.,
Rashidova M.A.,
Danusevich I.N.,
Lazareva L.M.,
Nadeliaeva I.G.,
Belenkaia L.V.,
Atalyan A.V.,
Vilson N.I.,
Igumnov I.A.,
Ievleva K.D.,
Egorova I.Yu.,
Bairova T.A.

Research Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Corresponding author:
Larisa V. Suturina,
e-mail: Lsuturina@mail.ru

ABSTRACT

Testosterone assessment is essential for detecting biochemical hyperandrogenism, one of the important diagnostic criteria of polycystic ovary syndrome (PCOS) both in clinical practice and in epidemiological studies. Currently, tandem liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most preferred technique to measure testosterone level in women. Its validation is important to reproducibility of androgen tests results for clinical practice and for epidemiological studies of the prevalence PCOS.

The aim of the study. *To develop and validate a method for determining total testosterone in blood serum using highly efficient LC-MS/MS to assess androgenemia in the epidemiological study of the prevalence of PCOS and its phenotypes in Eastern Siberia (ESPEP STUDY).*

Materials and methods. *We determined a total testosterone level in serum blood using triple quadrupole mass spectrometer LCMS-8060 (Shimadzu, Japan). The protocol of technique was developed using self-prepared purified human testosterone-free serum with a known concentration of analyzed compound. We used the serum samples of women of reproductive age to test the developed method.*

Results. *Optimum chromatographic conditions were obtained with a Kromasil 100-2.5-C18 column (2.1 mm × 100 mm; AkzoNobel, Netherlands), and an isocratic elution mode using a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1 % aqueous solution of formic acid. The total flow rate was 0.35 ml/min. The lower limit of quantification was 5 ng/dl with an average accuracy of 100.2 %. During the approbation of the method in a test population sample of 1138 premenopausal women (mean age – 34.3 ± 6.3 years), the median testosterone concentration was 26.9 ng/dl.*

Conclusion. *It was found that the proposed method for determining testosterone in blood serum has acceptable linearity and reproducibility and meets the requirements for bioanalytical methods under the regulatory documentation. This method can be used for clinical practice and epidemiological study of the prevalence of PCOS.*

Key words: *testosterone, validation, HPLC-MS/MS, hyperandrogenism, PCOS*

For citation: Suturina L.V., Belskikh A.V., Sholokhov L.F., Rashidova M.A., Danusevich I.N., Lazareva L.M., Nadeliaeva I.G., Belenkaia L.V., Atalyan A.V., Vilson N.I., Igumnov I.A., Ievleva K.D., Egorova I.Yu., Bairova T.A. The experience in the development and validation of method for testosterone measurement in blood serum of premenopausal women using HPLC-MS/MS. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(6): 92-101. doi: 10.29413/ABS.2022-7.6.9

Received: 23.05.2022
Accepted: 02.12.2022
Published: 29.12.2022

ВВЕДЕНИЕ

Исследование тестостерона является основным методом выявления биохимического гиперандрогенизма, одного из важных критериев диагностики синдрома поликистозных яичников (СПКЯ). Наряду с гиперандрогенизмом и специфичными изменениями структуры яичников, СПКЯ характеризуется нарушениями менструальной и репродуктивной функции, а также выраженными метаболическими расстройствами, которые коррелируют с тяжестью гиперандрогенемии [1–4]. СПКЯ считается самой распространённой эндокринопатией и выявляется, по различным данным, у 6–15 % женщин репродуктивного возраста [5, 6]. Одной из причин такой вариабельности распространённости СПКЯ, наряду с особенностями изучаемых популяций и используемых диагностических критериев, является отсутствие стандартных подходов к исследованию андрогенов [7]. Наиболее широко используемыми методами измерения уровня общего тестостерона в сыворотке или плазме крови являются радиоиммунный анализ (РИА) и иммуноферментный анализ (ИФА). Однако в настоящее время ИФА рекомендуется, в основном, для исследования уровня тестостерона у мужчин, так как для лиц, имеющих более низкие концентрации этого гормона, чувствительность и специфичность данного метода недостаточны [8]. Известно, что только 1–3 % тестостерона не связывается с белками плазмы, а наличие других стероидов схожей структуры может приводить к погрешностям в анализе. Методики, включающие экстракцию и хроматографию, обеспечивают несколько преимуществ, в частности, удаление белков и разделение перекрёстно реагирующих стероидов [9]. Доказано, что исследования тестостерона как с помощью РИА с экстракцией и хроматографией, так и с использованием жидкостной тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС), одинаково эффективны для диагностики СПКЯ, однако метод ЖХ-МС/МС предпочтительнее, учитывая относительную простоту его автоматизации [10]. В последнее десятилетие данный метод рассматривается в качестве «золотого стандарта» для определения тестостерона у женщин в клинической практике и научных исследованиях [11, 12]. Современные требования к проведению популяционных исследований распространённости СПКЯ, а также стандарты репортирования результатов изучения гиперандрогенизма в ведущих профильных научных журналах предполагают использование современных, высокоэффективных подходов для определения тестостерона [7, 13, 14]. При этом валидация методик исследования андрогенов рассматривается как совершенно необходимый этап, обеспечивающий точность и сопоставимость результатов, полученных в разных лабораториях [9, 15].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка и валидация метода определения общего тестостерона в сыворотке крови с использованием высокоэффективной ЖХ-МС/МС для диагностики гиперандрогенемии при проведении эпидемиологического исследования распространённости синдрома поликистоза яичников и его фенотипов в Восточной Сибири (ESPEP STUDY) [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были использованы аналитические стандарты тестостерона, приобретённые в компании Sigma Aldrich; изотопно-меченый [$^2H_3$]-Тестостерон (внутренний стандарт) приобретался в компании ALSACHIM (Франция). Все органические растворители имели квалификацию «MS-grade» или «особо чистый» (ОСЧ). Квалификация химических реактивов, использованных в работе, соответствовала стандартным требованиям к проведению биоаналитических исследований [17, 18].

Для приготовления контрольных и калибровочных растворов в «холостой» биологический материал помещали точно дозированное количество раствора аналитического стандарта. В ходе приготовления модельных смесей исходный биоматериал разбавляли не более чем на 5 % от его объёма, для того чтобы полученная смесь максимально соответствовала по составу реальной человеческой плазме или сыворотке крови. Сыворотка крови человека, свободная от тестостерона, была приготовлена самостоятельно из пулированной женской сыворотки крови, взятой от разных доноров репродуктивного возраста, с помощью пропускания через препаративную колонку-поглотитель, наполненную активированным углём [19]. Очистка производилась до получения хроматограммы «холостого» образца, не содержащей следов тестостерона. В среднем, для полноценной подготовки плазмы нам требовалось от 3 до 5 раз пропустить интактный биоматериал через стеклянную колонку длиной 200 мм и внутренним диаметром 6 мм, плотно наполненную гранулами активированного угля размером около 0,5 мм. Для ускорения процесса использовался вакуум водоструйного насоса, приложенный к приёмной колбе.

Хроматографическое разделение выполнено на системе Shimadzu Nexera X2 (Япония) с двумя насосами высокого давления и созданием градиента на стороне высокого давления. Детекция аналита осуществлялась с применением трёхквадрупольного тандемного масс-спектрометра LCMS-8060 (Shimadzu, Япония) в режиме положительной ионизации с гибридным сдвоенным источником ионизации (DUIS) и применением техники мониторинга множественных реакций (MRM).

Разработка и оптимизация метода анализа

При подборе хроматографических условий для достижения наиболее эффективного разделения мы пробовали использовать ряд хроматографических колонок с сорбентами C18 (Kromasil, Luna), C8 (ACE C8) и бифенильными модификаторами (Raptor Biphenyl). В каждом случае мы пытались подобрать оптимальные условия для отделения тестостерона от эндогенных компонентов. Наличие эндогенных примесей было связано с при-

менением сравнительно простой, но дешёвой и экспрессной методикой пробоподготовки. Важным фактором при подборе условия являлось суммарное время хроматографирования, т. к. одной из наших задач являлось построение максимально простого и экспрессного метода. Приемлемые хроматографические параметры были получены с применением колонки Kromasil 100-2.5-C18 (2,1 мм × 100 мм; AkzoNobel, Нидерланды) при изократическом режиме элюирования со скоростью 0,35 мл/мин. Состав подвижной фазы – 80 : 20 (v : v) ацетонитрил : 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты. В колоночном термостате поддерживали температуру 40 °C. В этих условиях суммарное время проведения хроматографического определения составило 1,5 минуты.

Для детектирования тестостерона и внутреннего стандарта использовались следующие MRM переходы: m/z 289,00 > 97,30; 289,00 > 109,20; 289,00 > 79,15 – для тестостерона, и m/z 292,00 > 109,20; 292,00 > 79,15; 292,00 > 97,30 – для [$^2H_3$]-тестостерона. Количественные расчёты производили по хроматограммам полного ионного тока (TIC).

Параметры квадрупольной системы: режим регистрации катионов, время сканирования – 50 мс, давление соударительного газа – 270 КПа, разрешение квадрупольной системы «юнит», энергия соударения по каналам тестостерона составила 21 В для переходов с m/z 289,00 > 97,30 и 289,00 > 109,20, и 46 В – для перехода 289,00 > 79,15. Для [$^2H_3$]-тестостерона энергия соударения по каналам составила 29 В для перехода с m/z 292,00 > 109,20; 49 В – для перехода с m/z 292,00 > 79,15; и 46 В – для канала m/z 292,00 > 97,30.

Параметры ионного источника: напряжение капилляра ESI – 4000 В, напряжение коронарного разряда DUIS – 4500 В, температура ионного источника – 300 °C, поток газа-нагревателя – 10 л/мин, поток газа распылителя – 2 л/мин, поток газа завесы – 10 л/мин, температура линии десольватации – 250 °C.

Приготовление растворов стандартных образцов

Навеску стандарта тестостерона в количестве около 5,0 мг (точная навеска) помещали в центрифужную пробирку и разводили в соответствующем количестве ацетонитрила для получения раствора 1 мг/мл (сток-раствор). Разбавленные растворы готовились из сток-раствора путём разведения в ацетонитриле до получения соответствующих концентраций, удобных для построения калибровочной зависимости. Исходный сток-раствор тестостерона хранили при –20 °C, разбавленные растворы хранили не более 1 недели при температуре +4 °C.

Методика пробоподготовки

Модифицированный метод SALLE (Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction) [20] был выбран как наиболее подходящий при разработке метода. Метод твёрдофазной экстракции показался нам недостаточно быстрым, тогда как классические методы осаждения белков и жидкостной экстракции не позволяли добиться приемлемых результатов по чувствительности и воспроизводимости.

Предварительно приготовленные пробы калибровочных стандартов и образцов контроля качества уравновешивались при комнатной температуре. В чистую пробирку типа Эппендорф объёмом 1,5 мл помещали 200 мкл биологического образца, 25 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта, 600 мкл ацетонитрила, 200 мкл 3М водного раствора сульфата аммония и тщательно перемешивали на пробирочном вортексе при 2500 об./мин в течение 15 секунд. Далее пробирки центрифугировали при 2952 g в течение 2 мин при температуре 20 °C, отбирали 400 мкл верхнего слоя и переносили в виалу для хроматографического анализа. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта по соотношению площадей хроматографических пиков тестостерона и изотопно-меченого [$^2H_3$]-тестостерона.

Калибровочные кривые

Девять ненулевых калибровочных стандартов в двух повторностях готовились для каждого аналитического цикла. Концентрации калибровочных стандартов составляли 5; 10; 30; 50; 70; 100; 200; 300 и 500 нг/дл. Все полученные данные аппроксимировались с использованием весового коэффициента 1 / *C*2, где *C* – концентрация аналита. Для аппроксимации использовалась функция второго порядка, а оценка правильности построения калибровочных кривых проводилась методом обратного расчёта.

Объекты исследования

Для апробации методики использованы образцы сыворотки крови 1138 женщин репродуктивного возраста (средний возраст – 34,3 ± 6,3 года), рекрутированных во время ежегодного профилактического осмотра по месту работы в период с 2016 по 2019 г. в Иркутской области и Республике Бурятия (Российская Федерация), отвечающих следующим критериям включения: возраст – от 18 до 45 лет, подписанное информированное согласие. Критериями исключения были: беременность или лактация в настоящее время, гистерэктомия или/и удаление придатков с обеих сторон, аблация эндометрия и/или эмболизация маточных артерий, приём гормональных препаратов и/или инсулиносенситайзеров.

Этическая экспертиза

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Комитета по биомедицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ и Хельсинкской декларации 1964 г. с её последующими изменениями. Информированное добровольное согласие было получено от каждой участницы исследования.

Статистический анализ

Для оценки точности, воспроизводимости и оценки стабильности проб подсчитывались номинальные и средние значения концентрации, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Значения концентрации тестостерона в выборке тестовой популяции представлены в виде медианы и перцентилей (5-го, 25-го, 75-го

и 95-го), поскольку распределение наблюдаемой величины не соответствовало закону нормального распределения (критерий Колмогорова – Смирнова).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Валидация метода

В ходе выполнения валидации метода экспериментально рассчитанные концентрации калибровочных стандартов находились в пределах ± 15 % номинальных значений (за исключением нижнего предела количественного определения, для которого это значение должно находиться в пределах ± 20 %). Калибровочные кривые для тестостерона обладали необходимой точностью в диапазоне концентраций от 5 до 500 нг/дл, с коэффициентами детерминации (r^2) более 0,98. Репрезентативная калибровочная кривая приведена на рисунке 1. Для оценки селективности и специфичности сравнивали

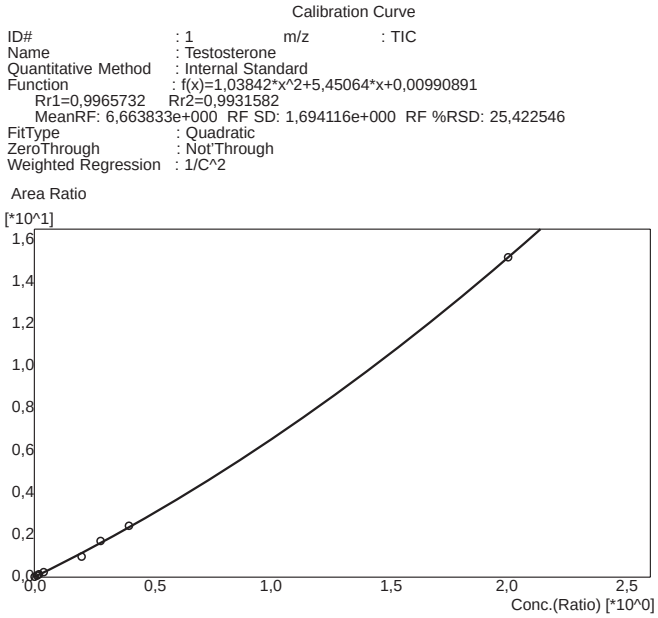

РИС. 1.

Калибровочная кривая. Quantitative method – способ количественного расчёта; Internal Standard – метод внутреннего стандарта; Function – вид аппроксимирующей калибровочной функции с коэффициентами; Rr1 – коэффициент корреляции r; Rr2 – коэффициент детерминации r^2; Fit Type – математическое наименование аппроксимирующей функции; Zero Through – принудительное прохождение калибровочной функции через точку начала координат; Weight Regression – весовой коэффициент

FIG. 1.

Calibration curve. Quantitative method – a method of quantitative calculation; Internal Standard – internal standard method; Function – type of approximating calibration function with coefficients; Rr1 – correlation coefficient r; Rr2 – coefficient of determination r^2; Fit Type – mathematical name of the approximating function; Zero Through – forced passage of the calibration function through the point of origin; Weight Regression – weight coefficient

хроматограммы «холостых» образцов из разных циклов подготовки биоматериала и хроматограммы проб с содержанием тестостерона на уровне 5 нг/дл. В соответствии с нормативами, определение выполнялось в 6 повторениях с использованием разных источников очищенной плазмы крови. Отдельно оценивалась возможность использования сыворотки и гемолизированной плазмы крови. Интерферирующие соединения давали пики на времени удерживания тестостерона, не превышающие 20 % от средней площади пика для калибровочного образца с низшей концентрацией. Типичные хроматограммы для подготовленной «холостой» пробы, образца «Зеро» (добавлен внутренний стандарт, но не добавлен аналит), пробы в нижнем и верхнем пределах количественного определения (НПКО и ВПКО соответственно) показаны на рисунке 2.

Нижний предел количественного определения

При оценке уровня НПКО в ходе обратного расчёта получены значения концентраций, варьирующиеся от 4,9 до 5,3 нг/дл. Коэффициенты вариации для повторных проб не превышали 20 %, а значение точности определения варьировалось от 97,3 до 106,3 %. Коэффициенты детерминации (r^2) находятся в пределах нормируемых погрешностей для всех пяти проведённых в рамках валидации аналитических циклов (0,9869–0,9967), таким образом, НПКО для данного метода может быть принят на уровне 5 нг/дл.

Точность, сходимость/воспроизводимость

Оценка внутрисерийной точности и прецизионности была проведена путём анализа нескольких приготовлений образцов с разными концентрациями тестостерона в плазме человека. Всего анализировали по 6 контрольных образцов на уровне НПКО (5 нг/дл), с низкой (КО НИЗК, 15 нг/дл), средней (КО СРЕДН, 150 нг/дл) и высокой (КО ВЫС, 350 нг/дл) концентрациями. Результаты оценки точности и воспроизводимости полностью соответствуют регуляторным требованиям, а метод является нормально воспроизводимым. Основные результаты оценки внутри- и межсерийной точности и воспроизводимости представлена в таблице 1.

Оценка стабильности проб

Оценка стабильности образцов производилась в стандартных условиях с использованием контрольных образцов с низкой и высокой концентрациями. Оценивали стабильность пробы при нахождении образца в течение суток в плазме при комнатной температуре, стабильность готового экстракта при нахождении его в течение суток в условиях автосамплера и долговременную стабильность проб в условиях хранения при температуре –40 °С. Выявлено, что образцы тестостерона показывали приемлемую стабильность во всех тестах, а при определении долговременной стабильности показана возможность хранения проб при температуре –40 °С в течение, по меньшей мере, одного месяца. Результаты оценки стабильности проб представлены в таблице 2.

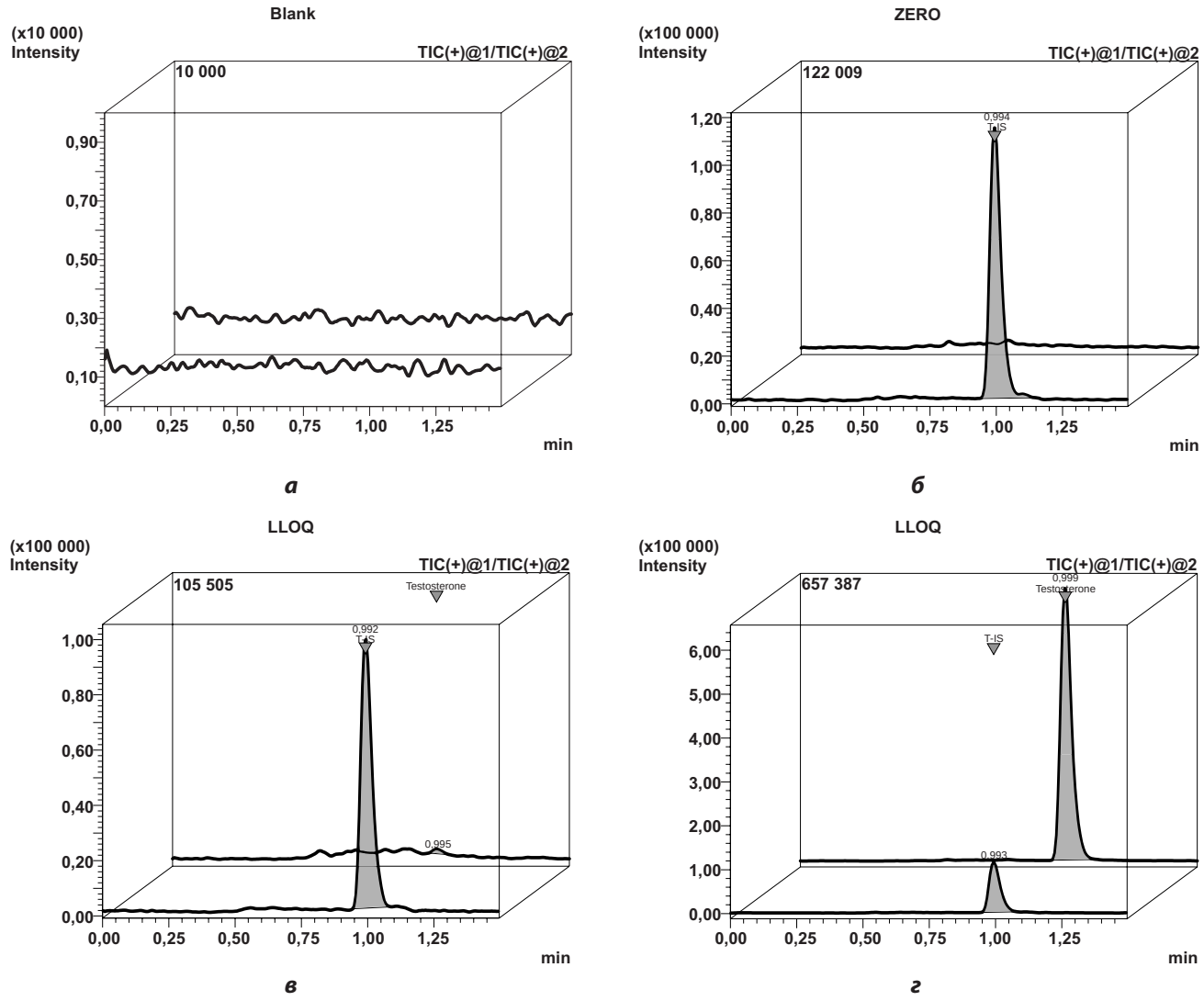

РИС. 2.

*Хроматограммы холостого образца (**а**); «Зеро» (**б**); НПКО (**в**) и ВПКО (**г**). На переднем плане представлены хроматограммы записанные для внутреннего стандарта, на заднем – для тестостерона; НПКО (LLOQ) – нижний предел количественного определения; ВПКО (ULOQ) – верхний предел количественного определения*

FIG. 2.

*Chromatograms of the blank sample (**а**); «Zero» (**б**); LLOQ (**в**) and ULOQ (**г**). In the foreground – internal control peaks, on the background – testosterone peaks; LLOQ – lower limit of quantitation; ULOQ – upper limit of quantitation*

ТАБЛИЦА 1

ВНУТРИСЕРИЙНАЯ И МЕЖСЕРИЙНАЯ ТОЧНОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

TABLE 1

INTRA BATCH AND INTER BATCH ACCURACY AND REPRODUCIBILITY

Уровень	Номинал, нг/дл	Средняя концентрация, нг/дл (*n* = 6)	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
Внутрисерийная точность и воспроизводимость				
КО НИЗК	15	13,9	0,8	5,7
КО СРЕДН	150	147,7	5,1	3,5
КО ВЫС	350	352,1	5,3	1,5
Межсерийная точность и воспроизводимость				
КО НИЗК	15	14,4	0,8	5,2
КО СРЕДН	150	142,1	8,4	5,9
КО ВЫС	350	357,8	8,3	2,3

ТАБЛИЦА 2
ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ПРОБ

TABLE 2
STABILITY TESTS

Показатели	Кратковременная пост-препаративная стабильность		Кратковременная стабильность в матрице при комнатной температуре		Стабильность через месяц хранения при –40 °C	
Номинальная концентрация, нг/дл	15	350	15	350	15	350
Измеренная концентрация, нг/дл	15,1	332,3	14,9	340,9	15,4	350,2
Точность, %	100,8	94,9	99,9	97,4	102,6	100,1
Коэффициент вариации, %	8,8	7,1	6,4	6,7	8,5	6,9

Апробация метода

При апробации метода в тестовой популяционной выборке медиана концентрации тестостерона у женщин репродуктивного возраста составила 26,9 нг/дл, со значениями 5-го, 25-го, 75-го и 95-го перцентилей 6,0; 17,8; 37,7 и 74,6 нг/дл соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный и валидированный нами подход по своим рабочим параметрам не уступает литературным аналогам, но при этом использует простую и экспрессную методику пробоподготовки, которая с лёгкостью может быть автоматизирована. Верхние пределы количественного определения и рабочий диапазон концентраций тестостерона при использовании предложенного нами варианта ВЭЖХ-МС/МС соответствуют значениям, обсуждаемым в большинстве современных литературных источников. По показателю чувствительности метод не уступает описанным ранее аналогам или даже превосходит их. Так, в работе W.A. Salameh и соавт. (2010) сообщается о нижнем пределе количественного определения, равном 0,3 нг/мл (30 нг/дл) [21]. B. Trabert и соавт. добились чувствительности метода, несколько превышающей нашу – 0,01 нг/мл (1 нг/дл) [15]. Однако этими авторами использовались сравнительно большие количества биологического материала и не самая удобная пробоподготовка. S.N. Alvi и соавт. [22] также использовали метод жидкостной экстракции, однако им удалось добиться чувствительности на уровне 50 нг/дл для плазмы крови, что свидетельствует о невысокой селективности метода.

Метод определения НПКО сводится к оценке минимальной концентрации, при которой соотношение отклика по определяемому аналиту и отклика в «холостом» образце (от эндогенных компонентов) составляет не менее 5. Таким образом, есть два принципиальных способа увеличения чувствительности методов: увеличение селективности приборов и более эффективная очистка во время пробоподготовки. Если селективность прибора находится на приемлемом уровне, то увеличение степени чистоты полученного экстракта – актуальная задача для каждого коллектива аналитиков, приступающих к разработке практически любого метода. В большинстве методов определения тестостерона используется относительно стандартная техника жидкостной экстракции, исторически отработанная со времён, когда основной диагностической матрицей являлась моча.

Так, B. Trabert и соавт. использовали стандартную экстракцию гексаном [15], а в работе M. van Nuland и соавт. применяется экстракция метил-трет-бутиловым эфиром [23]. Одним общим свойством этих методов является способность изолировать низкомолекулярную органическую фракцию от неорганической составляющей, существенно влияющей на качество масс-селективного детектирования. Важным обстоятельством является и то, что растворители, обычно использующиеся для такого типа экстракции, не применимы в обращённо-фазовой (ОФ) хроматографии, требуют упаривания и перерастворения образца, что неминуемо ведёт к потерям и погрешностям.

Преимуществом нашего подхода является то, что мы применили сравнительно новый метод жидкостной экстракции с высаливанием, позволяющий минимизировать потери на промежуточных аналитических этапах, так как экстрагентом является ацетонитрил и его можно сразу использовать для анализа в ОФ-хроматографии. Кроме того, как показано ранее, эффективность экстракции ацетонитрилом при сравнении с обычным осаждением белков значительно выше из-за увеличения площади соприкосновения фаз [20]. В перспективе при применении сравнительно простой методики можно добиться приемлемой степени извлечения для многих аналитов, включая обширные андрогенные панели. Также наш метод удобен для глубокой автоматизации и с успехом может быть использован в масштабных скрининговых проектах с участием тысяч субъектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый метод определения тестостерона в сыворотке крови женщин репродуктивного возрас-

та с использованием высокоэффективной жидкостной обращённо-фазовой хроматографии с тандемной масс-селективной детекцией аналита обладает необходимой точностью и воспроизводимостью результатов, характеризуется простой и быстрой пробоподготовкой, легко адаптируемой для использования в автоматических станциях подготовки проб при потоковом анализе. Метод приемлем для верификации гиперандрогенемии при проведении популяционных эпидемиологических исследований распространённости СПКЯ и его фенотипов, а также в клинической практике.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Авторы выражают признательность Cristina Wang (Clinical and Translational Science Institute, LA Biomedical Research Institute, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Harbor-Univ of Calif-LA Medical Center, Torrance, CA, USA) за консультативную помощь и предоставленную возможность стажировки, а также Frank Stanczyk (Department of Obstetrics and Gynecology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA.) за консультативную помощь при разработке и проведении валидации метода.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016; 106(1): 6-15. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.05.003

2. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2018; 110(3): 364-379. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.004

3. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012; 97(1): 28-38.e25. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.09.024

4. Lizneva D, Gavrilova-Jordan L, Walker W, Azziz R. Androgen excess: Investigations and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016; 37: 98-118. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.05.003

5. Bozdag G, Mumusoglu S, Zengin D, Karabulut E, Yildiz BO. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2016; 31(12): 2841-2855. doi: 10.1093/humrep/dew218

6. Boyle JA, Cunningham J, O'Dea K, Dunbar T, Norman RJ. Prevalence of polycystic ovary syndrome in a sample of Indigenous women in Darwin, Australia. *Med J Aust*. 2012; 196(1): 62-66. doi: 10.5694/mja11.10553

7. Azziz R, Kintziger K, Li R, Laven J, Morin-Papunen L, Merkin SS, et al. Recommendations for epidemiologic and phenotypic research in polycystic ovary syndrome: An androgen excess and PCOS society resource. *Hum Reprod*. 2019; 34(11): 2254-2265. doi: 10.1093/humrep/dez185

8. Chen Y, Yazdanpanah M, Hoffman BR, Diamandis EP, Wong PY. Rapid determination of serum testosterone by liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry and a split sample comparison with three automated immunoassays. *Clin Biochem*. 2009; 42(6): 484-490. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.11.009

9. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: An Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(2): 405-413. doi: 10.1210/jc.2006-1864

10. Salameh WA, Redor-Goldman MM, Clarke NJ, Mathur R, Azziz R, Reitz RE. Specificity and predictive value of circulating testosterone assessed by tandem mass spectrometry for the diagnosis of polycystic ovary syndrome by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil Steril*. 2014; 101(4): 1135-1141.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.056

11. Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Bio.* 2010; 121(3-5): 491-495. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.05.001

12. Fanelli F, Gambineri A, Mezzullo M, Vicennati V, Pelusi C, Pasquali R, et al. Revisiting hyper- and hypo-androgenism by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013; 14(2): 185-205. doi: 10.1007/s11154-013-9243-y

13. Wierman ME, Auchus RJ, Haisenleder DJ, Hall JE, Handelsman D, Hankinson S, et al. Editorial: The new instructions to authors for the reporting of steroid hormone measurements. *Mol Endocrinol*. 2014; 28(12): 1917. doi: 10.1210/me.2014-1285

14. Tosi F, Fiers T, Kaufman JM, Dall'Alda M, Moretta R, Giagulli VA, et al. Implications of androgen assay accuracy in the phenotyping of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101(2): 610-618. doi: 10.1210/jc.2015-2807

15. Trabert B, Xu X, Falk RT, Guillemette C, Stanczyk FZ, McGlynn KA. Assay reproducibility of serum androgen measurements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 155(PtA): 56-62. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.032

16. Suturina L, Lizneva D, Danusevich I, Lazareva L, Belenkaya L, Nadeliaeva I, et al. The design, methodology, and recruitment rate for the Eastern Siberia PCOS epidemiology&phenotype (ES-PEP) Study. *Abstracts of the 41st Annual Meeting of the Androgen Excess & PCOS Society.* Lorne, Victoria, Australia; 2016: 76.

17. Deshpande M, Kasture S, Mohan M, Chavan M. Bioanalytical method development and validation: A review. In: Muharrem L, Olcay Kaplan I (eds) *Recent Advances in Analytical Chemistry.* London: Intech Open; 2019.

18. Boterman M, Doig M, Breda M, Lowes S, Jersey J, Shoup R, et al. Recommendations on the interpretation of the new European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation by Global CRO Council for Bioanalysis (GCC). *Bioanalysis*. 2012; 4(6): 651-660. doi: 10.4155/bio.12.18

19. Fiandalo MV, Wilton JH, Mantione KM, Wrzosek C, Attwood KM, Wu Y, et al. Serum-free complete medium, an alternative medium to mimic androgen deprivation in human prostate cancer cell line models. *Prostate*. 2018; 78(3): 213-221. doi: 10.1002/pros.23459

20. Zhang J, Wu H, Kim E, El-Shourbagy TA. Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: A new high through-

put sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2019; 23(4): 419-425. doi: 10.1002/bmc.1135

21. Salameh WA, Redor-Goldman MM, Clarke NJ, Reitz RE, Caulfield MP. Validation of a total testosterone assay using high-turbulence liquid chromatography tandem mass spectrometry: total and free testosterone reference ranges. *Steroids*. 2010; 75(2): 169-175. doi: 10.1016/j.steroids.2009.11.004

22. Alvi SN, Hammami MM. An improved method for measurement of testosterone in human plasma and saliva by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Adv Pharm Technol Res*. 2020; 11(2): 64-68. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_162_19

23. van Nuland M, Venekamp N, Wouters WME, van Rossum HH, Rosing H, Beijnen JH. LC-MS/MS assay for the quantification of testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione, cortisol and prednisone in plasma from castrated prostate cancer patients treated with abiraterone acetate or enzalutamide. *J Pharm Biomed Anal*. 2019; 170: 161-168. doi: 10.1016/j.jpba.2019.03.043

Сведения об авторах

Сутурина Лариса Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: Lsuturina@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6271-7803

Бельских Алексей Владимирович – кандидат химических наук, инженер лаборатории персонализированной медицины, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: alex590750@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3678-7274

Шолохов Леонид Федорович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: lfshol@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3588-6545

Рашидова Мария Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: rashidovama@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4730-5154

Данусевич Ирина Николаевна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: irinaemails@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-8862-5771

Лазарева Людмила Михайловна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: lirken_@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7662-8529

Наделяева Яна Геннадьевна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: ianadoc@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-5747-7315

Беленькая Лилия Васильевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: drblv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4904-3709

Аталян Алина Валерьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории социально значимых проблем репродуктологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: alinaa@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-3407-9365

Вильсон Наталия Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: miracle_909@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7604-6246

Игумнов Илья Андреевич – младший научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: iigumnov7@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-1078-3657

Иевлева Ксения Дмитриевна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: asiy91@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0177-234X

Егорова Ирина Юрьевна – младший научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: egorovairina1994@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-6847-9810

Баирова Татьяна Ананьевна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: tbairova38@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3704-830X

Information about the authors

Larisa V. Suturina – Dr. Sc. (Med.), Chief Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: Lsuturina@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6271-7803

Aleksey V. Belskikh – Cand. Sc. (Chem.), Engineer at the Laboratory of Personalized Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: alex590750@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3678-7274

Leonid F. Sholokhov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Leading Research Officer at the Laboratory of Physiology and Pathology of the Endocrine System, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: lfshol@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3588-6545

Maria A. Rashidova – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Physiology and Pathology of the Endocrine System, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: rashidovama@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4730-5154

Irina N. Danusevich – Dr. Sc. (Med.), Leading Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru, https://orcid.org/0000-0002-8862-5771

Lyudmila M. Lazareva – Cand. Sc. (Med.), Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: lirken_@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7662-8529

Iana G. Nadeliaeva – Cand. Sc. (Med.), Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: ianadoc@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-5747-7315

Liliia V. Belenkaia – Cand. Sc. (Med.), Research Officer at the Laboratory of Physiology and Pathology of the Endocrine System, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: drblv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-4904-3709

Alina V. Atalyan – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Socially Significant Infections in Reproductive Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: alinaa@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-3407-9365

Natalia I. Vilson – Junior Research Officer at the Laboratory of Physiology and Pathology of the Endocrine System, Scientific Research Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: miracle_909@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7604-6246

Ilia A. Igumnov – Junior Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: iigumnov7@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-1078-3657

Kseniia D. Ievleva – Cand. Sc. (Med.), Junior Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: asiy91@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0177-234X

Irina Yu. Egorova – Junior Research Officer at the Laboratory of Gynecological Endocrinology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: egorovairina1994@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-6847-9810

Tatyana A. Bairova – Dr. Sc. (Med.), Leading Research Officer at the Laboratory of Personalized Medicine, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: tbairova38@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3704-830X