Determinazione degli ormoni steroidei mediante spettrometria di massa*

Steven J. Soldin[1,2], Offie P. Soldin[1,3,4]
[1]Department of Medicine, [2]Department of Pharmacology and General Clinical Research Center, [3]Lombardi Department of Oncology, Comprehensive Cancer Center, [4]Department of Physiology and Biophysics, Georgetown University, Washington, DC, USA

Traduzione a cura di Ferruccio Ceriotti

ABSTRACT

Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. New high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods are among the most successful approaches to improve specificity problems inherent in many immunoassays. We emphasize problems with immunoassays for the measurement of steroids and review the emerging role of LC-MS/MS in the measurement of clinically relevant steroids. The latest generation of tandem mass spectrometers has superior limits of quantification, permitting omission of previously employed derivatization steps. The measurement of steroid profiles in the diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia, adrenal insufficiency, chronic pelvic pain and prostatitis, oncology (breast cancer), and athletes has important new applications. LC-MS/MS now affords the specificity, imprecision, and limits of quantification necessary for the reliable measurement of steroids in human fluids, enhancing diagnostic capabilities, particularly when steroid profiles are available.

INTRODUZIONE

Gli ormoni steroidei sono sintetizzati a partire dal colesterolo e molti hanno grande rilevanza clinica (1). La sintesi avviene nei mitocondri e nel reticolo endoplasmico liscio delle cellule della corticale del surrene, delle gonadi e della placenta (Figura 1). Il surrene è composto da midollare e corticale; quest'ultima è suddivisa in 3 zone anatomiche: la zona granulosa, che produce i mineralcorticoidi come corticosterone e aldosterone, e le zone fascicolata e reticolare, che assieme producono i glicocorticoidi (11-desossicortisolo, cortisolo) e gli androgeni del surrene [deidoepiandrostenedione (DHEA), DHEA-solfato (DHEAS)], che nel surrene sono prodotti in quantità molto superiore rispetto all'androstenedione e al testosterone. L'aromatasi [citocromo P (CYP)-450 19, CYP19A1] aggiunge due doppi legami all'anello A del testosterone, producendo estradiolo con un anello aromatico A, e aromatizza anche l'anello A dell'androstenedione per formare estrone (E1).

Uno degli obiettivi del trattamento di alcuni tipi di cancro mammario è la riduzione della concentrazione degli estrogeni, che si può ottenere con l'uso di inibitori dell'aromatasi (AIs), che bloccano la conversione degli androgeni in estrogeni (2). Gli AIs non bloccano completamente la sintesi degli estrogeni da parte delle ovaie, ma impediscono agli altri tessuti di convertire gli androgeni in estrogeni. Per questa ragione, gli AIs sono utilizzati prevalentemente nelle donne in menopausa, quando le ovaie non sono più in grado di produrre steroidi. L'E1, sintetizzato principalmente dalla conversione dell'androstenedione causata dall'aromatasi, è metabolizzato in vari steroidi tra cui il 2-idrossiestrone (2-OHE1) (prodotto dal CYP1A2) ed il 16-α-idrossiestrone (16-OHE1) prodotto da CYP3A4 e CYP1A2. Il primo è blandamente estrogenico e inibisce la proliferazione delle cellule mammarie (3-6), mentre il secondo è cancerogeno e genotossico ed aumenta la crescita delle cellule mammarie, la sintesi di DNA e l'espressione di oncogeni (3). Sono in atto tentativi di modificare il rapporto 2-OHE1:16-OHE1 in giovani donne attraverso l'uso dell'antidepressivo fluoxetina (6). La fluoxetina è un noto inibitore di molti isoenzimi P450 tra cui 3A4, 2C9 e 2D6 e si sa che altera la concentrazione degli estrogeni.

METODI DI DETERMINAZIONE

Gli steroidi endogeni sono stati misurati con metodi immunochimici (7-12), gas cromatografia - spettrometria di massa (GC-MS) (13-15) e HPLC - spettrometria tandem massa (LC-MS/MS) (16-21). Dalla valutazione dei risultati della misura degli steroidi nel programma di VEQ

**Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2009;55:1061-6 su permesso dell'Editore.*
Copyright originale © 2009 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.

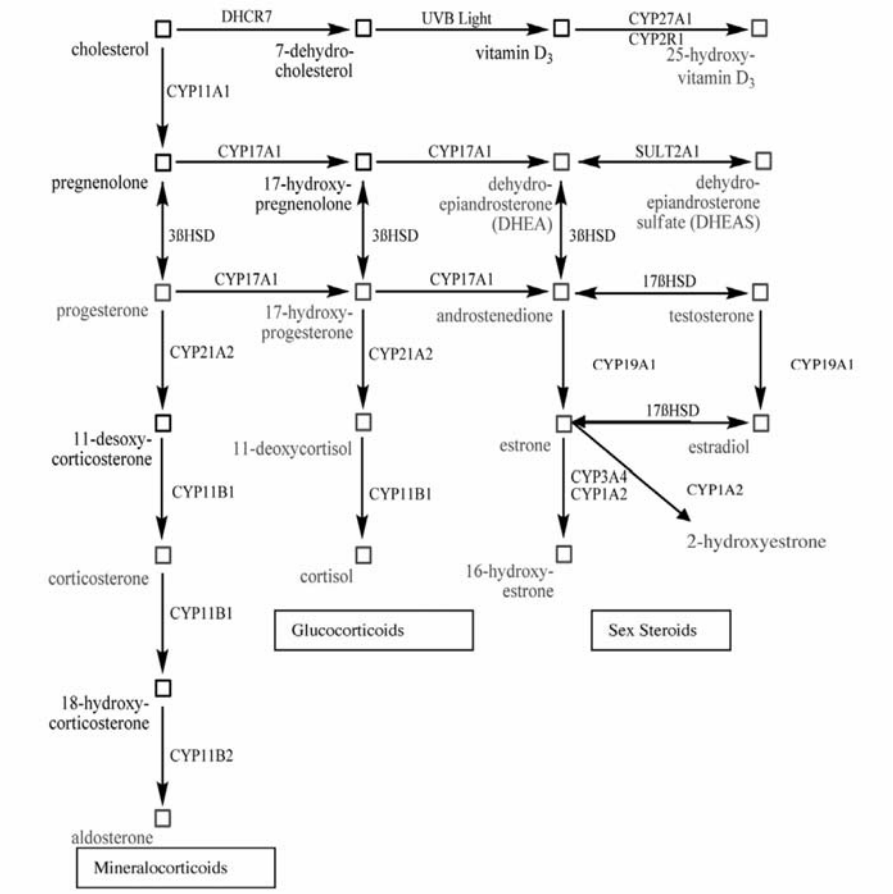


Figura 1
Vie di sintesi degli ormoni steroidei.

organizzato dal "College of American Pathologists" (CAP) si possono ottenere importanti informazioni. La maggioranza dei laboratori partecipanti utilizza metodi immunochimici, basati ciascuno su anticorpi differenti. Il CAP calcola la media per ciascun metodo ed è così possibile dividere il valore medio del metodo che dà la media più alta per quello del metodo con la media più bassa. La Tabella 1 riassume i risultati dei metodi immunochimici di uno degli esercizi 2008 del CAP. In questo specifico esercizio, i laboratori che usano i metodi che danno i risultati più alti differiscono da quelli che forniscono i risultati più bassi di un fattore 2,8, 9,0 e 3,3, rispettivamente per testosterone, estradiolo e progesterone.

Questo esempio dimostra in modo efficace l'entità del problema dei metodi immunochimici dovuto a molti fattori, tra cui la mancanza di specificità degli anticorpi utilizzati per la misura di un particolare steroide. Questa scarsa qualità dei metodi immunochimici per la misura degli steroidi non riguarda solo i 3 steroidi mostrati nella Tabella 1, ma tutti gli steroidi misurati nel programma di VEQ del CAP. Ciò contrasta con le buone prestazioni dei metodi immunochimici per la misura dei farmaci (fenitoina, fenobarbital, carbamazepina, ecc.), per i quali le medie per i diversi metodi sono pressoché identiche. Stanczyk et al. (22) affermano che la mancanza di standardizzazione della misura degli ormoni steroidei è un problema fondamentale negli studi epidemiologici. Nelle donne in menopausa sono riportate concentrazioni di estradiolo molto variabili, con valori di riferimento che variano di circa 6 volte (22), a conferma dei dati della VEQ del CAP riportati in precedenza.

In contrasto, la Tabella 2 mostra i risultati dei laboratori che utilizzano MS/MS per la misura degli steroidi. Il rapporto alto/basso è molto migliore, variando da 1,0 a 1,4. Va precisato, tuttavia, che il numero di laboratori che riportano i risultati di testosterone, estradiolo e progesterone con la spettrometria di massa tandem è molto limitato (9, 2 e 3 rispettivamente in questo esercizio). Questo può contribuire, almeno parzialmente, a spiegare le prestazioni apparentemente superiori della MS in confronto con i metodi immunochimici e fa sorgere il dubbio che non tutti i laboratori che utilizzano MS/MS partecipino al programma del CAP.

FATTORI DA CONSIDERARE NELLA DETERMINAZIONE IN SPETTROMETRIA DI MASSA DEGLI STEROIDI

Derivatizzazione vs. non derivatizzazione

Questo è oggi un problema ancora dibattuto. Coloro che propongono l'impiego della derivatizzazione sosten-

Tabella 1
Mancanza di specificità dei metodi immunochimici per la misura degli ormoni steroidei. Dati dal programma di VEQ del "College of American Pathologists", esercizio Y-A 2008

Analita	Media più bassa (L)	Media più alta (H)	Fattore H/L
Testosterone, ng/dL	52,6	148,7	2,8
Estradiolo, ng/L	25,4	229,0	9,0
Progesterone, μg/L	0,83	2,72	3,3

Tabella 2
Dati relativi ai metodi in spettrometria di massa per la determinazione degli ormoni steroidei. Programma VEQ del "College of American Pathologists", esercizio Y-A 2008

Analita	Valore più basso (L)	Valore più alto (H)	Fattore H/L
Testosterone, ng/dL			
Livello 1	52	72	1,4
Livello 2	182	225	1,2
Estradiolo, ng/L			
Livello 1	109	109	1,0
Livello 2	628	630	1,0
Progesterone, μg/L			
Livello 1	0,7	0,9	1,3
Livello 2	8,1	8,6	1,1

gono che essa migliora sia il limite di quantificazione sia la specificità. Ciò è, tuttavia, questionabile perché la derivatizzazione ha i suoi svantaggi, che includono la minore precisione dovuta ai passaggi aggiuntivi (estrazione, derivatizzazione a pH estremi). Anche l'esattezza può essere compromessa a causa della possibile idrolisi dei coniugati, che comporterebbe risultati falsamente aumentati. Un problema di questo tipo potrebbe accadere con i coniugati dell'estradiolo che, se idrolizzati, genererebbero estradiolo. Partecipando al comitato scientifico della VEQ del CAP abbiamo confrontato i valori ottenuti per testosterone, progesterone e estradiolo in tre laboratori che utilizzano la spettrometria di massa tandem. Se per il testosterone ed il progesterone c'era un accordo eccellente, nel caso dell'estradiolo i laboratori che utilizzavano la derivatizzazione a pH estremo avevano risultati circa il 10–20% più alti del laboratorio che non la utilizzava. I metodi con derivatizzazione sono anche lunghi e quindi richiedono tempi maggiori. Nel corso degli ultimi 15 anni, i limiti di rilevazione con i moderni spettrometri di massa sono molto migliorati, rendendo superflua la derivatizzazione. Per questo motivo, noi abbiamo proposto di eliminare la derivatizzazione nella misura degli steroidi (17-19).

Tipo di ionizzazione

La ionizzazione electrospray (ESI) in "modo negativo" produce i risultati migliori per gli estrogeni (estradiolo, estriolo, E1 e 16-OHE1) (18). Il metodo utilizzato, senza derivatizzazione, ha un limite di rilevazione (LOD) di 1-2 ng/L per tutti quattro gli estrogeni quando si utilizza lo spettrometro API-5000 (Applied Biosystems). Sono necessari solo 0,2 mL di campione e il tempo totale di cromatografia per ciascun profilo di estrogeni è di 8 min. L'utilizzo di colonne analitiche C-8 (Supelco LC-8-DB; 3,3 per 3,0 mm, particelle di 3 μm) è preferibile rispetto alle colonne C-18, perchè riducono notevolmente il tempo di ritenzione dell'analita in questione. La nostra esperienza e quella di altri (14, 18, 22) hanno dimostrato che i saggi immunochimici hanno problemi a bassi livelli di concentrazione di estrogeni (<80 ng/L) e spesso forniscono risultati falsamente aumentati.

Per DHEA, DHEAS, androstenedione, testosterone, progesterone, cortisolo, 11-desossicortisolo, corticosterone e aldosterone abbiamo trovato che la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI) ha potenziali vantaggi rispetto a ESI o APCI (ionizzazione chimica a pressione atmosferica) perché ha una fonte di ionizzazione delicata, che ionizza in modo efficace questi steroidi in modo piuttosto selettivo, fornendo cromatogrammi più chiari. Alary (23) ha confrontato APPI-MS/MS con APCI per la misura degli steroidi in matrici biologiche ed ha riportato che il segnale ottenuto con la sorgente APPI era 3-10 volte più intenso di quello ottenuto impiegando una fonte APCI. Nel nostro metodo APPI (19), il volume di campione è 0,2 mL di siero o plasma; dopo la deproteinizzazione con acetonitrile contenente lo standard interno deuterato, la soluzione è agitata su vortex-mixer e quindi centrifugata; il sopranatante è iniettato direttamente in una colonna C-8, come nel caso degli estrogeni. La colonna viene lavata con il tampone, si attiva la valvola di "switch" e gli steroidi sono eluiti nella spettrometro tandem massa usando un gradiente di metanolo.

Il tempo totale di cromatografia per il profilo degli steroidi è di 11 min. Il LOD varia da 1,5 a 10 ng/L in base all'analita (19). Sebbene la soppressione ionica abbia limitato l'impiego di molti metodi MS/MS, ciò accade raramente con il metodo descritto. Le buone prestazioni sono dovute all'uso di standard interno deuterato e di un passaggio di lavaggio in linea del campione.

Determinazione in profilo rispetto a misurazione singola

I grandi laboratori hanno quantità elevate di campioni per molti degli steroidi clinicamente importanti discussi in precedenza. Per gestire questo volume di lavoro e permettere tempi di refertazione rapidi con tempi di cromatografia brevi, questi laboratori hanno adottato la filosofia di 1 strumento/1 steroide, con un diverso spettrometro di massa per ciascuno steroide.

Laboratori più piccoli con un carico di lavoro meno consistente, d'altra parte, hanno valutato l'impiego potenziale della misura del profilo di steroidi. Dato che la LC-MS/MS permette la misura simultanea di vari steroidi, il volume di campione può essere ridotto rispetto alle metodiche immunochimiche che richiedono una nuova aliquota di campione per ciascuno steroide misurato; questo appare di particolare rilievo per la valutazione dei bambini, dove la quantità del campione è ridotta.

Circostanze in cui possono essere utilizzati i profili di steroidi

Iperplasia surrenalica congenita (CAH)

La CAH è un errore congenito della biosintesi degli steroidi. Essa rappresenta un gruppo di malattie ereditarie causate da una ridotta attività di 1 dei 5 enzimi presenti nella corteccia surrenalica. L'enzima carente porta ad una ridotta produzione di cortisolo [causando un aumento dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH)] ed un eccesso di produzione degli ormoni prossimali al difetto. Le due forme più comuni di CAH sono causate da mancanza di 21-idrossilasi (difetto dell'enzima P450c21) o di 11-β-idrossilasi (difetto dell'enzima P450c11). I soggetti con CAH dovuta a mancanza di 11- o 21-idrossilasi non riescono a produrre quantità sufficienti di cortisolo e, in alcuni casi, mancano anche di aldosterone. Questi ormoni sono essenziali per il metabolismo del glucosio e il riassorbimento del sodio. Se non trattata, la CAH può portare a insufficienza surrenalica acuta, con disidratazione, shock e persino morte. Per la valutazione di CAH si raccomanda di misurare cortisolo, androstenedione e 17-idrossiprogesterone (24-26). Al Children's National Medical Center utilizziamo un ampio profilo di 11-steroidi per migliorare la specificità dello screening per CAH dovuta a carenza di 21-idrossilasi o di 11-idrossilasi (19). Lo screening dei neonati per la presenza di CAH soffre di un alto numero di risultati falsi negativi e falsi positivi quando si usino metodi immunochimici per misurare il 17-idrossiprogesterone, specialmente nei neonati critici e nei pretermine. Perciò, una immediata rianalisi con LC-MS/MS di tutti i risultati superiori al cutoff può permettere una migliore distinzione fra neonati malati e non (24, 26).

Insufficienza surrenalica

Per la valutazione dell'insufficienza surrenalica storicamente si raccomanda l'utilizzo della misura del cortisolo 0, 30 e 60 min dopo la somministrazione di ACTH (27-29). Noi abbiamo migliorato l'affidabilità diagnostica di questo approccio misurando i tre steroidi aldosterone, cortisolo e, soprattutto, 11-desossicortisolo a 0, 30 e 60 min. L'inclusione nel profilo dell'aldosterone permette di distinguere l'insufficienza primaria dalla secondaria. Infatti, nell'insufficienza surrenalica primaria non c'è alcuna risposta da parte dell'aldosterone, mentre nella secondaria si riscontra una risposta adeguata (30). La concentrazione del 11-desossicortisolo nei controlli aumenta da 15 a 20 volte dopo lo stimolo con ACTH a confronto dell'aumento di circa 3 volte del cortisolo, analita misurato tradizionalmente. Il nostro studio ha dimostrato che la misura di questi tre steroidi permetteva una maggiore accuratezza diagnostica rispetto alla misura del solo cortisolo (30).

Altre applicazioni

Abbiamo valutato il ruolo dei profili steroidei nei pazienti con prostatite cronica/sindrome da dolore pelvico. I nostri risultati suggeriscono un'attività ridotta di CYP21A2 (P450c21), che è l'enzima 21-idrossilasi che converte il progesterone in 11-desossicorticosterone e il 17-idrossiprogesterone in 11-desossicortisolo (Figura 1) (31).

Abbiamo verificato se i profili steroidei potessero permettere di comprendere le cause dell'adrenarca prematuro e dei bambini con peli genitali (pubarca). In entrambi i gruppi, le concentrazioni di testosterone, androstenedione, DHEA e DHEAS erano lievemente superiori a quelle del gruppo di controllo di pari età (32). Abbiamo anche valutato gli intervalli di riferimento di questi steroidi durante la gravidanza e un anno dopo il parto, sempre con la spettrometria di massa tandem con diluizione isotopica (33).

Sono state effettuate misure di 15 steroidi e degli ormoni tiroidei nei sieri di fumatori attivi, passivi e di non fumatori per esaminare l'associazione fra esposizione al fumo e livelli ormonali (34, 35). Anche se non sappiamo se le concentrazioni ematiche degli ormoni riflettano modificazioni che vanno in parallelo con le variazioni delle concentrazioni fisiologiche degli ormoni steroidei, l'assunto è che le differenze riflettano un'associazione con l'esposizione al fumo di tabacco.

La LC-MS/MS dopo estrazione in fase solida è stata impiegata per ottenere un profilo lipidomico di ormoni steroidei femminili nelle urine umane. Ciò potrebbe avere un potenziale utilizzo clinico e per la ricerca in metabolomica (36).

Il diabete influenza marcatamente gli steroidi neuroattivi nel sistema nervoso. La misura mediante LC-MS/MS della concentrazione di steroidi neuroattivi fornisce una base per nuovi strumenti terapeutici per contrastare la neuropatia diabetica (37).

La presenza di tracce minime di estrogeni come E2, E1, estriolo e 17α-etinilestradiolo, può avere effetti negativi sugli esseri umani e sull'ecosistema acquatico. È perciò importante essere in grado di misurare in modo affidabile tracce (a concentrazioni rilevanti dal punto di vista ambientale) di estrogeni nell'acqua. Con la LC-MS/MS è oggi possibile rilevare queste sostanze chimiche in piccoli campioni di acqua fino a concentrazioni di 0,04 ng/L (38-41).

Infine, i profili steroidei sono stati usati per verificare le variazioni degli steroidi surrenalici dopo una gara di ultramaratona di 56 km (42). Le concentrazioni dei mineralcorticoidi corticosterone e aldosterone aumentavano in modo significativo, così come quelle dei glucocorticoidi cortisolo, 11-dessicortisolo e 17-OH progesterone e degli steroidi surrenalici DHEA, DHEAS e androstenedione (P <0,0001 per tutti).

Alcune aree di futura ricerca includono lo studio del ruolo dei neurosteroidi nell'epilessia, in particolare in ragazze prepuberi in cui è stato rilevato un incremento marcato nell'attività epilettica (43-45), e l'analisi degli androgeni nei pazienti con iperplasia prostatica benigna e cancro della prostata (46, 47).

In conclusione, la LC-MS/MS ora consente la specificità, l'imprecisione e il limite di quantificazione necessari per una misura affidabile degli steroidi nei fluidi umani, migliorando così le possibilità diagnostiche, in particolare quando sono disponibili i profili di steroidi. I principali vantaggi della MS consistono nel piccolo volume di campione necessario, nella misura simultanea di molti analiti e nella maggiore specificità rispetto ai metodi immunochimici. I metodi MS sono ancora piuttosto indaginosi e richiedono sicuramente un livello superiore di esperienza rispetto alle piattaforme immunochimiche automatizzate. Sono state descritte interferenze occasionali per i metodi MS, come l'interferenza di metaboliti del prednisolone/prednisone nella misura del cortisolo libero urinario (48). Bisogna sottolineare il fatto che il rimborso per il profilo steroideo non è ancora approvato da "Medicare" (con l'eccezione della CAH) e che i clinici non ordinano frequentemente questi profili. Questo potrà cambiare se i profili ormonali steroidei saranno maggiormente apprezzati nei prossimi anni. Anche se i saggi in MS non sono sempre più precisi di quelli immunochimici, sono sicuramente più specifici. Evitando l'estrazione e la derivatizzazione, le misure degli steroidi in MS hanno, tuttavia, una buona precisione (18, 19). L'interferenza da farmaci è stata verificata e non costituisce un problema per i profili di steroidi ed estrogeni descritti in questa rassegna (18, 19). Questi due metodi sono anche relativamente liberi da soppressione ionica.

BIBLIOGRAFIA

1. Holst JP, Soldin OP, Guo T, Soldin SJ. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. Clin Lab Med 2004;24:105-18.
2. Swain SM. Aromatase inhibitors: a triumph of translational oncology. N Engl J Med 2005;353:2807-9.
3. Bradlow HL, Davis DL, Lin G, et al. Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha/2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. Environ Health Perspect 1995;103:147-50.
4. Chen Z, Zheng W, Dunning LM, et al. Within-person variability of the ratios of urinary 2-hydroxyestrone to 16alpha-hydroxyestrone in Caucasian women. Steroids 1999;64:856-9.
5. Shou M, Korzekwa KR, Brooks EN, et al. Role of human hepatic cytochrome P450 1A2 and 3A4 in the metabolic activation of estrone. Carcinogenesis 1997;18:207-14.
6. Thompson DS, Kirshner MA, Klug TL, et al. A preliminary study of the effect of fluoxetine treatment on the 2:16-alpha-hydroxyestrone ratio in young women. Ther Drug Monit 2003;25:125-8.
7. Carter GD, Carter R, Jones J, et al. How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the international vitamin D external quality assessment scheme. Clin Chem 2004;50:2195-7.
8. Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, et al. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. Steroids 2002;67:151-8.
9. Hollis BW, Kamerud JQ, Kurkowski A, et al. Quantification of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D by radioimmunoassay with ^{125}I-labeled tracer. Clin Chem 1996;42:586-92.
10. Hsing AW, Stanczyk FZ, Belanger A, et al. Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16:1004-8.
11. Poulson K, Sancho J, Haber E. A simplified radioimmunoassay for plasma aldosterone employing an antibody of unique specificity. Clin Immunol 1974;2:373-80.
12. Schioler V, Thode J. Six direct radioimmunoassays of estradiol evaluated. Clin Chem 1988;34:949-52.
13. Andrew R. Clinical measurement of steroid metabolism. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2001;15:1-16.
14. Santen RJ, Demers L, Ohorodnik S, et al. Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy. Steroids 2007;72:666-71.
15. Wolthers BG, Kraan GP. Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids. J Chromatogr A 1999;843:247-74.
16. Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, et al. Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2000;870:511-22.
17. Guo T, Chan M, Soldin SJ. Steroid profiles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization source. Arch Pathol Lab Med 2004;128:469-75.
18. Guo T, Gu J, Soldin OP, et al. Rapid measurement of estrogens and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. Clin Biochem 2008;41:736-41.
19. Guo T, Taylor RL, Singh RJ, et al. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2006;372:76-82.
20. Nelson RE, Grebe SK, OKane DJ, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma. Clin Chem 2004;50:373-84.
21. Xu X, Roman JM, Issaq HJ, et al. Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chem 2007;79:7813-21.
22. Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of ste-

roid hormone assays: why, how, and when? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16:1713-9.
23. Alary JF. Comparative study: LC/MS/MS analysis of four steroid compounds using a new photoionization source and a conventional APCI source. In: Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2001; Chicago: American Society for Mass Spectrometry; 2001:A010942.
24. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, et al. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. Clin Chem 2004;50:621-5.
25. Minutti CZ, Lacey JM, Magera MJ, et al. Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:3687-93.
26. Janzen N, Peter M, Sander S, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:2581-9.
27. Crowley S, Hindmarsh PC, Honour JW, et al. Reproducibility of the cortisol response to stimulation with a low dose of ACTH(1–24): the effect of basal cortisol levels and comparison of low-dose with high-dose secretory dynamics. J Endocrinol 1993;136:167-72.
28. Grinspoon SK, Biller BM. Clinical review 62: laboratory assessment of adrenal insufficiency. J Clin Endocrinol Metab 1994;79:923-31.
29. May ME, Carey RM. Rapid adrenocorticotropic hormone test in practice: retrospective review. Am J Med 1985;79:679-84.
30. Holst JP, Soldin SJ, Tractenberg RE, et al. Use of steroid profiles in determining the cause of adrenal insufficiency. Steroids 2007;72:71-84.
31. Dimitrakov J, Joffe HV, Soldin SJ, et al. Adrenocortical hormone abnormalities in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. Urology 2008;71:261-6.
32. Kaplowitz P, Soldin SJ. Steroid profiles in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in infants with genital hair. J Pediatr Endocrinol Metab 2007;20:597-605.
33. Soldin OP, Guo T, Weiderpass E, et al. Steroid hormone levels in pregnancy and 1 year postpartum using isotope dilution tandem mass spectrometry. Fertil Steril 2005;84:701-10.
34. Soldin OP, Loffredo CA, Shields PG, et al. Hormone changes in women of reproductive age associations with genetics and tobacco smoke exposure. From: Flight Attendant Medical Research Institute's Sixth Scientific Symposium, 2007.
35. Soldin OP, Soldin SJ, Ressom H, et al. Hormone changes in women of reproductive age associated with tobacco smoke exposure using metabolomics. Soc Gynecol Invest Annu Meeting, 2008.
36. AlvarezSanchez B, Capote FP, Jimenez JR, et al. Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: an approach to lipidomics. J Chromatogr A 2008;1207:46-54.
37. Caruso D, Scurati S, Maschi O, et al. Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. Neurochem Int 2008;52:560-8.
38. Lin YH, Chen CY, Wang GS. Analysis of steroid estrogens in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. Rapid Commun Mass Spectrom 2007;21:1973-83.
39. Reddy S, Iden CR, Brownawell BJ. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chem 2005;77:7032-8.
40. Schlusener MP, Bester K. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. Rapid Commun Mass Spectrom 2005;19:3269-78.
41. Stanford BD, Weinberg HS. Isotope dilution for quantitation of steroid estrogens and nonylphenols by gas chromatography with tandem mass spectrometry in septic, soil, and groundwater matrices. J Chromatogr A 2007;1176:26-36.
42. Hew-Butler T, Jordaan E, Stuempfle KJ, et al. Osmotic and nonasmotic regulation of arginine vasopressin during prolonged endurance exercise. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:2072-8.
43. Higashi T, Nagahama A, Otomi N, et al. Studies on neurosteroids XIX. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for determination of 5alpha-reduced pregnane-type neurosteroids in rat brain and serum. J Chromatogr 2007;848:188-99.
44. Hill M, Bicikova M, Parizek A, et al. Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal blood: 2. Time profiles of pregnanolone isomers. J Steroid Biochem Mol Biol 2001;78:51-7.
45. Hill M, Parizek A, Bicikova M, et al. Neuroactive steroids, their precursors, and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 1. Identification and simultaneous determination of pregnanolone isomers. J Steroid Biochem Mol Biol 2000;75:237-44.
46. Higashi T, Yamauchi A, Shimada K, et al. Determination of prostatic androgens in 10 mg of tissue using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with charged derivatization. Anal Bioanal Chem 2005;382:1035-43.
47. Zhao M, Baker SD, Yan X, et al. Simultaneous determination of steroid composition of human testicular fluid using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Steroids 2004;69:721-6.
48. Kushnir MM, Rockwood AL, Nelson GJ, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of urinary free cortisol. Clin Chem 2003;49:965-7.