Bung

на правах рукописи

### Вирюс Эдуард Даниэлевич

# РАЗВИТИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ КАК МЕТОДА СКРИНИНГА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЛОЖНЫХ ПО СОСТАВУ СМЕСЯХ

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук

Москва – 2020

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВТЖХ-МСВР/ОЛ	Высокотемпературная жидкостная хроматомасс- спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой	
ВТЖХ- МСВР/ОЛ(ФХИАД)	Высокотемпературная жидкостная хроматомасс- спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой, используемые в сочетании с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении	
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография	
ВЭЖХ-МСВР(ХИАД)	Высокоэффективная жидкостная хроматомасс- спектрометрия высокого разрешения в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении	
ВЭЖХ- МСВР/ОЛ(ХИАД)	Высокоэффективная жидкостная хроматомасс- спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой, используемые в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении	
ВЭЖХ-МСВР/ОЛ	Высокоэффективная жидкостная хроматомасс- спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой	
ВЭЖХ-МС/МС	Высокоэффективная жидкостная тандемная хроматомасс-спектрометрия	
ГХ	Газовая хроматография	
ГХ/МС	Газовая хроматомасс-спектрометрия	
ГХ/МСВР	Газовая хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения	
ΓX/MC/MC	Газовая тандемная хроматомасс-спектрометрия	
ИЭР	Ионизация электрораспылением	

MCBP	Масс-спектрометрия высокого разрешения	
MC/MC	Тандемная масс-спектрометрия	
МСВР/ОЛ	Macc-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой	
ОЛ	Орбитальная ионная ловушка	
ТФЭ	Твердофазная экстракция	
УЭЖХ-МСВР/ОЛ	Ультраэффективная жидкостная хроматомасс- спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой	
ФАВ	Физиологически активные вещества	
ФХИАД	Фотохимическая ионизация при атмосферном давлении	
ХИАД	Химическая ионизация при атмосферном давлении	
ХИИЭР	Химическая ионизация, индуцированная электрораспылением	
m/z	Отношение массы к заряду	

### оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ПРОБЛЕМА МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ	
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ	
ЖИДКОСТЯХ (НА ПРИМЕРЕ ЗАДАЧ СПОРТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ).	
ОРБИТАЛЬНАЯ ИОННАЯ ЛОВУШКА	17
1.1 Методология обнаружения физиологически активных веществ (на	
примере биоаналитических лабораторий спортивной медицины)	17
1.2 Систематизация физиологически активных веществ	19
1.3 Подходы обнаружения физиологически активных веществ с	
применением хроматографических и хромато-масс-спектрометрических	
методов	22
1.3.1 Амфетамины (стимуляторы) и наркотики	22
1.3.2 Бета-адреноблокаторы и Бета-адреномиметики	27
1.3.3 Мочегонные препараты (диуретики)	30
1.3.4 Глюкокортикоиды	34
1.3.5 Гормоны и модуляторы метаболизма (вещества с антиэстрогенной	
активностью	36
1.3.6 Экзогенные синтетические стероиды	36
1.4 Проблемы обнаружения широкого спектра физиологически активных	
веществ	44
1.5 Орбитальная ионная ловушка	48
1.5.1 Краткая история масс-спектрометрии с орбитальной ионной	
ловушкой	48
1.5.2 Современная орбитальная ионная ловушка Макарова	54
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	60
2.1 Реагенты и исследуемые соединения	60

2.2 Оборудование	79
2.3 Условия изучения матричных эффектов	80
2.3.1 Подготовка образцов для оценки матричного эффекта	80
2.3.2 Хроматографические условия	80
2.3.3 Масс-спектрометрометрические условия	83
2.3.3.1 Тандемная масс-спектрометрия	83
2.3.3.2 Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с селективным	
детектированием ионов	84
2.3.3.3 Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с	
детектированием в режиме полного сканирования	85
2.4 Хроматографические условия скрининга	86
2.5 Масс-спектрометрические условия скрининга	89
2.5.1 Масс-спектрометрия высокого разрешения с электронной	
ионизацией	89
2.5.2 Тандемная масс-спектрометрия с электронной ионизацией	91
2.6 Подготовка проб для скрининговых процедур	91
2.7 Прием препаратов добровольцами и отбор проб	92
2.7.1 Прием препарата Оксандролон	92
2.7.2 Прием препарата Parabolan	92
ГЛАВА З ОГРАНИЧЕНИЯ ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР)	93
3.1 Изучение матричных эффектов в условиях электрораспылительной	
ионизации	93
3.2 Определение метаболита орал туринабола в реальных образцах мочи	
методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР)	97
ГЛАВА 4 ВЭЖХ-МСВР/ОЛ В СОЧЕТАНИИ С ХИАД	105
4.1 Исследование матричного эффекта в условиях ХИАД	105
4.2 Определение веществ с антиэстрогенной активностью в моче	
методами ВЭЖХ-МС/МС(ИЭР) и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)	109
4.3 Определение 17α-метил-2-окса-5α-андростан-3-он-17β-ола и его	115

метаболита в моче методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) после	
прекращения его приема	
4.4 Изучение фрагментации агонистов PPAR в условиях	
столкновительной диссоциации методами ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-	
МСВР/ОЛ(ХИАД)	121
4.5 Скрининг ФАВ методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)	131
ГЛАВА 5 ВЭЖХ-МСВР/ОЛ И ВТЖХ-МСВР/ОЛ В СОЧЕТАНИИ С	
ФХИАД	148
5.1 Исследование матричного эффекта при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с	
ФХИАД	148
5.2 Определение стероидов в реальных образцах мочи методом ВЭЖХ-	
МСВР/ОЛ с ФХИАД	150
5.3 Исследование матричного эффекта при сочетании ВТЖХ-МСВР/ОЛ с	
ФХИАД	159
5.4 Определение стероидов в моче методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД	162
5.4.1 Поиск оптимальной подвижной фазы для ВТЖХ-МСВР/ОЛ с	
ФХИАД при определении стероидов	162
5.4.2 Скрининг ультрамалых количеств стероидов методом ВТЖХ-	
МСВР/ОЛ с ФХИАД	168
5.4.3 Сравнение способа определения стероидов методом ВТЖХ-	
МСВР/ОЛ в условиях ФХИАД с ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР	180
ГЛАВА 6 ВЭЖХ-МСВР/ОЛ В СОЧЕТАНИИ С ХИИЭР	183
6.1 История вопроса	183
6.2 Исследование матричного эффекта при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ	
с ХИИЭР	185
6.3 Скрининг ФАВ в моче методом УЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с	
ХИИЭР	187
ГЛАВА 7 НОВАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ХРОМАТО-МАСС-	
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ЭКЗОГЕННЫХ ФАВ В	205

БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ПОДХОДЫ ДОСТИЖЕНИЯ	
КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ С РЕФЕРЕНСНЫМИ МЕТОДАМИ	
АНАЛИЗА	
7.1 Выявление «труднодериватизируемых» ФАВ для референсного	
метода ГХ-МС	206
7.2 Твердофазная экстракция на магнитных частицах как подход к	
снижению эффекта подавления ионизации матрицей для референсного	
метода ВЭЖХ-МС/МС	210
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	214
ВЫВОДЫ	217
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	219
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	243
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	247
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	254

### введение

#### Актуальность

Основными проблемами современного многокомпонентного анализа медико-биологических объектов являются растущие требования к быстрому активных веществ (ΦAB), обнаружению физиологически непрерывное расширение круга определяемых ФАВ, разнообразие их физико-химических свойств и сложность химического состава анализируемых смесей с высоким содержанием мешающих компонентов, концентрация которых на несколько порядков выше, чем концентрация определяемых соединений. Для решения этих проблем в настоящее время осуществляют предварительный анализ, основанный на скрининге методами хромато-масс-спектрометрии.

Сегодня одним из основных хромато-масс-спектрометрических методов многокомпонентного скрининга ФАВ в медико-биологических объектах является газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС) в сочетании с дериватизацией, нацеленной на охват широкого спектра соединений. Однако стадия дериватизации не способствует повышению экспрессности анализа и снижению временных затрат на разработку новых методик скрининга. Вместе с тем, с каждым годом растет число термолабильных и труднодериватизируемых соединений, требующих разработку новых способов дериватизации и новых процедур скрининга.

Для решения этой проблемы был предложен подход к скринингу ФАВ, основанный применении метода высокоэффективной жидкостной на хроматографии/тандемной масс-спектрометрии с тремя квадруполями (ВЭЖХ-МС/МС). В отличие от ГХ/МС скрининг с применением метода ВЭЖХ-МС/МС исключает дериватизации, определяемые стадию то есть вещества не подвергаются химической модификации с получением соответствующих летучих производных. Однако, несмотря на достоинства метода ВЭЖХ-МС/МС (высокая чувствительность и селективность), его применение всегда связано с детальным изучением МС/МС спектров, выбором селективных переходов и трудоемкими

стадиями оптимизации условий диссоциации, индуцированной соударениями. Кроме того, чрезмерное увеличение числа детектируемых соединений неизбежно приводит к уменьшению длительности регистрации селективных переходов, приводящей к снижению чувствительности. Таким образом, существующая методология обнаружения ФАВ, реализуемая методами ГХ/МС, ГХ/МС/МС, ГХ/МСВР и ВЭЖХ-МС/МС, не отвечает в полной мере современным требованиям многокомпонентного скрининга методами хромато-массспектрометрии.

Поэтому, актуальным является поиск альтернативного хромато-массспектрометрического метода скрининга ФАВ, позволяющего преодолеть ограничения, связанные с применением методов ГХ/МС, ГХ/МС/МС, ГХ/МСВР и ВЭЖХ-МС/МС. Альтернативная методология многокомпонентного анализа медико-биологических объектов на основе хромато-масс-спектрометрического скрининга должна удовлетворять следующим требованиям:

1. Разработка и выполнения методик обнаружения биорегуляторов в сложных по составу смесях не должны быть связаны с большими временными затратами, а сами методики определения должны исключать стадию дериватизации;

2. Селективность и пределы обнаружения ФАВ, достигаемые в рамках новой и «традиционной» методологий скрининга должны быть сопоставимы;

 Методология должна быть универсальной и охватывать широкий круг ФАВ;

4. Предлагаемая методология не должна ассоциироваться с трудоемким изучением масс-спектров и выбором селективных переходов;

5. Расширение круга определяемых ФАВ в рамках этой методологии не должно приводить к существенным временным затратам, связанным с их обнаружением;

6. Быстрая интерпретация результатов скрининга должна быть неотъемлемой особенностью данной методологии;

9

7. Выбор подтверждающего метода анализа не должен быть случайным, а его выполнение экспрессным.

Учитывая вышеперечисленные требования к альтернативной методологии скрининга и ограничения ГХ/МС, ГХ/МС/МС, ГХ/МСВР и ВЭЖХ-МС/МС, заслуживает внимание метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), применяемой в режиме полного Выбор данного метода обусловлен тем, что открывается сканирования. возможность ускорения процесса разработки методик анализа и их выполнение благодаря точному измерению m/z и, следовательно, установлению элементного состава диагностического иона, принадлежащего ФАВ или его метаболиту. В данном случае нет необходимости в выборе селективных переходов для достижения специфичности обнаружения ФАВ. В настоящее время в массспектрометрии есть три подхода к достижению высокого разрешения. С точки зрения разрешающей способности масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса является абсолютным рекордсменом на протяжении многих лет. Если говорить о скорости сканирования, то здесь безусловным лидером является времяпролетная масс-спектрометрия с ортогональным вводом. С другой стороны, масс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой (МСВР/ОЛ), предложенная Макаровым в 2002-м году, гармонично сочетает в себе достоинства этих двух методов. Вместе с тем, быстрый анализ биологических объектов сложного состава методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ не является тривиальной задачей. Основным препятствием к быстрому скринингу ФАВ в сложных по составу смесях данным методом является свойственный ОЛ матричный эффект. Все вышесказанное определило цель и задачи настоящей работы.

**Цель работы**. Развитие принципиально новых решений в жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения для быстрого обнаружения физиологически активных веществ в сложных по составу смесях. Разработка на этой основе новой методологии хромато-масс-спектрометрического скрининга физиологически активных веществ в биологических жидкостях.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка новой методологии хромато-масс-спектрометрического обнаружения широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях на основе ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с использованием ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР;

2. Определение роли матричного эффекта в быстром обнаружении ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в условиях полного сканирования;

3. Расширение возможностей ВЭЖХ-МСВР/ОЛ для быстрого обнаружения ФАВ в сложных по составу смесях путем снижения матричных эффектов за счет селективного протонирования с использованием ФХИАД и ХИАД;

4. Создание метода снижения матричных эффектов, обеспечивающего быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования путем подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием химической ионизации, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР);

5. Разработка и апробация способа скрининга ФАВ медико-биологических образцах методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИАД и ФХИАД на основе точного измерения m/z в режиме полного сканирования;

6. Разработка и апробация способа скрининга широкого спектра ФАВ в медико-биологических объектах методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР на основе точного измерения m/z в режиме полного сканирования;

7. Обоснование выбора пути достижения комплементарности предлагаемой методологии скрининга с референсными методами анализа.

### Научная новизна

К началу данной работы метод ВЭЖХ-МСВР/ОЛ как метод скрининга ФАВ в литературе не рассматривался.

1. Разработана новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга ФАВ на основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР, обеспечивающего быстрое обнаружение широкого спектра широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях с использованием точно измеренного m/z путем снижения матричных эффектов за счет селективного протонирования и

подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Обоснованы пути разработанной достижения комплементарности методологии скрининга С референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции твердофазной дериватизации и экстракции использования на магнитных частицах;

2. Определена причина и роль матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке, препятствующего обнаружению ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР (ОЛ) в режиме полного сканирования.

3. Установлено, что быстрое обнаружение ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования достигается снижением матричного эффекта путем селективного протонирования молекул ФАВ с использованием ФХИАД и ХИАД;

4. Установлено, что быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования достигается снижением матричного эффекта путем подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием ХИИЭР;

5. Создан способ обнаружения стероидов и N-алкил-β-гидроксиарилоксипропиламинов в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования с использованием ХИАД, основанный на селективной ионизации определяемых соединений;

6. Разработан способ обнаружения стероидов в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.1 – 2 нг/мл методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования с использованием ФХИАД, основанный на селективном протонировании молекул определяемых соединений;

7. Разработан способ быстрого обнаружения стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл методом УЭЖХ-МС/ОЛ в сочетании с ХИИЭР в режиме полного сканирования, основанный на подавлении ионизации мешающих компонентов матрицы.

#### Практическая значимость

- Разработанная в диссертационной работе методология, нацеленная на обнаружение ФАВ в сложных по составу биологических объектах методом ВЭЖХ-МСВР в сочетании с ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР за счет снижения влияния матричных эффектов, применима для экспрессного определения широкого спектра биоорганических соединений без стадии дериватизации при проведении метаболомных и медико-биологических исследований, эколого-аналитического скрининга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз.

- Универсальность методологии, достигнутая точным измерением m/z в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР с использованием ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР в режиме полного сканирования, обеспечивает ретроспективность поиска широкого спектра метаболитов ФАВ в метаболомных исследованиях и решает проблему консервации биологического материала в метаболомных исследованиях. Значительно снижаются временные затраты на расширение спектра определяемых метаболитов ФАВ.

- Разработанные способы обнаружения стероидов, бензотиодиазинов, Nалкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (βгидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида на уровне 0.05 – 250 нг/мл методом ВЭЖХ-МСВР в сочетании с ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР успешно прошли апробацию в ходе проведения профессионального тестирования, организованного Всемирным антидопинговым агентством в 2009-2012 гг. и получили высокую оценку медицинской комиссии Международного Олимпийского Комитета.

### Положения, выносимые на защиту:

≻Новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга ФАВ на основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР, обеспечивающая быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях с использованием точно измеренного m/z протонированных и фрагментных ионов путем снижения влияния матричных эффектов за счет селективного протонирования определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы;

- >Обоснование причины и роли матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке, препятствующего обнаружению ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР (ОЛ) в режиме полного сканированияс использованием точно измеренного m/z.
- ≻Методы снижения матричного эффекта (до 5 %), обеспечивающие быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ на основе селективного протонирования ФАВ и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР.
- >Способ скрининга скрининга стероидов и N-алкил-β-гидроксиарилоксипропиламинов в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл, основанный на применении метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИАД, обеспечивающей снижение матричных эффектов за счет селективной ионизации определяемых соединений
- >Способ скрининга стероидов в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.5 – 2 нг/мл, основанный на применении метода ВТЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ФХИАД, обеспечивающей снижение матричных эффектов за счет селективного протонирования молекул определяемых соединений
- >Способ скрининга стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидроксиарилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (βгидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида (120 соединений) в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл, основанный на применении метода УЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР,

обеспечивающей снижение матричных эффектов за счет подавления ионизации мешающих компонентов матрицы.

Подходы достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции дериватизации и способа снижения подавления ионизации компонентами матрицы для ВЭЖХ-МС/МС на основе твердофазной экстракции с магнитными частицами.

### Апробация работы

Результаты исследований были представлены на следующих научных конференциях: II Всероссийская конференция с международным участием «Массприкладные проблемы» (Москва, Россия. спектрометрия И ee 2007). Всероссийский симпозиум «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия» (Москва, Россия, 2008), III Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2009), III Всероссийская конференция «Аналитика России» с международным участием (Краснодар, Россия, 2009), 27<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis (Кьёльн, Германия, 2009), Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии, хроматография и нанотехнологии» (Самара, Россия, 2009), Съезд аналитиков России (Клязьма, Россия, 2010), Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2010), 28<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis (Кьёльн, Германия, 2010), 27th LC/MS Montreux Symposium (Монтрё, Швейцария, 2010), 34th International Symposium on Capillary Chromatography and 7th GC×GC Symposium (Рива дел Гарда, Италия, 2010), IV Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2011), IX Международная масс-спектрометрическая конференция по нефтехимии, экологии «ПЕТРОМАСС-2011» пищевой (Москва, Россия, 2011), XIX И химии Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Волгоград, Россия, 2011), 29<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis (Кьёльн, Германия, 2011), 30<sup>th</sup> Cologne Workshop on Dope Analysis (Кьёльн, Германия, 2012), VI Всероссийская

конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2015), Ι Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, Россия, конференция «Создание единой системы межведомственного 2015), ІІ-я взаимодействия экспертных лабораторий правоохранительных органов, химикотоксикологических лабораторий и лабораторий бюро судебно-медицинской экспертизы в сфере выявления новых наркотических средств» (Москва, Россия, 2017), VII Всероссийская конференция с международным участием «Массспектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2017), Съезд аналитиков России (Москва, Россия, 2017).

### Вклад автора

Вклад автора в работы состоит в постановке задач, непосредственном выполнении экспериментов, обсуждении, обобщении и оформлении полученных результатов исследований и их интерпретации.

### Публикации результатов исследований

По материалам диссертации опубликованы 21 статья в журналах, в том числе 12 статей в журналах, индексируемых в Международных базах данных, 9 статей в журналах, рекомендуемыми ВАК, а также получено 3 патента. Результаты работы представлены в более чем 20 тезисах докладов на отечественных и международных конференциях.

### Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, пяти глав с обсуждением полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 267 страницах, содержит 45 рисунков и 23 таблицы.

## ГЛАВА 1 ПРОБЛЕМА МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ (НА ПРИМЕРЕ ЗАДАЧ СПОРТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ). ОРБИТАЛЬНАЯ ИОННАЯ ЛОВУШКА.

# 1.1 Методология обнаружения физиологически активных веществ на примере биоаналитических лабораторий спортивной медицины

В биоаналитической химии моча и кровь (сыворотка и плазма) являются основными объектами исследования [1]. В редких случаях биоаналитики использовали в качестве объектов исследования слюну и волосы. Наиболее популярным объектом анализа в биоаналитической практике сегодня является моча. Это можно объяснить прежде всего простотой отбора проб. Во-первых, процедура отбора является неинвазивной. Во-вторых, объемом отбираемой пробы, который не ограничивается несколько миллилитрами в отличие от образцов крови. Дополнительным преимуществом мочи является содержание в ней метаболитов и самих ФАВ, которое в большинстве случаев выше, чем в других вышеуказанных объектах.

Сегодня очевидно, что быстрая установка факта присутствие того или иного ФАВ в моче предполагает осуществление скринингового анализа. Принципиальная схема анализа с ипользованием скрининга приведена на рис. 1.



Рисунок 1 Схема анализа в биоаналитических лабораториях [4,2].

Из приведенной схемы видно, что биологический образец делят на 2 части. хранят Вначале исследуют первую часть, а вторую при сверхнизких температурах. Исследование первой части проводят в 2 этапа. На первом этапе проводят скрининг. К подтверждающему анализу приступают только после обнаружения искомого ФАВ в первой части образца. Повторное обнаружение ФАВ в ходе подтвеждающего анализа является основанием для анализа второй части образца. Обе части образца хранятся не более 8 лет. Эффективный скрининговый характеризуется анализ минимальным количеством ложноотрицательных и ложноположительных результатов. Если этого не происходит, скрининговый анализ утрачивает свою целесообразность, так как с геометрической прогрессией увеличивается стоимость исследований И существенно уменьшается ИХ экспрессность, поскольку значительно материальные увеличиваются временные И затраты на выполнение подтверждающего анализа. Нужно отметить, что в обоих видах анализа допускается применение одинаковых методов.

Подобный подход обусловлен тем, что перед аналитическим центрами стоит задача обнаружения несколько сот ФАВ и их метаболитов за считанные часы, располагая ограниченным объемом (до 50 мл) биологического образца. При выполнении особо срочных метаболомных исследований, отчеты об их результатах представляются в течение дня. С другой стороны, интенсивное расширение круга определяемых соединений заставляет лабораторию непрерывно улучшать существующие и внедрять новые способы анализа для скрининга [3]. Не вызывает сомнений, что с увеличением числа методик скрининга будут расти временные И материальные затраты на проведение биоаналитических исследований [4]. Поэтому необходима методология, нацеленая на сокращение числа применяемых скрининговых методик, позволила бы значительно снизить затраты, ассоциированные с обнаружением широкого спектра ФАВ [5]».

### 1.2 Систематизация физиологически активных веществ

«Для регулирования процесса обнаружения ФАВ биоаналитическими лабораториями ВАДА подготовила документ о запрещенных ФАВ [6]. Классы ФАВ, запрещенные ВАДА, приведены в таблице 3.

По классификации ВАДА	Описание классификации	Условия запрета в спорте
SO	Препараты, не допущенные к применению в медицинской практике	Beuµecm ne
S1.1.a	Экзогенные анаболические андрогенные стероиды	16a, запр риод и 6
S1.1.b	Эндогенные анаболические андрогенные стероиды	ещенны г соревно
S1.2	Другие анаболические препараты	е в н рват
S2	Пептидные гормоны, факторы роста, подобные субстанции и миметики	е соревн ельный
S3	Бета-2 Агонисты	пери
S4	Гормоны и модуляторы метаболизма	пель
S5	Диуретики и маскирующие агенты	ный
\$6	Стимуляторы	
S7	Наркотики	Вещества, запрещенные в
S8	Каннабиноиды	соревновательный период
S9	Глюкокортикоиды	
P1	Алкоголь	Вещества, запрещенные в
P2	Бета-блокаторы	отдельных видах спорта

### Таблица 3 Классы ФАВ, запрещенные ВАДА, [4]

В инструкциях Агенства [4,7] не указаны конкретные ФАВ, а приведены 10 фармакологических классов ФАВ. Классы ФАВ, входящих в документ ВАДА состоит из 2 групп. Включение в первую группу определяется структурой ФАВ и его фармакологическими свойствами. Отличительной чертой второй группы является строгий перечень ФАВ, входящих в нее. Ежегодно перечень обновляется. Вхождение ФАВ в перечень ВАДА определяется ниуказанными критериями [7]: - Сам ФАВ или в присутствии другого вещества обладает возможностью поднять физиологический потенциал спортсмена;

- Прием ФАВ может угрожать самочувствию атлета;

- Употребление ФАВ нарушает права участников соревнований на победу.

Многие ФАВ из таблицы 3 активно применяются в здрвоохранении. Пороговые содержания в биологической жидкости атлетов фиксированы для морфина, салбутамола, метилэфедрина, эпитестостерона, катина, 11-нор-9карбокси- $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола, 19-норандростерона, псевдоэфедрина и эфедрина. Превышение пороговых содержаний этих ФАВ или продукты их биотрансформации В биологической жидкости атлета воспринимается антидопинговым агентством, как употребление неразрешенного ФАВ. К примеру, если содержание салбутамола в биологической жидкости выше, чем 1 мкг мл<sup>-1</sup>, это расценивается как отступление от правил антидопингового агентства. С другой стороны, такие ФАВ, как этанол и β-блокаторы не разрешается употреблять только в отдельных состязаниях. При этом анализируемые биообразцы атлета не должны содержать остальные ФАВ из перечня антидопингового агентства. «Особая» группа ФАВ, в которую могут попасть вещества с общим фармакологическим действием, определяет специфику лабораторий. исследований биоаналитических Учитывая многообразие химических свойств биорегуляторов, существование «особой» группы будет способствовать неотвратимому росту числа определяемых соединений и как следствие, методик их обнаружения. Имея данные о фармакологических ΦAB, биоаналитики действиях превентивно исследуют метаболизм потенциальных кандидатов в перечень запрещенных веществ до того, как начать разработку новых методик обнаружения. Хотя на первый взгляд вышеуказанный подход может показаться продуктивным, так как у биоаналитика остается время на открытие «долгоживущих» метаболитов и создание чувствительных методик обнаружения, он не решает в общем виде проблему непрерывного роста определяемых соединений [8-15].

### 1.3 Подходы обнаружения физиологически активных веществ с применением хроматографических и хромато-масс-спектрометрических методов

### 1.3.1 Амфетамины(стимуляторы) и наркотики

С амфетаминов началась эра неправомерного употребления ФАВ во время состязаний [16] и борьба с их применением в спорте. Являясь фенилалкиламинами, они отличаются друг от друга положением заместителей. У одних они находятся в фенильном кольце, а у других аминной группе или у  $\beta$  углеродных атомов боковой цепи. В целом их структуры подобные эндогенным катехоламинам [4, 17].

Масштабно их стали применять в начале второй мировой войны. В это время большое число фашистских солдат стало употреблять амфетамины [18] для повышения выносливости. Учитывая их эффективность, становится понятным рост интереса к этим ФАВ спортивной элитой [19]. Сегодня эргогенный эффект амфетаминов и родственных к ним соединений не вызывает сомнений. Для минимизации нежелательных эффектов от приема амфетаминов в сочетании с ними атлеты употребляют барбитураты и наркотики. В результае получаются необычные «коктейли», которые нарушители правил часто разбавляют кофеином. Кроме того, барбитуратов показывают высокую эффективность в качестве средства от бессонницы. В контактных видах соревнований некоторые атлеты употребляют Декстроморамид, Фетилин И Морфин [20] В качестве обезболивающего средства. Таким образом, до создания антидопингового движения эти вещества вошли в «черный список» международного олимпийского комитета [21]. Их «популярность» начала угасать только после того, как появились надежные способы их детектирования в физиологических жидкостях. Тем не менее, согласно статистикие ВАДА в настоящее время вещества с эргогенным эффектом и наркотики можно обнаружить в 25 процентах образцов атлетов, принимающих неразрешенные в соревнованиях препараты [22, 23]. В эти

25 процентов также входят вещества (симпатомиметики), приводящие к возбуждению нервной симпатической системы, содержащие аминогруппы. Однако, до настоящего времени, если упоминать контактные единоборства, мало известно о влиянии психоактивных веществ на результаты состязаний [24]. Поэтому, с этой точки зрения существует высокая вероятность пополнение Списка новыми синтетическими каннабиноидами с возникновением новых данных об их влиянии на исход состязаний. Вместе с тем, автор неоднократно наблюдал, как пересматривались решения о добавлении того или иного психоактивного вещества в данную категорию веществ. К примеру, до сих пор не утихают споры о признании кофеина и эфедрина, продаваемых в аптеке без рецепта. Тоже самое можно сказать об известном симпатомиметике фенилпропаноламине. При этом подавляющее большинство специалистов считает запрет приема амфетаминов на состязаниях оправданным. Здесь объяснение очень простое [25]. Дело в том, что высоких дозах эфедрин и кофеин оказывают сильное действие на центрально-нервную систему. В тоже время, лекарственные препараты, используемые для лечения заболеваний нижних дыхательных путей, могут содержать незначительные концентрации соединений. этих Антигистаминные препараты могли бы решить проблему лечения заболеваний нижних дыхательных путей у атлетов, но их применение также не рекомендуют седативного влияния на нервную систему. Такую спортивные врачи из-за лабильность Списка ужесточает требования к времени, отведенному на разработку методик обнаружения биоаналитическими лабораториями [26].

Чаще всего, вышеописанные вещества при больших дозах экскретируется в неизменном виде, и только несущественная часть подвергается биопревращениям. Химическое превращение в организме с участием этих веществ протекает с образованием их гидрокси-производных. В редких случаях происходит деаминирование и N-деалкилирование в ароматическом кольце и алкильной цепи. И только после этого наступает вторая стадия метаболизма с образованием конъюгата с глюкуроновой кислотой. В редких случаях образуются конъюгаты с образованием сульфатов. По рН мочи можно прогнозировать уровень нативных

23

фенилалкиламинов. Прогноз заключается в том, что для амфетамина и метамфетамина высокая скорость экскреции в кислой моче сопровождается повышенным сочдержанием нативного вещества в биологической жидкости [19].

Поскольку фенилалкиламины способствуют повышению результатов на состязаниях при очень больших дозах, нарушители правил честного соревнования их применяют только перед началом состязаний. Благодоря этому в настоящее подавляющее число аналитиков определяет их нативном виде. Высокие концентрации нативных веществ позволяют значительно упростить подготовку образцов к анализу и ограничиться стадией экстракции из мочи. Поскольку в данном случае мы имеем дело с соединениями, обладающими близкими химическими свойствами, «стандартизация» стадии подготовки биообразцов к анализу не сопровождается существенными трудозатратами. Здесь мы имеем дело с летучими азотсодержащими органическими соединениями с  $pK_a$  7–10. Для их извлечения, как правило, применяют жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) при pH 14. В качестве экстрагента используют диэтиловый эфир [27]. В свою очередь добавление безводного сульфата позволяет значительно повысить степень их извлечения из мочи [28].

В исключительных случаях прибегают к «кислотному гидролизу», когда речь идет о фенилалкиламинах. Его используют, когда есть необходимость в определении коньюгированных форм фенилалкиламинов, присутствующих в биологической жидкости [29]. К сожалению, мы не можем сказать тоже самое о наркотиках. Для них фармакологическое действие проявляется при низких концентрациях. Поэтому в первых работах, посвященных определению этих веществ их подвергали гидролизу кислотой [30–32]. Однако после того, как было установлено, что такой гидролиз может сопровождаться побочными реакциями при обнаружении морфина и его метаболитов [33, 34]. Это привело к тому, что в настоящее время отказались от данного способа и перешли к альтернативному способу гидролиза с использованием *Helix Pomatia*, когда необходимо обнаружить морфин. Для известного фермента *Helix Pomatia* свойственна βглюкуронидазная активность, которую применить при гидролизе коньюгатов

24

вышеописанных соединений. Немногочисленные исследователи также указывают на его арилсульфатазную активность [35].

В пионерских работах обнаружению фенилалкиламинов ПО хроматографическими методами использовали газовую хроматографию С азотоно-фосфорным детектором. Использование азотно-фосфорного детектора в сочетании с ЖЖЭ в щелочной среде приводило к пониженному уровню химического шума биологического происхождения [34]. На Олимпийских Играх в 2002 г. началась новая эра в обнаружении фенилалкиламинов в биологических жидкостях. Сотрудники испанской лаборатории тогда предложили вместо азотнофосфорного детектора сочетать газовую хроматографию с масс-спектрометрией в условиях электронной ионизации [36]. В своей исследователи испанской лаборатории отмечают, что в условиях электронной ионизации в масс-спектрах фенилалкиламинов отсутствуют интенсивные пики молекулярных ионов. Для характеристичности масс-спектров испанские биоаналитики повышения разработали методику обнаружения, включающую стадию дериватизации. Для фенилалкиламинов дериватизации они предложили использовать последовательно N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамид (МСТФА) и Nметил-бистрифторацетамид (МБТФА). Выбор МБТФА был обусловлен наличием как первичной, так и вторичной функциональной аминогруппы в структуре фенилалкиламинов. Иначе говоря, МБТФА они использовали в качестве Nацилирующего реагента. Важной особенностью этой реагента является отсутствие образование воды в ходе реакции с его участием. Кроме того, использование этого реагента не приводит к образованию кислоты. Другим важным достоинством этого электронно-акцепторными реагента является образование производных с свойствами, обеспечивающими снижения предела обнаружения за счет использования химической ионизации с электронным захватом. Эти соединения обладают низкой лабильностью, не только НО показывают отличные хроматографические свойства. Разработанная данным коллективом исследователей обнаружить методика анализа позволяет не фенилалкиламины только В биологической жидкости. Вышеописанную методику можно также использовать для

обнаружения наркотиков и их метаболитов. Кроме того, используя эту методику можно также определять пентазоцин, петидин, метадон, которые относятся к адренергетикам. Дополнительным свидетельством успешности данной методики является возможность определять с ее помощью бензодиазепины, трициклические антидепрессанты и антигистамины и вещества для обезболивания. Закономерным представляется применение этой методики до 2009 года [35]. С появлением способа обнаружения фенилалкиламинов и наркотиков методом ВЭЖХ-МС/МС стал снижаться интерес к этой уникальной методики.

Другой важной проблемой обнаружения некоторых фенилалкиламинов является их хиральность. К примеру, S-(+)-первитин является психоактивным В ТО время как R-(-)-первитин абсолютно не действует веществом, на симпатическую нервную систему. Если говорить о газовой хроматографии, то для разделения оптических изомеров используют два разных подхода. Первый подход [37, 38] заключается в применении оптически чистого реагента для трансформации определяемых соединений в диастереомеры и разделении полученной смеси с применением «ахиральной колонки». 2) Второй подход [39, 40] заключается в прямом хроматографическом разделении с применением хиральной колонки. Для второго подхода использовали такие реагенты как S-(-)гептафторбутирилпропилхлорид [43, 44], α-метокси-α-(трифторметил)фенилацетил хлорид [42] и S-(-)-трифторацетилпропилхлорид [41].

К сожалению, широкораспространенный в биоаналитической хроматографии полидиметилсилоксан не позволяет разделить такие стереоизомеры как псевдоэфедрин и эфедрин, а также катин и фенилпропаноламин. Дериватизация с образованием N-триметилсилильных производных также не решает проблему разделения. Успешным решением этой проблемы стала дериватизация с N-трифторацетил-О-триметилсилильных образованием производных вышеупомянутых соединений [36].

Несмотря на то, что наркотики нашли большое распространение во многих контактных единоборствах, они имеют ограниченное применение в других видах состязаний. На этих состязаниях их используют в качестве обезболивающего средства. Если говорить о других видах состязаний, то они не оказывают влияние на результаты соревнований. Однако с каждым годом растет интерес к контактным видам состязаний. Многие из них могут стать олимпийскими видами спорта. В таком контексте, расширится надзор над обезболивающими средствами со стороны спортивных федераций и ситуация можно предсказуемо измениться. Поэтому нужно быть готовыми, что Список может пополнится новыми наркотическими веществами. И тогда возникнет острая потребность в эффективном способе обнаружения широкого спектра ФАВ. Поэтому обращает на себя внимание работа немецких исследователей, которая предложила применить ВЭЖХ-МС/МС для определения наркотического средств [45].

### 1.3.2 Бета-адреноблокаторы и Бета-адреномиметики

Бета-адреноблокаторы относятся вещества, оказывающие ингибирующее действие адренорецепторы. Для бета-адреноблокаторов на всех гидроксиарилоксипропиламин выступает общим структурным компонентом. Атом кислорода, связывающий ароматические кольца с разными замещающими группами, является «визитной картой» этих ФАВ. Изопропильные замещающие группы относятся к самым распространенным в бета-адреноблокаторах [4]. Бетаадреноблокаторы принимаются при лечении повышенного интраокулярного давления, нарушении сердечного ритма, высоком артериальном давлении и ишемической болезни сердца [46]. Но недобросовестные атлеты их также успокоительных принимают В качестве средств ДЛЯ преодоления предсоревновательного стресса или в качестве средств, корректирующих сердечный ритм. Кроме того, они позволяют избавиться от необоснованного страха. Бетаадреноблокаторы представляют особый интерес в тех видах состязаний, в которых требуется неизменность вертикальной позы (прыжки в воду, метание дротиков, и.т.д.). В других видах созтязаний эти ФАВ не привлекают себе особого внимания, так как оказывают негативное влияние на противостояние утомлению атлетами. Блокирование бета-адренорецептора приводит к уменьшению дрожания

конечностей у спортсменов, вызванного предсоревновательным стрессом. Увидеть результаты их приема на итоги состязаний можно, как правило, у подготовленных атлетов, чем у непрофессиональных спортсменов. Для людей с ΦAB нормальным артериальным давлением ЭТИ являются сравнительно безвредными при их единовременном применении. С другой стороны, они представляют значительную угрозу здоровью людей, страдающих астмой. Дело в том, что в некоторых случаях эти ФАВ могут вызвать бронхоспазма у данных пациентов [47-49]. Они также не рекомендуются людям, страдающим сердечной недостаточностью.

Чтобы убедится в эффекте, оказываемым бета-адреноблокаторами, принимаемых внутрь, нужны сравнительно большие дозы препаратов. Вследствие этого содержание бета-адреноблокаторов в мочи при их приеме сравнительно высокое (сотни нг мл<sup>-1</sup>). Другой важной особенностью этих ФАВ является их преимущественная экскреция в нативном виде. В редких случаях они подвергаются биотрансформации. Сегодня известно два основных пути их биотрансформации [47]. Первый путь заключается в присоединении метильной группы с участием фермента катехол-*О*-метилтрансфераза. В данном случае донором метильной группы выступает S-аденозилметионин. Второй путь биопревращения сопровождается образованием конъюгированного соединения с сульфатом.

По своей структуре бета-адреномиметики похожи на производные пирокатехина. Другими словами, это гидроксифенилэтиламины, имеющие разные замещающие группы в фенильном кольце. Как правило, это трет-бутильные функциональные группы. В качестве примера можно назвать формотерол, бамбутерол и кленбутерол, как препараты, содержащие эти соединения. Вышеописанные препараты применяют обычно применяются в медицине для лечения заболеваний нижних дыхательных путей. Эти препараты также применяют для увеличения силы сокращения сердечной мышцы. В редких случаях в качестве средства уменьшения скорости наслоения жира. Если принимать большие дозы этих препаратов, то они будут действовать как андрогенные стероиды и психоактивные вещества. Бета-адреномиметики принимаются через рот или вдыханием [47]. Важной особенностью этих веществ является их экскреция в нативном виде. Как ни парадоксально, бетаадреномиметики также активны при незначительной дозировке. В виде растворов для вдыхания их нередко употребляют недобросовестные атлеты. И как следствие были введены умеренно строгие требования к пределам их обнаружения (0.02 мкг мл<sup>-1</sup>).

Этап гидролиза конъюгированных соединений является неотъемлемой частью стадии подготовки образцов к скринингу этих ФАВ. Вместе с тем, согласно литературным данным [51, 30], не рекомендуется проводить «кислый гидролиз», поскольку в этом случае может произойти разложение пиндолола, атенолола и тимолола. Для решения этой проблемы используют Helix Pomatia, фермента имеющего β-глюкуронидазную и арилсульфатазную активность, для гидролиза бета-адреномиметиков. Использование этого фермента позволяет проводить гидролиз в сравнительно нежестких условиях. При использовании данного фермента не происходит разложение бета-адреноблокаторов [52, 53]. Продолжительность гидролиза (pH 5.2) не превышает 2 ч при 50°С. Традиционно экстрагируют бета-адреномиметики и бета-адреноблокаторы из мочи методом [30, 52]. жидкостно-жидкостной экстракции В качестве экстрагентов исследователи использовали диэтиловый эфир (рН 9). Для ускорения этапа пробоподготовки и снижения расхода используемых растворителей в последнее время стали активнее применять твердофазную экстракцию (ТФЭ). В качестве сорбента для экстракции бета-адреноблокаторов и бета-адреномиметиков из мочи итальянские исследователи предложили использовать сорбенты с неподвижной фазой С<sub>18</sub> [54]. Соланс расширил возможности данного способа экстракции и предложил его использовать экстракции психоактивных для веществ И фенилалкиламинов. Отличительной чертой данного способа экстракции является гидрофобный характер взаимодействие с сорбентом [36]. Хотя преимущества ТФЭ неоспоримы, до сих пор исследователи предпочитают унифицированный способ экстракции [53] для стероидов и бета-адреномиметиков на основе

жидкостно-жидкостной экстракции с использованием в качестве растворителя диэтилового эфира.

Уже многие годы газовая хромато-масс-спектрометрия с электронным ударом не прекращает оставаться «золотым стандартом» обнаружения бетаадреноблокаторов и бета-адреномиметиков в моче. Наличие -NH<sub>2</sub> и -OH функциональных групп В структуре заставляет использовать сталию дериватизации для достижения удовлетворительного разделения на этапе подготовки образцов к анализу. В данном случае без дериватизации трудно добиться удовлетворительного разделения определяемых соединений методом ГХ/МС. Сама дериватизация здесь осуществляется в две стадии. На первой стадии ее проводят с МСТФА, а на второй с МБТФА [52]. В результате продуктами дериватизации становятся О-триметилсилил-N-трифторацетильные производные определяемы соединений. Применение аммиака в качестве газареагента в условиях химической ионизации с регистрацией положительных ионов позволяет существенно понизить предел обнаружения [55, 56].

Следующий шаг в развитии подходов обнаружения бета-адреноблокаторов и бета-адреномиметиков [57] определила коммерческая доступность тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии и эффективных способов ионизации в условиях атмосферного давления.

### 1.3.3 Мочегонные препараты (диуретики)

Мочегонные препараты является наиболее разнородной группой по составу. К ним относятся производные бензамида, производные бензанилида, бензотиадиазины, вещества с основными свойствами, производные бензойной кислоты и вещества, изменяющие осмотическое давление крови. Подобная разнородность группы значительно осложняет создание надежного подхода к обнаружению этих веществ в биологических объектах [58]. Эти препараты рекомендуют к применению при гипертензии. Эти вещества способствуют увеличению скорости образования мочи, оказывая действие на почечные канальцы [59]. Мочегонные препараты получили особое распространение в видах состязаний, где вес имеет значение. Можно, к примеру, добиться снижения веса (от 2 до 5 %), употребляя фуроцемид. Для уменьшения содержания в моче других «маскируемых» препаратов также используют мочегонные препараты [60]. Мочевыделение может в некоторых случаях превышать 200 мл ч<sup>-1</sup> в зависимости от дозировки и принимаемого препарата. С их применением в особых случаях достигается снижения содержания фенилалкиламинов в биологической жидкости в 3-5 раз за 3.5 ч. Это, безусловно, затрудняет обнаружение фенилалкиламинов в биологической жидкости «классическими» методами. Чтобы скрыть следы употребления психотропных препаратов [58] недобросовестные атлеты ингибитор металлофермента одновременно принимают карбоангидразы. Результатом употребления этого препарата является снижение экскреции продуктов биотрансформации некоторых психотропных веществ в течение нескольких часов.

Прием стероидов также пытаются маскировать с помощью диуретиков. Для используют препараты, значительно усиливающие экскрецию мочевовой кислоты. В данном контексте наиболее эффективным является пробенецид. Пробенецид замедляет экскрецию ксенобиотиков в виде глюкуроновых коньюгатов и может затруднить детектирование андрогенных стероидов. Дело в том, что любые способы, направленные на обнаружение глюкуроновых коньюгатов ксенобиотиков, в этом случае утрачивают свою эффективность. Вместе с тем, методики обнаружения, нацеленные на «несвязанную» фракцию метаболитов, будут оставаться валидными [61].

Различие свойств мочегонных веществ осложняет разработку общего способа обнаружения их приема. К счастью, эти вещества экскретируются в основном в нативном виде. В связи с этим способы обнаружения мочегонных веществ нацелены, как правило, на определение в моче исходных веществ. Несмотря на то, что проблема установления факта приема диуретиков в моче никогда не утрачивала актуальнось [62], исследователями было разработано

31

сравнительно небольшое число подходов обнаружения этих веществ в моче[63, 64].

Несмотря на различие физико-химических свойств описываемых веществ, были предложены общие способы их извлечения из мочи. Предложенные способы опирались на два разных подхода. Реализация первого подхода заключается в параллельном извлечении определяемых соединений с различными значениями pH [65–67]. Несмотря на простоту и привлекательность данного подхода, его применение сопровождалось повышением предела обнаружения. Второй способ позволяет ограничиться одной стадией извлечения аналитов с использованием высаливателя. Удачной реализацией данного способа извлечения стало извлечение этоксиэтаном совместно с Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при pH 7 [68]. Этот способ позволяет экстрагировать почти все вещества, усиливающиие выделение мочи, кроме амилорида. Наиболее эффективным способом извлечения этих веществ методом ЖЖЭ [55] признано извлечение при высоких pH с использованием этилового эфира уксусной кислоты с добавлением NaCl.

Наряду с ЖЖЭ изучалась возможность их экстракции из мочи методом ТФЭ [70, 71] на основе неподвижных фаз C<sub>18</sub>. Для элюирования извлекаемых соединений исследователи использовали этоксиэтан и метиловый спирт [70]. Вместе с тем исследователи признают, что различие в полярности создает труднопреодолимые препятствия одновременного извлечения для всех представителей этой группы веществ методом ТФЭ [71]. Несмотря на ограничения ТФЭ при экстракции диуретиков, испанские исследователи предложили использовать этот метод в подтверждающих анализах [72]. В качестве примера они приводят удачное извлечение хлорталидона из мочи с XAD-2 (полистиролдивинилбензол). использованием Для элюирования экстрагируемых соединений они предложили использовать метиловый спирт [73, 74]. Универсальность наиболее эффективных способов извлечения этих веществ повышает требования к селективности разрабатываемых способов обнаружения. Поэтому на протяжении многих лет обнаружение диуретиков основано на применении хромато-масс-спектрометрических методов анализа.

Вместе с тем, наличие сульфамидных групп в структуре описываемых соединений препятствует образованию устойчивых производных при силилировании. Поэтому при дериватизации диуретиков часто прибегают к метилированию [58, 73]. Существует 3 способа метилирования диуретиков: пиролитическое, экстракционное и с использованием раствора CH<sub>3</sub>I в ацетоне. С точки зрения универсальности последний способ превосходит предыдущие. Вместе с тем, длительность реакции является существенным ограничением последнего способа. Наиболее удачной попыткой повысить скорость данного способа метилирования можно считать проведение реации в микроволновом поле.

С точки зрения экспрессности второй способ превосходит остальные способы метилирования. В этой связи его рекомендуют использовать в подтверждающих анализах. Реализация этого способа заключается в экстракции в виде ионной пары определяемые соединения органической кислотой с солью четвертичного аммония. В этом случае определяемые соединения переходят в растворитель, в котором будет присутствовать реагент для метилирования. Метилирование протекает непосредственно в органическом растворителе [75]. Существенным ограничением данного способа метилирования является необходимость удаления соли четвертичного аммония, которая усложняет анализ методом хромато-масс-спектрометрии [76].

Целенаправленная химическая модификация (дериватизация) обсуждаемых соединений в ходе подготовки образцов к анализу обусловлена применением ГХ/МС в качестве метода скрининга. В данном случае используют метод ГХ/МС в режиме селективного детектирования от двух до трех фрагментных ионов в условиях электронной ионизации [58]. Для улучшения предела обнаружения [90] исследователи также предлагали использовать химическую ионизацию с детектированием отрицательных ионов. Большие временные затраты, связанные с необходимостью этапа дериватизации для успешного определения диуретиков методом ΓX/MC до сих пор мотивируют исследователей к поиску обнаружения. альтернативных методов ИХ Поэтому привлекательность высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии

(ВЭЖХ/МС) как метода скрининга диуретиков стала быстро очевидной [78]. В пионерских работах, посвященных определению диуретиков с использованием ВЭЖХ/МС, исследователи сочетали метод с термораспылительной ионизацией [78]. Однако, низкая эффективность ионизации в условиях термораспыления существенно ограничивала возможности метода для скрининга в сложных по составу смесях. Рост интереса к методу возобновился только после того, как его стали сочетать с электрораспылительной ионизацией [79]. При сочетании с электрораспылительной ионизацией исследователи не ограничивались детектированием положительно заряженных ионов [65, 74, 80, 81]. Характерной особенностью масс-спектров описываемых веществ при детектировании отрицательно заряженных ионов является присутствие пика депротонированной данном случае специфичности детектирования молекулы. В достигается применением метода ВЭЖХ-МС/МС с использованием столкновительной диссоциацией.

#### 1.3.4 Глюкокортикоиды

Структура этих синтетических веществ напоминает структуру кортизола Характерной особенностью кортикостероидов является достигаемый ими заметный эффект при низких дозировках [82, 83]. Это приводит к тому, что В определение этих веществ в биологических объектах остается нетривиальной задачей. Учитывая их низкие концентрацции в моче, в первых способах их обнаружения использользовали иммуноферментные методы [84–86]. Однако, растущее число ложноположительных результатов с использованием данных методов способствовало поиску альтернативных подходов на основе хроматомасс-спектрометрии.

Несмотря на то, что вышеописанные вещества экскретируются в умеренных количествах с мочей в неизменном виде, очень часто исследователи прибегают к гидролизу их конъюгированных метаболитов с использованием фермента с сульфатазной активностью [87–89]. Был разработано большое число способов их

экстракции из биологических объектов. В подавляющем большинстве случаев использовали ЖЖЭ [90-93]. В качестве экстрагентов исследователи использовали хлористый метилен, этоксиэтан и этиловый эфир уксусной кислоты. Отмечены твердофазную экстракцию [89, 94–97] также попытки использовать С применением С<sub>18</sub> в качестве неподвжиной фазы. Во многих случаях проводили дополнительную очистку экстрактов. Для очистки экстрактов исследователи использовали такие экзотические способы, как иммуноаффиную хроматографию [98, 99]. Подобная очистка экстрактов позволили исследователям снизить предел обнаружения для флюметазона и дексаметазона до нескольких пикограммов в миллилитре [100].

Хотя кортикостероиды являются термически неустойчивыми соединениями, метод ГХ/МС в условиях химической ионизации или электронного удара активно применяется для их обнаружения [98, 99]. Учитывая термолабильность этих соединений, на этапе подготовки образцов к анализу прибегают к дериватизации (химической модификации). Существует два подхода химической модификации кортикостероидов. Первый подход [101–103] основан на триметилсилилировании. Второй двухступенчатой подход основан дериватизации c на метоксииминированием О= группы и триметилсилилировании OH- группы [104– 107. В первом подходе для дериватизации используют смесь, в которую входят триметилхлорсилан и N-триметилсилилимидазол [89]. Для ускорения реакции используют как правило пиридин. Исследователи также использовали ВЭЖХ в сочетании с спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области. В пионерских работах по обнаружению кортикостероидов методом ВЭЖХ-МС традиционно прибегали к ионизации термораспылением [103]. Однако ощутимых результатов с точки зрения предела обнаружения исследователи добились при сочетании метода с ХИАД [101] и ИЭР [108].

35

# 1.3.5 Гормоны и модуляторы метаболизма (вещества с антиэстрогенной активностью)

К этой группе веществ относятся вещества, проявляющие антиэстрогенную активность, ингибируя ароматазу и оказывая влияние на эстрогенные рецепторы. Наиболее известными представителями этой группы являются циклофенил и кломифен. У этих веществ очень широкий спектр действия: от тепапии бесплодия до лечения рака груди [109]. В некоторых случаях их используют для минимизации нежелательных эффектов, вызванных приемом синтетических стероидов [110].

Подготовка образцов и процедуры обнаружения метаболитов этих веществ практически не отличается от процедуры, используемой для обнаружения метаболитов бета-адреномимитиков [4]. Исключением является летрозол и аминоглютетимид [111, 112]. Для их обнаружения используют отдельную методику обнаружения на основе метода ГХ/МС. Метод ВЭЖХ/МС для их обнаружения некоторых представителей (экземестан, анастрозол) этой группы стали относительно недавно [113].

### 1.3.6 Экзогенные синтетические стероиды

Представители этой группы веществ являются структурными аналогами тестостерона, используемого в качестве исходного вещества для их синтеза. Существует 3 группы этих веществ. К первой группе относятся представители, полученные в результате реакции этерификации 17бета-ОН группы. Второй группе принадлежат представители, полученные в результате реакции алкилирования 17альфа положения. В последнюю группу входят представители, у которых были модифицированы кольца А, В или С [114]. Последняя группа является самой многочисленной.

Препараты на основе представителей первой группы вводят как правило внутримышечно, а представителей второй и третьей группы принимают
перорально. Вкратце представителей 3-й группы получают одним ИЗ способов: перечисленных введением двойной связи между C4 И C5. присоединением метилльной группы к С1, С2 или С7, оксиметильной группы к С2, пиразольной или другой циклической структуры к кольцу через С2 и С3, присоединение Cl или OH- группы к C4 и присоединение метильной группы к C-7. Например, тестостерон отличается от нандролона наличием метильной группы в положении С10 [4,115].

Физиологическая функция этих веществ заключается в ускорении усвоения белка, а также вирилизации подростков в ходе их полового развития. Поэтому употребляют прилагательные «анаболические» и «андрогенные», когда хотят подчеркнуть интересующую функцию стероидов [116]. Сегодня эти вещества используют главным образом в терапевтических целях. Круг решаемых проблем с их применением невероятно широкий. Он охватывает задержку роста и сексуального развития у подростков, функциональные нарушения костного мозга, обусловленная ангиоэдема, гипогонадизм, метаболические генетически дисфункции, нарушение остеогенеза и расстройство гемопоэза. Были также опубликованы работы, где синтетические стероиды применяли при раке молочной железы. Кроме того, некоторые исследователи указывают на сдерживание развития гиперлипедемии при их применении [117].

Их начали применять в спорте в середине 50-х годов, хотя массовое применение началось в конце девяностых [118]. В молодежном спорте они получили распространение в конце 70-х [119]. Сейчас трудно переоценить масштабы их распространения в молодежном спорте, судя по «популяроности» в социальных сетях. Синтетические стероиды используют для повышения выносливости, силы и скорости. Их также используют для увеличения мускулатуры несмотря на то, что механизм не до конца изучен. В спорте атлеты их применяют только для улучшения результатов соревнований [118, 120]. Наиболее известным представителем этой группы веществ является деканоат нандролона, которого с середины прошлого до начала века пользовался особой популярностью у атлетов [121]. Однако с развитием хромато-массспектрометрических методов его стали реже употреблять в спорте высоких достижений. Кроме того, длительный период полувыведения (более 3 недель) способствует его обнаружению.

Круг синтетических стероидов, применяемых в спорте, не ограничивается препаратами, используемыми в терапевтических целях [3]. Здесь можно также найти такие ветеринарные препараты, как болденон. Несмотря на то, что проблема «андрогенного эффекта», вызванного применением синтетических стероидов, не решена в общем виде, интерес к препаратам на их основе не снижается [120]. Сегодня в биологических жидкостях атлетов можно обнаружить метилтестостерон, станозолол, метенолон, метандиенон и местеролон.

Масштабы злоупотребления препаратами на их основе привели к тому, что на Олимпиаде 76-го года в Монтреале были впервые отобраны образцы мочи у всех участников соревнований [122]. В те годы исследователи использовали радиоиммунологические методы [123, 124]. Однако с ростом числа применяемых стероидов вышеупомянутый метод перестал удовлетворять требованиям мультиплексности анализа. Решением проблемы стало активное внедрение ГХ/МС в сочетании с дериватизацией определяемых соединений [125]. Установление факта приема нерекомендуемых препаратов с использованием данного метода было основано на совпадении масс-спектров и времен удерживания определяемых соединений в биологических образцах и модельных смесях стероидов [126].

Проблему отсутствия стандартных образцов аналитики решали исследованием профиля метаболитов стероидов в моче пациентов, принимающих препараты на их основе [127, 128]. Хотя к концу двадцатого века были изучены пути биотрансформации многих синтетических стероидов, идентификация новых метаболитов до настоящего времени не прекращается [128–132]. Метаболизм синтетических стероидов подробно описан в работе автора [4]. Метаболизм синтетических стероидов, обусловленный монооксигеназной системой с участием 3-гидрокси-дегидрогеназы, предполагает восстановление двойной связи в положении 4,5 с образованием продуктов биотрансформации со скелетом 5альфа-

5бета-андростанов с последующим восстановлением 30 =И группы С образованием ЗОН-стероидов. Если говорить о реакции гидроксилирования, то молекулы. Последняя нельзя исключать другие положения стадия биотрансформации, перед выведением метаболитов с мочой, включает в себя их конъюгацию с глюкуроновой кислотой или сульфатом. Конъюгация способствует превращению метаболитов в гидрофильные соединения, которые легко выводятся из организма с биологической жидкостью. Однако, некоторые метаболиты биотрансформации стероидов участвуют В последней стадии (4не хлородегидрометилтестостерон, оксандролон). В неизменном виде стероиды присутствуют в моче в очень низких концентрациях. Сегодня гидролиз конъюгированных стероидов является неотъемлемой стадией пробоподготовки при их обнаружении в биологических жидкостях [133].

Для гидролиза конъюгированных форм в пионерских исследованиях в качестве ферментов применяли одновременно бета-глюкуронидазу И арилсульфатазу из Helix pomatia. Однако в последних работах мы наблюдаем постепенный переход к β-глюкуронидазы из E. coli. Это связано с тем, что с применением ферментов из *Helix pomatia* наблюдали побочные реакции [134]. Были также представлены результаты [135] трансформации некоторых стероидов в эндогенный тестостерон в присутствии данного фермента. В настоящее для контроля за побочными реакциями используют ряд маркеров. К примеру, трансформация дигидроэпиандростерона в адрост-4-ен-3,17-дион является признаком протекания побочных реакций с участием ферментов, используемых для гидролиза [4]. Очевидно, что при исследовании стероидного профиля, основанного на количественного определения эндогенных стероидов, побочные реакции с их участием не приемлемы. Попытки использования кислот для гидролиза конъюгированных форм стероидов не привели к заметным успехам, так как многие стероиды неустойчивы в кислой среде. Это относится в основном к 17бета-метилстероидам, которые предрасположены перегруппировке К И дегидратации [136]. Несмотря на отсутствие сульфатазной активности, в настоящее время при гидролизе конъюгированных форм стероидов предпочтение

отдают бета-глюкуронидазе, полученная от *E. Coli.* С использованием данного фермента длительность стадии гидролиза не превышает двух часов. Оптимальная температура гидролиза составляет 55°С. При этом очистка биологических образцов методом твердофазной экстракции, предшествующей стадии гидролиза коньюгированных форм стероидов, с использованием сорбента XAD-2 позволяет значительно упростить состав анализируемой пробы. Кроме того, исследователи отмечают, что подобная очистка образцов на основе данного подхода способствует эффективности гидролиза [137].

гидролизом конъюгированных форм стероидов следует 3a стадия экстракции. Основными требованиями к применяемым методам экстракции способность синтетических стероидов являются понизить концентрацию компонентов мешающих И степень извлечения целевых компонентов. Вышеуказанные требования необходимы высокой ЛЛЯ достижения чувтствительности и селективности определения целевых аналитов. Хотя было экстракции стероидов предложено ряд подходов жидкостно-жидкостная экстракция остается наиболее распространенным способом их извлечения из биологических объектов [132]. Ее обычно проводят при рН не выше 9, так как могут возникнуть трудности с экстракцией оксандролона и основного метаболита станозолола. В качестве экстрагента как правило используют этоксиэтан. Хотя данный способ экстракции может сопровождаться образованием пероксидов, двойная перегонка этоксиэтан позволяет решить эту проблему. Для решения этой проблемы также рекомендуют использовать В некоторых работах было предложено использовать 2-метил-2-метоксипропан. При использовании данного экстрагента степень извлечения для большого числа ЗОН-стероидов превышает 80%. Хотя степень извлечения при использовании 2-метил-2-метоксипропана не очень высокая, некоторые исследователи отдают ему предпочтение [130]. В тех случаях, когда необходимо подтвердить присутствие метаболитов метандиенона и нандролона, часто используют *н*-гексан и *н*-пентан. Использование этих экстрагентов позволяет значительно упростить состав анализируемого экстракта, присутствием гидрофильных уменьшив химическум шум, вызванного

компонентов матрицы. Несмотря на невысокую воспроизводимость [137], некоторые исследователи продолжают применять твердофазную экстракцию с XAD-2 форм стероидов. Умеренная для извлечения конъюгированных воспроизводимость промывки сорбента достигается после такими растворителями, как вода, метанол и ацетон. Из-за необратимой сорбции некоторых стероидов реже применяют твердофазную экстракцию на основе сорбентов С<sub>18</sub>. В данном случае приемлемая степень извлечения стероидов достигается при использовании метанола в качестве элюента [135].

Наличие О= и ОН- групп в структуре стероидов осложняет их разделение методом газовой хроматографии. Поэтому для решения этой проблемы в подготовку образцов к анализу вводят стадию дериватизации [125]. Кроме того, отсутствие данной стадии приводит к их термическому разложение в устройстве ввода хроматографа. Сегодня наиболее используемый реагент для дериватизации стероидов при их определении методом газовой хроматографии является МСТФА [138]. Продуктами реакции ОН-групп стероидов с МСТФА являются стабильные триметилсилильные производные. Важной особенностью этого дериватизирующего реагента также является возможность его использовать в качестве приемлемого растворителя для газовой хроматографии. Хотя было предложено большое число дериватизирующих реагентов [139–141], до сих пор МСТФА остается наиболее удачным реагентом для дериватизации стероидов. Как правило, его используют совместно с иодидом аммония, играющего роль катализатора. Добавление иодида аммония позволяет ускорить образование триметилсилильных производных стероидов, имеющих -О= группы. Другими словами, происходит енолизация кетогрупп в стероидах с последующим силилированием. Для минимизации образование иода используют этантиол или дитиоэритритол, которые служат восстановителями. Для некоторых стероидов вышеупомянутый катализатор приводит к образованию побочных продуктов. Это можно наблюдать у стероидов с сопряженными двойными связями, как например тетрагидрогестринон [142]. Особенности его структуры позволили ему долгое время оставаться «невидимым» для аналитических служб, применявщих метод ГХ-МС [143]. Ситуация изменилась только с применением метода ВЭЖХ-МС/МС для обнаружения тетрагидрогестринона [144]. Подход обнаружения тетрагидрогестринона на основе ВЭЖХ-МС/МС был вскоре распространен на такие стероиды, как метилдиенолон, гестринон, норболетон и метилтриенолон [145]. Несмотря на появление большого числа «труднодериватизируемых» последние годы, продолжают до сих активно применять метод ГХ/МС для обнаружения стероидов в биологических жидкостях [146].

Предложенный в третьей четверти прошлого века [147], метод ГХ/МС до сих пор отвечает современным требованиям к селективности и чувствительности обнаружения стероидов [148, 149]. Приемлемые пределы обнаружения (10 нг/мл) достигаются селективным детектированием ионов в условиях электронной ионизации методом ГХ/МС с использованием квадрупольных масс-анализаторов. Селективное детектирование производных стероидов основано на мониторинге молекулярных ионов М<sup>+</sup>, фрагментных ионов [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. Несмотря на высокую чувствительность метода до настоящего времени не прекращаются поиск подходов, обеспечивающих высокую селективность обнаружения стероидов в биологических объектах [4]. Дальнейшее улучшение предела обнаружения стероидов было связано с применением метода ГХ/МС высокого разрешения. С использованием данного метода исследователям удалось обнаружить метаболиты станозолола и метандиенона на уровне 0.1 нг/мл [150]. Высокое разрешение, превышающее 5000, позволило значительно уменьшить влияние мешающих компонентов матрицы на идентификацию стероидов и их метаболитов. Например, приведенное разрешение позволяет селектвно обнаружить метаболит нандролона в присутствии метаболита витамина Е[151] при отсутствии хроматографического хроматографии/масс-спектрометрии разделения. Метод газовой высокого разрешения также применяли ДЛЯ выявления неизвестных продуктов биотрансформации большого числа стероидов [150]. Для повышения селективности обнаружения стероидов в биологических жидкостях также применяли газовую хроматографию/тандемную масс-спектрометрию. В данном случае столкновительная диссоциация изолированных ионов и последующее

детектирование продуктов фрагментации ионов-предшественников позволяет значительно повысить селективность обнаружения. С использованием вышеупомянутого метода удается обнаружить большое число стероидов на уровне 500 пг мл<sup>-1</sup> [152].

Несмотря на преимущества ГХ/МС при скрининге стероидов, вырос интерес к методу ВЭЖХ-МС/МС [142, 153–156]. Это можно объяснить тем, что в последнем случае нет необходимости в получении летучих производных того, проблема стероидов. Кроме решается обнаружения термически неустойчивых стероидов. Вместе с тем, обнаружение стероидов и продуктов их биотрансформации методом ВЭЖХ-МС/МС в экстрактах биологических жидкостей является непростой задачей. Дело в том, что проблема разделения стероидов методом жидкостной хроматографии не решена в общем виде и это требования накладывает дополнительные К масс-спектрометрическому детектированию с точки зрения надежности идентификации. Несмотря не нетривиальность задачи были достигнуты большие успехи в изучении возможности детектирования ультрамалых количеств стероидов и продуктов их биотрансформации методом ВЭЖХ-МС/МС. Влияние состава подвижной фазы на предел детектирования около 70 стероидов в условиях ИЭР исследовали несколько лет назад ученые китайской лаборатории [156]. В ходе проведенного исследования они показали, что оптимальным составом подвижной фазы в условиях ИЭР для определения стероидов, является смесь метанол/вода, содержащая от одного до двух процентов метановой кислоты. Согласно их данным в этих условиях у ЗОН-стероидов образуются протонированные молекулы и фрагментные ионы  $[M+H-nH_2O(n=1,2)]^+$ . В тоже время, у стероидов с =О группой, как правило, не образуются протонированные молекулы, хотя в масс-спектре можно найти фрагментные ионы идентичные ЗОН-стероидам. Несмотря на то, что были предложены оригинальные подходы к обнаружению стероидов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ/МС, эту нетривиальную задачу не решена в общем виде [157, 158].

### 1.4 Проблемы обнаружения широкого спектра физиологически активных веществ

Важной особенностью биологических объектов анализа является небольшой объем отбираемых проб, который в редких случаях превышает 50 мл. Другими словами, в биоаналитической химии объем отбираемых проб ограничивает число используемых методик анализа. Вместе с тем, общепринятая методология обнаружения ФАВ в биологических объектах основана на определении структурно близких соединений в рамках одной методики [159]. В таком ключе принадлежность определяемых соединений к большому числу классов ФАВ, неотвратимо приводит к увеличению числа используемых методик анализа. Поэтому особо актуальным является поиск методологии, создающей предпосылки для разработки нового способа скрининга, позволяющего охватить широкий спектр определяемых ФАВ.

Классический подход обнаружения ФАВ в моче включает в себя до 6 стадий в зависимости от используемого метода:

- » Гидролиз конъюгированных форм определяемых ФАВ;
- извлечение ФАВ из мочи;
- > очистка от мешающих компонентов матрицы;
- химическая модификация с получением летучих производных определяемых ФАВ;
- анализ экстрактов;
- > интерпретация полученных данных.

Учитывая многостадийность подхода, растущее число определяемых ФАВ однозначно не способствуют уменьшению числа методик скрининга, необходимого для охвата широкого спектра соединений. Это особо актуально для антидопинговых лабораторий, где ежегодно анализируется более 20 тысяч проб. Кроме того, не снижаются требования к экспрессности анализа. К примеру, во время важных спортивных состязаний заключение о проведенных исследованиях лаборатория должна в течение нескольких часов после отбора проб [159]. Таким

образом, сегодня есть острая потребность в новой «многообъемлющей» методологии скрининга, позволяющей охватить широкий спектр ФАВ. При этом данная методология не должна допускать повышение затрат на проведение анализа. Автоматизация подготовки образцов к анализу на основе твердофазной экстракции [2] могла бы стать решением проблемы в рамках общепринятой методологии скрининга. Однако приемлемые условия для твердофазной экстрактции большого спектра ФАВ практически всегда требуют учета большого числа параметров, которые необходимо постоянно корректировать с расширением круга определяемых ФАВ.

Уменьшению числа используемых методик анализа также не способствует химическая модификация определяемых соединений, испольуемая в сочетании с методом ГХ/МС. В таком контексте закономерен интерес к методу ВЭЖХ-МС/МС, дающему возможность отказаться от химической модификации определяемых соединений [160, 161]. Невысокий уровень химического шума и высокая селективность метода достигаются детектированием селективных переходов в условиях столкновительной диссоциации родительских ионов. Основным ограничением данного метода является трудоемкие процедуры оптимизации условий столкновительной диссоциации родительских ионов и выбора характеристичных дочерних ионов [4]. Вторым важным ограничением метода является зависимость чувствительности от времени регистрации селективных переходов (ВРСП). Дело в том, что резкое сокращение ВРСП приводит к ощутимому падению чувствительности. С другой стороны, при увеличении числа определяемых соединений будет неизбежно сокращаться ВРСП. Другими словами, с использованием данного метода чувствительность падает с ростом числа детектируемых соединений. Используют два подхода для решения данной проблемы. Первый подход заключается в разработке методики анализа для ограниченного числа соединений (до 50). Второй подход заключается в динамичном изменении условий регистрации селективных переходов от одного удерживания другому. Однако, диапазона времени К несмотря на притягательность данного подхода, он требует периодической коррекции при

незначительном смещении времен удерживания. Таким образом, применение метода ВЭЖХ-МС/МС для скрининга широкого спектра ФАВ неибежно приводит методик обнаружения росту числа используемых И хромато-масс-К спектрометров, используемых для анализа [162, 163]. Ограничение, связанное с числом детектируемых соединений, привело к тому, что лаборатории, осуществляющие скрининг широкого спектра ФАВ, используют ВЭЖХ-МС/МС для обнаружения небольшого круга соединений. К примеру, современные антидопинговых лаборатории используют этот метод для установления факта приема психоактивных веществ, мочегонных препаратов, бета-адреномиметиков и кортикостероидов [164, 165]. В настоящее время не прекращаются активные исследования, направленные на разработку новых способов обнаружения ФАВ в биологических объектах с применением данного метода. В частности, несколько лет назад был разработан прямой способ обнаружения бета-адреномиметиоков, бета-адреноблокаторов и психоактивных веществ в моче методом ВЭЖХ-МС/МС без стадии очистки экстрактов. [166]. Последним важным ограничением метода ВЭЖХ-МС/МС является его неретроспективность [163]. Поэтому представляется актуальным разработка новой методологии быстрого обнаружения широкого спектра соединений, принадлежащих разным классам ФАВ при выполнении одного анализа. Основным достоинством данной методологии должна быть возможность использования несколько методик для обнаружения большого числа соединений, принадлежащих к разным классам ФАВ в сложных по составу смесях. Другими словами, с применением данной методологии детектирование большого числа соединений не приводить лолжно К ухудшению чувствительности. В таком контексте напрашивается регистрация масс-спектров в режиме полного, позволяющего потенциально детектировать неограниченное соединений без ущерба для чувствительности. В число данном случае селективность детектирования обеспечивается точным измерением m/z. В литературе есть примеры использования режима полного сканирования с точным измерением m/z для анализа объектов окружающей среды [168] и нефтей [167].

Этот подход также использовали для в протеомике при идентификации пептидов [169].

Другая важная особенность точного измерения m/z является возможность установления элементного состава [170, 171]. Несколько лет назад было показано, что точность измерения m/z лучше, чем 100 млрд<sup>-1</sup> позволяет однозначно установить элементный состав при соблюдении двух условий. Условия заключаются в следующем: в состав молекулы должны входить атомы углерода, водорода, азота, кислорода и серы, а молекулярная масса соединения не должна превышать 500 Дальтон [172]. Из этого следует, что точное измерение m/z имеет ключевое значение для достижения высокой селективности в режиме полного сканирования. Иначе говоря, построение масс-хроматограммы для одного точно измеренного m/z протонированной молекулы, достаточно для первичной интерпретации полученных данных. Кроме того, режим полного сканирования на основе точного измерения m/z обеспечивает ретроспективность анализа сложных по составу смесей. Хотя при данном подходе нет необходимости в оптимизации условий столкновительной диссоциации родительских ионов, достижение точного измерения m/z требует контроля за рядом факторов [170]. На точность измерения m/z влияет стабильность калибровки и настройки масс-спектрометра и разрешение. Большое значение также имеет высота пика и его форма в массспектре. Самый простой способ достижения удовлетворительной точности измерения m/z является непрерывное проведениеи калибровок. Для этого в источник ионов непрерывно подается калибровочная смесь.

Очень важную роль на точность измерения m/z играет высокта пика и его форма. Регистрируемые пики на шкале m/z должны быть симметричными. В противном случае можно наблюдать смещение центроида. Это очень важно, так как по положению центроида определяется экспериментальное m/z. Кроме того, положение центроида пика и мешающего влияния интерферирующих ионов, имеющих близкие m/z. Фундаментальным подходом для решения данной проблемы является достижение высокого масс-спектрометрического разрешения. Другими словами, высокое разрешение создает предпосылки для точного

измерения m/z благодаря возможности разделить пики с близкими m/z. Таким образом, при высоком разрешении наблюдаются узкие и симметричные пики m/z, и как следствие корректное положение центроида, которое легко определяется.

Сегодня существует три основных подхода для получения высокого разрешения в масс-спектрометрии [173]. Подход, основанный на применении масс-анализатора на основе ионно-циклотронного резонанса позволяет добиться самого высокого разрешения [174]. В свою очередь подход, основанный на времяпролетного масс-анализатора с ортогональным применении вводом позволяет использовать преимущества высокой скорости сканирования и приемлемого разрешения. Третий подход основан на применении орбитальной ловушки. ионной Последний подход является компромиссом **ДВУХ** выошеупомянутых подходов с точки зрения разрешения и скорости сканирования [175-180]. До работ автора ВЭЖХ-МСВР с орбитальной ионной ловушкой не рассматривалась как метод скрининга широкого спектра физиологически активных веществ в биологических жидкостях [181-184].

#### 1.5 Орбитальная ионная ловушка

#### 1.5.1 Краткая история масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушки

Несмотря на то, что масс-спектрометрия с орбитальной ионной ловушкой является абсолютно новым методом [185, 163], история ее появления связывают с ловушкой, разработанной Кингдомом в начале 20-х годов прошлого века [186]. Ловушка Кингдома представляет собой цилиндр, в которой находится проволока, вытянутая вдоль ее центральной оси. Приложение постоянного потенциала между проволокой образованию И цилиндром приводит К радидиальнологарифмического потенциала между электродами. Благодаря радидиальнологарифмическому потенциалу ионы, которые имеют высокую кинетическую стабильные энергию, приобретают «орбитальные» траектории вдоль центрального электрода [187]. Аксиальное удерживание ионов в ловушке Кингдома достигается приложением потенциалов к торцевым электродам [188]. С другой стороны ионы, обладающие недостаточно высокой кинетической энергией, в ловушке Кингдома будут сталкиваться с центральной проволокой и терять заряд.

Более 50 лет ловушку Кингдома использовали в оптических исследованиях ионов [188,189]. Пионерские исследования о возможности превращения ловушки Кингдома в масс-анализатор, основанный на орбитальном электростатическом удерживании ионов, были выполнены Кнайтом [190]. Чтобы обеспечить эффективное удерживание ионов электростатической ловушкой, Кнайт разделяет внешний цилиндрический электрод на две части и сужает его концы, создавая дополнительно удерживающий квадрупольный аксиальный потенциал к присутствующему радиально-логарифмическому потенциалу. Таким образом, он добивается перекрывание квадрупольного и логарифмического поля, что приводит к возникновению квадрологарифмического поля [191]. В этом поле ионы, вращаясь вокруг центрального электрода, совершают гармонические осцилляции по всей его длине. Чтобы регистрировать резонансные колебания, имеющие частоту обратно пропорциональную m/z ионов, Кнайт прикладывает радиочастотное напряжение между двумя половинками внешнего электрода. Иначе говоря, для превращения своей ловушки в масс-анализатор, Кнайт добивался резонансного возбуждения удержанных ионов в продольном направлении. Чтобы избавиться от слабых, уширенных и смещённых резонансов, наблюдаемых в экспериментах, Кнайт изменяет геометрию центрального электрода, так как он предполагал, что она может привести к искажению получаемого аксиального гармонического потенциала. К сожалению, несмотря на интересные результаты, его попытки достичь высокого масс-спектрального разрешения не увенчались успехом. «Низкое» разрешение своей ловушки Кнайт связывал с тем, что созданное им квадро-логарифмическое поле в ловушке не является идеальным. Тем не менее, он стал первым исследователем, кто ввел понятие «идеальной ловушки Кингдома» [190].

В 1996-м году, Гилиг, используя свою теоретическую модель движения ионов, подтверждает гипотезу Кнайта об «идеальной ловушке Кингдома». Согласно модели Гилига, эквипотенциальные линии «идеального» квадрологарифмического поля должны формировать центре В ловушки «веретенообразный» удерживающий объем [192]. Другими словами, из модели Гилига следует, что «идеальная ловушка Кингдома» может быть создана изготовлением «веретенообразного» центрального электрода, форма которого будет определяться квадрологарифмическими эквипотенциальными линиями, создающие «идеальное» удерживающее поле.

В 2000-м году Макаров публикует работу с изображением макета электростатической ионной ловушки [177]. Макаров назвал разработанную им электростатическую ионную ловушку «orbitrap» (на русский язык она переводится, как орбитальная ионная ловушка). Схематично орбитальная ионная ловушка Макарова представлена на рис. 2.



**Рисунок 2** Схематичное изображение орбитальной ионной ловушки Макарова, [177].

Из рисунка видно, как в ловушке Макарова центральный электрод, напоминающий веретено, помещен в широкий внешний электрод, имеющий форму «колокола». Чтобы обеспечить квадрологарифмическое распределение потенциалов в орбитальной ионной ловушке к двум вышеописанным электродам прикладывается только постоянное напряжение, достигающее несколько киловольт. Макаров приводит следующее уравнение для описания распределение квадрологарифмического потенциала в ловушке [193]:

$$\Phi(rz) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{(r^2 - R_1^2)}{2} \right) + \frac{k}{2} R_m^2 \ln\left(\frac{r}{R_1}\right) - U_r \tag{1}$$

где r, z являются цилиндрическими координатами, k– аксиальной силой отталкивания,  $R_1$  – радиусом центрального электрода, Rm – характеристичным радиусом (предельная величина, описывающая «радиальную» границу удерживания ионов), U<sub>r</sub> – напряжение на центральный электрод.

Из этого уравнения следует, что радиальная сила направлена к центральной оси при r < Rm и имеет противоположное направление при r > Rm. Радиальная сила равна нулю, когда r = Rm. Иначе говоря, когда ионы находятся в радиусе r < Rm, они притягиваются к центральной оси, а при r > Rm ионы отталкиваются от центральной оси и теряют, в конечном счете, заряд.

Для описания движения ионов под действием квадрологарифмического поля Макаров использует следующие уравнения [194]:

$$\frac{\partial^2 r}{\partial t^2} - r \left(\frac{\partial \Phi}{\partial t}\right)^2 = -\frac{z}{m} \frac{k}{2} \left[\frac{R_m^2}{r} - r\right]$$
(2)

$$\frac{d}{dt} \left[ r^2 \frac{\partial \Phi}{\partial t} \right] = 0 \tag{3}$$

$$\frac{\partial^2 Z}{\partial t^2} = -\frac{z}{m} k Z \tag{4}$$

где, *k* – кривизна поля, Rm – характеристичный радиус (предельная величина, описывающая «радиальную» границу удерживания ионов), C – приборная константа, *r* – полярный радиус, *Z* – аппликата, *φ* – угловой радиус, *z* – заряд иона, *m* – масса иона.

Подробное решение, при соответствующих граничных условиях, и выводы обсуждаемых уравнений можно найти в работе [194]. Из теоретической модели Макарова следует, что стабильными траекториями в квадрологарифмическом поле орбитальной ионной ловушки будут обладать ионы, совершающие одновременное r- и  $\varphi$ -движения вблизи центрального электрода в сочетании с простыми гармоническими колебаниями вдоль оси z (аксиальные движения) [193]. Другой любопытный аспект теоретической модели Макарова связан с частотой колебаний ионов в z- направлении. Макаров показывает, что данная частота не зависит от орбитального движения ионов в r- и  $\varphi$ -направлениях, так как для  $r/\phi$  и z нет перекрестных членов в описанном поле [177]. Иначе говоря, в ловушке Макарова только аксиальная частота не зависит от начального положения иона и его вращательной скорости движения. При этом ни частоты обладают вращательная, ΗИ радиальная не ЭТИМ свойством. Вышеописанные рассуждения стали решающими при создании нового массспектрометра, так как в орбитальной ионной ловушке Макарова аксиальная частота зависит только от m/z. Зависимость между аксиальной частотой и m/z приведена в уравнении (5) [177]:

$$\omega_z = \sqrt{\frac{kq}{m}} \tag{5}$$

где, m и q являются массой и зарядом, соответственно, k – константа, характеризующая потенциал поля.

Используя уравнение (2), Макаров предложил конвертировать частотный спектр в масс-спектр. Важно отметить, что хотя движение ионов в r-направлении

не используется для определения масс, оно имеет критическое значение для обеспечения стабильности траектории движения ионов, удерживаемых в ловушке.

Таким образом, Макаров первый предложил орбитальную ионную ловушку, в которой созданы условия, позволяющие ионам устойчиво вращаться вокруг центрального электрода и одновременно совершать аксиальные осцилляции (продольные колебания) вблизи него. В ловушке Макарова траектория движения ионов напоминает сложную спираль, а частота гармонических осцилляций ионов вдоль центрального электрода зависит только от m/z.

Для полного преобразования орбитальной ионной ловушки в современный масс-спектрометр сверхвысокого разрешения Макарову пришлось решить ряд нетривиальных физических и технических задач, связанных с детектированием ионов и их инжекцией в орбитальную ионную ловушку из внешнего источника.

частности, для совершения большого числа осцилляций, B ионам необходимо иметь стабильную траекторию в электростатическом поле. На первый взгляд это требование противоречит теореме Ирншоу, которая гласит: всякая конфигурация равновесная точечных зарядов неустойчива, если она обеспечивается исключительно электростатическим взаимодействием зарядов. Это противоречие Макаров решил, создавая нестационарную равновесную конфигурацию. С этой целью он придал ионам, входящим в орбитальную ионную ловушку, значительное ускорение, используя ускоряющие потенциалы, равные нескольким киловольтам. При этом ему удалось избежать существенных потерь кинетической энергии удерживаемыми ионами благодаря сведению к минимуму столкновения с нейтральным газом. В результате это привело к значительному увеличению длины свободного пробега ионов. До работ Макарова динамическое удерживание ионов в электростатических полях не использовали в аналитической масс-спектрометрии.

#### 1.5.2 Современная орбитальная ионная ловушка Макарова

В первом прототипе орбитальной ионной ловушки Макаров использовал в сочетании с МАЛДИ [177]. В этом прототипе разрешение было выше, чем 150000 (на полувысоте), а точность измерения масс составляла 5 ррт. Примечательно, что эти параметры были достигнуты без внешнего устройства накопления или «охлаждения» ионов. Последующие версии орбитальной ионной ловушки Макаров сочетал с методом ионизации электрораспылением [194]. В отличие от первого прототипа, для поздних версий орбитальной ионной ловушки были дополнительно разработаны устройство для предварительного удерживания ионов и С-ловушка (устройство для аккумулирования ионов и их радиального впрыскивания в орбитальную ионную ловушку). С появлением первого прибора 2005-м году гибридная коммерческого В масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой становится доступной для химиков-аналитиков [163, 185].

В первых коммерчески доступных масс-спектрометрах с орбитальной ионной ловушкой ионы вначале накапливались в линейной квадрупольной ионной ловушке, а затем транспортировались в С-ловушку и только после этого они радиально инжектировались в орбитальную ионную ловушку в течение нескольких сот наносекунд через щель в электроде благодаря приобретенному ускорению [189]. Также заметим, что перед щелью пучок ускоренных ионов предварительно фокусируется. Оказавшись в орбитальной ионной ловушке, ионы испытывают растущее действие сил электрического поля с повышением напряжения на центральном электроде, растущего до строго заданного значения. Это приводит к тому, что радиус вращения ионного пакета и его угловой радиус уменьшался в размерах с ростом сил электрического поля. Данный физический процесс называют «электродинамическим сжатием». Другими словами, «электродинамическое сжатие», осуществляемое силами электрического поля, приводит к уменьшению радиуса вращения ионного пакета вместе с его угловым радиусом [188]. Таким образом, этот процесс предотвращает столкновения ионов

внешним электродом во время их начальных осцилляций и создает С «пространство» для вновь инжектируемых ионов (с большим значением m/z). В итоге длительность стадии «электродинамического сжатия» будет определять диапазон m/z детектируемых ионов. С другой стороны, скорость повышения напряжения на центральном электроде будет лимитировать скорость сканирования орбитальной ионной ловушки. После «электродинамического сжатия» потенциалы в ловушке стабилизируются и их значения не меняются определенное время. Таким образом, ионы приобретают стабильные траектории, необходимые для их детектирования по наведенному изображению тока на внешнем электроде.

Другим важным фактором, определяющим радиальную стабильность в ловушке Макарова, является начальная кинетическая энергия ионов в самой ловушке [194]. При достижении радиальной стабильности траектория ионов, имеющих одинаковую кинетическую энергию, представляет собой «тонкое кольцо», в середине которого находится центральный электрод. Другими словами, радиусы этих «колец» соответствуют кинетической энергии ионов. То есть, ионы, обладающие разной кинетической энергией, будут иметь разные радиусы орбит. Очевидно, начальная энергия ионов может варьироваться в широком диапазоне в орбитальной ионной ловушке. Таким образом, мы получаем набор колец, в которых ионы будут иметь заданное m/z и заданную кинетическую энергию. Эти кольца осциллируют в z-направлении с частотой, зависящей от m/z ионов и смещаются радиально относительно центрального электрода в зависимости от кинетической энергии ионов. В свою очередь аксиальная осцилляция ионов индуцирует наведенное изображение ионного тока на разделённые внешние электроды, детектируемого как одиночный импульс и усиливаемого дифференциальным усилителем (по аналогии с массрезонанса). спектрометрией ионно-циклотронного Короткие одиночные импульсы быстро преобразуются в сигнал с использованием преобразования Фурье, генерирующего частотный спектр. Таким образом, детектируемый суммарный ионный ток является суммой токов, генерируемых каждой

индивидуальной заряженной частицей, находящейся в орбитальной ионной ловушке. Поэтому значение суммарного ионного тока будет прямо пропорционально количеству ионов, их заряду и амплитуде аксиальных осцилляций [191,185]. Таким образом, несколько тысяч аксиальных осцилляций могут быть детектированы в течение 10-100 секунд [185].

Несмотря на большие усилия, затраченные в разработке орбитальной ионной ловушки, есть ограничения, связанные с относительно длительным детектированием ионных пакетов из-за смещения по фазе [191]. Можно предположить, что потеря когерентности пакетами ионов в описанных в литературе случаях связаны с искажением поля в орбитальной ионной ловушке. Существуют несколько факторов, которые могут привести к искажению поля в орбитальной ионной ловушке. К этим факторам в первую очередь можно отнести нестабильное электропитание и несовершенство механообработки. Кроме того, столкновения с нейтральными частицами играют не последнюю роль в искажении поля внутри орбитальной ионной ловушки. Вне зависимости от причины искажения поля, при потере конгерентности аксиальная толщина исходного когерентного пакета ионов начинает приближаться к аксиальной амплитуде осцилляций [185]. В результате уширенный пакет ионов одновременно индуцирует противоположенные изображения наведенного тока на обоих внешних электродах. В конечном счете, это может привести к гашению сигнала и уменьшению отношения сигнала к шуму [191]. Таким образом, время, при котором пакет ионов будет осуществлять когерентные аксиальные колебания, будет определять максимально достижимое разрешение по массам в орбитальной ионной ловушке. Поскольку вероятность столкновений с инертным газом для ионов с большим m/z выше, разрешение по массам будет уменьшаться с ростом m/z (здесь поддержание высокого вакуума будет иметь очень большое значение). Безусловно, факторы, влияющие на разрешение, будут также влиять на точность измерения масс.

К факторам, влияющим на точность измерения масс, в первую очередь относят стабильность напряжения на центральном и отражающем электроде.

Большое значение имеет компенсация краевых полей [195]. При пренебрежении этим фактором, регистрируются различные аксиальные частоты для ионов с одинаковой массой. Все вышеописанные факторы также приводят к снижению разрешения, расщеплению пика и сдвигу по массам в масс-спектре [191]. Следует также помнить о флуктуациях комнатной температуры, которая в свою очередь приводит к периодическим смещениям калибровки по массам в течение дня. При низком отношении сигнала к шуму погрешность определения масс зависит в первую очередь от электронного и термического шума (их уровень остается неизменным при внешней и внутренней калибровке по массам)[195]. Кроме того, очень важно помнить, что динамический диапазон внутри масс-спектра в орбитальной ионной ловушке в некоторых случаях может не превышать 5000 при максимальной точности измерений масс [196]. Дело в том, что большие по размерам пакеты ионов могут привести к возникновению такого негативного явления в орбитальной ионной ловушке, как кулоновское отталкивание, ассоциированное с эффектом «пространственного заряда». Это явление в орбитальной ионной ловушке сопровождается обычно сдвигом по массам, коалесценцией ионных пакетов (взаимной сихронизацией двух ионных пакетов, имеющих близкие, но разные m/z) и взаимной диффузией ионных пакетов, вызванной взаимодействием пространственных зарядов [191, 195]. То есть, кулоновское отталкивание приводит к одновременному увеличению скорости «медленных» ионов и уменьшению скорости «быстрых» ионов. Другими словами, образуются пакеты «медленных» и «быстрых» ионов, осциллирующих вместе. Более того, в некоторых случаях, сгруппированный пакет ионов может со временем уменьшиться в размерах или разделиться на два или несколько субпакетов, имеющих различные скорости фазовой релаксации [177]. Это, безусловно, приводит к искажению масс-спектров (в этом случае наблюдают ухудшение точности измерения масс и расщепленные пиков в масс-спектре). Эти проблемы особо актуальны, когда анализируют сложные (по составу) матрицы. В некоторых случаях отрицательные эффекты, связанные с пространственным зарядом, смягчаются благодаря экранирующему действию центрального

электрода [191]. Использование удачных веществ для калибровки по массам или оптимизация предельного количества ионов, накапливаемых в ловушке также рассматривались, как варианты решения данной проблемы [197]. Любопытным преставляется подход, который заключается в стремлении настроить работу ловушки через контролируемое искажение поля (для восстановления идеального эффекты, ассоциированные с диффузией и поля) с целью «смягчить» синхронизацией [195]. Однако использование искусственно вызванных возмущений приводит к повышению точности измерения масс только отдельных пакетов ионов с заданным m/z. Другими словами, выбранные условия для отдельных пакетов ионов с заданным m/z, могут быть неблагоприятными для других пакетов ионов, представляющих интерес для исследователя.

Вместе с тем, анализ биологических объектов сложного состава методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ залачей [198]. не является тривиальной Основным препятствием к быстрому скринингу ФАВ в сложных по составу смесей данным методом является свойственный ОЛ матричный эффект, октрытый автором в ходе анализа биологических жидкостей. Все вышесказанное определило цель, которая в развитии методических подходов жидкостной хромато-массзаключается спектрометрии высокого разрешения для быстрого обнаружения биоорганических соединений в сложных по составу смесях и разработка на этой основе новой методологии хромато-масс-спектрометрического скрининга экзогенных физиологически активных веществ в биологических жидкостях

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Создание методологии хромато-масс-спектрометрического скрининга, обеспечивающей точное измерение масс в режиме полного сканирования для обнаружении широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях без трудоемкой подготовки образцов к анализу;

2. Разработка способов выявления и оценки матричных эффектов, характерных для жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой;

3. Разработка подходов снижения матричных эффектов в жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения при использовании химической (ХИАД) и фотохимической ионизации при атмосферном давлении (ФХИАД) за счет селективного протонирования определяемых ФАВ;

4. Разработка подхода снижения матричных эффектов в жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения при использовании химической ионизацией, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР) за счет подавления ионизации мешающих компонентов матрицы;

5. Разработка и апробация способа скрининга физиологически активных веществ в медико-биологических пробах методом жидкостной хромато-массспектрометрии сверхвысокого разрешения на основе точного измерения m/z протонированных молекул и фрагментных ионов в режиме полного сканирования с использованием ХИАД;

6. Разработка и апробация способов скрининга физиологически медико-биологических пробах активных веществ В методами высокотемпературной и ультраэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения на основе точного измерения m/z протонированных молекул в режиме полного сканирования с использованием ФХИАД и ХИИЭР соответственно;

7. Предложить пути достижения комплементарности предлагаемой методологии скрининга с референсными методами анализа.

#### ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 2.1 Реагенты и исследуемые соединения

В таблице 4 приведены сертифицированные стандартные образцы, использованные в работе:

Таблица 4 Образцы сравнения и реагенты.

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
	9α-фтор-18-нор-17,17-диметил-4,13-диен-		
1.	11β-ол-3-он (метаболит	Cerilliant	CERF-912
	флюоксиместерона)		
2.	Кленбутерол	AK Scientific	F496
3	2α-гидроксиметилэтилэтистерон	LGC CIIIA	
5.	(метаболит Даназола)		NWIAD720
4.	Ралоксифен	Sigma-Aldrich	R1402
5.	3-Гидрокси-4-метокси тамоксифен	LGC, CIIIA	NMIAD921
6.	Анастрозол	Sigma-Aldrich	A2736
7.	Флювестран	Sigma-Aldrich	I4409
8.	Аминоглутетимид	Sigma-Aldrich	545864
9.	Экземестан	Sigma-Aldrich	PZ0006
10.	17-Дигидроэкземестан	WAADS	
11.	Салметерол	AK Scientific	K590
12.	Фенотерол	AK Scientific	V0579
13.	Формотерол	AK Scientific	K252
14.	Бамбутерол	AK Scientific	G311
15.	Ацебутанол	Sigma-Aldrich	A3669
16.	Алпренолол	Sigma-Aldrich	A0360000
17.	Атенолол	Sigma-Aldrich	A7655
18.	Бетаксолол	Sigma-Aldrich	B1103000

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
19.			
20.	Бисопролол	Sigma-Aldrich	50787
21.	Бунолол	Sigma-Aldrich	1359801
22.	Буфетолол	WAADS	
23.	Картеолол	Sigma-Aldrich	1096757
24.	Карведилол	Sigma-Aldrich	C3993
25.	Целипролол	AHH Chemical	MT-49103
26.	Лабетолол	Sigma-Aldrich	L1011
27.	Метипранолол	Aronis	1180/1833
28.	Метопролол	ClearSynth	CS-O-04747
29.	Надолол	Sigma-Aldrich	N1892
30.	Окспренолол	Sigma-Aldrich	O0250000
31.	Пропранолол	Sigma-Aldrich	40543
32.	Соталол	Sigma-Aldrich	39863
33.	Талинолол	AK Scientific	5896AE
34.	Тимолол	AHH Chemical	MT-59525
35.	Эсмолол	Sigma-Aldrich	E8031
		Institute of	
36	Дезацетилгидрокси	Biochemistry, German	
50.	дефлазакорт (дефлазакорт метаболит)	Sport University,	
		Cologne	
37.	Беклометазон	Sigma-Aldrich	B0385
38.	Бетаметазон	Sigma-Aldrich	B7005
39.	Будезонид	Sigma-Aldrich	B7777
40.	Циклезонид	Sigma-Aldrich	Y0001553
41.	Клобезазол пропионат	Sigma-Aldrich	C8037
42.	Дефлазакорт	Sigma-Aldrich	SML0123
43.	21-Дезацетилдефлазакорт	Biosynth	J-006853
44.	Дезонид	Sigma-Aldrich	1173304
45.	Дезоксиметазон	AK Scientific	Q790

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
46.	Дексаметазон	Sigma-Aldrich	D1756
47.	Флуметазон	Sigma-Aldrich	F9507
48.	Флунизолид	Sigma-Aldrich	F5021
49.	Флукортолон	AK Scientific	E124
50.	Метилпреднизолон	Sigma-Aldrich	M0639
51.	Триамцинолон	Sigma-Aldrich	287334
52.	Триамцинолон Ацетонид	Sigma-Aldrich	T6501
53.	Преднизолон	Sigma-Aldrich	P6004
54.	Преднизон	Sigma-Aldrich	P6254
55.	Ацетазоламид	Sigma-Aldrich	97582
56.	Амилорид	Biosynth	W-107643
57.	Хлортиазид	Sigma-Aldrich	C4911
58.	Хлорталидон	Sigma-Aldrich	SML0591
59.	Этакриновая кислота	Sigma-Aldrich	SML1083
60.	Гидрохлоротиазид	Sigma-Aldrich	H4759
61.	Индапамид	Sigma-Aldrich	I1887
62.	Триамтерен	Sigma-Aldrich	T4143
63.	Алтиазид	Sigma-Aldrich	Y0000606
64.	Бензтиазид	Sigma-Aldrich	B7149
65.	Циклотиазид	Sigma-Aldrich	C9847
66.	Клопамид	Sigma-Aldrich	Y0000833
67.	Торасемид	Sigma-Aldrich	Y0000461
68.	Пробенецид	Sigma-Aldrich	P8761
69.	Адрафинил	iChemical	EBD43004
70.	Фампрофазон	AK Scientific	2409AH
71.	Мефентермин	AK Scientific	O653
72.	Модафинил	AK Scientific	SYN5738
73.	Норфенфлурамин	Aurora Fine Chemicals	A00.038.975
74.	6β-Гидроксибромантан	Biosynth	J-200187
75.	Этилефрин	AK Scientific	J10600
76.	Метоксифенамин	Sigma-Aldrich	M1641

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
77.	Метилэфедрин	Sigma-Aldrich	235210
78.	Пропилгекседрин	AK Scientific	X4900
79.	Селегилин	AK Scientific	J10787
80.	N-Дидезметил-сибутрамин	Tocris Bioscience	2322
81.	Сиднокарб	Vitas-M Laboratory	STK548667
82.	<i>р</i> -гидроксимезокарб	WAADS	
83.	Пролинтан	BOC Sciences	493-92-5
84.	1,3-Диметилпентиламин	AK Scientific	V2794
85.	Туаминогептан	Sigma-Aldrich	A56205
86.	Фенбутразат	BOC Sciences	4378-36-3
87.	Оксилофрин	BOC Sciences	365-26-4
88.	3,3-Дифенилпропиламин	Sigma-Aldrich	136298
89.	Pentylamine	Sigma-Aldrich	68518
90.	Изометгептен	BOC Sciences	503-01-5
91.	4-гидроксиафетамин	Angene Chemical	AGN-PC-0JK6M7
92.	Катин (Псевдоэфедрин)	LGC, CIIIA	NMIAM297
93.	Никетамид	Sigma-Aldrich	D98807
94.	Ортетамин	Labseeker	SC-60647
95.	Клобензорекс	Aurum Pharamatech	R2741
96.	Фенкамин	Biosynth	J-017333
97.	Пентилентетразол	Sigma-Aldrich	P6500
98.	<i>N</i> -дезметилселегилин (метаболит Селегилина)	Institute of Biochemistry, German Sport University, Cologne	
99.	Эфедрин	Sigma-Aldrich	E-011
100.	Бупренорфин	Sigma-Aldrich	PHR1729
101.	Зеранол	LGC, CIIIA	NMIAP1787
102.	Салбутамол	Sigma-Aldrich	S8260
103.	Эфапроксирал	WAADS	
104.	Зилпатерол	Sigma-Aldrich	32379
·			

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
105.	Фоледрин	Sigma-Aldrich	H3902
106.	Картеолол	Sigma-Aldrich	1096757
107.	17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α-диол (метаболит Метандиенона)	LGC, CIIIA	NMIAD638
108.	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-пиразол- 3',17β-диол (метаболит Станозолола)	LGC, CIIIA	NMIAD577
109.	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-пиразол- 16β,17β-диол (метаболит Станозолола)	LGC, CIIIA	NMIAD621
110.	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-пиразол- 4β,17β-диол (метаболит Станозолола)	LGC, CIIIA	NMIAD641
111.	17β-гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он (Тренболон)	Sigma-Aldrich	T3925
112.	17α- гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он (Эпитренболон)	LGC, CIIIA	NMIAD708
113.	9α-Фтор-17α-метил-11β,17β- дигидроксиандрост-4-ен-3-он (флюоксиместерон)	Cerilliant	CERF-909
114.	13-этил-17-гидрокси-18,19-dinor-17α- прегнан-4,9,11-триен-20-ин-3-он (Гестринон)	LGC, CIIIA	NMIAD860
115.	13-этил-17-гидрокси-18,19-динор-17α- прегна-4,9,11-триен-3-он (Тетрагидрогестринон)	LGC, CIIIA	NMIAD872
116.	17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α- андростан-3-он (метаболит Оксандролона)	LGC, CIIIA	NMIAD620
117.	17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5α- андростан-3-он (Оксандролон)	Sigma-Aldrich	1482003
118.	4-хлор-17β-гидрокси-17α-метиландроста- 1,4-диен-3-он (Орал Туринабол)	LGC, CIIIA	NMIAD613
119.	4-хлор-6β,17β-дигидрокси-17α- метиландроста-1,4-диен-3-он (метаболит Орал Туринабола)	LGC, CIIIA	NMIAD615
120.	17β-гидрокси-5α-андростано [3,2-с] пиразол (Prostanozol)	WAADS	

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
121.	6β,17β-дигидрокси-17α-метиландроста-1,4- диен-3-он (метаболит Метандиенона)	LGC, CIIIA	NMIAD639
122.	2α-17α-этинил-17β-гидроксиандрост-4- ено[2,3-d]изоксазол (Даназол)	Sigma-Aldrich	D8399
123.	17α-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (α-Болденон)	LGC, CIIIA	NMIAD582
124.	17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (Болденон)	Sigma-Aldrich	46431-R
125.	андроста-1,4-диен-3,17-дион (Болдион)	Sigma-Aldrich	A-7505
126.	13-этил-17-гидрокси-18,19-динорпрегна-4- ен-3-он (Норболетон)	ChemTik	CTK4B3533
127.	17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9-диен-3-он (Метилдиенолон)	LGC, CIIIA	NMIAD916
128.	17-Гидроксипрегна-4-ен-20-ин-3-он (Этистерон)	Sigma-Aldrich	E1001
129.	17β-гидрокси-17α-метил-5α-андрост-1-ен- 3-он (Метил-1- тестостерон)	BOC Sciences	65-04-3
130.	17β-гидрокси-5α-андрост-1-ен-3-он (1- Тестостерон)	LGC, CIIIA	NMIAD767b
131.	4-хлор-17β-гидроксиандрост-4-ен-3 -он (Клостебол)	Alfa Chemistry	ACM1093589
132.	17β-гидрокси-2α-метил-5α-андростан-3-он (Дростанолон)	Alfa Chemistry	ACM58195
133.	17β-гидрокси-17α-метил-5α-андростан-3-он (Местанолон)	Alfa Chemistry	ACM521119
134.	17β-гидрокси-l-метил-5α-андрост-1 -ен-3-он (Метенолон)	Labseeker	SC-46310
135.	17β-гидрокси-2α,17α-диметил-5α- андростан-3-он (Метастерон)	Alfa Chemistry	ACM88979446
136.	17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9,11- триен-3-он (Метилтриенолон)	Alfa Chemistry	ACM965935
137.	17β-гидрокси-7α,17α-диметилэстра-4-ен-3- он (Миболерон)	Sigma-Aldrich	SML0438

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
138.	4,17β-дигидрокси-17α-метиландрост-4-ен- 3-он (Оксиместерон)	Cerilliant, CША	CERO-910
139.	1α-метил-5α-андростан-3α-ол-17-он (метаболит Местеролон)	LGC, CША	NMIAD557
140.	1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17-он (metabolite метенолон)	LGC, CIIIA	NMIAD619
141.	17α-метил-5α-андростано[2,3-с]-фуразан- 16β,17β-диол (метаболит Фуразабола)	LGC, CIIIA	NMIAD602
142.	2α-метил-5α-андростан-3α-ол-17-он (метаболит Дростанолона)	LGC, CIIIA	NMIAD567
143.	2-гидроксиметил-17α-метиландрост-1,4- диен-11α,17β-диол-3-он (метаболит Формеболона)	LGC, CIIIA	NMIAD622
144.	5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он (метаболит Болденона)	LGC, CША	NMIAD564
145.	бα-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (метаболит 6-ОХО)	Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии	
146.	4-хлор-3α-гидроксиандрост-4-ен-17-он (метаболит Клостебола)	LGC, CIIIA	NMIAD563
147.	7α,17α-диметил-5β-андростан-3α,17β- диол (метаболит Боластерона)	LGC, CIIIA	NMIAD564
148.	7β,17α-диметил-5β-андростан-3α,17β-diol (метаболит Калустерона)	LGC, CIIIA	NMIAD624
149.	9-фтор-17α-метиландрост-4-ен- 3α,6β,11β,17β-тетрол (метаболит Флюоксиместерона)	LGC, CША	NMIAD616
150.	13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5α-гонан (метаболит Норболетона)	LGC, CIIIA	NMIAD820
151.	13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5β- гонан (метаболит Норболетона)	LGC, CIIIA	NMIAD818
152.	17α-этил-5α-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)	LGC, CIIIA	NMIAD558

\_

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
153.	17α-этил-5β-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)	LGC, CIIIA	NMIAD559
154.	17α-метил-5α-андростан-3α,17β-диол (метаболит Метилтестостерона)	LGC, CIIIA	NMIAD560
155.	17α-метил-5β-андростан-3α,17β-диол (метаболит Метилтестостерона)	LGC, CIIIA	NMIAD561
156.	7α-метилmethyl-19-нор-17α-прегна-5(10)- ен-20-ин-3α,17β-диол (метаболит Тиболона)	Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии	
157.	5α-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)	LGC, CIIIA	NMIAD555a
158.	5β-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)	LGC, CIIIA	NMIAD554
159.	18-нор-17,17-диметиландроста-1,4,13- триен-3-он (метаболит Метандиенона)	LGC, CIIIA	NMIAD576
160.	Methyltestosterone (ITSD)	Sigma-Aldrich	69240
161.	1α-метил-5α-андростан-3α,17β-диол (метаболит Местеролона)	LGC, CIIIA	NMIAD556
162.	17,17-диметил-18-nor-5β-androsta-1,13- diene-3α-ol (метаболит Метандиенона)	LGC, CIIIA	NMIAD639
163.	Эпиоралтуринабол	Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии	
164.	S-4	Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии	
165.	S-24	Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии	

Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
	Институт Биохимии,	
L GD2226	Спортивного	
EGD2220	Университета	
	Германии	
	Институт Биохимии,	
GW501516	Спортивного	
Gw501510	Университета	
	Германии	
	Институт Биохимии,	
L 165 041	Спортивного	
L-103,041	Университета	
	Германии	
N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-	Sigma-Aldrich	39/866
trifluoroacetamide (MSTFA)	51gina-7 Marten	374000
β-Glucuronidase <i>Helix Pomatia</i>	Sigma-Aldrich	G8885
Уксусная кислота	Merck	1.00063.2500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën	30407
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haën	30412
NH4I	Riedel-de Haën	03101
Капий карбонат	ХИММЕЛ	ХЧ
Калий Кароонат	Аниницд	ГОСТ 4221-76
Калий гилрокарбонат	ХИММЕЛ	Ч
кали пдрокироонит	Лининед	ГОСТ 2156-76
1,4-Dithio-DL-threitol	Fluka	43817
Эфир диэтиловый	МЕДХИМПРОМ	«чда»
β-Glucuronidase <i>E.coli</i>	Roche	03707601001
Натрий сериокиений	ХИММЕЛ	чда
Патрии сернокислый	Анимед	ГОСТ 195-77
Изопропанол	Fisher Scientific	P/7509/17
Ацетонитрил	Sigma-Aldrich	34888
Муравьиная кислота	Sigma-Aldrich	251364
Ацетат аммония	Acros Organics	631-61-8
Ацетат аммония Этилацетат	Acros Organics   ХИММЕД	631-61-8 ГОСТ 22300-76
	Стандартный ооразец   LGD2226   GW501516   L-165,041   N-Methyl-N-(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide (MSTFA)   β-Glucuronidase Helix Pomatia   Уксусная кислота   КН₂РО4   Na₂HPO4·2H₂O   NH4I   Калий карбонат   1,4-Dithio-DL-threitol   Эфир диэтиловый   β-Glucuronidase E.coli   Натрий сернокислый   Изопропанол   Ацетонитрил	Стандартный ооразец Производитель   LGD2226 Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии   GW501516 Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии   L-165,041 Институт Биохимии, Спортивного Университета Германии   N-Methyl-N-(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide (MSTFA) Sigma-Aldrich   β-Glucuronidase Helix Pomatia Sigma-Aldrich   Уксусная кислота Merck   KH2PO4 Riedel-de Haën   NH4I Riedel-de Haën   NH4I Riedel-de Haën   Kалий карбонат ХИММЕД   Зфир дизтиловый МЕДХИМПРОМ   β-Glucuronidase E.coli Roche   Натрий сернокислый ХИММЕД

N⁰	Стандартный образец	Производитель	Номер по каталогу
187.	Этанол	Sigma-Aldrich	34852
188.	Гидроксид аммония	Sigma-Aldrich	338818
189.	Триэтиламин	Sigma-Aldrich	T0886
190.	1-Метилпирролидин	Sigma-Aldrich	69110
191.	Бикарбонат аммония	Sigma-Aldrich	09830

#### Структурные формулы исследуемых соединений представлены на рис. 3.



Рисунок 3 Структурные формулы исследуемых соединений.



Карведилол



Клобезазол пропионат

21-Дезацетилдефлазак орт

Дефлазакорт

Дезонид



Пробенецид






17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α-диол (метаболит Метандиенона)





метил-5α-андростано-[3,2-с]пиразол-3',17β-диол (метаболит Станозолола)



гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он

(Тренболон)

9α-



OH

ЭН



гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он (Эпитренболон)

метил-5α-андростано-[3,2-с]пиразол-4β,17β-диол (метаболит Станозолола)



Фтор-17α-метил-11β,17βдигидроксиандрост-4-ен-3-он (флюоксиместерон)



17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α-андростан-3-он (метаболит Оксандролона)



этил-17-гидрокси-18,19-dinor-17αпрегнан-4,9,11-триен-20-ин-3-он (Гестринон)



17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5αандростан-3-он (Оксандролон)



гидрокси-18,19-динор-17α-прегна-4,9,11-триен-3-он (Тетрагидрогестринон)





СІ 4-хлор-17βгидрокси-17α-метиландроста-1,4диен-3-он (Орал Туринабол)



4-хлор-6β,17β-дигидрокси-17αметиландроста-1,4-диен-3-он (метаболит Орал Туринабола)



17β-гидрокси-5α-андростано [3,2с] пиразол (Prostanozol)



6β,17β-дигидрокси-17αметиландроста-1,4-диен-3-он (метаболит Метандиенона)



2α-17α-этинил-17βгидроксиандрост-4-ено[2,3d]изоксазол (Даназол)



андроста-1,4-диен-3,17-дион (Болдион)



17α-гидроксиандроста-1,4-диен-3он (α-Болденон)



13-этил-17-гидрокси-18,19динорпрегна-4-ен-3-он (Норболетон)



17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3он (Болденон)



17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9-диен-3-он (Метилдиенолон)



17-Гидроксипрегна-4-ен-20-ин-3-он (Этистерон)



гидрокси-17а-метил-5а-андростl-ен-3-он (Метил-1- тестостерон)



гидрокси-5α-андрост-1-ен-3-он (1-Тестостерон)



17β-гидроксиандрост-4-ен-3 -он (Клостебол)



гидрокси-2α-метил-5αандростан-3-он (Дростанолон)

17β-



17β-гидрокси-17α-метил-5αандростан-3-он (Местанолон)



гидрокси-l-метил-5α-андрост-1 - ен-3-он (Метенолон)



гидрокси-2а,17а-диметил-5аандростан-3-он (Метастерон)



17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9,11-триен-3-он (Метилтриенолон)

17β-гидрокси-7α,17αдиметилэстра-4-ен-3-он (Миболерон)



1α-метил-5α-андростан-3α-ол-17-он (метаболит Местеролон)



4,17β-дигидроксиэстра-4-ен-3-он (Оксаболон)



метилен-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17он (metabolite метенолон)

HO



2α-метил-5α-андростан-3α-ол-17-он (метаболит Дростанолона)



HO



4-хлор-3α-гидроксиандрост-4ен-17-он (метаболит Клостебола)



7α,17α-диметил-5β-андростан-3α,17β-диол (метаболит Боластерона)

HO

Н

HO

OH



7β,17α-диметил-5β-андростан-

3α,17β-diol (метаболит

Калустерона)

9-фтор-17а-метиландрост-4-ен-3а,6,6,11,6,17,6-тетрол (метаболит Флюоксиместерона)

F

ÔН



13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5αгонан (метаболит Норболетона)



4,17β-дигидрокси-17αметиландрост-4-ен-3-он (Оксиместерон)

0

OH



17α-метил-5α-андростано[2,3-с]фуразан-16β,17β-диол (метаболит Фуразабола)



5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он (метаболит Болденона)



13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5β-гонан (метаболит Норболетона)



17α-метил-5α-андростан-3α,17β-диол (метаболит Метилтестостерона)



5α-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)



Methyltestosterone (ITSD)



17α-этил-5α-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)



17α-метил-5β-андростан-3α,17βдиол (метаболит Метилтестостерона)



5β-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)



1α-methyl-5α-androstan-3α,17βdiol (метаболит Местеролона)



17α-этил-5β-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)



7α-метилтеthyl-19-нор-17αпрегна-5(10)-ен-20-ин-3α,17βдиол (метаболит Тиболона)



18-нор-17,17-диметиландроста-1,4,13-триен-3-он (метаболит Метандиенона)



17,17-диметил-18-nor-5βandrosta-1,13-diene-3α-ol (метаболит Метандиенона)

В качестве внутреннего стандарта использовали метилтестостерон с содержанием основного компонента 98 %. Растворы образцов сравнения с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точных навесок в метаноле для «хроматографии». Рабочие растворы получали последовательным разбавлением и хранили при температуре -20 °C.

#### 2.2 Оборудование

Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС был выполнен на жидкостном хроматографе модели Accela (Thermoscientific, США), который соединен с массспектрометром модели TSQ Quantum Ultra фирмы Thermo Finnigan со съемным источником ионов для электрораспылтительной ионизации. Для сбора и обработки данных было использовано программное обеспечение Xcalibur версии 2.2 (Thermoscientific, США).

ВЭЖХ-МСВР был Анализ методом выполнен на жидкостном хроматографе модели Surveyor (Thermo Finnigan, США), который соединен с масс-спектрометром модели Orbitrap (Thermoscientific, США) со съемными ионизации электрораспылением, химической источниками ИОНОВ для И фотохимической ионизации при атмосферном давлении. Для сбора и обработки данных было использовано программное обеспечение Xcalibur версии 2.2 (Thermoscientific, CIIIA)

Анализ методом ГХ-МС/МС был выполнен на газовом хроматографе Trace GC Ultra (Thermo Finnigan, США), который оснащен устройством автоматического ввода проб модели СТС Pal и соединен с масс-спектрометром типа «Ионная ловушка» модели PolarisQ с электронной ионизацией и системой обработки данных Xcalibur версии 2.2 (Thermoscientific, США).

Анализ методом ГХ-МСВР был выполнен на газовом хроматографе Trace GC Ultra (Thermoscientific, США), который оснащен устройством автоматического ввода проб модели СТС Pal и соединен с масс-спектрометром высокого разрешения модели DFS (Thermoscientific, США).

#### 2.3 Условия изучения матричных эффектов

#### 2.3.1 Подготовка образцов для оценки матричного эффекта

Процедура подготовки образцов для оценки матричного эффекта незначительно отличалась от процедуры, описанной в разделе 2.6. В данном случае исследуемый компонент добавляли в метанол и в экстракт из мочи. При этом концентрация в обоих образцах составляла 10 нг/мл в пересчете на 3 мл мочи при исследовании анаболических стероидов. Для селективных модуляторов андрогенных рецепторов, антиэстрогенов, бета-агонистов, бета-блокаторов, кортикостероидов, диуретиков и стимуляторов они составляли 25 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 125 нг/мл, 15 нг/мл, 125 нг/мл и 125 нг/мл соответственно. Оценка опиралась везде на параллельных эксперимента.

#### 2.3.2 Хроматографические условия

В таблице 5 представлены хроматографические условия, которые использовались в ходе исследования матричных эффектов с применением различных способов ионизации. **Таблица 5** хроматографические условия при исследовании матричных эффектов с использованием различных способов ионизации

Хроматографи	Способы ионизации				
ческие условия	ЭРИАД (ВЭЖХ-	ХИАД	ΦΣ	КИАД	ХИИЭР
	МС/МС и ВЭЖХ-		Без добавок	С добавками	
	MCBP)				
Колонка	Eclipse XDB-C18 (150×2.1 мм, диаметр частиц 5 мкм)	Onyx Monolytic C18 (100×3 мм)	Restek         Ultra           C18         (100×2.1           мм,         диаметр           частиц 5 мкм)	Hypercarb (100 × 1 мм, диаметр частиц 3 мкм)	Асquity ВЕН- C18 (50×2.1 мм, диаметр частиц 1.7 мкм)
Температура в термостате колонки	50 °C	30 °C	35 °C	90 °C	35 °C
Состав подвижной фазы	А – 0,05 %-ный раствор НСООН в воде В - 0,05 %-ный раствор НСООН в метаноле	А – деионизированна я вода В - метанол	<ul> <li>A – 0,05 %-ный раствор</li> <li>HCOOH в воде</li> <li>B - 0,05 %-ный</li> <li>раствор</li> <li>HCOOH в</li> <li>метаноле</li> </ul>	А – Вода В - ацетонитрил/ добавка (этанол, ТГФ, ацетон изопропанол,) (25/75 v/v)	А – Вода с 3 мМ NH4OH В – Метанол с 3 мМ NH4OH
Скорость потока подвижной фазы	0.2 мл/мин	0 мин – 0.9 10 мин – 1.1 10 – 14 мин – 1.1 16 мин – 0.9 20 мин – 0.9 мл/мин	0.25 мл/мин	0.17 мл/мин	0.2 мл/мин
Программа I	0 мин. – 40 % В	0 мин. – 30 % В	0 мин. – 50 % В	0 мин. – 20 % В	0 мин. – 30 %
градиентного элюирования	8 мин. – 90 % В 12 - 18 мин. – 40 % В 18 - 21 мин. – 40 % В	4 мин. – 90 % В 8 - 10 мин. – 30 % В 10 - 14 мин. – 30 % В	8 мин. – 100 % В 8 – 12 мин. – 100 % В 12 – 16 мин. – 50 % В	13 мин. – 100 % В 13 - 20 мин. – 100 % В 24 - 28 мин. – 20 % В	В 7 мин. – 100 % В 7 - 15 мин. – 100 % В 17 мин. – 30 % В 17 - 20 мин. – 30 % В

Хроматографи	Способы ионизации				
ческие условия	ЭРИАД (ВЭЖХ-	ХИАД	Φ	ХИАД	ХИИЭР
	МС/МС и ВЭЖХ-		Без добавок	С добавками	
	MCBP)				
Программа II	0 мин. – 40 % В	0 мин. – 30 % В			
градиентного	10 мин. – 90 % В	6 мин. – 90 % В			
элюирования	14 - 20 мин. – 40 %	10 - 12 мин. – 30			
		%			
		12 - 16 мин. – 30			
		%			
Программа III	0 мин. – 40 % В	0 мин. – 30 % В			
градиентного	12 мин. – 90 % В	8 мин. – 90 % В			
элюирования	16 - 22 мин. – 40 %	12 - 14 мин. – 30			
		%			
		14 - 18 мин. – 30			
		%			
Программа IV	0 мин. – 40 % В	0 мин. – 30 % В			
градиентного	14 мин. – 90 % В	10 мин. – 90 %			
элюирования	18 - 24 мин. – 40 %	В			
		14 - 16 мин. – 30			
		%			
		16 - 20 мин. – 30			
		%			
Объем пробы	15 мкл	50 мкл	10 мкл	5 мкл	3 мкл

## Таблица 5 (Продолжение)

#### 2.3.3 Масс-спектрометрические условия

#### 2.3.3.1 Тандемная масс-спектрометрия

При изучения матричных эффектов, характерных для тандемной массспектрометрии и масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, условия ионизации были идентичными. Напряжение на капилляре составляло 3.8 кВ; температура фокусирующего капилляра - 270°С; скорость потока распыляющего газа (азот) 0.45 л мин<sup>-1</sup>; скорость потока вспомогательного газа (азот) 0.075 л мин<sup>-1</sup>. Условия селективного детектирования для тандемного масс-спектрометра представлены в табл.6

Таблица 6 Условия селективного детектирования тандемного массспектрометра

Соединение	Ион-	m/z	Энергия	m/z
	предшественник	иона-	соударений	детектируемых
		предшествен	, eV	фрагментных
		ника		ИОНОВ
Гестринон	$[M+H]^{+}$	309	15	241
			30	199
Охандролон	$[M+H+CH_3OH]^+$	339	20	289
			30	135
Оксиместерон	$[M+H]^+$	319	34	125
			30	113
Тетрагидрогестринон	$[M+H]^+$	313	15	241
			35	199
6β-Гидрокси-4-	$[M+H]^+$	351	15	209
хлородегидрометилтестостерон			32	191

При применении тандемной масс-спектрометрии в качестве газа-мишени использовали аргон. Энергия столкновений в камере соударений варьировали от 10 до 70 эВ. Ширина пропускания ионов на первом квадруполе (Q1) и третьем квадруполе (Q3) составляла 0.5 а.е.м., время задержки 5 мс.

Условия детектирования орбитальной ионной ловушки в ходе изучения матричных эффектов и выполнения скрининга были одинаковыми. Разрешение, максимальное время удерживания ионов, AGC, скорость сканирования, диапазон

сканирования составляли 60000, 100 мс, 200000, 1 скан/с и 100 – 500 а.е.м соответственно.

### 2.3.3.2 <u>Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с селективным</u> <u>детектированием ионов</u>

Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с селективным детектированием ионов применялась для исследования матричного эффекта характерного для ОЛ. Для выполнения экспериментов с селективным детектированием ионов орбитальная ионная ловушка использовалась в тандеме с линейной ионной ловушкой, изолирующей детектируемые ионы. Условия селективного изолирования ионов, представленные в табл. 7, осуществлялись благодаря линейной ионной ловушки, которая использовалась в тандеме с орбитальной ионной ловушкой. Условия детектирования орбитальной ионной ловушкой. Условия детектирования орбитальной ионной ловушки, которая использовалась в тандеме с орбитальной ионной ловушкой. Условия детектирования орбитальной ионной ловушки приведены в разделе 2.3.3.1.

Таблица 7 Условия селективного изолирования ионов линейной ионной ловушкой

Соединение	Изолируемый	m/z	«Ширина	Максимальное
	ИОН	изолируемый	окна» для	время
		иона	изолируемо	удераживания
			го иона,	изолированного
			а.е.м	иона
Гестринон	$[M+H]^+$	309	3	100 мс
Охандролон	$[M+H]^+$	307	3	100 мс
Оксиместерон	$[M+H]^+$	319	3	100 мс
Тетрагидрогестринон	$[M+H]^+$	313	3	100 мс
6β-Гидрокси-4-	$[M+H]^+$	351	3	100 мс
хлородегидрометилтестостерон				
Эфедрин	$[M+H]^+$	166	3	100 мс
Метилэфедрин	$[M+H]^+$	180	3	100 мс
Торасемид	$[M+H]^+$	349	3	100 мс

2.3.3.3 Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения с детектированием в режиме полного сканирования

Масс-спектометрические условия, представленные в табл. 8, в ходе изучения матричных эффектов и выполнения процедуры скрининга с применением орбитальной ионной ловушки были одинаковыми.

### Таблица 8

Параметры	Способы ионизации				
Параметры	ХИАД	ФХИАД	ХИИЭ		
Напряжение на капилляре	-	-	3.8 кВ		
Напряжение на игле коронного разряда	5 кВ	-	-		
Используемая лампа		Kr	-		
Температура фокусирующего капилляра	280 °C	280 °C	400 °C		
Скорость потока осущающего газа (N <sub>2</sub> ):	0.75 л/мин	0.75 л/мин	0.45 л мин <sup>-1</sup>		
Скорость потока вспомогательного газа (N <sub>2</sub> ):	0.095 л/мин	0.095 л/мин	0.075 л мин <sup>-1</sup>		
Энергия соударений в источнике ионов	30 эВ	-	-		
Потенциал на выталкивающей линзе	-4.25 B	-4.25 B	-4.25 B		
Потенциал на ускоряющей линзе	-42 B	-42 B	-42 B		
Потенциал на фокусирующей линзе	-9 B	-9 B	-9 B		
Максимальное время удерживания ионов, мс	350 мс	500 мс	100 мс		

Условия выполнения экспериментов с орбитальной ионной ловушкой

Параметры	Способы ионизации				
	ХИАД	ФХИАД	ХИИЭ		
AGC	200000	200000	200000		
Скорость сканирования	1 скан/с	1 скан/с	1 скан/с		
Диапазон сканирования	100-500 а.е.м.	100-500 а.е.м.	100- 650 а.е.м.		
Точность определения масс	≤ 5 ppm	≤ 5 ppm	$\leq$ 5 ppm		
Разрешение	60000	60000	60000		

#### 2.4 Хроматографические условия скрининга

хроматографического Для разделения веществ, детектированных с применением тандемного масс-спектрометра с тройным квадруполем в условиях электрораспылительной ионизации, была использована в ходе скрининга колонка Eclipse XDB-C18 (150×2.1 мм, диаметр частиц 5 мкм) фирмы Agilent. Подвижная фаза представляла собой 0.05%-ный раствор муравьиной кислоты в воде (А) и метаноле (В). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0.2 мл/мин. Температура в термостате колонок достигала 50 °С. Объем пробы – 15 мкл. Программа градиентного элюирования была следующей: 0 мин – 40 % **В**; 8 мин – 90 % **В**; 12 – 18 мин – 40 %. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 18 минут.

хроматографического разделения Для веществ, детектированных С орбитальной ловушки применением *условиях* ионной в электрораспылительной ионизации, применяли в ходе скрининга колонку Restek Ultra C18 (100×2.1 мм, диаметр частиц 5 мкм). Подвижная фаза представляла собой 0.01%-ный раствор уксусной кислоты в воде с 5 мМ CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (A) и смесь метанол/A (90/10 v/v) (B). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0.25 мл/мин. Температура в термостате колонок достигала 35 °C. Объем пробы – 10 мкл. Программа градиентного элюирования была следующей: 0 мин – 50 % В; 8 мин – 100 % В; 8 – 12 мин – 100 % В; 12 – 16 мин – 50 %. Объем вводимой пробы – 5 мкл.

Для хроматографического разделения веществ, детектированных с использованием орбитальной ионной ловушки с *химической ионизацией при атмосферном давлении*, была использована в ходе скрининга колонка Onyx Monolytic C18 (100×3 мм) фирмы Phenomenex. Подвижная фаза:  $\mathbf{A}$  – деионизованная вода,  $\mathbf{B}$  – метанол. Хроматографическое разделение проводилось в режиме градиентного элюирования: 0 мин – 30 % **B**; 10 мин – 90 % **B**; 10 – 14 мин – 90 % **B**; 16 мин – 30 % **B**; 16 – 20 мин – 30 % Скорость потока подвижной фазы: 0 мин – 0.9 мл/мин; 10 мин – 1.1 мл/мин; 10 – 14 мин – 1.1 мл/мин; 16 мин – 0.9 мл/мин; 20 мин – 0.9 мл/мин. Температура в термостате колонок достигала 30 °C. Объем пробы – 50 мкл.

Для хроматографического разделения веществ, детектированных с использованием орбитальной ионной ловушки с *химической ионизацией, инициируемой электрораспылением* была использована в ходе скрининга колонка Acquity BEH C18 column ( $50 \times 2.1$  мм, диаметр частиц 1.7 мкм) фирмы Waters. Подвижная фаза представляла собой раствор гидроксида аммония (3 мМ) в воде (**A**) и в смеси метанол/вода (**B**). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0.2 мл/мин. Температура в термостате колонок достигала 35 °C. Объем пробы – 3 мкл. Программа градиентного элюирования была следующей: 0 мин – 40 % **B**; 7 – 15 мин – 100 % **B**; 17 – 20 мин – 40 %.

Для хроматографического разделения веществ, детектированных с использованием орбитальной ионной ловушки в условиях *фотохимической ионизации при атмосферном давлении* без использования добавок применяли в ходе скрининга колонку Restek Ultra C18 (100×2.1 мм, 5 мкм). Подвижная фаза представляла собой 0.01%-ный раствор CH<sub>3</sub>COOH в H<sub>2</sub>O с 5 мМ CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (**A**) и смесь метанол/А (90/10 v/v) (**B**). Скорость потока подвижной фазы была

постоянной и составляла 0.25 мл/мин. Температура в термостате колонок достигала 35 °C. Объем пробы – 10 мкл. Программа градиентного элюирования была следующей: 0 мин – 50 % **B**; 8 мин – 100 % **B**; 8 – 12 мин – 100 % **B**; 12 – 16 мин – 50 %.

В хроматографического свою очередь для разделения веществ, детектированных с использованием орбитальной ионной ловушки в условиях фотохимической ионизации при атмосферном давлении с использованием добавок применяли в ходе скрининга колонку Hypercarb (100 × 1 мм, диаметр частиц 3 мкм) фирмы Thermoscientific. Подвижная фаза представляла собой 0.1%трифторуксусной **(A)** ный раствор кислоты в воле И В смеси ацетонитрил/изопропанол (25/75 v/v), содержащей 0.1% CF<sub>3</sub>COOH (**B**). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0.17 мл/мин. Температура в термостате колонок достигала 90 °С. Объем пробы – 5 мкл. Программа градиентного элюирования была следующей: 0 мин – 20 % **B**; 13 мин – 100 % **B**; 13 – 20 мин – 100 % В; 24 – 28 мин – 20 %.

Для хроматографического разделения ТМС-производных биорегуляторов, детектированных с использованием масс-спектрометра типа «ионной ловушки» с электронной ионизацией была использована в ходе скрининга капиллярная колонка DB-1MS длиной 25 м с внутренним диаметром 0.32 мм и толщиной слоя неподвижной фазы 0.25 мкм фирмы J&W Scientific. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Газом-носителем служил гелий. Скорость потока газа-носителя через колонку составляла 2.2 мл/мин. Сброс, равный 60 мл/мин, открывали через 0.8 мин после ввода пробы. Температура инжектора и переходной линии 280 И 300 °C соответственно. Условия составляли программирования температуры: 120 °С (1 мин), скорость нагрева 50 К/мин до 200 °С (3 мин), скорость нагрева 10 К/мин до 300 °С (7 мин).

Для хроматографического разделения ТМС-производных биорегуляторов, детектированных с использованием магнитно-секторного масс-спектрометра с электронной ионизацией была использована в ходе скрининга капиллярная колонка Trace-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной слоя неподвижной фазы 0.1 мкм фирмы Thermoscientific. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Скорость потока газа-носителя через колонку составляла 0.8 мл/мин. Ввод осуществлялся со сбросом 50/1. Температура инжектора и переходной линии составляли 295 и 300 °C соответственно. Условия программирования температуры: 180 °C (1 мин), скорость нагрева 50 К/мин до 200 °C (3 мин), скорость нагрева 10 К/мин до 325 °C (7 мин).

#### 2.5 Масс-спектрометрические условия скрининга

#### 2.5.1 Масс-спектрометрия высокого разрешения с электронной ионизацией

Температура в камере ионизации достигала 280 °С. Энергия электронов составляла 70 эВ. В ходе анализа непрерывно вводилось калибровочное вещество, которое в данном случае было перфтортрибутиламином. Разрешение составляло 10200. Напряжение на электронном умножителе 1615 В. Исследования проводились с использованием электрического сканирования [210]. Условия электрического сканирования приведены в табл. 9.

T / A	<b>T</b> 7				U U	V 1		U U
I on hung y	νοπορια	CVAUUNODAUUG	Macc_cnewThoMeT	naci	проило	u m	orveur	NUDRUI
	ј СЛОВИЛ	скапирования		$Da \cup I$	тройно	иw	υκνυμι	ιυσκυμ
···· • • •		1	1 .	L r	1	1	J 1	

Сегмент 1				
Начало сканирования (мин)	: 4.80			
Первая реперная масса:	263.98	71		
Вторая реперная масса:	425.97	75		
Режим сканирования: Селен	ктивное детек	тирование полож	ительно заряжен	ных ионов в
диапазоне	[ 263.98	71-425.9775]		
Сегмент 2				
Начало сканирования (мин)	: 9.20			
Первая реперная масса:	313.983	9		
Вторая реперная масса:	463.974	3		
Режим сканирования:	Селективное	детектирование	положительно	заряженных
ионов в диапазоне	[ 313.983	9-463.9743]		
Сегмент 3				
Начало сканирования (мин)	: 11.01			
Первая реперная масса:	325.983	9		
Вторая реперная масса:	463.974	3		
Режим сканирования:	Селективное	детектирование	положительно	заряженных
ионов в диапазоне	[ 325.9839	-463.9743]		

Таблица 9(Продолжение)

Сегмент 4	
Начало сканирования (мин	ı): 11.50
Первая реперная масса:	313.9839
Вторая реперная масса:	575.9679
Режим сканирования:	Селективное детектирование положительно заряженных
ионов в диапазоне [ 313.98	39-575.9679]
Сегмент 5	
Начало сканирования (мин	ı): 14.00
Первая реперная масса:	425.9775
Вторая реперная масса:	613.9679
Режим сканирования:	Селективное детектирование положительно заряженных
ионов в диапазоне	[ 425.9775-613.9679]

Отношение массы к заряду характиристичных ионов, детектированных магнитным масс-спектрометром с электронной ионизацией представлены в таблице 10.

**Таблица 10** Отношение массы к заряду характеристичных ионов, детектированных магнитным масс-спектрометром с двойной фокусировкой

N⁰		TMC-	Отношение массы к заряду
п/п	Определяемое соединение.	производные	детектируемых ионов, m/z
1	5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он	Бис-О-ТМС	417.26451, 432.28798,
1			433.2958
2	17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α-	Бис-О-ТМС	343.2457, 358.2688, 448.3193
2	диол		
2	1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17-он	Бис-О-ТМС	341.22925, 431.28015,
3	-		446.30360
1	17α- гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он	Бис-О-ТМС	450.3344, 435.31091,
4			360.28429, 345.26082
5	17α-метил-5β-андростан-3α,17β-диол	Бис-О-ТМС	412.22483, 322.17474,
5			323.17865
6	4-хлороандрост-4-ен-3α-17-он		431.28015, 451.22552,
0			466.24900
7	17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α-	Моно-О-ТМС	363.23554, 364.23890,
/	андростан-3-он		378.2584
Q	17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5α-	Моно-О-ТМС	363.23554, 364.23890,
0	андростан-3-он		378.2584
0	4,17β-дигидрокси-17α-метиландрост-	Трис-О-ТМС	535.3414, 519.31458,
7	4-ен-3-он		534.33806
10	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-	Бис-О-ТМС,	560.3650, 545.3415, 471,3221,
10	пиразол-3',17β-диол	N-O-TMC	520.3642

#### 2.5.2 Тандемная масс-спектрометрия с электронной ионизацией

Температура в камере ионизации достигала 250 °С. Энергия электронов составляла 70 эВ. Газом-мишенью для диссоциации, индуцированной соударениями, служил гелий. Отношение массы к заряду характиристичных фрагментных ионов, детектированных тандемным масс-спектрометром с электронной ионизацией приведены в табл. 11.

**Таблица 11** Отношение массы к заряду характиристичных фрагментных ионов, детектированных тандемным масс-спектрометром

№ п/п	Определяемое соединение	ТМС- производные	Энер гия соудар ений	Массы изолир ованны х ионов	Отношение массы к заряду детектированны х ионов, m/z
1	5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он	Бис-О-ТМС	1.3	417	327, 237, 417
2	17β-метил-5β-андрост-1-ен- 3α,17α-диол	Бис-О-ТМС	1.2	358	301, 343, 358
3	1-метилен-5α-андростан-3α- ол-17-он	Бис-О-ТМС	1.2	431	251
4	17α- гидроксиэстра-4,9,11- триен-3-он	Бис-О-ТМС	1.2	307	275, 293, 307
5	17α-метил-5β-андростан- 3α,17β-диол	Бис-О-ТМС	1.4	435	255, 345
6	4-хлороандрост-4-ен-3α-17-он		1.2	451	415, 451, 361
7	17α-гидрокси-17β-метил-2- окса-5α-андростан-3-он	Моно-О-ТМС	0.9	363	213, 273, 363
8	17β-гидрокси-17α-метил-2- окса-5α-андростан-3-он	Моно-О-ТМС	0.9	363	213, 273, 363
9	4,17β-дигидрокси-17α- метиландрост-4-ен-3-он	Трис-О-ТМС	1.5	534	389, 444, 534
10	17α-метил-5α-андростано-[3,2- с]-пиразол-3',17β-диол	Бис-О-ТМС, N-О-ТМС	1.8	545	455, 545

Для всех изолированных ионов время изоляции ионов-предшественников не превышало 16 мс, а время возбуждения - 30 мс.

#### 2.6 Подготовка проб для скрининговых процедур

Исследуемые пробы мочи готовили в соответствии с методикой, описанной работе с незначительными изменениями [209, 210]. Вкратце, 1 мл фосфатного

буфера (0.8 М, рН 6.3), содержащий 3 % В-глюкуронидазы и 1.5 µг метилтестостерона, используемого в качестве внутреннего стандарта добавлялся в 3 мл мочи. После интенсивного встряхивания смесь помещали на 60 мин. в термостат, в котором осуществлялся ферментативный гидролиз при температуре 55 °C. Затем в смесь добавляли 1 мл карбонатного буфера (15 %-ный раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ KHCO<sub>3</sub> в соотношении 1/1, pH 10). После ферментативного гидролиза глюкуронидов определяемые биорегуляторы интенсивным встряхиванием эфиром экстрагировались диэтиловым (5 мл) В присутствии  $Na_2SO_4$ , используемого в качестве высаливателя. Затем пробирку со всем содержимым центрифугировали при 3200 об./мин. в течение 4 мин. После этого водный слой замораживали в низкотемпературной ванне при температуре -30 °C. Отделяли органический слой, подкисляли 50 µл 5 М раствора уксусной кислоты в этилацетате и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток перерастворяли в 0.1 мL элюента (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 30/70)

#### 2.7 Прием препаратов добровольцами и отбор проб мочи

#### 2.7.1 Прием препарата Оксандролона

Здоровый мужчина, 42 лет, принимал первые 5 дней по 10 мг оксандролона утром и вечером. С 6-го по 10-й день доброволец принимал по 20 мг оксандролона утром и вечером. С 11-го по 15-й – снова по 10 мг оксандролона утром и вечером. После этого прекратился прием оксандролона. Первоначальный протокол исследований предполагал отбор пробы мочи начался через 4 дня после окончания приема препарата и закончился через 2 недели после прекращения приема оксандралона.

#### 2.7.2 Прием препарата Parabolan

Здоровый мужчина, 47 лет, принимал два раз в день 12.5 мг (полкапсулы) препарата Parabolan (ацетат тренболана), производимого British Dragon (Таиланд). Протокол исследований предполагал прием одной капсулы в день в течение 5 дней и отбор пробы мочи через две недели после окончания приема препарата.

# 3.1 Изучение матричных эффектов в условиях электрораспылительной ионизации

Из литературных данных известно, что матричнный эффект, наблюдаемый в условиях электрораспылительной ионоизации, негативно сказывается на чувствительность метода ВЭЖХ-МС в целом. Поэтому было необходимо оценить степень этого влияния на детектирование ультрамалых количеств ФАВ в сложных по составу смесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/орбитальной ионной ловушки. Матричный эффект оценивали по формуле:

$$M_E = 100\% - \frac{I_S}{I_M} \times 100\%, \tag{6}$$

где

*М*<sub>*E*</sub> – матричный эффект

*I<sub>m</sub>* – площадь масс-хроматографического пика определяемого соединения, при анализе модельной смеси.

*I<sub>s</sub>* – площадь масс-хроматографического пика определяемого соединения, при анализе конечного экстракта мочи (в обоих смесях концентрации определяемых соединений идентичны).

Результаты оценки матричных эффектов при использовании методов ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР приведены на рисунке 4:



Рисунок 4. Наблюдаемые матричные эффекты при использовании методов ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР (n=3, P=0.95).

Из рисунка 4 видно, что при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС значение матричного эффекта лежит в диапазоне 54-89 % в зависимости от соединения. В данном случае мы имеем дело с широко описанным в литературе матричным эффектом, связанным с подавлением ионизации компонентами матрицы. С другой стороны при использовании метода ВЭЖХ-МСВР с ионизацией электрораспылением мы также наблюдаем матричный эффект, но в данном случае он на 30-40% превосходит эффект, наблюдаемый при применении метода ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией. Наблюдаемый матричный эффект при применении метода ВЭЖХ-МСВР с электрораспылительной ионизацией нельзя объяснить одним подавлением ионизации компонентами матрицы, так как в обоих методах использовали идентичный источник ионов и идентичные условия хроматографического разделения. Можно предположить, что в отличие от ВЭЖХ-МС/МС падение отклика может быть вызвано ограниченной емкостью Словушки (она не может удержать более 5×10<sup>6</sup> зарядов), используемой для фокусировки пакетов ионов, непрерывно направляемых в орбитальную ионную ловушку. В нашем случае, преимущественное заполнение С-ловушки ионами

мешающих компонентов матрицы приводит к уменьшению времени накопления всех ионов и к снижению скорости заполнения С-ловушки ионами определяемых соединений. В данном случае с уменьшением времени накопления ионов только незначительная доля ионов определяемых соединений попадает в С-ловушку. При этом важно отметить, что С-ловушка является интегральной и неотъемлемой частью орбитальной ионной ловушки. Используемый нами в исследованиях гибридный хромато-масс-спектрометр, представляющий собой орбитальную ионную ловушку, сопряженную с линейной ионной ловушкой, дает нам возможность проверить эту гипотезу. Для этого нам достаточно выполнить анализы вышеупомянутого экстракта, изменяя диапазоны сканировния масс линейной ионной ловушки. Другими словами, линейная ионная ловушка используется для изолирования отдельных ионов, направляемых в ОЛ. Изменение сканирования линейной ионной ловушки моделирует диапазона процесс детектирования методом ВЭЖХ-МС/МС и создает условия, препятствующие С-ловушке. накоплению ионов мешающих компонентов В Ha рис. 5 представлены результы влияния изменения диапазона сканирования на наблюдаемый матричный эффект.



Рисунок 5. Наблюдаемые матричные эффекты при использовании метода ВЭЖХ-МСВР с различными режимами сканирования, (n=3, P=0.95).

Из рис. 5 видно, что матричный эффект, наблюдаемый при сопряжении линейной ионной ловушки с орбитальной в режиме изоляции отдельных ионов (узкий диапазон сканирования), не отличается более, чем на 10 % от матричного эффекта, наблюдаемого в случае применения метода ВЭЖХ-МС/МС. Таким образом, подтверждается гипотеза о роли С-ловушки в анализе сложных по составу матриц методом ВЭЖХ-МСВР с орбитальной ионной ловушкой. Из этого следует, что подходы, направленные на увеличение «концентрации» ионов определяемых соединений в С-ловушке, должны неизбежно привести к улучшению их пределов обнаружения при анализе сложных по составу смесей. К сожалению, с уменьшением диапазона сканирования предлагаемый диссертантом подход перестает охватывать широкий круг ФАВ. Всвязи с этим необходимы эффекта. альтернативные подходы снижению матричного Учитывая к наблюдаемый матричный эффект для быстро элюируемых соединений, хроматографическое разделение стало одним из подходов к уменьшению «концентрации» ионов мешающих компонентов в С-ловушке и снижению компонентами матрицы. На рис. подавления ионизации 6 представлены результаты влияния условий хроматографического разделения на наблюдаемый матричный эффект.

96



Рисунок 6 Наблюдаемые матричные эффекты при использовании метода ВЭЖХ-МСВР с различными программами градиентного элюирования в условиях электрораспылительной ионизации, (n=3, P=0.95).

Из рисунка 6 видно, что оптимизация хроматографического разделения приводит к уменьшению матричного эффекта для всех модельных соединений. Однако его значение продолжает оставаться высоким (более 50 %). В среднем его удалось уменьшить в 1.5 раза.

# 3.2 Определение метаболита орал туринабола в реальных образцах мочи методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР)

Опираясь на полученные результаты, был апробирован вышеописанный подход для обнаружения основного метаболита орал туринабола (ббетагидрокси-4-хлордегидрометилтестостерона) в биологической жидкости (моче) методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР) [198]. Постановка задачи была обусловлена необходимости рекомендацией ВАДА 0 использовать альтернативные подтверждающие методы анализа при определении 6β-гидрокси-4хлордегидрометилтестостерона (метаболит Орал Туринабола) в моче. Несмотря на непрекращающийся интерес исследователей к ВЭЖХ-МС/МС(ИЭР) [160], как

проблему обнаружения к подходу, позволяющему решить «труднодериватизируемых» соединений, данный метод не лишен недостатков. Важным ограничением данного метода остается трудоемкая процедура выбора характеристичных ионов и поиска оптимальных условий для детектирования селективных переходов. Для преодоления данного ограничения автором настоящей работы было предложено изучить возможность применения метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ионизацией электрораспылением. Беря в расчет стоимость оборудования и сложность его эксплуатации, пришлось в самом начале поисков отказаться от масс-анализатора с ионно-циклотронного резонанса, несмотря на разрешение, достигаемое с использованием данного подхода. Поиски подходов достижения высокого и сверхвысокого разрешения привели к выбору орбитальной ионной ловушки, предложенной Макаровым [185]. Несмотря на ограничение, связанное с емкостью масс-анализатора, важным преимуществом данного подхода является удачное сочетание скорости сканирования и высокого разрешения, обеспечивающего достижения высокой точности измерения m/z, a также возможность ее сочетания с ультраэффективной хроматографией. В отличие от классических масс-анализаторов в ОЛ ионы удерживаются в электростатическом поле. Оказывая в электростатическом поле ионы совершают одновременно вращательные движения и продольные колебания вокруг и вдоль центрального электрода соответственно. Своими продольными колебаниями вдоль центрального электрода Частота этих колебаний вдоль центрального электрода, возведенная в квадрате, обратно пропорциональна m/z. Хотя ОЛ успешно применялась для решения задач протеомики, до начала работ автора не проводились исследования, посвященные обнаружению низкомолекулярных соединений (до 500 Да) в сложных по составу смесях, с использованием данного подхода. Таким образом, опираясь на подход снижения матричного эффекта с использованием хроматографического разделения, было изучена возможность ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР) применения обнаружения метаболита 4-ДЛЯ хлордегидрометилтестостерона [198]. Для достижения поставленной цели использовали основанный на выборе оптимальный программы подход,

98

позволяющей уменьшить эффект градиентного элюирования, матрицы, обусловленный ограниченной емкостью С-ловушки и подавлением ионизации определяемых соединений компонентами матрицы. Метаболизм и структура 4хлордегидрометилтестостерона представлены на рис. 7 [131]. Хотя к началу работы автора было известно два основных метаболита 4хлордегидрометилтестостерона, только для одного метаболита (ббета-гидрокси-4хлородегидрометилтестостерон) был коммерчески доступен стандартный образец. метаболита 4-хлородегидрометилтестостерона, полученный Масс-спектр с использованием метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР) представлен на рис. 8.



Рисунок 7 Метаболизм и структура 4-хлордегидрометилтестостерона [131]



Рисунок 8 Масс-спектр метаболита Орал туринабола, полученный методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР)

Как видно из рис.8, основными характеристичными ионами являются протонированный и катионированный ион  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ , а также фрагментный ион  $[M+H-H_2O]^+$  с m/z, равными 351.1723, 333.1616, 373.1541 а.е.м. соответственно. Согласно требованиям ВАДА к подтверждающим методам анализа в масс-спектре определяемых соединений должны присутствовать не менее трех характеристичных иона. При этом разброс отношений интенсивностей пиков в масс-спектре должен соответствовать критериям, приведенным в табл. 1. Применение ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с использованием пиков изотопных ионов при построении масс-хроматограмм позволило без труда выполнить установленные критерии. Теоретические и точно измеренные m/z, относящаяся к изотопным пикам  $[M+H]^+$  метаболита орал туринабола представлены в приведены в табл. 12.

**Таблица 12** Измерение точных m/z пиков изотопных ионов [М+Н]<sup>+</sup> метаболита 4хлородегидрометилтестостерона, [198]

Диагностические ионы	Теоретические m/z, Да	Измеренная m/z, Да
$^{12}\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{28}\mathrm{O}_{3}{}^{35}\mathrm{Cl}^{+}$	351.1732	351.1723
${}^{13}\mathrm{C}{}^{12}\mathrm{C}{}_{19}\mathrm{H}_{28}\mathrm{O}_{3}{}^{35}\mathrm{Cl}{}^{+}$	352.1760	352.1756
${}^{12}C_{20}H_{28}O_3{}^{37}Cl^+$	353.1702	353.1693

Из таблицы 12 видно, что точность измерения m/z при использовании метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с разработанными условиями обнаружения лучше, чем 2 ррт. На втором этапе оценивали предел детектирования метаболитов изучаемого синтетического стероида основе на массхроматограммам для пиков изотопных ионов. Процедура оценки предела детектирования заключалась в анализе модельной смеси, содержащей метаболит исследуемого ФАВ. Концентрация метаболита в метанольной смеси составляла 1000 пг/мкл. Масс-хроматограммы метанольной смеси, содержащей метаболит исследуемого синтетического стероида с концентрацией 1 нг/мкл приведены на рис. 9.



**Рисунок 9** Масс-хроматограммы метанольной смеси с метаболитом 4хлородегидрометилтестостерона, полученные с использованием ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР): **А** – масс-хроматограмма для m/z= 351.1723, **Б** – массхроматограмма для m/z=352.1756, **В** – масс-хроматограмма для m/z= 353.1693.

Таким образом, был оценен предел детектирования метаболита 4хлородегидрометилтестостерона, который составил  $1.3 \times 10^{-12}$ г. Массхроматограммы, полученные при использовании оптимальной программы градиентного элюирования, экстракта из мочи спортсмена, принимающего Орал Туринабол, представлены на рис.10.



Рисунок 10 Масс-хроматограммы мочи, содержащей метаболит 4хлородегидрометилтестостерона, полученной при использовании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР): А – масс-хроматограмма по ПИТ, Б – масс-хроматограмма для m/z= 351.1723, В – масс-хроматограмма для m/z=352.1756, Γ - массхроматограмма для m/z=353.1693.

Из рис. 10 видно, что отношения высот основных хроматографических пиков 6β-гидрокси-4-хлородегидрометилтестостерона на масс-хроматограммах модельной смеси и реальной пробы практически совпадают (в пределах разбросов, установленных ВАДА).

Таким образом, выбранная в ходе исследовании матричного эффекта, оптимальная программа градиентного элюирования позволяет достичь высокочувствительного детектирования метаболита 4хлородегидрометилтестостерона в биологической жидкости методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ИЭР).

На данном этапе основным результатом стало открытие матричного эффекта, характерного для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ. Он был открыт после сравнения матричного эффекта, наблюдаемого при определении стероидов в моче методами ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в условиях электрораспылительной

103

ионизации, где значение матричного эффекта было аномально высоким во втором случае (на 30-40 % выше, чем в первом). Это нельзя было объяснить одним подавлением ионизации компонентами матрицы. Предположительно, падение отклика было вызвано с ограниченной емкостью С-ловушки (она не может удержать более 5×10<sup>6</sup> зарядов). Будучи неотъемлемой частью ОЛ, она используется для фокусировки пакетов ионов, непрерывно направляемых в саму орбитальную ионную ловушку. Для оценки матричного эффекта, характерного для ОЛ, было предложено ее использовать в тандеме с линейной ионной ловушкой, позволяющей направлять в ОЛ ионы с заданным m/z. Матричный эффект, наблюдаемый при сопряжении линейной ионной ловушки с орбитальной в режиме изоляции отдельных ионов, не отличается более, чем на 10 % от матричного эффекта, наблюдаемого в случае применения метода ВЭЖХ-МС/МС. Открытие самого матричного эффекта, характерного для ОЛ, а также способа его оценки способствовали поиску подходов к его минимизации. Была изучена применения хроматографического подхода возможность к минимизации матричного эффекта, наблюдаемого в условиях ионизации электрораспылением. Хотя удалось уменьшить значение матричного эффекта в среднем в 1.5 раза данным подходом, его значение продолжало оставаться высоким ЛЛЯ физиологически большинства исследованных активных соединений [183]. Поэтому на данном этапе исследований оставался актуальным поиск других подходов, приводящих к уменьшению матричного эффекта, обусловленного ограниченной емкостью С-ловушки и подавлением ионизации компонентами матрицы.

#### ГЛАВА 4 ВЭЖХ-МСВР/ОЛ В СОЧЕТАНИИ С ХИАД

#### 4.1 Исследование матричного эффекта в условиях ХИАД

Исследования, проведенные в условиях ИЭР показали, что минимизация матричного эффекта, основанная на оптимизации условий хроматографического разделения, не решает проблему быстрого скрининга большого числа ФАВ, присутствующих в ультрамалых количествах в сложных по составу смесях. Поэтому, несмотря на успешное применение подхода данного при детектировании 6β-гидрокси-4-хлородегидрометилтестостерона в моче, поиск подходов к снижению матричного эффекта альтернативных продолжали оставаться актуальными. Следующим подходом стал подход, основанный на применении химической ионизации при атмосферном давлении. Поскольку при ионизации отсутствует конкуренция ЭТОМ способе между аналитами за приобретение заряда в отличие от электрораспылительной ионизации, можно предположить, что ограничения ВЭЖХ-МС, связанные с матричными эффектами, ассоциированные с подавлением ионизации компонентами матрицы, могут быть преодолены, и они не будут препятствовать скринингу ультрамалых количеств ФАВ в сложных по составу смесях. Опираясь на результаты, демонстрирующие возможность уменьшения матричного эффекта через выбор оптимальной программы градиентного элюирования, было решено соединить эти два подхода. Для количественной оценки матричного эффекта использовали формулу 6. На представлены результаты исследования матричного эффекта при рис. 11 различных программах градиентного элюирования в условиях ХИАД.



Рисунок 11 Наблюдаемые матричные эффекты при использовании метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) с различными условиями хроматографического разделения, (n=3, P=0.95).

Из рис. 11 видно, что в условиях ХИАД значение матричного эффекта без выбора оптимальной программы градиентного элюирования составляет от 17% до 32% в зависмости от соединения. В свою очередь, оптитимизация программы градиентного элюирования привела к дальнейшему уменьшению матричного эффекта в 2-3 раза в зависимости от соединения. Для установления матричного эффекта, обусловленного ограниченной емкостью С-ловушки, было выполнено сканирование в узком и широком диапазоне масс. Задавая «окно» для сканирования в узком диапазоне масс, руководствовались m/z протонированных На рис. соединений. молекул модельных 12 представлены результаты исследования матричного эффекта при различных режимах сканирования в условиях ХИАД с использованием оптимальной программы градиентного элюирования.

106



Рисунок 12 Матричные эффекты при использовании метода ВЭЖХ-МСВР с различными режимами сканирования в условиях ХИАД с оптимальной программой градиентного элюирования, (n=3, P=0.95).

Из рис. 12 видно, что изменение режима сканирования не сказалось на наблюдаемый матричный эффект. Это свидетельствует о том, что сочетание ХИАД с выбором оптимальной программы градиентного элюирования позволяет избежать «перегрузки» С-ловушки. Из этого следует, что селективность ионизации определяемых соединений в сочетании с эффективностью разделения могут быть применены для минимизации матричного эффекта, обусловленного ограниченной емкостью орбитальной ионной ловушки. Таким образом, были созданы предпосылки для изучения возможности применения ВЭЖХ-МСВР с ХИАД для анализа сложных по составу экстрактов из биологических образцов.

Сегодня, когда необходимо уйти от трудоемкой процедуры очистки экстрактов в процедурах скрининга, прибегают к газовой хромато-массспектрометрии с использованием квадрупольных масс-анализаторов, применяемых в режиме селективного детектирования ионов [159]. Однако, обнаружению ультраследовых количеств ФАВ и их метаболитов данным методом мешает высокий уровень химического шума, характерный для данного метода. Для решения этой проблемы было предложено использовать ГХ-МС/МС или ГХ-МСВР. Однако, несмотря на высокую чувствительность и селективность этих методов, скрининг ФАВ с его применением всегда ассоциируется со стадией дериватизации, ограничивающей универсальность данного подхода. Поэтому возник интерес к ВЭЖХ-МС/МС. Хотя ВЭЖХ-МС/МС не лишена недостатков (высокая стоимость оборудования и невысокая эксплуатационная надежность по газовой хроматографией/масс-спектрометрией), сравнению с она имеет существенное преимущество перед ранее упомянутыми методами. Она не нуждается в стадии дериватизации. Это преимущество позволяет расширить круг определяемых соединений и значительно сократить время, затраченное на анализ. Таким образом, благодаря сочетанию жидкостной хроматографии с массспектрометрией в значительной мере повышается экспрессность определения термолабильных ΦAB. Сегодня в аналитической практике лаборатории применяют в основном жидкостную хроматографию в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. При этом, в качестве масс-анализаторов чаще всего используют тройные квадруполи. В этом случае, для достижения высокой чувствительности, аналитики регистрируют только селективные переходы. Это приводит к тому, что детектируется ограниченное число соединений. Кроме того, после утилизации пробы пропадает возможность ретроспективного исследования проб. С этой точки зрения перспективным представляется применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с орбитальной ионной ловушкой, создающей предпосылки для ретроспективного анализа за счет полного сканирования с точным измерением масс [212]. Однако, перед тем, как изучить целесообразность применения ВЭЖХ-орбитальной ионной ловушки с ХИАД в процедурах скрининга необходимо было сопоставить чувствительность предлагаемого метода с широкоиспользуемой в допинговом контроле тандемной хромато-масс-спектрометрией с электрораспылительной ионизацией. Для этого
были выбраны экземестан и его метаболиты. Выбор был обусловлен, прежде всего, их эффективностью ионизации в условиях ионизации электрораспылением. Другими словами, в таких условиях тандемная хромато-масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией использовалась на пределе возможностей метода.

#### 4.2 Определение веществ с антиэстрогенной активностью в моче методами ВЭЖХ-МС/МС(ИЭР) и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)

Экземестан (6-метиланандроста-1,4-диен-3,17-дион, рис. 13 (I)) – препарат, обладающий антиэстрогенными свойствами. Эти свойства проявляются через подавление трансформации андрогенов в эстрогенов через связывание с изоформой цитохрома P-450 ароматазой. В клинике он применяется для ингибирования изоформы цитохрома P-450 ароматазы пациентками с раком молочной железы. Основным продуктом биотрансформации вышеупомянутого ФАВ является 17β-дигидроэкземестан (6-метиланандроста-1,4-диен-17β-ол-3-он, рис.9 (II)) [126].



Рисунок 13 Структурные формулы экземестана (I) и 17-дигидроэкземестана (II).

Этот препарат также активно начали применять на спортивных состязаниях, где его используют с целью избежать осложнения, связанные с приемом синтетических стероидов. В настоящее время они служат биомаркерами, которые позволяют установить факт приема синтетических стероидов, используемых для улучшения результатов спортивных соревнований. Поэтому существует острая потребность у клинических и биоаналитических лабораторий в быстрых способах обнаружения антиэстрогенных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях.

До последнего времени для их обнаружения применяли метод ГХ-МС с электронной ионизацией в режиме детектирования положительно заряженных селективных ионов в сочетании с дериватизацией. Вместе с тем, экземестан и его метаболиты относятся к «труднодериватизируемым» соединениям. Поэтому актуальным остается поиск альтернативных подходов их обнаружения, предполагающих отсутствие этапа дериватизации и трудоемкую процедуру выбора селективных переходов.

С возникновением орбитальной ионной ловушки [185] появилась альтернатива ВЭЖХ-МС/МС – масс-спектрометрия высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР). При его использовании теоретически нет ограничений к числу детектируемых соединений в отличие от ВЭЖХ-МС/МС. Кроме того, он обладает еще одним важным преимуществом перед ВЭЖХ-МС/МС с точки зрения временных затрат на разработку способов анализа. Другими словами, при его применении нет необходимости в трудоемкой процедуре выбора оптимальных селективных переходов для достижения высокой селективности определения.

Учитывая рекомендации ВАДА о необходимости использовать альтернативные подтверждающие процедуры, была изучена возможность определения ультрамалых количеств антиэстрогенных веществ и их метаболитов в моче с применением ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) и ВЭЖХ-МС/МС [199].

При выполнении подтверждающих анализов биоаналитические лаборатории учитывают критерии идентификации, представленные в табл. 1.

110

Вместе с тем их соблюдение возможно только при наличии не менее трех диагностических ионов в масс-спектре идентифицируемого соединения.

Выбор диагностических ионов и условий столкновительной диссоциации опирался на данные, полученные в ходе прямого и непрерывного ввода метанольного раствора каждого определяемого соединения с использованием шприцевого насоса. Концентрация определяемых соединений составляла 5000 нг/мл. В качестве родительских ионов использовали [M+H]<sup>+</sup>с m/z 297 и 299 Да, соответственно. Энергию столкновений варьировали от 5 до 40 эВ. В качестве газа для инициирования столкновительной диссоциации использовали аргон. Критерием выбора оптимальной энергии соударений была высота пиков диагностических ионов. Выбирались диагностические ионы, высота пиков которых выше, чем 10% от высоты пика основного иона. В результате проведенных исследований В качестве оптимального значения энергии соударений для большинства переходов было выбрано 10 эВ. На рис. 14 диссоциации, представлены масс-спектры индуцированной продуктов соударениями, протонированных молекул исследуемого антиэстрогена и его метаболита.

Из рис. 14 видно, что в результате диссоциации, индуцированной соударениями, наблюдаются интенсивные пики с m/z 279 для исходного соединения и m/z 281 для его метаболита. Вероятнее всего, эти пики принадлежат фрагментному иону, образованному в результате потери воды протонированной молекулой, выбранной в качестве родительского иона. Для определения исследуемого антиэстрогена с использованием селективных переходов были выбраны диагностические ионы с m/z 121, 149 и 279. В свою очередь для определения его метаболита были выбраны ионы с m/z 281, 135 и 91.

ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) Для В качестве диагностических ионов продукты диссоциации, индуцированной столкновениями использовали В ионов, протонированных молекул определяемых соединений. источнике Эксперименты, направленные на поиск оптимальной энергии столкновений показали, что энергия равная 30 эВ, является оптимальной для столкновительной

диссоциации в источнике ионов. Масс-спектры исследованного антиэстрогена и его метаболита, полученные с использованием ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) представлены на рис. 15.



Рисунок 14 Масс-спектры продуктов столкновительной диссоциации протонированной молекулы 6-метиланандроста-1,4-диен-3,17-диона (1) и его метаболита (2), полученные с использованием ВЭЖХ–МС/МС(ИЭР) в режиме полного сканирования дочерних ионов.





Из рис. 15 видно, что наиболее интенсивные пики при использовании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) также принадлежат протонированным молекулам определяемых соединений с m/z 297,1854 и 299,2004. Вторые по интенсивности пики принадлежат характеристичным ионам образующимися в результате отрыва

молекулы воды: m/z 279,1883 для 6-метиланандроста-1,4-диен-3,17-диона и m/z 281,1901 для его метаболита. Достигнутое разрешение дало возможность также применить в качестве диагностических изотопные ионы с m/z 298,1883 для 6-метиланандроста-1,4-диен-3,17-диона и с m/z 300,2039 для его метаболита. Кроме того, для экземестана были выбраны дополнительные ионы с m/z 121,1008 и 149,0959. Более того, фрагментный ион 17-дигидроэкземестана с m/z 135,0802 также оказался селективным и также использовался в дальнейшем как дополнительный.

Для сравнения подходов исследовали образцы мочи, содержащие 6метиланандроста-1,4-диен-3,17-дион и его метаболита, методами ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-МС/МС. При сравнении учитывали такие параметры, как предел и селективность обнаружения искомых соединений. Все исследования проводились которые являются условиях, оптимальными для каждого подхода. В Специфичность обоих способов определения 17экземестана И дигидроэкземестана оценивали по результатам анализа 10 холостых проб. Аналитические характеристики предложенных подходов представлены в табл. 13.

**Таблица 13** Аналитические характеристики способов определения экземестана и 17β-дигидроэкземестана: предел обнаружения (χ, нг/мл), степень извлечения из биожидкости человека (γ, %) и время удерживания (τ, мин) (n=3, *P*=0.95)

Соединение	Метод	χ	γ	τ
Экземестан	ВЭЖХ-МСВР	2.5	83	5.8
	ВЭЖХ-МС/МС	1	83	9.9
17-	ВЭЖХ-МСВР	2.5	91	6.3
дигидроэкземестан	ВЭЖХ-МС/МС	1	92	10.3
Метилтестостерон	ВЭЖХ-МСВР	_	_	6.3
	ВЭЖХ-МС/МС			10.3

Степень извлечения экземестана из биологической жидкости человека составила 83%, 17-дигидроэкземестана – 91%. Предел обнаружения веществ методами ВЭЖХ/МСВР и ВЭЖХ-МС/МС сопоставимы друг с другом. Высокая чувствительность, достигнутая с применением ВЭЖХ/МСВР в условиях ХИАД, открывает новые возможности альтернативного обнаружения трудноопределяемых соединений. В частности, к таким соединениям относится оксандролон.

# 4.3 Определение 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол и его метаболита в моче методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)

17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол (Оксандролон) принадлежит к группе «труднодетектируемых» соединений для высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии. Проблемы с детектированием 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3он-17бета-ола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии можно объяснить сложностями с выбором диагностических ионов, обеспечивающих достоверную идентификацию.

Хотя 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол был синтезирован в прошлом веке, пути его биотрансформации до сих пор остаются малоизученными[135]. К началу настощей работы был известен только один относительно «долгоживущий» метаболит вышеупомянутого ФАВ. Речь идет о его 17альфа-эпимере. Поэтому в настоящее время современные лаборатории продолжают использовать метод газовой хроматографии/масс-спектрометрии в режиме селективного детектирования ионов для обнаружения 17альфа-метил-2окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол И его основного метаболита. При применении метода ГХ-МС в режиме селективного детектирования ионов предел обнаружения 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ола И его основного метаболита составляет от 0.002 до 0.01 мкг/мл. Таким образом, актуальным является поиск подходов, обеспечивающих быстрое обнаружение вышеупомянутого ФАВ. Важным требованием к альтернативному подходу является отсутствие длительного этапа подготовки образцов к анализу. Кроме достигаемая при использовании того, чувствительность, альтернативного подхода, должна обеспечить возможность обнаружения 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ола и его метаболита после прекращения его приема.

В таком контексте, привлекательным представляется подход, основанный на применении ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)[185]. Здесь важно подчеркнуть, что к началу настоящей работы метод использовался как правило для решения задач протеомики [197]. До начала работ автора отсутствовали исследования, посвященные обнаружению низкомолекулярных соединений в сложных по составу смесях данным методом. Поэтому целью настоящей работы стало изучение эффективности метода ВЭЖХ/орбитальной ловушки с ХИАД для

116

обнаружения оксандролона и его метаболита в моче после прекращения приема препарата [179].

Для исследования потенциала метода ВЭЖХ/орбитальной ловушки при детектировании оксандролона и его метаболита после прекращения приема анализировали мочу добровольца принимающего Оксандролон.

Масс-спектры 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ола и его метаболита, полученные методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) представлены на рис.16 и рис. 17 соответственно.



Рисунок 16 Масс-спектр оксандролона, [179]





Из рис. 16 и 17 видно, что условия ХИАД приводят к образованию протонированных молекул  $[M+H]^+$  и фрагментных ионов  $[M+H-H_2O]^+$  данных соединений. Важной особенностью масс-спектров, полученных в условиях ХИАД, является отсутствие катионированных молекул. В отличие от масс-спектров, полученных в условиях ИЭР, здесь мы не наблюдаем образование ионов  $[M+Na]^+$  и  $[M+K]^+$  [156].

Учитывая, что теоретические m/z диагностических ионов ([M+H]<sup>+</sup> и [M+H-H2O]<sup>+</sup>) равны 307.2268 Да и 289.2162 Да соответственно, точность измерения m/z с использованием предлагаемого подхода составляет 2 ppm. Высокая точность измерения m/z необходима для высокоселективного обнаружения искомого ФАВ в сложных по составу биологических жидкостях в режиме полного сканирования. Важно подчеркнуть, что вышеприведенная точность измерения m/z достигается при использовании внешней калибровки по массам, исключающей загрязнение источника ионов. Для оценки предела детектирования вводили метанольный раствор оксандролона и его метаболита в инжектор хроматографа. Концентрация оксандролона и его метаболита составляла 1000 пг/мкл. На рис. 18 приведена масс-хроматограммы вышеуказанных раствора для m/z 307.2268 Да и 289.2161 Да. Эти m/z соответствуют ионам [M+H]<sup>+</sup> и [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ола и его метаболита соответственно.



Рисунок 18 Масс-хроматограммы метанольного раствора 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол (t<sub>уд.</sub>=7.67 мин.) и 17бета-метил-2-окса-5альфаандростан-3-он-17бета-ола (t<sub>уд.</sub>=8.98 мин.), полученные с использованием ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД): А – масс-хроматограмма для m/z=307.2268 а.е.м., Б – массхроматограмма для m/z= 289.2161 а.е.м., [179]

Учитывая, S/N 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-ончто ДЛЯ 17бета-ола и 17бета-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ола составляли 38000 и 100000 соответственно, их расчетный предел обнаружения в моче 0.003 нг/мл и 0.001 нг/мл соответствует соответственно. Расчитывая потенциальный предел обнаружения учитывали коэффициент концентрирования, получаемый в ходе концентрирования. Таким образом, теоретически предел обнаружения искомых ФАВ с использованием предлагаемого метода на 3 порядка лучше, чем при использовании ГХ-МС в в режиме селективного детектирования ионов. Другим важным преимуществом предлагаемого метода является возможность вводить 1/5 часть экстракта в отличие от метода ГХ-МС. Массхроматограммы мочи пациента, принимавшего препарат, содержащий 17альфаметил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол, приведены на рис.19.



Рисунок 19 Масс-хроматограммы мочи пациента, принимавшего препарат, содержащий 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол, полученные при использовании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) для m/z=307.2268 Да: А – отобранной в день прекращения приема, Б, В, Г, Д, Е – спустя 4, 6, 8, 10 и 14 дней соответственно после прекращения приема Ж, З, И, К, Л, М – масс-хроматограммы по суммарному ионному току для экстрактов; А, Б, В, Г, Д и Е, [179]

Как видно из рис. 19, несмотря на то, что пациент перестал принимать препарат две недели назад, удалось обнаружить нативный компонент и его метаболит в моче без какого либо влияния мешающих компонентов. Уменьшение концентрации определяемых соединений в 300 раз в моче не повлияло на обнаружения биологической жидкости. Оценочное селективность их В содержание 17альфа-метил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ол и 17бетаметил-2-окса-5альфа-андростан-3-он-17бета-ола в моче пациента спустя две недели после прекращения приема препарата составляло 0.33 нг/мл. Таким образом, благодаря высокой точности определения масс, разрешению И

минимизации матричного эффекта, достигается высокоселективное определение оксандролона и его основного метаболита в анализируемой матрице сложного состава. При этом оксандролон и эпиоксандролон были обнаружены через 14 дней после прекращения приема оксандролона. Применение ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) позволяет сделать однозначное заключение о присутствии оксандролона и его метаболита при полном сканировании. Таким образом, была показана комплементарность метода ВЭЖХ-МСВР/ОИ в условиях ХИАД в решении задач скрининга.

## 4.4 Изучение фрагментации агонистов PPAR в условиях столкновительной диссоциации методами ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)

Чувствительность, достигнутая благодаря сочетанию ВЭЖХ-МСВР-ОИ с ХИАД, открыла новую возможность для изучения и оптимизации условий индуцированной соударениями, ΦΑΒ [205]. Изучение диссоциации, диссоциации, индуцированной соударениями, протонированных молекул ФАВ является необходимой процедурой при разработке способа их определения методом ВЭЖХ-МС/МС. Эта возможность была использована для изучения фрагментации агонистов дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом в условиях столкновительной диссоциации. Рецепторы активации пролиферации (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) пероксисом группа \_ внутриядерных белков, относящихся к семейству гормональных рецепторов. Они были открыты недавно, и в течение последних лет удалось показать центральную роль PPAR в энергетическом гомеостазе организма животных и человека [200-202]. Агонисты PPAR6 проходят клинические испытания как средства для лечения ожирения и нормализации уровня холестерина и пока не имеют патентованных названий, только кодовые номера [203,206].

Каждый из PPAR управляет активностью определенного ансамбля генов, контролирующих многие процессы внутриклеточного обмена, рост, дифференциацию и апоптоз ряда клеток, а также ход некоторых патологических

процессов. PPAR являются центральными регуляторами липидного и углеводного обмена, развития и дифференциации жировой ткани, модуляторами экспрессии генов во многих тканях, включая адипоциты, эпителиальные клетки, гладкую мускулатуру, эндотелий сосудов и макрофаги. Показано, что у мышей активация PPAR типа δ стимулирует сжигание жировых клеток, являющихся энергетическим депо живых организмов [203]. Исследования показали, что активация PPAR6 специфически индуцирует экспрессию генов, необходимых для окисления жирных кислот и выделения энергии. Кроме того, обнаружена уникальная способность агониста PPAR6 – GW501516 (Ia) – повышать выносливость мышей посредством изменения метаболических процессов в мышечных тканях животных [204]. ВАДА включило в Запрещенный список с января 2009 все PRARδ агонисты (рис.20), подобные Ia.



**Рисунок 20** Структурные формулы допинговых препаратов нового поколения: **Ia** – GW501516, **I6** – GW0742, **II** – L-165,041

GW0742 (Іб) и L-165,041 (ІІ) обладают аналогичным свойствами с Іа. Важно отметить, что к началу настоящей работы отсутствовали данные о продуктах столкновительной диссоциации ионов-предшественников вышеупомянутых соединений. Вместе с тем, надежное и селективное обнаружение новых ФАВ и их метаболитов методом ВЭЖХ–МС/МС невозможно без рационального выбора диагностических ионов. Учитывая временные затраты, связанные с правильным выбором характеристичных ионов для скрининговой процедуры, было решено использовать сочетание двух масс-спектрометрических методов для изучения фрагментации этих соединений. Таким образом, целью данной работы явилось выявление продуктов столкновительной диссоциации ионов-предшественников, используя методы ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) [205].

В выбранных условиях электрораспылительная ионизация соединений Ia, Ib и II приводила к образованию протонированных молекул. На рис. 21а представлен масс-спектр Ia, полученный в условиях столкновительной диссоциации ионов-предшественников соединения Ia в камере соударений. В качестве ионов-предшественников выступали протонированные молекулы.



Рисунок 21 Масс-спектры соединений Ia (а,б), Iб (в,г) и II (д), полученные методом ВЭЖХ–МС/МС. Энергия столкновений в камере соударений: (а,в,д) – 20 эВ; (б) – 70 эВ; (г) – 50 эВ.

Как видно из рис. 21 фрагментация протонированной молекулы приводит к образованию нескольких характеристичных фрагментов. Можно предположить, что

124

фрагментный ион с *m/z* 257 образуется за счет разрыва связи сера – алифатический углерод, образующийся при этом катион-радикал стабилизирует систему спаренных *π*-электронов (рис. 22).



Рисунок 22 Предполагаемый путь фрагментации протонированных молекул Ia и I6 с 454 и 473 а.е.м [205, 207].

Дальнейшее увеличение энергии столкновений в камере соударений приводила к потере водорода или трифторметильного радикала из иона с m/z 257, при этом образуются характеристичные ионы с четным числом электронов и *m/z* 256 и 188, соответственно (рис. 23б). Кроме того, отрыв тиазольного кольца от фрагментного с m/z.257приводит образованию 4иона К катиона трифторметилбензилиденеамина с *m/z* 172. Таким образом, для определения соединения Іа в режиме детектирования селективных реакций с регистрацией положительных ионов переходы m/z 454  $\rightarrow m/z$  257 (30 эВ), 188 (40 эВ), 172 (60 эВ) могут быть выбраны в качестве характеристичных.

Соединение Іб отличается от Іа наличием атома фтора в кольце В. Введение группы, обладающей сильными электроноакцепторными свойствами, приводит к резкому снижению эффективности образования положительных ионов в условиях электрораспылительной ионизации. В условиях индуцированной соударениями диссоциации образуются фрагментные ионы аналогичные Іб со сдвигом по массам равным 19 а.е.м. (рис. 21 в,г, рис 22).

На рис. 21д представлен масс-спектр соединения II, полученный в условиях столкновительной диссоциации протонированной молекулы II в камере соударений. При фрагментации (регистрация положительных ионов) иона-предшественника II с *m/z* 403 в условиях индуцированной столкновениями диссоциации происходит разрыв связи кислород – алифатический углерод с образованием иона с *m/z* 235 (рис. 23).



**Рисунок 23** Постулируемая схема фрагментации протонированной молекулы соединения II с 403 а.е.м. [205]

Перераспределение заряда в цикле В и отрыв группы -СН2СН2СН3

приводит к наблюдению в масс-спектре осколочного иона с m/z 193 Да. (рис. 21д). Отщепление пропанола приводит к обнаружению в масс-спектре фрагментных ионов с m/z 177 Да и 135 Да. В свою очередь отрыв уксусного альдегида приводит к обнаружению с масс-спектре пика фрагментного иона с m/z 151 Да.

Метод ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) применяли для проверки достоверности предполагаемых путей фрагментации ионов исследуемых соединений в камере столкновений ВЭЖХ-МС/МС. Обоснованность данного подхода опиралась на предполагаемые общие механизмы столкновительной диссоциации в источнике ионов ВЭЖХ-МСВР/ОЛ и в ячейке столкновений ВЭЖХ-МС/МС. Масс-спектр ФАВ II, зарегистрированный с использованием метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД), приведен на рис.24.



Рисунок 24 Масс-спектр соединения II, полученный с использованием ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД), [205]

Из рис. 24 видно, что ионно-молекулярные реакции в источнике ионов не препятствует появлению пиков фрагментных ионов, которых мы наблюдали в масс-спектре продуктов столкновительной диссоциации ионов-предшественников исследуемого соединения. Другими словами, можно предположить, что фрагментация протонированных молекул в ячейке соударений тандемного массспектрометра и в источнике ионов протекает по одному механизму. Учитывая, что фрагментация в обоих случаях протекает по общему механизму, мы можем ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) использовать для установления достоверности постулированной схемы фрагментации. Описанный далее подход к установлению достоверности предполагаемых путей фрагментации исследованных соединений приведен в работе автора [205]: «Для этого были вычислены m/z для осколочных ионов определяемых ФАВ Ia, Iб и II, приведенных на рис. 22 и 23, которые затем сопоставляли с их точными m/z фрагментных ионов, образованных при диссоциации, индуцированной ионов, в источнике ионов для химической ионизации при атмосферном давлении масс-спектрометра»<sup>205</sup>. Рассчитанные и фрагментных экспериментально полученные точные массы ионов С постулированными структурами соединений Ia, Iб и II представлены в табл. 14.

Молекулярная формула фрагментного иона	Teop. m/z, Да	Экспер. m/z, Да	Точность измер. m/z, ppm	Постулируемая структура фрагментного иона
		I	a	
$C_{12}H_{10}F_3NS$	257.0479	257.0471	3.1	+I +S N F
C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> N	172.0368	172.0362	3.5	+ NH
$C_7H_4F_3$	145.0259	145.0253	4.1	+ F F
C7H3N	103.0416	103.0409	3.8	HN +
C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> NS	256.0402	256.0394	3.1	H + S N
$C_{11}H_{10}NS$	188.0529	188.0522	3.7	H S N
		I	б	
C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> F <sub>4</sub> NS	275.0381	275.0372	3.2	+ + N F F F F
C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> F <sub>4</sub> N	190.0279	190.0271	4.2	HN + F F
C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> FN	121.0322	121.0317	4.1	HN F

**Таблица 14** Рассчитанные и экспериментально полученные точные массы фрагментных ионов с постулированными структурами соединений Ia, Iб и II.

Молекулярная формула фрагментного иона	Teop. m/z, Да	Экспер. m/z, Да	Точность измер. m/z, ppm	Постулируемая структура фрагментного иона
••	•	]	б	
C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> F <sub>4</sub>	163.0165	163.0159	3.6	+ F F F
C11H8FNS	206.0434	206.0428	2.9	K K K K K K K K K K K K K K K K K K K
C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> F <sub>4</sub> NS	274.0308	274.0300	2.9	H S+ K F F F
	1	]		
C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub>	235.1328	235.1321	2.9	+ O OH
$C_{11}H_{13}O_3$	193.0859	193.0853	3.1	O O O H
C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	177.0910	177.0904	3.3	+ OH
C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	135.0440	135.0434	4.5	OH t
C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	151.0753	151.0747	3.9	но он

#### Таблица 14 (Продолжение), [205]

Как видно из табл. 14 теоретические и экспериментальные массы практически идентичны в пределах 5 ppm. Предложенные выше схемы фрагментации протонированных молекул агонистов PPARδ в условиях диссоциации, индуцированной соударениями, в столкновительной ячейке тандемного масс-спектрометра были автором подтверждены [205]. Другими словами, было показано, что орбитальная ионная ловушка может быть использована для изучения фрагментанции протонированных молекул ФАВ [184, 207] для выбора селективных переходов, используемых в тандемной массспектрометрии и оба метода являются комплементарными. Таким образом, были созданы предпосылки к изучению возможности применения ВЭЖХ-орбитальной ионной ловушки с ХИАД непосредственно в скрининговом анализе.

#### 4.5 Скрининг ФАВ методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)

Цель исследования заключалась в изучении возможности быстрого скрининга стероидов и N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/орбитальной ионной ловушкой с в условиях ХИАД с диссоциацией, индуцированной соударениями, в источнике ионов (ХИАД-ДИС) на основе одной масс-хроматограммы для точно измеренной m/z иона [M+H]<sup>+</sup> или [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> для решения задач скрининга в антидопинговом контроле [181]. ДИС в источнике ионов должна была способствовать выбору диагностичных ионов. Оптимизация условий диссоциации, индуцированной соударениями в источнике ионов проводилась в соответствии с рекомендациями производителя оборудования. Для этого вводили модельные смеси определяемых соединений непосредственно в источник ионов. Эффективная фрагментация определяемых соединений в источнике ионов достигалась благодаря повышению разности потенциала между скимером и входным конусом. В ходе экспериментов с изменением этого параметра от 10 до 100 В было установлено, что оптимальным значением является 30 В. Для

повышения точности измерения масс фрагментных ионов с m/z меньше 250 в качестве реперной массы использовалось m/z 195.0882 (она принадлежит протонированной молекуле кофеина) [212]. После внешней калибровки по массам он продолжает присутствовать в масс-спектре в течение 8 часов. Масс-спектры детектируемых соединений, полученные в условиях ХИАД-ДИС, приведены в приложении 2. Важной особенностью масс-спектров анаболических стероидов, β<sub>2</sub>-агонистов и веществ с антиэстрогенной активностью, полученных в условиях ХИАД-ДИС, является присутствие пиков, принадлежащих протонированным молекулам [М+Н] или фрагментным ионам [М+Н-пН<sub>2</sub>O]. Безусловно, эти ионы относятся к наиболее характеристичным. В таблице 15 представлены брутто-формулы, m/z диагностичных ионов исследуемых соединений и точность измерений масс в условиях ХИАД-ДИС. Протонированные ионы и фрагментные ионы [М+Н-пН<sub>2</sub>O] выделены курсивом.

**Таблица 15** Брутто-формулы, m/z характеристичных ионов и точность их измерения, полученные в условиях диссоциации, индуцированной соударениями, в источнике с применением ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) (курсивом выделены ионы [M+H]<sup>+</sup> и ионы [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), [181].

Сокращение	Детектируемое соединение	Препарат	Брутто- формула хар. ионов	Теоретиче- ская масса	Измеренная масса	Точность, ppm
FLUOm	9α-фтор-18нор-17,17-диметил- 4,13-диен-11β-ол-3-он	Флюоксиместер он	$\begin{array}{c} C_{20}H_{28}FO_2\\ C_{20}H_{25}O\\ C_{19}{}^{13}CH_{27}O_2 \end{array}$	<b>319.2068</b> <b>281.1900</b> 300.2040	<b>319.2069</b> <b>281.1902</b> 300.2039	0.3 0.7 0.3
EFAP	2-(4-(((3,5- диметиланилин)карбонил)метил)ф енокси)-2-метилпропионовая кислота	Эфапроксирал	$C_{20}H_{24}NO_4\\C_{16}H_{18}NO_2\\C_8H_{12}N$	<b>342.1700</b> 256.1332 122.0964	<b>342.1698</b> 256.1332 122.0962	0.6 <0.4 1.6
SALB	4-[2-(терт-бутиламино)-1- гидроксиэтил]-2- (гидроксиметил)фенол	Салбутамол	$\begin{array}{c} C_{13}H_{22}NO_{3} \\ C_{13}H_{20}NO_{2} \\ C_{9}H_{10}NO \end{array}$	<b>240.1594</b> <b>222.1489</b> 148.0757	<b>240.1590</b> <b>222.1485</b> 148.0753	1.6 1.8 2.7
ZILP	(±)-транс-4,5,6,7-Тетрагидро-7- гидрокси-6-(изопропиламино) имидазол [4,5,1-jk]-[1]бензазепин- 2(1Н)-он	Зилпатерол	$\begin{array}{c} C_{14}H_{20}N_{3}O_{2}\\ C_{14}H_{18}N_{3}O\\ C_{11}H_{12}N_{3}O\end{array}$	<b>262.1550</b> <b>244.1444</b> 202.0975	<b>262.1550</b> <b>244.1444</b> 202.0974	<0.4 <0.4 0.5

Сокращение	Детектируемое соединение	Препарат	Брутто- формула диаг. ионов	Теоретиче- ская масса	Измеренная масса	Точность, ррт
60RAL	4-хлор-6β,17β-дигидрокси-17α- метиландроста-1,4-диен-3-он	Орал Туринабол	$\begin{array}{c} C_{20}H_{27}O_3\\ C_{18}H_{22}ClO\\ C_{19}{}^{13}CH_{27}O_3 \end{array}$	<b>315.1521</b> 289.1353 <b>316.1988</b>	<b>315.1511</b> 289.1354 <b>316.1987</b>	3 0.3 0.3
TREN	17β-гидроксиэстра-4,9,11-триен-3- он	Тренболон	$\begin{array}{c} C_{18}H_{23}O_2\\ C_{18}H_{21}O\\ C_{17}{}^{13}CH_{23}O_2 \end{array}$	271.1692 253.1587 272.1726	271.1693 253.1588 272.1725	0.3 0.4 0.3
OXA	17β-гидрокси-17α-метил-2-окса- 5α-андростан-3-он	Оксандролон	$\begin{array}{c} C_{19}H_{31}O_{3} \\ C_{18}H_{25}O_{3} \\ C_{18}{}^{13}CH_{31}O_{3} \end{array}$	307.2268 289.2162 308.2301	307.2266 289.2161 308.230	0.6 0.3 0.3
MTRIEN	17β-гидрокси-17α-метилэстра- 4,9,11-триен-3-он	Метилтриенолон	$\begin{array}{c} C_{19}H_{25}O_2\\ C_{19}H_{23}O\\ C_{18}{}^{13}CH_{25}O_2 \end{array}$	285.1849 267.1743 286.1883	285.1848 267.1744 286.1881	0.3 0.3 0.7
FORM	4-гидроксиандростендион	Форместан	$\begin{array}{c} C_{19}H_{23}O\\ C_{18}{}^{13}C\ H_{25}O_{2}\\ C_{19}H_{25}O_{2} \end{array}$	267.1743 286.1882 285.1849	267.1744 286.1883 285.1848	0.4 0.3 0.3

Сокращение	Детектируемое соединение	Препарат	Брутто- формула диаг. ионов	Теоретиче- ская масса	Измеренная масса	Точность, ррт
ZER	(11S)-7,15,17-тригидрокси-11- метил-12- оксабицикло[12.4.0]октадека- 1(14),15,17-триен-13-он	Зераленон	$\begin{array}{c} C_{18}H_{25}O_4\\ C_{18}H_{23}O_3\\ C_{17}H_{25}O_2 \end{array}$	<b>305.1747</b> <b>287.1642</b> 261.1849	<b>305.1747</b> <b>287.1642</b> 261.1849	<0.3 <0.3 <0.4
GEST	13-этил-17-гидрокси-18,19-динор- 17α-прегна-4,9,11-триен-20-ин-3- он	Гестринон	$\begin{array}{c} C_{21}H_{25}O_2\\ C_{21}H_{23}O\\ C_{20}{}^{13}CH_{25}O_2 \end{array}$	<b>309.1849</b> <b>291.1743</b> 310.1883	<b>309.1849</b> <b>291.1745</b> 310.1881	<0.3 0.7 0.6
CLEN	1-(4-амино-3,5-дихлорфенил)-2- (терт-бутиламино)этанол	Кленбутерол	$\begin{array}{c} C_{12}H_{19}Cl_2N_2O\\ C_{12}H_{17}Cl_2N_2\\ C_8H_9Cl_2N_2 \end{array}$	<b>277.0869</b> <b>259.0763</b> 203.0137	<b>277.0869</b> <b>259.0764</b> 203.0137	<0.3 0.4 <0.5
3STAN	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]- пиразол -3',17β-диол	Станозолол	$\begin{array}{c} C_{21}H_{33}N_2O_2\\ C_{21}H_{31}N_2O\\ C_{10}H_{13}O \end{array}$	<b>345.2536</b> <b>327.2431</b> 149.0966	<b>345.2535</b> <b>327.2430</b> 149.0960	0.3 0.3 4.0
16STAN	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]- пиразол-16β,17β-диол	Станозолол	$\begin{array}{c} C_{21}H_{33}N_2O_2 \\ C_{31}H_{31}N_2O \end{array}$	345.2536 327.2431	345.2533 327.2430	1.1 0.9

Сокращение	Детектируемое соединение	Препарат	Брутто- формула хар. ионов	Теоретиче- ская масса	Измеренная масса	Точность, ррт
OXY	4,17β-дигидрокси-17α- метиландрост-4-ен-3-он	Оксиместерон	$\begin{array}{c} C_{20}H_{31}O_{3}\\ C_{20}H_{29}O_{2}\\ C_{20}H_{27}O\end{array}$	319.2268 301.2162 283.2056	319.2263 301.2159 283.2056	1.5 1.0 <0.3
MT(IS)	17β-гидрокси-17α-метиландрост-4- ен-3-он (Вн. стандарт)	Метилтестостер он	$C_{20}H_{31}O_2$	303.2318	303.2313	1.6
BOLDm	5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он	Болденон	$C_{19}H_{29}O_2$	289.2162	289.2162	<0.3
EPIOXA	17α-гидрокси-17β-метил-2-окса- 5α-андростан-3-он	Оксандролон	$\begin{array}{c} C_{19}H_{31}O_3\\ C_{19}H_{29}O_2\\ C_{18}{}^{13}CH_{31}O_3 \end{array}$	307.2268 289.2162 308.2301	307.2268 289.2161 308.2301	<0.3 0.3 <0.3
THG	13-этил-17-гидрокси-18,19-динор- 17α-прегна-4,9,11-триен-3-он	Тетрагидрогестр инон	$\begin{array}{c} C_{21}H_{29}O_2\\ C_{21}H_{27}O\\ C_{20}{}^{13}CH_{29}O_2 \end{array}$	313.2162 295.2056 314.2196	313.2161 295.2056 314.2193	0.3 <0.3 0.9

Сокращение	Детектируемое соединение	Препарат	Брутто- формула хар. ионов	Теоретиче- ская масса	Измеренная масса	Точность, ррт
16FUR	16β,17β-дигидрокси-17α-метил-5α- андростано[2,3-с]-фуразан	Фуразабол	$\begin{array}{c} C_{20}H_{29}N_2O_2 \\ C_{19}{}^{13}CH_{29}N_2O_2 \end{array}$	329.2223 330.2257	329.2223 330.2256	<0.3 0.3
19NAN	5α-эстран-3α-ол-17-он	Nandrolone	$C_{17}{}^{13}CH_{27}O \\ C_{18}H_{27}O \\ C_{18}H_{25}$	260.2090 259.2056 241.1951	260.2090 259.2056 241.1951	<0.4 <0.4 <0.4
METm	1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17- он	Метенолон	$\begin{array}{c} C_{20}H_{29}O\\ C_{20}H_{27}\\ C_{17}H_{23} \end{array}$	<b>285.2212</b> <b>267.2107</b> 227.1794	<b>285.2212</b> <b>267.2107</b> 227.1794	<0.3 <0.4 <0.4
METANm1	17α-метил-5β-андростан-3α,17β- диол	Метандиенон	$\begin{array}{c} C_{20}H_{31} \\ C_{15}H_{23}O_2 \\ C_{19}{}^{13}CH_{31} \end{array}$	<b>271.2420</b> 235.1693 <b>272.2454</b>	<b>271.2420</b> 235.1692 <b>272.2453</b>	<0.4 0.4 0.4
BOLASm	7α,17α-диметил-5β-андростан- 3α,17β-диол	Боластерон	$\begin{array}{c} C_{21}H_{35}O\\ C_{21}H_{33}\\ C_{15}H_{23} \end{array}$	<b>303.2682</b> <b>285.2576</b> 203.1794	<b>303.2681</b> <b>285.2576</b> 203.1794	0.3 <0.3 <0.5

Сокращение	Детектируемое соединение	Препарат	Брутто- формула хар. ионов	Теоретиче- ская масса	Измеренная масса	Точность, ppm
MESTm	1α-метил-5α-андростан-3α-ol-17- он	Местеролон	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O C <sub>20</sub> H <sub>29</sub>	287.2369 269.2264	287.2369 269.2264	<0.3 <0.4
CALUSm	7β,17α-диметил-5α-андростан- 3α,17β-диол	Калустерон	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub>	285.2577	285.2575	0.7
METHAS	17β-гидрокси-2α,17α-диметил-5α- андростан-3-он	Метастерон	$\begin{array}{c} C_{21}H_{35}O_2\\ C_{21}H_{33}O\\ C_{20}{}^{13}CH_{33}O \end{array}$	319.2631 301.2526 302.2560	319.2633 301.2527 302.2559	0.6 0.3 0.3
EPIMET	17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α- diol	Metandienone	$\begin{array}{c} C_{20}H_{29} \\ C_{16}H_{21} \\ C_{15}H_{21} \end{array}$	<b>269.2264</b> 213.1638 201.1638	<b>269.2263</b> 213.1638 201.1637	0.4 <0.5 0.5
METANm2	18нор-17,17-диметил-5β- андростан-1,13-диен-3α-ол	Metandienone	$\begin{array}{c} C_{20}H_{29} \\ C_{16}H_{21} \\ C_{12}H_{17} \end{array}$	<b>269.2264</b> 213.1638 161.1325	<b>269.2262</b> 213.1637 161.1323	0.7 0.5 1.2
SALM	2-(гидроксиметил)-4-[1-гидрокси- 2-[6-(4-фенилбутокси) гексиламино]этил]фенол	Salmeterol	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>4</sub> C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> NO <sub>3</sub> C <sub>24</sub> <sup>13</sup> CH <sub>38</sub> NO <sub>4</sub>	<b>416.2795</b> <b>398.2690</b> 417.2828	<b>416.2794</b> <b>398.2687</b> 417.2826	0.2 0.7 0.5

Как видно из табл. 15, точность измерения масс для всех фрагментных ионов была лучше, чем 2 ppm. Таким образом, удерживание ионов с низким значением m/z не сопровождается ухудшением точности измерений масс.

Для оценки селективности определения анаболических стероидов и β<sub>2</sub>агонистов с выбранными характеристичными ионами, анализировали мочу, в которую добавили не только искомые соединения, но и кортикостероиды и диуретики. Концентрация определяемых соединений и потенциально мешающих компонентов составляла 1 нг/мл и 50 нг/мл. На рис. 25 представлены массхроматограммы, полученных в ходе оценки селективности предлагаемого способа определения, для m/z характеристичных ионов «проблемных» метаболитов биорегуляторов, имеющих широкое распространение среди спортсменов (концентрация каждого компонента составляет здесь 0.1 нг/мл). «Окно», заданное для построения масс-хроматограмм, не превышало 3 ррт.



Масс-хроматограммы, Рисунка 25 полученные ходе исследования В селективности с применением метода ВЭЖХ/орбитальной ионной ловушки с химической ионизацией при атмосферном давлении, для m/z характеристичных метаболитов «проблемных» биорегуляторов, ионов имеющих широкое распространение среди спортсменов (0.1 нг/мл).

Как видно из рис. 25 отсутствует мешающее влияние потенциально интерферирующих компонентов, включая кортикостероидов и диуретиков. Ни одного пика потенциально интерферирующего компонента мы не видим в представленных «окнах». Полученные результаты одназначно показывают, что можно при скрининге методом ВЭЖХ-МС/ОЛ(ХИАД) можно ограничиться детектированием одним характеристичным ионом. Кроме того, была оценена специфичность предложенного подхода, которая заключалась в проверке отсутствия интерферирующих компонентов во всех исследуемых холостых образцах. Для этого анализировали образцы мочи от 10 добровольцев, не употребляющих допинговые препараты. Таким образом, предложенный способ скрининга также успешно прошел испытание на специфичность.

Учитывая, что эффект матрицы может значительно отличаться в зависимости от анализируемого образца, была проведена полная вадидация (для определяемых веществ) с использованием образцов 10 всех мочи OT добровольцев, не принимающих допинговые препараты. Валидация подхода включала в себя оценку степени извлечения, а также установление предела обнаружения и проверку повторяемости и прецизионности выполняемых анализов.

Для оценки степени извлечения определяемых соединений, в 5 холостых пробах мочи и в их конечных экстрактах раздельно добавляли аналиты. Во всех 10 экстрактах из мочи концентрации аналитов были одинаковыми (в пересчете на 3 мл мочи 100 нг/мл). Степень извлечения оценивали по формуле:

$$E = \frac{Si}{Sif} \times 100$$

где *Е*-степень извлечения;

Si – средняя площадь хроматографического пика определяемого биорегулятора і при его добавлении в холостую пробу перед ее подготовкой к анализу;

*Sif* – средняя площадь хроматографического пика определяемого биорегулятора і при его добавлении в конечный экстракт холостой пробы.

При валидации метода оценивали предел обнаружения исследуемых соединений. Для его оценки в 10 образцах биологической жидкости добавляли 29 «труднодериватизируемых» ФАВ с отличающимися друг от друга концентрациями (10, 2, 1, 0.1, 0.05 нг/мл). Предел обнаружения определяли, как наименьшую концентрацию биорегулятора (или его метаболита) с отношением сигнала к шуму выше, чем 10/1. Поскольку основной задачей скрининга является четкая дифференциация между истинно отрицательной и истинно положительной пробой, подразумевалось, что биорегуляторы детектируются во всех 10 пробах с концентрацией аналитов, соответствующей пределу обнаружения.

На последней стадии валидации была выполнена проверка повторяемости получаемых результатов. Внутридневную и междневную повторяемость получаемых результатов скрининга выражали через относительное стандартное отклонение отношения площадей аналитов с концентрацией 1, 2 и 10 нг/мл к площади внутреннего стандарта (метилтестостерон). Для ее проверки одну и ту же пробу анализировали шесть раз в день в течение 3 дней.

Результаты, полученные в ходе валидации представлены в табл. 16.

**Таблица 16** Данные, полученные в ходе валидации процедуры скрининга «проблемных» биорегуляторов методом ВЭЖХ/МС-ОЛ с химической ионизацией при атмосферном давлении, [181].

			Повторяемость						
Детектируемое	Время удер.	Степень извле-	Внутридневная извле- повторяемость		ная Сть	ая Повторяемость между днями гь			
соединение	(мин)	чения (%)	1 нг/мл	2 нг/мл	10нг/м л	1 нг/мл	2 нг/мл	10 нг/мл	
Флюоксиместерон Мет.	1.53	79	20.7	18.6	16.3	24.9	22.5	17.2	0.1
Эфапроксикрал	2.12	52	21.5	19.3	17.4	25.7	23.2	18.5	0.1
Сальбутамол	3.23	35	21.6	19.7	17.8	25.8	23.5	18.7	0.1
Зилпатерол	3.47	41	21.7	19.9	17.5	25.9	23.7	18.3	0.1
ОралТуринабол Мет.	5.03	91	20.8	18.6	16.3	24.6	22.7	17.6	0.05
Тренболон	5.46	95	20.9	18.8	16.5	24.7	22.9	17.4	0.05
Охандролон	5.83	96	20.8	18.9	16.7	24.6	22.8	17.3	0.05
Метилтриенолон	5.88	92	21.1	19.2	16.9	25.3	23.1	17.7	0.1
Форместан	6.02	79	20.6	18.5	16.4	24.4	22.6	17.2	0.1
Зеранол	6.13	83	20.5	18.3	16.2	24.3	22.4	17.5	0.05
Гестринон	6.20	94	20.7	18.9	16.7	24.5	22.1	17.8	0.05
Кленбутерол	6.32	23	21.3	19.5	17.3	25.5	23.4	18.4	0.1
Станозолол Мет.1	6.37	91	20.9	18.7	16.5	25.1	22.8	18.1	0.05
Станозолол Мет.2	6.59	73	21.4	19.5	17.3	25.6	23.3	18.9	0.05
Оксиместерон	6.76	95	21.8	19.9	17.7	25.7	23.8	18.5	0.05

		Повторяемость							
Потолитичного с	De avez vezar	<b>C</b>	Вну	тридневн	ая	Повто	ряемость	между	
детектируемое	время удер.	Степень извле-	ПОВ	вторяемос	сть		днями		ПО (нг/мл)
соединение	(мин)	чения (%)	1 mp/мп	2 115/101	10	1 115/11	2 HE/MI	10	
			1 HI/MJI	2 HI/MJI	нг/мл	I HI/WIJI	2 HI/MJI	нг/мл	
Болденон Мет.	6.93	87	21.9	19.6	17.4	25.8	23.5	18.2	0.05
Эпиоксандролон	7.15	84	20.5	19.3	17.2	24.3	23.2	18.1	0.05
Тетрагидрогестринон	7.35	99	20.4	19.1	17.3	24.2	22.7	18.6	0.05
Фуразабол Мет.	7.40	93	20.7	18.5	17.4	24.5	22.9	18.1	0.1
Нандролон Мет.	7.46	77	21.3	18.6	17.2	25.6	22.2	17.8	0.05
Метенолол Мет.	7.60	92	21.1	18.2	16.9	25.3	23.6	17.6	0.05
Метандиенон Мет.1	7.78	76	21.2	18.8	16.6	25.1	23.4	17.4	0.05
Боластерон Мет.	8.11	86	20.7	18.6	16.7	24.6	22.4	17.6	0.1
Местеролон Мет.1	8.14	88	20.8	18.3	16.5	24.5	22.6	17.3	0.05
Калустерон Мет.	8.33	89	20.7	19.4	17.1	24.3	22.4	18.6	0.1
Метастерон	8.42	97	21.2	18.3	16.8	25.1	22.9	17.9	0.05
Эпиметендиол	9.54	88	20.9	18.4	17.2	24.7	22.3	18.3	0.05
Метандиенон Мет.2	10.77	75	21.1	18.5	16.8	24.9	23.4	17.7	0.05
Салметерол	11.03	75	20.5	18.4	17.3	25.2	22.2	18.8	0.05
Как видно из табл. 16, степень извлечения для большинства «проблемных» биорегуляторов и их метаболитов была выше, чем 70 процентов. Для всех исследуемых соединений предел детектирования был лучше, чем 100 пг/мл. Как видно из табл. 15 внутридневная повторяемость (n=6) менялась в зависимости от соединения в пределах 17-21 %, а междневная повторяемость в пределах 18-25 %.

Для апробации преложенного способа был выполнен анализ пробы мочи спортсмена, в которой был обнаружен эпиметендиол (метаболит метандиенона) с использованием валидированной процедуры скрининга методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения. Предположительно, концентрация эпиметендиола в пробе составляет 0.5 нг/мл. Масс-хроматограммы положительной пробы, полученные с применением предложенного подхода представлены на рис. 25.



Рисунок 25 Масс-хроматограммы реальной пробы, содержащей эпиметендиол.

видно, что присутствующие на масс-хроматограммах пики Из рис. 25 имеют идентичные времена удерживания с пиками масс-хроматограмм холостой пробы, добавили Полученные которой эпиметендиол, В результаты свидетельствуют об эффективности высокоэффективной жидкостной хроматографии/орбитальной ионной ловушки В сочетании с ХИАД В обнаружении запрещенных ФАВ в сложных по составу смесях без стадии очистки экстрактов. Учитывая, что к началу данной работы подобные исследования не проводились, были выполнены дополнительные эксперименты, подтверждающие эффективность предложенного подхода.

Впервые было изучено сочетание ХИАД с ВЭЖХ-МСВР/ОЛ, позволяющее преодолеть ограничение орбитальной ионной ловушки, связанное с емкостью Словушки [213]. Благодаря этому сочетанию и выбору оптимальной программы

146

градиентного элюирования удалось снизить значение матричных эффектов до 7% и улучшить предел обнаружения анаболических и бета-агонитсов в сложных по составу экстрактах из мочи. На основе данного подхода стало возможным определение стероидов и N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов в моче на уровне 0.05 - 0.1 нг/мл в зависимости от определяемого соединения [181]. Таким образом, чувствительность ВЭЖХ-МСВР/ОЛ стала сопоставима с ВЭЖХ-МС/МС при анализе сложных по составу экстрактов из биологических жидкостей [211]. Это нашло отражение в определении эземестана и его метаболита, где их пределы обнаружения отличались только в 2.5 раза в пользу ВЭЖХ-МС/МС [199]. Другим доказательством эффективности предлагаемого важным подхода стало обнаружение оксандролона и его метаболита в моче спортсмена через две недели после прекращения приема препарата [179]. Возможность применения ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИАД для выбора селективных переходов, необходимых для ВЭЖХ-МС/МС, стало дополнительным подтверждением эффективности предлагаемого подхода [205]. Более того, предлагаемый подход, основанный на сочетании ХИАД с ВЭЖХ-МСВР/ОЛ, привел к созданию нового способа скрининга ФАВ на уровне 0.05 – 0.1 нг/мл в сложных по составу экстрактах [213].

#### ГЛАВА 5 ВЭЖХ-МСВР/ОЛ И ВТЖХ-МСВР/ОЛ В СОЧЕТАНИИ С ФХИАД

## 5.1 Исследование матричного эффекта при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД

Результаты, полученные при сочетании ХИАД с орбитальной ионной ловушкой, показали, что способ ионизации будет способствовать не только минимизации матричного эффекта, связанного с подавлением ионизации компонентами матрицы, но и с эффектом, ассоциированным с ограниченной емкостью С-ловушки. Аналогичных результатов правомерно было ожидать от менее изученной фотохимической ионизации при атмосферном давлении (ФХИАД), не использованной ранее в сочетании с орбитальной ионной ловушкой в скрининге сложных по составу смесей. По аналогии с ХИАД элюент здесь также испаряется в нагреваемом распылителе и отсутствует конкуренция между компонентами матрицы за «приобретение заряда». Однако в отличие от ХИАД процесс ионизации осуществляется, как правило, с помощью криптоновой ультрафиолетовой лампы, испускающей фотоны с энергией 10 и 10.6 эВ. Соединения, которые напрямую могут ионизироваться фотонами, имеют сечение ионизации ниже 10 или 10.6 эВ. Вода и метанол, имеющие потенциал ионизации выше 10.6 эВ, в таких условиях (при отсутствии примесей) не ионизуруются. Существует два подхода к реализации ФХИАД: а) ФХИАД без использования добавок и б) ФХИАД с использованием добавок. В первом случае первая реакция в условиях ФХИАД протекает с образованием молекулярного иона, полученного в результате фотоионизации аналита, имеющего потенциал ионизации ниже энергии фотонов. В данном случае в присутствии протонного растворителя (воды, метанола, и.т.д.) молекулярный ион аналита отрывает атом водорода у растворителя с образованием протонированной молекулы. Во втором случае используют растворители в качестве добавок, имеющих потенциал ионизации ниже энергии фотонов. В этом случае молекулярные ионы растворителя вступают в реакцию с аналитами с переносом протона. Стремясь минимизировать

матричный эффект, связанный с подавлением ионизации и избежать «перегрузки» С-ловушки «мешающими ионами» изучали оба подхода к ФХИАД.

На рис. 26 представлены результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД без использования добавок.



**Рисунок 26.** Матричные эффекты при использовании метода ВЭЖХ-МСВР в условиях ФХИАД без использования добавок, (n=3, P=0.95).

На рис. 26 мы наблюдаем матричный эффект, связанный с ограниченной емкостью С-ловушки, (оба эксперимента проводились при идентичных условиях ионизации и разделения). Более высокие значения матричных эффектов в условиях ФХИАД (без использования добавок) можно объснить только более высокой эффективностью ионизации мешающих компонентов матрицы в данных условиях. Различие матричных эффектов нельзя объяснить подавлением ионизации компонентами матричных эффектов в условиях.

масс общее значение матричного эффекта не превышает 12%. Дело в том, что уменьшение диапазона сканирования не должно сказываться на подавление матрицы. Хотя значения матричного эффекта, ионизации компонентами связанного с емкостью С-ловушки, в условиях ФХИАД без использования добавок в 2-3 раза меньше, чем при электрораспылительной ионизации, остается актуальным поиск подходов к их дальнейшему снижению. Очевидно, что для дальнейшей минимизации матричного эффекта, вызванного «перегрузкой» Словушки необходимо добиться селективности ионизации, используя добавки в ФХИАД [214]. Другими условиях словами, селективность ФХИАД использованием добавок позволит избежать «перегрузки за селективности ионизации, как и случае с ХИАД. Однако, несмотря на полученные результаты, необходимо в начале оценить эффективность ФХИАД без добавок в анализе реальных биологических образцов методом ВЭЖХ-МСВР.

## 5.2 Определение стероидов в реальных образцах мочи методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД

Анаболические стероиды синтетическими производными являются тестостерона, стимулирующего рост мышечной массы. Учитывая соблазн их применения для достижения спортивных успехов, они были запрещены в 1976 году. Однако, несмотря на запреты к их применению, интерес к ним со стороны недобросовестных спортсменов до настоящего времени не пропадает. Сегодня основным методом скрининга анаболических стероидов и их метаболитов газовая хроматография/масс-спектрометрия. Однако проблемы, является связанные с длительностью процедуры скрининга, основанного на применении газовой хромато-масс-спектрометрии, мотивируют исследователей к поиску альтернативных подходов, исключающих трудоемкую стадию дериватизации. Эти поиски привели к разработке ряд процедур, основанных на применении ВЭЖХ-МС. Постепенно ВЭЖХ-МС превращается в комплементарный метод, применяемый совместно с ГХ-МС.

Кроме ВАДА настаивает необходимость того, на использовать альтернативные процедуры скрининга «труднодериватизируемых» синтетических стероидов, что способствовало постановке задаче данного исследования. Учитывая достигнутые результаты в снижении матричных эффектов при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, было решено распространить данный подход на другие проблемные анаболические стероиды. К «проблемным» относились стероиды, которые реагируют с силилирующими агентами с низким ТМС-производных. К выходом сожалению, эксперименты С электрораспылительной ионизацией показали, что наблюдаемый в данном случае эффект подавления ионизации матрицей может осложнить определение стероидов в биологических жидкостях. Таким образом, целью настоящего исследования стало проведение пилотных экспериментов по изучению возможности обнаружения «труднодериватизируемых» синтетических стероидов И ИХ метаболитов В биологических жидкостях с использованием ВЭЖХ-МСВР(ФХИАД) без ввода добавок [180].

Структуры исследованных метаболитов анаболических стероидов представлены на рис.27.



17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α-андростан-3-он



176-гидроксэстра-4,9,11-триен-3-он



13-этил-176-гидрокси-18,19-динор-17а-прегна-4,9,11-триен-3-он



13-этил-17β-гидрокси-18,19-динор-17α-прегна-4,9,11-триен-20-ин-3-он

Рисунок 27 Структуры исследованных метаболитов синтетических стероидов

Масс-спектры исследуемых аналитов, полученные методом ВЭЖХ-МСВР(ФХИАД) представлены на рис. 28-31.



Рисунок 28 Масс-спектр тетрагидрогестринона



Рисунок 29 Масс-спектр тренболона



Рисунок 30 Масс-спектр гестринона



Рисунок 31 Масс-спектр, эпиоксандролона

Притягательной чертой масс-спектров изученных аналитов, полученых в условиях ФХИАД без ввода добавок, является наличие пиков, принадлежащих протонированным молекулам. Вместе с тем, в масс-спектрах некоторых соединений также присутствовали пики, принадлежащие фрагментным ионам [M+H+nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>(эпиоксандролон, гестринон). Другой важной особенностью исследуемых аналитов является отсутствие таких аддуктов, как [M+Na]<sup>+</sup>и [M+K]<sup>+</sup>, присутствие которых так характерно для масс-спектров, полученных у условиях ионизации электрораспылением. Беря в расчет информативность масс-спектра, предложенный подход может быть использован не только для скрининга, но и для подтверждающего анализа.

Теоретические и экспериментальные m/z детектируемых ионов аналитов приведены в табл. 17.

**Таблица 17** «Результаты измерений точных масс ионов анаболических стероидов, которые были определены с использованием орбитальной ловушки»<sup>180</sup>.

Определяемое соединение	Время удерживан ия, мин.	Брутто- формулы характерист ичных ионов	Теоретическая масса, Да	Измеренная масса, Да
13-этил-17β-гидрокси-18,19-динор-		$C_{21}H_{29}O_2$	313.2162	313.2166
17α-прегна-4,9,11-триен-3-он	8.73	$C_{21}H_{27}O$	295.2056	295.2061
(тетрагидрогестринон)		$C_{17}H_{21}O$	241.1587	241.1590
		$C_{18}H_{23}O_2$	271.1693	271.1693
1/р-гидроксэстра-4,9,11-триен-5-опе	6.65	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> O	253.1587	253.1588
(треноблон)		$C_{14}H_{15}O$	199.1117	199.1117
13-этил-17β-гидрогси-18,19-динор-		$C_{21}H_{24}O_2$	327.1955	327.2433
17α-прегна-4,9,11-триен-20-ин-3-он	7.38	$C_{21}H_{25}O_2$	309.1849	309.1853
(гестринон)		$C_{21}H_{23}O$	291.1743	291.1747
		$C_{19}H_{31}O_3$	307.2268	307.2273
17α -гидрокси-17β-метил-2-окса-5α-	7.01	$C_{19}H_{29}O_2$	289.2162	289.2167
андростан -3-он (эпиоксандролон)		C19H27O	271.2056	271.2061

Как видно из табл. 17, точность измерения m/z с использованием ВЭЖХ-МСВР/ОЛ меньше, чем 2 ppm(внешняя калибровка). Важно подчеркнуть, что необходимым условием достижения такой точности является ежедневная калибровка. В свою очередь высокая точность измерения m/z обеспечивает специфичность детектирования вышеуказанных аналитов в сложных по составу биологических матрицах.

При приготовлении модельных смесей руководствовались требованиями МОК к пределам обнаружения синтетических стероидов и их метаболитов. Эти требования гласят, что применяемые лабораториями подходы должны обеспечить обнаружение синтетических стероидов и их метаболитов на уровне 5000 пг/мл. В конечный экстракт с стадии пересчете на учетом концентрирования, концентрация аналитов в вводимой пробе будет составлять 0.1 нг/мл. В нашем случае мы вводили модельный раствор, в котором содержание определяемых соединений составляла 0.1 нг/мкл. На рис. 32 представлены масс-хроматограммы 271.1693, 309.1853. m/z313.2166, Эти m/zдля относились к для протонированным молекулам тетрагестринона, тренболона, гестринона, соответственно. Кроме того, строилась масс-хроматограмма для m/z 289.2161. Это m/z относилось к осколочному иону [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> эпиоксандролона.



Рисунок 32 Масс-хроматограммы метанольного раствора аналитов, полученные при использовании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ФХИАД). «А – масс-хроматограмма для m/z 313.2166, Б – масс-хроматограмма для m/z 271.1693, В – масс-хроматограмма для m/z 289.2167»<sup>180</sup>.

Рисунок 32 подтверждает достижение высокой чувствительности данным методом. При данных условиях S/N выше, чем 2000 вне зависимости от определяемого соединения.

Для оценки селективности предлагаемого подхода анализировали мочу, содержащую тренболон. Масс-хроматограммы биологической жидкости, содержащей искомый аналит приведены на рис.33.



**Рисунок 33** Масс-хроматограммы приведены в работе автора [180]: «Массхроматограммы образца мочи, содержащей треболон (t<sub>уд.</sub>=6.89 мин., 0.1 нг/мл), полученные при применении ВЭЖХ-МСВР(ФХИАД): «**A** - масс-хроматограмма для m/z 271,1693; **Б** – масс-хроматограмма для m/z 253,1588; **B** – массхроматограмма для m/z 199,1117; **Г** - масс-хроматограмма по полному ионному току»<sup>180</sup>.

Несмотря на сложность состава анализируемой матрицы и низкую концентрацию определяемого соединения, удалось с высокой селективностью определить тренболон. При этом высокая селективность определения достигается с детектированием одной протонированной молекулы определяемого соединения. Таким образом, полученные результаты указывают на целесообразность изучения возможности скрининга ультрамалых количеств анаболических стероидов хроматографии/орбитальной методом жидкостной ионной ловушки с фотоионизацией при атмосферном давлении [180]. Рекордные пределы обнаружения для изученных ФАВ в биологических матрицах были достигнуты в приведенном исследовании благодаря минимизации матричных эффектов, основанной на сочетании ФХИАД с ВЭЖХ-МСВР/ОЛ.

## 5.3 Исследование матричного эффекта при сочетании ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД

Для снижения матричного эффекта, ассоциированного с емкостью Словушки, изучали также возможность использования добавок в условиях ФХИАД [214]. Использование добавок должно было способствовать повышению селективности ионизации определяемых соединенй и избежать «перегрузки» Словушки. Реализуя данный способ ионизации, добавку во многих случаях смешивают с подвижной фазой после хроматографического разделения. Вместе с тем, недостаточное смешивание добавки и подвижной фазы препятствует достижению гомогенного распределения реагентов в источнике ионов. Это проявляется в повышенном уровне химического шума на хроматограмме. Поэтому для «доставки» реагента, участвующего в ион-молекулярных реакциях в источнике ионов, в данном исследовании смешивали добавку с подвижной фазой до хроматографического разделения. Очевидно, что при данном подходе выбранные добавки не должны привести к ухудшению хроматографического разделения и это накладывает существенные ограничения к выбору неподвижных фаз. Учитывая, что проблема разделения большого числа анаболических стероидов методом ВЭЖХ-МС до настоящей работы не была решена в общем виде, в качестве неподвижной фазы использовали пористый графитизированный углерод, который был специально разработан для разделения геометрических изомеров. В частности, до настоящей работы не была решена проблема разделения таких соединений, как 17α-метил-5β-андростан-3α,17β-диола и 17αметил-5α-андростан-3α,17β-диола, имеющие идентичные переходы при детектировании методом тандемной масс-спектрометрии. С другой стороны сильное удерживание анаболических стероидов неподвижной фазой на основе графитизированного может привести к резкому углерода увеличению продолжительности анализа, что не приемлемо для процедур скрининга. Для преодоления этого ограничения и селективного определения ультрамалых количеств анаболических стероидов в настоящем исследовании предложен подход, основанный на сочетании высокотемпературной хроматографии с

использованием графитизированного углерода в качестве неподвижной фазы и орбитальной ионной ловушки с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении [208].

Была изучена возможность использования в качестве добавок изопропанол, этанол, ацетон и тетрагидрофуран. Выбор этих добавок был обусловлен существенным различием в сродстве к протону данных соединений. На рис. 34 представлены результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД с использованием различных добавок.



Рисунок 34 Результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД с использованием различных добавок, (n=3, P=0.95).

Из рис. 34 видно, что значительный матричный эффект (от 12 до 23 % в зависимости от соединения) наблюдается только при использовании этанола в качестве добавки. Во остальных случаях значение матричного эффекта не превышает 10 %. Важно отметить, что наиболее низкие значения матричного мы наблюдаем, когда используютя добавки с относительно высоким сродством к протону. У изопропанола, ацетона и тетрагидрофурана оно составляет 793 кДж/моль, 812 кДж/моль и 822 кДж/моль соответственно, в то время, как для этанола оно составляет 776 кДж/моль. Таким образом, относительно высокие

значения матричного эффекта при использовании этанола в качестве добавки можно объяснить относительно высокой эффективностью ионизации мешающих компонентов матрицы, вызывающих «перегрузку» С-ловушки, в данных условиях. Для проверки этого утверждения было выполнено сканирование в широком и узком диапазоне масс при использовании этанола в качестве добавки. На рис. 35 представлены результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД с использованием различных добавок при применении узкого и широкого диапазона сканирования масс при использовании этанола в качестве добавки.



Рисунок 35 Матричные эффекты при применении метода ВЭЖХ-МСВР с различными режимами сканирования в условиях ФХИАД с использованием этанола в качестве добавки, (n=3, P=0.95).

Из рис. 35 видно, как значительно падает значение матричного эффекта, варьируя от 8 до 13 % при уменьшении диапазона сканирования. Это свидетельствует о том, что наблюдаемый матричный эффект при широком диапазоне сканирования связан с «перегрузкой» С-ловушки, вызванной тем, что

ионы мешающих компонентов матрицы со сродством к протону выше, чем у этанола, оказались в ней. Уменьшая диапазон сканирования, мы препятствуем их проникновению в С-ловушку. Вместе с тем, уменьшение диапазона сканирования ограничивает основное достоинство метода, его универсальность метода. Опираясь на достигнутые результаты минимизации матричных эффектов в условиях ФХИАД с использованием добавок, изучали перспективновность предложенного подхода для скрининга большого числа анаболических стероидов в биологических жидкостях.

#### 5.4 Определение стероидов в моче методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД

# 5.4.1 Поиск оптимальной подвижной фазы для ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД при определении стероидов

Несмотря на то, что ХИАД в сочетании с оптимизацией программы градиентного элюирования позволила значительно минимизировать матричный эффект, определение большого числа стероидов в ходе анализа приводит к ухудшению экспрессности анализа в целом. В таком контексте возник интерес к фотохимической ионизации при атмосферном давлении. Дело в том, что при фотохимической ионизации С использованием добавок, как показали эксперименты по изучению матричных эффектов, удается подавить ионизацию мешающих компонентов матрицы, обладающих низким сродством к протону, так как перенос протонов от растворителей, используемых в качестве подвижной фазы, к этим соединениям становится энергетически невыгодным. Таким образом, потенциально, возникает возможность избежать «перегрузки» орбитальной ионной ловушки [214].

Для изучения эффективности подхода, основанного на использовании ФХИАД с добавлением этанола, изопропанола, ацетона и тетрагидрофурана в подвижную фазу, для скрининга оценивали степень выявления 57 анаболических стероидах в образцах мочи. Степень выявления запрещенного биорегулятора представляла собой отношение числа проб, в которых был обнаружен искомый биорегулятор, к общему числу анализированных проб, содержащих данный биорегулятор. Для оценки этой величины в образцы мочи от 10 добровольцев добавляли исследуемые стероиды. При этом концентрация каждого определяемого стероида во всех исследуемых образцах составляла 2 нг/мл. Результаты данного исследования представлены в табл. 18.

**Таблица 18** Влияние исследуемых добавок на степень выявления анаболических стероидов и их метаболитов при использовании ВЭЖХ-МСВР с фотохимической ионизации при атмосферном давлении (концентрация определяемых стероидов составляет 2 нг/мл)

D	Степень выявления анаболических стероилов и их метаболитов					
Выявляемое соединение	Этанол	Тетрагид рофуран	Ацетон	Изопропан ол		
17β-метил-5β-андрост-1-ен-	10/10	10/10	10/10	10/10		
3α,17α-диол						
17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-	10/10	10/10	10/10	10/10		
пиразол-3',17β-диол						
17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-	10/10	10/10	10/10	10/10		
пиразол-16β,17β-диол						
17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-	10/10	10/10	10/10	10/10		
пиразол-4β,17β-диол						
17β-гидроксиэстра-4,9,11-триен-	10/10	10/10	10/10	10/10		
3-он (Тренболон)	20/20	10/10	10/10	10/10		
17α- гидроксиэстра-4,9,11-триен-	10/10	10/10	10/10	10/10		
3-он	20/20	10/10	10/10	10/10		
9-Фтор-17α-метил-11β,17β-	10/10	10/10	10/10	10/10		
дигидроандрост-4-ен-3-он	10/10	10/10	10/10	10,10		
13-этил-17-гидрокси-18,19-dinor-						
17α-прегнан-4,9,11-триен-20-ин-	10/10	10/10	10/10	10/10		
3-он						
13-этил-17-гидрокси-18,19-динор-	10/10	10/10	10/10	10/10		
17α-прегна-4,9,11-триен-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10		
17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-	10/10	10/10	10/10	10/10		
5α-андростан-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10		
17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-	10/10	10/10	10/10	10/10		
5α-андростан-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10		
4-хлор-17β-гидрокси-17α-	10/10	10/10	10/10	10/10		
метиландроста-1.4-диен-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10		
4-хлор-66,176-лигидрокси-17α-	10/10	10/10	10/10	10/10		
метиландроста-1.4-лиен-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10		
17β-гидрокси-5α-андростано [3.2-	1/10	3/10	10/10	10/10		
с] пиразол	1/10	J/ 10	10/10	10/10		

	Степень выявления анаболических						
Выявляемое соединение	стероидов и их метаболитов						
	Этанол	Тетрагид	Ацетон	Изопропан			
		рофуран		ОЛ			
6β,17β-дигидрокси-17α-	10/10	10/10	10/10	10/10			
метиландроста-1,4-диен-3-он							
2α-Гидроксиметилэтистерон	10/10	10/10	10/10	10/10			
17α-этинил-17β-гидроксиандрост-	2/10	5/10	10/10	10/10			
4-ено[2,3-d]изоксазол	_,		10/10	10/10			
17α-гидроксиандроста-1,4-диен-3-	10/10	10/10	10/10	10/10			
ОН							
17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-	10/10	10/10	10/10	10/10			
ОН							
андроста-1,4-диен-3,17-дион	10/10	10/10	10/10	10/10			
13-этил-17-гидрокси-18,19-	10/10	10/10	10/10	10/10			
динорпрегна-4-ен-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9-	10/10	10/10	10/10	10/10			
диен-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
17-Гидроксипрегна-4-ен-20-ин-3-	10/10	10/10	10/10	10/10			
ОН							
17β-гидрокси-17α-метил-5α-	10/10	10/10	10/10	10/10			
андрост-1-ен-3-он							
17β-гидрокси-5α-андрост-1-ен-3-	10/10	10/10	10/10	10/10			
ОН							
4-хлор-17β-гидроксиандрост-4-ен-	10/10	10/10	10/10	10/10			
3 -он							
17β-гидрокси-2α-метил-5α-	10/10	10/10	10/10	10/10			
андростан-3-он							
1/β-гидрокси-1/α-метил-5α-	10/10	10/10	10/10	10/10			
андростан-3-он							
1 /β-гидрокси-І-метил-5α-андрост-	10/10	10/10	10/10	10/10			
1 -eH-3-0H							
1/р-гидрокси-2а,1/а-диметил-5а-	10/10	10/10	10/10	10/10			
андростан-э-он							
1/p-гидрокси-г/а-метилэстра-	10/10	10/10	10/10	10/10			
т, , , 11-1рисп-3-0н 178-гилрокси-7а 17а-	10/10	10/10	10/10	10/10			
1/р-1идрокон-/и,1/и- лиметилэстра-Дец-З-оц	10/10	10/10	10/10	10/10			
4 170 4 2	4/10	7/10	10/10	10/10			
4,1 / р-дигидроксиэстра-4-ен-3-он	-1/10	// 10	10/10	10/10			

	Степень выявления анаболически						
Выявляемое соединение	ст	стероидов и их метаболитов					
	Этанол	Тетрагид	Ацетон	Изопропан			
		рофуран		ОЛ			
4,17β-дигидрокси-17α-	10/10	10/10	10/10	10/10			
метиландрост-4-ен-3-он							
1α-метил-эα-андростан-зα-ол-1/- он	10/10	10/10	10/10	10/10			
1-метилен-5α-андростан-3α-ол- 17-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
17α-метил-5α-андростано[2,3-с]- фуразан-16β,17β-диол	10/10	10/10	10/10	10/10			
2α-метил-5α-андростан-3α-ол-17- он	10/10	10/10	10/10	10/10			
2-гидроксиметил-17α- метиландрост-1,4-диен-11α,17β- диол-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
бα-гидроксиандрост-4-ен-3,17- дион	10/10	10/10	10/10	10/10			
4-хлор-3α-гидроксиандрост-4-ен- 17-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
7α,17α-диметил-5β-андростан- 3α,17β-диол	10/10	10/10	10/10	10/10			
7β,17α-диметил-5β-андростан- 3α,17β-диол	10/10	10/10	10/10	10/10			
9-фтор-17α-метиландрост-4-ен- 3α,6β,11β,17β-тетрол	10/10	10/10	10/10	10/10			
13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5α- гонан	10/10	10/10	10/10	10/10			
13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5β- гонан	10/10	10/10	10/10	10/10			
17α-этил-5α-эстран-3α,17β-диол	10/10	10/10	10/10	10/10			
17α-этил-5β-эстран-3α,17β-диол	10/10	10/10	10/10	10/10			
17α-метил-5α-андростан-3α,17β- диол	10/10	10/10	10/10	10/10			

D	Степень выявления анаболических						
Выявляемое соединение	Этанол	Тетрагид рофуран	Ацетон	Изопропан ол			
17α-метил-5β-андростан-3α,17β-	10/10	10/10	10/10	10/10			
диол 7α-метилmethyl-19-нор-17α- прегна-5(10)-ен-20-ин-3α,17β- диол	10/10	10/10	10/10	10/10			
5α-эстран-3α-ол-17-он	4/10	5/10	9/10	10/10			
5β-эстран-3α-ол-17-он	5/10	7/10	10/10	10/10			
18-нор-17,17-диметиландроста- 1,4,13-триен-3-он	10/10	10/10	10/10	10/10			
17,17-диметил-18-нор-5β- андроста-1,13-диен-3α-ол	10/10	10/10	10/10	10/10			
1α-метил-5α-андростан-3α,17β- диол	10/10	10/10	10/10	10/10			

Как видно из табл. 18, наиболее эффективной подвижной фазой для выявления запрещенных стероидов в пробах мочи оказалась смесь с добавлением изопропанола, которая была выбрана при валидации способа скрининга 57 анаболических стероидов в моче. Предположительно, это можно объяснить низким сечением фотоионизации изопропанола, способствующим высокому выходу реакций с переносом протонов. Отличительной особенностью массспектров анаболических стероидов, полученных в условиях фотохимической ионизации при атмосферном давлении с данным составом подвижной фазы, является образование протонированных молекул и фрагментных ионов [М+Hи [М+H-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>(Приложение 2). B дальнейшем  $H_2O]^+$ ЭТИ ионы были использованы в качестве диагностических.

## 5.4.2 Скрининг ультрамалых количеств стероидов методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД

Изучение возможности скрининга 57 анаболических стероидов в моче методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД включало в себя оценку специфичности и эффекта подавления ионизации матрицей, установление предела обнаружения и степени извлечения, а также определение повторяемости проводимых анализов [208].

Пробу мочи готовили в соответствии с методикой, описанной в экспериментальной части с одним отличием. Сухой остаток перерастворяли в 40 мкл метанола. В ходе оценки специфичности проверялось наличие мешающих компонентов при скрининге исследуемых соединений в 10 холостых пробах мочи добровольцев, не употребляющих допинговые препараты. Для оценки предела обнаружения в 10 проб мочи добавляли смесь анаболических стероидов таким образом, чтобы концентрация каждого биорегулятора составляла 0.1, 0.2, 0.5, 1 и 2 нг/мл, соответственно. Предел обнаружения определяли, как наименьшую концентрацию биорегулятора (или его метаболита), который детектировали с отношением сигнала к шуму выше, чем 3/1. Поскольку процедура скрининга предполагает четкую дифференциацию между истинно отрицательной и истинно положительной пробой, вышеуказанное условие должно было выполняться для 10 различных проб.

Для валидации предложенного способа скрининга дополнительно были выполнены эксперименты по оценке степени извлечения стероидов из мочи с использованием 5 холостых проб мочи. Для этого в конечные экстракты из холостых проб и непосредственно в холостые пробы добавляли смеси определяемых стероидов. Оценивали степень извлечения по формуле (7). Поскольку, в конечном счете, предлагаемый способ нацелен на проведение качественного анализа, исследование повторяемости полученных результатов ограничивалось оценкой разброса относительного времени удерживания аналитов в течение 10 дней и разбросом отношения площадей хроматографических пиков аналитов к площади пика внутреннего стандарта (метилтестостерон) между несколькими днями (3 дня). Для этого использовали 3 пробы мочи, в которых концентрация аналитов составляла 2 нг/мл.

Из-за сильных взаимодействий между стероидами и графитизированным углеродом выбранная подвижная фаза не позволяет элюировать определяемые соединения в приемлемое для скрининга время при комнатной температуре. Это связано квазипланарной структурой стероидов, способствующей с ИХ удерживанию в неподвижной фазе. Однако, как показали предварительные эксперименты, сильноудерживаемые при комнатной температуре стероиды могут элюироваться из колонки значительно быстрее при повышении ее температуры. В настоящем исследовании использовали колонку Hypercarb 3 µк, 1 × 100 мм. На рис. 36 представлены масс-хроматограммы мочи, использованной для валидации, которые свидетельствуют о высокой селективности определения «проблемных» анаболических стероидов в моче на уровне 2 нг/мл.



Как видно из рис. 36 при использовании колонки с графитизированным углеродом достигается селективное разделение всех «проблемных» стероидов. Их

селективности определения «проблемных» анаболических стероидов (2 нг/мл).

мочи,

20

12

свидетельствующие

Time (min)

m/z 343.2273

20

0

Масс-хроматограммы

13

Time (min)

m/z 271 2419

20

0

Рисунок

14

Time (min)

m/z 271.2419

36

20

0

0

10

Time (min)

m/z 347.2329

высокой

разделение на «традиционных» неподвижных фаз связано с известными трудностями. Время удерживания стероидов и селективность неподвижной фазы выглядят необычными и резко отличаются от «трационных» фаз. Вместе с тем, эта неподвижная фаза демонстрирует уникальную способность к разделению изомерных стероидов. Она успешно разделяет анаболические стероиды, у которых m/z протонированных молекул абсолютно идентичные. К примеру, разделяются такие пары, как 17α-метил-5β-андростан-3α,17β-диол/17α-метил-5αандростан-3а,17β-диол (m/z 271.2417), тренболон/эпитренболон (m/z 271.1693), болденон/метилдиенон (m/z 287.2011), эпиоксандролон/оксандролон (m/z)3'-гидроксистанозолол/16β-гидроксистанозолол/4β-307.2268), гидроксистанозолол (m/z)345.2537), тетрагидрогестринон/этистерон (m/z)313.2162). Стойкость графитизированного углерода к агрессивной среде позволило использовать эту неподвижную фазу при температуре 90°С и pH 2. Благодаря этому открылись новые возможности для хроматографического разделения. Высокая температура колонки привела к уменьшению вязкости подвижной фазы и снижению сопротивлению колонки. Возможность увеличить значения коэффициентов диффузии, ассоциированных с высокой температурой подвижной и неподвижной фаз, создала условия для эффективного разделения компонентов смеси при высоких скоростях потока элюента. Кроме того, выбранные условия позволяют минимизировать мешающее влияние Заданное интерференций. «окно» для построения масс-хроматограмм не превышало 5 ррт. При анализе 10 холостых проб мочи ни в одном случае не наблюдалось совпадение времен удерживания интерферирующих компонентов и определяемых биорегуляторов и их метаболитов. В ходе валидации время удерживания не отклонялось более чем на 0.05 минут от среднего значения. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что время удерживания и точные m/z одного иона определяемого соединения достаточно для селективного детектирования анаболических стероидов. Результаты оценки значения матричного эффекта, предела обнаружения и точности измерения

В

представлены

171

19.

табл.

**Таблица 19** Экспериментальные данные, полученные в ходе разработки и валидации процедуры скрининга анаболических стероидов методом высокотемпературной жидкостной хроматографии в сочетании с орбитальной ионной ловушки с фотохимической ионизации при атмосферном давлении.

	Соединение	Диагностичн. ион	m/z диагностичн. иона, а.е.м	Средняя точность измерения масс, ppm	Время удержива ния, мин.	Матричный Эффект, %	Предел обнаруже ния, нг/мл	Степень извлечения, %
1	17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α- диол (метаболит Метандиенона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	269.2264	1.8	14.71	7	0.1	93
2	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]- пиразол-3',17β-диол (метаболит Станозолола)	[M+H]	345.2537	2.9	9.46	11	0.1	71
3	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]- пиразол-16β,17β-диол (метаболит Станозолола)	[M+H]	345.2537	2.3	22.78	5	0.5	77
4	17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]- пиразол-4β,17β-диол (метаболит Станозолола)	[M+H]	345.2537	2.6	14.43	10	0.5	74
5	17β-гидроксиэстра-4,9,11-триен-3- он (Тренболон)	[M+H]	271.1693	1.1	12.15	9	0.1	98
6	17α- гидроксиэстра-4,9,11-триен-3- он (Эпитренболон)	[M+H]	271.1693	0.7	16.07	8	0.1	99
7	9-Фтор-17α-метил-11β,17β- дигидроандрост-4-ен-3-он (флюоксиместерон)	[M+H]	337.2173	2.4	7.11	15	0.5	79
8	13-этил-17-гидрокси-18,19-dinor- 17α-прегнан-4,9,11-триен-20-ин-3- он (Гестринон)	[M+H]	309.1849	2.9	13.00	12	0.5	96
9	13-этил-17-гидрокси-18,19-динор- 17α-прегна-4,9,11-триен-3-он (Тетрагидрогестринон)	[M+H]	313.2162	1.6	10.73	8	0.5	92
10	17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5α- андростан-3-он (Оксандролон)	[M+H]	307.2268	1.9	16.30	7	0.5	98
11	17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α- андростан-3-он (метаболит Оксандролона)	[M+H]	307.2268	1.9	14.70	11	0.5	99

	Соединение	Диагностичн. ион	m/z диагностичн. иона, а.е.м	Средняя точность измерения масс, ppm	Время удержива ния, мин.	Матричный Эффект, %	Предел обнаруже ния, нг/мл	Степень извлечения, %
12	4-хлор-17β-гидрокси-17α-							
	метиландроста-1,4-диен-3-он (Орал Туринабол)	[M+H]	335.1778	3.9	13.44	6	0.5	76
13	4-хлор-6β,17β-дигидрокси-17α-		215 1521	57	12 41	7	0.5	<u>(</u> )
	метиландроста-1,4-диен-3-он (метаболит Орад Туринабода)	$[M+H-2H_2O]$	315.1521	5.7	13.41	1	0.5	68
14	17β-гидрокси-5α-андростано [3,2-с] пиразол (Prostanozol)	[M+H]	315.2436	2.2	18.90	10	1	75
15	6β,17β-дигидрокси-17α-							
	метиландроста-1,4-диен-3-он	$[M+H-H_2O]$	299.2011	1.0	9.47	6	0.5	99
16	(метаболит Метандиенона)							
10	(метаболит Даназола)	[M+H]	343.2273	2.9	11.89	8	0.5	83
17	17α-этинил-17β-гидроксиандрост-4- ено[2,3-d]изоксазол (Даназол)	[M+H]	338.2120	1.5	15.25	5	1	91
18	17α-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (α-Болденон)	[M+H]	287.2011	2.0	16.15	11	0.5	98
19	17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (Болденон)	[M+H]	287.2011	1.7	14.23	8	0.5	95
20	андроста-1,4-диен-3,17-дион (Болдион)	[M+H]	285.1855	1.7	17.63	12	0.5	96
	13-этил-17-гидрокси-18,19-					_		
21	динорпрегна-4-ен-3-он	[M+H]	317.2481	0.9	8.94	7	0.5	94
22	(пороолетон) 17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9- диен-3-он (Метилдиенолон)	[M+H]	287.2011	5.2	11.73	6	0.5	97
23	17-Гидроксипрегна-4-ен-20-ин-3-он (Этистерон)	[M+H]	313.2168	4.8	10.08	9	0.5	86
	17β-гидрокси-17α-метил-5α-							
24	андрост-l-ен-3-он (Метил-1- тестостерон)	[M+H]	303.2318	1.3	18.23	9	0.5	96
25	17β-гидрокси-5α-андрост-1-ен-3-он (1-Тестостерон)	[M+H]	289.2162	1.7	16.46	7	0.5	95
26	4-хлор-17β-гидроксиандрост-4-ен-3 - он (Клостебол)	[M+H]	323.1772	0.1	13.53	7	0.5	97

	Соединение	Диагностичн. ион	m/z диагностичн. иона, а.е.м	Средняя точность измерения масс, ppm	Время удержива ния, мин.	Матричный Эффект, %	Предел обнаруже ния, нг/мл	Степень извлечения, %
27	17β-гидрокси-2α-метил-5α- андростан-3-он (Дростанолон)	[M+H]	305.2475	0.6	19.95	5	0.5	98
28	17β-гидрокси-17α-метил-5α- андростан-3-он (Местанолон)	$[M+H-H_2O]$	287.2368	1.4	16.07	7	0.5	96
29	17β-гидрокси-І-метил-5α-андрост-1 - ен-3-он (Метенолон)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	285.2206	1.0	13.47	9	0.5	97
30	17β-гидрокси-2α,17α-диметил-5α- андростан-3-он (Метастерон)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	301.2524	0.9	18.27	6	0.5	89
31	17β-гидрокси-17α-метилэстра- 4,9,11-триен-3-он (Метилтриенолон)	[M+H]	285.1847	1.0	10.50	6	0.5	94
32	17β-гидрокси-7α,17α-диметилэстра- 4-ен-3-он (Миболерон)	[M+H]	303.2312	0.6	13.27	8	0.5	100
33	4,17β-дигидроксиэстра-4-ен-3-он (Оксаболон)	[M+H]	291.19547	2.0	16.53	11	1	95
34	4,17β-дигидрокси-17α- метиландрост-4-ен-3-он (Оксиместерон)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	283.2055	0.1	10.73	7	0.5	100
35	1α-метил-5α-андростан-3α-ол-17- он (метаболит Местеролон)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	287.2368	0.3	14.41	11	0.5	98
36	1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17- он (метаболит метенолона)	$[M+H-H_2O]$	285.2218	2.1	15.10	8	0.5	98
37	17α-метил-5α-андростано[2,3-с]- фуразан-16β,17β-диол (метаболит Фуразабола)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	329.2229	2.4	10.05	8	0.5	84
38	2α-метил-5α-андростан-3α-ол-17- он (метаболит Дростанолона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	269.2263	0.7	14.44	6	0.5	97
39	2-гидроксиметил-17α- метиландрост-1,4-диен-11α,17β- диол-3-он (метаболит Формеболона)	[M+H]	347.2209	0.3	11.47	9	0.5	95
40	5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он (метаболит Болденона)	[M+H]	289.2156	0.3	12.31	7	0.5	93
41	4-андростен-7α,17β-диол-3-он (4- гидрокситестостерон)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	289.2168	3.4	22.10	5	0.5	91

	Соединение	Диагностичн. ион	m/z диагностичн. иона, а.е.м	Средняя точность измерения масс, ppm	Время удержива ния, мин.	Матричный Эффект, %	Предел обнаруже ния, нг/мл	Степень извлечения, %
42	4-хлор-3α-гидроксиандрост-4-ен- 17-он (метаболит Клостебола)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	305.1664	0.6	13.56	10	0.5	89
43	7α,17α-диметил-5β-андростан- 3α,17β-диол (метаболит Боластерона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	285.2574	0.7	12.81	8	0.5	95
44	7β,17α-диметил-5β-андростан- 3α,17β-diol (метаболит Калустерона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	285.2574	0.1	11.96	6	0.5	98
45	9-фтор-17α-метиландрост-4-ен- 3α,6β,11β,17β-тетрол (метаболит Флюоксиместерона)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	337.2179	5.0	9.63	11	0.5	87
46	13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5α- гонан (метаболит Норболетона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	285.2574	1.7	15.07	9	0.5	99
47	13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5β- гонан (метаболит Норболетона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	285.2574	0.3	13.77	5	0.5	97
48	17α-этил-5α-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	271.2417	0.4	14.20	5	0.5	98
49	17α-этил-5β-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)	$[M+H-2H_2O]$	271.2417	0.4	12.66	7	0.5	95
50	17α-метил-5α-андростан-3α,17β- диол (метаболит Метилтестостерона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	271.2417	0.7	14.02	6	0.1	97
51	17α-метил-5β-андростан-3α,17β- диол (метаболит Метилтестостерона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	271.2417	0.1	12.87	6	0.1	99
52	7α-метилmethyl-19-нор-17α-прегна- 5(10)-ен-20-ин-3α,17β-диол (метаболит Тиболона)	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	279.2106	0.7	10.06	7	0.5	93
53	5α-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	259.2057	2.7	13.62	7	2	99

	Соединение	Диагностичн. ион	m/z диагностичн. иона, а.е.м	Средняя точность измерения масс, ppm	Время удержива ния, мин.	Матричный Эффект, %	Предел обнаруже ния, нг/мл	Степень извлечения, %
54	5β-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	259.2057	2.7	12.03	6	2	97
55	18-нор-17,17-диметиландроста- 1,4,13-триен-3-он (метаболит Метандиенона)	[M+H]	283.2053	0.7	10.08	11	0.5	98
56	17,17-диметил-18-нор-5β-androsta- 1,13-diene-3α-ol (метаболит Метандиенона)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	269.2262	1.1	11.84	8	0.1	96
57	1α-метил-5α-андростан-3α,17β-диол (метаболит Местеролона) Метилтестостерон ( <b>ITSD</b> )	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	271.2417 303.2318	1.8 1.5	15.42 10.07	5	0.2	95

Из табл. 19 видно, что значение матричного эффекта изменялось от 5 % до 11 % в зависимости от определяемого вещества, что на порядок ниже, чем при электрораспылительной ионизации. Таким образом, ФХИАД позволяет значительно снизить матричные эффект. Из табл. 19 также видно, что для всех стероидов точность измерений масс была лучше, чем 5 ppm с использованием внешней калибровки по массам. На рис. 37 представлены круговые диаграммы распределения точности измерения масс, матричного эффекта, формулы диагностичного иона и предела обнаружения по 57 определяемым стероидам.



**Рисунок 37** Круговые диаграммы распределения точности измерения масс, матричного эффекта, формулы диагностичного иона и предела обнаружения по 57

определяемым стероидам

Из рис. 37 видно, что для 91 % исследованных соединений предел обнаружения составлял 100 – 500 пг/мл. Только для двух стероидов предел обнаружения составил 2 нг/мл. Предложенный подход полностью удовлетворяет требованиям ВАДА к пределам обнаружения. Более того, для подавляющего большинства соединений пределы обнаружения были в 10 раз ниже, чем пределы, установленные ВАДА. Для всех соединений наблюдали в масс-спектрах принадлежащие интенсивные пики, протонированным молекулам или фрагментным ионам [M+H-H2O]+ и [M+H-2H<sub>2</sub>O]+. В 53% случаях наблюдали в масс-спектрах интенсивные пики, принадлежащие протонированным молекулам. Оценка степени извлечения показала, что в этой процедуре может быть использована жидкостно-жидкостная экстракция. Из 57 изученных аналитов для 55 степень извлечения была выше, чем 70 %. Для всех определяемых соединений были относительные времена удерживания стабильны между днями. Относительное стандартное отклонение времен удерживания всех без исключения аналитов было меньше, чем 0.3 %. В свою очередь относительное стандартное отклонение отношения площадей пиков к площади пика внутреннего стандарта изменялось от 0.7 % до 14.5 % в зависимости от компонента.

Для окончательной проверки пригодности предложенной процедуры скрининга был выполнен анализ мочи добровольца принимающего тренболон. Здоровый мужчина, 47 лет принимал два раз в день 12.5 мг (полкапсулы) препарата Parabolan (ацетат тренболана), производимого British Dragon (Таиланд). Протокол исследований предполагал прием одной капсулы в день в течение 5 дней и отбор пробы мочи через две недели после окончания приема препарата.

На рис. 38А приведена масс-хроматограмма мочи добровольца, принимающего тренболон, а на рис. 38В масс-хроматограмма мочи добровольца, не принимающего тренболон.



**Рисунок 38** Масс-хроматограмма мочи добровольца, принимающего тренболон (А) и масс-хроматограмма добровольца, не принимающего препарат и масс-хроматограмма холостой пробы (В).

Как видно из рис. 38А, на масс-хроматограмме присутствует пик с временем удерживания (16.07 мин.), соответствующим времени удерживания эпитренболону (табл. 19). После анализа мочи добровольца, принимающего тренболон, был сразу выполнен анализ мочи добровольца, не принимающего этот препарат (рис. 39В). Из рис. 39В видно, что на масс-хроматограмме отсутствуют пики интерферирующих компонентов. Кроме того, нет перекрестного загрязнения пробы. Это дополнительно свидетельствует об эффективности предложенного способа скрининга анаболических стероидов в моче [208].

## 5.4.3 Сравнение способа определения стероидов методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ в условиях ФХИАД с методами ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР

способов Для сравнения определения анаболических стероидов, основанных на применение методов ГХ-МС/МС [209], ГХ-МСВР и ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, были выбраны 10 модельных стероидов. Все выбранные модельные соединения являлись «проблемными» стероидами. У шести из них тренболон, (оксандролон, эпиоксандролон, эпитренболон, гестринон, тетрагидрогестринон) чрезвычайно низкий выход реакции дериватизации, у остальных (метаболиты метилтестостерона) трудности детектирования связаны с интерферирующими компонентами матрицы при использовании «классических» колонок с обращенной фазой. В данном исследовании автор использовал разработанные им способы определения стероидов методами ГХ-МС/МС, ГХ-МСВР, получившие в дальнейшем широкое распространение в аналитической практике антидопингового контроля [209, 210].

Подготовка проб мочи к анализу проводилась в соответствии с процедурой, описанной в работе автора [210] Концентрация каждого стероида в каждом растворе составляла 0.5 нг/мл. Степень выявления исследуемых стероидов с применением указанных методов представлены в табл. 20.
**Таблица 20** Степень выявления исследуемых стероидов методами ГХ-МС/МС, ГХ-МСВР и высокоэффективной жидкостной хроматографией/орбитальной ионной ловушкой (0.5 нг/мл)

	Степень выявления исследуемых стероидов					
Определяемое соединение	различными методами					
	ГХ-MC/MC	ГХ-МСВР	ВЭЖХ/Орбит			
5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он	9/10	10/10	10/10			
17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α- диол	7/10	10/10	10/10			
1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17-он	10/10	10/10	10/10			
17α- гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он	1/10	5/10	10/10			
17α-метил-5β-андростан-3α,17β- диол	10/10	10/10	10/10			
4-хлороандрост-4-ен-3α-17-он	10/10	10/10	10/10			
17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α- андростан-3-он	10/10	10/10	10/10			
17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5α- андростан-3-он	10/10	10/10	10/10			
4,17β-дигидрокси-17α-метиландрост- 4-ен-3-он	8/10	10/10	10/10			
17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]- пиразол-3',17β-диол	10/10	10/10	10/10			

Как видно из табл. 20, «проблемные» стероиды были успешно обнаружены методом ВЭЖХ в сочетании с орбитальной ионной ловушкой по сравнению с другими методами. Это свидетельствует о целесообразности предложенного способа для скрининга «проблемных» стероидов.

Сочетание ФХИАД с ВТЖХ-МСВР/ОЛ способствовало значительному снижению матричного эффекта (до 5% для некоторых стероидов), достигнутому благодаря совместному использованию изопропанола и графитизированного углерода в качестве подвижной фазы и неподвижной фазы соответственно. Результатом применения данного подхода стал предложенный способ скрининга, исключающий стадию дериватизации, 57 анаболических стероидов на уровне 0.1 – 2 нг/мл. Предлагаемый способ обладает рядом достоинств. Он позволяет существенно снизить временные затраты на проведение анализа. Это особо

актуально, когда в лабораторию поступает большое число проб и необходимо очень быстро представить результаты анализа. Универсальность предложенного подхода дает возможность легко добавить в список определяемых веществ новые соединения без изменений хроматографических и масс-спектрометрических условий в отличие от сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, где необходимо оптимизировать условия диссоциации, индуцированной соударениями. Более того, получение массспектров в режиме полного сканирования в сочетании с точным измерением масс разрешении при сверхвысоком является мощным инструментом для ретроспективного анализа проб [212]. Хотя в данном исследовании показано успешное применение предлагаемого подхода только в допинговом контроле, вышеописанный подход может быть применен и в других аналитических службах, где выполняется скрининг стероидов.

#### ГЛАВА 6 СОЧЕТАНИЕ ВЭЖХ-МСВР/ОЛ С ХИИЭР

#### 6.1 История вопроса

Поскольку ионизация электрораспылением протекает при атмосферном давлении и в газовой фазе оказываются не только заряженные частицы определяемых молекул, но и заряженные частицы компонентов подвижной фазы, есть основание предполагать, что в газовой фазе будут протекать ионмолекулярные реакции, которые могут повлиять на степень ионизации определяемых соединений. По всей видимости эти реакции будут протекать после того, как заряженные частицы определяемых соединений «покинут» жидкую фазу. Поэтому здесь уместно говорить о химической ионизации, индуцированной электрораспылением.

Открыта была химическая индуцированная ионизация, электрораспылением, Кэлли и коллегами [215]. Изучая электрораспыление растворов пептидов при высоком значении рН элюента, они обнаружили в их масс-спектрах интенсивные пики, принадлежащих протонированным молекулам. Согласно общепринятым представлениям, при этих условиях в масс-спектрах были пептидов должны присутствовать принадлежащие пики, депротонированным молекулам. Однако они показали, что интенсивность пиков не зависила от рН раствора. Эти результаты нашли подтверждение в исследованиях Хираока. Исследуя водные растворы аминокислот, содержащие гидроксид аммония или уксусную кислоту, Хираока показал, что во всех случаях интенсивности пика, относящегося к протонированной молекуле, в масс-спектре были сопоставимы [216]. Он выдвинул гипотезу, что после электрораспыления в газовой фазе протекают ион-молекулярные реакции с переносом протонов. Он предположил, что протонированные в ходе электрораспыления молекулы, оказавшись в газовой фазе, будут терять свои протоны, если в газовой фазе будут присутствовать компоненты подвижной фазы с превышающей основностью. С этой точки зрения аналиты, которые испаряются из капель как нейтральные соединения, могут ионизироваться в ходе этих реакций. То есть реакции с

переносом протонов в газовой фазе будут происходить только в том случае, если будет инверсия в шкале основности при переходе частиц из жидкой фазы в газовую фазу. Здесь важно отметить, что инверсия в шкале основности в принципе возможна, поскольку основность в жидкой фазе и сродство протонов в газовой фазе не обязательно должны быть жестко связаны между собой. Другими словами, соединения с высоким сродством к протону в газовой фазе могут не обладать высокой основностью в жидкой фазе. В этом случае, в газовой фазе молекула с высоким сродством к протону будет отрывать протон у другой молекулы с низким сродством. Хираока предположил, что в условиях химической ионизации, индуцированной электрораспылением, компоненты подвижной фазы с высоким сродством протонов в газовой фазе могут полностью подавить ионизацию определяемых соединений. Другими словами, сродство протонов в газовой фазе компонентов подвижной фазы в условиях химической ионизации, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР), играет роль своеобразного порога, которого аналитам нужно преодолеть, если мы хотим их детектировать. Таким образом, в условиях ХИИЭР имеет значение не только ионизация в жидкой фазе, но и ион-молекулярные реакции в газовой фазе. Учитывая высокое сродство протонов в газовой фазе экзогенных физиологически активных веществ и их метаболитов, открывается возможность подавить ионизацию мешающих компонентов матрицы, имеющих низкое сродство к протону в газовой фазе, добавляя в подвижную фазу компоненты с умеренным сродством в газовую фазу.

Таким образом, можно избежать «перегрузки» орбитальной ионной ловушки и минимизировать матричный эффект, обусловленный емкостью Словушки. Хотя исследователи активно использовали химическую ионизацию, инициируемую электрораспылением при определении аминокислот и пептидов для установлении механизмов протекающих ион-молекулярных реакциях, анализ литературных данных показал, что данный способ ионизации не применялся целенаправлено в аналитической практике к началу исследований автора [182]. Кроме того, до исследований автора химическая ионизация, индуцированная

электрораспылением не применялась в сочетании с орбитальной ионной ловушкой.

### 6.2 Исследование матричного эффекта при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР

Изучение влияния условий химической ионизации, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР), на матричный эффект, ассоциированный с емкостью С-ловушки, было направлено на решение проблемы ее «перегрузки» при анализе сложных по составу смесей [182]. Вышеуказанные условия ХИИЭР достигались электролитами, имеющими различное сродство к протону в газовой фазе. При их выборе также учитывали совместимость с условиями разделения ультраэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Поэтому в настоящем исследовании в качестве электролитов использовали муравьиную кислоту уксусную кислоту и гидроксид аммония, для которых сродство к протону составляло 742 кДж/моль, 783 кДж/моль и 853 кДж/моль соответственно. Поскольку муравьиная кислота широко используется в качестве добавки к подвижной фазе в жидкостной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, она была выбрана для была выбрана для сравнения. В качестве модельных веществ использовали 6β-гидроксиоралтуринабол, эпиоксандролон, эфедрин, метилэфедрин и торасемид. 6β-гидроксиоралтуринабол и эпиоксандролон были выбраны для сопоставления с ранее полученными подходами снижения матричных эффектов. Поскольку, в литературе нет сведений о сродстве к протонам ФАВ в газовой фазе, при выборе модельных веществ руководствовались различием их кислотно-основных свойств в жидкой фазе. Кроме того, выбранные модельные вещества принадлежат к трем большим а именно к анаболическим стероидам, классам запрещенных веществ, стимуляторам и диуретикам. На рис. 39 представлены результаты оценки матричного эффекта при сканировании в узком и широком диапазоне масс в условиях ионизации электрораспылением с добавлением муравьиной кислоты, уксусной кислоты и гидроксида аммония в подвижную фазу.



Торасемид (125 нг/мл)

**Рисунок 39** Оценка матричного эффекта при сканировании в узком и широком диапазоне масс в условиях ХИИЭР с добавлением муравьиной кислоты, уксусной кислоты и гидроксида аммония в подвижную фазу

186

Как видно из рис. 39 при переходе от широкого диапазона сканирования к узкому диапазону значение матричного эффекта для всех веществ меньше всего изменялось при использовании гидроксида аммония в качестве добавки к подвижной фазе. Ни для одного исследуемого вещества, вне зависимости от его кислотно-основных свойств, изменение матричного эффекта, при добавлении гидроксида аммония в подвижную фазу, не превышало 15%. Эти данные свидетельствуют о том, что удалось значительно уменьшить матричный эффект, ограниченной емкостью С-ловушки, при обусловленный использовании гидроксида аммония в качестве добавки к подвижной фазе. Другими словами высокое сродство к протону гидроксида аммония в газовой фазе способствует уменьшению «перегрузки» С-ловушки, так как в ней могут оказаться только ионы соединений, обладающие большим сродством к протону в газовой фазе, чем у гидроксида аммония. Таким образом, благодаря ионно-молекулярным реакциям, протекающим в газовой фазе можно уменьшить от 5 до 10 раз «популяцию» ионов в С-ловушке в зависимости от определяемого соединения и повысить чувствительность ионной ловушки в целом при анализе сложных по составу смесей. То есть созданы предпосылки к изучению возможности скрининга широкого круга ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР [182].

#### 6.3 Скрининг ФАВ методом УЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР

проблем Одна антидопинговых центров ИЗ основных является необходимость проведения скрининга широкого круга запрещенных веществ за короткий промежуток времени. Сегодня многие биорегуляторы, добавленные в список запрещенных веществ ВАДА, надежно и эффективно детектируются только методом ВЭЖХ-МС. Теоретически, метод ВЭЖХ-МС может быть биорегуляторов для обширного скрининга В рамках применен одной аналитической процедуры. При этом биорегуляторы могут существенно различаться как по химическим, так и по фармакологическим свойствам. Сегодня при применении жидкостной хроматомасс-спектрометрии биоаналитические лаборатории все чаще испольуют метод ВЭЖХ совместно с тандемной массспектрометрией. При применении данного метода известные вещества и их метаболиты детектируются с использованием селективных переходов. Безусловно, такой подход позволяет достичь очень низких пределов обнаружения. Однако он имеет существенное ограничение, связанное с трудоемкой процедурой исследования МС/МС спектров для поиска селективных переходов. Учитывая ежегодное пополнение списка новыми запрещенными ФАВ, возникает острая потребность в разработке подхода, позволяющего снизить временные затраты на разработку новых способов скрининга или на расширение круга определяемых ФАВ существующими способами. При таком подходе можно направить высвобожденные ресурсы на разработку эффективных способов выполнения подтверждающих анализов, отвечающих высоким критериям идентификации. Концептуально эту проблему можно решить методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования. В этом случае селективность определения достигается за счет высокого разрешения и точности измерения масс, достигаемые при сочетании высокоэффективной жидкостной хроматографии с орбитальной ионной ловушкой. Однако матричный эффект, обусловленный ограниченной емкостью Словушки (интегральная часть ΟЛ), препятствует достижению высокой чувствительности при анализе сложных по составу смесей.

Несмотря на достигнутые в работе успехи в детектировании ультрамалых количеств аналитов в моче спортсменов при использовании химической и фотохимической ионизации при атмосферном давлении, стало очевидным, что при расширении круга определяемых биорегуляторов, запрещенных в спорте, нельзя обойтись без УЭЖХ с обращенной фазой. Опираясь на успехи в уменьшении матричных эффектов, достигнутых при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР, целью настоящего исслелования стало изучение возможности скрининга стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидроксиарилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-

гидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида, охватывающих широкий круг ФАВ предлагаемым подходом.

Учитывая агрессивность подвижной фазы, содержащей гидроксид аммония, хроматографическое разделение компонентов было выполнено с использованием колонки Acquity UPLC BEH C18 1.7 µк, 2.1 × 50 мм. На рис. 40 представлена масс-хроматограмма мочи, использованной в ходе валидации, после 1050 анализов.



Рисунок 41 Масс-хроматограммы мочи для m/z [M+H]<sup>+</sup> и [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ФАВ, полученные методом ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР)



Фенбутразат

Прентиламин

Оксилофрин

Ортетамин

190



Рисунок 41 (Продолжение)

Как видно из рис. 41 добавление гидроксида аммония (рН 10.3) не привело к ухудшению формы хроматографических пиков и к потере хроматографической эффективности. Среднее относительное стандартное отклонение относительных времен удерживания составляло 0.27 %. После анализа более 1000 реальных хроматографические С образцов пики оставались симметричными. данной проблемных использованием колонки удалось разделить ряд анаболических стероидов и их метаболиты с идентичными m/z за приемлемое время. К примеру, успешно были разделены З'-гидроксистанозолол/16βгидроксистанозолол/4β-гидроксистанозолол 345.2537), (m/z)тренболон/эпитренболон, оралтуринабол/эпиоралтуринабол (m/z)335.1778). болденон/метилдиенолон (m/z 287.2011). Отсутствие интерференций на массхроматограммах мочи также свидетельствует 0 высокой селективности определения.

191

В настоящем исследовании оценка матричных эффектов и предела обнаружения была выполнена для 120 ФАВ. Для оценки предела обнаружения 10 добровольцев. отбирали образцы мочи y Концентрации ΦAB В анализированных образцах распределялись следующим образом: анаболические стероиды – 0.2, 1, 2, 5 нг/мл; селективные модуляторы андрогенных андрогенных рецепторов – 5, 25, 50, нг/мл; антиэстрогены – 5, 25, 50, нг/мл; бета-агонисты – 10, 50, 100, нг/мл, бета-блокаторы – 50, 250, 500 нг/мл, кортикостероиды – 3, 15, 30 нг/мл, диуретики – 25, 125, 250 нг/мл, стимуляторы – 50, 250, 500 нг/мл. Поскольку предлагаемый способ скрининга ФАВ направлен на решение задач антидопингового контроля, были выбраны концентрации, которые отвечают требованиям ВАДА к пределам обнаружения. Эти требования опираются на концентрации, при которых наблюдается физиологический эффект от приема этих веществ. Поскольку основная задача скрининга является четкая дифференциация между истинно отрицательной и истинно положительной пробой на заданном концентрационном уровне, предел обнаружения определяли, как наименьшую концентрацию биорегулятора (или его метаболита) при которой решается эта задача с отношением сигнала к шуму выше, чем 10/1. При этом наименьшее содержание биорегулятора должно детектироваться во всех 10 анализируемых пробах, включенных в исследовании. Результаты оценки матричного эффекта, а также пределы обнаружения, полученные в ходе изучения возможности скрининга широкого круга биорегуляторов, запрещенных в спорте методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР представлены в табл.21.

**Таблица 21** Результаты оценки матричного эффекта и предела обнаружения, полученные при изучении возможности скрининга широкого круга биорегуляторов, запрещенных в спорте методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР скрининга широкого круга биорегуляторов, запрещенных в спорте

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Т <sub>уд</sub> , мин	Точность изм. масс, ppm	Матричый эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
17β-метил-5β-андрост-1-ен-	[M+H-2H <sub>2</sub> O]	269.2262	9.84	1.5	9	85	< 0.2
3α,1/α-диол (эпиметендиол)	[M+H]	345 2533	6 88	2.0	35	90	<02
3 -гидроксистанозолол	[M+H]	345 2533	0.00 7.64	1.1	30	03	<0.2
16'-гидроксистанозолол		271 1602	7.04	0.4	52	95 97	<0.2
Тренболон		271.1092	7.02	0.4	32	07	<1
Эпитренболон		2/1.1692	1.24	1.4	34	93	<1
9α-фтор-18-нор-17,17- лиметип-4 13-лиен-118-оп-3-	[M+H]	319.2068	8.52	0.3	36	97	<1
он (метаболит							
флюоксиместерона)		200 10 10		0.6	•		
Гестринон	[M+H]	309.1849	7.52	0.6	29	98	<1
Тетрагидрогестринон	[M+H]	313.2162	8.27	0.6	20	89	<1
Оксандролон	[M+H]	307.2267	7.27	1.3	17	99	<1
Эпиоксандролон	[M+H]	307.2267	8.12	1.3	14	87	<1
Орал Туринабол	[M+H]	335.1777	8.04	0.3	13	94	<1
Эпиоралтуринабол	[M+H]	335.1777	8.54	0.6	17	91	<1
6-гидроксиоралтуринабол	[M+H]	351.1721	6.63	1.4	47	51	<1
Простанозол	[M+H]	315.2436	8.18	1.6	24	91	<1
Кленбутерол	[M+H]	277.0869	6.52	0.4	37	76	0.4
6β-гидроксиметандиенон (метаболит Метандиенон_)	[M+H-H <sub>2</sub> O]	299.2011	5.87	1.0	41	97	<1
2α- гидроксиметилэтилэтистерон	[M+H]	343.2273	7.23	0.9	13	94	<1
(метаболит Даназола_) Даназол	[M+H]	338.2120	8.61	2.9	42	95	<1
α-Болденон	[M+H]	287.2011	7.17	1.4	56	100	5

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матр ичый эффе кт, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Болленон	[M+H]	287.2011	7.64	1.7	51	97	5
Метициенолон	[M+H]	287 2011	7 36	03	33	99	<1
Боллион		285 1855	6 79	1.7	23	87	5
волдион	[[11]+11]	203.1033	0.79	1./	23	07	5
Ралоксифен	[M+H]	474.1739	8.22	1.7	32	94	<5
3-Гидрокси-4- метокси тамоксифен	[M+H]	418.2382	9.61	1.2	15	91	<5
Аминоглутетимид	[M+H]	233.1285	2.91	0.1	6	75	<5
Анастрозол	[M+H]	294.1719	5.33	2.0	33	99	<5
Экземестан	[M+H]	297.1849	7.40	0.7	10	84	<5
Дигидроэкземеста	[M+H]	299.2004	7.75	0.7	6	95	<5
н Флювестран	[M+H]	607.3244	9.42	0.3	7	88	<5
Салметерол	[M+H]	416.2793	9.76	0.9	58	100	<10
Фенотерол	[M+H]	304.1549	2.90	1.0	16	88	<10
Формотерол	[M+H]	345.1808	5.56	1.1	35	79	<10
Банбутерол	[M+H]	368.2185	6.91	1.1	62	57	<10

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матрич ый эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Ацебуталол	[M+H]	337.2127	6.18	2.1	47	25	<50
Алпренолол	[M+H]	250.1807	8.35	2.8	43	86	<50
Атенолол	[M+H]	267.1709	2.22	1.9	50	13	50
Бетаксолол	[M+H]	308.2226	8.24	2.6	55	82	<50
Бисопролол	[M+H]	326.2331	7.71	1.8	45	85	<50
Бунолол	[M+H]	292.1913	6.85	1.8	47	80	<50
Буфетолол	[M+H]	324.2175	5.15	1.5	41	100	50
Картеолол	[ <b>M</b> + <b>H</b> ] 3	293.1860	5.34	0.7	44	18	<50
Карведилол	[M+H]	407.1971	7.60	1.2	45	97	<50
Целипролол	[M+H]	380.2549	6.82	1.0	42	20	<50
Лабетолол	[M+H]	329.1860	6.23	0.1	52	91	<50
Метипранолол	[M+H]	310.2018	7.86	2.2	49	71	<50
Метопролол	[M+H]	268.1907	6.65	0.4	39	56	<50
Надолол	[M+H]	310.2013	5.53	0.6	58	22	<50
Окспренолол	[M+H]	266.1750	7.38	0.3	33	81	<50
Пропранолол	[M+H]	260.1645	8.16	0.4	46	99	<50
Соталол	[M+H]	273.1267	1.59	0.7	52	22	50
Талинолол	[M+H]	364.2595	7.96	0.3	70	76	<50

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричый эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Тимолол	[M+H]	317.1647	7.11	2.2	40	56	<50
Эсмолол	[M+H]	296.1856	6.88	0.3	55	50	<50
дезацетил-гидрокси дефлазакорт	[M+H]	416.2068	2.73	0.5	24	94	10
Беклометазон	[M+H]	409.1782	7.01	1.2	33	65	<5
Бетаметазон	[M+H]	393.2072	6.88	0.2	10	76	<5
Будезонид	[M+H]	431.2434	7.99	2.3	26	92	<5
Циклезонид	[M+H]	541.3165	11.0	0.5	30	94	<5
Клобезазол пропионат	[M+H]	467.2001	4 8.22	1.3	11	95	<5
Дефлазакорт	[M+H]	442.2230	7.39	1.8	8	88	<5
21- Перечетичной теречести	[M+H]	400.2124	6.55	1.5	24	94	<5
Дезацетилдефлазакорт Дезонид	[M+H]	417.2272	7.19	0.9	49	88	<5
Дезоксиметазон	[M+H]	377.2128	7.32	1.3	30	94	<5
Дексаметазон	[M+H]	393.2077	6.88	1.2	45	98	<5
Флуметазон	[M+H]	411.1978	6.75	0.5	35	98	<5
Флунизолид	[M+H]	435.2177	7.13	0.4	37	97	<5
Флукортолон	[M+H]	377.2123	7.16	0.3	18	90	<5
Метилпреднизолон	[M+H]	375.2171	7.01	0.8	35	82	<5

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричый эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Триамцинолон	[M+H]	395.1870	5.12	1.5	28	78	<5
Триамцинолон Ацетонид	[M+H]	435.2177	6.98	0.1	10	45	<5
Преднизолон	[M+H]	361.2009	6.34	0.3	25	64	<5
Преднизон	[M+H]	359.1858	5.93	1.1	19	88	<5
Ацетазоламид	[M+H]	222.9954	0.58	0.4	12	96	250
Амилорид	[M+H]	230.0552	1.60	0.4	9	79	125
Хлортиазид	[M+H]	295.9561	0.62	0.3	5	94	250
Хлорталидон	[M+H]	339.0201	2.96	1.2	65	89	<25
Этакриновая кислота	[M+H]	303.0185	5.15	1.6	7	87	250
Гидрохлоротиазид	[M+H]	297.9717	0.95	1.0	53	94	125
Индапамид	[M+H]	366.0679	5.21	0.8	31	81	<25
Триамтерен	[M+H]	254.1149	3.59	0.4	24	87	<25
Алтиазид	[M+H]	383.9901	2.71	2.3	47	90	<25
Бензтиазид	[M+H] <sub>3</sub>	431.9913	6.06	1.1	54	79	125
Циклотиазид	[M+H]	390.0344	5.50	0.2	36	89	250
Клопамид	[M+H]	346.0992	4.30	1.1	54	83	<25
Торасемид	[M+H]	349.1329	4.84	0.6	17	70	<25
Пробенецид	[M+H]	286.1108	3.50	1.0	13	79	125

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричый эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Адрафинил	[M+H]	290.0845	4.54	0.3	85	23	50
Фампрофазон	[M+H]	378.2545	9.38	1.6	75	44	50
Мефентермин	[M+H]	164.1439	6.75	4.2	57	30	<50
Модафинил	[M+H]	274.0896	5.67	0.4	64	20	100
Норфенфлурамин	[M+H]	204.1000	7.52	2.9	42	32	<50
6β- Гидроксибромантан	[M+H]	322.0801	8.69	0.3	69	31	100
Этилефрин	[M+H]	182.1176	6.21	2.2	7	30	<50
Метоксифенамин	[M+H]	180.1383	6.21	1.6	10	35	<50
Метилэфедрин	[M+H]	180.1383	6.21	0.5	15	30	50
Пропилгекседрин	[M+H]	156.1747	8.11	1.9	12	33	<50
Селегилин	[M+H]	188.1433	7.74	1.1	15	48	<50
N-Дидезметил- сибутрамин	[M+H]	252.1519	10.10	2.0	17	38	100
Сиднокарб	[M+H]	323.1503	7.23	0.9	29	34	50
р-гидроксимезокарб	[M+H]	339.1457	6.16	1.5	16	44	<50
Пролинтан	[M+H]	218.1903	9.34	0.9	12	61	<50
1,3-	[M+H]	116.1434	6.29	1.7	14	18	<50
диметиллентиламин Туаминогептан	[M+H]	116.1434	6.80	1.7	20	11	<50
Фенбутразат	[M+H]	368.2226	9.21	2.4	25	90	<50

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричый эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Оксилофрин	[M+H]	182.1181	1.32	3.8	18	5	<50
3,3-	[M+H]	212.1435	8.31	0.9	12	66	<50
Дифенилпропиламин Изометгептен	[M+H]	142.1588	6.88	0.1	12	35	<50
4-гидроксиафетамин	[M+H]	152.1070	2.91	1.9	11	6	50
Катин	[M+H]	152.1070	1.3	2.2	14	7	100
Никетамин	[M+H]	179.1170	2.20	5.0	9	75	<50
Ортетамин	[M+H]	150.1283	6.55	4.6	8	36	<50
Клобензорекс	[M+H]	260.1206	9.06	1.9	10	98	<50
Фенкамин	[M+H]	385.2352	8.27	1.3	23	58	<50
Пентилентетразол	[M+H]	139.0970	1.32	5.0	15	63	<50
<i>N</i> -дезметилселегилин	[M+H]	174.1270	7.10	4.0	19	81	<50
(метаболит Селегилина) Псевдоэфедрин	[M+H]	166.1232	4.27	4.8	20	11	50
Эфедрин	[M+H]	166.1232	3.89	4.8	19	8	50
Фоледрин	[M+H]	166.1220	2.19	3.0	12	10	100
Бупренорфин (MRPL=10 ng/ml)	[M+H- H <sub>2</sub> 0]	450.3008	11.37	2.2	15	34	1

Как видно из таблицы 21 при химической ионизации, инициированной электрораспылением, величина матричного эффекта изменялась от 4 % до 85 % в зависимости от определяемого вещества. Таким образом, не удалось в полной мере избавиться от этого явления. Пределы обнаружения для анаболических стероидов не превышали 5 нг/мл. В целом пределы обнаружения находились в интервале 0.2 – 250 нг/мл. Полученные результаты можно объяснить участием ионов аммония, обладающих большим сродством к протону и подавлением ионизации мешающих компонентов матрицы. Таким образом, гипотеза об образовании протонированных молекул В газовой фазе нашла свое подтверждение. Иначе говоря, есть основание предполагать, что ионномолекулярная реакция с участием аналитов и ионов аммония происходит согласно следующей схеме:

$$NH_4^+(c.) + M(c.) \rightarrow NH_3(c.) + MH^+(c.)$$

Отличительной особенностью масс-спектров анаболических стероидов,  $\beta_2$ агонистов,  $\beta$ -блокаторов, веществ с антиэстрогенной активностью, стимуляторов, диуретиков и кортикостероидов, полученных в условиях химической ионизации, инициируемой электрораспылением, как и следовало ожидать, являются интенсивные пики, принадлежащие протонированным молекулам (приложение 3). В редких случаях наблюдали в масс-спектрах интенсивные пики, принадлежащие фрагментным ионам [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Поэтому при скрининге запрещенных в спорте ФАВ ограничились построением одной масс-хроматограммы для m/z одной протонированной молекулы определяемого соединения или для m/z одного фрагментного иона [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

В ходе проводимых исследований сравнивали также уровень химического шума при использовании НСООН и NH<sub>4</sub>OH. На рис. 42 представлена массхроматограмма холостой пробы мочи для m/z основного пика каждого массспектра, полученного при добавлении гидроксида аммония (A) и муравьиной кислоты (B) в подвижную фазу.



**Рисунок 41** Масс-хроматограмма холостой пробы мочи для m/z основного пика каждого масс-спектра, полученного при добавлении муравьиной кислоты (A) и гидроксида аммония (B) в подвижную фазу.

Из рис. 41 видно, что отклик интерферирующих компонентов при использовании гидроксида аммония в качестве подвижной фазы значительно снизился. Это очень важный аспект, так как в этом случае орбитальная ионная ловушка заполняется главным образом ионами определяемых соединений, а не ионами интерферирующих компонентов. Таким образом, низкий предел детектирования определяемых соединений достигается преимущественно за счет резкого снижения отклика мешающих компонентов, в результате чего создаются условия эффективного удерживания и «накопления» ионов определяемых соединений в орбитальной ионной ловушке.

Была выполнена дополнительная соответствии валилация в с рекомендациями Eurochem и ВАДА, которая включала оценку специфичности и определение повторяемости проводимых анализов. Для оценки специфичности предложенного подхода были использованы образцы мочи от 10 добровольцев, не употребляющих допинговые препараты. В ходе оценки специфичности проверялось наличие мешающих компонентов при скрининге исследуемых

соединений в 10 холостых пробах мочи. Поскольку, в конечном счете, предлагаемый подход нацелен на проведение качественного анализа, исследование повторяемости полученных результатов ограничивалось оценкой разброса относительного времени удерживания аналитов в течение 10 дней и разбросом отношение площадей хроматографических пиков аналитов к площади пика внутреннего стандарта (метилтестостерон) между несколькими днями (3 дня). Для этого использовали 3 пробы мочи, в которых концентрация аналитов в два раза превышала требование к пределам обнаружения.

При анализе 10 холостых проб мочи ни в одном случае не наблюдалось совпадение времен удерживания интерферирующих компонентов и определяемых биорегуляторов и их метаболитов. Здесь важно отметить, что допустимый разброс m/z для построения масс-хроматограмм не превышал 10 мДа (рис. 41). В ходе валидации время удерживания не отклонялось более чем на 0.05 минут, а точность измерений масс была не хуже, чем 5 ppm.

Для всех определяемых соединений относительные времена удерживания были стабильны между днями. Относительное стандартное отклонение времен удерживания всех без исключения аналитов было меньше, чем 0.4 %. Кроме того, относительное стандартное отклонение отношения площадей пиков к площади пика внутреннего стандарта для 91 аналита было меньше, чем 10 %.

Для апробации предложенного подхода были выполнены анализы трех реально положительных проб спортсменов для окончательной проверки пригодности предложенного подхода. Присутствие запрещенных биорегуляторов в моче спортсменов было предварительно установлено с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. В первой пробе присутствовал эпиметендиол, во второй – 6β-гидроксиоралтуринабол, а в третьей эпиметендиол. На рис. 42 приведены масс-хроматограммы этих проб, полученные применением высокоэффективной с метода жидкостной хроматографии/орбитальной ловушки химической ионной с ионизацией, индуцированной электрораспылением.



Рисунок 42 Масс-хроматограммы проб, содержащие метаболит эпиметендиола (А), станозолола (В), оралтуринабола (С) и холостых проб (D, E, F), полученные с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии/орбитальной ионной ловушки с химической ионизацией, индуцированной электрораспылением.

Как видно из рис. 42, во всех пробах были обнаружены метаболиты запрещенных биорегуляторов. Важно отметить, что в масс-хроматограммах проб мочи абсолютные времена удерживания метаболитов отклонялись не более чем на 0.03 минуты. После обнаружения положительных проб были сразу выполнены анализы холостых проб (рис. 42). Как видно из рис. 42 на масс-хроматограммах холостых проб отсутствуют как интерференции, так и перекрестное загрязнение проб. Это свидетельствует о высокой эффективности ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР для решения задач антидопингового контроля.

203

Проведенное исследование показало эффективность предложенного способа скрининга 120 ФАВ, основанного на сочатании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР при использовании гидроксид аммония в качестве добавки к подвижной фазы. Отвечая требованиям ВАДА, предъявляемым к способам скрининга с точки зрения селективности и чувствительности, предложенный способ позволяет детектировать больше одной трети запрещенных биорегуляторов в допинговом контроле на основе одной точно измеренной массы протонированной молекулы определяемого соединения в рамках одной процедуры без стадии дериватизации и переключения полярности на входе к масс-анализатору, что резко снижает временные затраты на выполнение скрининга. Такая необходимость возникает, когда в лабораторию поступает большое число проб или объем поступившей пробы не достаточен для выполнения большого числа процедур. Охваченные соединения принадлежат различным химическим классам ФАВ (стероиды, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламины, бензотиодиазины, катехоламины, фенилалкиламины, (β-гидроксифенилэтил)амины и производных бензамида) [182]. Кроме того, универсальность предложенного подхода позволяет легко добавить в список определяемых веществ новые соединения без изменений хроматографических и масс-спектрометрических условий в отличие от сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной массспектрометрией, где при каждом добавлении нового соединения необходимо детально изучить МС/МС спектры и выбрать селективный переход. Более того, детектирование режиме полного сканирования в сочетании с точным измерением масс при сверхвысоком разрешении является мощным инструментом для ретроспективного анализа проб [212].

# ГЛАВА 7 НОВАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ЭКЗОГЕННЫХ ФАВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ПОДХОДЫ ДОСТИЖЕНИЯ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ С РЕФЕРЕНСНЫМИ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА

Благодаря достигнотому точному измерению m/z на уровне 2 ppm в режиме полного сканирования в сложных по составу смесях, полученному снижением матричных эффектов за счет селективного протонирования определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов с использованием ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР, была предложена новая методология скрининга ФАВ в биологических жидкостях с применением жидкостной хромато-массспектрометрии сверхвысокого разрешения. Схема анализа с использованием данной методологии представлена на рис. 43.



Рисунок 43 Схема анализа медико-биологических объектов на основе новой хромато-масс-спектрометрической методологии скрининга

Из рисунка видно, что за этапом скрининга следует подтверждающий анализ с использованием таких референсных методов, как ГХ-МСВР и ВЭЖХ-МС/МС.

Одним из путей достижения комплементарности предлагаемой методологии скрининга с существующими референсными методами является оценка выхода реакции дериватизации и применение ТФЭ на магнитных частицах для снижения матричных эффектов, наблюдаемых при использовании ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией.

### 7.1 Выявление «труднодериватизируемых» ФАВ для референсного метода ГХ-МС

В хромато-масс-спектрометрии принято относить К «труднодериватизируемым» ΦAB соединения, которые реагируют с силилирующими Превентивное агентами с низким выходом. выявление «труднодериватизируемых» ФАВ дает возможность заранее выбрать адекватный референсный метод анализа, существенно сократить временные и материальные затраты на разработку процедуры скрининга с применением газовой хроматографии/масс-спектрометрии и достичь комплементарности с методом ВЭЖХ-МСВР. Для выявления «труднодериватизируемых» ФАВ автор настоящей работы предлагает оценивать выход реакции, используемой для получения летучих производных определяемых соединений.

Оценка выхода реакции проводится на основе анализа смеси, имеющей идентичные концентрации исходного аналита и его производного [217, 218]. Для этой цели в качестве модельных соединений были выбраны 17β-гидрокси-17метил-4-андростен-3-он (Метилтестостерон), 17α-метил-17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (Метандиенон), 17β-гидрокси-17α-метил-2-оха-5α-андростан-3-он (Оксандролон) и 4-Хлор-17α-метил-17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (Орал Туринабол), для которых априори известны оптимальные условия дериватизации. Хотя в биоаналитической практике обычно в качестве реагента для химической модификации используют N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (МСТФА) здесь автор использовал N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамид. Сами условия анализа описаны автором настоящей работы в статье [218]: «в данной работе в качестве дериватизирующего агента был использован N,Oбис(триметилсилил)-трифторацетамид (БСТФА), содержащий 1 % триметилхлорсилана, поскольку после протекания реакции он мог быть заменен на инертный органический растворитель. Такая замена позволяет работать в режиме без деления потока и избежать загрязнения источника ионов, инжектора и капиллярной колонки. Более того, такой подход позволяет вводить большие объемы пробы и определить выход реакции дериватизации для нанограммовых количеств стероидов»<sup>218</sup>.

Оценку вышеуказанной реакции автор настоящей работы предложил проводить, используя формулу из своей статьи [218]: «предполагая, что побочные продукты реакции для выбранных реагентов не образуются»<sup>218</sup>:

$$W = \frac{Sder}{Sder + kSnat} \times 100\%$$
<sup>(7)</sup>

где, *W* – выход реакции дериватизации;

Sder – площадь хроматографического пика производного соединения;

*Snat* – площадь хроматографического пика недеривазированного соединения;

*k* – отношение коэффициентов чувствительности производного и недериватизированного соединения.

Для определения выхода реакции необходимо было установить отношения коэффициентов чувствительности производного и недериватизированного соединения. С этой целью, в начале был выполнен анализ раствора ТМС-производного метилтестостерона, а затем приступали к анализу раствора, содержащего метилтестостерон. При этом количество исследуемых соединений в первом и втором растворе были идентичными. Подготовка к дериватизации и ее проведение, описанные в статье [218] автора настоящей работы. «Для этой цели отбирали 5 мкл модельного раствора метилтестостерона в метаноле (100 нг/мкл). Метанол упаривали досуха. К сухому остатку добавляли 10 мкл пиридина и 20

мкл БСТФА и выдерживали смесь в течение 20 часов при комнатной температуре, так как при высоких температурах реагент может привести к разложению соединений. Длительность дериватизации обеспечивала определяемых максимальный выход реакции. После дериватизации реакционную смесь упаривали досуха в потоке азота и к сухому остатку добавляли 100 мкл метилэфира»<sup>218</sup>. трет-бутилового Анализ реакционной смеси выполняли с использованием газовой хромато-масс-спектрометрии в режиме селективного детектирование ионов. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. При построении масс-хроматограммы для m/z 302 (характеристичный ион метилтестостерона) не был зарегистрирован ни один пик. Это означает, что выход реакции в анализируемой смеси можно принять за сто процентов. Полученный результат позволил перейти к исследованию смеси, содержащей идентичное количество исходного аналита (500 нг). Аналогично были выполнены анализы растворов метандиенона, оксандролона, орал туринабол и их производных. Полученные в ходе опытов площади пиков исходных аналитов и их производных применяли для вычисления отношения их коэффициентов чувствительности. Рассчитанные отношения коэффициентов чувствительности производного И исходного соединения приведены в табл. 22

**Таблица 22** «Значения и стандартные отклонения (SD) отношения коэффициентов чувствительности модифицированного и исходного соединения (*k*)»<sup>218</sup>,[218]

Определяемое соединение	Коэффициент	Стандартное отклонение
	чувствительности	
17β-гидрокси-17-метил-4-	8.69	0.62
андростен-3-он		
17α-метил-17β-	2.85	0.14
гидроксиандроста-1,4-		
диен-3-он		
17β-гидрокси-17α-метил-2-	21.6	1.4
оха-5α-андростан-3-он		
4-Хлор-17α-метил-17β-	26.6	3.2
гидроксиандроста-1,4-		
диен-3-он		

Значения выхода реакции дериватизации исследуемых соединений, рассчитанные для различных условий дериватизации представлены на рис. 43.



Рисунок 44 Выход реакции дериватизации, рассчитанный для 17β-гидрокси-17метил-4-андростен-3-он (Метилтестостерон), 17α-метил-17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (Метандиенон), 17β-гидрокси-17α-метил-2-оха-5α-андростан-3-он (Оксандролон) и 4-Хлор-17α-метил-17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (Орал Туринабол), Реакцию дериватизации проводили в течение 15 и 30 мин.

Таким образом, полученные результаты полностью согласуются с литературными данными. Это свидетельствует о надежности подхода для выявления «труднодериватизируемых» ФАВ.

## 7.2 Твердофазная экстракция на магнитных частицах как подход к снижению эффекта подавления ионизации матрицей для референсного метода ВЭЖХ-МС/МС

Комплементарность предлагаемой методологии скрининга с референсным методом ВЭЖХ-МС/МС достигается применением ТФЭ на магнитных частицах [222], используемой для снижения матричных эффектов, наблюдаемых в условиях электрораспылительной ионизации.

Твердофазная экстракция основана на целенаправленном извлечении определяемых компонентов из биологической матрицы сорбцией на твердом носителе. Важной особенностью твердофазной экстракции является объединение концентрирования и извлечения. Снижение эффекта подавления стадии ионизации твердофазной экстракцией достигается за счет специфических взаимодействий определяемых соединений или мешающих компонентов с неподвижной фазой. Изменением характера взаимодействия адсорбата с неподвижной фазой достигается высокая селективность экстракции. Наиболее простой способ достижения высокой селективности при использовании твердофазной экстракции является взаимодействие на основе гидрофобных сил. Вместе с тем поиск оптимальных условий экстракции широкого спектра ФАВ всегда связан со значительными временными затратами. Отсюда возникает потребность в поиске простых и экспрессных в оптимизации методов экстракции.

В таком ключе, одним из перспективных способов извлечения запрещенных в спорте ФАВ из биологической жидкости на основе твердофазной экстракции с магнитными частицами [219]. Наибольшее распространение получили частицы, поверхность которых химичически модифицирована группами С<sub>18</sub>. При этом концентрирование аналитов происходит на самих частицах. Сами микрочастицы обладают рядом характерных особенностей. Во-первых у них большая удельная поверхность, которая обеспечивает высокую степень извлечения. Их диаметр в редких случаях превышает 2 мкм [220]. Во-вторых сами микрочастицы обладают ферромагнитными свойствами. Как правило, их синтезируют на основе нанокристаллов оксида железа, которых затем покрывают полимерным слоем. Вышеописанные свойства позволяют их легко извлекать из биологической жидкости в присутствии магнитного поля. Сама экстракция проводится в отсутствии магнитного поля. При этом частицы находятся в анализируемой матрице в виде суспензии [221]. Другим важным достоинством этих частиц является возможность элюировать определяемые компоненты небольшими объемами растворителей. При таких условиях нет необходимости в упаривании экстрактов. Кроме того, возможность варьировать объем суспензии позволяет легко управлять степенью извлечения определяемых соединений и «емкостью сорбента» [223]. До начала настоящих исследований отсутствовали литературные данные по экстракции низкомолекулярных соединений из мочи [224].

В качестве модельных соединений использовали S-4, S-24, L-165.041, LGD2226, GW0742 и GW501516 из мочи человека. Далее представлены вкратце используемые материалы, условия анализа и экстракции, описанные в статье автора [223]: «для проведения магнитной сепарации использовали ферромагнитные микрочастицы с поверхностью, модифицированной группами C<sub>18</sub> Dynabeads RPC18, 12.5 мг/мл, размер частиц 1 мкм (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). Для подготовки ферромагнитных частиц перед анализом 200 мкл коммерчески доступной суспензии микрочастиц с концентрацией 12.5 мг/мл наливали в пробирку типа эппендорф, которую помещали в магнитный сепаратор, удаляли надосадочную жидкость, частицы промывали 1 мл 0.1 %-ного раствора трифторуксусной кислоты. После удаления кислоты добавляли 2 ΜЛ деионизированной воды для получения суспензии с концентрацией 1.25 мг/мл, который использовали в дальнейшем»<sup>223</sup>.

На рис. 44 приведена «схема процедуры извлечения исследуемых веществ из мочи человека с использованием магнитной сепарации»<sup>223</sup>, представленная в статье [223] автора.

211



**Рисунок 45** «Схема процедуры извлечения исследуемых веществ из мочи человека с использованием магнитной сепарации»<sup>223</sup>.

Вкратце процесс экстракции заключался в следующем. После добавления 200 мкл суспензии с частицами (1.25 мг/мл) в модельный образец биологической жидкости (1000 мкл) смесь активно перемешивали. После встряхивания удаляли надосадочную жидкость. Затем частицы промывали деионизированной H<sub>2</sub>O (0.5 мл). Элюировали в два этапа. Сначала 100 мкл CH<sub>3</sub>OH, а затем 50 мкл. После этого элюаты объединяли. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

Проводили оценку степени извлечения, анализируя 5 образцов биологической жидкости, в которых добавляли определяемые соединения (50 нг/мл) до и после экстракции. Также добавляли внутренние стандарты во все конечные экстракты биологических образцов. Для каждого определяемого компонента рассчитывали отношение площади его хроматографического пика к плащади пика внутреннего стандарта. Исходили из того, что степень извлечения определяемого компонента, добавленного после экстракции, составляет 100 процентов. В своей статье [223] автор настоящей работы описал методику, используемую далее для оценки эффекта подавления ионизации. Вкратце, для оценки влияния вышеупомянутого эффекта на обнаружение ФАВ, 0.005 мл смеси, содержащей аналиты (0.01 мкг/мл) и внутренний стандарт упаривали досуха. Затем в сухой остаток добавляли в 0.15 мл СН<sub>3</sub>ОН или экстракта биологической жидкости, в которой отсутствовали аналиты.

Оптимизация условий извлечения определяемых соединений из мочи сводилась только к выбору оптимального объема суспензии ферромагнитных

частиц. Объем суспензии варьировали от 50 до 500 мкл. При объеме суспензии, равном 200 мкл наблюдали максимальную степень извлечения. Дальнейшее увеличение объема суспензии не приводило к увеличению степени извлечения. В таблице 20 приведены аналитические характеристики магнитной сепарации.

**Таблица 23** Аналитические характеристики магнитной сепарации при экстракции S-4, S-24, L-165.041, LGD2226, GW0742 и GW501516 из мочи человека: (*P*=0.95, n=5, χ – степень подавления ионизации компонентами матрицы, γ– степень извлечения)

Соединение	χ, %	γ,%
S-4	11	97
S-24	12	98
L-165.041	14	95
LGD2226	11	98
GW0742	12	97
GW501516	15	96

Как видно из табл. 23, для всех определяемых соединений наблюдали низкую степень подавления ионизации матрицей. Это свидетельствует о необратимой сорбции интерферирующих компонентов матрицы, способствующих подавлению ионизации определяемых соединений. Таким образом, был предложен подход достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсным ВЭЖХ-МС/МС методом на основе снижения подавления ионизации использованием твердофазной экстракции компонентами матрицы С с магнитными частицами.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К началу данной работы метод ВЭЖХ-МСВР/ОЛ как метод скрининга ФАВ в биологической жидкости в литературе не рассматривался. В работе впервые был предложени и апробировани ВЭЖХ-МСВР/ОЛ для обнаружения в биологической жидкости экзогенных ФАВ. Основным результатом проводимых исследований стало развитие ВЭЖХ-МСВР/ОЛ, как метода скрининга ФАВ в сложных по составу экстрактах из биологической жидкости, основанное на создание методических подходов к минимизации открытого в ходе анализа мочи матричного эффекта, характерного для данного метода. Матричный эффект, характерный для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ, был открыт после сравнения матричного эффекта, наблюдаемого при определении стероидов в моче методами ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в условиях электрораспылительной ионизации, где значение матричного эффекта было аномально высоким во втором случае (на 30-40 % выше, чем в первом). Это нельзя было объяснить одним подавлением ионизации компонентами матрицы. Предположительно, падение отклика было вызвано ограниченной емкостью С-ловушки (она не может удержать более 5×10<sup>6</sup> зарядов). Будучи неотъемлемой частью ОЛ, она используется для фокусировки пакетов ионов, непрерывно направляемых в саму орбитальную ионную ловушку. Для оценки матричного эффекта, характерного для ОЛ, было предложено ее использовать в тандеме с линейной ионной ловушкой, позволяющей направлять в ОЛ ионы с заданным m/z. Матричный эффект, наблюдаемый при сопряжении линейной ионной ловушки с орбитальной в режиме изоляции отдельных ионов, не отличается более, чем на 10 % от матричного эффекта, наблюдаемого в случае применения метода ВЭЖХ-МС/МС. Открытие самого матричного эффекта, характерного для ОЛ, а также способа его оценки способствовали поиску минимизации. Была изучена возможность подходов к его применения хроматографического К минимизации матричного эффекта, подхода наблюдаемого в условиях ионизации электрораспылением. Хотя удалось уменьшить значение матричного эффекта в среднем в 1.5 раза данным подходом,

его значение продолжало оставаться высоким для большинства исследованных соединений. Поэтому поиск альтернативных подходов уменьшения матричных эффектов продолжал оставаться актуальным. Результатом этого поиска стали разработанные методические подходы, основанные на сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР, которые позволили минимизировать матричные эффекты, характерные для ОЛ при анализе сложных по составу смесей. Благодаря сочетанию ФХИАД с ВЭЖХ-МСВР/ОЛ значение матричного эффекта для анаболических стероидов не превышало 12 %, а при сочетании с ВТЖХ-МСВР/ОЛ оно снижалось до 5%. Кроме того, выбранные условия ионизации с использованием методов ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР обеспечили присутствие пиков, принадлежащих ионам [M+H]<sup>+</sup> или [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, в массбензотиодиазинов, N-алкил-β-гидроксиспектрах стероидов, арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (βгидроксифенилэтил)аминов бензамида. производных Опираясь И на разработанные методические подходы снижения матричных эффектов, был способ N-алкил-β-гидроксипредложен скрининга стероидов И арилоксипропиламинов (всего 29 соединений) в сложных по составу экстрактах мочи методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИАД с пределом обраружения, лежащим в интервале 0.05 – 0.1 нг/мл. В свою очередь сочетание ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД позволило предложить способ определения 57 стероидов с пределом обнаружения, лежащим в интервале 0.1 – 2 нг/мл, в сложных по составу смесей на основе одной точно измеренной массы иона [M+H]<sup>+</sup> или [M+H-nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, принадлежащего детектируемому соединению, а сочетание УЭЖХ-МС/ОЛ с ХИИЭР - способ быстрого обнаружения стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-βгидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (βгидроксифенилэтил)аминов производных бензамида стероидов, И бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида (всего 120 соединений) в моче на основе одной точно измеренной массы иона  $[M+H]^+$  или  $[M+H-nH_2O]^+$  с пределом обнаружения, лежащим в интервале 0.2 –

250 нг/мл, в течение 20 минут. Все предложенные способы были валидированы и апробированы на реальных образцах мочи спортсменов. Кроме того, было проведено сравнение возможностей ВТЖХ-МСВР/ОЛ (ФХИАД) при определении распространенных среди спортсменов анаболических стероидов в моче с методами ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР. Сравнение показало, что степень выявления положительных проб у метода ВТЖХ-МСВР/ОЛ (ФХИАД) выше, чем у ГХ-MC/MC и ГХ-МСВР, когда речь идет о «труднодериватизируемых» соединениях, присутствующих в моче на уровне 0.5 нг/мл. Для ВТЖХ-МСВР/ОЛ (ФХИАД) она составляет 100 %, в то время, как для ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР она составляет она варьирует от 10% до 90% в зависимости от соединения. Была показана возможность обнаружения оксандролона в моче методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИАД через две недели после прекращения его приема спортсменом. Таким образом, была предложена методология скрининга ФАВ в сложных по составу экстрактах из биологической жидкости, основанная на сочетание ВЭЖХ-МСВР/ОЛ ХИИЭР. с ХИАД, ФХИАД И Найдены пути достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсными методами анализа, основанные на оценке выхода реакции дериватизации и способе снижения подавления ионизации компонентами матрицы для ВЭЖХ-МС/МС с использованием твердофазной экстракции с магнитными частицами.

Предлагаемая методология скрининга ФАВ может быть рекомендована для проведения медико-биологических исследований, эколого-аналитического мониторинга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз. Внедрение этой методологии в клинико-токсикологические лаборатории, работающие в интенсивной отделениях терапии, будет способствовать повышению эффективности терапевтического вмешательства в условиях узкого временного терапевтического окна.
## выводы

1. Разработана новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга спектра физиологически широкого активных веществ, обеспечивающая их быстрое определение на основе точного измерения m/z протонированных молекул и фрагментных ионов на уровне 2 ррт в сложных по составу смесях. В основе лежат предложенные решения снижения матричного эффекта при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования в сочетании как с химической ионизацией, индуцированной электрораспылением, так химической И И фотохимической ионизацией при атмосферном давлении.

2. Обоснован выбор пути достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции дериватизации и способа снижения подавления ионизации компонентами матрицы для высокоэффективной жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с использованием твердофазной экстракции с магнитными частицами.

3. Установлена причина и роль матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке, препятствующего обнаружению физиологически активных веществ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования.

4. Созданы подходы значительного снижения матричных эффектов (до 5-12%), основанные как на селективной ионизации физиологически активных веществ с использованием химической и фотохимической ионизации при атмосферном давлении, так и на подавлении ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием химической ионизации, индуцированной электрораспылением, при определении физиологически активных веществ с высоким сродством к протону

217

5. С использованием предложенных подходов снижения матричных эффектов разработаны и апробированы три быстрых способа скрининга (длительность анализа не более 30 минут) физиологически активных веществ в моче на основе измерения m/z на уровне 2 ppm в режиме полного сканирования:

а. - термостабильных стероидов и N-алкил-β-гидроксиарилоксипропиламинов с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл при использовании химической ионизации при атмосферном давлении

b. - стероидов с пределом обнаружения 0.5 – 2 нг/мл при использовании фотохимической ионизации при атмосферном давлении.

с. - стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидроксиарилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (βгидроксифенилэтил) аминов, производных бензамида е с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл при использовании химической ионизации, индуцированной электрораспылением.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Badoud F., Guillarme D., Boccard J., Grata E., Saugy M., Rudaz S., Veuthey J.L. Analytical aspects in doping control: challenges and perspectives // Forensic Sci. Int. 2011. Vol. 213, N 1–3. P. 49–61.

2. Nicoli R., Guillarme D., Leuenberger N., Baume N., Robinson N., Saugy M., Veuthey J.L. Analytical strategies for doping control purposes: Needs, challenges, and perspectives //Anal. Chem. 2016. Vol. 88, N 1. P. 508–523.

3. Вирюс Э.Д., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Масс-спектрометрия в допинговом контроле // Мир измерений. 2013. № 11. С. 19-21

4. Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Хромато-массспектрометрия запрещенных в спорте физиологически активных веществ: скрининг широкого круга соединений и их метаболитов // Масс-спектрометрия. 2017. Т. 14. № 3. С. 149-175

5. Schamasch P., Rabin O. Challenges and perspectives in antidoping testing // Bioanalysis. 2012. Vol. 4, N 13. P. 1691–1701.

6. Prohibited List 2016: [Электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency. Montreal, 2002–2016. URL: https://www.wada-ama.org/en/resources/sciencemedicine/prohibitedlist. (Дата обращения: 18.12.2016).

 Mazzoni I., Barroso O., Rabin O. The list of prohibited substances and methods in sport: structure and review process by the world anti-doping agency // J. Anal. Toxicol. 2011. Vol. 35, N 9. P. 608–612.

8. Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: the Prohibited List 2008-analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test. Anal. 2009. Vol. 1, N 1. P. 4–13.

 Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2010. Vol. 2, N 4.
 P. 149–61.  Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2011. Vol. 3, N 1.
 P. 1–14.

 Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2012. Vol. 4, N 1.
 P. 2–16.

 Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2013. Vol. 5, N 1.
 P. 1–19.

13. Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2014. Vol. 6, N 1–2. P. 164–184.

14. Thevis M., Kuuranne T., Geyer H., Schänzer W. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2015. Vol. 7, N 1. P. 1–20.

15. Thevis M., Kuuranne T., Walpurgis K., Geyer H., Schänzer W. Annual bannedsubstance review: analytical approaches in human sports drug testing // Drug Test Anal. 2016. Vol. 8, N 1. P. 7–29.

16. Boghosian T., Mazzoni I., Barroso O., Rabin O. Investigating the use of stimulants in out-of-competition sport samples // J. Anal. Toxicol. 2011. Vol. 35, N 9. P. 613–616.

17. Morgan D., Löfstrandh S., Costa E. Amphetamine analogues and brain amines // Life Sci I. 1972. Vol. 11, N 2. P. 83–96.

18. Bower E.A., Phelan J.R. Use of amphetamines in the military environment // Lancet. 2003. Vol. 362, N 12. Suppl: P. s18–19.

19. Boghosian T., Mazzoni I., Barroso O., Rabin O. Investigating the use of stimulants in out-of-competition sport samples // J. Anal. Toxicol. 2011. Vol. 35, N 9. P. 613–616.

20. Novich M.M. Drug abuse and drugs in sports. Personal observations. // N Y State J Med. 1973. Vol. 73, N 21. P 2597–2600.

21. Momaya A., Fawal M., Estes R. Performance-enhancing substances in sports: a review of the literature // Sports Med. 2015. Vol. 45, N 4. P. 517–531.

22. Deventer K., Roels K., Delbeke F.T., Van Eenoo P. Prevalence of legal and illegal stimulating agents in sports // Anal. Bioanal. Chem. 2011. Vol. 401, N 2. P. 421–432.

23. Pereira H.M., Sardela V.F. Stimulant doping agents used in Brazil: prevalence, detectability, analytical implications, and challenges // Subst. Use Misuse. 2014. Vol. 49, N 9. P. 1098–1114.

24. Docherty J.R. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA) // Br. J. Pharmacol. 2008. Vol. 154, N 3. P. 606–622.

25. Jones G. Caffeine and other sympathomimetic stimulants: modes of action and effects on sports performance // Essays Biochem. 2008. Vol. 44, N 1. P. 109–123.

26. Casali L., Pinchi G., Puxeddu E. Doping and respiratory system // Monaldi Arch. Chest. Dis. 2007. Vol. 67, N 1. P. 53–62.

27. Thevis M., Schänzer W. Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays // Mass Spectrom. Rev. 2007. Vol. 26, N 1. P. 79–107.

28. Hemmersbach P., de la Torre R. Stimulants, narcotics and beta-blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 1996. Vol. 687, N 1. P. 221–238.

29. Vermeulen N.P., de Roode D., Breimer D.D. Gas chromatographic determination of pemoline as 5-phenyl-2,4-oxazolidinedione in human urine // J. Chromatogr. 1977. Vol. 137, N 2. P. 333–342.

30. Lho D.S., Hong J.K., Paek H.K., Lee J.A., Park J. Determination of phenolalkylamines, narcotic analgesics, and beta-blockers by gas chromatography/mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 1990. Vol. 14, N 2. P. 77–83.

31. Hackett L.P., Dusci L.J., Ilett K.F., Chiswell G.M. Optimizing the hydrolysis of codeine and morphine glucuronides inurine // Ther. Drug Monit. 2002. Vol. 24, N 5. P. 652–657.

32. Romberg R.W., Lee L. Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase // J. Anal. Toxicol. 1995. Vol. 19, N 3. P. 157–162.

33. Delbeke F.T., Debackere M. Infl uence of hydrolysis procedures on the urinary concentrations of codeine and morphine in relation to doping analysis // J. Pharm. Biomed. Anal. 1993. Vol. 11, N 4–5. P. 339–343.

34. Lho D.S., Shin H.S., Kang B.K., Park J. Systematic analysis of stimulants and narcotic analgesics by gas chromatography with nitrogen specifi c detection and mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 1990. Vol. 14, N 2. P. 73–76.

35. Савельева Н.Б. Быковская Н.Ю. Дикунец М.А. Болотов С.Л. Родченков Г.М. Использование дейтерированного внутреннего стандарта для количественного определения морфина в допинг-контроле методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием // Судебно-медицинская экспертиза. 2010. №3. С. 29–32.

36. Solans A., Carnicero M., de la Torre R., Segura J. Comprehensive screening procedure for detection of stimulants, narcotics, adrenergic drugs, and their metabolites in human urine // J. Anal. Toxicol. 1995. Vol. 19, N 2. P. 104–114.

37. Cody J.T. Determination of methamphetamine enantiomer ratios in urine by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. 1992. Vol. 580, N 1–2. P. 77–95.

38. Wang S.M, Wang T.C., Giang Y.S. Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic-isotope dilution mass spectrometry // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2005. Vol. 816, N 1–2. P. 131–143.

39. Drake S.J., Morrison C., Smith F. Simultaneous chiral separation of methylamphetamine and common precursors using gas chromatography/mass spectrometry // Chirality. 2011. Vol. 23, N 8. P. 593–601.

40. Plotka J.M., Simeonov V., Morrison C., Biziuk M., Namieśnik J. Capillary gas chromatography using a  $\gamma$ -cyclodextrin for enantiomeric separation of methylamphetamine, its precursors and chloro intermediates after optimization

of the derivatization reaction // J. Chromatogr. A. 2014. Vol. 1347, N 1. P.146–156.

41. Maurer H.H., Kraemer T. Toxicological detection of selegiline and its metabolites in urine using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and gas chromatography-

mass spectrometry (GC-MS) and differentiation by enantioselective GC-MS of the intake of selegiline from abuse of methamphetamine or amphetamine // Arch. Toxicol. 1992. Vol. 66, N 9. P. 675–678.

42. Paul B.D., Jemionek J., Lesser D., Jacobs A., Searles D.A. Enantiomeric separation and quantitation of (+/-)-amphetamine, (+/-)-methamphetamine, (+/-)-MDA, (+/-)-MDMA, and (+/-)-MDEA in urine specimens by GC-EIMS after derivatization with (R)-(-)- or (S)-(+)-alpha-methoxy-alpha-(trifluoromethy)phenylacetyl chloride (MTPA) // J. Anal. Toxicol. 2004. Vol. 28, N 6. P. 449–455.

43. Srinivas N.R., Hubbard J.W., Cooper J.K, Midha K.K. Enantioselective gas chromatographic assay with electron-capture detection for fenfl uramine and norfenfl uramine in plasma // J. Chromatogr. 1988. Vol. 433. P. 105–117.

44. Jirovský D., Lemr K., Sevcík J., Smysl B., Stránský Z. Methamphetamine-

properties and analytical methods of enantiomer determination // Forensic Sci. Int. 1998. Vol. 96, N 1. P. 61–70.

45. Thevis M., Sigmund G., Koch A., Guddat S., Maurer H.H., Schänzer W. Doping control analysis of methoxyphenamine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Eur. J. Mass Spectrom. 2008. Vol. 14, N 3. P. 145–152.

46. Paravastu S.C., Mendonca D.A., da Silva A. Beta blockers for peripheral arterial disease. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2009. Vol. 38, N 1. P. 66–70.

47. Wagner J.C. Enhancement of athletic performance with drugs. An overview // Sports Med. 1991. Vol. 12, N 4. P. 250–265.

48. Knopp W.D., Wang T.W., Bach B.R. Jr. Ergogenic drugs in sports // Clin. Sports Med. 1997. Vol. 16, N 3. P. 375–392.

49. Fitch K. Proscribed drugs at the Olympic Games: permitted use and misuse (doping) by athletes // Clin. Med. 2012. Vol. 12, N 3. P. 257–260.

50. Morgan D.J. Clinical pharmacokinetics of beta-agonists // Clin. Pharmacokinet. 1990. Vol. 18, N 4. P. 270–294.

51. Chan S.C., Torok-Both G.A., Billay D.M., Przybylski P.S., Gradeen C.Y., Pap K.M., Petruzelka J. Drug analysis at the 1988 Olympic Winter Games in Calgary // Clin. Chem. 1991. Vol. 37, N 7. P. 1289–1296.

52. Segura J., Pascual J.A., Ventura R., Ustaran J.I., Cuevas A., Gonzalez R. International cooperation in analytical chemistry: experience of antidoping control at the XI Pan American Games // Clin. Chem. 1993. Vol. 39, N 5. P. 836–845.

53. Dumasia M.C., Houghton E. Screening and confirmatory analysis of beta-agonists, beta-antagonists and their metabolites in horse urine by capillary gas chromatographymass spectrometry // J. Chromatogr. 1991. Vol. 564, N 2. P. 503–513.

54. Polettini A., Groppi A., Ricossa M.C., Montagna M. Gas chromatographic/electron impact mass spectrometric selective confirmatory analysis of clenbuterol in human and bovine urine // Biol. Mass Spectrom. 1993. Vol. 22, N 8. P. 457–461.

55. Polettini A. Bioanalysis of beta 2-agonists by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques // J. Chromatogr. B Biomed Appl. 1996. Vol. 687, N 1. P. 27–42.

56. van Rhij n J.A., Heskamp H.H., Essers M.L., van de Wetering H.J., Kleijnen H.C., Roos A.H. Possibilities for confirmatory analysis of some beta-agonists using two different derivatives simultaneously // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 1995. Vol. 665, N 2. P. 395–398.

57. Politi L., Groppi A., Polettini A. Applications of liquid chromatography-

mass spectrometry in doping control // J. Anal. Toxicol. 2005. Vol. 29, N 1. P. 1–14.

58. Ventura R., Segura J. Detection of diuretic agents in doping control // J. Chromatogr. B Biomed Appl. 1996. Vol. 687, N 1. P. 127–144.

59. Pagliaro B., Santolamazza C., Rubattu S., Volpe M. New therapies for arterial hypertension // Panminerva Med. 2016. Vol. 58, N 1. P. 34–47.

60. Benzi G. Pharmacoepidemiology of the drugs used in sports as doping agents // Pharmacol. Res. 1994. Vol. 29, N 1. P. 13–26.

61. Doping in Sports: Biochemical Principles, Eff ects and Analysis (Handbook of Experimental Pharmacology); Ed. by D. Thieme, P. Hemmersbach. Berlin: Springer-Verlag, 2010. 540 p.

62. Cowan D.A. Drug testing // Essays Biochem. 2008. Vol. 44, N 1. P. 139–148.

63. Hsu K.F., Chien K.Y., Chang-Chien G.P., Lin S.F., Hsu P.H., Hsu M.C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method for the simultaneous

detection of stimulants and diuretics in urine // J. Anal. Toxicol. 2011. Vol. 35, N 9. P. 665–674.

64. Ventura R., Roig M., Montfort N., Sáez P., Bergés R., Segura J. High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents // Eur. J. Mass Spectrom. 2008. Vol. 14, N 3. P. 191–200.

65. Deventer K., Delbeke F.T., Roels K., Van Eenoo P. Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Biomed. Chromatogr. 2002. Vol. 16, N 8. P. 529–535.

66. Cooper S.F., Massé R., Dugal R. Comprehensive screening procedure for diuretics in urine by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. 1989. Vol. 489, N 1. P. 65–88.

67. Tsai F.Y., Lui L.F., Chang B. Analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC-MSD confi rmation // J. Pharm. Biomed. Anal. 1991. Vol. 9, N 10–12. P. 1069–1076.

68. Park S.J., Pyo H.S., Kim Y.J., Kim M.S., Park J. Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confi rmation // J. Anal. Toxicol. 1990. Vol. 14, N 2. P. 84–90.

69. Ventura R., Nadal T., Alcalde P., Pascual J.A., Segura J. Fast screening method for diuretics, probenecid and other compounds of doping interest // J. Chromatogr. A. 1993. Vol. 655, N 2, 3. P. 233–242.

70. Amendola L., Colamonici C., Mazzarino M., Botrè F. Rapid determination of diuretics in human urine by gas chromatography–mass spectrometry following microwave assisted derivatization // Anal. Chim. Acta. 2003. Vol. 475, N 1–2. P. 125–136.

71. Campins-Falcó P., Herráez-Hernández R., Sevillano-Cabeza A. Solid-phase extraction techniques for assay of diuretics in human urine samples // J. Liquid Chromatogr. 1991. Vol. 14, N 19. P. 3575–3590.

72. Salado S., Vera-Avila L.E. On-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of chlorthalidone in urine // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1997. Vol. 690, N 1–2. P. 195–202.

73. Carreras D., Imaz C., Navajas R., Garcia M.A., Rodriguez C., Rodriguez A.F., Cortes R. Comparison of derivatization procedures for the determination of diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 1994. Vol. 683, N 1. P. 195–202.

74. Thieme D., Grosse J., Lang R., Mueller R.K., Wahl A. Screening, confirmation and quantification of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2001. Vol. 757, N 1. P. 49–57.

75. Lisi A.M., Trout G.J., Kazlauskas R. Screening for diuretics in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with derivatisation by direct extractive alkylation // J. Chromatogr. 1991. Vol. 563, N 2. P. 257–270.

76. Lisi A.M., Kazlauskas R., Trout G.J. Diuretic screening in human urine by gas chromatography-mass spectrometry: use of a macroreticular acrylic copolymer for the efficient removal of the coextracted phase-transfer reagent after derivatization by direct extractive alkylation // J. Chromatogr. 1992. Vol. 581, N 1. P. 57–63.

77. Ehrhardt J.D. Negative-ion mass spectra of methylated diuretics // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1992. Vol. 6, N 5. P. 349–351.

78. Kim Y., Park S., Park J., Lee W. Detection of benzthiazide by high-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 1995. Vol. 689, N 1. P. 170–174.

79. Garbís S.D., Hanley L., Kalita S. Detection of thiazidebased diuretics in equine urine by liquid chromatography/mass spectrometry // J AOAC Int. 1998. Vol. 81, N 5. P. 948–957.

80. Deventer K., Van Eenoo P., Delbeke F.T. Simultaneous determination of betablocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan-to-scan polarity switching // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005. Vol. 19, N 2. P. 90–98. 81. Sanz-Nebot V., Toro I., Bergés R., Ventura R., Segura J., Barbosa J. Determination and characterization of diuretics in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2001. Vol. 36, N 6. P. 652–657.

82. Strehl C., Buttgereit F. Optimized glucocorticoid therapy: teaching old drugs // Mol.Cell Endocrinol. 2013. Vol. 380, N 1–2. P. 32–40.

83. Stahn C., Löwenberg M., Hommes D.W., Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists // Mol. Cell Endocrinol. 2007. Vol. 275, N 1–2. P. 71–78.

84. Chen C.L., Zhu D., Gillis K.D., Meleka-Boules M. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay to determine serum and urine dexamethasone concentrations in thoroughbreds after intravenous administration of the steroid // Am. J. Vet Res. 1996. Vol. 57, N 2. P. 182–186.

85. Ribeiro Neto L.M., Salvadori M.C., Spinosa H.S. Immunoaffinity chromatography in the detection of dexamethasone in equine urine // J. Chromatogr. Sci. 1997. Vol. 35, N 11. P. 549–551.

86. Rodriguez M.L., McConnell I., Lamont J., Campbell J., Fitzgerald S.P. Generic immunoassay of corticosteroids with minimum pre-treatment of urine samples // Analyst. 1994. Vol. 119, N 12. P. 2631–2634.

87. Courtheyn D., Vercammen J., De Brabander H., Vandenreyt I., Batjoens P., Vanoosthuyze K., Van Peteghem C. Determination of dexamethasone in urine and faeces of treated cattle with negative chemical ionization-mass spectrometry // Analyst. 1994. Vol. 119, N 12. P. 2557–2564.

88. Savu S.R., Silvestro L., Haag A., Sörgel F. A confirmatory HPLC-MS/MS method for ten synthetic corticosteroids in bovine urines // J. Mass Spectrom. 1996. Vol. 31, N 12. P. 1351–1363.

89. Bagnati R., Ramazza V., Zucchi M., Simonella A., Leone F., Bellini A., Fanelli R. Analysis of dexamethasone and betamethasone in bovine urine by purification with an "on-line" immunoaffinity chromatography-high-performance liquid chromatography

system and determination by gas chromatography-mass spectrometry // Anal. Biochem. 1996. Vol. 235, N 2. P. 119–126.

90. Park S.J., Kim Y.J., Pyo H.S., Park J. Analysis of corticosteroids in urine by HPLC and thermospray LC/MS // J. Anal. Toxicol. 1990. Vol. 14, N 2. P. 102–108.

91. Santos-Montes A., Gonzalo-Lumbreras R., Gasco-Lopez A.I., Izquierdo-Hornillos R. Solvent and solid-phase extraction of natural and synthetic corticoids in human urine // J. Chromatogr. 1994. Vol. 652, N 1. P. 83–89.

92. Santos-Montes A., Gasco-Lopez A.I., Izquierdo-Hornillos R. Optimization of the high-performance liquid chromatrographic separation of a mixture of natural and synthetic corticosteroids // J. Chromatogr. 1993. Vol. 620, N 1. P. 15–23.

93. Jusko W.J., Pyszczynski N.A., Bushway M.S., D'Ambrosio R. Fifteen years of operation of a high-performance liquid chromatographic assay for prednisolone, cortisol and prednisone in plasma // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 1994. Vol. 658, N 1. P. 47–54.

94. Shibasaki H., Furuta T, Kasuya Y. Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. 1997. Vol. 692, N 1. P. 7–14.

95. Hirata H., Kasama T., Sawai Y., Fike R.R. Simultaneous determination of defl azacort metabolites II and III, cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B Biomed Appl. 1994. Vol. 658, N 1. P. 55–61.

96. McWhinney B.C., Ward G., Hickman P.E. Improved HPLC method for simultaneous analysis of cortisol, 11-deoxycortisol, prednisolone, methylprednisolone, and dexamethasone in serum and urine // Clin. Chem. 1996. Vol. 42, N 6. P. 979–981.

97. Shibata N., Hayakawa T., Takada K., Hoshino N., Minouchi T., Yamaji A. Simultaneous determination of glucocorticoids in plasma or urine by high-performance liquid chromatography with precolumn fluorimetric derivatization

by 9-anthroylnitrile // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1998. Vol. 706, N 2. P. 191–199.

98. Stanley S.M., Wilhelmi B.S., Rodgers J.P., Bertschinger H. Immunoaffinity chromatography combined with gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry for the confirmation of flumethasone abuse in the equine // J. Chromatogr. 1993. Vol. 614, N 1. P.77–86.

99. Delahaut P., Jacquemin P., Colemonts Y., Dubois M., De Graeve J., Deluyker H. Quantitative determination of several synthetic corticosteroids by gas chromatographymass spectrometry after purification by immunoaffinity chromatography // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1997. Vol. 696, N 2. P. 203–215.

100. Creaser C.S., Feely S.J., Houghton E., Seymour M. Immunoaffinity chromatography combined on-line with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of corticosteroids // J. Chromatogr A. 1998. Vol. 794, N 1. P. 37–43.

101. Kasuya Y., Althaus J.R., Freeman J.P., Mitchum R.K., Skelly J.P. Quantitative determination of dexamethasone in human plasma by stable isotope dilution mass spectrometry // J. Pharm. Sci. 1984. Vol. 73, N 4. P. 446–451.

102. Minagawa K., Kasuya Y., Baba S., Knapp G., Skelly J.P. Determination

of dexamethasone in human plasma and urine by electron-impact mass spectrometry // J. Chromatogr. 1985. Vol. 343, N 2. P. 231–237.

103. Girault J., Istin B., Fourtillan J.B. A rapid and highly sensitive method for the quantitative determination of dexamethasone in plasma, synovial fluid and tissues by combined gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1990. Vol. 19, N 5. P. 295–302.

104. Rodchenkov G.M., Uralets V.P., Semenov V.A. Determination of methylprednisolone metabolites in human urine by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. 1987. Vol. 423. P. 15–22.

105. Rodchenkov G.M., Uralets V.P., Semenov V.A., Gurevich V.A. Gas chromatographic and mass spectral study of betamethasone synthetic corticosteroid metabolism // J. Chromatogr. 1988. Vol. 432. P. 283–289.

106. Rodchenkov G.M., Uralets V.P., Semenov V.A. Gas chromatographic and mass spectral study of synthetic corticosteroid metabolism: fl uorometholone // J. Chromatogr. 1988. Vol. 426, N 2. P. 399–405.

107. Rodchenkov G.M., Vedenin A.N., Uralets V.P., Semenov V.A. Characterization of prednisone, prednisolone and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. 1991. Vol. 565, N 1–2. P. 45–51.

108. Volmer D.A., Hui J.P. Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997. Vol. 11, N 17. P. 1926–1933.

109. Freedman O.C., Verma S., Clemons M.J. Pre-menopausal breast cancer and aromatase inhibitors: Treating a new generation of women // Breast Cancer Res. Treat. 2006. Vol. 99, N 3. P. 241–247.

110. Karaer O., Oruç S., Koyuncu F.M. Aromatase inhibitors: possible future applications // Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2004. Vol. 83, N 8. P. 699–706.

111. Mareck U., Sigmund G., Opfermann G., Geyer H., Schänzer W. Identification of the aromatase inhibitor aminoglutethimide in urine by gas chromatography/mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2002. Vol. 16, N 24. P. 2209–2214.

112. Mareck U., Sigmund G., Opfermann G., Geyer H., Thevis M., Schänzer W. Identification of the aromatase inhibitor letrozole in urine by gas chromatography/mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005. Vol. 19, N 24. P. 3689–3693.

113. Mareck U., Geyer H., Guddat S., Haenelt N., Koch A., Kohler M., Opfermann G., Thevis M., Schänzer W. Identification of the aromatase inhibitors anastrozole and exemestane in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. Vol. 20, N 12. P. 1954–1962.

114. Kicman A.T., Gower D.B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives // Ann. Clin. Biochem. 2003. Vol. 40(Pt 4). P. 321–356.

115. Blickenstaff R.T., Ghosh A.C., Gordon C.W. Total synthesis of steroids organic chemistry: A series of monographs, Volume 30. NY: Academic Press, 1974. 328 p.

116. Bardin C.W., Catterall, J. F., Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism // Science. 1981. Vol. 211, P. 1285–1294.

117. Kopera H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids // Acta Endocrinol. 1985. Vol. 271, P. 11–18.

118. Catlin D.H., Murray T.H., Performance-enhancing drugs, fair competition, and Olympic sport // J. Am. Med. Assoc. 1996. Vol. 276, N 3, P. 231–237.

119. Buckley W.E., Yesalis C.E., Friedl K.E., Anderson W.A., Streit A.L., Wright J. E. Estimated prevalence of anabolic steroid use among male high school seniors // J. Am. Med. Assoc.1988. Vol. 260, N 23. P. 3441–3445.

120. Catlin D.H., Hatton C.K. Use and abuse of anabolic and other drugs for athletic enhancement // Adv. Int. Med. 1991. Vol. 36. P. 399–424.

121. Catlin D.H., Kammerer R.C., Hatton C.K., Sekera M.H., Merdink J. M. Analytical chemistry at the games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles 1984 // Clin. Chem. 1987. Vol. 33, N 2. P. 319–327.

122. Laurin C.A., Létourneau G. Medical report of the Montreal Olympic Games // Am.J. Sports Med. 1978. Vol. 6, N 2. P. 54–61.

123. Brooks R.V., Firth R.G., Sumner N.A. Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay // British J. Sports Medicine. 1975. Vol. 9, N 2. P. 89–92.

124. Rogozkin V.A., Morozov V.I., Tchaikovsky V.S. Rapid radioimmunoassay for anabolic steroids in urine // Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin. 1979. Vol. 27, N 4. P. 169–173.

125. Catlin D.H., Hatton C.K., Starcevic S.H. Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine // Clin Chem. 1997. Vol. 43, N 7. P. 1280–1288.

126. Saugy M., Cardis C., Robinson N., Schweizer C. Test methods: anabolics // Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol Metab. 2000. Vol. 14, N 1. P. 111–133.

127. Sobolevsky T., Rodchenkov G. Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2012. Vol. 128, N 3–5. P. 121–127.

128. Sobolevsky T., Rodchenkov G. Mass spectrometric description of novel oxymetholone and desoxymethyltestosterone metabolites identified in human urine and their importance for doping control // Drug Test. Anal. 2012. Vol. 4, N 9. P. 682–691.

129. Schänzer W., Opfermann G., Donike M. Metabolism of stanozolol: identifi cation and synthesis of urinary metabolites // J. Steroid Biochem. 1990. Vol. 36, N 1–2. P. 153–174.

130. Schänzer W., Delahaut P., Geyer H., Machnik M., Horning S. Long-term detection and identifi cation of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography high-resolution mass spectrometry // J. Chromatogr. B Anal.Techniques Biomed. Life Sci. 1996. Vol. 687, N 1. P. 93–108.

131. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids // Clin. Chem. 1996. Vol.42, N 7. P. 1001–1020.

132. Schänzer W., Geyer H., Fussholler G., Halatcheva N., Kohler M., Parr M.K., Guddat S., Thomas A., Thevis M. Mass spectrometric identification and characterisation of a new long-term metabolite of metandienone in human urine

// Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. Vol. 20, N 15. P. 2252–2258.

133. Schänzer W., Opfermann G., Donike M. 17-Epimerization of 17 alpha-methyl anabolic steroids in humans: metabolism and synthesis of 17 alpha-hydroxy-17 betamethyl steroids // Steroids. 1992. Vol. 57, N 11. P. 537–550.

134. Vanluchene E., Eechaute W., Vandekerhove D. Conversion of free 3β-hydroxy-5enesteroids by incubation with Helix pomatia // J. Steroid Biochem. 1982. Vol. 16, N 5. P. 701–703.

135. Masse R., Ayotte C., Dugal R. Studies on anabolic steroids I. Integrated methodological approach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine // J. Chromatogr. 1989. Vol. 489, N 1. P. 23–50.

136. Bi H., Masse R., Studies on anabolic steroids - 12. Epimerization and degradation of anabolic 17ß-sulphate-17-methyl steroids in human: Qualitative and quantitative GC/MS analysis // J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 1992. Vol. 42, N 5. P. 533–546.

137. Bradlow H.L. Modifi ed technique for the elution of polar steroid conjugates from Amberlite XAD-2 // Steroids. 1977. Vol. 30, N 4. P. 581–582.

138. Donike M. N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid, ein neues Silylierungs mittel aus der Reihe der silylierten Amide // J. Chromatogr. 1969. Vol. 42. P. 103–104.

139. Chambaz E.M., Horning, E.C. Steroid trimethylsilyl ethers // Anal. Lett., 1967. Vol.1, N 3. P. 201–211.

140. Chambaz E.M., Dafaye G., Madani Ch. Trimethylsilyl ether-enol-trimethyl silyl ether– a new type of derivative for the gas phase study of hormonal steroids // Anal. Chem. 1973. Vol. 46, N. 7. P. 1090–1098.

141. Donike M., Zimmermann J., Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl-und tert.-Butyldimethylsilylenoläthern von Ketosteroiden für gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen // J. Chromatogr. 1980. Vol. 202, N 3. P. 483–486.

142. Catlin D.H., Sekera M.H., Ahrens B.D., Starcevic B., Chang Y.C., Hatton C.K. Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004. Vol. 18, N 12. P. 1245–1249.

143. Malvey T.C., Armsey T.D. Tetrahydrogestrinone: the discovery of a designer steroid // Curr. Sports Med. Rep. 2005. Vol. 4, N 4. P. 227–230.

144. Lévesque J.F., Templeton E., Trimble L., Berthelette C. Discovery, biosynthesis, and structure elucidation of metabolites of a doping agent and a direct analogue, tetrahydrogestrinone and gestrinone, using human hepatocytes // Anal. Chem. 2005. Vol. 77, N 10. P. 3164–3172.

145. Thevis M., Bommerich U., Opfermann G., Schänzer W. Characterization of chemically modifi ed steroids for doping control purposes by electrospray ionization tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2005. Vol. 40, N 4.

P. 494–502.

146. Athanasiadou I., Voss S., Lyris E., Aljaber A., Alsayrafi M., Georgakopoulos C. Analytical progresses of the World Anti-Doping Agency Olympic laboratories: a 2016 update from London to Rio // Bioanalysis. 2016. Vol. 8, N 21. P. 2265–2279.

147. Donike M. Zum problem des Nachweises der anabolen steroide: gaschromatographische und massenspezifische Moglichkeiten // Sportarzt und Sportmedizin 1975. Vol. 26, P. 1–11. 148. Chung B.C., Choo H.Y.P., Kim T.W., Eom K.D., Kwon O.S., Suh J., Yang J., Park J. Analysis of anabolic steroids using GC/MS with selected ion monitoring // J. Anal. Toxicol. 1990. Vol. 14, N 2. P. 91–95.

149. Ayotte C., Goudreault D., Charlebois A. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine // J. Chromatogr. B.1996. Vol. 687, N 1. P. 3–25.

150. Schänzer W., Delahaut P., Geyer H., Machnik M., Horning S. Long-term detection and identifi cation of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography high-resolution mass spectrometry // J. Chromatogr. B.

1996. Vol. 687, N 1. P. 93–108.

151. Mueller R.K., Grosse J., Lang R., Thieme D. Chromatographic techniques – the basis of doping control // J. Chromatogr. B. 1995. Vol. 674, N 1. P. 1–11.

152. Marcos J., Pascual J.A., de la Torre X., Segura J. Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2002. Vol. 37, N 10. P. 1059–1073.

153. Thevis M., Geyer H., Mareck U., Schänzer W. Screening for unknown synthetic steroids in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2005. Vol. 40, N 7. P. 955–962.

154. Deventer K., Eenoo P.V., Delbeke F.T. Screening for anabolic steroids in doping analysis by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry // Biomed Chromatogr. 2006. Vol. 20, N 5. P. 429–433.

155. Pozo O.J., Van Eenoo P., Deventer K., Delbeke F.T. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

// Anal. Bioanal. Chem. 2007. Vol. 389, N 4. P. 1209–1224.

156. Cha E., Kim S., Kim H.W., Lee K.M., Kim H.J., Kwon O.S., Lee J. Relationships between structure, ionization profile and sensitivity of exogenous anabolic steroids under electrospray ionization and analysis in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Biomed Chromatogr. 2016. Vol. 30, N 4. P. 555–565.

157. Jeon B.W., Yoo H.H., Jeong E.S., Kim H.J., Jin C., Kim D.H., Lee J. LC– ESI/MS/MS method for rapid screening and confi rmation of 44 exogenous anabolic steroids in human urine // Anal. Bioanal. Chem. 2011. Vol. 401, N 4. P. 1353–1363.

158. Kim S.H., Cha E.J., Lee K.M., Kim H.J., Kwon O.S., Lee J. Simultaneous ionization and analysis of 84 anabolic androgenic steroids in human urine using liquid chromatography–silver ion coordination ionspray/triple–quadrupole mass spectrometry // Drug Test Anal. 2014. Vol. 6, N 11–12. P. 1174–1185.

159. Sobolevsky T., Krotov G., Dikunets M., Nikitina M., Mochalova E., Rodchenkov G. Anti-doping analyses at the Sochi Olympic and Paralympic Games 2014 // Drug Test Anal. 2014. Vol. 6, N 11–12. P. 1087–1101.

160. Thevis M., Thomas A., Schänzer W. Current role of LCMS(/MS) in doping control // Anal. Bioanal Chem. 2011. Vol. 401, N 2. P. 405–420.

161. Thevis M., Thomas A., Pop V., Schänzer W. Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: possibilities and limitations // J. Chromatogr. A. 2013. Vol. 31, N 1292. P. 38–50.

162. Mazzarino M., Botrè F. A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. Vol. 20, N 22. P. 3465–3476.

163. Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Лузянин Б.П., Пальцын А.А. Масс-спектрометрия в биологии и в медицине XXI века // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013. № 4. С. 68-75.

164. Mazzarino M., Turi S., Botrè F. A screening method for the detection of synthetic glucocorticosteroids in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry based on class-characteristic fragmentation pathways // Anal. Bioanal. Chem. 2008. Vol. 390, N 5. P. 1389–1402.

165. Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS // Anal. Bioanal. Chem. 2008. Vol. 392, N 4. P. 681–698.

166. Guddat S., Solymos E., Orlovius A., Thomas A., Sigmund G., Geyer H., Thevis M., Schänzer W. High-throughput screening for various classes of doping agents using a new 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach // Drug Test Anal. 2011. Vol. 3, N 11–12. P. 836–850.

167. Cho Y., Ahmed A., Islam A., Kim S. Developments in FTICR MS instrumentation, ionization techniques, and data interpretation methods for petroleomics // Mass Spectrom. Rev. 2015. Vol. 34, N 2. P. 248–263.

168. Leendert V., Van Langenhove H., Demeestere K. Trends in liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for multi-residue analysis of organic micropollutants in aquatic environments // Trends Analyt. Chem. 2015. Vol. 67. P. 192–208.

169. Mann M.; Kelleher N.L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Vol. 105, N 47. P. 18132–18138.

170. Beynon J.H. Qualitative Analysis of Organic Compounds by Mass Spectrometry // Nature. 1954. Vol. 174, P. 735–737.

171. Little J.L., Williams A.J., Pshenichnov A.; Tkachenko V. Identification of "Known Unknowns" Utilizing Accurate Mass Data and ChemSpider // J. Am. Soc. Mass Spectr. 2012. Vol. 23, N 1. P. 179–185.

172. Kim S., Rodgers R.P., Marshall A.G. Truly «exact» mass: Elemental composition can be determined uniquely from molecular mass measurement at similar to 0.1 mDa accuracy for molecules up to similar to 500 Da // Int. J. Mass Spectrom. 2006. Vol. 251, N 2–3. P. 260–265.

173. Marshall A.G., Hendrickson C.L. High-Resolution Mass Spectrometers

// Annu Rev. Anal. Chem. 2008. Vol. 1. P. 579–599.

174. Kaiser Nathan K., Bruce James E., Observation of Increased Ion Cyclotron Resonance Signal Duration through Electric Field Perturbations // Analytical Chemistry. 2005. Vol. 77, N 18. P. 5973–5981.

175. Makarov A., Denisov E., Lange O. Performance Evaluation of a High-field Orbitrap Mass Analyzer // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009. Vol. 20, N 8. P. 1391– 1396. 176. Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Baischun W., Lange, O., Strupat K., Horning S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer // Anal. Chem. 2006. Vol. 78, N 7. P. 2113–2120.

177. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis // Anal Chem. 2000. Vol. 72, N 6. P. 1156–1162.

178. Perry R.H., Cooks R.G., Noll R.J. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications // Mass Spectrom. Rev. 2008. Vol. 27, N 6. P. 661–699.

179. Вирюс Э.Д., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Обнаружение оксандролона и метаболита высокоэффективной его В моче методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения орбитальной с ловушкой с химической ионизацией при атмосферном давлении после прекращения его приема // Журнал Аналитической Химии. 2009, 64(1), 31-35.

180. Вирюс Э.Д., Родченгов Г.М. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с фотоионизацией при атмосферном давлении для детектирования ультрамалых количеств анаболических стероидов // Масс-спектрометрия. 2007. Т. 4, № 4. С. 275–282.

181. Virus E.D., Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M. Introduction of HPLC/Orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control // J. Mass Spectrom. 2008. Vol. 43, N 7. P. 949–957.

182. Virus E.D., Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M. 'Wrong-Way-Round' and screening for doping substances in human urine by high-performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2012. Vol. 47, N 3. P. 381–391.

183. Семенистая Е.Н., ВирюсЭ.Д., Родченков Г.М. Сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения для определения сульфатов и глюкуронидов эндогенных стероидов в биожидкостях // Журнал Физической Химии, 2009, Vol 83, № 4, С. 625-632.

184. Семенистая Е.Н., Вирюс Э.Д., Родченков Г.М. Изучение фрагментации глюкуронида тестостерона и сульфата тестостерона при индуцированной

соударениями диссоциации в источнике ионов и в ионной ловушке методами масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемной масс-спектрометрии // Масс-спектрометрия 5 (2), 2008, Р. 103-110.

185. Hu Q., Noll R. J., Li H., Makarov A., Hardman, M., Cooks R. G. The Orbitrap: a new mass spectrometer // J Mass Spectrom. 2005. Vol. 40, N 4. P. 430-443.

186. Kingdom K. H. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures // Phys Rev. 1923. Vol. 21, N 4. P. 408-418.

187. Lewis R. R. Motion of Ions in the Kingdon Trap // J Appl Phys. 1982. Vol. 53, N6. P. 3975-3980.

188. Sekioka, T., Terasawa, M., Awaya Y. Ion Storage in Kingdon Trap // Radiat Effects and Defects in Solids. 1991, Vol. 117, N 1-3. P. 253-259.

189. Yang L. S., Church D. A. Confinement of Injected Beam Ions in a Kingdon Trap // Nucl Instrum Meth B. 1991. Vol. 56-7, P. 1185-1187.

190. Knight R. D. Storage of Ions from Laser-Produced Plasmas // Appl Phys. Lett. 1981. Vol. 38, N 4. P. 221-223.

191. Makarov A. In Practical Aspects of Trapped Ion Mass Spectrometry, Volume IV; CRC Press: 2010; pp. 251-272.

192. Gillig K. J., Bluhm B. K., Russell D. H. Ion motion in a Fourier transform ion cyclotron resonance wire ion guide cell // Int J Mass Spectrom. 1996. Vol. 157-158, P. 129-147.

193. Makarov, A. Mass spectrometer. 1999, US Patent 5,886,356.

194. Hardman M., Makarov A.A. Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source // Analytical Chemistry. 2003. Vol. 75, N 7. P. 1699-1705.
195. Makarov A., Denisov E., Jung, G., Balschun W., Horning S. Improvements in an electrostatic trap. 2006, Patent WO2006/129109

196. Makarov A., Denisov E., Lange, O., Horning S. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer // J. Am. Soc. Mass Spectr. 2006. Vol. 17, N 7. P. 977-982. 197. Wenger, C. D.; McAlister, G. C.; Xia, Q.; Coon, J. J. Sub-part-per-million precursor and product mass accuracy for high-throughput proteomics on an ETD-enabled orbitrap mass spectrometer // Mol Cell Proteomics. 2010. Vol. 9, N 5. P. 754-763.

198. Вирюс Э.Д., Родченков Г.М. Определение ультрамалых количеств 66гидрокси-4-хлордегидрометилтестостерона ВЭЖХ/Масс-В моче методом орбитальной спектрометрии ионной ловушкой с условиях В электрораспылительной ионизации // Заводская лаборатория. Диагностика материалов 74 (7), 2008, Р. 17-21.

199. Семенистая Е. N., Дикунец М. А., Э.Д. Вирюс, Родченков Г.М. Определение экземестана и 17-гидроэкземестана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и масс-спектрометрией высокого разрешения // Журнал Аналитической Химией. 2010, 65(5), 498-506.

200. Desvergne B., Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. // Endocr. Rev.1999. Vol. 20, P. 649–688.

201. Desvergne B., Michalik L., Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. //Molecular Endocrinolog. 2004. Vol. 18, N 6. P. 1321-1332.

202. Walczak R., Tontonoz P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPAR in the control of lipid metabolism. // J. Lipid Research. 2002. Vol. 43, P. 177-186.

203. Wang Y. X., Lee C. H., Tiep S., Yu R. T., Ham J., Kang H., Evans R. M. Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fat metabolism to prevent obesity. // Cell. 2003. Vol. 113. P. 159-170.

204. Narkar V. A., Downes M., Yu R. T., Embler E., Wang Y. X., Banayo E., Mihaylova M. M., Nelson M. C, Zou Y., Juguilon H., Kang H., Shaw R. J., Evans R. M. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. // Cell. 2008. Vol. 134, N 3. P. 405-415.

205. Дикунец М. А., Вирюс Э.Д., Семенистая Е.Н., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Масс-спектрометрия допинговых препаратов нового поколения: агонисты

дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом // Журнал Аналитической Химии. 2010, 65(13): 1411-1419

 206. Наука и спортивная медицина: [Электронный ресурс] // Родченков Г.М.

 Новые
 классы
 допинговых
 соединений.
 URL:

 http://federalbook.ru/files/SPORT/soderganie/Tom%202/Rodchenkov.pdf.
 (Дата обращения: 27.11.2017).

207. Sobolevsky T, Dikunets M, Sukhanova I, Virus E., Rodchenkov G. Detection of PPAR $\delta$  agonists GW1516 and GW0742 and their metabolites in human urine. // Drug Test Anal. 2012, 4(10):754-760

208. Virus E.D., Luzyanin B.P., Ivanov A.V., Kubatiev. High-performance liquid chromatography on a porous graphitized carbon column coupled to an orbitrap mass spectrometer with atmospheric pressure photoionization for screening exogenous steroids in human urine // Rapid communications in Mass Spectrometry 2015, 29(19): 1779-1788.

209. Вирюс Э.Д., В.Ф. Сизой, М.А. Дикунец, Г.М. Родченков Определение ультрамалых количеств З'-гидроксистанозолола методом газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии // Судебно-медицинская экспертиза 2007;50(1):27-31.

210. Вирюс Э.Д., Родченков Г.М. Высокочувствительное и специфичное определение 17α-метил-5β-андростан-3α,17β-диол методом газовой хроматографии/тройной масс-спектрометрии // Журнал Физической Химии 81(3), 2007, С. 493–498.

211. Вирюс Э.Д., Дикунец М., Соболевский Т., Родченков Г. Многокомпонентный скрининг допинговых препаратов методами жидкостной хроматографии/массспектрометрии // Аналитика. - 2012. – 3(2). - С. 28-37.

212. Патент РФ 2478207. Способ ретроспективного обнаружения ксенобиотиков при допинговом контроле спортсменов Вирюс Э.Д., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М.; Заявл. 16.08.2011, Опубл. 27.03.2013. Бюл. № 9

213. Патент РФ 2473079. Способ обнаружения комплекса ксенобиотиков в биологической жидкости при допинговом контроле и устройство для его

осуществления / Вирюс Э.Д., Родченков Г.М., Соболевский Т.Г.; Заявл. 16.08.2011, Опубл. 20.01.2013. Бюл. № 2

214. Патент РФ 2483309. Способ обнаружения экзогенных стероидов в биологической жидкости человека / Вирюс Э.Д., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М.; Заявл. 05.03.2012, Опубл. 27.05.2013. Бюл. № 15

215. Kelly M. A., Vestling M.M., Fenselau C.C., Smith P.B. Electrospray analysis of proteins: A comparison of positive-ion and negative-ion mass spectra at high and low pH // J. Mass Spectrom. 1992. Vol. 27, N 10. P. 1143-1147.

216. Hiraoka K., Murata K., Kudaka I. Do the Electrospray Mass Spectra Reflect the Ion Concentrations in Sample Solution ? // Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan. 1995. Vol. 43, N 3. P 127–138.

217. Самохин А.С., Ревельский А.И., Вирюс Э.Д., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М., Чепелянский Д.А., Ревельский А.И. Новый подход к определению степени дериватизации и его применение для изучения реакции силилирования нанограммовых/микрограммовых количеств метилтестостерона // Журнал Аналитической Химии. 2011, 66(12), 1186-1189.

218. Самохин А.С., Перевозчикова Д.В., Ревельский А.И., Вирюс Э.Д., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М., Ревельский И.А. Улучшенный подход к определению степени дериватизации и его применение для изучения реакции силилирования ряда анаболических стероидов // Масс-спектрометрия. 2013. Т. 10. № 1. С. 25-30.

219. Faraji M., Yamini Y., Rezaee M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization and applications // Journal of the Iranian Chemical Society. 2010. Vol. 7, N 1. P. 1-37.

220. Fonnum G., Johansson C., Molteberg A., Morup S., Aksnes E. Characterization of Dynabeads® by magnetization and Mössbauer spectroscopy // Journal of magnetism and magnetic materials. 2005, Vol. 293, N 1, P. 41-47.

221. Vogeser M., Geiger A., Herrmann R., Kobold U. Sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using functionalized ferromagnetic microparticles // Clinical Biochemistry. 2008, Vol. 41, N 16-17, P. 1417-1419.

222. Суханова И.И., Дикунец М.А., Вирюс Э.Д., Родченков Г.М. Магнитная сепарация как новый метод для экстракции низкомолекулярных соединений из биологических жидкостей // Журнал Аналитической Химии. 2011. Т. 66. № 9. С. 807-814.

223. Суханова И.И., Дикунец М.А., Э.Д. Вирюс, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Магнитная сепарация как альтернативный способ экстракции допинговых препаратов новых классов из мочи человека // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т. 12. № 2. С. 283-294.

224. Суханова И., Дикунец М., Родченков Г., Соболевский Т., Э.Д. Вирюс Нанотехнологии в допинговом контроле: перспективы применения магнитной сепарации для пробоподготовки // Аналитика. 2012. Т. 2. № 1. С. 18-23.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1



17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α-андростан-3-он

17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9,11-триен-3-он

4-гидроксиандростендион



5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он

17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5αандростан-3-он

13-этил-17-гидрокси-18,19-динор-17α-прегна-4,9,11-триен-3-он етрагидрогестринон





18нор-17,17-диметил-5βандростан-1,13-диен-3α-ол

Salmeterol

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2











13-этил-17-гидрокси-18,19-динор-17а-прегна-4,9,11-триен-3-он (Тетрагидрогестринон)



247

17α-метил-5α-андростано-[3,2с]-пиразол-3',17β-диол (метаболит Станозолола)



Relative Abundance 60-40-20 254.2024 201.1633 0 200 m/z

100-

80-

269.2259





17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]пиразол-4β,17β-диол (метаболит Станозолола)



9-Фтор-17α-метил-11β,17βдигидроандрост-4-ен-3-он (флюоксиместерон)





13-этил-17-гидрокси-18,19-dinor-17а-прегнан-4,9,11-триен-20-ин-3-он (Гестринон)



17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5αандростан-3-он (Оксандролон)







4-хлор-17β-гидрокси-17αметиландроста-1,4-диен-3-он (Орал Туринабол)



4-хлор-6β,17β-дигидрокси-17αметиландроста-1,4-диен-3-он (метаболит Орал Туринабола)



17β-гидрокси-5α-андростано [3,2-с] пиразол (Prostanozol)



6β,17β-дигидрокси-17αметиландроста-1,4-диен-3-он (метаболит Метандиенона)



2α-Гидроксиметилэтистерон (метаболит Даназола)





17α-этинил-17βгидроксиандрост-4-ено[2,3d]изоксазол (Даназол)

17α-гидроксиандроста-1,4-диен-3он (α-Болденон)



250







17β-гидрокси-І-метил-5αандрост-1 -ен-3-он (Метенолон)

303.2310







17β-гидрокси-17α-метилэстра-4,9,11-триен-3-он (Метилтриенолон)



17β-гидрокси-7α,17αдиметилэстра-4-ен-3-он (Миболерон)



4,17β-дигидроксиэстра-4-ен-3-он (Оксаболон)







4,17β-дигидрокси-17αметиландрост-4-ен-3-он (Оксиместерон)

1α-метил-5α-андростан-3α-ол-17-он (метаболит Местеролона)

1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17он (метаболит метенолона)



17α-метил-5α-андростано[2,3-с]фуразан-16β,17β-диол (метаболит Фуразабола)



2α-метил-5α-андростан-3α-ол-17-он (метаболит Дростанолона)



2-гидроксиметил-17αметиландрост-1,4-диен-11α,17βдиол-3-он (метаболит Формеболона)



5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он (метаболит Болденона)



4-андростен-7α,17β-диол-3-он (4-гидрокситестостерон)



4-хлор-3α-гидроксиандрост-4-ен-17-он (метаболит Клостебола)

337.2162

319.2058

300

299.1999

281.<u>189</u>6

263.1790

m/z

200



7α,17α-диметил-5β-андростан-3α,17β-диол (метаболит Боластерона)





285.2574

100-

80-

60-

40-

20-

0-

Relative Abundance







13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-5αгонан (метаболит Норболетона)

13β,17α-диэтил-3α,17β-диол-β-гонан (метаболит Норболетона)

271.2419



17α-этил-5α-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)



17α-этил-5β-эстран-3α,17β-диол (метаболит Норэтандролона)







17α-метил-5β-андростан-3α,17βдиол (метаболит Метилтестостерона)







7α-метилmethyl-19-нор-17α-прегна-5(10)-ен-20-ин-3α,17β-диол (метаболит Тиболона)

5α-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)

5β-эстран-3α-ол-17-он (метаболит Нандролона)


18-нор-17,17-диметиландроста-1,4,13-триен-3-он (метаболит Метандиенона)





## ПРИЛОЖЕНИЕ 3













Тимолол

Эсмолол

дезацетил-гидрокси дефлазакорт





Триамцинолон Ацетонид

Преднизолон

Преднизон



Индапамид

Триамтерен

Алтиазид









(метаболит Селегилина)



Фоледрин

Бупренорфин