

На правах рукописи



Прасолов Илья Сергеевич

Обнаружение стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато-масс-спектрометрии

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии
«Антидопинговый центр»

Научный руководитель:

кандидат химических наук,
Соболевский Тимофей Геннадьевич
начальник отдела ХМСМА
Федеральное государственное унитарное
предприятие «Антидопинговый центр»

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
старший научный сотрудник
Бродский Ефим Соломонович
и.о. заведующего лабораторией
аналитической экотоксикологии
Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН

доктор биологических наук, профессор
Зякун Анатолий Маркович
заведующий лабораторией
масс-спектрометрии
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Ведущая организация:

Всероссийский научно-исследовательский
институт метрологии им. Д.И. Менделеева
Федерального агентства по техническому
регулированию и метрологии,
г. Санкт-Петербург

Защита состоится 23 сентября 2015 г. в 16 ч. 30 мин. в ауд. 446 на заседании
диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском
государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу:

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Химического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова – www.chem.msu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Моногарова О.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В настоящее время в практике допинг–контроля существует необходимость выявления случаев употребления допинговых препаратов, являющихся близкими аналогами гормонов, вырабатываемых в организме человека, или их метаболическими предшественниками: тестостерона, дегидроэпиандростерона, андростендиона, андростендиолов. По результатам анализа методом газовой хроматографии в сочетании с масс–спектрометрией это сделать не удается, и отмечаются лишь так называемые атипичические изменения гормонального профиля спортсмена.

Применение синтетического тестостерона в спорте запрещено на протяжении 35 лет. Ранее единственным способом установить факт его использования было определение отношения концентраций тестостерона (T) и его неактивного изомера – эпитестостерона (E) в моче. Однако данный подход имеет ряд существенных ограничений, поскольку отношение T/E в популяции варьируется в довольно широких пределах (от 0.1 до 4.0 и выше). Кроме этого, в последнее время на рынке спортивного питания широкое распространение получили «прогормоны» – вещества, которые являются предшественниками или метаболитами тестостерона и не определяются традиционными методами допинг–контроля. Установить происхождение стероидных гормонов можно двумя способами – обладая информацией о стероидном профиле спортсмена или напрямую, посредством изотопной хромато–масс–спектрометрии. Исследование стероидного профиля по программе “Биологический паспорт спортсмена” представляет собой косвенный подход к решению проблемы и ввиду отсутствия специфических метаболитов («маркеров») требует наличия большого количества статистических данных и их последующей индивидуализации. Поскольку подавляющее большинство синтетических стероидов получают из растительного сырья с изотопным составом углерода около минус 30‰ и ниже (относительно международного стандарта белемнита), факт их применения может быть выявлен с использованием изотопной масс–спектрометрии. Метод основан на измерении отношения изотопов $^{13}C/^{12}C$ эндогенных стероидов в организме человека, которое в естественных условиях лежит в диапазоне от минус 17 до минус 26‰ в зависимости от места проживания и особенностей диеты человека, и никогда не достигает значений ниже минус 27‰.

В 1994 г. была впервые предложена методика селективного выделения метаболитов тестостерона из мочи с последующим анализом методом газовой хроматографии –

сжигания – изотопной масс–спектрометрии (*ГХ–С–ИМС*), однако она требовала до 50 мл образца.

В 2004 г. Всемирное антидопинговое агентство (*ВАДА*) опубликовало технический документ, регламентирующий использование метода *ГХ–С–ИМС*, но даже сегодня у антидопинговых лабораторий отсутствует единый подход к методике анализа ввиду его сложности и трудоемкости. Наиболее часто используют многостадийную твердофазную экстракцию (*ТФЭ*) и *ТФЭ* в сочетании с полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (*ВЭЖХ*).

Целью настоящей работы являлась разработка способа обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато–масс–спектрометрии.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи**:

- подобрать условия выделения стероидов из мочи, включая выбор оптимальных условий сорбционного концентрирования, полупрепаративного разделения стероидов и их производных методом *ВЭЖХ*, а также дериватизации целевых соединений;
- выбрать оптимальные условия газохроматографического разделения целевых стероидов;
- проанализировать статистически значимое количество отрицательных проб мочи спортсменов и добровольцев методом *ГХ–С–ИМС* и провести статистическую обработку полученных данных с целью установления внутрилабораторных критериев оценки результатов анализа;
- выявить закономерности влияния приёма б прогормонов экзогенного происхождения на изотопный состав эндогенного тестостерона и основных его метаболитов и установить маркеры употребления, наиболее информативные при выявлении случаев их использования в спорте;
- разработать способ установления происхождения стероидов, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато–масс–спектрометрии для целей допинг–контроля.

Научная новизна работы. Изучены хроматографические свойства целевых соединений и выбраны условия их селективного выделения из мочи человека посредством жидкостно–жидкостной и твердофазной экстракции, а также

высокоэффективной жидкостной хроматографии, с учетом минимизации эффекта изотопного фракционирования в процессе пробоподготовки.

Выбраны условия ацелирования исследуемых соединений, обеспечивающие полную степень конверсии эндогенного маркера 16-андростенола в ацетильную форму и корректное измерение его изотопного соотношения.

В экспериментально выбранных условиях методом ГХ–С–ИМС проанализировано более 900 образцов мочи спортсменов и добровольцев, а в результате статистической обработки полученных данных впервые определены референтные интервалы разницы значений изотопного состава в парах «эндогенный маркер – целевое соединение» для российской популяции спортсменов. Использование установленных внутрилабораторных критериев оценки аналитических данных практически полностью исключает вероятность появления ложноположительных результатов анализа.

Выявлен ряд закономерностей биотрансформации 6 прогормональных препаратов экзогенного происхождения в человеческом организме и установлены потенциальные маркеры их употребления, наиболее информативные при выявлении случаев их использования в спорте (для 3 из 6 препаратов – впервые).

Практическая значимость. Показана возможность достоверного определения происхождения стероидов, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато–масс–спектрометрии в целях допинг–контроля спортсменов. Предложенная методика обнаружения стероидов экзогенной природы в моче валидирована и аттестована в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и внесена в область аккредитации Федерального государственного унитарного предприятия «Антидопинговый центр» (ФГУП АДЦ) органом по аккредитации ААЦ «Аналитика». Предложенный способ определения происхождения выделенных из мочи стероидов в течение 5 лет активно используется в повседневной работе ФГУП АДЦ. В ходе настоящего исследования выполнен государственный контракт №262 от 13 августа 2013 г. на научно–исследовательскую работу для Министерства спорта Российской Федерации по лоту №10 по теме «Разработка методики установления природы ряда эндогенных стероидов методом изотопной масс–спектрометрии для целей антидопингового контроля и последующего использования во время XXII Олимпийских зимних игр в г. Сочи в 2014 году». Опыт успешного применения указанной методики в российском допинг–контроле позволил применить полученные в рамках данного исследования результаты для анализа проб спортсменов во временной Антидопинговой

лаборатории г. Сочи в период проведения Олимпийских и Паралимпийских зимних игр 2014 года.

На защиту выносятся следующие положения:

- способ обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс–спектрометрией;
- внутрилабораторные критерии оценки результатов анализа, установленные для российской популяции спортсменов по результатам анализа 923 образцов мочи спортсменов и добровольцев методом изотопной хромато–масс–спектрометрии;
- результаты исследований биотрансформации 6 прогормональных препаратов, влияющих на изотопный состав углерода стероидов человеческого организма, и маркеры употребления, наиболее информативные при выявлении случаев их использования в спорте.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены в виде докладов на Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (26 сентября – 1 октября 2010 г., Краснодар, Россия), III Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (2–7 октября 2011 г., Краснодар, Россия), 16–ой европейской конференции по аналитической химии (11–15 сентября 2011 г., Белград, Сербия) и московском семинаре по практическим аспектам применения изотопной масс–спектрометрии (10–12 апреля 2012 г., пос. Московский, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ в виде статей и тезисов докладов.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 166 страницах, содержит 93 рисунка, 69 таблиц и список цитируемой литературы из 96 наименований.

Основное содержание работы

Исходные вещества, аппаратура, техника эксперимента

Работу проводили на изотопном масс-спектрометре Delta V Plus (Thermo Electron, Германия), подключенном с помощью интерфейса сжигания Combustion III к газовому хроматографу TRACE GC (Thermo Electron, Италия). Для идентификации определяемых соединений использовали масс-спектрометр DSQ II (Thermo Electron, США), соединенный со вторым газовым хроматографом. Для ввода жидких проб использовали автодозатор TriPlusAS (Thermo Electron, Италия) в исполнении, позволяющем вводить пробу в инжекторы двух газовых хроматографов попеременно.

Целевые соединения (табл. 1) в виде ацетил-производных и прогормональные препараты (табл. 2) как в нативном виде, так и в форме ацетатов разделяли на идентичных капиллярных колонках RTX-35MS с интегрированной предколонкой длиной 5 м (Restek, США) $30\text{ м} \times 0.25\text{ мм} \times 0.25\text{ мкм}$ в режиме программирования температуры, варьируя начальную температуру термостата, скорость нагрева и температуру конечной изотермы. Газ-носитель для *ГХ-С-ИМС* дополнительно очищали с помощью термокаталитического дожигателя (Supelco, США). Для *ГХ-С-ИМС* также использовали CO_2 чистоты 99.995% (газ сравнения) и O_2 чистоты 99.999%. Температура окислительного реактора в интерфейсе сжигания составляла 940°C , а восстановительного – 600°C . Окислительный реактор регенерировали, насыщая кислородом в течение 15 мин при рабочей температуре за несколько часов до начала каждой серии анализов. В случае *ГХ-МС* данные регистрировали в режиме сканирования от 50 до 410 а.е.м. в условиях ионизации электронным ударом при 70 эВ. Объем вводимой пробы составлял 2 мкл для *ГХ-С-ИМС* и 0.5 мкл для *ГХ-МС*.

В процессе пробоподготовки использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent серии 1100 (Германия), оборудованный бинарным насосом, автодозатором, диодно-матричным детектором и препаративным коллектором фракций G1364B. Разделение проводили на колонке SunFire C18 (Waters, США) $250\text{ мм} \times 4.6\text{ мм}$ с размером зерна сорбента 5 мкм. Для защиты аналитической колонки использовали предколонку $20\text{ мм} \times 4.0\text{ мм}$ с аналогичным сорбентом.

Таблица 1. Перечень целевых соединений

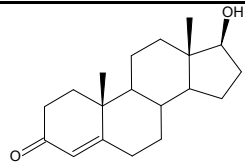
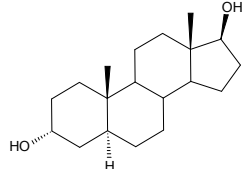
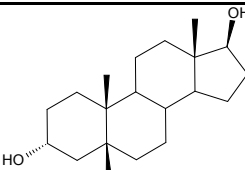
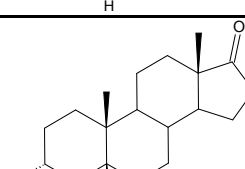
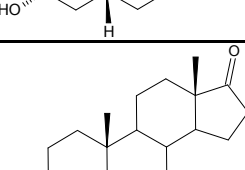
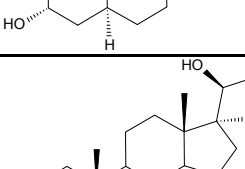
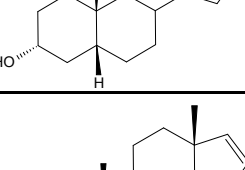
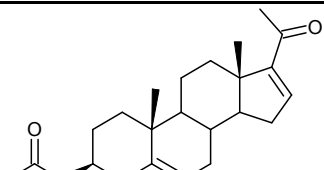
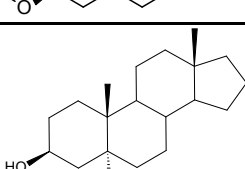
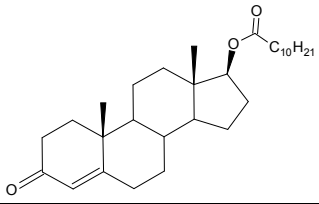
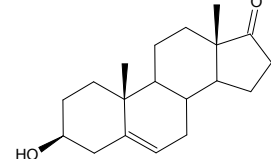
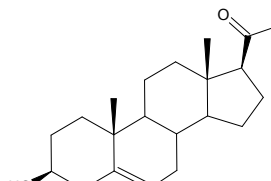
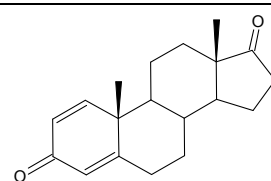
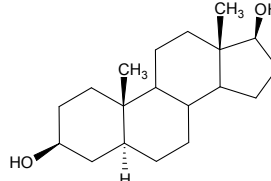
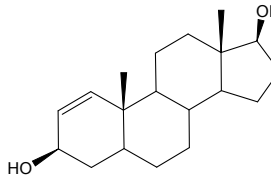
Соединение, производитель	Сокращение	Молекулярная масса	Структурная формула
определяемые соединения			
Тестостерон (NMI, Австралия)	<i>T</i>	288	
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (NMI, Австралия)	<i>5α</i>	292	
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (NMI, Австралия)	<i>5β</i>	292	
Этиохоланолон (NMI, Австралия)	<i>Э</i>	290	
Андростерон (NMI, Австралия)	<i>A</i>	290	
5 β -прегнан-3 α ,20 α -диол (Steraloids, США)	<i>ПД</i>	320	
16(5 α)-андростен-3 α -ол (Sigma, США)	<i>16-ен</i>	274	
внутренние стандарты			
дегидропрегненолона ацетат (Sigma, США)	<i>ДГПА</i>	356	
Андростанол (Sigma, США)	<i>A-ол</i>	276	

Таблица 2. Список прогормональных препаратов, изученных в работе

№	Название препарата, производитель	Состав, заявленное содержание основного компонента	Структурная формула
1	Andriol TK [Organon]	тестостерона ундеканат, 40 мг	
2	DHEA [Ultimate Nutrition]	дегидроэпиандростерон, 50 мг	
3	Pregnenolone [Vitamin World]	прегненолон, 50 мг	
4	BOLD [iForce Nutrition]	1,4-андростадиен-3,17-дион, 100 мг	
5	Maxteron [Impact Nutrition]	5α-андростан-3β,17β-диол, 200 мг	
6	1-AD [Ergopharm]	1-андростен-3β,17β-диол, 100 мг	

Подбор условий жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции

В литературе не приводится никаких данных по изучению условий ЖЖЭ и ТФЭ изучаемых стероидов из мочи. По этой причине мы провели серию экспериментов для поиска оптимальных условий ТФЭ и определения степени извлечения при ЖЖЭ. В этом случае анализ получаемых образцов проводили на ГХ-МС в виде триметилсилильных (ТМС) производных по стандартной процедуре, используемой в практике допинг-контроля.

Определение степени извлечения целевых соединений при ЖЖЭ

Исследуемые вещества экстрагировали из 10 мл модельного водного раствора дважды порциями диэтилового эфира по 5 мл. В ходе анализа первичного экстракта обнаружено, что степени извлечения целевых соединений приближаются к количественным, поэтому от двукратной экстракции в процессе пробоподготовки решили отказаться.

Выбор промывной жидкости для ТФЭ

В качестве промывных жидкостей (промывка картриджа для ТФЭ перед элюированием целевых соединений) рассматривали воду, смесь 10% метанол – 90% воды и смесь 20% метанол – 80% воды (объем 4 мл). Для серии экспериментов использовали одну и ту же пробу мочи объемом 10 мл.

В случае использования водных смесей, содержащих метанол, наряду с незначительным улучшением чистоты экстрактов, которую оценивали путем визуального сопоставления хроматограмм, полученных после анализа в виде ТМС производных, наблюдали некоторое снижение отклика (площади пика соответствующего ТМС производного) целевых соединений, поэтому от их применения отказались и в дальнейшем использовали воду.

Выбрав промывную жидкость, искали ее оптимальный объем. Картридж промывали 2, 4 и 6 мл воды. Для объема промывной жидкости 6 мл наблюдали наилучшую степень очистки экстрактов от посторонних компонентов.

Выбор элюента

В качестве элюентов рассматривали метанол, смесь 20% ацетона – 80% метанола, ацетонитрил и метилтретбутиловый эфир (МТБЭ). Как и ранее, использовали одну и ту же пробу мочи объемом 10 мл.

Обнаружено, что метанол и МТБЭ проявили наилучшую элюирующую способность, причем в случае МТБЭ степень извлечения глюкуронида андростенола была выше. Однако, при использовании МТБЭ в качестве элюента на стадии перерастворения и переноса экстрактов в виалы перед ВЭЖХ фракционированием наблюдали образование эмульсии, что вероятно вызвано присутствием в экстрактах малополярных компонентов матрицы, элюировавшихся с картриджа на стадии ТФЭ вместе с целевыми соединениями. Если перед элюированием промывать картридж не только водой, но и гексаном, потребуется тщательно высушивать сорбент между промывками и

элюированием, что заметно удлиняет пробоподготовку на этой стадии. Поэтому в дальнейшем в качестве элюента использовали метанол.

В поисках оптимального объема элюента целевые соединения (в виде глюкуронидов) элюировали с картриджа 2, 4 и 6 мл метанола. Несмотря на то, что в случае 6 мл степень извлечения исследуемых веществ была несколько выше, использовали 4 мл элюента с целью сокращения времени аналитической процедуры за счет уменьшения объема упариваемого экстракта.

Выбор условий разделения методом жидкостной хроматографии

Целевые соединения содержатся в объекте анализа как в очень низких (как у *T* и *5α*-диола – 5–50 нг/мл), так и весьма высоких концентрациях (*A* и *Э* до 10000 нг/мл и более), поэтому существует необходимость во фракционировании и концентрировании пробы. Наличие в моче огромного числа мешающих соединений, в том числе стероидной структуры, также требует тщательной очистки пробы от этих компонентов. Данные задачи в процессе пробоподготовки решали на стадии полупрепаративного *ВЭЖХ* разделения. На этапе выбора оптимальных условий *ВЭЖХ* фракционирования стремились достигнуть наилучшего разделения целевых компонентов пробы и, как следствие, максимальной чистоты фракций за минимальное время.

На этапе выбора оптимальной программы градиентного элюирования предварительно изучили хроматографическое поведение всех целевых стероидов. Для этого в *ЖХ* вводили растворы индивидуальных соединений в метаноле. Особенности химического строения определяемых стероидов обуславливают малое поглощение в *УФ* диапазоне, поэтому для их детектирования выбрали длину волны 197 нм. Для работы при 197 нм подходит только ацетонитрил, причем очень высокого качества.

Найденные в ходе экспериментов условия градиентного элюирования приведены в табл. 3 (метод №1). На рис. 1 представлены хроматограммы первичного *ВЭЖХ* фракционирования для модельной смеси стероидов и реального образца мочи. Для контроля стабильности времен удерживания в модельную смесь и каждую пробу добавляли ацетат дегидропрегненолона (вещество экзогенной природы, имеющее время удерживания, заметно отличающееся от такового для остальных компонентов пробы).

Таблица 3. Условия градиентного элюирования для первичного фракционирования (метод №1) и выделения ацетатов андростандиолов (метод №2)

метод № 1			метод № 2		
время, мин	A, %	B, %	время, мин	A, %	B, %
0	70	30	0	30	70
20	0	100	33	0	100
30	0	100	38	0	100
35	70	30	43	30	70
40	70	30	48	30	70

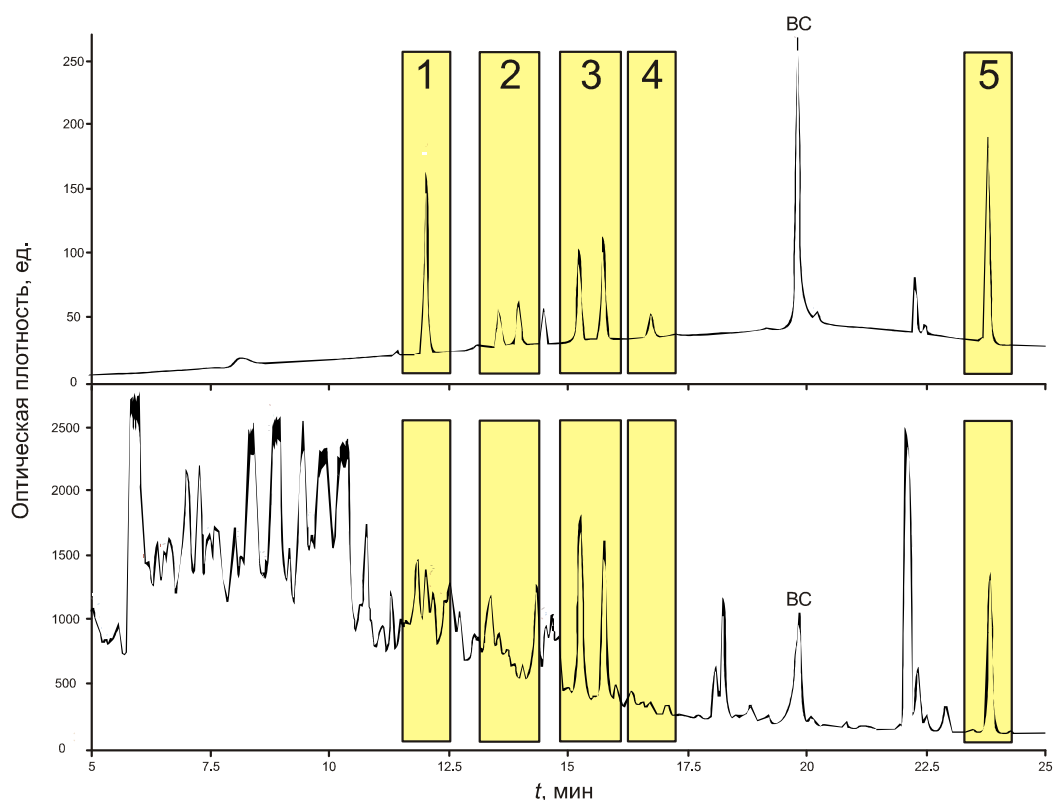


Рис. 1. Хроматограммы, соответствующие ВЭЖХ разделению тестовой смеси стероидов и реального объекта. Выделенные зоны отвечают временным интервалам сбора фракций: 1 – Т, 2 – 5 α /5 β -диола, 3 – А/Э, 4 – ПД, 5 – 16-ен. ВС – маркер времени (ацетат дегидропрегненолона)

Нами были также изучены хроматографические свойства ацетата тестостерона и диацетатов 5 α /5 β -андростандиолов. Поскольку фракции указанных соединений содержали большое количество мешающих компонентов, после стадии ацетилирования их подвергали повторному ВЭЖХ-фракционированию. Установлено, что для выделения ацетата тестостерона целесообразно использовать те же условия элюирования (табл. 14), но детектировать при длине волны 240 нм. В случае ацетатов 5 α /5 β -андростандиолов

следует применить более плавный градиент, начинающийся с 70% ацетонитрила, так как в противном случае существенно увеличиваются значения времен удерживания (табл. 3 – метод №2).

Выбор условий газохроматографического разделения

При выборе условий ГХ разделения целевых соединений следует обеспечить решение двух основных задач:

- достичь наилучшего разделения, сохраняя при этом разумную длительность анализа и минимально возможную ширину пиков;
- обеспечить стабильный фон, обусловленный уносом неподвижной фазы колонки (важно для изотопной масс–спектрометрии, так как чем стабильнее фоновый сигнал, тем точнее измеряемые значения $\delta^{13}\text{C}$).

Исходя из химической природы анализируемых соединений, сочли целесообразным использовать капиллярную колонку с неподвижной фазой средней полярности, содержащую 35% фенильных групп.

Несмотря на то, что в случае анализа стероидов в нативном виде разделение близких по структуре пар соединений (5 α /5 β –диола, А/Э) более эффективно, чем в случае ацетатов, предел обнаружения последних существенно ниже. В случае анализа сопоставимых количеств тестостерона сигнал для ацетата был в два раза выше в сравнении с таковым, зарегистрированным для свободной формы. Кроме того, при анализе ацетатов целевых соединений наблюдали улучшение формы и уменьшение ширины соответствующих хроматографических пиков. По этим причинам, определение изотопного состава целевых соединений осуществляли в форме ацетильных производных.

Стабилизации фонового сигнала достигли благодаря использованию медленной температурной программы на участке выхода целевых соединений: 120°C (1 мин), нагрев 30°C/мин до 260°C, нагрев 1°C/мин до 280°C (2 мин). В поисках оптимальной температурной программы варьировали начальную температуру (60°C, 80°C и 120°C). Следовало ожидать, что при температурах 60°C и 80°C на форме хроматографических пиков положительно скажется так называемый “эффект растворителя”, но поскольку анализируемые соединения имеют достаточно высокие температуры кипения, данный эффект не проявился в значительной степени, и поэтому с целью предотвращения конденсации паров воды в колонке и уменьшения времени охлаждения термостата

хроматографа до начальной температуры, приняли в качестве начальных условий температуру в 120°C.

При подборе скорости нагрева в температурном интервале выхода целевых соединений обнаружили, что для значений в 3 и 5°C/мин происходило сужение пиков анализируемых веществ и заметно сокращалось время анализа, однако наряду с этим наблюдался рост фонового сигнала (унос неподвижной фазы) и ухудшение разделения близких по структуре пар целевых соединений (5 α /5 β -диолы, А/Э). С учетом вышесказанного, нагрев в дальнейшем производили со скоростью 1°C/мин.

Скорость потока газа-носителя при ГХ-МС анализе установили на значении 1.7 мл/мин, что немного выше оптимальной скорости потока для колонки с внутренним диаметром 0.25 мм, однако это позволило несколько сократить время одного анализа. В случае ГХ-С-ИМС использовали скорость потока газа-носителя 2 мл/мин для получения времен удерживания, близких к таковым в ГХ-МС системе (для компенсации большей длины пути до детектора).

Ниже на рис. 2 приведена хроматограмма тестовой смеси для ГХ, содержащей исследуемые соединения в виде ацетатов (регистрация в ГХ-МС системе). Тестовую смесь стероидов использовали для идентификации пиков на хроматограммах проб мочи, а также для проверки состояния хромато-масс-спектрометра.

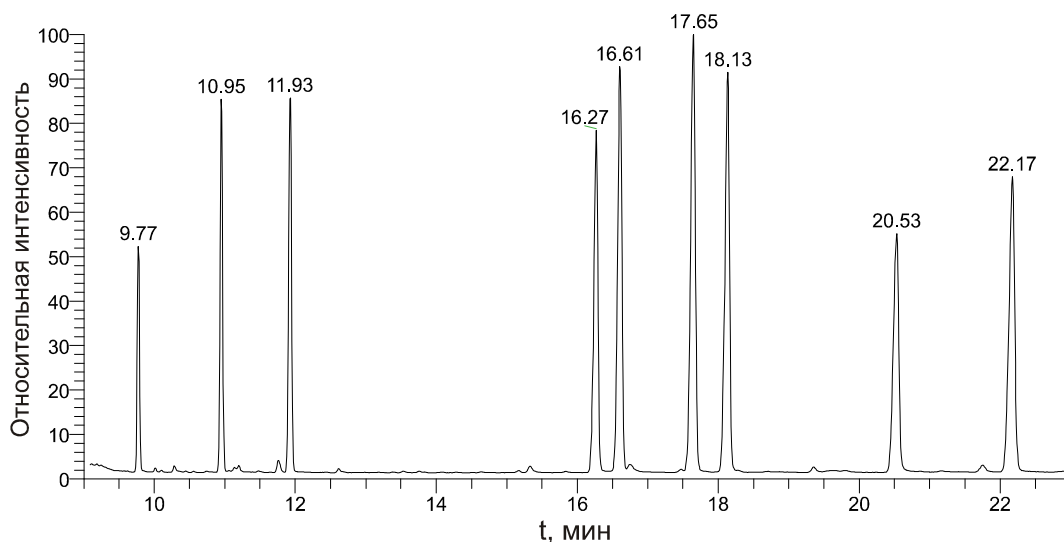


Рис. 2. Хроматограмма тестовой смеси стероидов для ГХ (9.77 мин – пентакозан [внутренний стандарт¹], 10.95 мин – 16-ен, 11.93 мин – андростанол [внутренний стандарт²], 16.27 мин – Э, 16.61 мин – А, 17.65 мин – 5 β -диол, 18.13 мин – 5 α -диол, 20.53 мин – Т, 22.17 мин – ПД) (все в виде ацетатов)

Дериватизация (ацелирование)

В виду особенностей конструкции интерфейса сжигания, эфиры трифторуксусной кислоты, также как и триметилсилильные производные, не подходят для изотопной хромато-масс-спектрометрии, поскольку необратимо отравляют окислительный реактор. Анализ же целевых соединений в форме ацетильных производных не наносит вреда системе, вследствие чего в качестве дериватирующего агента выбрали уксусный ангидрид. На рис. 3 приведена схема реакции ацелирования тестостерона.

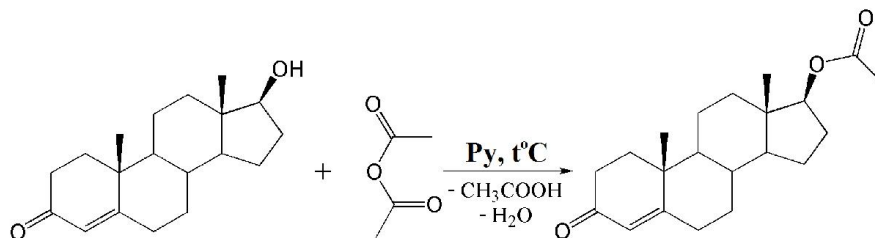


Рис. 3. Взаимодействие тестостерона с уксусным ангидридом.

Целью оптимизации условий дериватизации являлось получение ацетатов стероидов с максимальным выходом за минимальное время. Поскольку в литературе описано множество протоколов ацелирования стероидов (время, температура), сравнивали различные условия получения производных.

Установлено, что среди всех целевых соединений и стандартов андростанол и андростенол образуют ацетаты с наименьшим выходом. Из этого следует, что оценку полноты протекания процесса необходимо осуществлять по степеням превращения именно этих соединений. В табл. 4 приведены полученные данные для андростанола.

Таблица 4. Выход реакции ацелирования андростанола в зависимости от условий протекания процесса

Условия	Полнота протекания
60°C, 60 мин	80%
60°C, 120 мин	95%
70°C, 45 мин	91%
80°C, 45 мин	94%
80°C, 90 мин	95%
80°C, 120 мин	97%
СВЧ 800Вт, 30 мин	98%

В соответствии с данными табл. 4, дериватизация при 80°C в течение 120 мин и под действием микроволнового излучения дает наилучший выход ацетильных производных.

Однако, в виду отсутствия возможности контроля условий реакции дериватизации в случае с микроволновым излучением мы решили остановить свой выбор на дериватизации при 80°C в течение 120 мин.

Поскольку ацетилирование приводит к изменению изотопного состава исследуемых соединений за счет добавления в молекулу 2 или 4 атомов углерода из уксусного ангидрида, требовалось оценить величину этого вклада. Чтобы учесть эти изменения, мы посредством *ГХ-С-ИМС* определили значения $\delta^{13}\text{C}$ для нативных стероидов и для соответствующих ацетатов, после чего рассчитали $\delta^{13}\text{C}$ уксусного ангидрида ($\delta_{\text{УА}}$), которое составило -55‰ (усредненное значение). При анализе реальных проб делали обратный расчет, используя формулу:

$$\delta_{\text{НС}} = \frac{n_{\text{С}_{\text{АС}}} \cdot \delta_{\text{АС}} - n_{\text{С}_{\text{УА}}} \cdot \delta_{\text{УА}}}{n_{\text{С}_{\text{НС}}}}, \text{ где}$$

$\delta_{\text{НС}}$ – значение $\delta^{13}\text{C}$ нативного стероида (расчетное);

$\delta_{\text{АС}}$ – значение $\delta^{13}\text{C}$ ацетата стероида (измеренное);

$\delta_{\text{УА}}$ – значение $\delta^{13}\text{C}$ уксусного ангидрида (расчетное);

$n_{\text{С}_{\text{АС}}}$ – число атомов углерода в молекуле ацетата стероида;

$n_{\text{С}_{\text{НС}}}$ – число атомов углерода в молекуле исходного стероида;

$n_{\text{С}_{\text{УА}}}$ – число атомов углерода, добавляемых к молекуле исходного стероида при дериватизации.

Эффект изотопного фракционирования контролировали по значениям $\delta^{13}\text{C}$ андростанола (внутренний стандарт) – при отсутствии существенных отклонений от серии к серии проб принимали влияние данного эффекта незначительным (то есть постоянным).

Пробоподготовка образцов мочи

Пробу мочи объемом 10-40 мл (в зависимости от концентрации целевых соединений) подвергали *ТФЭ*, метанольный элюат упаривали, перерастворяли в 1 мл фосфатного буферного раствора и экстрагировали 5 мл диэтилового эфира. Предварительно выделенный посредством вымораживания водный слой инкубировали 1 ч при 57°C в присутствии β -глюкуронидазы. После нейтрализации карбонатным буферным раствором проводили *ЖЖЭ* 5 мл диэтилового эфира. Эфирный экстракт переносили в новую пробирку, упаривали, перерастворяли в 60 мкл метанольного раствора маркера времени и 40 мкл воды и вводили в жидкостный хроматограф. Собирали фракции,

соответствующие по временам удерживания тестостерону (I), 5 α - и 5 β -андростан-3 α ,17 β -диолам (II), андростерону и этиохоланолону (III), прегнандиолу (IV) и андростенолу (V), после чего отдельные фракции упаривали досуха и ацетилировали в течение 2 ч при 80 $^{\circ}$ C. Реакционные смеси упаривали, и фракции I и II подвергали вторичному ВЭЖХ-фракционированию, собирая фракции, соответствующие ацетату тестостерона и ацетатам 5 α - и 5 β -андростан-3 α ,17 β -диолов. При проведении исследований по метаболизму в случае препаратов №4 и №6 (см. табл. 2) дополнительной ВЭЖХ-очистке подвергали также фракцию III, содержащую андростерон и этиохоланолон.

Фракции I, II (и III – в случае проведения дополнительного фракционирования) упаривали досуха, после чего к фракциям I – V добавляли раствор пентакозана в гептане (100 нг/мкл) в количестве, равном 1/10 от конечного объема фракции, и 9/10 объема чистого гептана. Полученные образцы I – V анализировали методами ГХ-МС и ГХ-С-ИМС. Блок-схема пробоподготовки представлена на рис. 4.

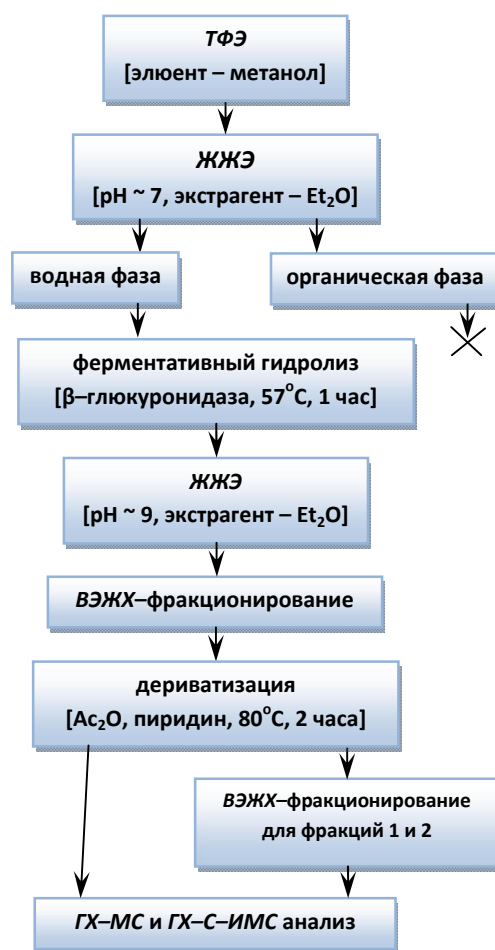


Рис. 4. Принципиальная схема пробоподготовки.

Анализ реальных проб мочи

С химической точки зрения экзогенные стероиды идентичны эндогенным и отличаются от них лишь изотопным составом. При попадании в человеческий организм эти соединения претерпевают ряд превращений (рис. 5) и выводятся из него в виде смеси с эндогенными гормонами. В случае трансдермального способа введения экзогенные стероиды вызывают незначительные концентрационные изменения гормонального профиля, но существенно влияют на изотопный состав стероидов в моче.

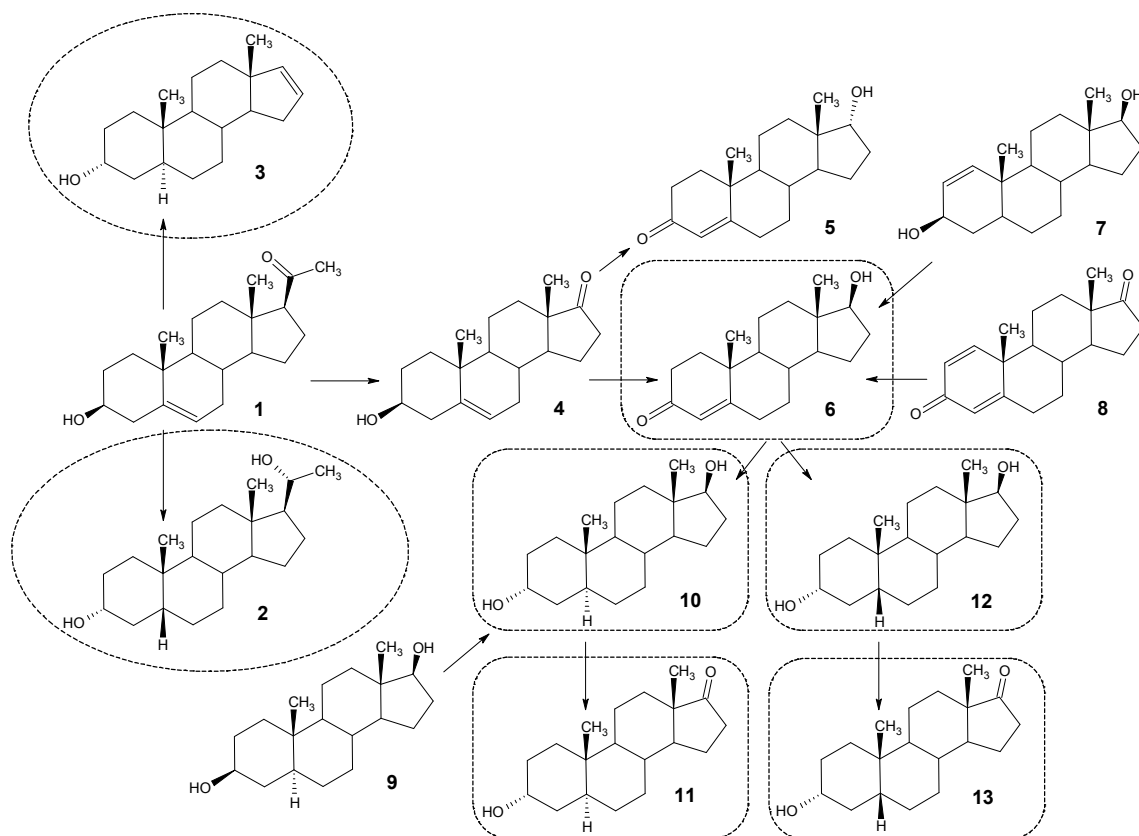


Рис. 5. Схема метаболизма стероидов. Целевые соединения заключены в квадраты, эндогенные маркеры – в эллипсы (1 – прегненолон, 2 – 5β-прегнан-3α,20S-диол, 3 – 16(5α)-андростен-3α-ол, 4 – дегидроэпиандростерон, 5 – эпитестостерон, 6 – тестостерон, 7 – 1-андростен-3β,17β-диол, 8 – 1,4-андростадиен-3,17-дион, 9 – 5α-андростан-3β,17β-диол, 10 – 5α-андростан-3α,17β-диол, 11 – андростерон, 12 – 5β-андростан-3α,17β-диол, 13 – этиохоланолон).

Для более глубокого понимания принципа метода необходимо рассмотреть схему биосинтеза стероидных гормонов в организме человека (рис. 5). Их общим предшественником считается холестерин, как синтезируемый в печени, так и поступающий в организм непосредственно с пищей, который в ходе дальнейшей

биотрансформации метаболизирует до прегненолона (рис. 5.1). Последний, под действием высокоспецифичных ферментов, отвечающих за протекание реакций гидроксирования, гидрирования, дегидрирования, изомеризации, расщепления и ароматизации, образует весь спектр стероидных гормонов, в том числе и ряд андрогенов. На заключительном этапе происходит образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой. По сравнению с исходными соединениями конъюгаты гораздо лучше растворимы в воде и легко выводятся из организма.

Тестостерон (*T* – рис. 5.6) является наиболее важным представителем класса андрогенов. Его основными метаболитами являются 5α - и 5β -андростандиолы (5α – рис. 5.10 и 5β – рис. 5.12), которые в свою очередь превращаются в неактивные продукты андростерон (*A* – рис. 5.11) и этиохоланолон (*Э* – рис. 5.13). Также на схеме представлены стероиды, не вовлечённые в метаболизм андрогенов (или так называемые «эндогенные маркеры» - *ЭМ*), такие как прегнандиол (*ПД* – рис. 5.2) и андростенон (*1бен* – рис. 5.3). Поскольку их изотопный состав определяется только регионом проживания и особенностями диеты человека, при интерпретации результатов анализа сравнивают значения $\delta^{13}\text{C}$ тестостерона или его метаболитов (целевых соединений – *ЦС*) с аналогичными значениями *ЭМ*, и если различие по абсолютной величине не превышает 3‰, результат анализа признаётся отрицательным, то есть считается, что андрогены в данном образце имеют эндогенное происхождение. Эту разницу принято обозначать как «дельта-дельта», $\Delta\delta$. Однако существенное влияние на результаты анализа систематической погрешности, вызванной изотопным фракционированием при пробоподготовке и анализе, может привести к ложноположительным результатам из-за смещения значений $\delta^{13}\text{C}$ для отдельных стероидов. По этой причине в последнее время антидопинговые лаборатории чаще используют внутрилабораторные критерии оценки результатов анализа, индивидуальные для каждой пары «*ЦС–ЭМ*». Последний способ оценки результатов получил название метода «референтных интервалов».

В соответствии с этим методом проба признаётся положительной в случае превышения значений $\Delta\delta$ «*ЦС–ЭМ*» относительно установленных в лаборатории референтных интервалов, поэтому перед тем как сформулировать частные критерии оценки (по данным исследований метаболизма прогормонов) в рамках данной работы было необходимо определить общие критерии. Проведена статистическая обработка результатов анализа более 900 проб мочи спортсменов и добровольцев, не употреблявших стероидные препараты. Соответствующие значения $\delta^{13}\text{C}$ приведены в

табл. 5. Выполнение нормального закона распределения проверяли визуально построением графиков «квантиль – квантиль» с использованием ПО для статистической обработки данных STATISTICA версии 10.

Таблица 5. Значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов, установленные в работе

Соединение	Среднее, ‰	Интервал, ‰	СКО, ‰
тестостерон	-22.6	-(19.6 – 25.4)	0.99
5 α -андростандиол	-22.9	-(18.7 – 26.1)	1.35
5 β -андростандиол	-21.6	-(19.0 – 24.5)	0.91
андростерон	-22.1	-(19.3 – 24.7)	0.92
этиохоланолон	-22.6	-(19.6 – 24.9)	0.80
прегнандиол	-21.4	-(18.6 – 24.0)	0.84
андростенон	-22.0	-(19.1 – 24.3)	0.83

При аттестации разработанной методики в соответствии со стандартом ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025 нами определены статистически обоснованные референтные интервалы, представляющие собой усредненную по всем проанализированным пробам разницу «ЦС–ЭМ» ($\Delta\delta$). Путем прибавления утроенного стандартного отклонения к этому значению, что соответствует доверительной вероятности 99.7%, мы получили критическое значение для каждой пары стероидов. В табл. 6 и 7 приведены референтные интервалы, рассчитанные для двух эндогенных маркеров (прегнандиол, андростенон) и пяти целевых стероидов (тестостерон, 5 α -андростандиол, 5 β -андростандиол, андростерон, этиохоланолон). Аналогично построением графиков «квантиль – квантиль» нами показано, что значения $\Delta\delta$ распределены в соответствии с нормальным законом.

Таким образом, наши результаты подтверждают, что при интерпретации получаемых результатов целесообразно руководствоваться не единым порогом в 3‰, установленным ВАДА, а внутрилабораторными критериями, поскольку, например, для тестостерона и 5 α -андростандиола это значение составляет 4.0 и 4.8‰, соответственно (относительно прегнандиола). Если же установленное в лаборатории значение оказывается менее 3‰, то следует использовать порог в 3‰, чтобы не входить в противоречие с техническим документом ВАДА.

Таблица 6. Референтные интервалы, рассчитанные относительно ПД

	$\Delta\delta(\text{ПД}-T)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-5\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-5\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-A)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-Э)$
<i>среднее</i>	1.02	1.31	0.09	0.73	1.24
<i>СКО</i>	1.00	1.15	0.67	0.66	0.60
<i>3×СКО</i>	3.00	3.44	2.01	1.99	1.80
<i>реф. интервал</i>	4.01	4.75	2.10	2.72	3.04

Таблица 7. Референтные интервалы, рассчитанные относительно 16-ен

	$\Delta\delta(16-ен-T)$	$\Delta\delta(16-ен-5\alpha)$	$\Delta\delta(16-ен-5\beta)$	$\Delta\delta(16-ен-A)$	$\Delta\delta(16-ен-Э)$
<i>среднее</i>	0.51	0.75	-0.51	0.15	0.65
<i>СКО</i>	0.92	1.03	0.89	0.67	0.80
<i>3×СКО</i>	2.76	3.10	2.66	2.02	2.39
<i>реф. интервал</i>	3.26	3.85	2.15	2.17	3.04

Выявление факта употребления прогормональных препаратов

В экспериментах по метаболизму синтетических аналогов эндогенных стероидов участвовали 3 добровольца мужского пола (возраст – 23, 33, 31 год), предварительно проинформированных о возможном риске приёма исследуемых препаратов и согласных предоставить пробы мочи в соответствии с графиком отбора образцов. Непосредственно перед началом каждого исследования добровольцы предоставляли по 3 образца мочи, содержащие стероиды с естественным изотопным составом. Перерыв между различными экспериментами составлял не менее 2 недель, что было необходимо для нормализации изотопного соотношения исследуемых стероидов. Три добровольца принимали препараты в рекомендуемой производителем дозировке однократно, после чего собирали мочу в течение недели по схеме: первый день – 4 пробы, второй день – 3 пробы, третий день – 2 пробы, четвертый день – 1 проба, шестой день – 1 проба, восьмой день – 1 проба. Таким образом, в каждом эксперименте серия состояла из 15 образцов. Выбранный способ сбора образцов мочи обусловлен особенностями фармакокинетического выведения препаратов из человеческого организма. Для получения корректных результатов заранее оценивали концентрации целевых стероидов в исследуемом образце мочи, чтобы аналитический сигнал на изотопном масс-спектрометре находился в пределах его линейного диапазона. Концентрации стероидов определяли предварительным анализом пробы по существующей методике допинг-контроля, после чего рассчитывали, в каком объеме нужно перерастворить ту или иную фракцию до содержания 50 – 100 нг/мкл стероида в конечном экстракте. Далее, каждый

из образцов подвергали пробоподготовке и анализу методом изотопной хромато–масс–спектрометрии и определяли изотопный состав тестостерона, его метаболитов, прегнандиола и 16–андростенола.

Данные по изотопному составу исследованных стероидов как в свободном виде, так в пересчёте из ацетатов, приведены в табл. 8. При сопоставлении значений $\delta^{13}\text{C}$ для каждого соединения можно обнаружить, что за исключением тестостерона («Andriol ТК») изотопный состав препаратов в свободном виде и в пересчитанном из ацетата различаются в среднем на промилле. Вероятнее всего, это связано с эффектом изотопного фракционирования, сопровождающим процесс испарения пробы в инжекторе газового хроматографа. Поскольку хроматографические свойства стероидов в свободном виде и в форме производных существенно различаются, данный эффект в различной степени влияет на результаты анализа.

Таблица 8. Изотопный состав прогормональных препаратов, исследованных в работе.

№	Название соединения	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	
		в нативном виде	пересчитанный из ацетата
1	тестостерон	– (28.2±0.2)	– (28.3±0.5)
2	дегидроэпиандростерон	– (31.2±0.2)	– (30.2±0.4)
3	прегненолон	– (30.8±0.9)	– (29.9±0.3)
4	болдион	– (27.8±1.7)	–
5	5 α –андростан–3 β ,17 β –диол	– (29.7±0.3)	– (30.5±0.8)
6	1–андростен–3 β ,17 β –диол	– (19.9±0.5)	– (18.4±0.5)

На рис. 6 представлены зависимости изотопного состава 5 целевых соединений и 2 эндогенных маркеров от времени, прошедшего с момента приёма каждого из прогормональных препаратов. Поскольку от добровольца к добровольцу общий вид полученных данных принципиально не менялся, представлено 6 диаграмм, а не 18.

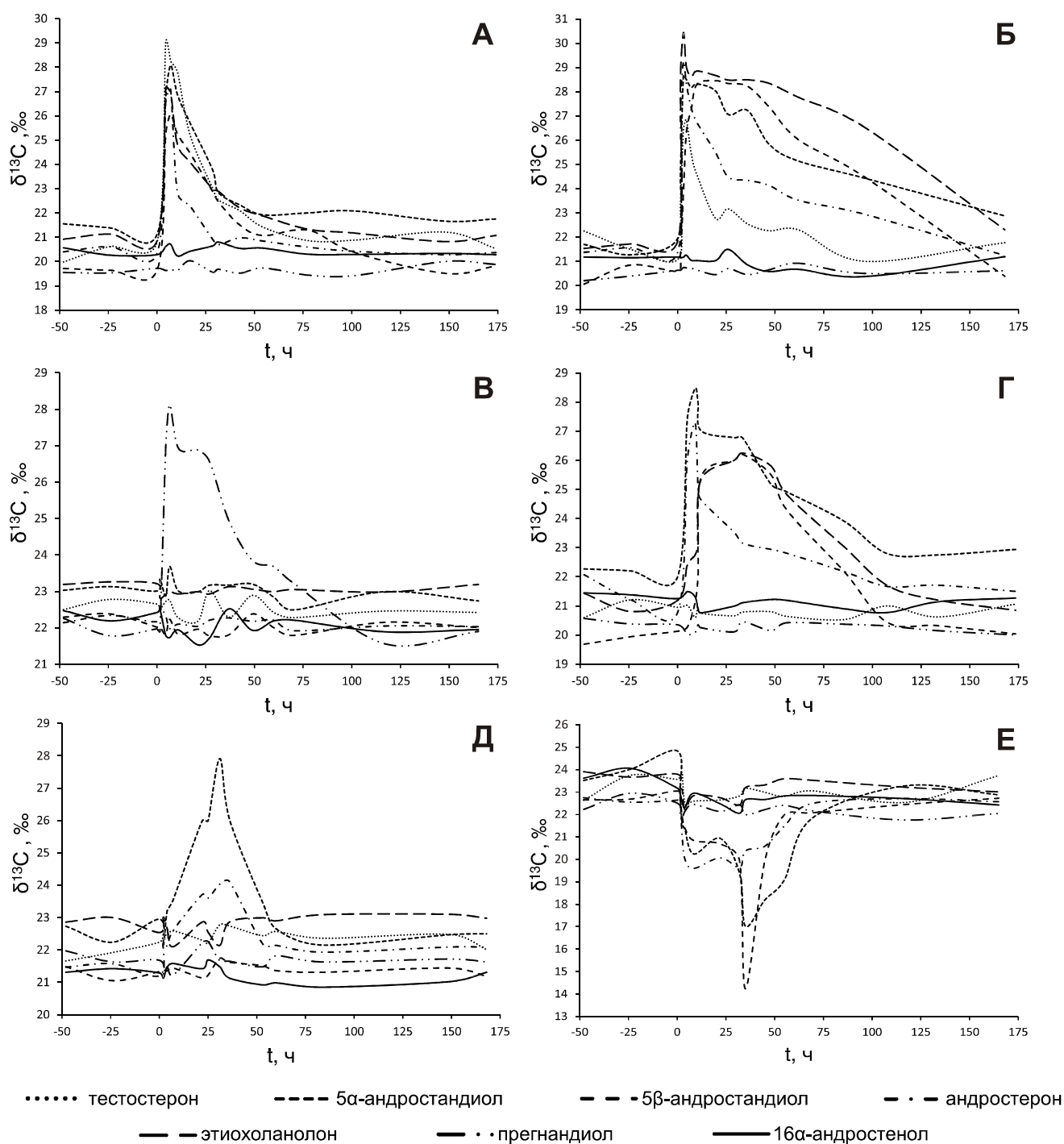


Рис. 6. Графики зависимости изотопного состава 5 целевых соединений и 2 эндогенных маркеров от времени, прошедшего с момента приёма прогормона. Диаграммы А–Е соответствуют препаратам №1–6 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю).

Диаграмма А. Употребление синтетического тестостерона (рис. 5.6) вызывает резкое изменение изотопного состава всех целевых соединений. Однако уже после 11 часов (первые три точки) с момента приёма соотношение T/E падает ниже 4. Установить факт употребления тестостерона методом $ГХ-С-ИМС$ возможно вплоть до 30 часов, что говорит о довольно коротком периоде выведения этого препарата. Наиболее

информативными являются пары 5β -стероидов – 5β -андростандиола и этиохоланолона, что объясняется превалирующей активностью 5β -редуктазы в метаболических процессах, протекающих в тканях печени. Если учесть, что применение спортсменами допинговых препаратов редко ограничивается однократным приёмом и терапевтической дозировкой, временной интервал детектирования может заметно увеличиться.

Диаграмма Б. В силу особенностей метаболизма, приём *ДГЭА* (рис. 5.4) также влияет на изотопное соотношение всех целевых соединений, однако, в отличие от синтетического тестостерона, при сопоставимых дозировках имеет более широкий интервал времени, в течение которого достоверно детектируются изменения изотопного состава. В течение 4 суток с момента приёма *ДГЭА* пробы мочи дают положительный результат методом изотопной хромато-масс-спектрометрии, несмотря на то, что соотношение T/E в случае добровольца №3 меняется незначительно и превышает 4 только в течение первых 10 часов. Длительное изменение изотопного соотношения отмечено у $5\alpha/\beta$ -андростандиолов и этиохоланолона, что делает пары этих соединений с эндогенными маркерами наиболее характеристичными в случае анализа для подтверждения употребления *ДГЭА*.

Диаграмма В. Приём прегненолона (рис. 5.1) не оказывает выраженного анаболического эффекта, и сам прегненолон не входит в список веществ, запрещённых к применению в спорте. Однако, как видно из графической зависимости, после его приёма селективно изменяется изотопное соотношение эндогенного маркера прегнандиола. В случае совместного употребления прегненолона и других аналогов эндогенных стероидов (к примеру, *ДГЭА*) изотопный состав целевых соединений и прегнандиола будет изменяться симбатно, что может использоваться спортсменом для маскирования факта применения допинговых препаратов и приводить к неверной оценке результатов анализа. Это подтверждает необходимость использования нескольких эндогенных маркеров в процессе анализа методом изотопной хромато-масс-спектрометрии. Изменений концентрационного соотношения T/E употребление прегненолона не вызывает. Методом *ГХ-С-ИМС* нетипичный изотопный состав эндогенного маркера прегнандиола (основного метаболита прегненолона) детектируется в течение 2 суток.

Диаграмма Г. Употребление болдиона (рис. 5.8) не влияет на соотношение T/E , однако изменяет изотопный состав всех целевых соединений, кроме тестостерона. Наибольшему влиянию подвержен 5α -андростан- $3\alpha,17\beta$ -диол и андростерон, в меньшей

степени – 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол и этиохоланолон. Значения $\delta^{13}\text{C}$ для этих соединений превышают установленные референтные интервалы в течение 60 часов с момента приёма болдиона. Поскольку основной метаболит болдиона имеет схожую с этиохоланолоном химическую структуру и, как следствие, хроматографические свойства, фракцию III после стадии дериватизации подвергали вторичному ВЭЖХ-фракционированию, так как в противном случае наблюдали заметное искажение изотопного состава андростерона и этиохоланона. Один из метаболитов болдиона детектируется в моче посредством ГХ-МС в течение 90 часов, что делает классическое хромато-масс-спектрометрическое определение болдиона в моче более предпочтительным, либо органично дополняющим ГХ-С-ИМС анализ. В случае с приёмом болдиона практический интерес представляет нетривиальное использование метода изотопной хромато-масс-спектрометрии для изучения метаболических процессов, поскольку биотрансформация данного препарата и её связь с метаболизмом эндогенных анаболических стероидов изучена недостаточно.

Диаграмма Д. Действующим веществом препарата №5 является 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол (рис. 5.9). Его влияние на изотопный состав целевых соединений носит селективный характер, несмотря на то, что концентрационные соотношения гормонального профиля меняются незначительно. Наиболее существенные изменения претерпевает 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол, и, как следствие, его метаболит андростерон. Значения $\delta^{13}\text{C}$ этих целевых соединений выходят за рамки внутрилабораторных критериев вплоть до 36 часов.

Диаграмма Е. При попадании в организм 1-андростен-3 β ,17 β -диол (рис. 5.7), как и болдион, не вызывает ни изменения концентрации, ни изотопного состава тестостерона. От остальных препаратов, исследованных в настоящей работе, это вещество отличается способом производства – сырьем для синтеза послужили растения с C4-механизмом фотосинтетического потребления CO₂, обогащённые изотопом ¹³C. Согласно данным табл. 5, изотопное соотношение для данного препарата составляет –19.9‰ и сильно отличается от значений $\delta^{13}\text{C}$ других прогормонов. Как видно из графической зависимости, изменение изотопного состава целевых соединений сдвинуто в противоположную сторону. Влиянию 1-андростен-3 β ,17 β -диола в первую очередь подвержен 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол, а также 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол и андростерон, что проясняет путь биотрансформации этого препарата в человеческом организме. В

связи с тем, что III фракция после приёма андростендиола содержала стероиды, интерферирующие с андростероном и этиохоланолоном, её также подвергали дополнительной очистке ВЭЖХ-фракционированием. Мешающие компоненты (метаболиты 1-андростен-3 β ,17 β -диола), имеющие близкие с андростероном и этиохоланолоном времена удерживания, детектируются посредством ГХ-МС в течение 48 часов. После однократного приёма препарата пробы мочи дают положительный результат методом ГХ-С-ИМС также в течение 2 суток с момента приёма 1-андростен-3 β ,17 β -диола.

На основании результатов эксперимента по *in vivo* биотрансформации 6 синтетических аналогов эндогенных стероидов выявлены закономерности в изменении изотопного состава эндогенных стероидов и определены пары «эндогенный маркер–целевое соединение», наиболее информативные в случае установления факта употребления каждого из препаратов (табл. 9).

Таблица 9. Пары «ЭМ–ЦС» $\Delta\delta$, которых наиболее информативны в случае установления факта употребления каждого из изученных прогормональных препаратов (ЭМ являются 16-ен и ПД)

Прогормональный препарат	Пары «ЭМ–ЦС»	Среднее время детектирования, ч
№1 (тестостерона ундеканат)	«ЭМ–5 β », «ЭМ–Э»	30
№2 (дегидроэпиандростерон)	«ЭМ–5 α », «ЭМ–5 β », «ЭМ–Э»	77
№3 (прегненолон)	«ПД–Т», «ПД–5 α », «ПД–5 β », «ПД–А», «ПД–Э»	90
№4 (болдион)	«ЭМ–5 α », «ЭМ–5 β », «ЭМ–Э»	62
№5 (5 α -андростан-3 β ,17 β -диол)	«ЭМ–5 α »	69
№6 (1-андростен-3 β ,17 β -диол)	«ЭМ–5 α », «ЭМ–5 β »	46

Выводы

1. Выбраны условия селективного выделения целевых соединений из мочи посредством твердофазной и жидкостно–жидкостной экстракции, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии, с учётом минимизации эффекта изотопного фракционирования в процессе пробоподготовки.
2. Выбраны условия ацелирования исследуемых соединений, обеспечивающие полную степень конверсии эндогенного маркера 16 андростенола в ацетильную форму и корректное измерение его изотопного соотношения.
3. Проведены модификации системы для ГХ–С–ИМС анализа, позволившие существенно повысить эффективность газохроматографического разделения близких по химической структуре целевых соединений ($5\alpha/\beta$ -андростандиолы, андростерон/этиохоланолон), и, как следствие, повысить правильность процесса измерения их изотопного состава.
4. В экспериментально выбранных условиях методом ГХ–С–ИМС проанализировано более 900 отрицательных и 220 положительных образцов мочи.
5. В результате статистической обработки полученных данных для российской популяции впервые установлены референтные интервалы в парах «эндогенный маркер – целевое соединение», необходимые для однозначной интерпретации аналитических данных.
6. Найдены потенциальные маркеры употребления 6 прогормональных препаратов экзогенного происхождения, наиболее информативные при выявлении случаев их использования в спорте (для 3 из 6 - впервые).
7. Предложенный способ обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, валидирован и аттестован в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и внесен в область аккредитации ФГУП АДЦ. Процедура анализа стероидов методом ГХ–С–ИМС в течение нескольких лет активно применяется в повседневной работе ФГУП АДЦ, а также была использована в рамках допинг–контроля спортсменов на зимних Олимпийских и Паралимпийских играх в Сочи 2014 года.

Список публикаций по теме диссертации

1. *И.С. Прасолов, Т.Г. Соболевский, Г.М. Родченков.* Определение синтетических аналогов эндогенных стероидов в моче методом изотопной хромато-масс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. 2012. Т. 9, № 2. Стр. 83-92.
2. *Т.Г. Соболевский, И.С. Прасолов, Г.М. Родченков.* Проблемы аналитической химии [Текст].-Москва:Физматлит. Т.15 : Изотопная масс-спектрометрия легких газообразующих элементов / ред. В. С. Севастьянов. - [Б. м.], 2011. - 236 с. - ISBN 978-5-9221-1344-1. // Стр. 193-209.
3. *Т.Г. Соболевский, И.С. Прасолов, Г.М. Родченков.* Изотопная масс-спектрометрия углерода в допинговом контроле // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65, № 8. Стр.843–850.
4. *И.С. Прасолов, Т.Г. Соболевский, Г.М. Родченков.* Применение изотопной хромато-масс-спектрометрии в допинг-контроле // Московский семинар «Практические аспекты применения изотопного и элементного анализа методом масс-спектрометрии», пос. Московский, Россия. 12 апреля 2012 г.
5. *I.S. Prasolov, T.G. Sobolevsky, G.M. Rodchenkov.* Carbon isotope ratio mass spectrometry in doping control // 16th European Conference on Analytical Chemistry «Challenges in Modern Analytical Chemistry», Belgrad, Serbia. 2011. P.618.
6. *И.С. Прасолов, Т.Г. Соболевский, Г.М. Родченков.* Подготовка пробы к анализу методом изотопной масс-спектрометрии в допинг-контроле // III Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, 2011. Стр. 103.
7. *И.С. Прасолов, Т.Г. Соболевский, Г.М. Родченков.* Изотопная масс-спектрометрия в антидопинговом контроле // Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез», Краснодар, 2010. Стр. 39.