

МИНИСТЕРСТВО СПОРТА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное унитарное предприятие

«Антидопинговый центр»

(ФГУП АДЦ)

На правах рукописи

Прасолов Илья Сергеевич

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

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

*нач.отд., к.х.н. Т.Г. Соболевский
(ФГУП “Антидопинговый Центр”)*

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор	8
1.1. Теоретические основы метода изотопной хромато–масс–спектрометрии	8
1.2. Основные функциональные узлы изотопного хромато–масс–спектрометра	10
1.3. Метаболизм стероидных гормонов	15
1.3.1. Особенности биосинтеза стероидов в организме человека	18
1.3.2. Способы интерпретации результатов анализа	22
1.3.3. Синтетические аналоги эндогенных стероидов	26
1.3.3.1. Тестостерон	26
1.3.3.2. Эпитестостерон	29
1.3.3.3. Дигидротестостерон	30
1.3.3.4. Андростендион	32
1.3.3.5. Дегидроэпиандростерон	33
1.3.3.6. Прегненолон	35
1.3.3.7. Форместан	36
1.3.3.8. Болдион и болденон	39
1.4. Подготовка образцов к анализу	42
1.4.1. Использование реактива Жирара	44
1.4.2. Иммуноаффинная хроматография	44
1.4.3. Фракционирование с помощью тонкослойной хроматографии	45
1.4.4. Твердофазная экстракция	45
1.4.5. Фракционирование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	46
Глава 2. Экспериментальная часть	49
2.1. Исходные вещества и материалы	49
2.2. Основное оборудование	53
2.3. Вспомогательное оборудование	53
2.4. Методика эксперимента	54
2.4.1. Приготовление растворов определяемых соединений и буферов	54
2.4.2. Твердофазная и жидкостно–жидкостная экстракция	56
2.4.3. Фракционирование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	57
2.4.4. Дериватизация	57
2.4.5. Взаимодействие с реактивом Жирара	58
2.4.6. Газохроматографическое определение стероидов	58
2.4.7. Масс–спектрометрическая идентификация стероидов	59
2.4.8. Условия окислительной конверсии стероидов	60

2.4.9. Масс–спектрометрическое определение продукта конверсии	60
2.9.10. Пробоподготовка прогормональных препаратов	61
2.4.11. Подготовка образцов мочи к анализу	62
Глава 3. Пробоподготовка образцов мочи	65
3.1. Подбор условий жидкостно–жидкостной и твердофазной экстракции	65
3.2. Выбор условий разделения методом жидкостной хроматографии	68
3.3. Использование реактива Жирара	71
3.4. Дериватизация	73
Глава 4. Инструментальный анализ экстрактов	75
4.1. Выбор условий газохроматографического разделения	75
4.2. Масс–спектрометрическая идентификация целевых соединений	81
4.3. Подбор условий окислительной конверсии стероидов и масс–спектрометрической идентификации продукта конверсии	85
Глава 5. Валидация и аттестация разработанной методики	90
5.1. Метрологические характеристики разработанной методики	90
5.2. Внутрилабораторные критерии экзогенной природы стероидов	94
5.3. Межлабораторное сравнение результатов анализа	96
Глава 6. Изменение изотопного состава эндогенных стероидов после употребления их синтетических аналогов	98
6.1. Выделение и анализ активных компонентов прогормональных препаратов	98
6.2. Препарат №1 – тестостерон	103
6.3. Препарат №2 – дегидроэпиандростерон	111
6.4. Препарат №3 – прегненолон	119
6.5. Препарат №4 – болдион	126
6.6. Препарат №5 – 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол	134
6.7. Препарат №6 – 1-андростен-3 β ,17 β -диол	141
Заключение	150
Выводы	153
Список сокращений	154
Список литературы	155

Введение

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 метаболитами предшественниками: тестостерона, дегидроэпиандростерона, андростендиона, андростендиолов. По результатам анализа методом газовой хроматографии в сочетании с масс–спектрометрией это сделать не удастся, 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 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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 6 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 ацетилирования 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.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Теоретические основы метода изотопной хромато–масс–спектрометрии

Идея объединения газовой хроматографии с изотопной масс–спектрометрией впервые описана в 1978 году в работах таких ученых, как Мэттью и Хэйс [1]. Однако, активное изучение и применение данного метода началось только в 90–х годах, когда оборудование для *ГХ–С–ИМС* стало коммерчески доступным. Анализ данным методом состоит из трёх стадий:

- газохроматографическое разделение исследуемого образца на индивидуальные соединения;
- конверсия анализируемых веществ до CO_2 в окислительном реакторе;
- определение соотношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в углекислом газе методом изотопной масс–спектрометрии.

Поскольку напрямую соединить газовый хроматограф с изотопным масс–спектрометром невозможно, решением данной проблемы является использование в качестве связующего звена так называемого интерфейса сжигания, основную функцию в котором выполняет окислительный реактор. Именно в нем происходит конверсия исследуемых соединений в простую молекулярную форму, обладающую малым количеством изотопмеров, что сильно облегчает анализ.

Изотопная масс–спектрометрия обладает рядом отличий от классической масс–спектрометрии органических соединений, в частности:

- не несет никакой структурной информации (изотопный состав соединений исследуется в простой молекулярной форме), но обеспечивает чрезвычайно точное определение соотношения изотопов;
- классический масс–спектрометр оснащен одним детектором, функционирующим в режиме сканирования, в изотопном же масс–спектрометре имеется как минимум три детектора, работающих непрерывно.

В связи с тем, что изотоп ^{13}C мало распространен в природе и его количество составляет всего 1.07% от общего содержания углерода, изменения отношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ от объекта к объекту столь незначительны, что измерения изотопного состава обычно проводят в единицах так называемой δ -шкалы – тысячных долей (промилле). Ниже приведено уравнение (1), используемое для расчетов в изотопной масс-спектрометрии углерода [2]:

$$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}] = \frac{R_{\text{обр}} - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} * 1000 \quad (1),$$

где $R_{\text{обр}} = \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{обр}}$ и $R_{\text{std}} = \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{std}} = 0.0112372$ – отношения изотопов в образце и стандарте, соответственно. Стандартом является CO_2 , полученный при разложении CaCO_3 из кальцита окаменелости *Belemnitella americana* мелового периода (белемнит). Указанный минерал выбран в качестве стандарта по причине однородного изотопного состава.

δ -шкала выполняет три важных функции [3]:

- акцентирует внимание на том факте, что измерение соотношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ носит относительный, а не абсолютный характер;
- позволяет описывать крайне малые изменения изотопного соотношения;
- упрощает различные вычисления, являясь аддитивной величиной.

Данный метод отличается исключительной точностью измерений ($\text{СКО} \leq 0.2\text{‰}$), что позволяет получить характеристический изотопный “отпечаток” исследуемого соединения [4]. По этой причине *ГХ-С-ИМС* широко используется для решения многих аналитических задач в парфюмерной, нефтяной промышленности, с целью контроля качества эфирных масел [5], пищевых продуктов [6] и топливных ресурсов [7]; в различных биологических и экологических исследованиях (изучение наземных и океанических экосистем и их пищевых цепей [8]), а также для определения происхождения наркотических средств [9] и в допинг-контроле. При этом чувствительность метода *ГХ-С-ИМС* сравнительно невысока, и для получения корректных результатов требуется не менее 10 нг на колонку (в расчете на углерод).

1.2. Основные функциональные узлы изотопного хромато–масс–спектрометра

Газовый хроматограф

Поскольку при прохождении через интерфейс сжигания (рисунок 1) происходит значительное уширение хроматографических зон, на стадии газовой хроматографии важно обеспечить разделение пиков до базовой линии. В частности, это может быть достигнуто подбором соответствующей температурной программы и введением анализируемых веществ в ГХ в виде производных (если необходимо), имеющих хорошие хроматографические свойства.

Узел ввода пробы

В ГХ–С–ИМС ввод пробы в испаритель (инжектор) газового хроматографа осуществляется в режиме без деления потока с целью подавления эффекта изотопного фракционирования, а также для повышения чувствительности определения [10]. Однако, так как любой фазовый переход ведет к изотопному фракционированию анализируемых соединений, инжектор, в котором происходит испарение пробы, является не лучшим вариантом для изотопной масс–спектрометрии [11]. Этой проблемы можно избежать при использовании инжектора с непосредственным вводом пробы в колонку (так называемый “on–column” инжектор), но, несмотря на улучшение правильности и воспроизводимости результатов анализа, применение данного типа инжектора сопряжено с некоторыми техническими сложностями – в частности, необходимостью использования предколонки и жесткими требованиями к чистоте образцов, поскольку жидкая проба попадает в колонку, минуя стадию испарения [12].

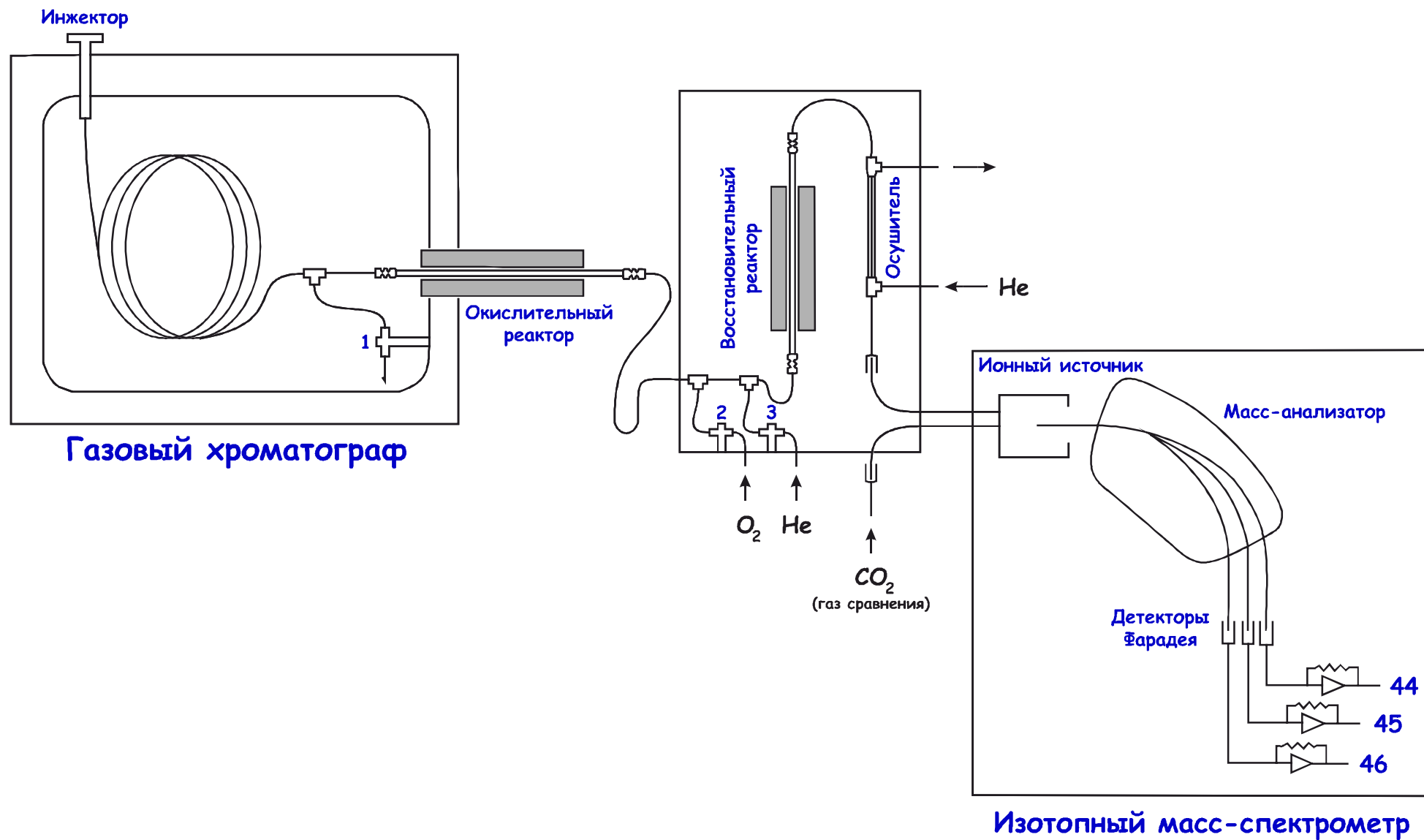


Рисунок 1 — Схема прибора для ГХ-С-ИМС анализа

Интерфейс для сопряжения ГХ и масс–спектрометра

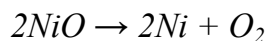
Используемая конструкция интерфейса (рисунок 1) обеспечивает:

- количественную конверсию целевых соединений в аналитическую форму (CO₂);
- удаление побочных продуктов конверсии (H₂O, NO_x) из потока газа–носителя;
- предотвращение попадания растворителя в окислительный реактор за счет режима обратной продувки;
- регенерацию окислительного реактора;
- ввод в масс–спектрометр калибровочного газа в заданные промежутки времени.

Активация *режима обратной продувки* осуществляется открытием вентилей 1 и 3 (рисунок 1). Использование данного режима особенно важно для удаления растворителя из пробы (истощает окислительную способность реактора), а также препятствует попаданию O₂ в хроматограф и масс–спектрометр при окислении реактора [10].

В *окислительном реакторе* происходит конверсия целевых соединений до CO₂ и H₂O (и NO_x, если исследуемые соединения содержат атомы азота). Он представляет собой полую трубку из Al₂O₃ с внутренним диаметром 0.5 мм, в которую помещены три проволоки – медная, никелевая, и платиновая (240 мм длиной, 0.125 мм в диаметре). Реактор помещен в трубчатую печь с рабочей температурой 940°C.

Образование NiO при рабочей температуре реактора идет затруднительно, поэтому процесс нуждается в катализаторе, в качестве которого выступает платина. Кислород в реакторе генерируется в результате двух химических реакций:



Равновесие этих процессов сильно сдвигается вправо при повышении температуры.

Для получения правильных результатов измерений изотопного состава ¹³C/¹²C окислительный реактор должен обеспечивать 100% конверсию анализируемых веществ, так как в случае, когда окисляющая способность реактора

истощена, наряду с образованием CO_2 происходит неполное сгорание до CO . Этот процесс приводит к изотопному фракционированию продуктов конверсии анализируемых соединений, поскольку CO обогащается изотопом ^{13}C вследствие кинетических изотопных эффектов [13].

С учетом вышесказанного, реактор нуждается в периодическом окислении с целью поддержания высокой окисляющей способности. Окисление проводят в режиме обратной продувки (вентили 1, 2, 3 – открыты) для предотвращения попадания кислорода в восстановительный реактор и масс-спектрометр.

Восстановительный реактор по конструкции и используемым материалам близок к окислительному реактору. Отличие заключается в том, что внутри реактора находятся три медные проволоки (диаметр 0.125 мм). Реактор помещен в трубчатую печь с рабочей температурой 600–650°C. Целесообразность наличия восстановительного реактора в системе для изотопной масс-спектрометрии углерода – спорный вопрос. В первую очередь он необходим в изотопной масс-спектрометрии азота, так как именно восстановительный реактор переводит азот из окисленной формы в аналитическую (N_2). С одной стороны, он является очередной зоной хроматографического размывания в аналитической системе, но с другой – выполняет одну важную функцию. В связи с тем, что окислительный реактор заметно обогащает поток газа-носителя кислородом из-за разложения CuO при рабочей температуре окислительного реактора, восстановительный реактор используют для поглощения избытка O_2 ($2\text{Cu} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{CuO}$), с целью исключения негативного влияния на катод ионного источника масс-спектрометра.

Важно отметить, что вода как один из продуктов конверсии способна протонировать $^{12}\text{CO}_2$ с образованием $\text{H}^{12}\text{CO}_2^+$, который имеет то же отношение массы к заряду (m/z), что и $^{13}\text{CO}_2$. Данный процесс приводит к регистрации искаженных результатов, поэтому необходимо тщательно удалить пары воды из потока газа-аналита. Эту задачу решают включением в аналитическую линию *осушителя*, в качестве которого могут использоваться:

- полупроницаемая нафтионовая трубка, обдуваемая снаружи потоком сухого гелия. Нафтион – синтетический полимер на основе тефлона с высокой

протонной проводимостью (рисунок 2). Благодаря его свойствам, он селективно удаляет пары воды из потока газа;

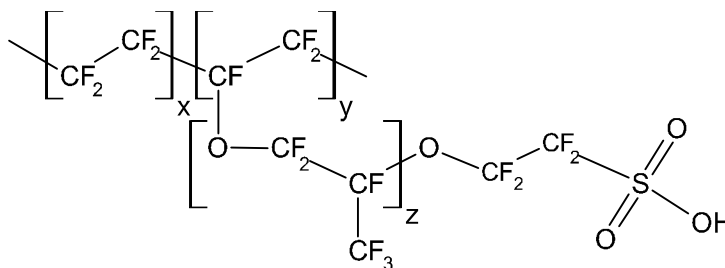


Рисунок 2 — Структурная формула нафiona

- криогенная ловушка – сосуд Дьюара, наполненный охлаждающей смесью. В качестве хладагента наиболее часто используется смесь ацетона с сухим льдом (-86°C).

Несмотря на более высокую эффективность криогенной ловушки по сравнению с полупроницаемой трубкой из нафiona, её использование сопряжено с рядом трудностей, поскольку существует необходимость в периодическом размораживании устройства и удалении воды из капилляра. По этой причине полупроницаемая мембрана на основе нафiona является предпочтительным вариантом в качестве осушителя.

Делитель потока (рисунок 3), который располагается непосредственно перед входом в масс-спектрометр, выполняет две важных функции в процессе анализа:

- поддерживает постоянным давление в ионизационной камере масс-спектрометра, что способствует сохранению высокой точности измерений изотопного соотношения, однако при этом только $\frac{1}{4}$ потока из хроматографа попадает в масс-спектрометр;
- обеспечивает вязкое натекание газа в масс-спектрометр с целью исключения эффекта изотопного фракционирования.

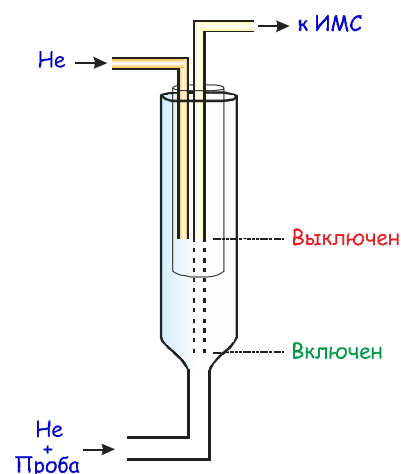


Рисунок 3 — Принцип работы делителя потока

Особенности конструкции масс–спектрометра

В ионный источник проба попадает в газообразной форме, где происходит ионизация электронным ударом. В отличие от классической электронной ионизации в органической масс–спектрометрии, ионизация электронным ударом в изотопной масс–спектрометрии имеет бóльшую эффективность, что достигается благодаря закрытой конструкции ионного источника [4].

Для разделения ионов в изотопном масс–спектрометре используется магнитный секторный анализатор. После ионизации и разделения следует стадия измерения изотопного соотношения при помощи *детекторов Фарадея*. В изотопной масс–спектрометрии углерода детектируется всего три иона, что соответствует:

- $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{+}$ (m/z 44);
- $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{+}$ и $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^{+}$ (m/z 45);
- $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^{+}$ (m/z 46).

Следует сказать, что в отличие от традиционной масс–спектрометрии органических соединений в изотопной масс–спектрометрии каждому иону соответствует свой коллектор (детектор), причем регистрация сигнала проводится в непрерывном режиме. Каждый из детекторов Фарадея соединен с отдельным каналом усиления и регистрации сигнала, что позволяет полностью исключить влияние на процесс измерения флуктуаций ионного тока, вызванных перепадами температуры и нестабильностью ионного пучка [14].

1.3. Метаболизм стероидных гормонов

Анаболические стероидные гормоны при попадании в человеческий организм заметно повышают работоспособность, увеличивают мышечную массу и влияют на спортивный результат, в связи с чем *ВАДА* относит эти соединения к группе запрещенных к применению в спорте препаратов [15]. Ниже приведен краткий перечень основных эффектов их употребления [16]:

- увеличение выработки белка в мышцах наряду с предотвращением его обратного распада;

- повышение синтеза мышечными клетками креатинфосфата, который играет решающую роль в процессе энергетического обмена в организме;
- накопление в тканях печени углеводов в форме гликогена, что ведет к повышению выносливости;
- стимуляция периферического кровообращения, и как следствие – улучшение процесса доставки питательных веществ и кислорода к мышечным клеткам.

Анаболические стероиды на протяжении десятилетий используются атлетами для улучшения спортивных показателей. Наиболее распространенным препаратом данного класса является синтетический тестостерон.

В случае использования инъекций тестостерона или при пероральном приеме спортсмен может быть обнаружен по атипичному значению соотношения концентраций тестостерона и его неактивного изомера – эпитестостерона – в пробе мочи. В организме человека, не принимающего гормональные препараты, это соотношение, как правило, не превышает 4:1. Любые положительные отклонения от данного значения согласно технической документации *ВАДА* требуют дальнейших исследований пробы [17].

Если же экзогенные стероидные гормоны попадают в организм постепенно, как при использовании так называемых “тестостероновых пластырей” или нанесения на кожу геля, содержащего тестостерон, соотношение *T/E* меняется незначительно (к примеру, до 3:1). Результаты анализа в данной ситуации можно трактовать двояко: либо атлет имеет генетическую предрасположенность к такого рода метаболизму андрогенов, либо он выдает экзогенный тестостерон за эндогенный. В настоящее время существует лишь один метод, способный внести определенность в данный вопрос: газовая хроматография в сочетании с изотопной масс-спектрометрией.

Если принять во внимание тот факт, что синтетический тестостерон, получаемый из растительного сырья (соя, рис, пшеница), по сравнению с тестостероном, вырабатываемым организмом человека, обеднен изотопом ^{13}C , отличить экзогенные стероиды от эндогенных можно путем измерения изотопного соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в тестостероне и/или его метаболитах в моче. Ниже на

рисунке 4 приведены структурные формулы ситостерола и стигмастерола – соединений растительного происхождения, наиболее часто использующихся для синтеза тестостерона.

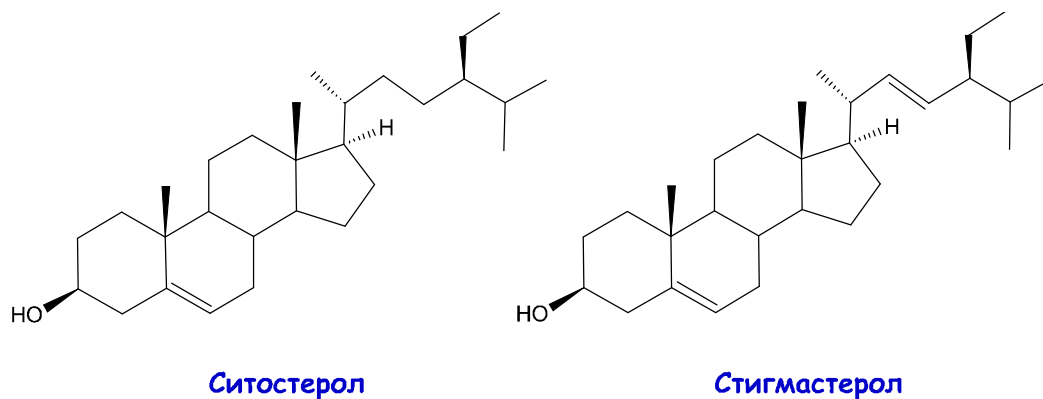


Рисунок 4 — Исходные соединения для синтеза тестостерона

Потребляемые человеком продукты питания не только являются источником жиров, белков и углеводов, а также коренным образом влияют на изотопный состав эндогенных стероидов [18]. Исследования показали [19,20], что изотопный состав стероидных гормонов для популяций, проживающих на разных континентах, существенно отличается: эндогенные стероиды у жителей Северной и Южной Америки обогащены изотопом ^{13}C в большей степени, чем у европейцев. Это обусловлено тем фактом, что в Америке преобладающее большинство сельскохозяйственных культур использует C4-механизм для фотосинтетического потребления CO_2 , в Европе же наблюдается обратная ситуация – там у растений в большей степени распространен механизм C3.

C3-механизм – ферментативная реакция с участием рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы, продуктом которой является 3-фосфоглицериновая кислота (соединение содержит 3 углеродных атома). Реакция носит обратимый характер и известна как цикл Кальвина–Бенсона. 90% всех растений используют данный механизм фотосинтетического потребления CO_2 (в том числе рис, соя, пшеница и сахарная свекла). Растения данного класса имеют обедненный изотопом ^{13}C состав, и $\delta^{13}\text{C}$ для них лежит в пределах от -24‰ до -34‰ [21];

C4-механизм – ферментативная реакция с участием фосфоенолпируват-карбоксилазы, продуктом которой является щавелевоуксусная кислота (соединение содержит 4 углеродных атома). Данный процесс необратим и известен как цикл

Хетча–Слэка. Растения данного класса имеют обогащенный изотопом ^{13}C состав и $\delta^{13}\text{C}$ для них лежит в пределах от минус 6‰ до минус 19‰ (кукуруза и сахарный тростник) [21].

На рисунке 5 приведена диаграмма, иллюстрирующая, каким образом изотопный состав рассмотренных выше сельскохозяйственных культур и других объектов соотносится с составом стандарта (белемнита).

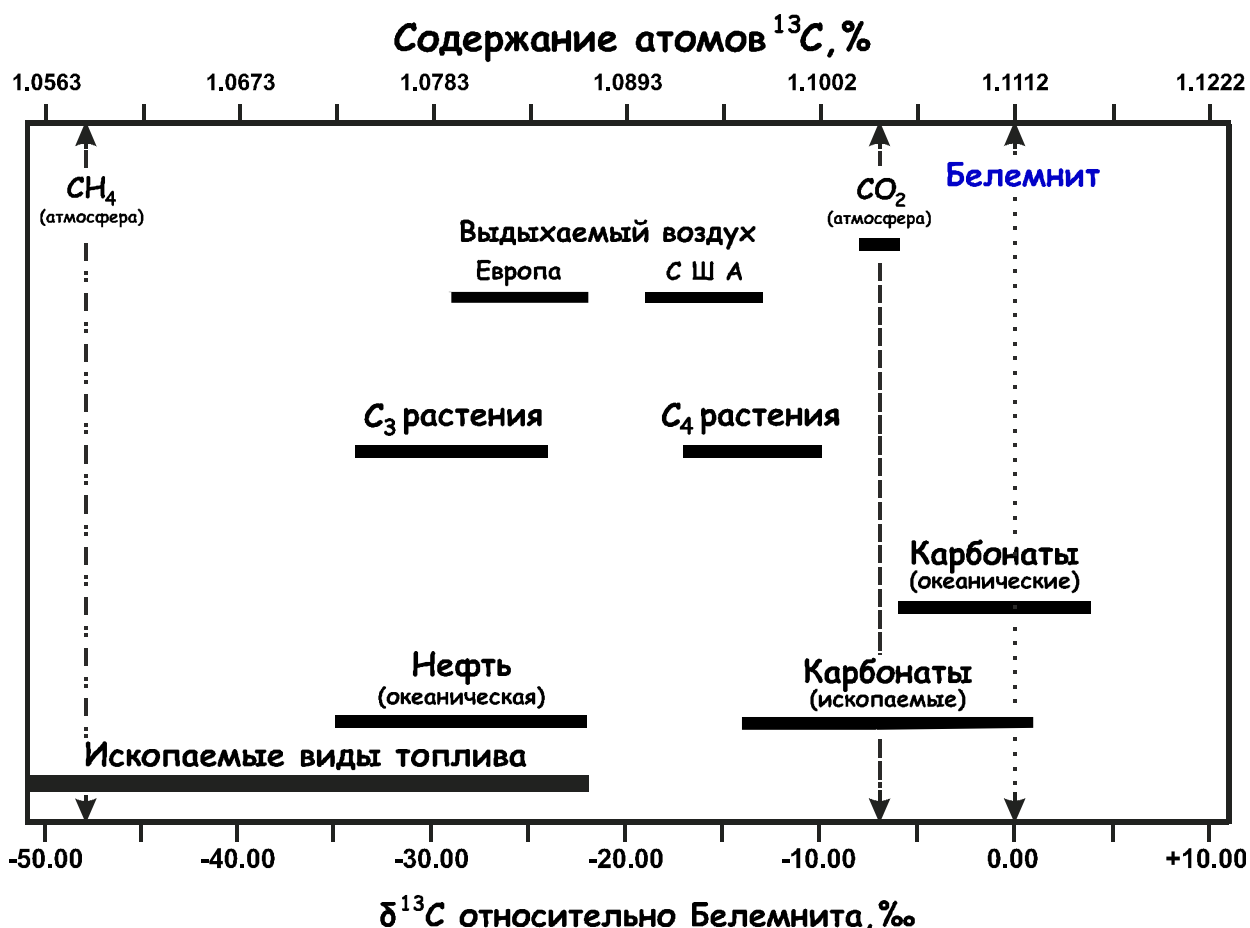


Рисунок 5 — Распространенность ^{13}C в природных объектах

1.3.1. Особенности биосинтеза стероидов в организме человека

Общим предшественником стероидных гормонов является холестерин. Углеродный скелет холестерина включает 27 атомов углерода и состоит из 4 конденсированных колец. Четвертое кольцо имеет длинную боковую цепь. Холестерин, необходимый для синтеза стероидных гормонов, поступает из разных источников в гормонсинтезирующие клетки желез в составе липопротеинов низкой плотности [22].

Тестостерон – наиболее важный представитель андрогенов. Он синтезируется клетками Лейдига и контролирует развитие и функцию половых желез. Этот гормон отвечает также за развитие вторичных мужских половых признаков: развитие мускулатуры, волосяной покров, низкий тембр голоса.

Отдельные стадии биосинтеза стероидных гормонов катализируются высокоспецифичными ферментами. Основные типы ферментативных превращений андрогенов включают в себя реакции гидроксилирования, гидрирования, дегидрирования, изомеризации, расщепления и ароматизации. Схема метаболизма приведена на рисунке 6 [23].

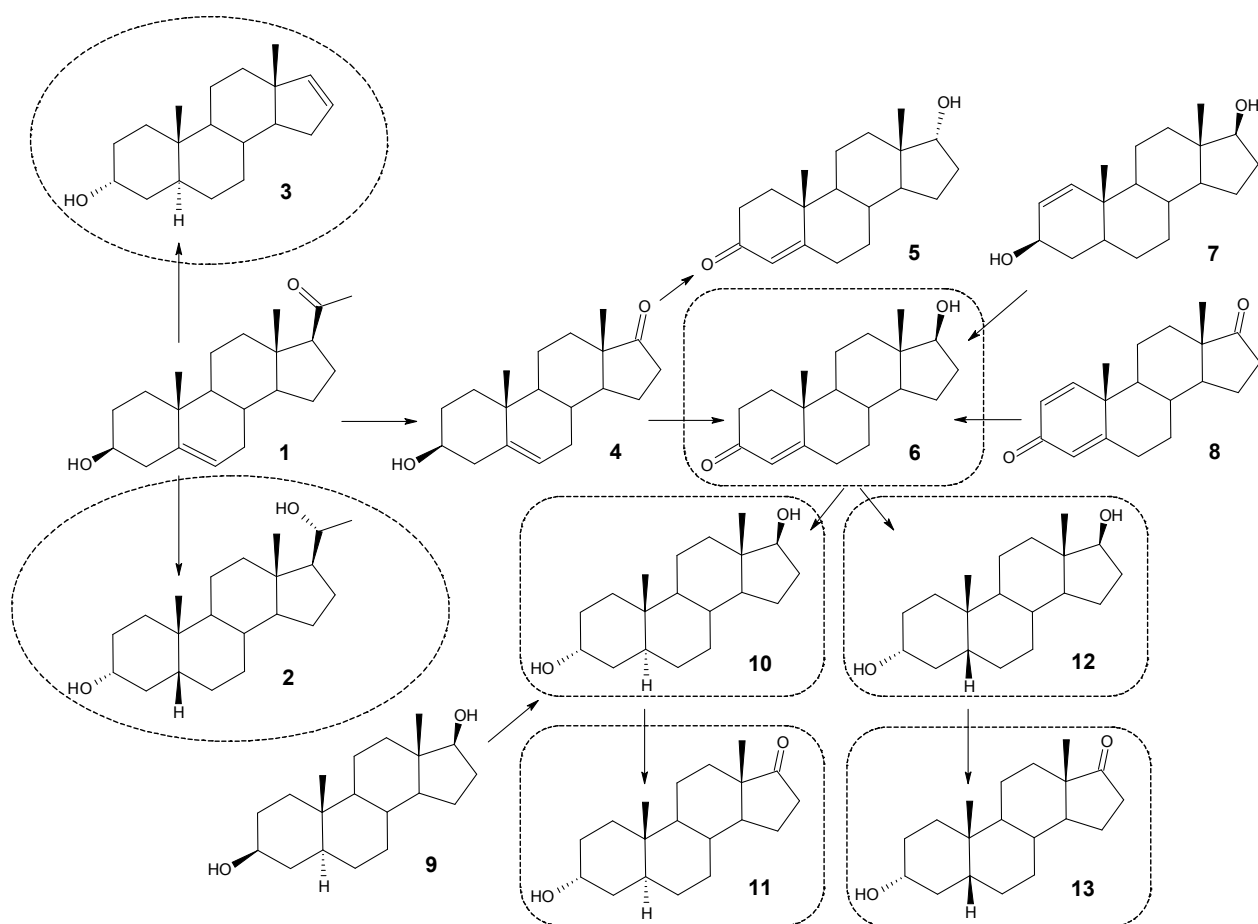


Рисунок 6 — Схема метаболизма стероидов [23]. Целевые соединения заключены в квадраты, эндогенные маркеры – в эллипсы (1 – прегненолон, 2 – 5β-прегнан-3α,20S-диол, 3 – 16(5α)-андростен-3α-ол, 4 – дегидроэпиандростерон, 5 – эпитестостерон, 6 – тестостерон, 7 – 1-андростен-3β,17β-диол, 8 – 1,4-андростадиен-3,17-дион, 9 – 5α-андростан-3β,17β-диол, 10 – 5α-андростан-3α,17β-диол, 11 – андростерон, 12 – 5β-андростан-3α,17β-диол, 13 – этиохоланолон)

Процесс ферментативной инактивации андрогенов происходит в печени. На первой фазе метаболизма молекулы стероидных гормонов подвергаются восстановлению или гидроксигированию, после чего на второй фазе метаболизма переводятся в соответствующие конъюгаты. Биосинтез конъюгатов заключается в гликозилировании глюкуроновой кислотой и приводит к образованию глюкуронидов. По сравнению с исходными соединениями конъюгаты гораздо лучше растворимы в воде и легко экскретируются. Из печени конъюгаты попадают в кровь, откуда выводятся почками за счет фильтрации. На рисунке 7, в качестве примера, приведена структурная формула 3 α -глюкуронида прегнандиола.

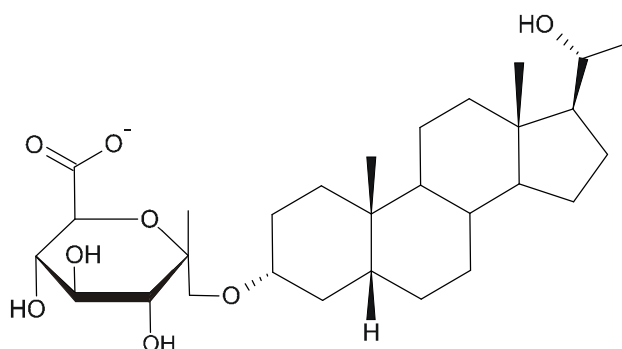


Рисунок 7 — 3 α -глюкуронид прегнандиола (в ионизированной форме)

С целью исключения влияния на результаты изотопных измерений различных факторов (к примеру, естественных изменений гормонального фона спортсмена либо флуктуаций внешних условий эксперимента) принято соотносить $\delta^{13}\text{C}$ целевых соединений с $\delta^{13}\text{C}$ так называемых эндогенных маркеров – соединений, имеющих природу стероидных гормонов, на чей изотопный состав не влияет употребление тестостерона, дегидроэпиандростерона, дигидротестостерона и остальных прогормонов. Нижеследующее уравнение (2) отражает суть данной процедуры:

$$\Delta\delta[\text{‰}] = \delta^{13}\text{C}_{\text{ЭМ}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ЦС}} \quad (2),$$

где $\delta^{13}\text{C}_{\text{ЭМ}}$ и $\delta^{13}\text{C}_{\text{ЦС}}$ выражают изотопные соотношения эндогенного маркера и целевого соединения, соответственно.

Антидопинговые лаборатории используют в качестве эндогенных маркеров различные соединения. Чаще всего за эндогенный маркер принимается прегнандиол (ПД) – основной продукт катаболизма прегненолона [24]. Использование прегнандиола для этих целей сопряжено с некоторыми

трудностями, так как некоторые пищевые добавки в настоящее время могут содержать в качестве одного из компонентов прегненолон, употребление которого вызывает изменение изотопного состава стероидных гормонов, в том числе и данного эндогенного маркера [25].

В качестве эндогенных маркеров часто используются 11-гидроксиандростерон ($11\beta\text{-OH-A}$), 11-гидроксиэтиохоланолон ($11\beta\text{-OH-Э}$) и 11-кетозтиохоланолон [26]. Однако, и на их изотопный состав можно повлиять, если на фоне употребления стероидов принимать биологически активную добавку (БАД) под торговым названием «11-ОХО», содержащую 11-кетоандростендион. На рисунке 8 приведена схема, иллюстрирующая образование данных эндогенных маркеров в организме человека. Легко заметить, что 11-кетоандростендион является общим прекурсором для этих веществ.

В качестве эндогенных маркеров ранее использовали прегнантриол (ПТ) и холестерин. Однако, впоследствии от их использования отказались, поскольку ПТ обладает худшими по сравнению с ПД хроматографическими свойствами, а пути попадания в организм человека холестерина подлежат дальнейшему изучению.

Андростенон (16-en) является наиболее подходящим вариантом для определения $\Delta\delta[\text{‰}]$. В работе [27] установлено, что даже прием прегненолона не вызывает значительных изменений его изотопного состава. Повлиять на изотопное соотношение этого эндогенного маркера возможно лишь употребив непосредственно сам андростенон, но сделать это достаточно проблематично, так как он отсутствует в свободной продаже.

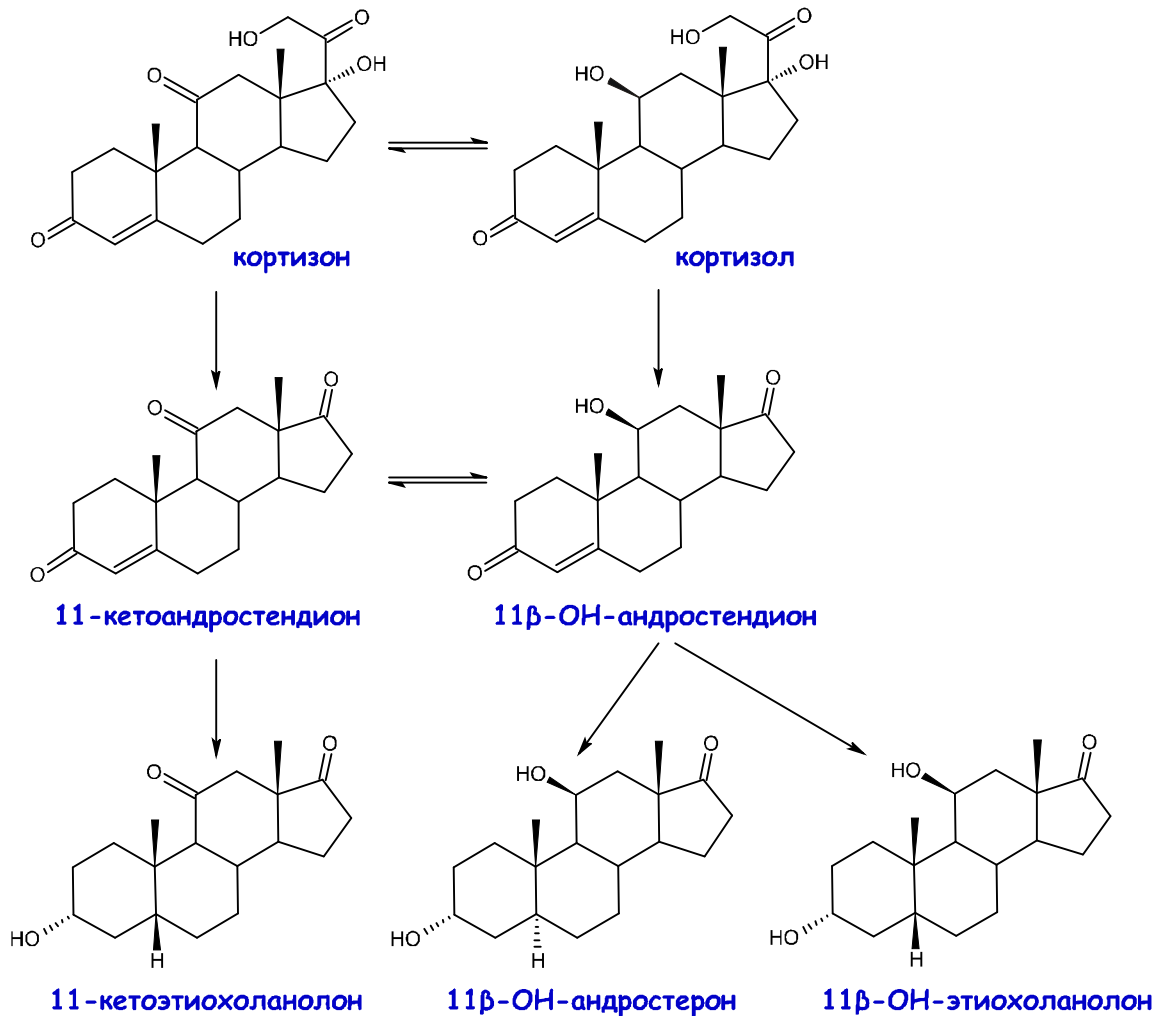


Рисунок 8 — Схема синтеза 11-кетоандростендиона, 11β-ОН-андростерона и 11β-ОН-этиохоланолона в организме человека [26]

1.3.2. Способы интерпретации результатов анализа

Когда получены данные по изотопному составу метаболитов тестостерона, существует два способа интерпретации результатов:

- 1) *Критерий “трех промилле”* – ВАДА установило пороговое значение для $\Delta\delta$ в 3‰. Пробы, в которых данная разность превышает установленную величину, считаются положительными. В случае, когда измерение изотопного состава эндогенного маркера не представляется возможным, проба признается положительной, если $\delta^{13}\text{C}$ метаболита тестостерона составляет величину меньшую, чем -28‰ [17];

- 2) *Метод референтных интервалов* – на основании большого массива экспериментальных данных по заведомо отрицательным пробам вычисляется $\bar{\Delta\delta}[\%]$ для всех возможных пар целевых соединений и эндогенных маркеров. И тем самым определяется референтный интервал для каждой пары. При дальнейшем анализе, пробы с $\Delta\delta$, выходящими за пределы данных интервалов, считаются положительными.

В работе [28] определены референтные интервалы для группы добровольцев, состоящей из 61 человека (мужчины в возрасте от 20 до 40). Участники эксперимента во время исследований отказались от приема различных медицинских препаратов, биодобавок и прогормонов. Ниже в таблице 1 приведены результаты определения референтных интервалов для пяти соединений – *A*, *Э*, *T*, *5α-диола* и *5β-диола* – относительно двух эндогенных маркеров – *ПД* и *16-ен*.

Таблица 1 — Референтные интервалы, приведенные в работе [28]

	$\Delta\delta(\text{ПД}-A)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-\text{Э})$	$\Delta\delta(\text{ПД}-T)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-5\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД}-5\beta)$
среднее значение	-0.2	1.1	1.6	1.3	0.4
СКО	0.4	0.5	0.9	0.8	0.7
3×СКО	1.1	1.5	2.8	2.4	2.0
реф. интервал	0.9	2.6	4.4	3.7	2.4

	$\Delta\delta(16\text{-ен}-A)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-\text{Э})$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-T)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-5\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-5\beta)$
среднее значение	-0.4	1.0	1.4	1.2	0.3
СКО	0.7	0.8	1.1	1.0	0.9
3×СКО	2.1	2.5	3.2	2.9	2.6
реф. интервал	1.7	3.5	4.7	4.0	2.9

Из таблицы 1 видно, что для некоторых пар «стероид – эндогенный маркер» значения референтных интервалов значительно ниже 3‰, а для других, наоборот, выше. Отсюда следует, что метод референтных интервалов по сравнению с критерием “трех промилле” является более правильным способом интерпретации результатов, поскольку:

- учитывает все потенциальные влияния, связанные с эффектом изотопного фракционирования, которые могут происходить в процессе пробоподготовки и анализа в данной конкретной лаборатории;
- исключает влияние естественных изменений гормонального фона спортсмена на результаты определения изотопных соотношений.

Следует отдельно остановиться на основных проблемах при определении происхождения стероидов методом изотопной хромато–масс–спектрометрии:

- низкие (*T*, *5 α / β -диолы* – 5–50 нг/мл) и очень высокие (*A*, *Э* – до 10000 нг/мл) концентрации стероидов в моче обуславливают необходимость во фракционировании и концентрировании пробы. В случае стероидов оптимальное количество во вколе составляет 50–100 нг;
- сложность матрицы приводит к длительной и трудоемкой пробоподготовке;
- низкая летучесть стероидов ставит необходимость в стадии дериватизации.

Дериватизация целевых соединений для *ГХ–С–ИМС* оказывает существенное влияние на результаты анализа. Возникающие трудности связаны в основном со следующими факторами:

- изменение изотопного состава целевых соединений за счет введения дополнительных атомов углерода, входящих в состав дериватирующего агента;
- возможное искажение результатов изотопных измерений из–за неколичественной конверсии целевых соединений в производные;
- изотопное фракционирование в процессе дериватизации, обусловленное кинетическими факторами.

Кроме этого, учитывая специфику аппаратного обеспечения метода, существует ряд жестких требований к выбору производных. Силилирование, являясь одним из самых простых и распространенных способов дериватизации, не подходит для *ГХ–С–ИМС*, так как при окислении силильных производных образуется SiO_2 , отложения которого со временем приведут к нарушению функциональности окислительного реактора. Продукты конверсии производных

трифторуксусной кислоты вызовут отравление окислительного реактора из-за образования крайне устойчивых CuF_2 и NiF_2 , что приведет к невозможности его регенерации. С другой стороны, использование уксусного ангидрида в качестве дериватирующего агента для получения ацетатов, хотя и влечет за собой изменение изотопного состава целевых соединений и может приводить к изотопному фракционированию, не наносит вреда системе, а получаемые соединения обладают хорошими хроматографическими свойствами. Изменение же изотопного состава в производных по сравнению со свободной формой вычисляется на основе экспериментальных данных [4].

Эффект *изотопного фракционирования* может быть обусловлен как кинетическими, так и термодинамическими факторами. Причина возникновения этого эффекта заключается в различии энергии колебательных уровней в связях, содержащих тяжелые изотопы, в сравнении со связями, содержащими легкие изотопы [29]. В случае кинетического изотопного эффекта эта энергетическая разность приводит к различию в скорости протекания процессов, включающих соединения разного изотопного состава. Влияние данного эффекта особенно велико в процессах, в которых разрыв или образование связи является лимитирующей стадией. Второй тип эффекта изотопного фракционирования связан с различием в таких физико-химических свойствах, как поглощение теплового излучения, молярный объем, давление пара, температура плавления и кипения. Наиболее отчетливо он проявляет себя в процессах дистилляции и фазовых переходах.

Важно понимать, что изотопное фракционирование сопутствует практически каждой стадии анализа. В качестве примера можно привести стадии дериватизации и ввода пробы в систему (испарение в инжекторе хроматографа), а также различные варианты хроматографического разделения (изотопный состав вещества может различаться на 10 промилле в начале и в конце хроматографического пика [13]). Первостепенная задача экспериментатора – минимизировать действие этого эффекта во всех возможных его проявлениях.

1.3.3. Синтетические аналоги эндогенных стероидов

1.3.3.1. Тестостерон

Тестостерон (рисунок 9) как наиболее известный представитель класса анаболических стероидов запрещен к применению в спорте начиная с 1976 года. Однако, выявление факта употребления тестостерона и его аналогов по-прежнему остается сложной задачей для допинг-контроля.

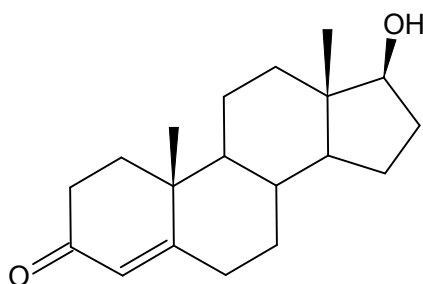


Рисунок 9 — Структурная формула тестостерона

Ранее для этой цели использовали определение в крови таких концентрационных соотношений как T/E и T /лютеинизирующий гормон [30], либо $T/17\alpha$ -гидроксипрогестерон [31]. В августе 2004 *ВАДА* был выпущен технический документ, постулирующий необходимость осуществления $ГХ-С-ИМС$ анализа экскретируемых в мочу стероидов для проб, в которых соотношение концентраций T/E превышает 4, либо наблюдаются флуктуации в параметрах стероидного профиля [17]. У здоровых субъектов пероральный прием эфиров тестостерона вызывает резкое увеличение концентрации последнего в биожидкостях [32,33]. Тестостерон в свободной форме не обладает биологической активностью при пероральном приеме, в то время как его эфиры абсорбируются в желудочно-кишечном тракте, после чего претерпевают инактивацию в тканях печени [34,35]. Поскольку выведение экзогенного тестостерона из организма происходит достаточно быстро, соотношение T/E превышает установленное *ВАДА* пороговое значение только в первые часы после приема [36,37]. К примеру, в случае однократного перорального приема 120 мг ундеcanoата тестостерона соотношение T/E падает ниже 4 уже через 10 часов после приема [38]. В случае наружного применения тестостерона в форме геля изменение концентраций и концентрационных соотношений носит ещё менее выраженный характер, в связи с

чем классические методы анализа не подходят для установления происхождения тестостерона и его метаболитов в моче.

В работе [37] представлены данные по изотопному составу метаболитов тестостерона в течение 5 дней после двухкратного приёма 40 мг тестостерона ундеcanoата здоровым добровольцем (рисунок 10). Прогормон был принят в равной дозировке с интервалом в 13 часов, чем и обусловлены всплески значений $\delta^{13}\text{C}$ целевых соединений на диаграммах. Аналогичным образом выглядит зависимость соотношения T/E от времени, прошедшего с момента употребления препарата. Данное соотношение падает ниже порогового значения по прошествии 12 и 17 часов после первой и второй дозы, соответственно. Также быстро нормализуется изотопный состав метаболитов тестостерона. По причине различной кинетики метаболизма андростерон, этиохоланолон и 5α -андростандиол возвращаются к естественному изотопному составу уже после 15 часов с момента первого приёма, измененное же изотопное соотношение для 5β -андростандиола детектируется в течение 40 часов.

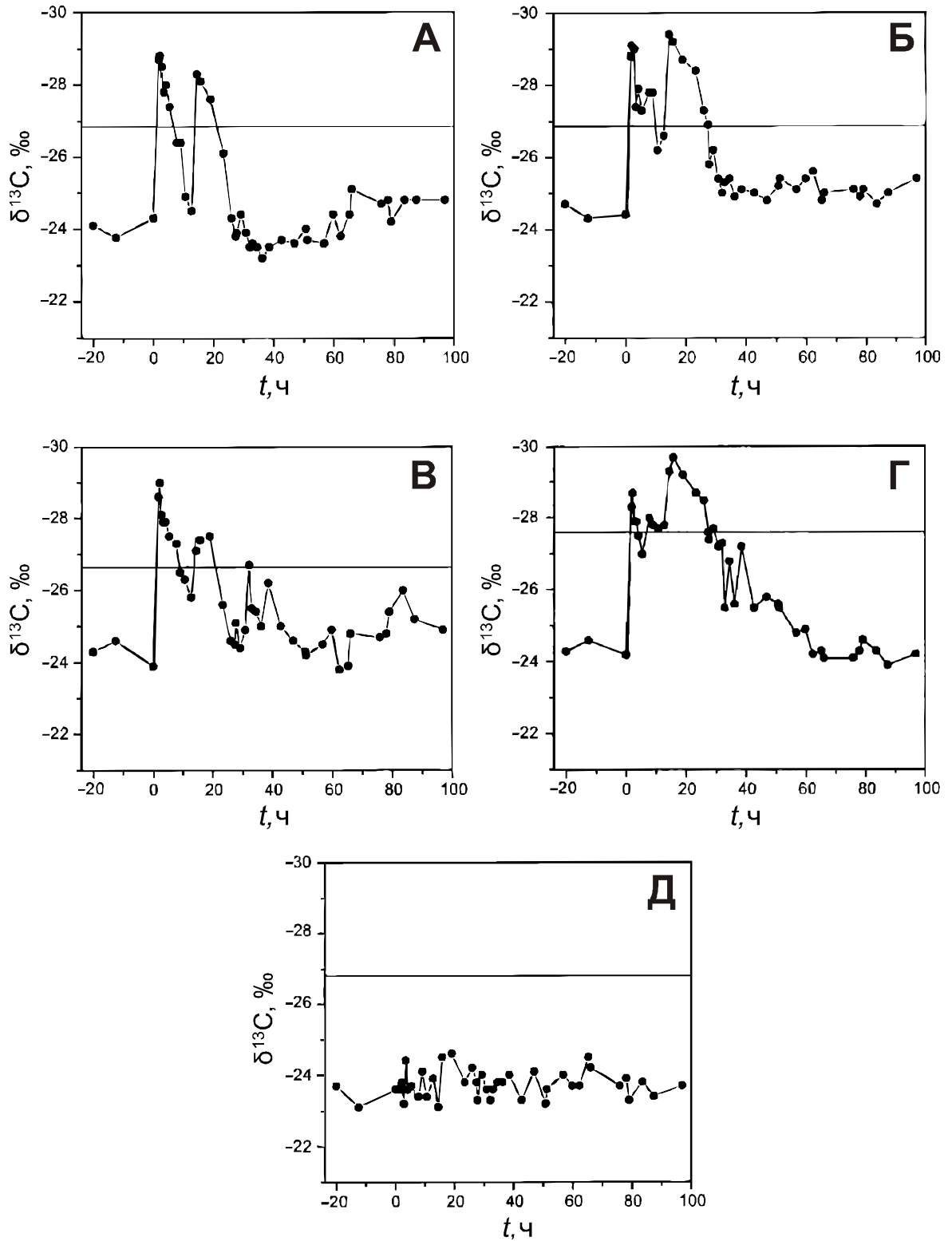


Рисунок 10 — Изотопный состав андростерона (А), этиохоланола (Б), 5 α -андростандиола (В), 5 β -андростандиола (Г) и прегнандиола (Д) в зависимости от времени, прошедшего с момента приема двух доз ундеcanoата тестостерона ($t = 0$ ч и $t = 13$ ч). Горизонтальная линия отвечает среднему значению $\delta^{13}\text{C}$ целевого соединения или эндогенного маркера за вычетом утроенного стандартного отклонения [37]

1.3.3.2. Эпитестостерон

Эпитестостерон (рисунок 11) является 17α -эпимером тестостерона и экскретируется с мочой в концентрации, близкой к таковой для тестостерона.

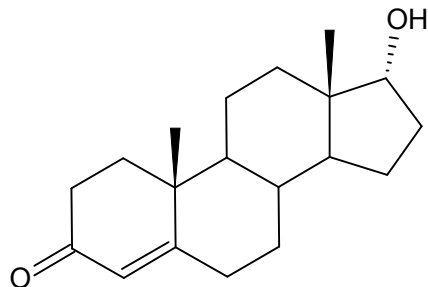


Рисунок 11 — Структурная формула эпитестостерона

Был впервые выделен из человеческой мочи в 1964 году [39], однако его физиологическая роль до сих пор не ясна. Естественным образом вырабатывается в человеческом организме в органах малого таза [40] и надпочечниках [41]. Анδροгенная активность у данного соединения отсутствует, либо не поддается детектированию [42], в связи с чем препараты эпитестостерона мало распространены. Тем не менее, данное соединение может быть обнаружено в качестве примеси в препаратах на основе других стероидов. Эпитестостерон представляет интерес для спортсменов, употребляющих запрещённые препараты, поскольку вызывает снижение соотношения концентраций T/E при совместном приеме с другими анаболиками. К примеру, при попадании в человеческий организм экзогенного тестостерона [43], андростендиона [44] или дегидроэпиандростерона [45] концентрация тестостерона в моче возрастает, в то время как концентрация эпитестостерона падает, а в случае, когда соотношение T/E принимает значение более 4, проба подвергается анализу методом изотопной хромато-масс-спектрометрии. По этой причине эпитестостерон признан *ВАДА* маскирующим агентом и запрещен к применению в спорте. В случае если концентрация этого вещества в образце превышает пороговое значение в 200 нг/мл, пробу анализируют подтверждающим методом.

В таблице 2 приведены данные по концентрации тестостерона и эпитестостерона, а также по изотопному составу эпитестостерона, андростерона и этиохоланолона для 10 проб мочи спортсменов с превышенным

концентрационным порогом на эпитестостерон. Из всех образцов только №10 содержит стероиды экзогенного происхождения, но достоверно установить какой из прогормональных препаратов стал их источником, из имеющихся данных, не представляется возможным [46].

Таблица 2 — Концентрации и изотопный состав ряда андрогенов, полученные в ходе анализа 10 проб мочи спортсменов [46]

Образец	Концентрация, нг/мл		T/E	$\delta^{13}C$, ‰		
	T	E		E	A	Э
1	53	180	0.31	-23.6	-22.0	-21.1
2	8	203	0.04	-23.3	-23.3	-21.9
3	89	218	0.43	-21.3	-20.8	-20.4
4	17	219	0.10	-23.4	-20.7	-20.4
5	45	248	0.20	-23.3	-21.9	-21.1
6	139	251	0.60	-26.1	–	–
7	43	324	0.15	-23.0	–	–
8	155	328	0.61	-22.2	-21.4	-20.2
9	116	405	0.32	-22.3	–	–
10	1183	1176	1.11	-32.6	-30.7	-31.4

1.3.3.3. Дигидротестостерон

Дигидротестостерон (рисунок 12) – биологически активный метаболит тестостерона, применяемый в спорте в качестве средства, повышающего интенсивность естественных анаболических процессов.

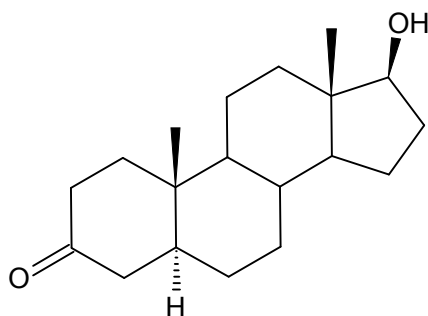


Рисунок 12 — Структурная формула ДГТ

В человеческом организме образование ДГТ из тестостерона происходит под действием фермента 5 α -редуктазы [47]. Примечательно, что ДГТ имеет более высокую, чем у тестостерона, степень сродства к андрогенным рецепторам и

образуемый им комплекс “рецептор–субстрат” диссоциирует в тканях с меньшей скоростью. Прием дигидротестостерона является причиной значительного увеличения концентраций и концентрационных соотношений его метаболитов в моче, поэтому в качестве критериев выявления факта употребления используют соотношения концентраций *ДГТ/Е* или *5 α -андростан-3 α ,17 β -диол/5 β -андростан-3 α ,17 β -диол* [48–50].

Наружное применение дигидротестостерона с $\delta^{13}\text{C} = -28.8\text{‰}$ в форме геля вызывает резкое снижение содержания изотопа ^{13}C в его *5 α -метаболитах*, в частности у *5 α -андростан-3 α ,17 β -диола* [51]. Наряду с выраженным снижением значений $\delta^{13}\text{C}$ для *5 α -диола*, наблюдалось также и незначительное изменение изотопного состава андростерона с максимальным отклонением от начальных значений на 2.9‰. Для 5 субъектов, участвовавших в исследовании время детектирования факта приема *ДГТ* по диольной фракции колебалось от 28 до 78 часов с момента употребления (рисунок 13). Стоит заметить, что изменение изотопного соотношения *5 α / β -андростан-3 α ,17 β -диолов* в случае приема *ДГТ* и *Т* при прочих равных условиях носит схожий характер. Поэтому, зная изотопный состав только лишь этих метаболитов тестостерона, делать однозначные утверждения относительно природы прогормонального препарата, вызвавшего эти изменения, не представляется возможным.

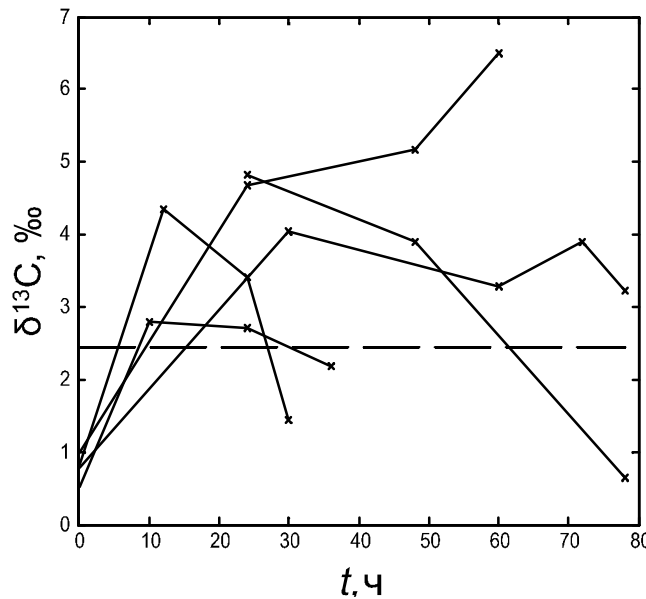


Рисунок 13 — Изотопный состав *5 α -андростан-3 α ,17 β -диола* у пяти человек в зависимости от времени, прошедшего после наружного применения *ДГТ* в форме геля. Пунктирная линия соответствует границе референтного интервала [51]

1.3.3.4. Андростендион

4-андростен-3,17-дион (рисунок 14) – эндогенный стероидный гормон, промежуточное звено в процессе биосинтеза половых гормонов тестостерона и эстрона [52–54].

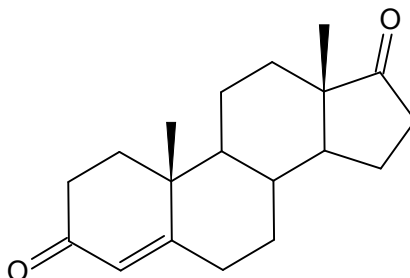


Рисунок 14 — Структурная формула андростендиона

В связи с потенциальным анаболическим эффектом это соединение классифицируется *ВАДА* как прогормональный препарат, запрещенный к применению в спорте. На данный момент однозначный критерий употребления андростендиона в случае газохроматографического анализа не сформулирован и установить факт приема прогормона возможно только методом *ГХ-С-ИМС*. В работе [55] найдено, что прием экзогенного андростендиона вызывает резкое увеличение концентраций тестостерона и его метаболитов в моче. На ранних сроках выведения наблюдается также и повышение соотношения концентраций *T/E*.

Логично предположить, что если для тестостерона и его метаболитов наблюдается повышение концентрации, то должен изменяться и их изотопный состав. На рисунке 15 изображена зависимость изотопного состава двух метаболитов тестостерона (андростерона и этиохоланолона) и эндогенного маркера прегнандиола от времени, прошедшего с момента попадания в организм прогормонального препарата. Прием андростендиона с $\delta^{13}\text{C} = -35.5\text{‰}$ в дозировке 100 мг дает положительный результат методом изотопной хромато-масс-спектрометрии по парам *[А-ПД]* и *[Э-ПД]* в течение 28 и 55 часов, соответственно [55].

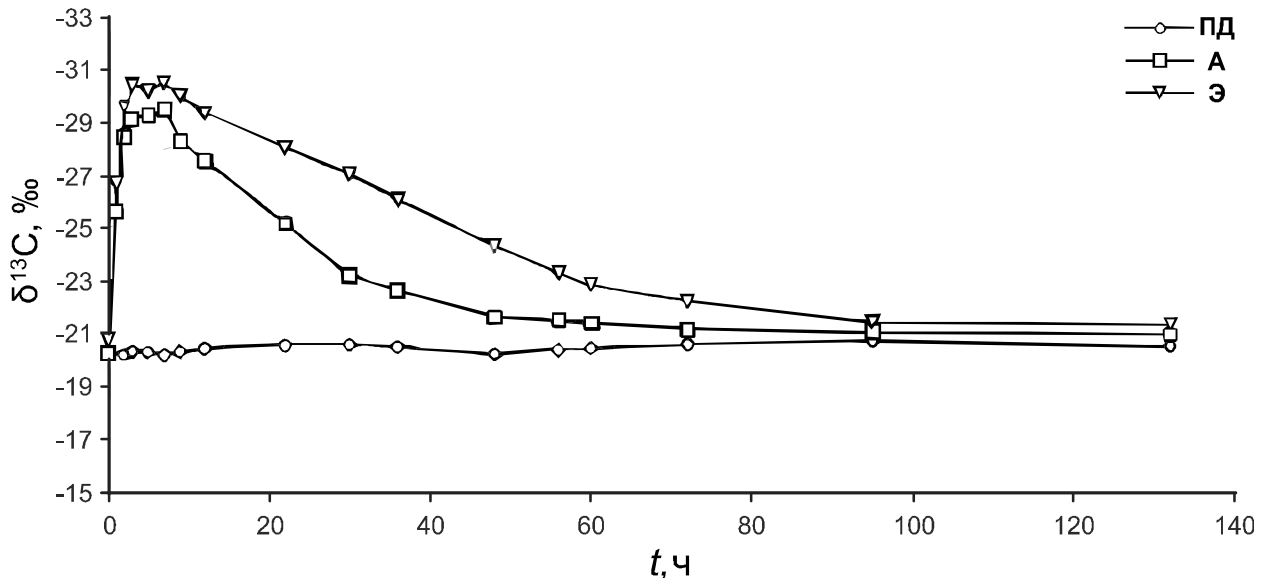


Рисунок 15 — Зависимость изотопного соотношения андростерона, этиохоланолона и прегнандиола от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг андростендиона [55]

1.3.3.5. Дегидроэпиандростерон

Дегидроэпиандростерон (рисунок 16) представляет собой основной андрогенный стероид, синтезируемый в надпочечниках [56].

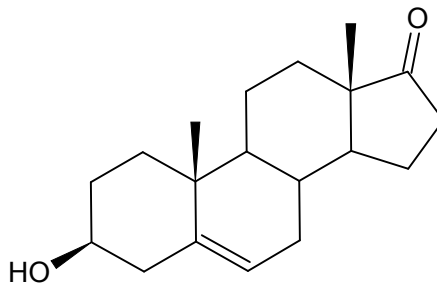


Рисунок 16 — Структурная формула ДГЭА

Уровень выработки этого гормона сильно зависит от пола, возраста и генетических особенностей субъекта [57]. Сам по себе ДГЭА не обладает ярко выраженным анаболическим эффектом, но является прекурсором в синтезе тестостерона и других эндогенных анаболических стероидов. Легкодоступность препаратов на основе ДГЭА и неоспоримые положительные эффекты их применения послужили причиной тому, что в 1997 году Международный Олимпийский комитет признал употребление данного соединения неприемлемым для спортсменов.

В таблице 3 приведены данные по изотопному составу препаратов, содержащих ДГЭА [23]. Принимая во внимание значения $\delta^{13}\text{C}$ ДГЭА в указанных продуктах, можно предположить, что прием данных биодобавок непременно вызовет значительные изменения изотопного состава андрогенов в человеческом организме.

Таблица 3 — Значения $\delta^{13}\text{C}$ коммерчески доступных форм ДГЭА [23]

Название препарата	Основной компонент	Производитель	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
Dehydroepiandrosterone	ДГЭА	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-31.4
Dehydroisoandrosterone	ДГЭА	Sigma Chemical Co.	-33.5
Dehydroisoandrosterone	ДГЭА	Wako Pure Chemical Industries., Ltd.	-34.1
New DHEA	ДГЭА	Leiner Health Products Inc.	-30.5
Schiff DHEA	ДГЭА	Schiff Products	-30.6
Dehydroepiandrosterone Acetate	ацетат ДГЭА	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-35.6
Dehydroisoandrosterone Acetate	ацетат ДГЭА	Wako Pure Chemical Industries., Ltd.	-34.5
Mylis	сульфат ДГЭА	Kanebo Co., Ltd.	-27.1

Как видно из рисунка 17, прием синтетического ДГЭА вызывает смещение $\delta^{13}\text{C}$ выделяемого с мочой ДГЭА в зону отрицательных значений. Изотопный состав ДГЭА пяти добровольцев изменялся на 4–6‰ в течение первых 8 часов, и принимал первоначальные значения уже после 72 часов после употребления. Изменение соотношения изотопов углерода в случае 5 α - и 5 β -андростандиолов носило более выраженный характер, что в соответствии с рекомендациями авторов [23] делает их использование в качестве маркеров приема ДГЭА наиболее целесообразным. В работе [58] в качестве целевых соединений выступали андростерон и этиохоланолон.

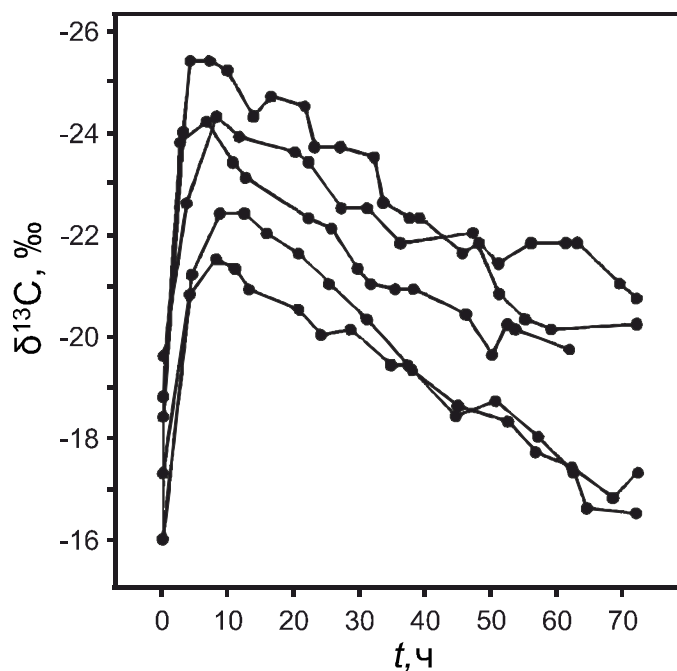


Рисунок 17 — Изотопный состав экскретируемого с мочой ДГЭА у 5 добровольцев после приема 50 мг экзогенного ДГЭА [23]

1.3.3.6. Прегненолон

Прегненолон (рисунок 18) является важным звеном в процессе синтеза андрогенов и кортикостероидов из холестерина [59].

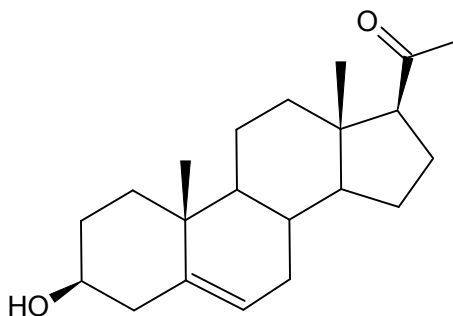


Рисунок 18 — Структурная формула прегненолона

После того, как прегненолон стал коммерчески доступным в сороковых годах двадцатого века, были проведены исследования, подтвердившие его эффективность в качестве общеукрепляющего средства [60,61]. Однако статус этих исследований до сих пор неоднозначен, и благоприятные эффекты приёма прегненолона на данный момент не имеют всеобщего признания [62].

Поскольку употребление прегненолона не вызывает улучшения спортивных показателей, он не относится к допинговым средствам и не фигурирует в

запрещённом списке *ВАДА* [63]. На рисунке 19 представлена графическая зависимость изотопного состава прегнандиола от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона с изотопным соотношением минус 31.1‰ [64]. Легко заметить, что экзогенный прегненолон существенно влияет на значение $\delta^{13}\text{C}$ такого распространённого эндогенного маркера, как прегнандиол, и может потенциально использоваться в качестве маскирующего агента в случае совместного употребления с другими синтетическими аналогами эндогенных стероидов.

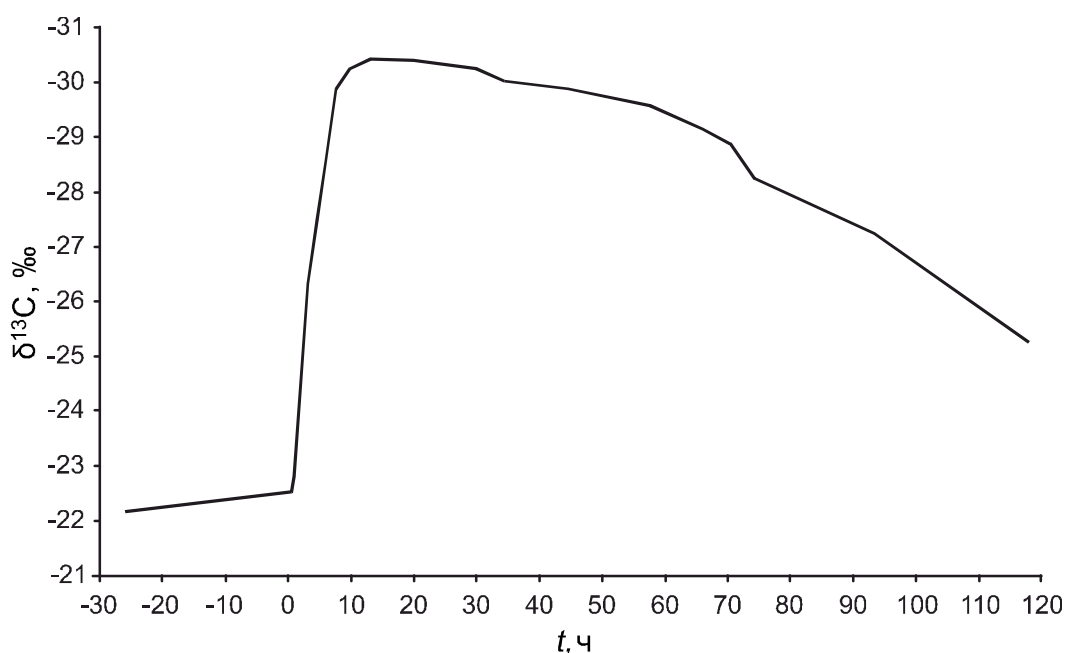


Рисунок 19 — Изотопное соотношение прегнандиола в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона [64]

1.3.3.7. Форместан

Форместан (4-гидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион) относится к классу ингибиторов ароматазы (рисунок 20). Установлено, что данный препарат на фоне низкой токсичности проявляет высокую эффективность в процессах ингибирования [65,66]. Форместан разносторонне описан в рамках различных клинических исследований и в составе ингибиторов ароматазы второго поколения активно используется для лечения рака груди, вызванного нарушением метаболизма эстрогенов [67,68].

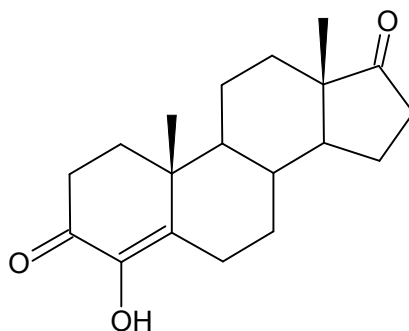


Рисунок 20 — Структурная формула форместана

Периферическая конверсия андрогенов в эстрогены является основным негативным действием при применении анаболических стероидов как допинговых субстанций. Совместный приём анаболиков и ингибиторов ароматазы минимизирует побочные эффекты употребления. По этой причине форместан как соединение с антиэстрогенной активностью внесен в запрещенный список *ВАДА* начиная с 2005 года [69]. Если концентрация форместана в образце мочи лежит в диапазоне от 25 до 150 нг/мл, пробу подвергают анализу методом изотопной хромато–масс–спектрометрии.

В работе [70] изучено влияние употребления препарата, содержащего форместан с изотопным составом минус $(30.30 \pm 0.16) \text{‰}$, на изотопное соотношение эндогенных стероидов. Согласно данным таблицы 4, при попадании в человеческий организм форместан не влияет на изотопные характеристики *ДГЭА*, а также тестостерона и его метаболитов.

Таблица 4 — Значения $\delta^{13}\text{C}$ стероидов, на изотопный состав которых не влияет приём 100 мг форместана ($n=15$) [70]

Соединение	$\delta^{13}\text{C}_{\text{среднее}}, \text{‰}$	<i>СКО</i> , ‰
Этиохоланолон	-23.9	0.15
Андростерон	-22.7	0.10
Тестостерон	-23.6	0.35
Эпитестостерон	-24.8	0.49
Дегидроэпиандростерон	-21.6	0.44
5 α -андростандиол	-23.4	0.48
5 β -андростандиол	-22.0	0.43

На рисунке 21 приведена диаграмма зависимости изотопного состава 11-гидрокси-этиохоланолона и 11-гидрокси-андростерона от времени, прошедшего с

момента употребления 100 мг форместана [70]. Эти соединения зачастую выступают в качестве эндогенных маркеров при анализе методом *ГХ–С–ИМС*. Однако, судя по графической зависимости, 11–гидрокси–андростерон не может быть использован в качестве эндогенного маркера в случае анализа на форместан, поскольку в условиях эксперимента *11β–ОН–А* не разделяется с *3α,4α–дигидрокси–андростан–17–оном*, до которого метаболизирует форместан.

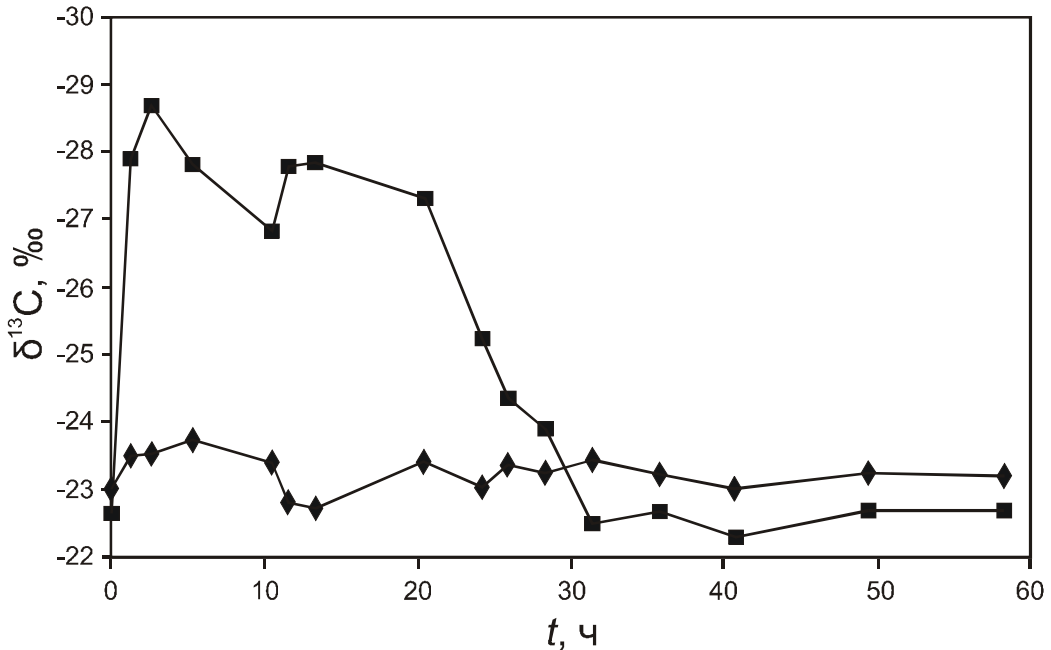


Рисунок 21 — Зависимость изотопного соотношения 11–гидрокси–этиохоланолон (ромбы) и 11–гидрокси–андростерона (квадраты) от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг форместана [70]

Как видно из рисунка 22, экскретируемый с мочой форместан имеет изменённый изотопный состав в течение 60 часов после приёма экзогенного аналога в дозировке 100 мг, в то время как его концентрация превышает пороговые значения только лишь в первые 30 часов. Прегнандиол же напротив сохраняет постоянное изотопное соотношение минус $(22.40 \pm 0.23 \text{ ‰})$. С учетом вышесказанного, авторы исследования [70] рекомендуют использовать непосредственно сам форместан как целевое соединение и прегнандиол в качестве эндогенного маркера. Референтный интервал для пары форместан–прегнандиол, установленный для популяции из 42 субъектов, составляет 2.9 ‰.

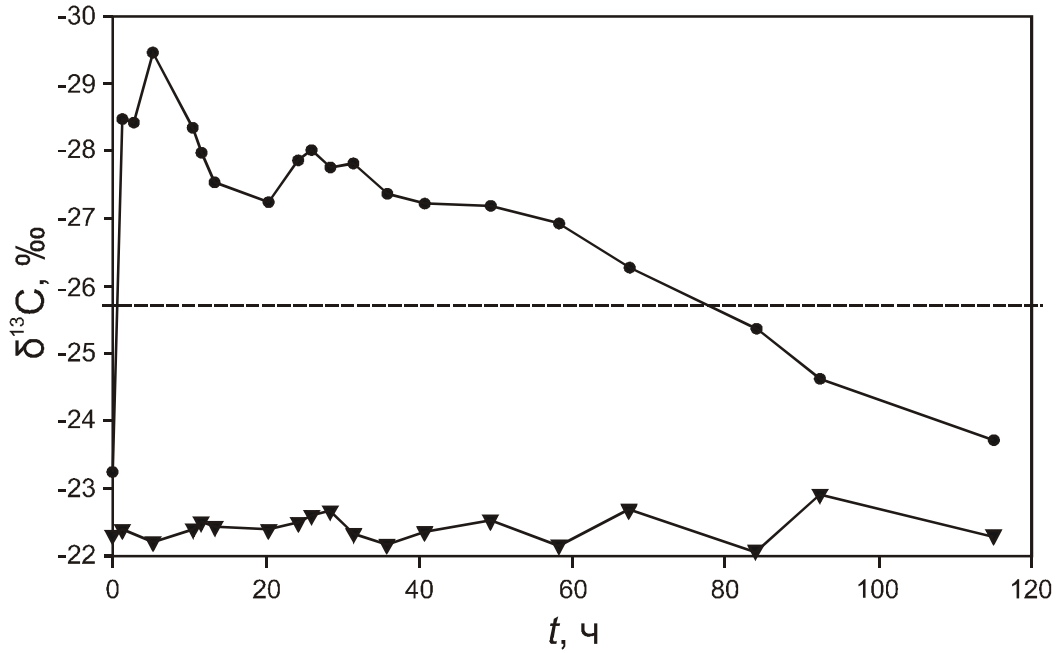


Рисунок 22 — Зависимость изотопного соотношения форместана (окружности) и прегнандиола (треугольники) от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг форместана. Пунктирная линия соответствует границе референтного интервала (Форместан–ПД) [70]

1.3.3.8. Болдион и болденон

Широкораспространённый прогормональный препарат болдион (1,4-андростадиен-3,17-дион) находится в запрещённом списке ВАДА, начиная с 2004 года [17]. Болдион (рисунок 23) является прекурсором болденона (1,4-андростадиен-17β-ол-3-он) и в человеческом организме метаболизирует до него под действием 17β-гидрокси(стероид)гидрогеназы – того же фермента, что восстанавливает андростендион до тестостерона [71].

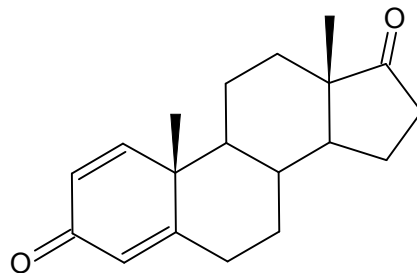


Рисунок 23 — Структурная формула болдиона

Болденон (рисунок 24) впервые синтезирован в 1940 году и активно применяется с целью стимуляции процесса размножения у крупного рогатого скота и в конном допинге [72–74].

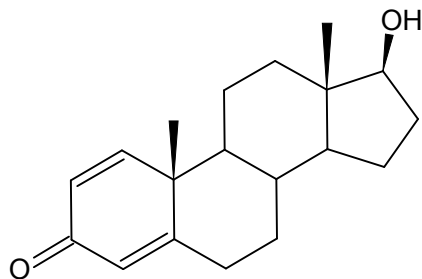
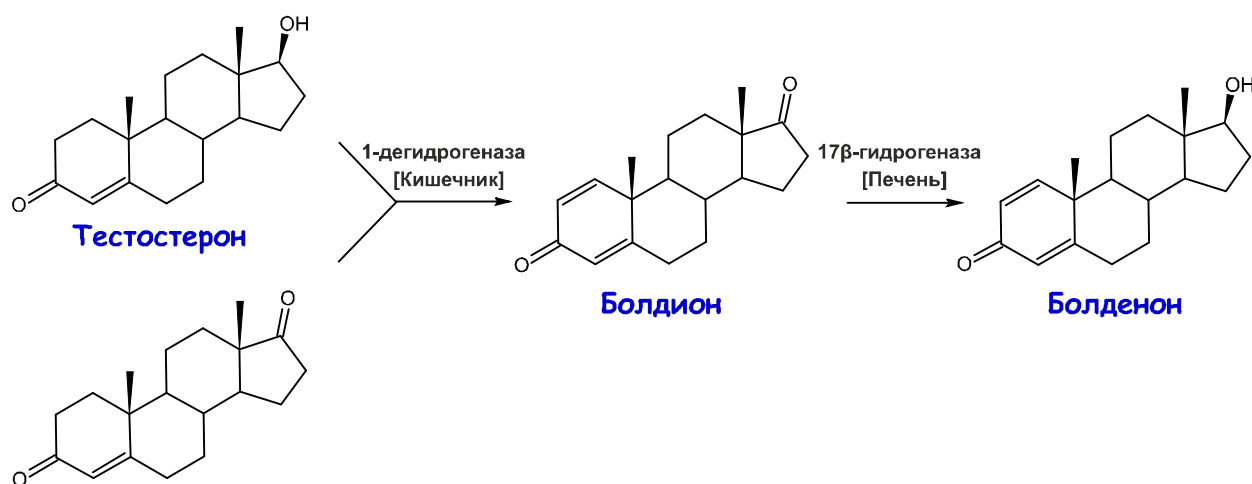


Рисунок 24 — Структурная формула болденона

Ранее считалось, что в человеческом организме этот стероид естественным образом не вырабатывается, однако после выхода в свет публикации [75] в 1996 году признано, что его присутствие в моче в низких концентрациях может носить эндогенный характер. Синтез болденона в условиях *in vivo* протекает по нетривиальному механизму (рисунок 25). Установлено, что наряду с холестерином и желчными кислотами около 2 мг стероидных гормонов ежедневно попадает в кишечник с желчью, где в анаэробных условиях под действием различных штаммов бактерий, продуцирующих 1-(стероид)дегидрогеназу, такие андрогены, как тестостерон и андростендион приобретают двойную связь у атома углерода C1 с образованием болдиона [76,77]. Далее болдион всасывается в кровь через стенки кишечника, по портальной вене поступает в печень и, взаимодействуя с 17β-гидрокси(стероид)гидрогеназой, восстанавливается до болденона, после чего образует метаболиты по I и II фазе и выводится из организма почками. Поскольку путь синтеза эндогенного болденона является многостадийным и сложным процессом, уровень его концентрации в моче, как правило, не превышает значения в несколько наногرامмов на миллилитр.



4-андростен-3,17-дион

Рисунок 25 — Схема образования болденона в человеческом организме

Препараты на основе болденона зачастую представляют собой масляный раствор эфира ундекановой кислоты в инъекционной форме. В таблице 5 приведены данные по изотопному составу 5 продуктов, содержащих болденон [78]. Среди объектов исследования интерес вызывает “Eldorben” ввиду значения $\delta^{13}\text{C}$, близкого к эндогенным стероидам спортсменов европейской популяции. Обнадеживает то, что этот ветеринарный препарат, выпущенный впервые в 1985 году, на рынке сейчас недоступен, так как снят с производства.

Таблица 5 — Изотопный состав инъекционных препаратов на основе Болденона [78]

Название препарата	Производитель	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
Vetranal	Riedel–de Haen	–30.3
Eldorben	Squibb	–22.7
Ganabol	Laboratorios V.M. Ltda	–26.3
Boldabolic	Asia Pharma	–27.1
Boldabol 200	British Dragon Pharmaceuticals	–27.7

Данные анализа проб мочи после употребления болдиона в литературе отсутствуют, однако существует информация об изотопном составе метаболитов тестостерона и болденона в пробах мочи на поздних сроках выведения препарата. В соответствии с данными таблицы 6 концентрации болденона и его метаболита в моче в большинстве случаев относительно низкие, что существенно сказывается на точности определения их изотопного состава. По этой причине авторы рекомендуют использовать в качестве критерия положительной пробы интервал

$\Delta\delta(\text{ЭМ-ЦС}) = 4\text{‰}$ (а не 3‰) [78]. Применяя данный критерий к результатам измерений изотопного состава для стероидов 12 образцов мочи, можно с уверенностью утверждать, что все пробы являются положительными на факт употребления болденона.

Таблица 6 — Результаты анализа положительных на факт употребления болденона проб [78]

№ пробы	Концентрация, нг/мл		$\delta^{13}\text{C}$, ‰					
	Болденон	Метаболит болденона	ПД	Э	А	Т	Болденон	Метаболит болденона
1	50	50	-18.0	-19.6	-18.1	–	-28.7	-29.2
2	5	6	-18.7	-20.0	-18.4	–	-27.0	-30.0
3	10	30	-18.4	-20.3	-18.4	-19.5	-30.1	-28.7
4	–	50	-18.7	-23.5	-20.4	-21.5	–	-28.6
5	2	12	-20.3	-21.4	-19.9	-21.5	-28.9	-30.8
6	2	12	-19.3	-21.7	-19.9	-21.4	-21.3	-28.7
7	40	17	-22.5	-24.9	-22.5	-24.2	-29.2	-29.1
8	10	30	-19.4	-20.0	-19.3	-19.7	-29.6	-28.9
9	50	120	-20.6	-23.1	-21.2	-24.2	-27.4	-29.1
10	–	25	-19.5	-23.1	-21.7	-21.4	-29.6	-29.4
11	5	6	-22.8	-23.9	-21.9	-22.8	-29.2	-29.3
12	170	170	-21.8	-23.8	-21.9	–	-28.1	-28.2

1.4. Подготовка образцов к анализу

Принципиальную схему подготовки пробы к анализу методом *ГХ-С-ИМС* можно представить последовательностью следующих операций:

- 1) выделение конъюгатов стероидов при помощи *ТФЭ*;
- 2) ферментативный гидролиз – перевод целевых соединений из конъюгированной формы в свободную;

Стадию ферментативного гидролиза, как правило, проводят при помощи двух реагентов, это:

Глюкуронидаза из *E. Coli*

pH = 6.0 – 7.0 (фосфатный буфер)
1 час при 50°–57°С

Сок улитки *Helix Pomatia*

(смесь глюкуронидазы и
арилсульфатазы)

pH = 5.5 (ацетатный буфер)
3 часа при 55°–60°С

Чистая глюкуронидаза из *E. Coli* является более эффективным агентом для гидролиза, так как деконъюгирует целевые соединения за меньшее время и, в отличие от сока улитки *Helix Pomatia*, не обладает побочной ферментативной активностью.

- 3) экстракция деконъюгированных стероидов;
- 4) очистка и, желательнo, фракционирование пробы различными методами – ТФЭ, ИАХ, ТСХ, ВЭЖХ, в том числе и химическими.

В основе химических методов фракционирования компонентов пробы лежит взаимодействие кетостероидов с реактивом Жирара (рисунок 26) с образованием водорастворимых оксимов с последующим разделением образца при помощи ЖЖЭ на фракцию, содержащую кетостероиды, и фракцию, их не содержащую [30].

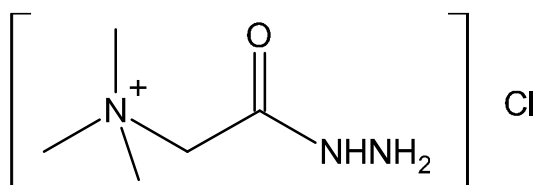


Рисунок 26 — Структурная формула реактива Жирара

- 5) дериватизация (опционально) – улучшение хроматографических свойств целевых соединений.

Важно отметить, что чувствительность и селективность методики определения изотопного состава стероидов при помощи ГХ–С–ИМС напрямую зависит от качественного выполнения процедур на стадии пробоподготовки.

1.4.1. Использование реактива Жирара

Отличительной чертой данного способа пробоподготовки является очистка и концентрирование целевых компонентов пробы посредством взаимодействия с реактивом Жирара и нормально-фазовой (*НФ*) *ТФЭ* [80,81].

Образец мочи (30 мл) подвергают твердофазной экстракции с метанолом в качестве элюента. Экстракт упаривают и перерастворяют в растворе ацетатного буфера (рН ~ 5) с добавлением сока улитки *Helix Pomatia*. Ферментативный гидролиз осуществляют при 55°C в течение 3 часов, после чего из пробы посредством взаимодействия с реактивом Жирара (раствор в ледяной уксусной кислоте, 100°C, 30 мин) и жидкостно-жидкостной экстракции выделяют стероиды, не содержащие карбонильных групп. В работе [81] взаимодействию с реактивом Жирара предшествовала *ТФЭ*. Далее целевые соединения сорбируют на картридже для *НФ ТФЭ*, элюируют смесью циклогексан : этанол = 4 : 1 и окисляют висмутатом натрия в среде уксусной кислоты (2 часа) для разрушения малолетучих производных прегнана (данная стадия отсутствует в работе [81]). Затем следует *ЖЖЭ* этилацетатом. Органическую фазу, содержащую целевые стероиды (*5 α -диол*, *5 β -диол*, *ПД*) упаривают, высушенный экстракт подвергают дериватизации уксусным ангидридом (*Ac₂O*) в присутствии пиридина (*Py*) при $t_{\text{комн}}$ °C в течение 12 часов. Далее целевые соединения анализируют методом *ГХ-С-ИМС*.

1.4.2. Иммуноаффинная хроматография

В основе данного варианта пробоподготовки лежит очистка и концентрирование целевых компонентов пробы методом иммуноаффинной хроматографии (*ИАХ*) [82–84].

Образец мочи (10 мл) подвергают твердофазной экстракции. Далее метанолом с картриджа элюируют глюкурониды стероидов, а смесью хлороформ/ацетон – холестерин. Фракцию, содержащую холестерин, упаривают, сухой экстракт ацетируют (*Ac₂O*, *Py*, $t_{\text{комн}}$ °C, 12 часов), подвергают *НФ ТФЭ* со смесью дихлорметана с гексаном в качестве элюента и определяют изотопный состав ацетата холестерина. Экстракт, содержащий конъюгаты стероидов, упаривают и перерастворяют в растворе ацетатного буфера (рН ~ 5.5) с добавлением раствора сока улитки *Helix Pomatia*. Ферментативный гидролиз

осуществляют при 55°C в течение 3 часов. После этого, из пробы посредством ЖЖЭ диэтиловым эфиром выделяют деконъюгированные стероиды, которые в дальнейшем сорбируют на картридже для *НФ ТФЭ* и элюируют смесью этилацетат : гексан = 50 : 50. Растворитель упаривают, экстракт растворяют в воде и пропускают через колонку для *ИАХ*, содержащую сорбент с антителами, специфичными для 17-гидроксистероидов. Целевые соединения (*Т* и *Е*) смывают смесью этанол : вода = 80 : 20. Высушенный элюат ацетируют (Ac_2O , Py , $t_{комн}$ °С, 12 часов), после чего анализируют методом *ГХ-С-ИМС*.

1.4.3. Фракционирование с помощью тонкослойной хроматографии

Принципиальной особенностью данного способа пробоподготовки является очистка и фракционирование целевых компонентов пробы методом *ТСХ* [85–87].

Образец мочи (10 мл) подвергают твердофазной экстракции с метанолом в качестве элюента. Экстракт упаривают и перерастворяют в растворе фосфатного буфера (рН ~ 7) с добавлением β-глюкуронидазы из *E. Coli*. Ферментативный гидролиз осуществляют либо при 37°C в течение 12 часов [85], либо при 55°C в течение 3 часов [86,87]. Затем из пробы посредством экстракции гептаном выделяют деконъюгированные стероиды и подвергают *ТСХ*, после чего на пластинке для *ТСХ* вырезают участки сорбента, содержащие целевые соединения (*Е* и *ПТ* [26]; *А*, *Т*, *5α-диол* и *ПТ* [86,87]) и экстрагируют сорбент метанолом, высушенный элюат ацетируют (Ac_2O , Py , 70°C, 30 мин). Далее целевые соединения анализируют методом *ГХ-С-ИМС*.

1.4.4. Твердофазная экстракция

Отличительной чертой данного способа пробоподготовки является очистка и фракционирование целевых компонентов пробы с применением многостадийной *ТФЭ* [88–91].

Образец мочи (10 мл) подвергают твердофазной экстракции с метанолом в качестве элюента. Экстракт упаривают и перерастворяют в растворе фосфатного буфера (рН ~ 7) с добавлением раствора β-глюкуронидазы из *E. Coli*. Ферментативный гидролиз осуществляют при 60°C в течение 1 часа, после чего деконъюгированные стероиды сорбируют на картридже для *ТФЭ* и элюируют

двумя различными по объемному составу смесями ацетонитрила с водой, получая соответственно 2 экстракта – первый содержит *A* и *Э*, второй – *ПД*, *16-ен* и *5β-диол*. Высушенные экстракты ацетируют (Ac_2O , *Py*, 60°C, 1 час) и ацетильные производные вновь подвергают *ТФЭ* со смесью ацетонитрил : вода = 75 : 25 (первая фракция) и чистым *ACN* (вторая фракция) в качестве элюентов. Далее содержимое фракций анализируют методом *ГХ-С-ИМС*.

1.4.5. Фракционирование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В основе данного варианта пробоподготовки лежит очистка и фракционирование целевых компонентов пробы методом обращенно-фазовой *ВЭЖХ* [28,92,93].

Образец мочи (10 мл) подвергают твердофазной экстракции с метанолом в качестве элюента. Элюат упаривают, перерастворяют в растворе фосфатного буфера (рН ~ 7) и экстрагируют 5 мл метилтретбутилового или диэтилового эфира для дополнительной очистки. К водной фазе добавляют раствор β-глюкуронидазы. Ферментативный гидролиз осуществляют при 50°C в течение 1 часа. После этого из пробы посредством экстракции метилтретбутиловым (диэтиловым) эфиром выделяют деконъюгированных стероиды. Далее пробу очищают и фракционируют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. При этом фракции содержат: 1 – *11β-ОН-А* и *11β-ОН-Э*; 2 – *T*; 3 – *5α-диол* и *5β-диол*; 4 – *A* и *Э*; 5 – *ПД*; 6 – *16-ен*. Растворитель упаривают, фракции ацетируют (Ac_2O , *Py*, 70°C, 45 мин). В работе [28] фракции 2 и 3 подвергают повторной очистке посредством *ОФ ВЭЖХ*. Далее содержимое фракций анализируют методом *ГХ-С-ИМС*, причем фракции 1 и 4 анализируют без дериватизации (в нативном виде).

Ниже в таблице 7 рассмотрены основные достоинства и недостатки рассмотренных вариантов пробоподготовки.

Таблица 7 — Сравнительный анализ различных способов пробоподготовки

<i>метод</i>	<i>достоинства</i>	<i>недостатки</i>
<i>Реактив Жирара</i>	Экспрессность; низкая стоимость анализа.	Узкий круг извлекаемых соединений; соединения с потенциально разной концентрацией попадают в одну фракцию (ПД, 5 α /5 β -диолы).
<i>ИАХ</i>	Высокая селективность; отсутствие изотопного фракционирования.	Ограниченный круг веществ; высокая стоимость анализа.
<i>ТФЭ</i>	Экспрессность; относительная простота эксперимента.	Недостаточная селективность; ограниченный круг веществ; соединения с потенциально разной концентрацией попадают в одну фракцию (ПД, 16-ен, 5 α /5 β -диолы).
<i>ТСХ</i>	Экспрессность; низкая стоимость анализа.	Сложность проведения эксперимента (перенос и экстракция пятен сорбента); проблемы с воспроизводимостью.
<i>ВЭЖХ</i>	Высокая селективность; широкий круг определяемых веществ (возможность добавлять новые).	Длительность анализа; опасность изотопного фракционирования (необходимость строгого контроля интервалов сбора фракций); большой расход органических растворителей.

На основе изучения существующих данных установлено, что определить 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 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 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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, и никогда не достигает значений ниже минус 27‰.

Учитывая достоинства и недостатки рассмотренных методов, следует сказать, что наиболее подходящим способом пробоподготовки для анализа методом изотопной хромато–масс–спектрометрии является комбинация твердофазной экстракции и полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Анализ литературных источников на тему метаболизма синтетических аналогов эндогенных стероидов показал, что большинство препаратов данного класса влияют на процесс биотрансформации тестостерона и его метаболитов, в связи с чем в качестве целевых соединений при измерении изотопного состава стероидов, выделенных из мочи, необходимо использовать тестостерон и его метаболиты. Таким образом, целью настоящей работы являлась разработка прямого и достоверного способа обнаружения факта употребления спортсменами таких экзогенных препаратов, как тестостерон, дегидроэпиандростерон, прегненолон, 1,4–андростадиен–3,17–дион, 5 α –андростан–3 β ,17 β –диол и 1–андростен–3 β ,17 β –диол методом изотопной хромато–масс–спектрометрии.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Исходные вещества и материалы

Стадию твердофазной экстракции осуществляли на концентрирующих картриджах Bond Elut LRC–C18 объемом 10 мл с массой сорбента 500 мг (Varian, США) с применением метанола «для хроматографии» (Chromasolv, Merck, Германия) и воды «для хроматографии» (Biosolve, Нидерланды) в качестве элюента и промывочной жидкости.

Жидкостно–жидкостную экстракцию выполняли с использованием диэтилового эфира (Fisher Scientific, Великобритания) и *n*-пентана (Acros, Бельгия). Гидрокарбонат натрия и карбонат калия (ч.д.а.) произведены компанией Химмед (Россия), дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия – Riedel–de–Haën (Германия), 4–дитио–*DL*–триетол (*ДТТ*) – Sigma (Германия).

Ферментативный гидролиз проводили посредством раствора β -глюкуронидазы *E. Coli* в глицерине (Roche Diagnostics, Германия).

В качестве подвижной фазы на стадии *ВЭЖХ*–фракционирования использовали ацетонитрил «для дальнего УФ» (JT Baker, Нидерланды) и воду «для хроматографии» (Biosolve, Нидерланды).

Азид натрия, йодид аммония, а также *МСТФА* (*N*-метил–*N*-триметилсилилтрифторацетамид) качества «для дериватизации» произведены фирмой Macherey–Nagel (Германия). Уксусный ангидрид и пиридин, необходимые для стадии дериватизации, а также реактив Жирара “Т” получены от компании Sigma (США). Ацетон и гептан (ОСЧ) произведены фирмой Химмед (Россия), пентакозан – Sigma (США).

Для анализа методом *ГХ–С–ИМС* использовали гелий марки «60» с чистотой не менее 99.9999% (газ–носитель), кислород ОСЧ с чистотой не менее 99.999% и углекислый газ ОСЧ с чистотой не менее 99.995%.

Информация по стандартным образцам целевых соединений, эндогенных маркеров, внутренних стандартов и прогормональным препаратам приведена в таблицах 8–10.

Таблица 8 — Перечень целевых соединений при анализе на синтетические аналоги
эндогенных стероидов

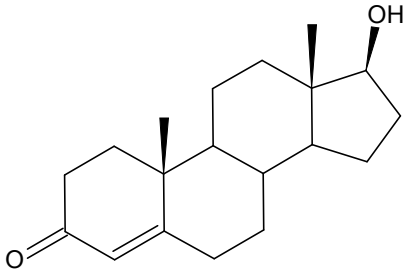
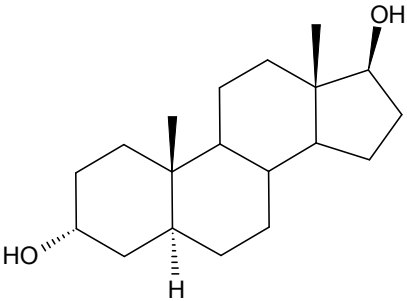
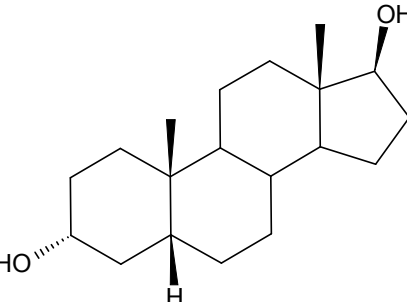
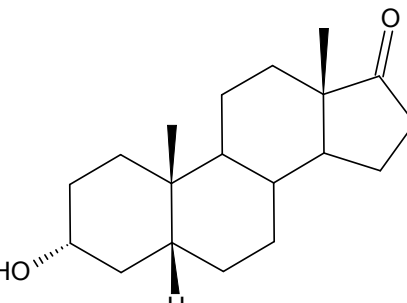
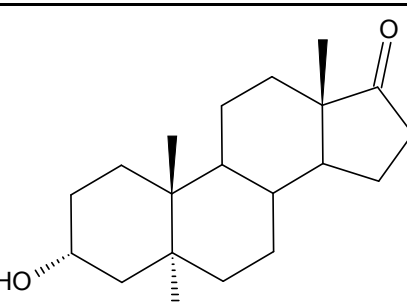
Соединение, производитель	Сокращение	Молекулярная масса	Структурная формула
тестостерон (NMI, Австралия)	<i>T</i>	288	
5 α -андростан-3 α ,17 β - диол (NMI, Австралия)	<i>5α</i>	292	
5 β -андростан-3 α ,17 β - диол (NMI, Австралия)	<i>5β</i>	292	
этиохоланолон (NMI, Австралия)	<i>Э</i>	290	
андростерон (NMI, Австралия)	<i>A</i>	290	

Таблица 9 — Эндогенные маркеры и внутренние стандарты

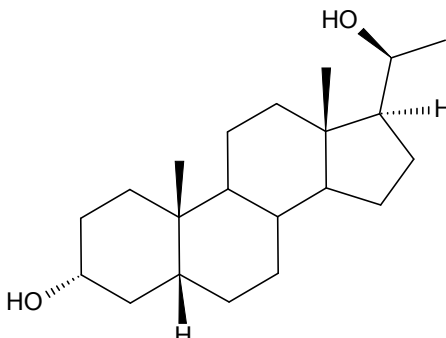
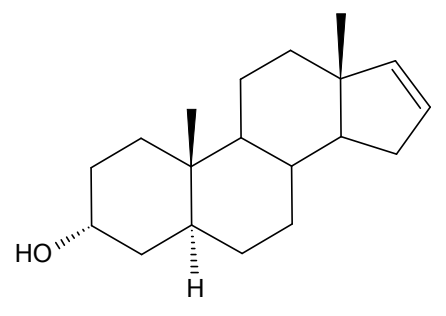
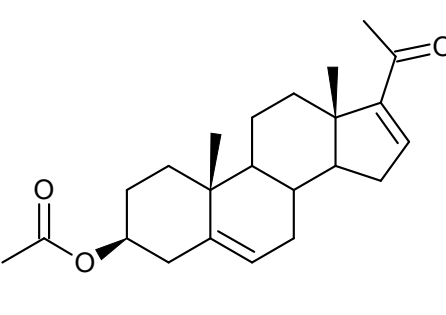
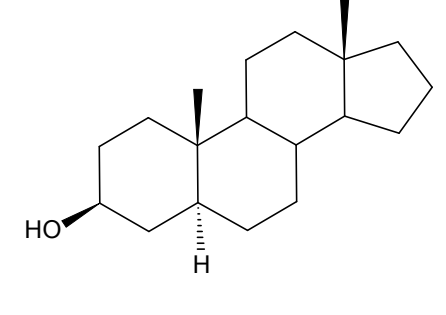
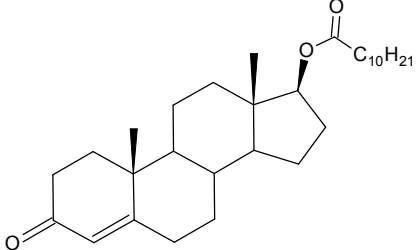
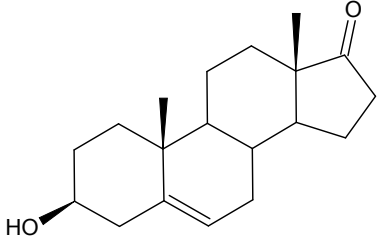
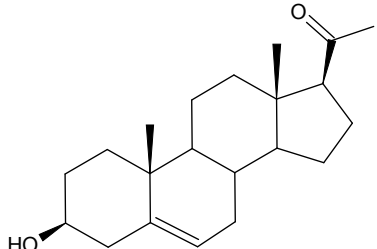
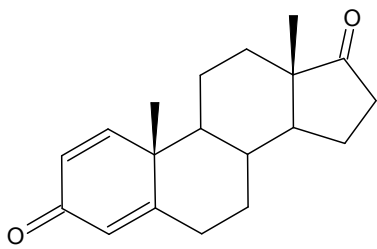
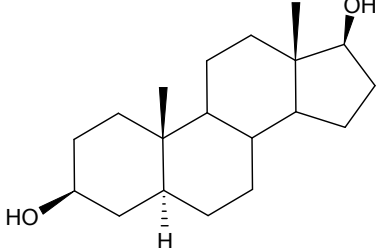
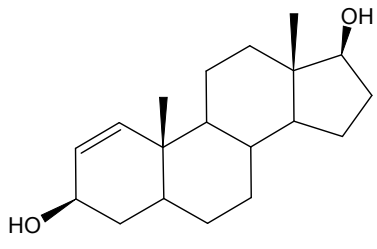
Соединение, производитель	Сокращение	Молекулярная масса	Структурная формула
<i>эндогенные маркеры</i>			
5 β -прегнан-3 α ,20 α -диол (Steraloids, США)	<i>ПД</i>	320	
16(5 α)-андростен-3 α -ол (Sigma, США)	<i>16-ен</i>	274	
<i>внутренние стандарты</i>			
дегидропрегненолона ацетат (Sigma, США)	<i>ДГПА</i>	356	
5 α -андростан-3 β -ол (Sigma, США)	<i>A-ол</i>	276	

Таблица 10 — Прогормональные препараты, изученные 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	

2.2. Основное оборудование

Твердофазную экстракцию (ТФЭ) осуществляли при помощи вакуумного манифолда (Restek, США), подключённого к насосу для создания вакуума (Millipore, США).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на стадии фракционирования проводили на базе систем Agilent 1100 (Agilent Technologies, Германия) и Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Системы имеют аналогичную структуру и включают в себя блок дегазации, бинарный насос, автосамплер, термостат колонки, диодноматричный детектор и полупрепаративный коллектор фракций.

ГХ–МС анализ выполняли на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс–спектрометрическим детектором 5973inert и автосамплером Agilent ALS 7683 (Agilent Technologies, США) и на газовом хроматографе Thermo Trace GC с масс–спектрометрическим детектором Thermo DSQ II и автосамплером Thermo TriPlus AS (Thermo Scientific, Италия).

ГХ–С–ИМС анализ осуществляли на газовом хроматографе Thermo Trace GC с автосамплером Thermo TriPlus AS и интерфейсом для сжигания пробы Combustion Interface III, подсоединённым к изотопному масс–спектрометру Thermo Delta V Plus (Thermo Scientific, Германия).

2.3. Вспомогательное оборудование

pH раствора определяли посредством pH–метра MA235 фирмы Mettler–Toledo, Швейцария. Стандартные образцы и фармацевтические формы взвешивали на аналитических весах CP225D (Sartorius, Германия).

Для аликвотирования растворителей и буферных растворов использовали дозаторы переменного объема (1–10, 20–200, 100–1000, 500–5000 и 1000–10000 мкл), механические степперы Multipette plus с электронным дисплеем и диспенсеры переменного объема (0.5–2.5 и 1–5 мл) фирмы Eppendorf, Германия.

Для проведения жидкостно–жидкостной экстракции (*ЖЖЭ*) применяли автоматические шейкеры марок Glas–Col (Terre Haute, США) и Intelli–Mixer RM–1L (ELMI Ltd., Латвия).

Центрифугирование проб мочи осуществляли на центрифуге марки Rotina 420 (Hettich, Германия).

Вымораживание водного слоя после ЖЖЭ проводили в низкотемпературной бане марки М-12 (Термэкс, Россия).

Образцы мочи на стадии ферментативного гидролиза инкубировали в термостате фирмы Binder, США.

Упаривание органических растворителей выполняли в вакуумном испарителе RapidVar (Labconco Corp., США).

Ацетилирование и силилирование экстрактов осуществляли в твердотельном нагревателе с программируемой температурой модели EC2 (VLM, Германия).

2.4. Методика эксперимента

2.4.1. Приготовление растворов определяемых соединений и буферов

- 1) *Пентакозан*. На аналитических весах взвесили 2 мг пентакозана и растворили в 2000 мкл гептана. К 200 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл добавили 1800 мкл гептана. Полученный раствор с концентрацией 100 нг/мкл использовали в работе;
- 2) *Дегидропрегненолона ацетат (маркер времени)*. На аналитических весах взвесили 2 мг дегидропрегненолона ацетата и растворили в 2000 мкл метанола. К 100 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл добавили 1900 мкл метанола. Полученный раствор с концентрацией 50 нг/мкл использовали в работе;
- 3) *Андростанол*. На аналитических весах взвесили 2 мг 5 α -андростан-3 β -ола и растворили в 2000 мкл метанола. К 600 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл добавили 1400 мкл метанола. Полученный раствор с концентрацией 300 нг/мкл использовали в работе;
- 4) *Дериватизирующий реактив на основе МСТФА*. На аналитических весах взвесили по 2 мг иодида аммония и дитиотреитола и растворили в 1000 мкл МСТФА. Приготовленный раствор использовали для получения триметилсилильных производных;

- 5) *Реактив Жирара “Т”*. На аналитических весах взвесили 1 г реактива Жирара “Т”, после чего добавили 18 мл метанола и 2 мл “ледяной” уксусной кислоты. Приготовленный раствор использовали в работе;
- 6) *Тестовая смесь стероидов №1 для ВЭЖХ*. Растворы исследуемых соединений готовили в метаноле с концентрацией 1 мг/мл, после чего в емкости подходящего объема смешали эти растворы в соответствии с таблицей 11, добавили 300 мкл метанола и 1200 мкл деионизированной воды. Полученный раствор (3 мл) использовали в работе.

Таблица 11 — Объемы растворов стероидов для приготовления тестовой смеси для ВЭЖХ

<i>Вещество</i>	<i>Объем раствора, мкл</i>
тестостерон	90
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	300
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	300
андростерон	150
этиохоланолон	150
5 β -прегнан-3 α ,20 α -диол	400
16(5 α)-андростен-3 α -ол	50
дегидропрегненолона ацетат	60

- 7) *Тестовая смесь стероидов №2 для ВЭЖХ*. В емкости подходящего объема смешали метанольные растворы (1 мг/мл) тестостерона ацетата (50 мкл) и дегидропрегненолона ацетата (150 мкл), после чего добавили 1600 мкл метанола и 1200 мкл воды. Полученный раствор (3 мл) использовали в работе;
- 8) *Тестовая смесь стероидов №3 для ВЭЖХ*. К метанольным растворам (1 мг/мл) 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола диацетата (640 мкл) и дегидропрегненолона ацетата (60 мкл) добавили 1100 мкл метанола и 1200 мкл воды. Полученный раствор (3 мл) использовали в работе;
- 9) *Тестовая смесь стероидов для ГХ*. В емкости подходящего объема смешали метанольные растворы исследуемых соединений с концентрацией 1 мг/мл в соответствии с таблицей 12 и добавили 280 мкл метанола. Полученный раствор (1 мл) использовали в работе.

Таблица 12 — Объемы растворов стероидов для приготовления тестовой смеси для газовой хроматографии

<i>Вещество</i>	<i>Объем раствора, мкл</i>
тестостерон	100
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	100
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	100
андростерон	100
этиохоланолон	100
прегнандиол	100
16(5 α)-андростен-3 α -ол	60
5 α -андростан-3 β -ол	60

10) *Фосфатный буфер*. На технических весах взвесили 43 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 54 г KH_2PO_4 и 0.8 г NaN_3 , перенесли в мерную колбу, довели объем деионизированной водой до 800 мл и измерили pH (~ 6.2–6.4);

11) *Карбонатный буфер*. На технических весах взвесили по 60 г K_2CO_3 и KHCO_3 , перенесли в мерную колбу, довели объем деионизированной водой до 800 мл и измерили pH (~ 10.0–10.2);

2.4.2. Твердофазная и жидкостно–жидкостная экстракция

Степень извлечения исследуемых веществ при ЖЖЭ из водного (модельного) раствора вычисляли на основании данных трех параллельных определений (двукратная экстракция 5 мл эфира).

В качестве промывных жидкостей (объем 4 мл) на стадии ТФЭ рассматривали воду и смеси на ее основе: одна содержала 10% метанола, вторая – 20% (3 параллельных опыта для каждой). Выбрав промывную жидкость, искали оптимальный объем для промывки. В качестве вариантов рассматривали 2, 4 и 6 мл.

В качестве элюентов (объем 4 мл) на стадии ТФЭ рассматривали метанол, смесь, содержащую 10% воды и 90% метанола, ацетонитрил и МТБЭ (3 параллельных опыта для каждой). Выбрав элюент, искали оптимальный объем для десорбции исследуемых стероидов. В качестве вариантов рассматривали 2, 4 и 6 мл.

Во всех случаях образцы анализировали методом *ГХ–МС* после получения триметилсилильных (*ТМС*) производных.

2.4.3. Фракционирование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Полупрепаративное разделение проб мочи после *ТФЭ* осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent 1100, оборудованном автосамплером и детектором с диодной матрицей. Использовали хроматографическую колонку Waters Sunfire C18 250 мм × 4.6 мм, размер зерна 5.0 мкм с предколонкой Waters Sunfire C18 20 мм × 4.6 мм, размер зерна 5.0 мкм. Для получения воспроизводимых времен удерживания колонку термостатировали при 35°C. Скорость потока элюента составляла 1.0 мл/мин. Детектирование производили при 192 нм и 240 нм. Растворитель «А» – вода “для хроматографии”, растворитель «В» – ацетонитрил.

Для разделения использовали режим градиентного элюирования. Временная задержка между детектором *ЖХ* и коллектором фракций составляла 10 секунд. Фракции собирали во временные интервалы, установленные путем анализа модельных смесей стероидов.

При подборе оптимального объемного соотношения смеси растворителей для перерастворения сухих экстрактов перед *ВЭЖХ*–фракционированием варьировали состав смесей метанол/вода. В качестве вариантов рассматривали смеси метанол/вода, равные 30/70, 50/50, 60/40 и чистый метанол.

2.4.4. Дериватизация

ТМС производные получали в стандартных условиях, используемых в практике допинг–контроля [94]. К высушенному экстракту мочи добавляли 50 мкл дериватирующей смеси и выдерживали 30 мин при 70°C.

Для получения ацетильных производных использовали смесь уксусного ангидрида с пиридином (1:1), варьируя временные рамки процесса в твердотельном нагревателе при трех различных температурах (60°C, 70°C и 80°C) и в микроволновой печи с мощностью 800 Вт.

2.4.5. Взаимодействие с реактивом Жирара

В каждую из 3 пробирок внесли по 10 мкл растворов ДГЭА и 5 α /5 β -диолов с концентрацией 1 мг/мл и упарили досуха. Две из них подвергли взаимодействию с 1 мл раствора реактива Жирара при различной температуре, а в контрольную внесли 1 мл 10% метанольного раствора “ледяной” уксусной кислоты. Далее к реакционной смеси добавили 1 мл раствора карбонатного буфера и экстрагировали целевые соединения 2 \times 5 мл пентана. Экстракты упарили, перерастворили в 100 мкл ацетона и анализировали методом ГХ–МС без стадии дериватизации.

2.4.6. Газохроматографическое определение стероидов

Исследуемые соединения анализировали в нативном виде, в форме ацетатов, а также на начальном этапе работы при подборе условий эксперимента в виде ТМС производных. Оптимизацию температурной программы и идентификацию компонентов проводили на хромато–масс–спектрометре DSQ II.

В случае анализа ТМС производных использовали стандартную процедуру определения анаболических стероидов, используемую в допинг–контроле [94].

ГХ–МС (Agilent MSD 5973):

Для определения концентраций стероидов в моче, а также при подборе условий экстракции целевых соединений, разделение компонентов осуществляли на кварцевой капиллярной колонке J&W HP Ultra–1, 17 м \times 0.20 мм \times 0.11 мкм в режиме программирования температуры. Использовали стандартную методику определения анаболических стероидов в моче [94].

Пробу (в виде раствора в дериватизирующей смеси) объемом 1 мкл вводили микрошприцем *Hamilton* в режиме с делением потока 1:10.

ГХ–МС (Thermo DSQ II):

Разделение компонентов осуществляли на кварцевой капиллярной колонке RTX–35MS, 30 м \times 0.25 мм \times 0.25 мкм с интегрированной предколонкой длиной 5 м (Restek, США) в режиме программирования температуры. В поисках оптимальной температурной программы варьировали начальную температуру колонки (60 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C и 120 $^{\circ}$ C), скорость нагрева и число ступеней температурной

программы. Выбрав подходящие параметры, анализ осуществляли в соответствии с условиями: 120°C (1 мин), нагрев 30°C/мин до 260°C, нагрев 1°C/мин до 280°C (2 мин).

В качестве газа–носителя использовали гелий. На этапе подбора условий анализа варьировали скорость его потока через колонку в пределах от 1 до 2 мл/мин, после чего установили на значении 1.7 мл/мин. Температура инжектора составляла 250°C, ввод пробы осуществляли в режиме без деления потока в течение 1 мин, затем вентиль сброса открывали, создавая поток 50 мл/мин. Температура ГХ–МС интерфейса составляла 300°C.

Пробу объемом 0.4 мкл вводили микрошприцем *Hamilton* с длиной иглы 80 мм, причем ввод пробы осуществляли горячей пустой иглой для уменьшения дискриминации высококипящих компонентов пробы. Стероиды в нативном виде растворяли в ацетоне, а ацетаты – в гептане. Перед вводом пробы и после шприц промывали по 8 раз ацетоном.

ГХ–С–ИМС (Thermo Delta V Plus):

Разделение компонентов осуществляли на аналогичной колонке в идентичных условиях, за исключением того, что объем вводимой пробы составлял 2 мкл, скорость потока газа–носителя установили на значении 2 мл/мин, а давление в инжекторе в момент ввода пробы повышали в 2.5 раза на одну минуту для увеличения полноты переноса определяемых веществ в колонку.

2.4.7. Масс–спектрометрическая идентификация стероидов

Энергия электронов составляла 70 эВ, температура ионного источника – 230°C. Катод включали через 8 мин после начала анализа и выключали через 22 мин. Коэффициент усиления на электронном умножителе составлял 3×10^5 , режим сбора данных – полное сканирование в диапазоне m/z 50–410 а.е.м. со скоростью около 5 спектров в секунду. Масс–спектрометр (Thermo DSQ II) периодически калибровали с помощью перфтортрибутиламина в соответствии с рекомендациями производителя.

2.4.8. Условия окислительной конверсии стероидов

Температура окислительного реактора составляла 940°C, температура восстановительного реактора – 600°C. Рабочее давление газов на интерфейсе: гелий – 1.2 бар (соответствует скорости потока через клапан обратной продувки около 3.5 мл/мин), кислород – 0.85 бар (соответствует потоку через окислительный реактор 1 мл/мин), углекислый газ – 0.63 бар (давление углекислого газа подбирали таким образом, чтобы сигнал по m/z 44 на втором коллекторе составлял 2.0–2.5 В). Калибровку изотопного состава газа сравнения осуществляли относительно кофеина с аттестованным изотопным составом ($\delta^{13}\text{C} = -27.771\%$) раз в три месяца.

Регенерацию окислительного реактора проводили перед началом каждой серии анализа пропуская через него кислород в течение 15 мин. Кроме этого, в начале каждого анализа в режиме обратной продувки в систему подавали двухсекундный импульс кислорода, далее следовали 7 импульсов газа сравнения длительностью 20 с вплоть до 450 с, когда поток из хроматографа начинал поступать в масс-спектрометр (переключение в прямой режим). После этого, в аналитическую систему в разное время подавали 5 импульсов газа сравнения вплоть до окончания анализа на 1600 с. Последние 5 импульсов газа сравнения использовали для определения изотопного состава исследуемых соединений.

2.4.9. Масс-спектрометрическое определение продукта конверсии

Ионный источник изотопного масс-спектрометра нагревался под действием излучения двух галогеновых ламп, а катод был включен постоянно. Энергия электронов составляла 120 эВ, ускоряющее напряжение – 3 кВ. Регистрацию ионного тока осуществляли в непрерывном режиме по трем m/z – 44, 45 и 46.

Перед началом каждой серии анализов проводили тест внутренней точности масс-спектрометра путем напуска в ионный источник 10 импульсов газа сравнения длительностью 20 с каждый с интервалом в 30 с между ними. В соответствии с рекомендациями производителя, среднеквадратичное отклонение измеренных значений $\delta^{13}\text{C}$ не должно превышать 0.06%. Линейность масс-спектрометра в определяемом диапазоне аналитического сигнала (1–6 В) проверяли раз в три месяца. Путем подстройки параметров ионного источника добивались, чтобы линейность в указанном диапазоне была не хуже, чем $\pm 0.1\%/V$.

2.9.10. Пробоподготовка прогормональных препаратов

Навески массой 10 мг, содержащие вещество из капсулы, растворяли в 1 мл метанола под действием ультразвука в течение 10 мин. Далее, к 50 мкл экстракта препаратов №2–6 добавляли 10 мкл метанольного раствора маркера времени удерживания, содержащего 50 нг/мкл ацетата дегидропрегненолона, и 40 мкл воды. Полученную смесь вводили в жидкостный хроматограф (длина волны 197 нм) и собирали фракции, содержащие соответствующие стероиды. Полученные фракции разделяли на две части, и одну из частей упаривали досуха и ацетилировали 100 мкл смеси пиридина с уксусным ангидридом (50:50) при 80°C в течение 2 часов, далее образцы упаривали, перерастворяли в 60 мкл метанольного раствора маркера времени и 40 мкл воды, после чего подвергали ВЭЖХ–фракционированию (при длине волны 197 нм для №2–4 и №6, при длине волны 240 нм для №5) и собирали фракции, содержащие ацетаты стероидов. Далее фракции, как прошедшие, так и не прошедшие стадию дериватизации, упаривали досуха и к сухому остатку добавляли раствор пентакозана в гептане (100 нг/мкл) в количестве, равном 1/10 от конечного объема фракции, рассчитанного по данным ВЭЖХ, и 9/10 объема чистого гептана. ВЭЖХ–фракционирование наряду с очисткой и концентрированием пробы позволяло оценить концентрацию целевого аналита, на основании чего образец перерастворяли в таком объеме раствора внутреннего стандарта и растворителя, чтобы концентрация аналита составляла 50–100 нг/мкл. Полученные образцы анализировали методами ГХ–МС и ГХ–С–ИМС.

Масляное содержимое капсулы препарата №1 растворяли в 4 мл *n*-гексана под действием ультразвука в течение 10 мин. К 40 мкл полученного раствора добавляли 780 мкл этилацетата, 160 мкл метанола и 40 мкл концентрированной серной кислоты и подвергали кислотному гидролизу в течение ночи при 57°C [95]. После охлаждения гидролизат нейтрализовали 3 М карбонатным буферным раствором (рН 10), добавили 5 мл диэтилового эфира и экстрагировали на автоматическом встряхивателе в течение 10 мин. После центрифугирования и вымораживания водного слоя при минус 30°C извлеченный эфирный экстракт упаривали при 60°C и растворяли сухой остаток в 60 мкл метанольного раствора маркера времени и 40 мкл воды. Экстракт вводили в жидкостный хроматограф (длина волны 197 нм) и собирали фракцию, содержащую тестостерон. Затем

полученную фракцию разделяли на две части и одну из частей ацетилювали при 80°C в течение 2 часов, после чего смесь упаривали досуха, перерастворяли в 60 мкл метанольного раствора маркера времени и 40 мкл воды, подвергали вторичному ВЭЖХ-фракционированию (при длине волны 240 нм) и собирали фракцию, соответствующую ацетату тестостерона. Далее фракции тестостерона, как в свободном виде, так и в форме ацетата, упаривали досуха и перерастворяли в растворе пентакозана в гептане (100 нг/мкл) в количестве, равном 1/10 от конечного объема фракции, рассчитанного по данным ВЭЖХ, и 9/10 объема чистого гептана. Полученные образцы анализировали методами ГХ-МС и ГХ-С-ИМС.

2.4.11. Подготовка образцов мочи к анализу

Аликвоту мочи (10–20 мл) подвергали твердофазной экстракции на предварительно активированном картридже (кондиционирование – 5 мл CH₃OH, 5 мл H₂O) с использованием вакуумного манифолда. После того, как аликвота прошла через картридж, его промывали 5 мл деионизированной воды с последующей десорбцией целевых компонентов пробы при помощи метанола (3 мл). Элюат упаривали в вакуумном испарителе при 50°C и давлении 50–100 мбар в течение 30 мин, к сухому остатку добавляли 1 мл фосфатного буфера и 5 мл диэтилового эфира, встряхивали смесь в течение 5 мин, центрифугировали и органический слой выбрасывали.

К водной фазе добавляли 100 мкл раствора β-глюкуронидазы и помещали в термостат на 1 час при 57°C для ферментативного гидролиза. После охлаждения к добавляли 1 мл карбонатного буфера и 5 мл диэтилового эфира, встряхивали смесь в течение 5 мин, центрифугировали 4 мин при 3000 об/мин, отделяли органический слой и упаривали экстракт при 60°C. К сухому остатку добавляли 60 мкл раствора дегидропрегненолона ацетата в метаноле (50 нг/мкл) и 40 мкл деионизированной воды и переносили содержимое в пластиковый виал со вставкой уменьшенного объема.

В жидкостный хроматограф вводили 90 мкл *тестовой смеси стероидов №1* для ВЭЖХ и проверяли соответствие полученных времен удерживания компонентов смеси ожидаемым значениям в пределах ± 0.1 мин. Если времена

удерживания не выходили за допустимые границы, то 90 мкл приготовленного экстракта пробы вводили в прибор и при помощи коллектора фракций собирали 5 фракций (1 – Т, 2 – 5 α /5 β -диолы, 3 – А и Э, 4 – ПД, 5 – 16-ен) в ранее установленные интервалы времени.

К фракциям 3, 4 и 5 добавляли раствор андростанола в метаноле (300 нг/мкл) в количестве, равном 1/10 от конечного объема фракции, рассчитанного по формуле (3):

$$V_{\text{фр}} = (C_{\text{м}} \cdot V_{\text{м}} \cdot k) / 50 \quad (3),$$

где $C_{\text{м}}$ – концентрация стероида в моче (нг/мл)¹, $V_{\text{м}}$ – объем мочи, взятый для анализа (мл), а k – “коэффициент переноса”², отражающий потери целевых соединений при пробоподготовке. Далее содержимое фракций упаривали в вакуумном испарителе при 50°C и давлении 50–100 мбар в течение около 40 мин.

После охлаждения к сухому остатку в каждую из пробирок (5 фракций плюс *тестовая смесь стероидов для ГХ*) добавляли 50 мкл пиридина и 50 мкл уксусного ангидрида, выдерживали 2 часа при 80°C в твердотельном нагревателе. Реакционную смесь упаривали в вакуумном испарителе при 50°C и давлении 50–100 мбар в течение 30 мин. К сухому остатку ацетилированных фракций № 1 и 2 добавляли 60 мкл раствора дегидропрегненолона ацетата в метаноле (50 нг/мкл) и 40 мкл воды и подвергали вторичному ВЭЖХ фракционированию. При проведении исследований по метаболизму в случае препаратов №4 и №6 дополнительной ВЭЖХ-очистке подвергали также фракцию III, содержащую андростерон и этиохоланолон.

К сухому остатку всех фракций добавляли гептан в количестве 9/10 от рассчитанного объема фракции и раствор пентакозана в гептане (100 нг/мкл) до конечного объема, после чего переносили в стеклянные виалы со вставкой уменьшенного объема и анализировали методами ГХ-МС/ГХ-С-ИМС. Блок-схема пробоподготовки представлена на рисунке 27.

¹ Предварительно определенная по стандартной методике количественного анализа эндогенных стероидов;

² $k = 0.8$ для Т, 5 α -диола, 5 β -диола, А, Э, $k = 0.6$ для ПД и 16-ен.

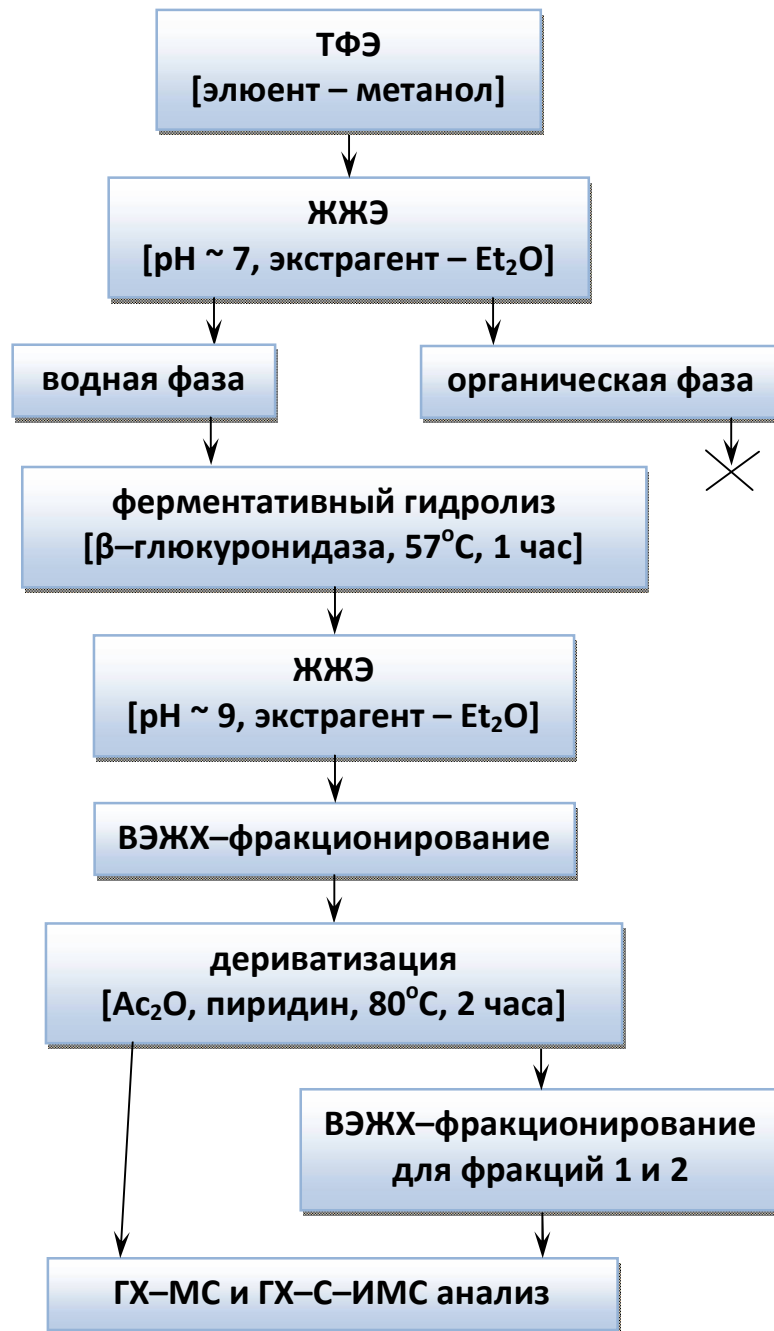


Рисунок 27 — Принципиальная схема пробоподготовки

Глава 3. Пробоподготовка образцов мочи

3.1. Подбор условий жидкостно–жидкостной и твердофазной экстракции

В литературе отсутствуют данные по изучению условий извлечения целевых стероидов из мочи методами *ЖЖЭ* и *ТФЭ*. По этой причине проведена серия экспериментов для поиска оптимальных условий *ТФЭ* и определения степени извлечения при *ЖЖЭ*. В этом случае анализ получаемых образцов осуществляли методом *ГХ–МС* в виде триметилсилильных производных по стандартной процедуре, используемой в нашей практике допинг–контроля [94].

1) 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 случае анализа на синтетические аналоги эндогенных стероидов, влияющих на изотопное соотношение тестостерона и его метаболитов, отказались. Степени извлечения целевых соединений и эндогенных маркеров приведены ниже в таблице 13.

Таблица 13 — Найденные степени извлечения целевых соединений при однократной *ЖЖЭ*

Соединение	Степень извлечения, %
тестостерон	94±5
5α–андростандиол	92±5
5β–андростандиол	91±5
андростерон	95±4
этиохоланолон	92±6
прегнандиол	94±2
андростенол	96±5

2) Выбор промывной жидкости

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. Экспериментальные данные представлены ниже в виде диаграммы на рисунке 28.

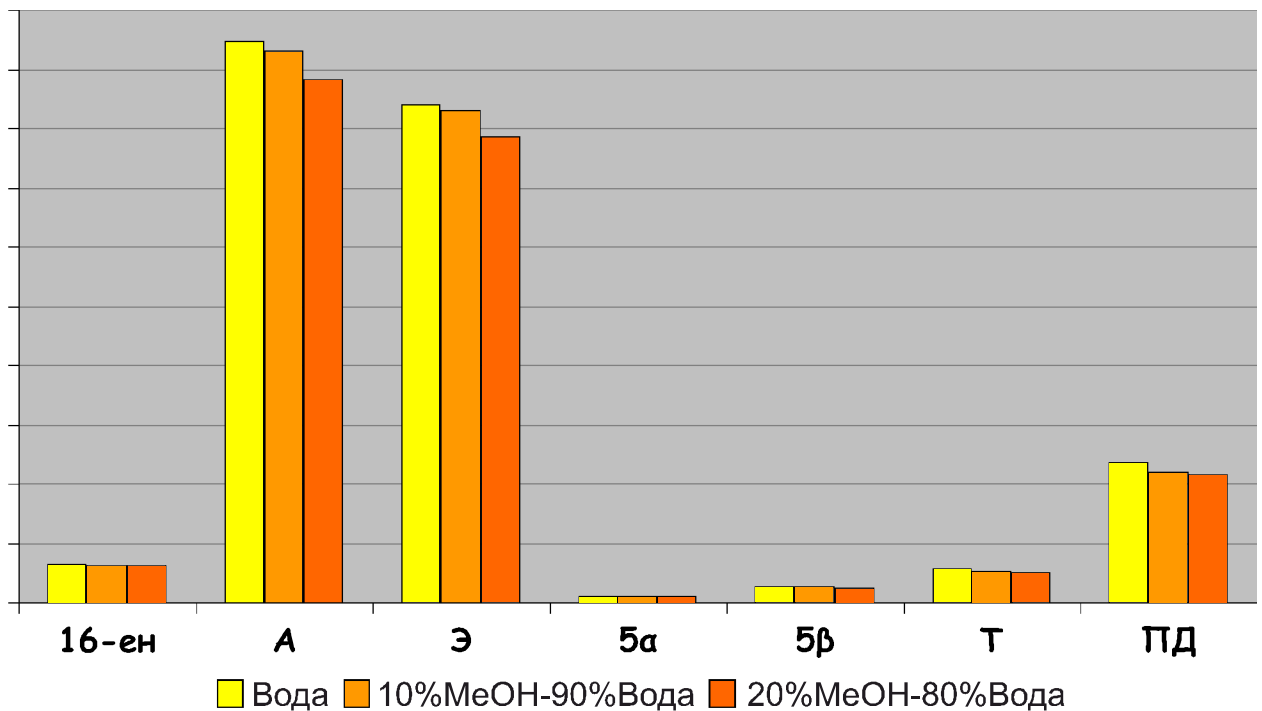


Рисунок 28 — Относительное содержание целевых соединений в реальном образце при использовании различных промывных жидкостей

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.

3) 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 вials 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. Экспериментальные данные представлены ниже в виде диаграммы на рисунке 29.

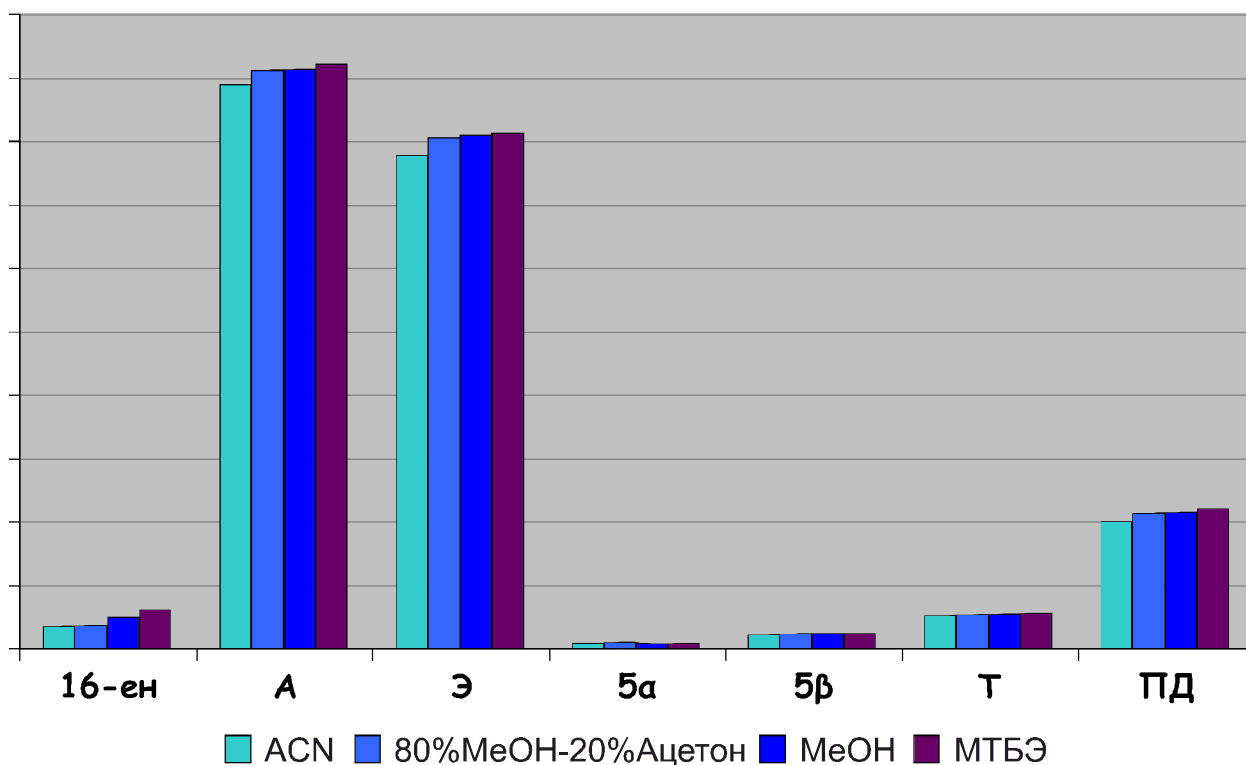


Рисунок 29 — Относительное содержание целевых соединений в реальном образце при использовании различных элюентов

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.

3.2. Выбор условий разделения методом жидкостной хроматографии

Целевые соединения содержатся в объекте анализа как в очень низких (как у *T* и *5 α -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. Учитывая, что на данной стадии в жидкостный хроматограф вводили большой объем пробы (90 мкл), использовали колонку с высокой перегрузочной способностью (то есть большим количеством сорбента) для получения стабильных времен удерживания и достаточной эффективности разделения. Указанным требованиям удовлетворяла колонка размером 250 мм × 4.6 мм.

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.

В первой серии экспериментов обнаружили, что при вводе в *ЖХ* 90 мкл раствора при использовании чистого метанола в качестве растворителя происходит размывание переднего фронта пиков тестостерона и андростандиолов ввиду

высокой элюирующей способности метанола в условиях *ОФ ВЭЖХ* (при объеме пробы менее 50 мкл размывания не происходило, однако столь малый объем не позволяет количественно перерастворить экстракт после *ТФЭ*). По этой причине перерастворение экстрактов производили смесью метанола с водой. Так как целевые стероиды нерастворимы в воде, использование элюента, содержащего 70% воды, неприемлемо. При подборе оптимального состава смеси растворителей наилучшие результаты получены в случае объемного соотношения метанол/вода = 60/40.

Выбранные в ходе экспериментов условия градиентного элюирования приведены в таблице 14. В данных условиях осуществляли первичное *ВЭЖХ*-фракционирование при анализе на синтетические аналоги эндогенных стероидов, влияющих на изотопное соотношение тестостерона и его метаболитов (рисунок 30). Для контроля стабильности времен удерживания в модельную смесь и каждую пробу добавляли ацетат дегидропрегненолона (так называемый маркер времени). Выбор этого соединения обусловлен тем, что оно является экзогенным, а также имеет время удерживания, заметно отличающееся от времени удерживания остальных компонентов пробы.

Таблица 14 — Условия градиентного элюирования для первичного фракционирования

<i>Метод № 1</i>		
<i>Время, мин</i>	<i>A, %</i>	<i>B, %</i>
0	70	30
20	0	100
30	0	100
35	70	30
40	70	30

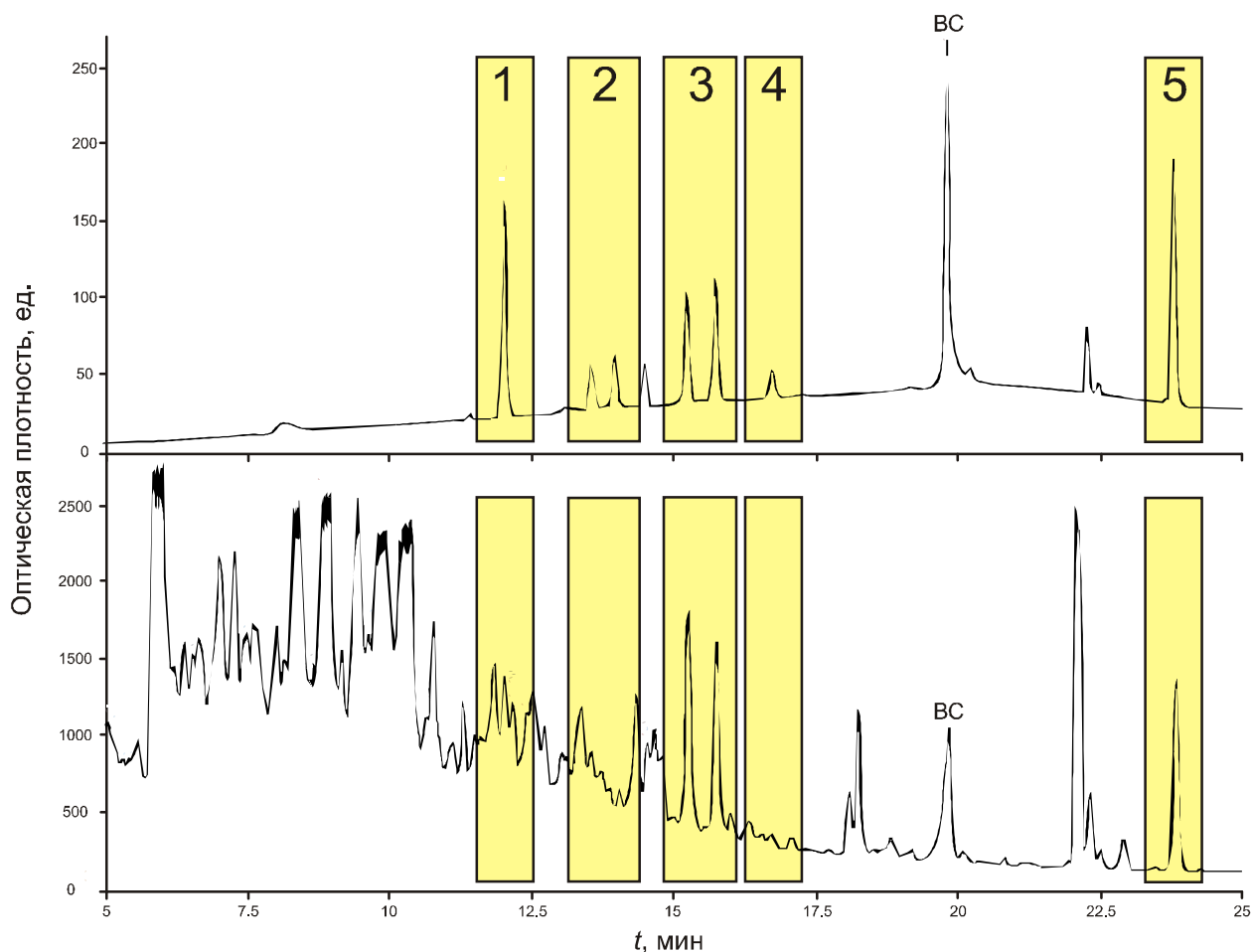


Рисунок 30 — Хроматограммы, соответствующие *ВЭЖХ* разделению тестовой смеси стероидов и реального объекта. Выделенные зоны отвечают временным интервалам сбора фракций: 1 – *T*, 2 – $5\alpha/5\beta$ -диолы, 3 – *A/Э*, 4 – *ПД*, 5 – *16-ен*.

BC – маркер времени (ацетат дегидропрегненолона)

Нами были также изучены хроматографические свойства ацетата тестостерона и диацетатов $5\alpha/5\beta$ -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 (таблица 14), но детектировать при длине волны 240 нм. В случае ацетатов $5\alpha/5\beta$ -андростандиолов следует применить более плавный градиент, начинающийся с 70% ацетонитрила, так как в противном случае существенно увеличиваются значения времен удерживания (таблица 15).

Таблица 15 — Условия градиентного элюирования для выделения диацетатов андростандиолов

<i>Метод № 2</i>		
<i>Время, мин</i>	<i>A, %</i>	<i>B, %</i>
0	30	70
33	0	100
38	0	100
43	30	70
48	30	70

В таблице 16 представлены данные по временным интервалам сбора фракций при первичном и вторичном ВЭЖХ-фракционировании при анализе на синтетические аналоги эндогенных стероидов, влияющих на изотопный состав тестостерона и его метаболитов.

Таблица 16 — Временные интервалы сбора фракций при первичном и вторичном ВЭЖХ-фракционировании

<i>Способ разделения</i>	<i>Условия</i>	<i>Компоненты фракции</i>	<i>Интервал сбора фракции, мин</i>
Первичное разделение	Метод №1, 197 нм	тестостерон	11.60–12.60
		5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	13.20–14.50
		5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	
		этиохоланолон	14.80–16.30
		андростерон	
		прегнандиол	16.35–17.35
16(5 α)-андростен-3 α -ол	23.40–24.40		
Очистка фракции №1	Метод №1, 240 нм	тестостерона ацетат	9.50–10.50
Очистка фракции №2	Метод №2, 192 нм	5 α -андростан-3 α ,17 β -диола диацетат	21.60–23.60
		5 β -андростан-3 α ,17 β -диола диацетат	

3.3. Использование реактива Жирара

На начальном этапе работы вместо повторного ВЭЖХ-фракционирования для дополнительной очистки фракции, содержащей 5 α /5 β -андростандиолы, использовали реактив Жирара (2-гидразино-N,N,N-триметил-2-оксо-этиламин хлорид). Из литературных источников [80,81] известно, что реактив Жирара ранее

применяли для селективного удаления кетостероидов, которые образуют с ним водорастворимые продукты. Однако, условия проведения этой реакции различались от источника к источнику. Наши эксперименты показали, что взаимодействие пробы мочи (фракции, содержащей андростандиолы) с раствором реактива Жирара при 60°C в течение 30 мин обеспечивает полное удаление кетостероидов, имеющих близкое с андростандиолами время удерживания. Экспериментальные данные, полученные при анализе реальной пробы, представлены на рисунке 31 (в данном случае мешающий компонент – ДГЭА с $t_R = 13.47$ мин). Стероиды анализировали в нативном виде.

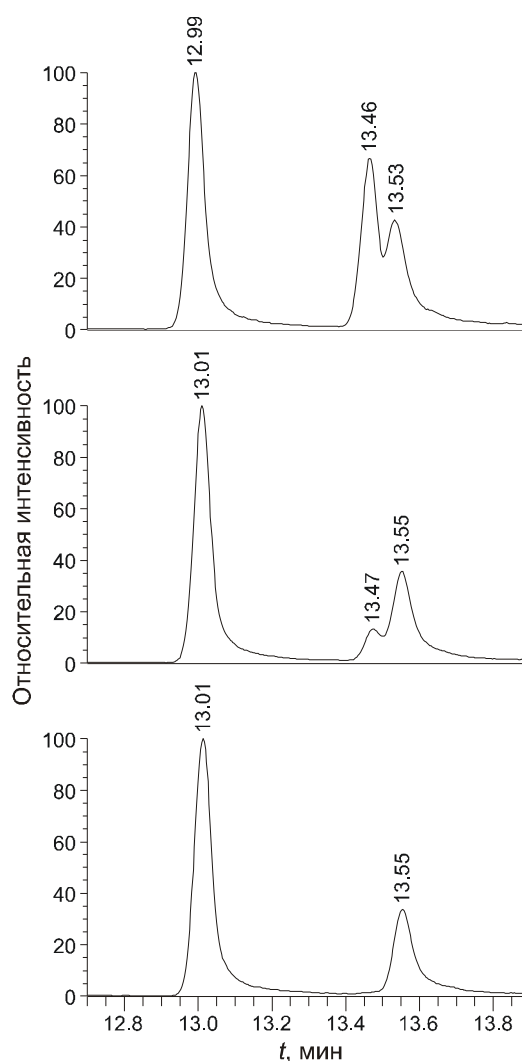


Рисунок 31 — Масс-хроматограммы по ионам с m/z 215 и 288, соответствующим

5α -диолу ($t_R=13.55$ мин), 5β -диолу ($t_R=13.01$ мин) и ДГЭА ($t_R=13.47$ мин):

1 – контрольная проба, 2 – взаимодействие при 20°C в течение 30 мин, 3 – при 60°C в течение 30 мин

Важно отметить, что в некоторых ситуациях необходимо определять также и изотопный состав кетостероидов (*E*, *ДГЭА*), которые на стадии первичного *ВЭЖХ*-разделения попадают в одну фракцию с диолами. Кроме того, при анализе серии реальных образцов обнаружено, что в ряде случаев в силу особенностей гормонального фона человека в диольной фракции в заметном количестве содержатся эндогенные андростендиолы, которые данным реактивом не удаляются, а на стадии *ГХ* разделения мешают определению целевых андростандиолов. По этой причине от дальнейшего использования реактива Жирара отказались в пользу повторного *ВЭЖХ*-фракционирования.

3.4. Дериватизация

Ранее упоминалось, что эфиры трифторуксусной кислоты, как и триметилсилильные производные, отравляют окислительный реактор, поэтому не подходят для изотопной хромато-масс-спектрометрии. Анализ целевых соединений в форме ацетильных производных не несет никакого вреда системе. По этой причине в качестве дериватирующего агента использовали уксусный ангидрид. На рисунке 32 приведена схема реакции ацетилирования тестостерона.

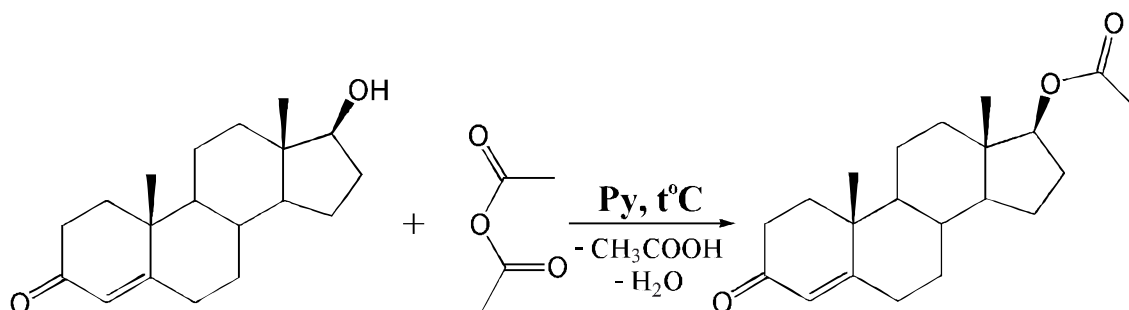


Рисунок 32 — Взаимодействие тестостерона с уксусным ангидридом

Целью оптимизации условий дериватизации являлось получение ацетатов стероидов с максимальным выходом за минимальное время. Поскольку в литературе описано множество протоколов ацетилирования 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 таблице 17 приведены полученные данные для андростанола.

Таблица 17 — Выход реакции ацетилирования андростанола в зависимости от условий протекания процесса

<i>Условия</i>	<i>Полнота протекания</i>
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 таблицы 17, дериватизация при 80°C в течение 120 мин и под действием микроволнового излучения дает наилучший выход ацетильных производных. Однако, дериватизация при 80°C в течение 120 мин является более предпочтительным вариантом, так как воспроизводимость значений $\delta^{13}\text{C}$ при использовании твердотельного нагревателя лучше.

Поскольку ацетилирование приводит к изменению изотопного состава исследуемых соединений за счет добавления в молекулу 2 или 4 атомов углерода из уксусного ангидрида, необходимо оценить величину этого вклада. Для этого методом *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 (δ_{YA}), которое составило минус 55‰ (усредненное значение). При анализе реальных проб делали обратный расчет, используя ту же формулу (4):

$$\delta_{\text{HC}} = \frac{n_{\text{C}_{\text{AC}}} \cdot \delta_{\text{AC}} - n_{\text{C}_{\text{YA}}} \cdot \delta_{\text{YA}}}{n_{\text{C}_{\text{HC}}}} \quad (4),$$

где:

δ_{HC} — значение $\delta^{13}\text{C}$ нативного стероида (расчетное);

δ_{AC} — значение $\delta^{13}\text{C}$ ацетата стероида (измеренное);

δ_{YA} — значение $\delta^{13}\text{C}$ уксусного ангидрида (расчетное);

$n_{\text{C}_{\text{AC}}}$ — число атомов углерода в молекуле ацетата стероида;

$n_{\text{C}_{\text{HC}}}$ — число атомов углерода в молекуле исходного стероида;

$n_{\text{C}_{\text{YA}}}$ — число атомов углерода, добавляемых к молекуле исходного стероида при дериватизации.

Глава 4. Инструментальный анализ экстрактов

4.1. 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 -диолы*, *A/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 рисунках 33–38 приведены хроматограммы тестовой смеси для *ГХ* и соответствующих фракций реальных проб, содержащих тестостерон, его метаболиты, прегнандиол, 16-адростенол (анализ *в форме ацетатов* в системе *ГХ-МС*). Тестовую смесь стероидов использовали для идентификации пиков на хроматограммах проб мочи, а также для проверки состояния хромато-масс-спектрометра.

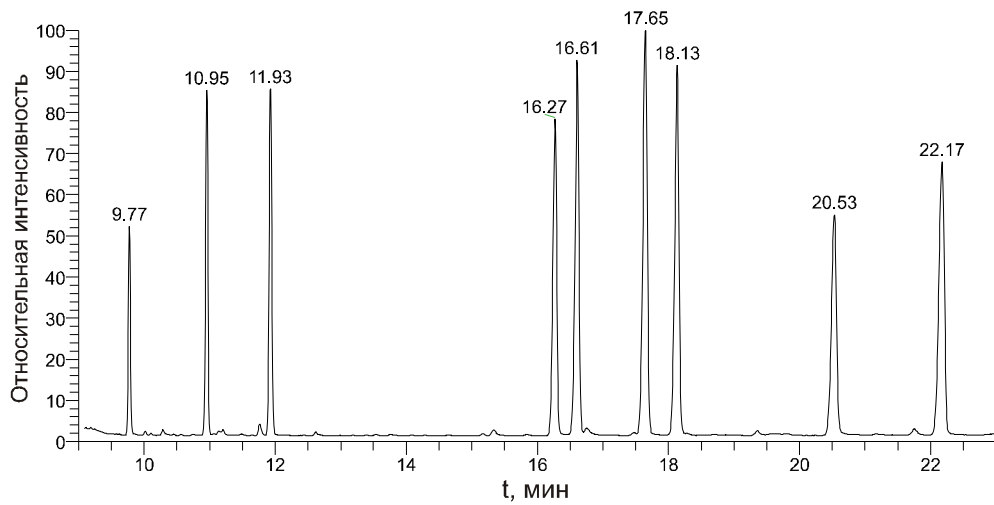


Рисунок 33 — Хроматограмма тестовой смеси стероидов для ГХ (9.77 мин – пентакозан [внутренний стандарт], 10.95 мин – *16-ен*, 11.93 мин – андростанол [внутренний стандарт], 16.27 мин – Э, 16.61 мин – А, 17.65 мин – *5β*-диол, 18.13 мин – *5α*-диол, 20.53 мин – Т, 22.17 мин – ПД) (все в виде ацетатов)

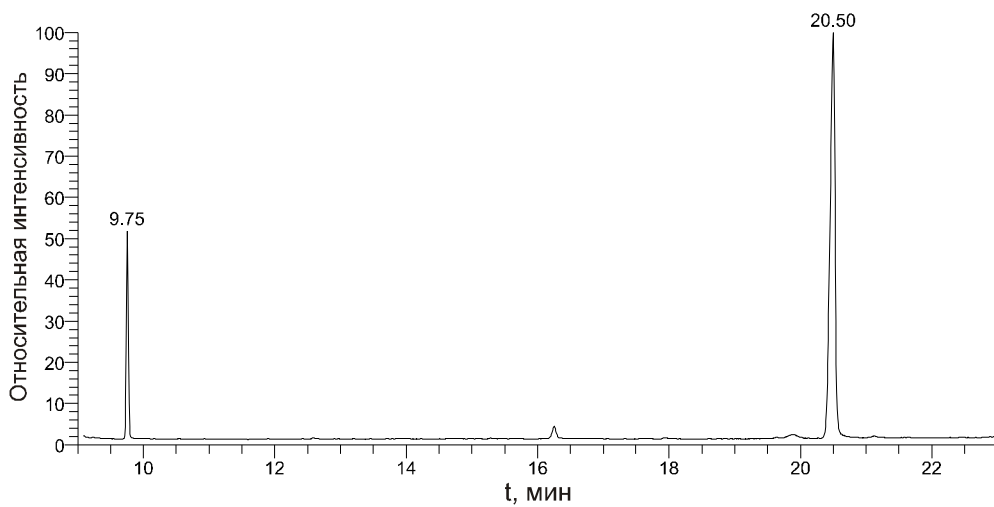


Рисунок 34 — Хроматограмма фракции, содержащей ацетат тестостерона (20.50 мин)

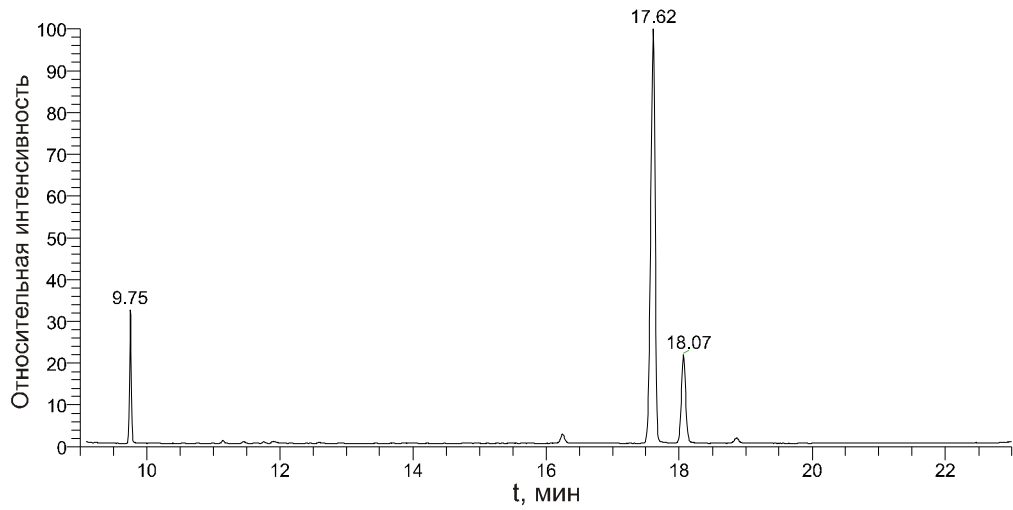


Рисунок 35 — Хроматограмма фракции, содержащей диацетаты $5\beta/5\alpha$ -андростандиолов (17.62 и 18.07 мин, соответственно)

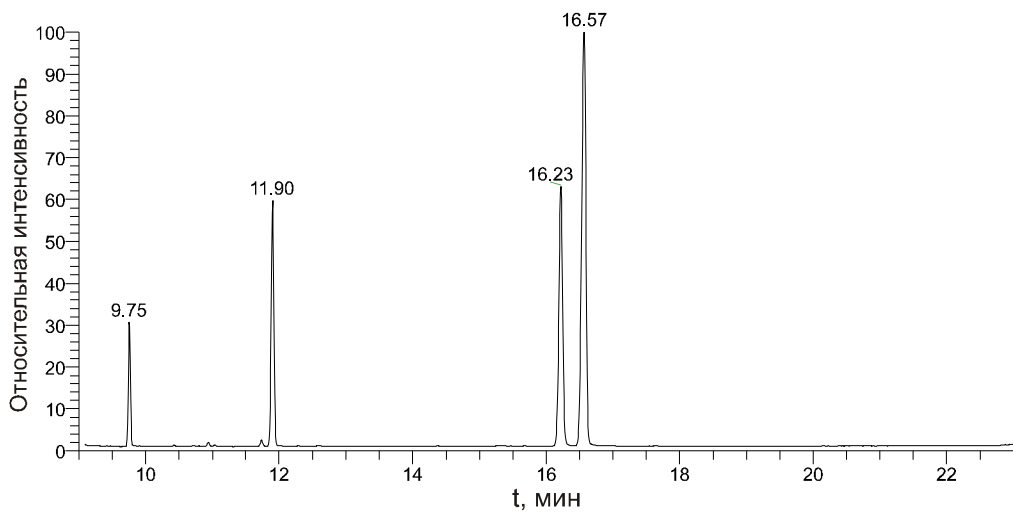


Рисунок 36 — Хроматограмма фракции, содержащей ацетаты этиохоланолона и андростерона (16.23 и 16.57 мин, соответственно)

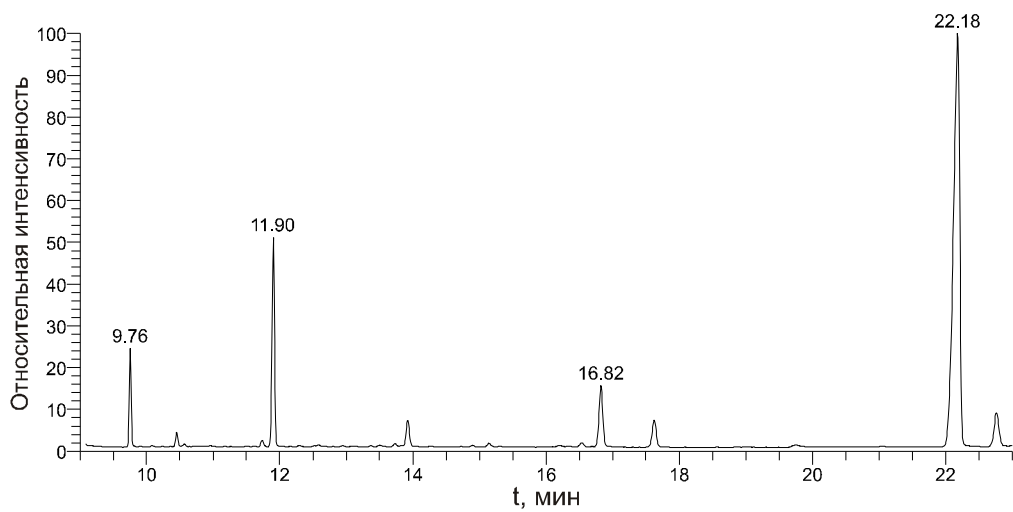


Рисунок 37 — Хроматограмма фракции, содержащей диацетат прегнандиола (22.18 мин)

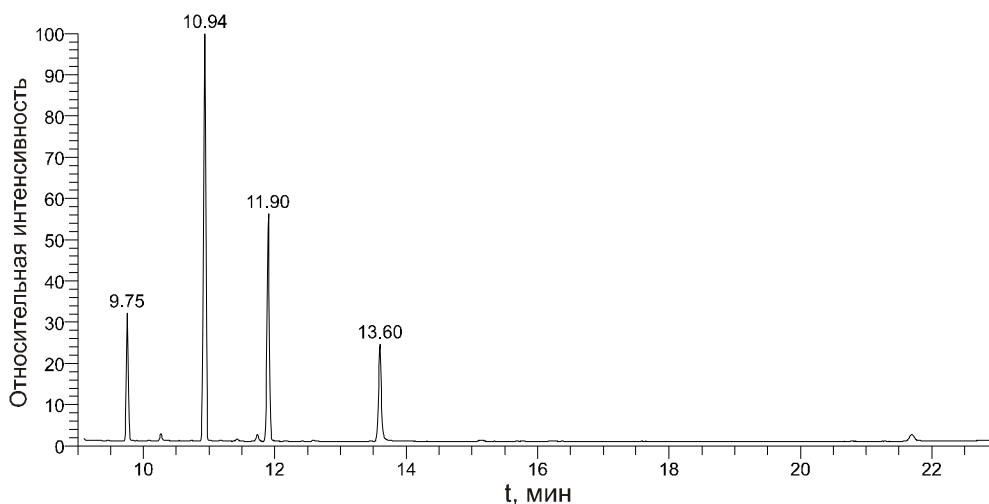


Рисунок 38 — Хроматограмма фракции, содержащей ацетат андростенола (10.94 мин)

В таблице 18 представлены времена удерживания целевых соединений в тестовых смесях и анализируемых пробах с учетом среднеквадратичного отклонения. Идентификация целевых соединений во фракциях анализируемых образцах осуществляется путем сравнения времен удерживания компонентов тестовых смесей и соответствующих фракций (значения времен удерживания должны лежать в указанных доверительных интервалах).

Таблица 18 — Времена удерживания целевых соединений в тестовых смесях и реальных образцах, зарегистрированные в системе ГХ–МС

Соединение	Время удерживания, мин	
	Тестовая смесь	Анализируемая проба
тестостерон (ацетат)	20.53	20.53 ± 0.06
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (диацетат)	18.13	18.13 ± 0.05
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (диацетат)	17.65	17.65 ± 0.05
андростерон (ацетат)	16.61	16.61 ± 0.04
этиохоланолон (ацетат)	16.27	16.27 ± 0.05
прегнандиол (диацетат)	22.18	22.18 ± 0.05
16(5 α)-андростен-3 α -ол (ацетат)	10.94	10.94 ± 0.03

Хроматографический анализ в системе ГХ–С–ИМС имеет несколько особенностей, связанных с конструкцией интерфейса между газовым хроматографом и изотопным масс-спектрометром. Во-первых, большое количество узлов соединения и длинных капилляров приводит к уширению

хроматографических зон, в том числе пика CO_2 , образовавшегося после сжигания компонентов пробы, и увеличению времени удерживания по сравнению с *ГХ–МС*. Для минимизации этого размывания была проведена модификация интерфейса *ГХ–С–ИМС* системы, заключающаяся в замене металлического тройника в термостате *ГХ* на стеклянный коннектор (“прессфит”) и продевании кварцевого капилляра, через который проба поступает в окислительный реактор, непосредственно в реактор. В оригинальной конструкции соединение реализовано через металлический коннектор. Даже после этих изменений ширина пика в *ГХ–С–ИМС* в среднем составляла 25–40 сек в зависимости от вещества и его количества, что накладывало дополнительные требования по эффективности разделения соседних пиков.

Во-вторых, поскольку само соединение масс-спектрометра и интерфейса является открытым делителем потока, почти 80% пробы, введенной в хроматограф, теряется. Это приводит к необходимости вводить в *ГХ–С–ИМС* больший объем пробы по сравнению с *ГХ–МС*. В данной работе объем пробы, вводимый в *ГХ–МС*, составил 1 мкл, а в *ГХ–С–ИМС* – 2 мкл. Для минимизации потерь целевых соединений в испарителе ввод пробы осуществляли, увеличивая в 2.5 раза давление в испарителе на 1 мин после ввода пробы. Это делали только в системе *ГХ–С–ИМС*, поскольку, во-первых, чувствительности обычного *ГХ–МС* было достаточно, а во-вторых, при увеличенном давлении скорость потока через колонку составляла 4 мл/мин, что является опасно большой нагрузкой для турбомолекулярного насоса масс-спектрометра. Для ацетатов стероидов при повышении давления в испарителе увеличение площади хроматографического пика происходило примерно в 2 раза, тогда как для нативных стероидов достигало 9 раз (зависело от полярности и температуры кипения вещества). Учитывая низкие концентрации некоторых целевых соединений в моче, подобные потери недопустимы. Более того, потери вещества могут приводить к изотопному фракционированию и регистрации искаженных значений $\delta^{13}\text{C}$, что также неприемлемо.

4.2. Масс–спектрометрическая идентификация целевых соединений

Поскольку аналитический сигнал в изотопной масс–спектрометрии не несет никакой структурной информации, а по требованиям *ВАДА* в случае анализа положительных образцов необходимо идентифицировать соответствующие хроматографические пики, параллельно с *ГХ–С–ИМС* анализом каждую фракцию пробы исследовали методом *ГХ–МС*. Идентификацию аналитов проводили, сопоставляя времена удерживания и масс–спектры компонентов пробы с временами удерживания и масс–спектрами, зарегистрированными для тестовой смеси ацетатов стероидов.

В ходе работы получены масс–спектры электронной ионизации анализируемых веществ как в нативном виде, так и в виде ацетильных производных. Масс–спектры электронной ионизации ацетильных производных приведены ниже на рисунках 39–46.

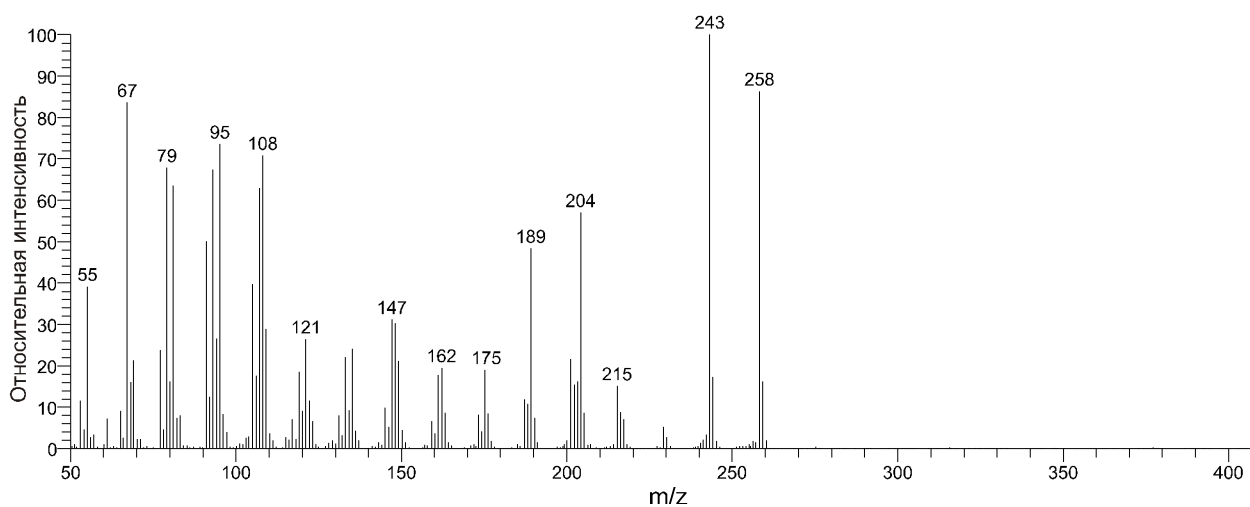


Рисунок 39 — Масс–спектр электронной ионизации (ЭИ) 5α–андростан–3β–ола ацетата (вн. стандарт, ММ 318)

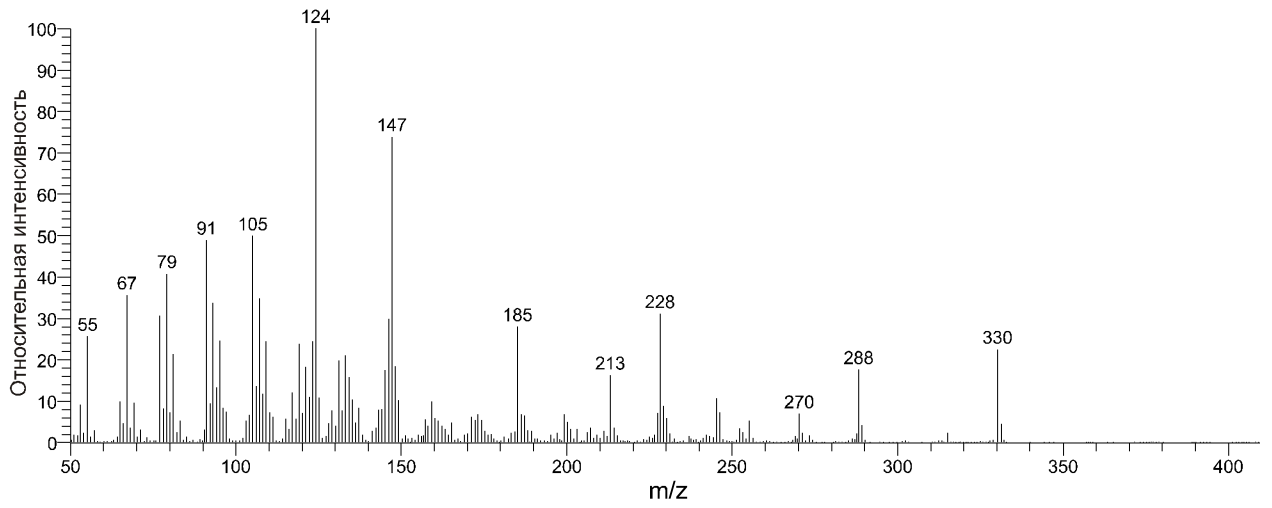


Рисунок 40 — Масс-спектр ЭИ тестостерона ацетата (ММ 330)

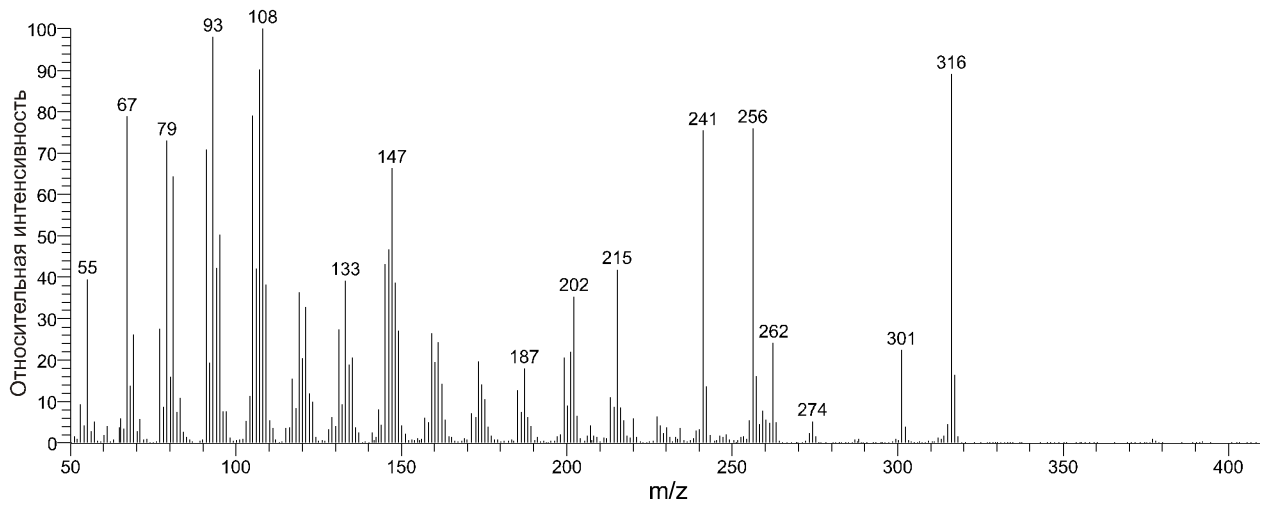


Рисунок 41 — Масс-спектр ЭИ 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола диацетата (ММ 376)

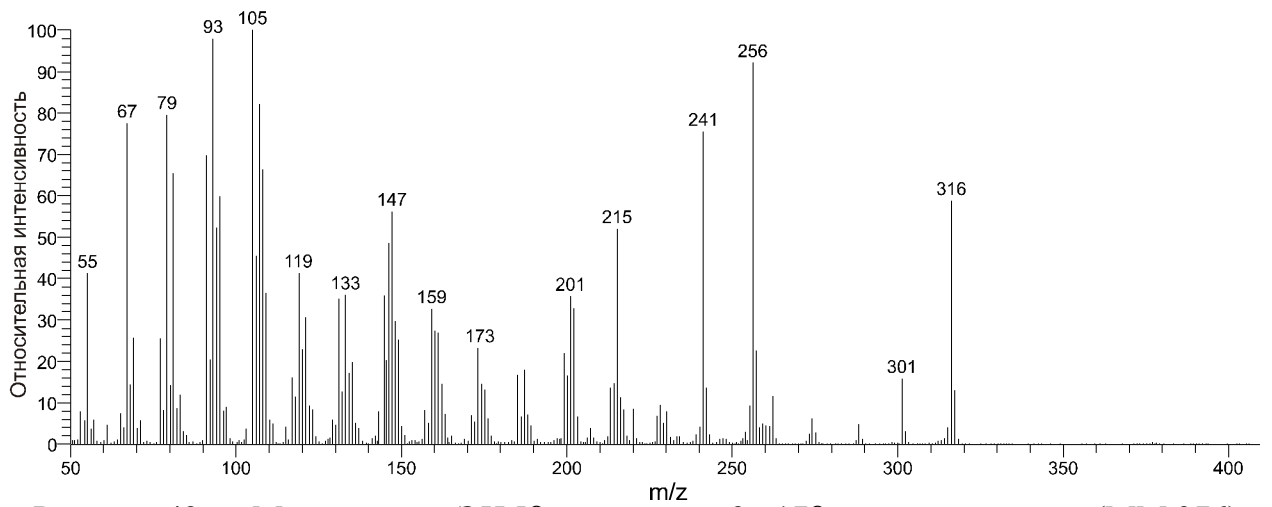


Рисунок 42 — Масс-спектр ЭИ 5 β -андростан-3 α ,17 β -диола диацетата (ММ 376)

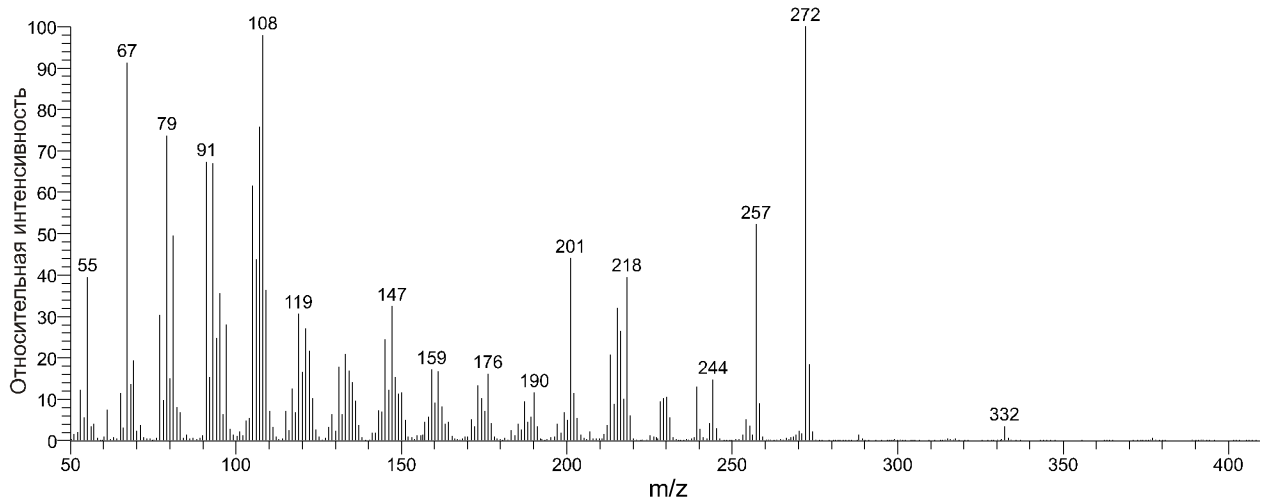


Рисунок 43 — Масс-спектр ЭИ андростерона ацетата (ММ 332)

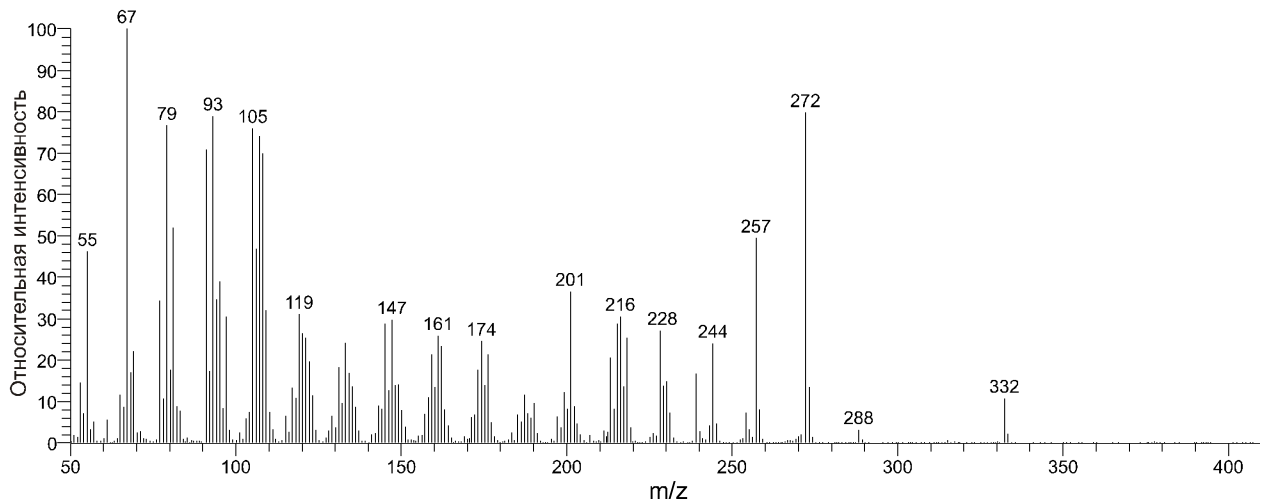


Рисунок 44 — Масс-спектр ЭИ этиохоланолон ацетата (ММ 332)

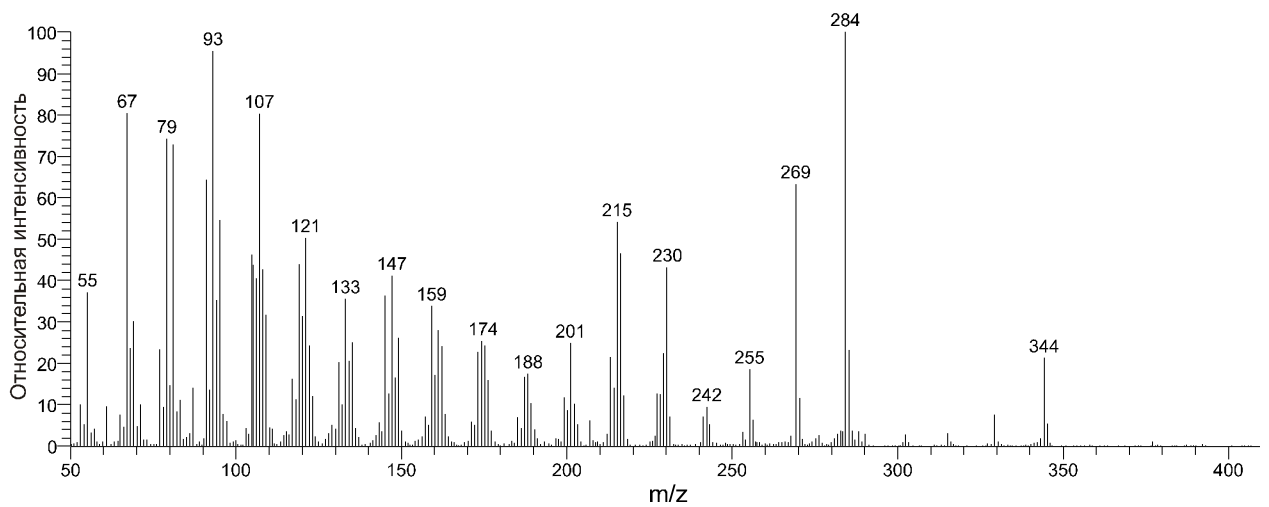


Рисунок 45 — Масс-спектр ЭИ прегнандиола диацетата (ММ 404)

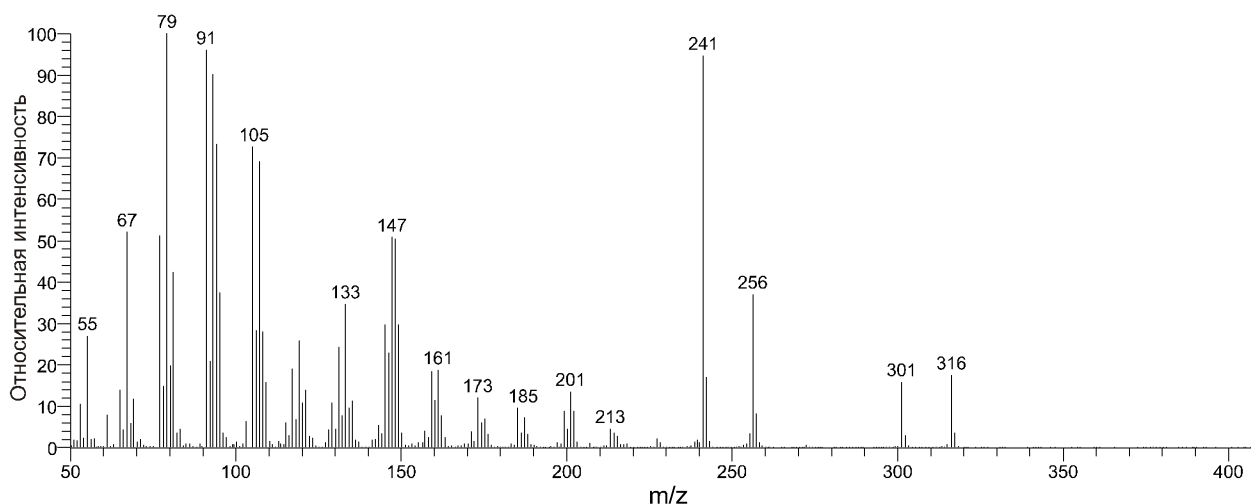


Рисунок 46 — Масс-спектр ЭИ 16(5 α)-андростен-3 α -ола ацетата (ММ 316)

Для того, чтобы идентифицировать каждое соединение, необходимо сравнить масс-спектры пиков в анализируемой пробе и соответствующих по времени удерживания пиков в тестовых смесях и убедиться, что относительные интенсивности выбранных характеристичных ионов (не менее трех) совпадают в допустимых пределах, представленных в таблице 19 [17].

Таблица 19 — Допустимые границы отклонений в интенсивностях характеристичных ионов, зарегистрированных при анализе тестовых смесей и образцов мочи

<i>Относительная интенсивность</i>	<i>Допустимые границы</i>
> 50%	$\pm 10\%$ (абс.)
25 – 50%	$\pm 20\%$ (отн.)
< 25%	$\pm 50\%$ (абс.)

Характеристичные ионы, необходимые для масс-спектрометрической идентификации целевых соединений, приведены в таблице 20.

Таблица 20 — Характеристичные ионы, необходимые для масс-спектрометрической идентификации целевых соединений

Соединение	Характеристичные ионы, <i>m/z</i>		
	№1	№2	№3
тестостерон (ацетат)	124	288	330
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (диацетат)	215	256	316
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (диацетат)	215	256	316
андростерон (ацетат)	257	272	332
этиохоланолон (ацетат)	257	272	332
прегнандиол (диацетат)	269	284	344
16(5 α)-андростен-3 α -ол (ацетат)	241	256	316

4.3. Подбор условий окислительной конверсии стероидов и масс-спектрометрической идентификации продукта конверсии

Поскольку хроматографические условия в *ГХ-МС* и *ГХ-С-ИМС* системах идентичны, то порядок выхода соединений на хроматограммах один и тот же. Однако, времена удерживания в системе *ГХ-С-ИМС* несколько больше из-за особенностей интерфейса. В *ГХ-С-ИМС* времена удерживания традиционно приводятся в секундах.

Идентификацию компонентов каждой фракции образцов мочи осуществляли по временам удерживания, сравнивая полученные значения с временами удерживания соответствующих хроматографических пиков в тестовой смеси (таблица 21).

Таблица 21 — Времена удерживания целевых соединений в тестовых смесях и реальных образцах, зарегистрированные в системе *ГХ-С-ИМС*

Соединение	Время удерживания, с	
	Тестовая смесь	Анализируемая проба
тестостерон (ацетат)	1174	1174 \pm 10
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (диацетат)	1056	1056 \pm 7
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (диацетат)	1034	1034 \pm 7
андростерон (ацетат)	972	972 \pm 6
этиохоланолон (ацетат)	956	956 \pm 6
прегнандиол (диацетат)	1276	1276 \pm 8
16(5 α)-андростен-3 α -ол (ацетат)	690	690 \pm 5

На рисунках 47–52 представлены хроматограммы, полученные в системе ГХ–С–ИМС, для тестовых смесей и фракций образцов мочи. Пики прямоугольной формы соответствуют пульсам референсного газа (CO_2), по изотопному составу которых проводится вычисление $\delta^{13}\text{C}$ целевых соединений. Внешний вид хроматограмм, в частности, отсутствие на них посторонних пиков, свидетельствует о высокой степени очистки фракций образцов мочи от мешающих компонентов в процессе пробоподготовки, что, в свою очередь, обеспечивает достоверность измерений изотопного соотношения целевых соединений методом ГХ–С–ИМС.

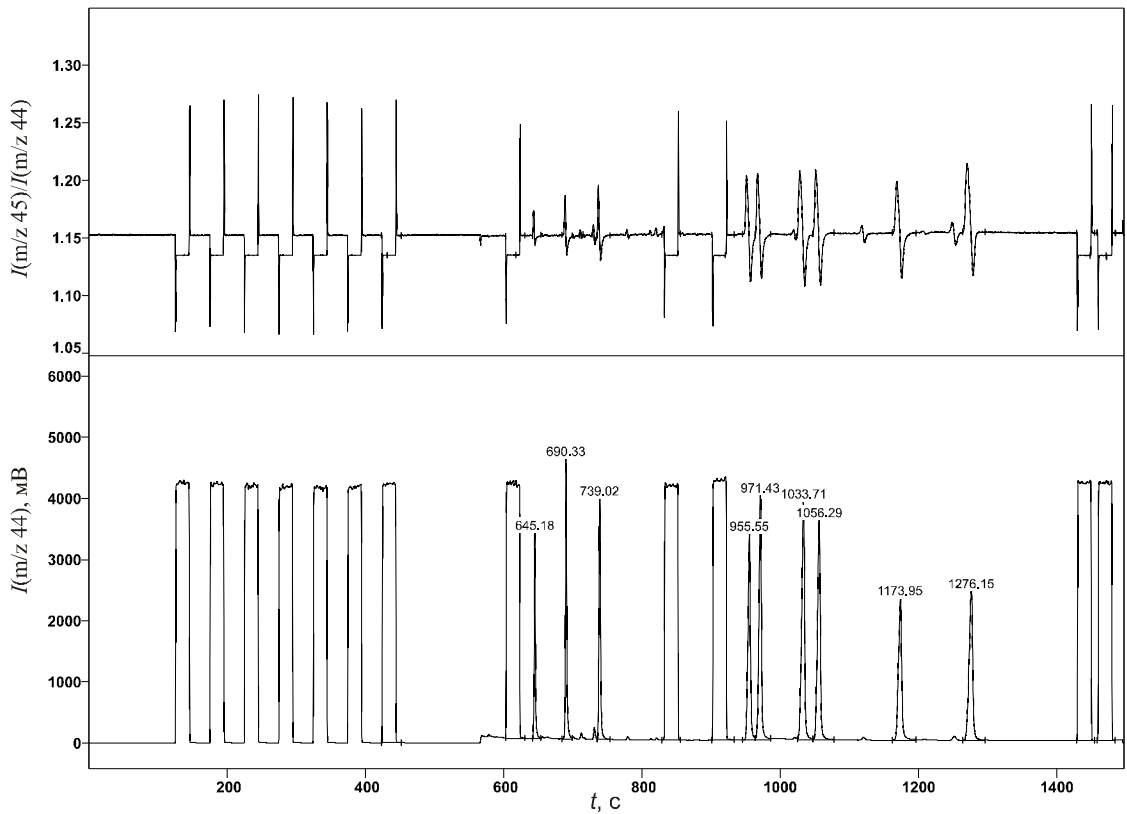


Рисунок 47 — Тестовая смесь стероидов (пентакозан – 645 с, *16-ен* – 690 с, андростанол – 739 с, Э – 955 с, А – 971 с, *5β-диол* – 1034 с, *5α-диол* – 1056 с, Т – 1056 с, ПД – 1276 с) (все соединения в виде ацетатов)

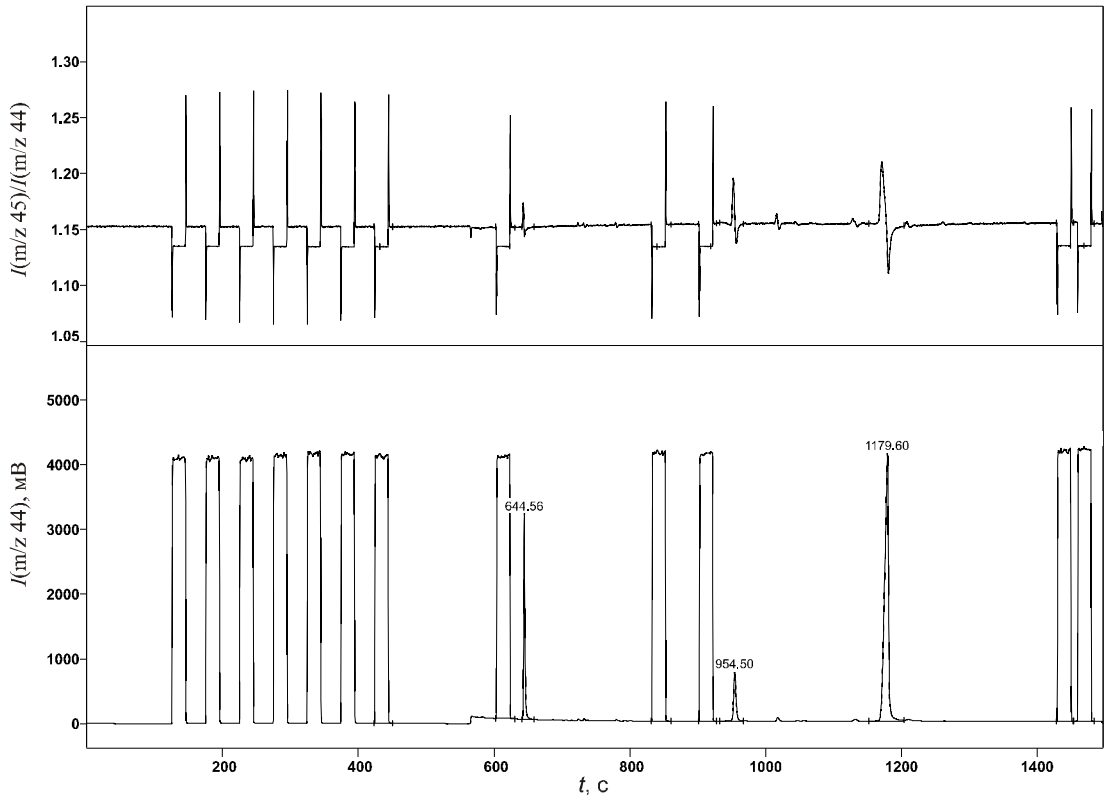


Рисунок 48 — Хроматограмма фракции, содержащей ацетат тестостерона (1179 с)

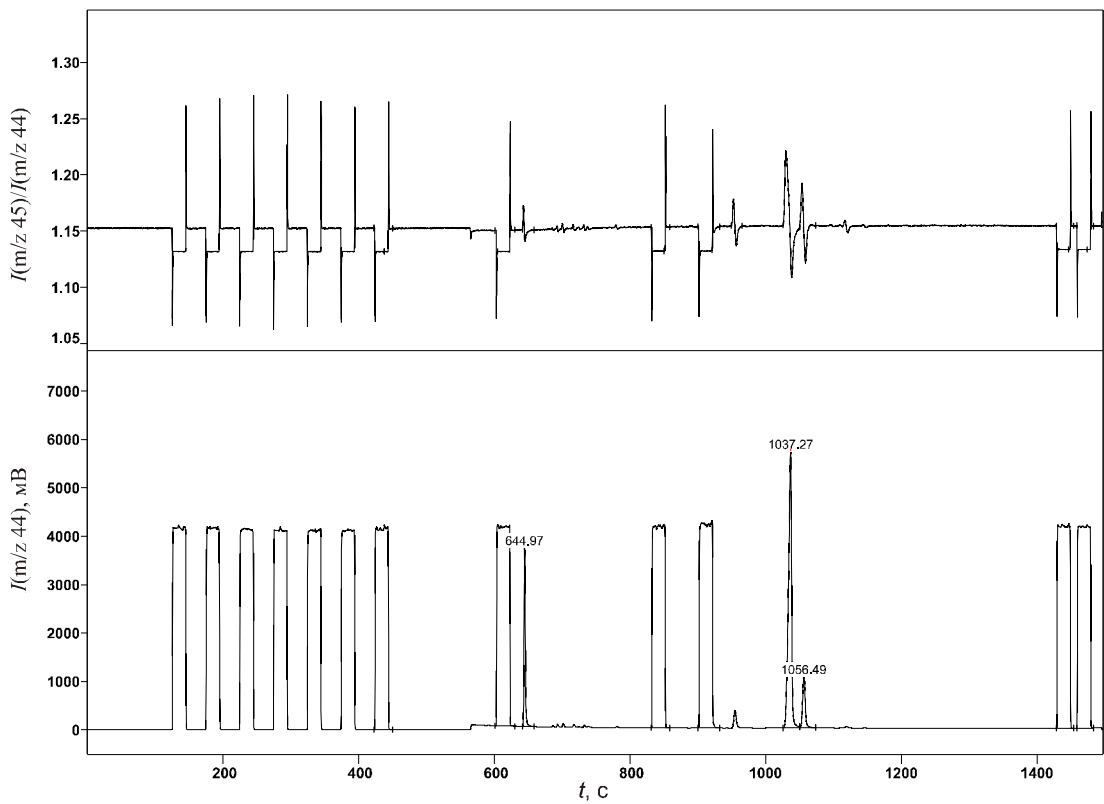


Рисунок 49 — Хроматограмма фракции, содержащей диацетаты 5 β - и 5 α -андростандиолов (1037 и 1056 с, соответственно)

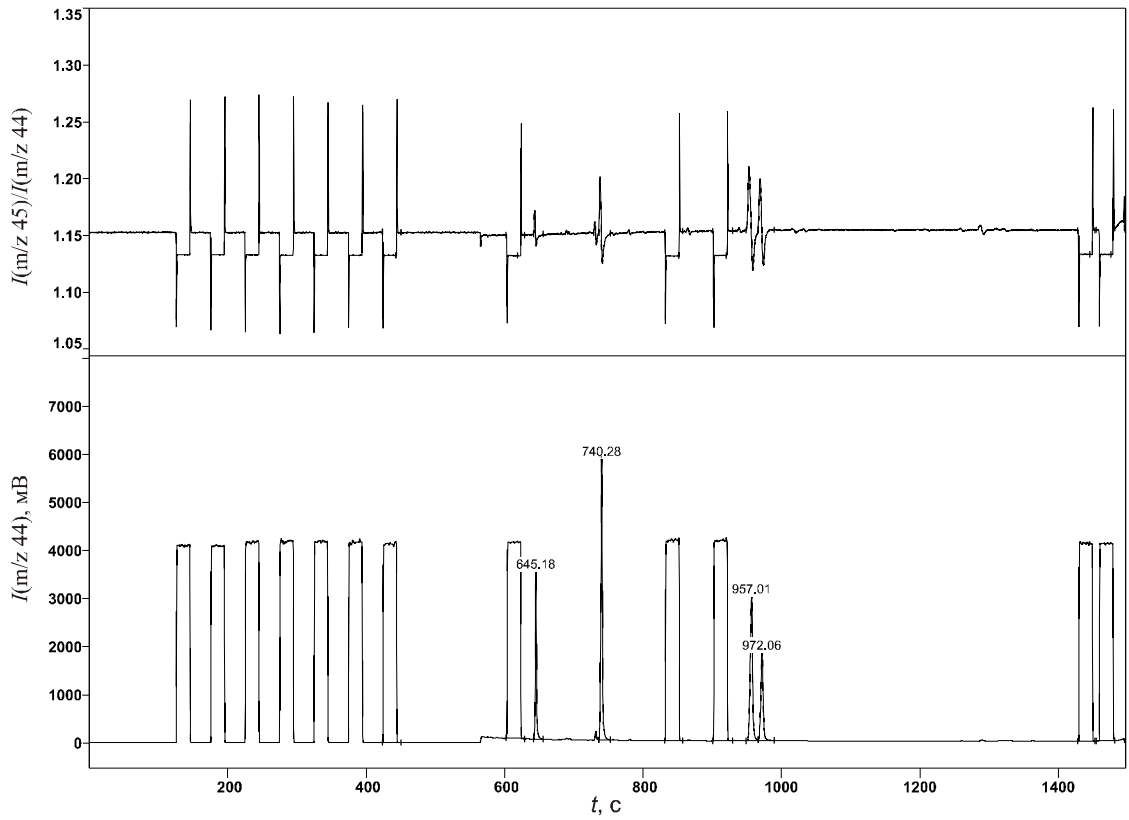


Рисунок 50 — Хроматограмма фракции, содержащей ацетаты этиохоланола и андростерона (972 и 957 с, соответственно)

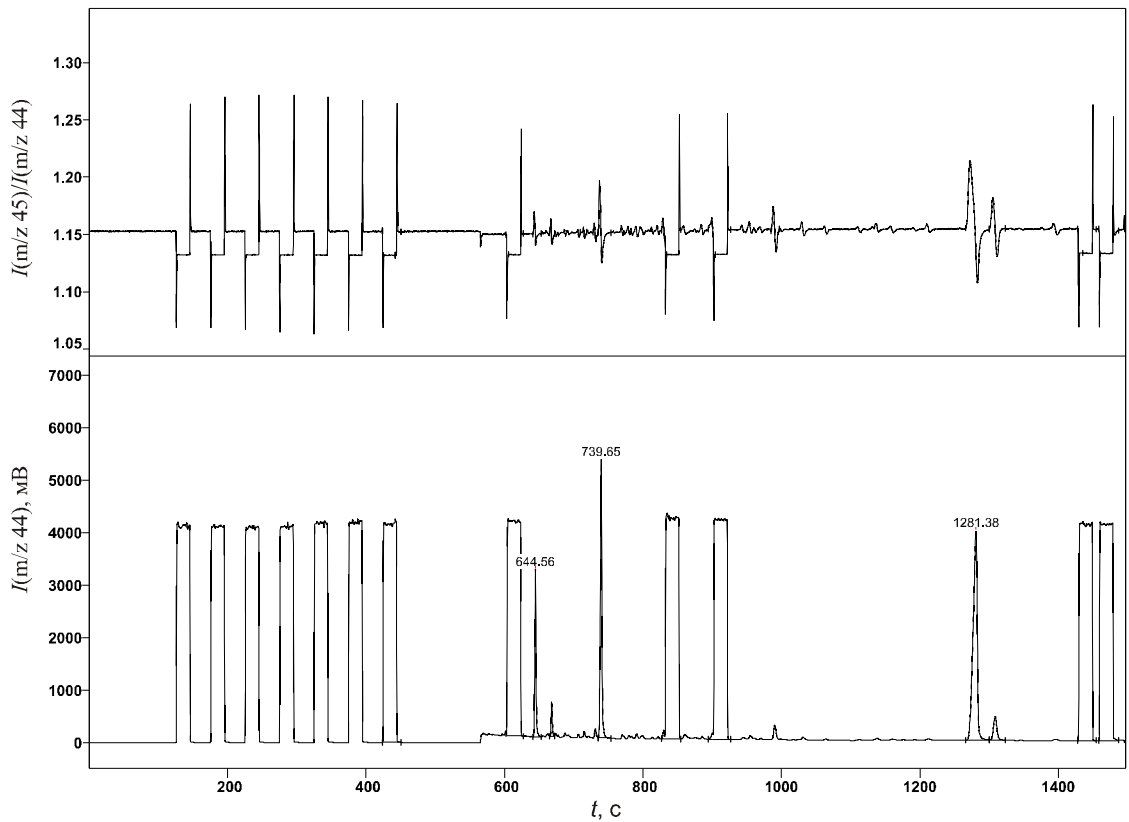


Рисунок 51 — Хроматограмма фракции, содержащей диацетат прегнандиола (1281 с)

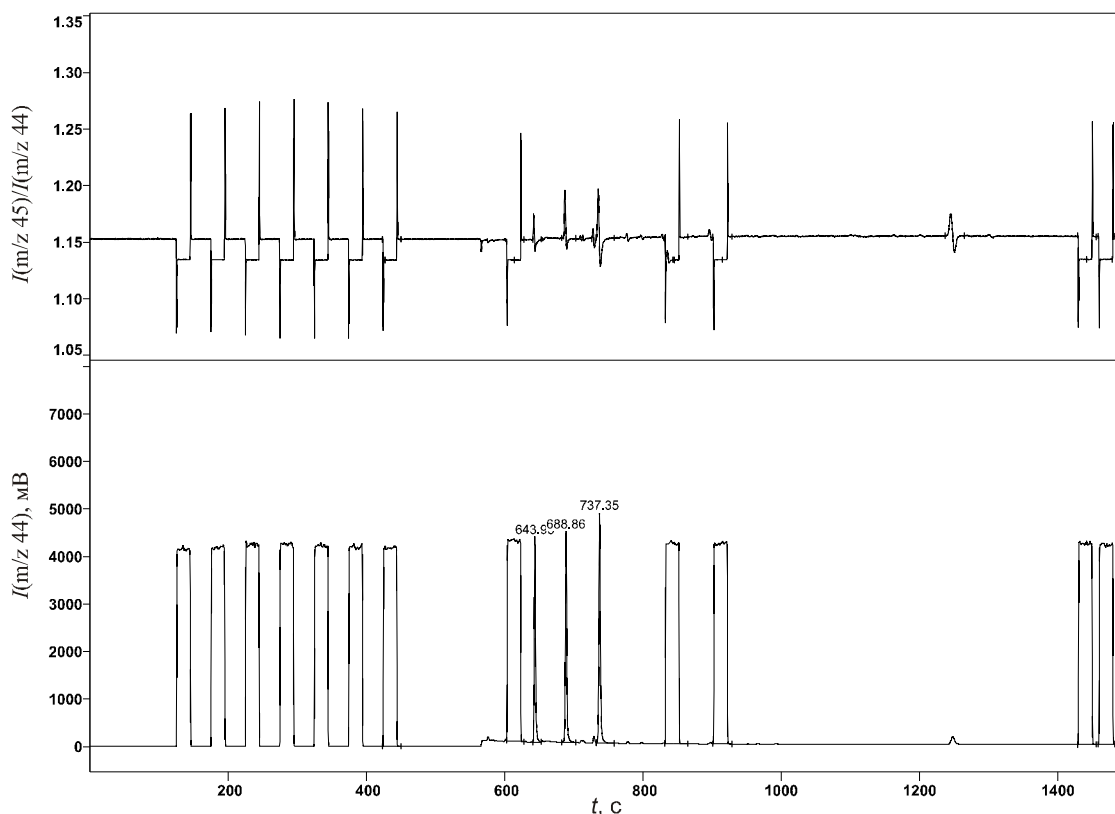


Рисунок 52 — Хроматограмма фракции, содержащей ацетат 16–андростенола (688 с)

Таким образом, в главах 3 и 4 решена задача выбора оптимальных условий процесса пробоподготовки биообразцов и анализа экстрактов методом изотопной хромато–масс–спектрометрии. На основании изучения хроматографических свойств целевых стероидных гормонов и БАД, их содержащих, предложены условия для их селективного выделения из мочи человека с применением методов жидкостно–жидкостной и твердофазной экстракции, высокоэффективной жидкостной хроматографии и дериватизации. Выбраны оптимальные условия газохроматографического разделения и масс–спектрометрической идентификации исследуемых соединений, а также окислительной конверсии стероидов и последующей масс–спектрометрической идентификации продукта конверсии. Выбор оптимальных условий каждой из стадий анализа обоснован в соответствующих подразделах. Практическое применение полученной в ходе экспериментальной деятельности информации обеспечило высокую правильность при определении изотопного состава целевых соединений и позволило приступить к исследованию процесса биотрансформации ряда синтетических аналогов эндогенных стероидов и изучению влияния их приема на изотопное соотношение целевых соединений.

Глава 5. Валидация и аттестация разработанной методики

5.1. Метрологические характеристики разработанной методики

На основании совокупности полученных экспериментальных данных, разработана методика, позволяющая селективно выделить целевые стероиды из проб мочи, перевести их в подходящую для анализа форму и измерить значения $\delta^{13}\text{C}$ методом *ГХ–С–ИМС*. Ключевыми параметрами методики являются воспроизводимость результатов анализа и отсутствие изотопного фракционирования в процессе пробоподготовки. Важно отметить, что методика подразумевает определение разности между значениями $\delta^{13}\text{C}$ различных стероидов, поэтому абсолютные значения не имеют первостепенной важности.

1) Определение степени извлечения целевых соединений на стадии

ВЭЖХ–фракционирования

Данные получены путем сравнения площадей пиков на хроматограмме тестовых смесей для *ВЭЖХ*, проанализированных методом *ГХ–МС* напрямую и после *ВЭЖХ–фракционирования* ($n=3$) (таблица 22).

Таблица 22 — Степени извлечения целевых соединений при
ВЭЖХ–фракционировании

<i>Соединение</i>	<i>Степень извлечения, %</i>
тестостерон	100 ± 4
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	101 ± 3
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	102 ± 4
андростерон	104 ± 5
этиохоланолон	105 ± 6
прегнандиол	97 ± 3
16(5 α)-андростен-3 α -ол	88 ± 5

2) Стабильность изотопного состава целевых соединений на стадии ВЭЖХ–фракционирования

Поскольку при ВЭЖХ анализе происходит разделение изотопомеров (изотопный состав компонента в разных точках хроматографического пика различен), для целей настоящей методики необходимо убедиться, что целевой компонент попадает в соответствующую фракцию без потерь, так как в противном случае измеренное на конечном этапе анализа значение $\delta^{13}\text{C}$ будет иметь систематическую погрешность. Для этого были измерены значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых компонентов тестовой смеси до и после ВЭЖХ–фракционирования ($n=3$) (таблица 23). Стероиды анализировали в виде ацетатов.

Таблица 23 — Значения $\delta^{13}\text{C}$ стероидов прошедших и непрошедших стадию ВЭЖХ–фракционирования (все в виде ацетатов)

Соединение	Исходное значение $\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$ после ВЭЖХ, ‰
тестостерон	-33.24 ± 0.17	-33.63 ± 0.26
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	-32.58 ± 0.27	-32.71 ± 0.24
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	-31.72 ± 0.20	-31.41 ± 0.28
андростерон	-30.44 ± 0.21	-30.38 ± 0.23
этиохоланолон	-30.87 ± 0.16	-30.92 ± 0.15
прегнандиол	-21.84 ± 0.12	-21.78 ± 0.14
16(5 α)-андростен-3 α -ол	-29.13 ± 0.24	-29.32 ± 0.21

Полученные данные указывают на отсутствие существенного изменения изотопного состава при ВЭЖХ–фракционировании.

3) Линейность сигнала изотопного масс–спектрометра

Известно, что значения $\delta^{13}\text{C}$, измеренные на изотопном масс–спектрометре, могут зависеть от количества введенного в него вещества. По этой причине была проверена линейность масс–спектрометра по всем целевым соединениям в диапазоне от 20 до 200 нг (на колонку). В таблице 24 приведены измеренные значения $\delta^{13}\text{C}$ ($n=3$).

Таблица 24 — Значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов в концентрационном диапазоне 20–200 нг (все в виде ацетатов)

Соединение	$\delta^{13}\text{C}$, ‰				
	20 нг	50 нг	100 нг	150 нг	200 нг
тестостерон	-33.34 ± 0.27	-33.31 ± 0.22	-33.27 ± 0.20	-33.20 ± 0.17	-33.16 ± 0.23
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	-32.64 ± 0.32	-32.60 ± 0.27	-32.58 ± 0.24	-32.55 ± 0.25	-32.50 ± 0.28
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	-32.00 ± 0.29	-31.90 ± 0.26	-31.83 ± 0.25	-31.80 ± 0.20	-31.72 ± 0.24
андростерон	-30.54 ± 0.29	-30.50 ± 0.23	-30.48 ± 0.21	-30.49 ± 0.24	-30.45 ± 0.19
этиохоланолон	-30.93 ± 0.26	-30.90 ± 0.22	-30.92 ± 0.19	-30.84 ± 0.23	-30.79 ± 0.27
прегнандиол	-21.99 ± 0.23	-21.86 ± 0.19	-21.80 ± 0.12	-21.84 ± 0.17	-21.77 ± 0.21
16(5 α)-андростен-3 α -ол	-29.24 ± 0.28	-29.20 ± 0.24	-29.16 ± 0.22	-29.09 ± 0.16	-29.03 ± 0.19

Из полученных данных видно, что в диапазоне от 20 до 200 нг отклик масс-спектрометра мало зависит от количества введенного вещества. На основании этого установлен критерий минимальной и максимальной высоты хроматографического пика для ГХ-С-ИМС: 400 и 6000 мВ, соответственно.

4) Повторяемость

Для определения повторяемости пять аликвот одной и той же пробы были приготовлены одним исполнителем в одной серии анализа (в течение трех дней) (таблица 25).

Таблица 25 — Средние значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов с учетом СКО ($n=5$) в условиях повторяемости

Соединение	Среднее значение $\delta^{13}\text{C}$, ‰	СКО, ‰
тестостерон	-22.28	0.35
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	-24.25	0.24
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	-23.97	0.24
андростерон	-22.99	0.08
этиохоланолон	-23.55	0.12
прегнандиол	-22.74	0.07
16(5 α)-андростен-3 α -ол	-22.54	0.21

Из полученных данных видно, что стандартное отклонение в условиях повторяемости не превышает 0.40‰.

5) Промежуточная прецизионность

Для определения промежуточной прецизионности одна и та же заведомо отрицательная проба была приготовлена трижды в течение месяца разными исполнителями (таблица 26).

Таблица 26 — Средние значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов с учетом СКО ($n=3$) в условиях промежуточной прецизионности (отрицательная проба)

Соединение	Среднее значение $\delta^{13}\text{C}$, ‰	СКО, ‰
тестостерон	-22.54	0.34
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	-24.44	0.75
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	-24.22	0.48
андростерон	-23.12	0.27
этиохоланолон	-23.48	0.30
прегнандиол	-22.64	0.26
16(5 α)-андростен-3 α -ол	-22.15	0.22

Из полученных данных видно, что стандартное отклонение для заведомо отрицательной пробы не превышает 0.75‰.

Для определения промежуточной прецизионности одна и та же заведомо положительная проба была приготовлена трижды в течение месяца разными исполнителями (таблица 27).

Таблица 27 — Средние значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов с учетом СКО ($n=3$) в условиях промежуточной прецизионности (положительная проба)

Соединение	Среднее значение $\delta^{13}\text{C}$, ‰	СКО, ‰
тестостерон	-28.04	0.43
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	-29.36	0.35
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол	-27.72	0.64
андростерон	-27.37	0.26
этиохоланолон	-27.29	0.33
прегнандиол	-21.11	0.48
16(5 α)-андростен-3 α -ол	-22.62	0.43

Из полученных данных видно, что стандартное отклонение для заведомо положительной пробы не превышает 0.64‰.

5.2. Внутрिलाбораторные критерии экзогенной природы стероидов

С целью установления статистически обоснованных критериев оценки результатов анализа (референтных интервалов) для 923 проб мочи спортсменов и добровольцев методом *ГХ–С–ИМС* определен изотопный состав тестостерона, его метаболитов, а также прегнандиола и 16-андростенола (таблица 28). Выполнение нормального закона распределения проверяли визуально построением графиков «квантиль – квантиль» с использованием программного обеспечения для статистической обработки данных SPSS версии 17. На рисунке 53 представлены гистограммы для каждого стероида, характеризующие плотность распределения вероятности соответствующих значений $\delta^{13}\text{C}$.

Таблица 28 — Значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов, установленные в работе по результатам исследования 923 проб мочи спортсменов и добровольцев

<i>Соединение</i>	<i>Среднее, ‰</i>	<i>Интервал, ‰</i>	<i>СКО, ‰</i>
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
андростенол	–22.0	–(19.1 – 24.3)	0.83

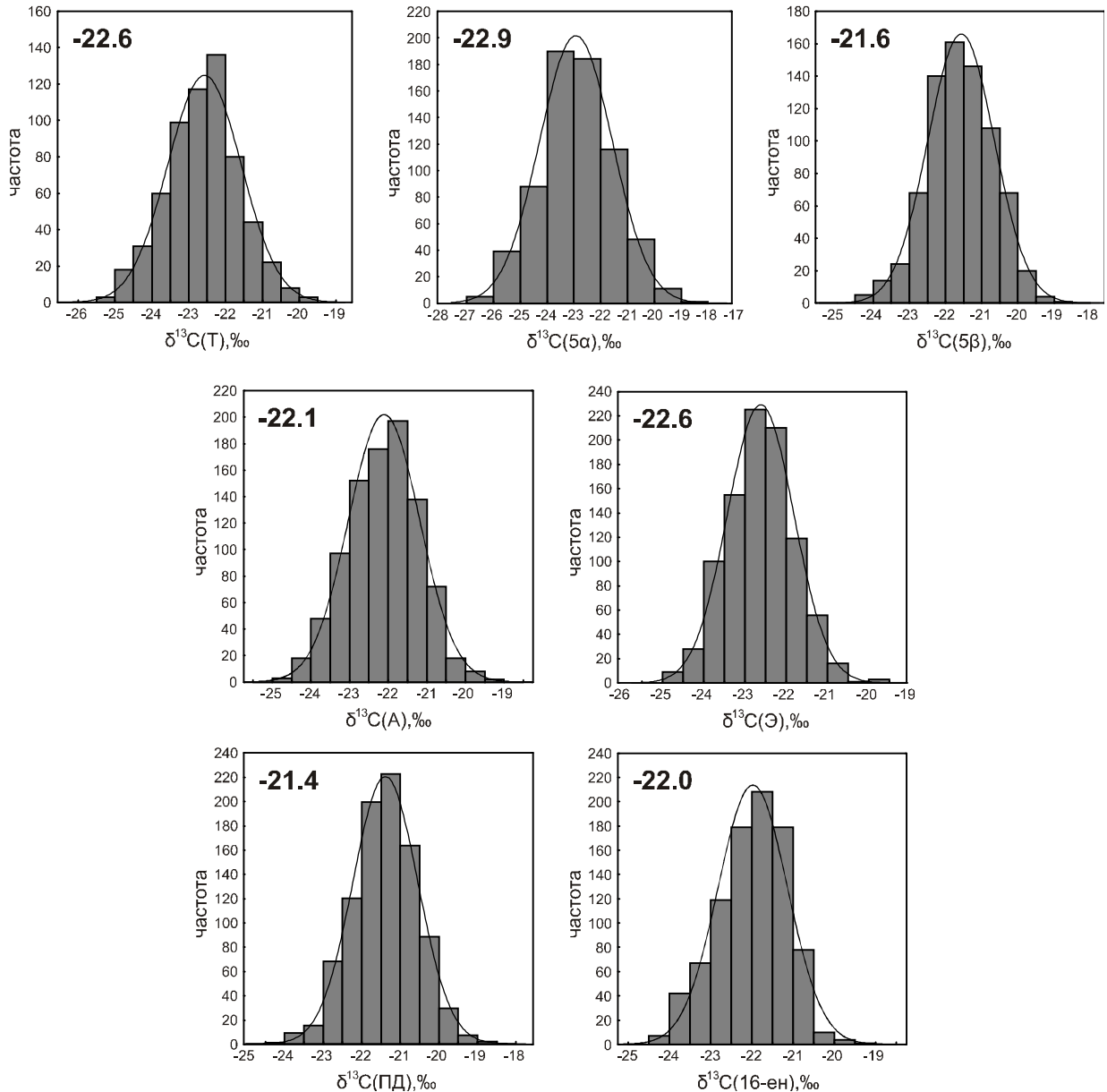


Рисунок 53 — Графики плотности распределения вероятности значений $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов

В таблицах 29, 30 представлены данные по референтным интервалам, рассчитанные для двух эндогенных маркеров и пяти целевых стероидных гормонов. Референтные интервалы представляют собой усредненную по всем проанализированным в ФГУП АДЦ пробам разницу «стероид–эндогенный маркер» ($\Delta\delta$) плюс утроенное стандартное отклонение этой пары стероидов. Хотя метод референтных интервалов обладает некоторыми недостатками и требует большого числа экспериментальных данных, его использование для трактовки получаемых результатов предпочтительнее критерия «трех промилле», поскольку он практически исключает вероятность ложноположительных результатов, вызванных

наличием систематической погрешности в значениях $\delta^{13}\text{C}$ стероидов из-за особенностей пробоподготовки.

Таблица 29 — 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 30 — Референтные интервалы, рассчитанные относительно 16-ен

	$\Delta\delta(16\text{-ен}-T)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-5\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-5\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-A)$	$\Delta\delta(16\text{-ен}-Э)$
<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

5.3. Межлабораторное сравнение результатов анализа

В соответствии с требованиями Международного стандарта для лабораторий версии 7, вступившего в силу с 1 января 2012 года [96], антидопинговые лаборатории, имеющие аккредитацию ВАДА, должны принимать участие программе межлабораторных сличительных испытаний и предоставлять корректные результаты анализа с целью сохранения этой аккредитации.

В таблице 31 представлены данные межлабораторных сличительных испытаний, проходивших в декабре 2013 года, по методике определения происхождения эндогенных стероидов в моче методом изотопной масс-спектрометрии. В вышеописанных испытаниях образец мочи, содержащий стероиды экзогенного происхождения, был проанализирован в 32 аккредитованных ВАДА лабораториях.

Таблица 31 — Найденные в ФГУП АДЦ и средние значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых соединений и эндогенных маркеров, а также $\Delta\delta$ для пар «ЭМ–ЦС»

	<i>T</i>	<i>5α</i>	<i>5β</i>	<i>A</i>	<i>Э</i>	<i>ПД</i>	<i>16-ен</i>
$\delta^{13}\text{C}_{\text{ФГУП АДЦ}}, \text{‰}$	-27.60	-26.70	-26.10	-24.60	-24.70	-22.00	-21.10
$\delta^{13}\text{C}_{\text{среднее}}, \text{‰}$	-27.08	-26.32	-26.10	-24.36	-24.70	-22.64	-21.94
$ \delta^{13}\text{C}_{\text{ФГУП АДЦ}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{среднее}} , \text{‰}$	0.52	0.38	0.00	0.24	0.00	0.64	0.84
	<i>(ПД – T)</i>	<i>(ПД – 5α)</i>	<i>(ПД – 5β)</i>	<i>(ПД – A)</i>	<i>(ПД – Э)</i>		
$\Delta\delta_{\text{ФГУП АДЦ}}$	5.60	4.70	4.10	2.60	2.70		
$\Delta\delta_{\text{среднее}}$	4.64	3.43	3.60	1.70	2.18		
$ \Delta\delta_{\text{ФГУП АДЦ}} - \Delta\delta_{\text{среднее}} $	0.96	1.27	0.50	0.90	0.52		
	<i>(16-ен – T)</i>	<i>(16-ен – 5α)</i>	<i>(16-ен – 5β)</i>	<i>(16-ен – A)</i>	<i>(16-ен – Э)</i>		
$\Delta\delta_{\text{ФГУП АДЦ}}$	6.50	5.60	5.00	3.50	3.60		
$\Delta\delta_{\text{среднее}}$	5.34	4.00	3.80	1.97	2.44		
$ \Delta\delta_{\text{ФГУП АДЦ}} - \Delta\delta_{\text{среднее}} $	1.16	1.60	1.20	1.53	1.16		

Согласно данным таблицы 31, найденные в ФГУП АДЦ в ходе межлабораторных сличительных испытаний значения $\delta^{13}\text{C}$ для целевых соединений и эндогенных маркеров хорошо согласуются с соответствующими средними значениями, рассчитанными по результатам анализа 32 лабораторий. Значения $\Delta\delta$ по парам «ПД–ЦС» также лишь незначительно отклоняются средних. В случае пар «16-ен–ЦС», $\Delta\delta_{\text{ФГУП АДЦ}}$ в большей степени отличаются от усредненных значений, что вызвано повышенной летучестью этого эндогенного маркера и, как следствие, большей склонностью к изотопному фракционированию в процессе пробоподготовки и анализа. Тем не менее, указанные отклонения лежат в допустимых пределах. Согласно данным, полученным в московской лаборатории, ВАДА признало прохождение сличительных испытаний для ФГУП АДЦ успешным, что напрямую свидетельствует в пользу адекватности результатов разработанной методики.

Глава 6. Изменение изотопного состава эндогенных стероидов после употребления их синтетических аналогов

6.1. Выделение и анализ активных компонентов прогормональных препаратов

Прежде чем провести исследования по метаболизму 6 синтетических аналогов эндогенных стероидов, потребовалось определить их изотопный состав. Для этого посредством жидкостно-жидкостной экстракции и ВЭЖХ-фракционирования из содержимого капсул каждого препарата выделяли активные компоненты. Хроматограммы экстрактов и соответствующих активным компонентам стандартных растворов приведены ниже на рисунках 54, 55.

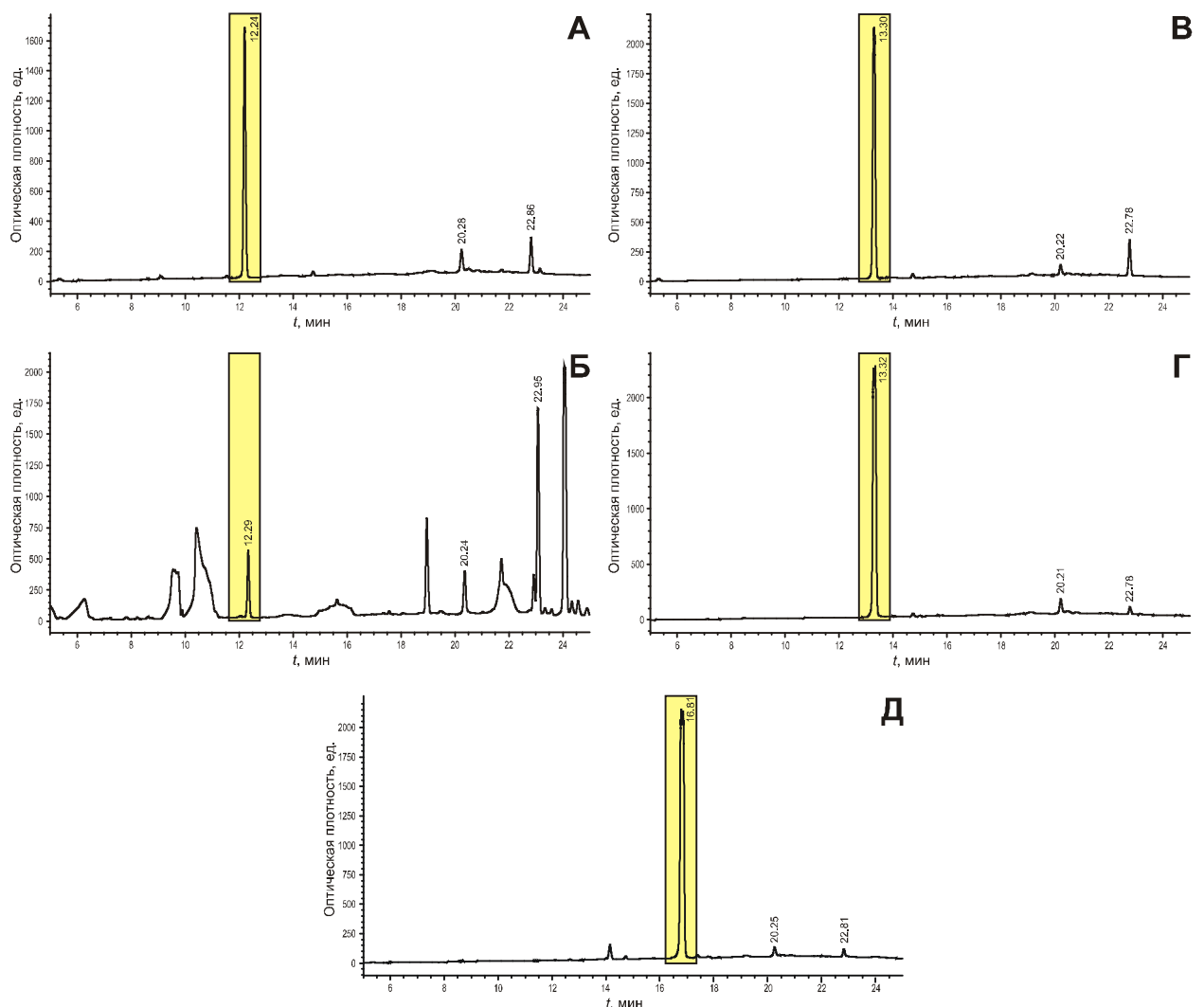


Рисунок 54 — Хроматограммы ВЭЖХ-разделения экстрактов прогормональных препаратов и соответствующих стандартов (А – тестостерон, Б – препарат №1

«Andriol ТК», В – ДГЭА, Г – препарат №2 «DHEA», Д – препарат №3 «Pregnenolone»). Желтыми зонами выделены временные интервалы сбора фракций

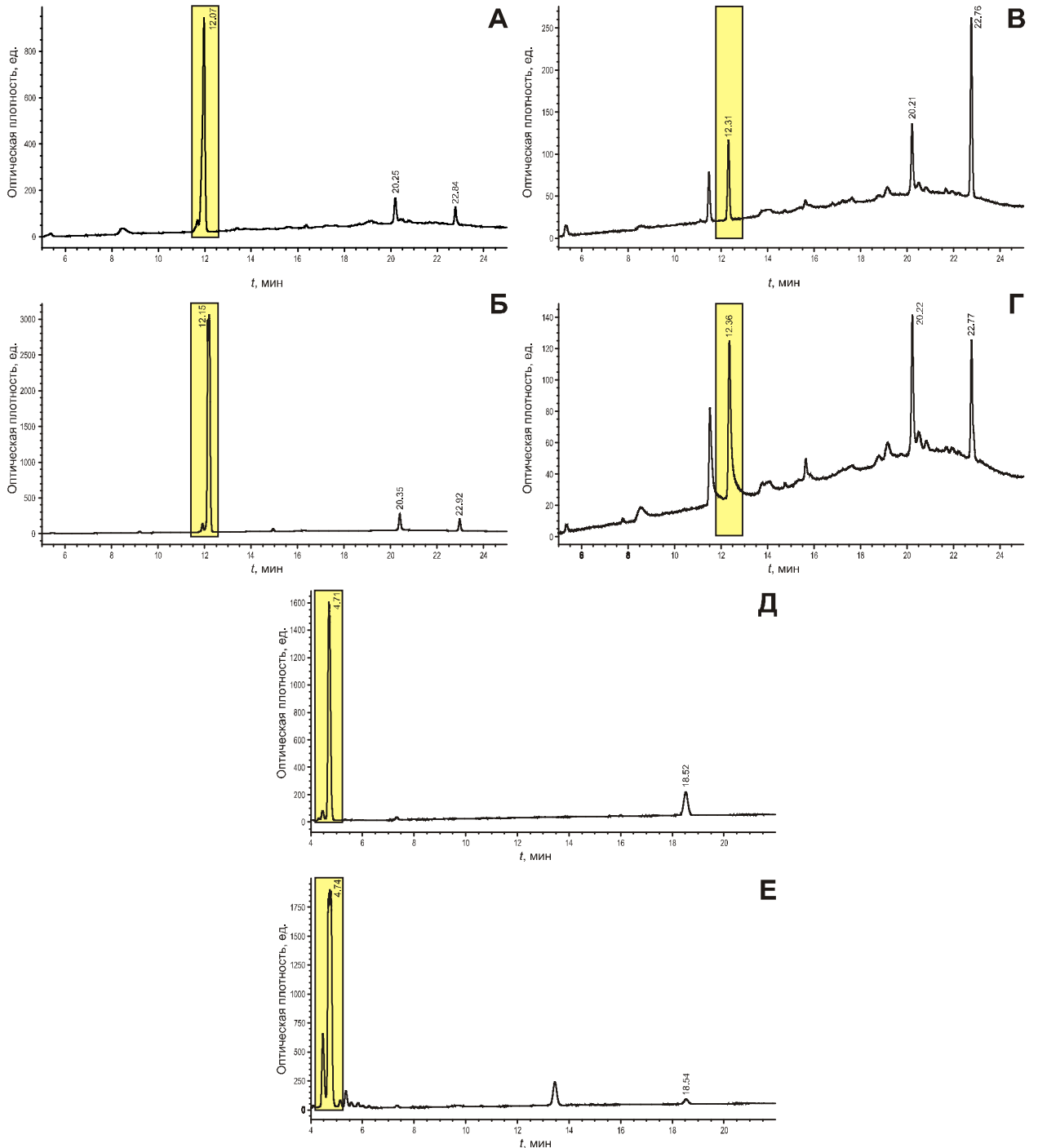


Рисунок 55 — Хроматограммы ВЭЖХ-разделения экстрактов прогомональных препаратов и соответствующих стандартов (А – болдион, Б – препарат №4 «BOLD», В – 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол, Г – препарат №5 «Maxteron», Д – 1-андростен-3 β ,17 β -диол, Е – препарат №6 «1-AD»). Желтыми зонами выделены временные интервалы сбора фракций

Выделенные фракции силилировали и подтверждали идентичность активных компонентов методом *ГХ–МС*, после чего анализировали целевые соединения посредством изотопной хромато–масс–спектрометрии. Хроматограммы, полученные в системе *ГХ–С–ИМС*, приведены на рисунках 56, 57.

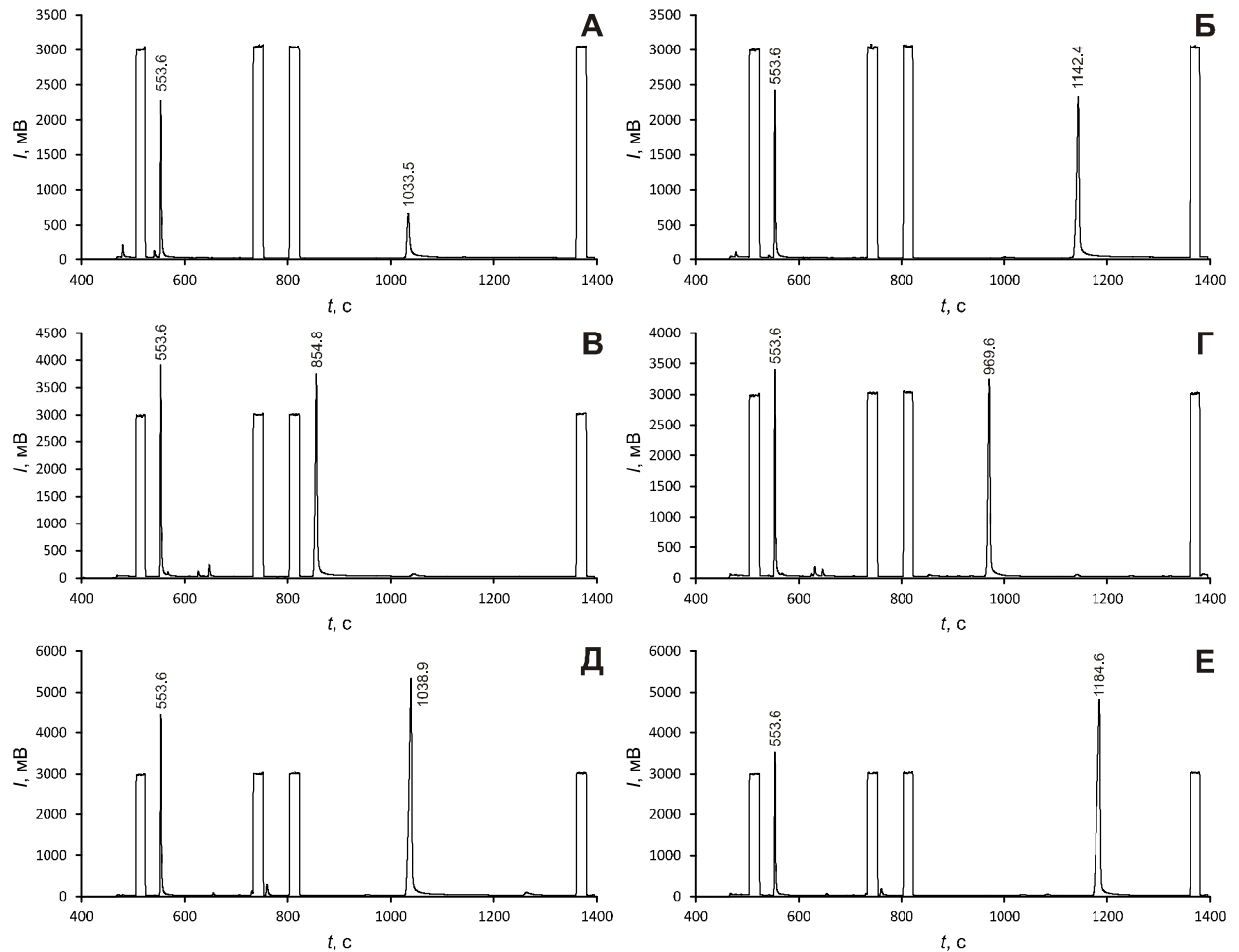


Рисунок 56 — Хроматограммы ацетилированных и неацетилированных фракций препаратов №1 (А, Б), 2 (В, Г) и 3 (Д, Е), зарегистрированные в системе *ГХ–С–ИМС* (А – тестостерон [1033 с], Б – тестостерона ацетат [1142 с], В – ДГЭА [854 с], Г – ДГЭА ацетат [989 с], Д – прегненолон [1039 с], Е – прегненолона ацетат [1184 с])

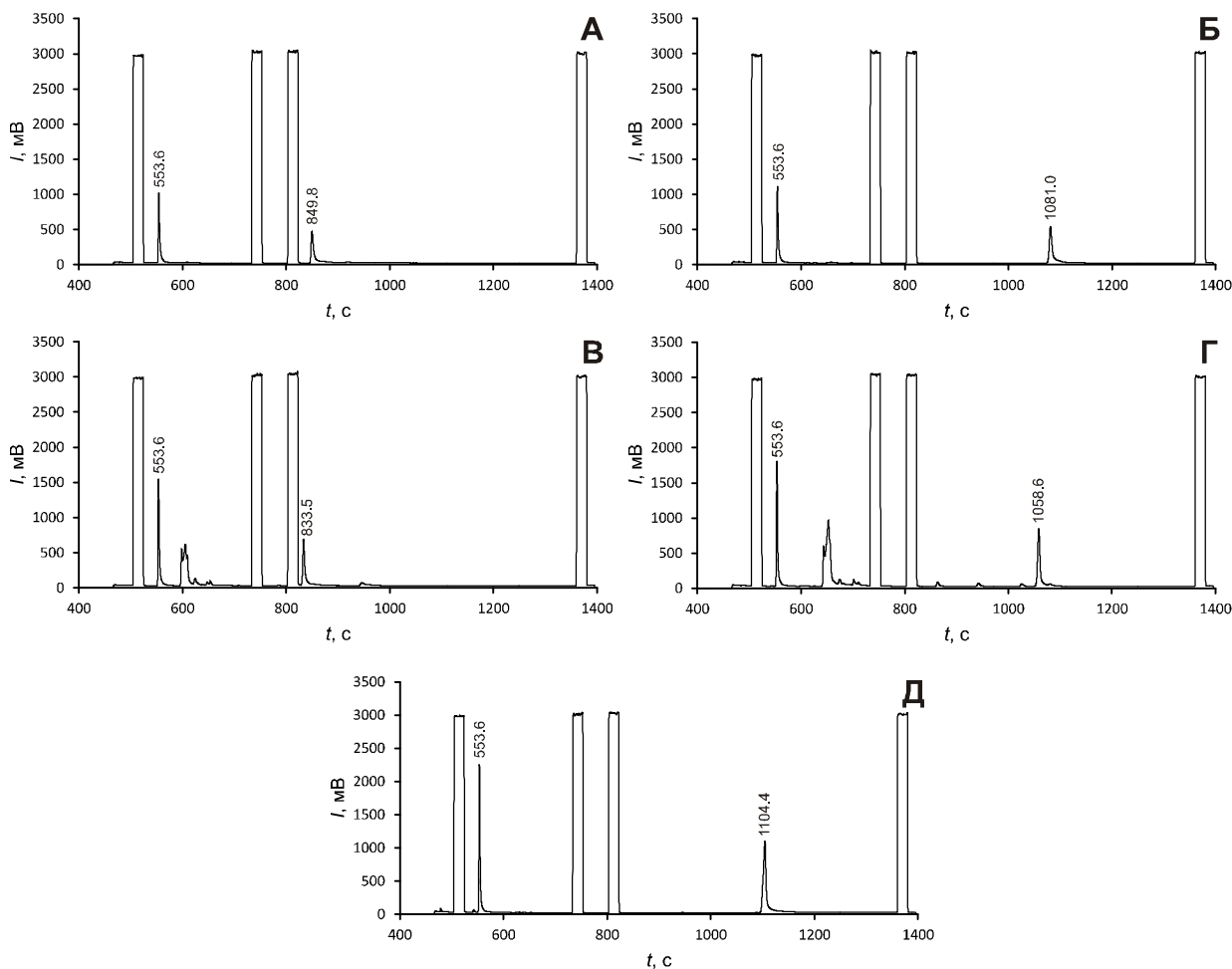


Рисунок 57 — Хроматограммы ацетилированных и неацетилированных фракций препаратов №4 (Д), 5 (А, Б) и 6 (В, Г), зарегистрированные в системе ГХ–С–ИМС (А – 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол [849 с], Б – 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол диацетат [1081 с], В – 1-андростен-3 β ,17 β -диол [833 с], Г – 1-андростен-3 β ,17 β -диол диацетат [1058 с], Д – болдион [1104 с])

Данные по изотопному составу исследованных стероидов как в свободном виде, так в пересчёте из ацетатов, приведены в таблице 32. 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 32 — 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)

Данные, полученные в ходе выделения и анализа активных компонентов прогормональных препаратов, позволили перейти к исследованию влияния употребления соединений экзогенного происхождения на изотопный состав целевых соединений. 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 [94], 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.

6.2. Препарат №1 – тестостерон

Употребление синтетического тестостерона вызывает резкое изменение изотопного состава выделяемых с мочой тестостерона и его метаболитов. На рисунках 59, 61, 63 представлены диаграммы, отражающие зависимость изотопного состава тестостерона, его метаболитов, прегнандиола и 16-андростенола от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата каждым из трех добровольцев.

У субъекта №1 (таблицы 33, 34) превышение критерия 3‰ для $\Delta\delta$ по всем парам «ЦС–ЭМ» наблюдается в течение 23 часов после приема (за исключением пар «ПД–5 β –диол» и «16–ен–5 β –диол» – 36 часов). В том же временном интервале соотношение концентраций тестостерона к эпитестостерону у данного субъекта выходит за рамки 4 (критерий, в соответствии с которым пробу необходимо анализировать методом изотопной хромато-масс-спектрометрии) (рисунок 58).

У субъекта №2 (таблицы 35, 36) завышенные по парам «ПД–ЦС» значения $\Delta\delta$ детектируются в первые 30 часов с момента употребления (исключение составляет пара «ПД–А» – 11 часов). Для пар «16–ен–ЦС» превышение порогового значения в 3‰ наблюдается вплоть до 17 часов («16–ен–ЦС» – 11 часов). Соотношение T/E выше 4 наблюдали только для первых трех точек – 5, 7 и 11 часов (рисунок 60).

У субъекта №3 (таблицы 37, 38) для пар «ПД–5 β –диол» и «ПД–Э» $\Delta\delta$, превышающие 3‰, регистрируются в течение 29 часов с момента употребления, у остальных пар по прегнандиолу – 12 часов. Для пары «16–ен–5 β –диол» повышенное значение $\Delta\delta$ сохраняется на протяжении 29 часов, для пар «16–ен–5 α –диол» и «16–ен–Э» – 25 часов, для остальных пар этого эндогенного маркера – 12 часов. Поскольку у субъекта №3 наблюдается генетическая

предрасположенность к естественно высоким значениям соотношения концентраций T/E , данный критерий при анализе его образцов малоинформативен (рисунок 62).

С учетом вышесказанного, установить факт употребления тестостерона методом $ГХ-С-ИМС$ возможно в среднем вплоть до 30 часов с момента перорального приема. Наиболее информативными являются пары 5β -стероидов – 5β -андростандиола и этиохоланолон, 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.

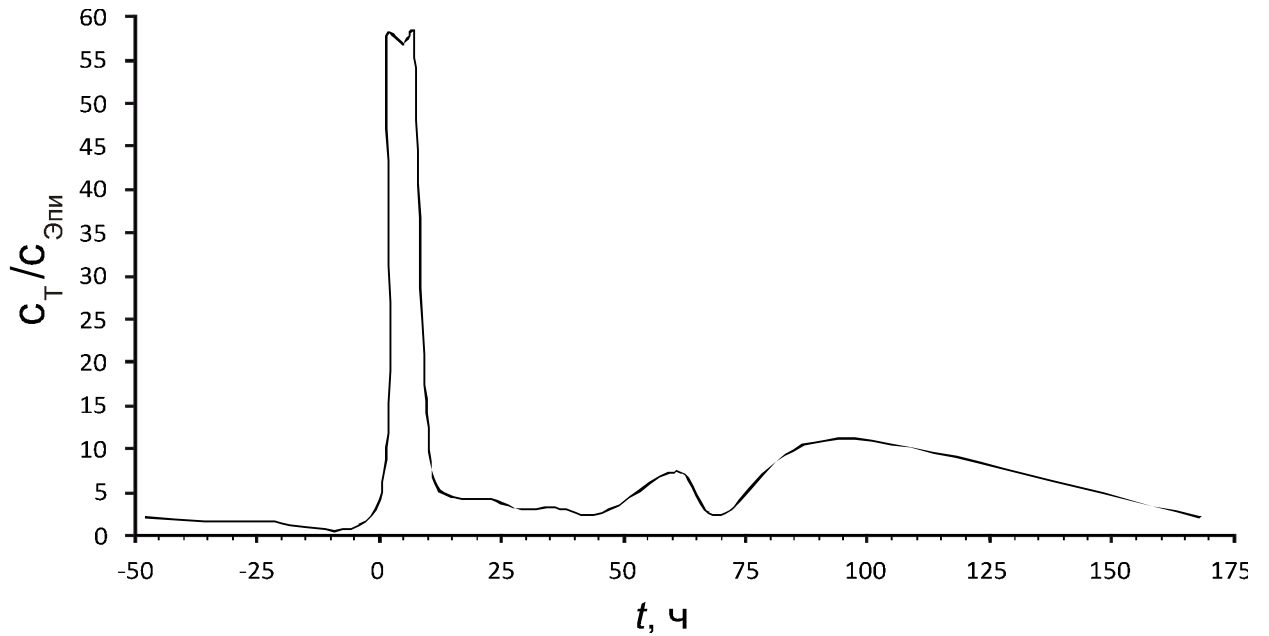


Рисунок 58 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата субъектом №1

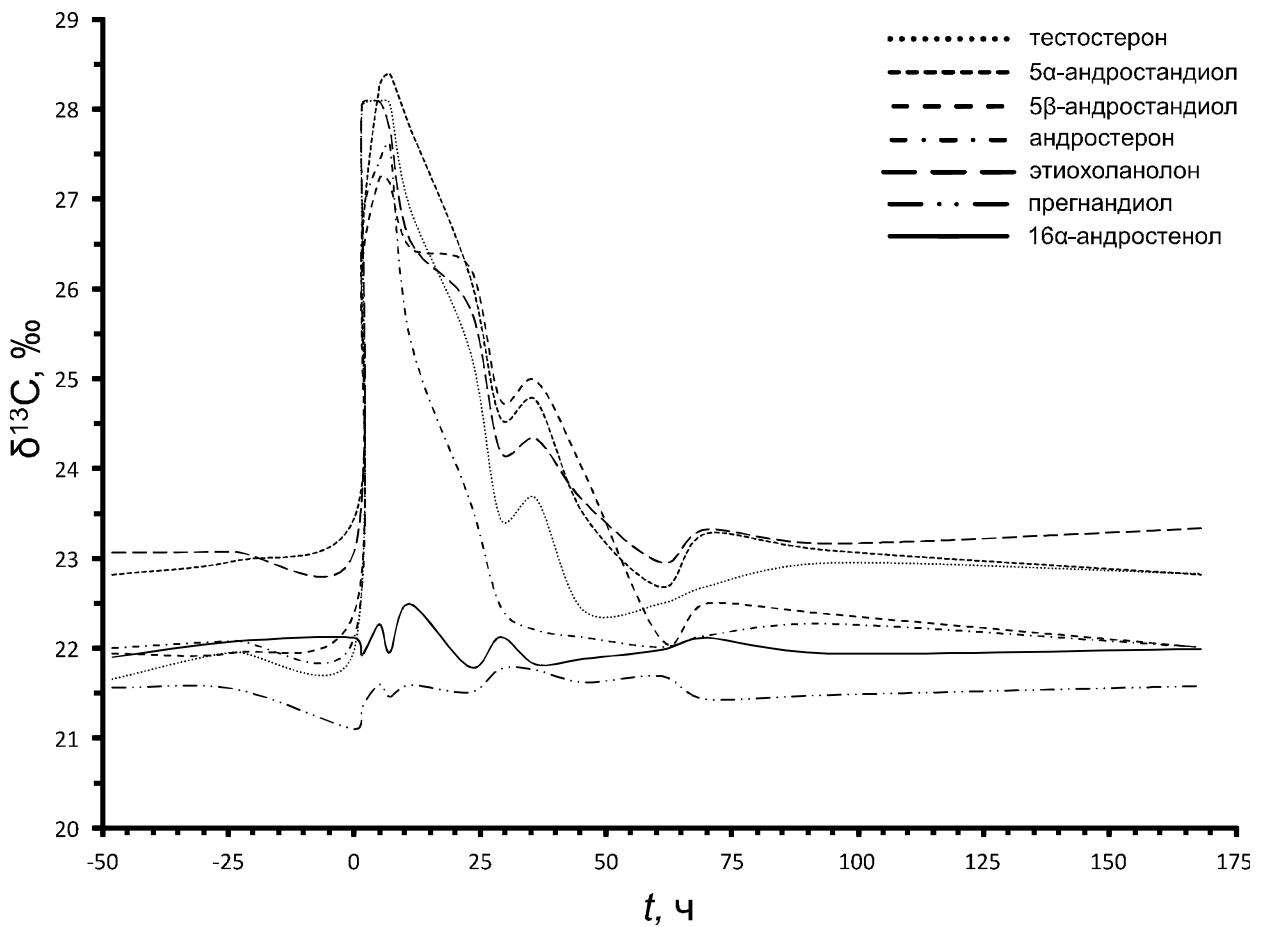


Рисунок 59 — Зависимость изотопного состава T , 5α -диола, 5β -диола, A , Э , ПД и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата субъектом №1 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 33 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеcanoата субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.1	1.3	0.4	0.4	1.5
-24	0.4	1.4	0.4	0.5	1.5
0	0.9	2.4	1.3	1.0	2.0
2	6.7	5.2	4.8	5.4	6.7
5	6.5	6.7	5.6	5.8	6.5
7	6.6	6.9	5.7	6.1	6.3
11	5.3	6.2	4.9	3.9	4.9
23	3.8	4.6	4.7	2.1	4.3
29	1.7	2.8	3.0	0.7	2.4
36	1.9	3.0	3.2	0.4	2.6
46	0.8	1.9	2.3	0.5	2.0
61	0.8	1.0	0.4	0.3	1.3
70	1.3	1.9	1.1	0.7	1.9
94	1.5	1.6	0.9	0.8	1.7
168	1.2	1.2	0.4	0.4	1.8

Таблица 34 — Значения $\Delta\delta(16\text{-en-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеcanoата субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-en-T})$	$\Delta\delta(16\text{-en-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-en-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-en-A})$	$\Delta\delta(16\text{-en-Э})$
-48	-0.3	0.9	0.0	0.1	1.2
-24	-0.1	0.9	-0.1	0.0	1.0
0	-0.1	1.3	0.3	0.0	1.0
2	6.1	4.6	4.3	4.8	6.1
5	5.8	6.0	5.0	5.2	5.8
7	6.1	6.4	5.2	5.6	5.8
11	4.4	5.3	4.0	3.0	4.1
23	3.5	4.3	4.4	1.8	4.0
29	1.3	2.4	2.6	0.3	2.1
36	1.8	2.9	3.2	0.4	2.5
46	0.5	1.6	2.1	0.2	1.8
61	0.5	0.7	0.1	0.0	1.0
70	0.6	1.2	0.4	0.0	1.2
94	1.0	1.2	0.4	0.3	1.2
168	0.8	0.8	0.0	0.0	1.3

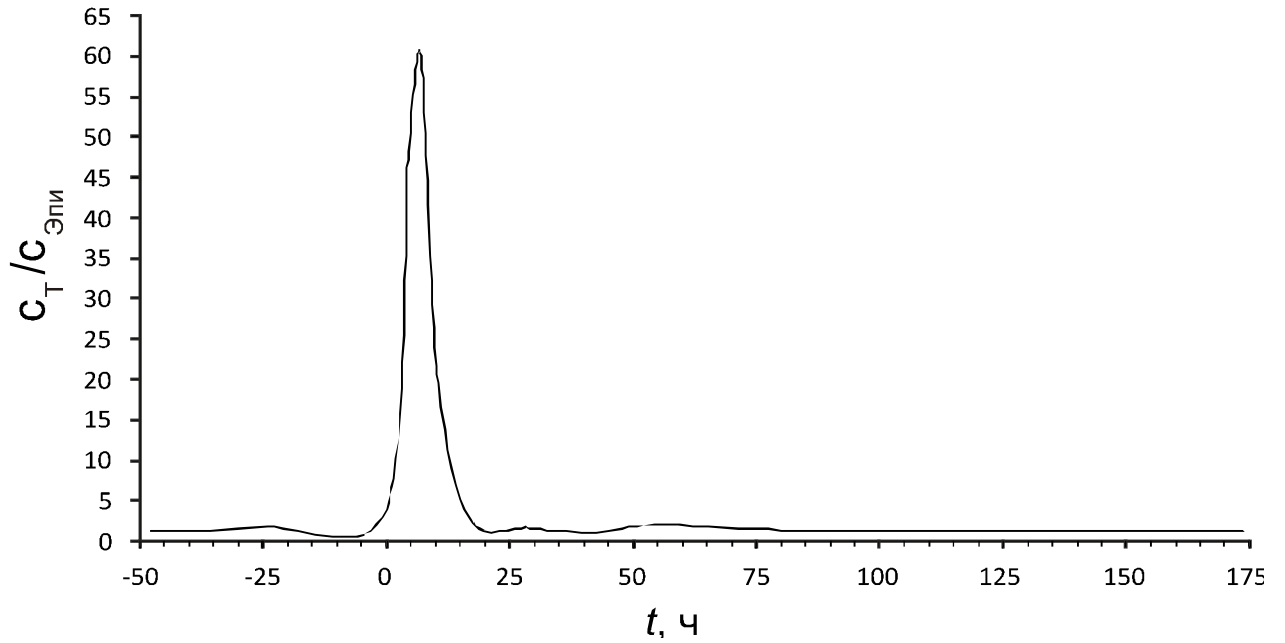


Рисунок 60 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата субъектом №2

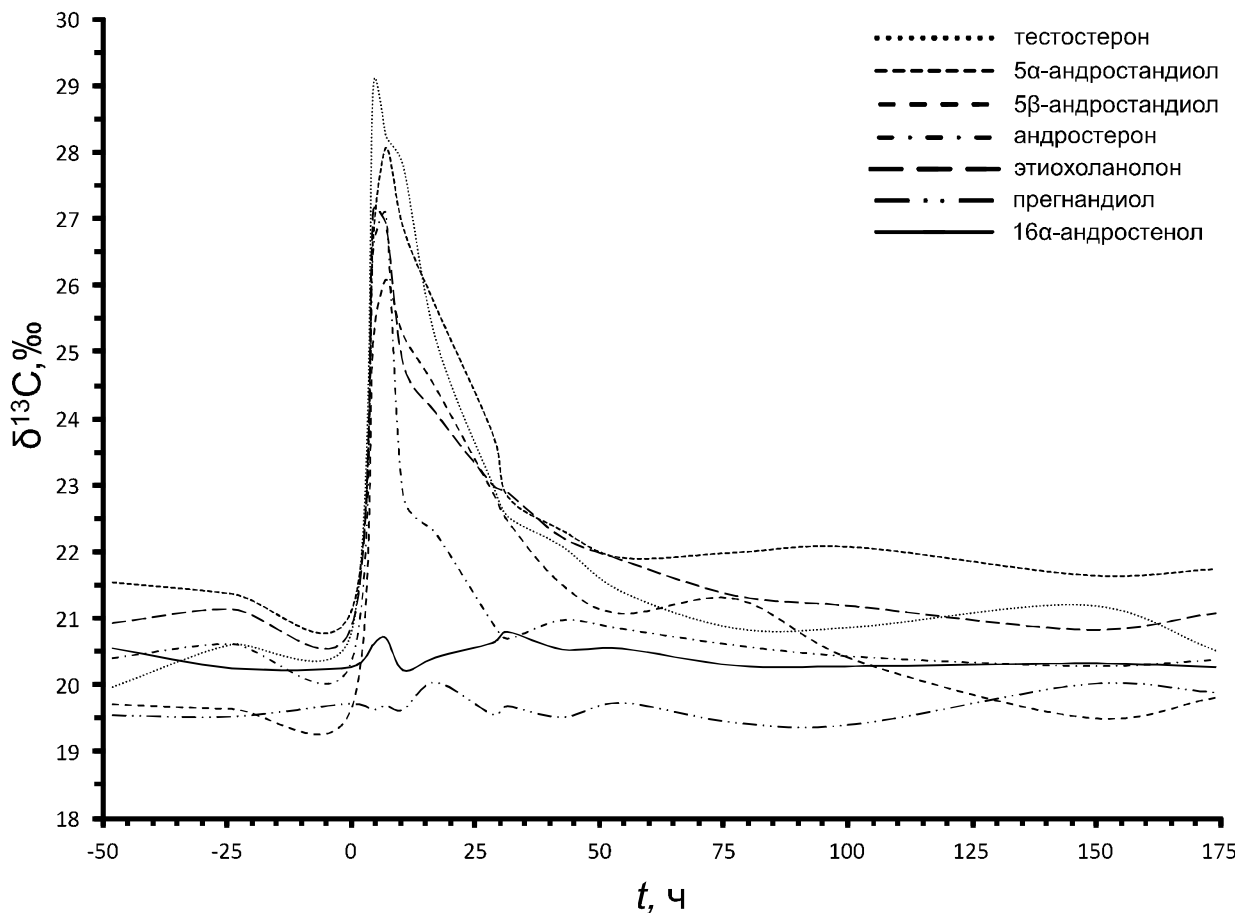


Рисунок 61 — Зависимость изотопного состава T , 5α -диола, 5β -диола, A , Δ , PD и 16α -ен от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата субъектом №2 (значения $\delta^{13}C$ даны по модулю)

Таблица 35 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеcanoата субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.4	2.0	0.2	0.8	1.4
-24	1.1	1.9	0.1	1.1	1.6
0	1.1	1.4	-0.1	0.6	1.1
5	9.4	7.2	5.6	7.0	7.5
7	8.6	8.4	6.4	7.4	7.3
11	8.2	7.2	5.6	3.2	5.2
17	5.2	5.7	4.4	2.3	4.1
29	3.5	4.2	3.3	1.4	3.4
32	2.9	3.2	2.8	1.0	3.2
43	2.6	2.8	2.0	1.5	2.7
55	1.7	2.2	1.3	1.1	2.1
78	1.4	2.6	1.9	1.2	1.9
102	1.5	2.7	0.9	1.0	1.8
148	1.2	1.7	-0.5	0.3	0.8
174	0.7	1.9	-0.1	0.5	1.2

Таблица 36 — Значения $\Delta\delta(16\text{-en-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеcanoата субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-en-T})$	$\Delta\delta(16\text{-en-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-en-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-en-A})$	$\Delta\delta(16\text{-en-Э})$
-48	-0.6	1.0	-0.8	-0.2	0.4
-24	0.4	1.1	-0.6	0.3	0.9
0	0.5	0.8	-0.7	0.0	0.6
5	8.4	6.2	4.6	6.0	6.5
7	7.5	7.4	5.4	6.4	6.2
11	7.6	6.6	5.0	2.6	4.6
17	4.8	5.3	4.0	1.9	3.7
29	2.4	3.1	2.3	0.3	2.4
32	1.7	2.0	1.7	-0.1	2.1
43	1.6	1.8	1.0	0.4	1.7
55	0.9	1.4	0.5	0.3	1.3
78	0.6	1.7	1.0	0.3	1.0
102	0.6	1.8	0.1	0.1	0.9
148	0.9	1.3	-0.8	0.0	0.5
174	0.3	1.5	-0.5	0.1	0.8

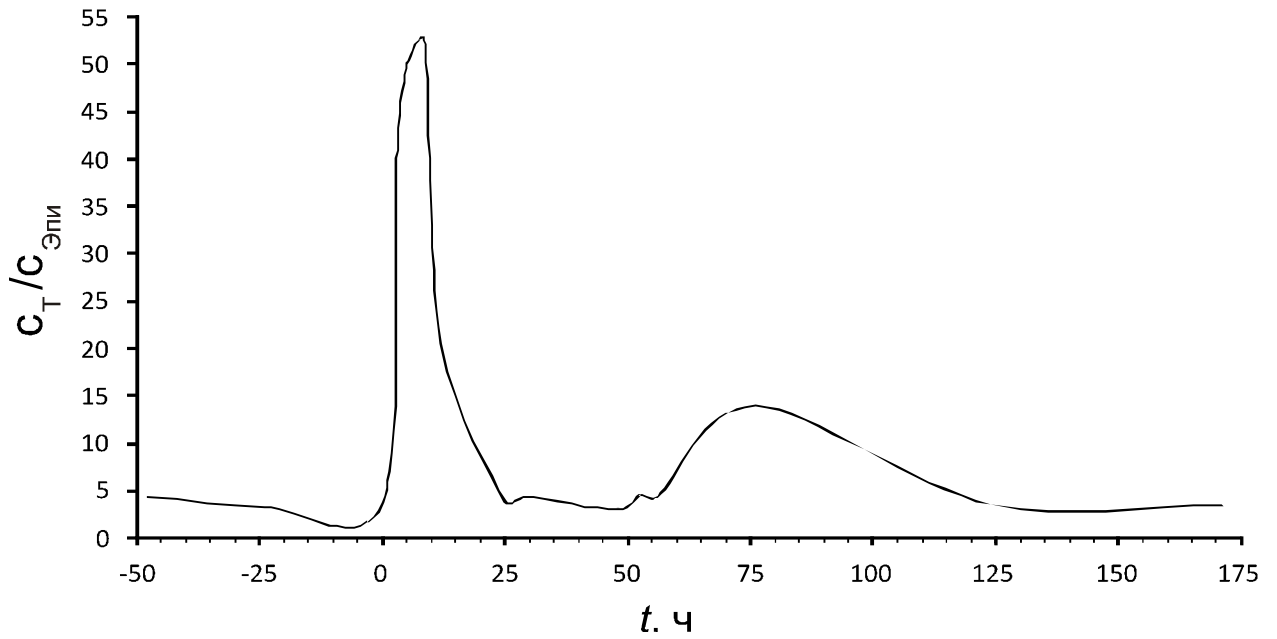


Рисунок 62 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата субъектом №3

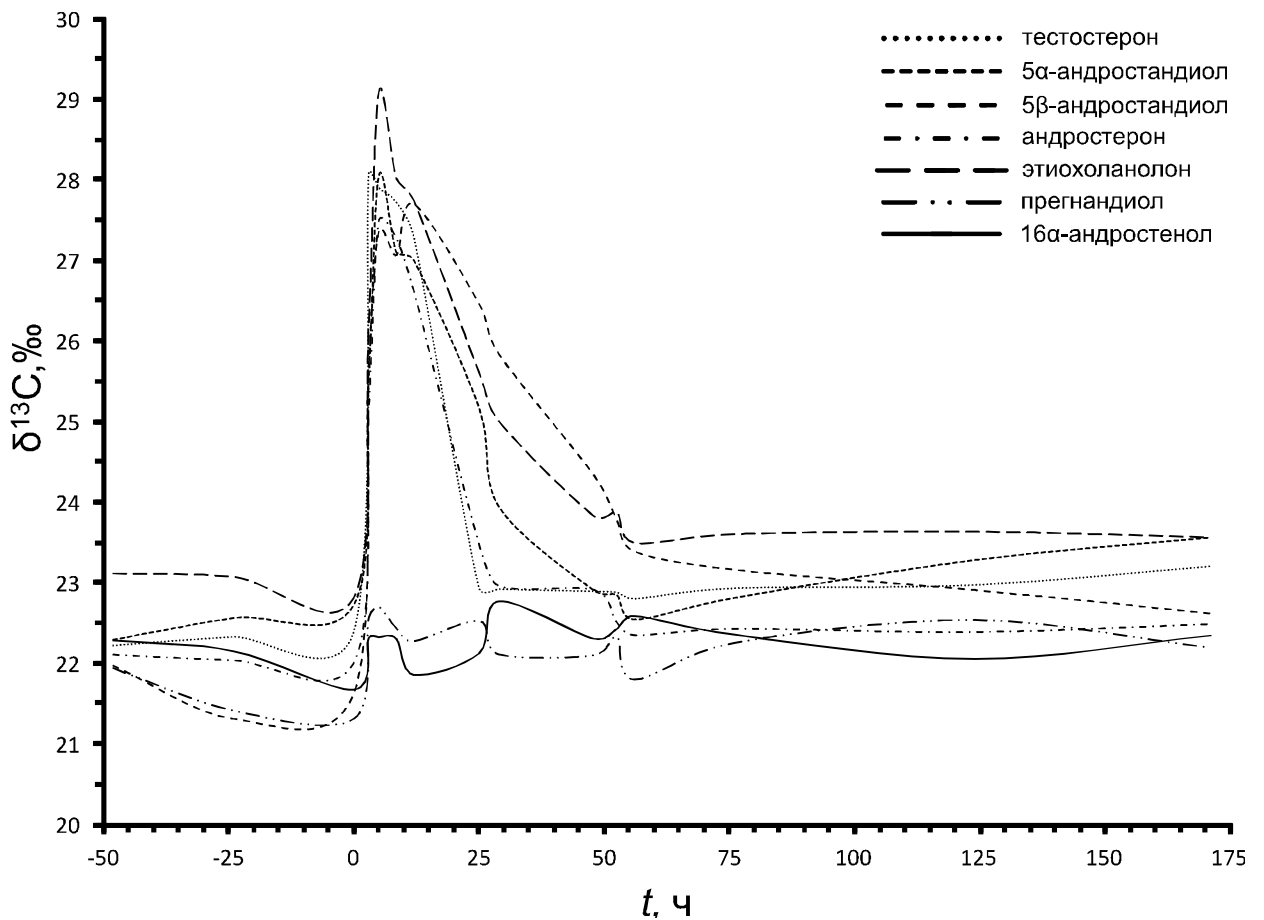


Рисунок 63 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеканоата субъектом №3 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 37 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеcanoата субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.3	0.4	0.0	0.2	1.2
-24	0.9	1.2	-0.1	0.6	1.7
0	1.1	1.4	0.3	0.7	1.5
3	5.5	3.0	3.1	2.6	3.6
5	5.2	5.4	4.7	4.8	6.4
9	5.3	4.7	4.6	4.8	5.6
12	5.0	4.7	5.4	4.3	5.5
25	0.4	2.7	4.0	1.0	3.1
29	0.8	1.8	3.7	0.9	2.9
48	0.8	0.8	2.2	0.8	1.7
53	0.6	0.5	1.5	0.2	1.6
56	1.0	0.8	1.6	0.6	1.7
76	0.7	0.6	0.9	0.2	1.4
124	0.4	0.8	0.4	-0.1	1.1
171	1.0	1.4	0.4	0.3	1.4

Таблица 38 — Значения $\Delta\delta(16\text{-en-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 80 мг тестостерона ундеcanoата субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-en-T})$	$\Delta\delta(16\text{-en-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-en-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-en-A})$	$\Delta\delta(16\text{-en-Э})$
-48	-0.1	0.0	-0.3	-0.2	0.8
-24	0.2	0.4	-0.8	-0.1	0.9
0	0.7	1.1	-0.1	0.3	1.1
3	5.8	3.3	3.4	2.8	3.9
5	5.6	5.7	5.1	5.2	6.8
9	5.4	4.8	4.8	5.0	5.7
12	5.4	5.2	5.9	4.8	5.9
25	0.8	3.1	4.4	1.4	3.5
29	0.2	1.2	3.1	0.2	2.2
48	0.6	0.6	2.0	0.6	1.5
53	0.5	0.4	1.4	0.1	1.5
56	0.2	0.0	0.8	-0.2	0.9
76	0.6	0.5	0.8	0.1	1.3
124	0.9	1.2	0.9	0.3	1.6
171	0.9	1.2	0.3	0.1	1.2

6.3. Препарат №2 – дегидроэпиандростерон

В силу особенностей метаболизма, приём дегидроэпиандростерона также существенно влияет на изотопный состав тестостерона и его метаболитов, однако последние этому влиянию подвержены сильнее, чем сам тестостерон. На рисунках 65, 67, 69 приведены диаграммы, отражающие зависимость изотопного соотношения тестостерона, его метаболитов, прегнандиола и 16-андростенола от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг ДГЭА каждым из трех добровольцев.

У субъекта №1 (таблицы 39, 40) $\Delta\delta$ для пары «ПД–Т» падает ниже 3‰ после 8 часов с момента употребления, для пары «ПД–А» – через 31 час, для остальных пар с прегнандиолом – после 62 часов. В случае 16-андростенола пара «16-ен–Т» возвращается к исходным значениям после 8 часов, «16-ен–А» – после 31 часа, остальные – после 48. Соотношение T/E выходит за рамки 4 только в первые 8 часов после приема (рисунок 64).

У субъекта №2 (таблицы 41, 42) завышенные значения $\Delta\delta$ для пар «ПД–Т» и «16-ен–Т» детектируются на протяжении 10 часов с момента приема, для пар «ПД–А» и «16-ен–А» – в первые 47 часов, для остальных пар с прегнандиолом и 16-андростенолом – в интервале 96 часов. Соотношение T/E не превышает 4 ни в одном из образцов добровольца №2, что свидетельствует в пользу быстрого метаболизма ДГЭА до продуктов биотрансформации тестостерона (рисунок 66).

У субъекта №3 (таблицы 43, 44) для пары «ПД–Т» $\Delta\delta \geq 3\text{‰}$ наблюдается в течение 7 часов с момента употребления, у пар «ПД–5 β -диол» и «ПД–А» – 24 часа, у пары «ПД–Э» – 62 часа, у «ПД–5 α -диол» – 73. В случае второго эндогенного маркера повышенное значение $\Delta\delta$ у «16-ен–Т» сохраняется на протяжении 12 часов, для «16-ен–А» – 24 часа, у «16-ен–5 β -диол» – 35 часов, а для пар «16-ен–5 α -диол» и «16-ен–Э» – 73 часа. У добровольца №3 критерий соотношения T/E малоинформативен (рисунок 68).

В отличие от синтетического тестостерона, в случае с дегидроэпиандростероном при сопоставимых дозировках наблюдается более широкий интервал времени, в течение которого достоверно детектируются

изменения изотопного состава. В течение 2–3 суток с момента приёма синтетического ДГЭА пробы мочи дают положительный результат методом изотопной хромато–масс–спектрометрии. 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.

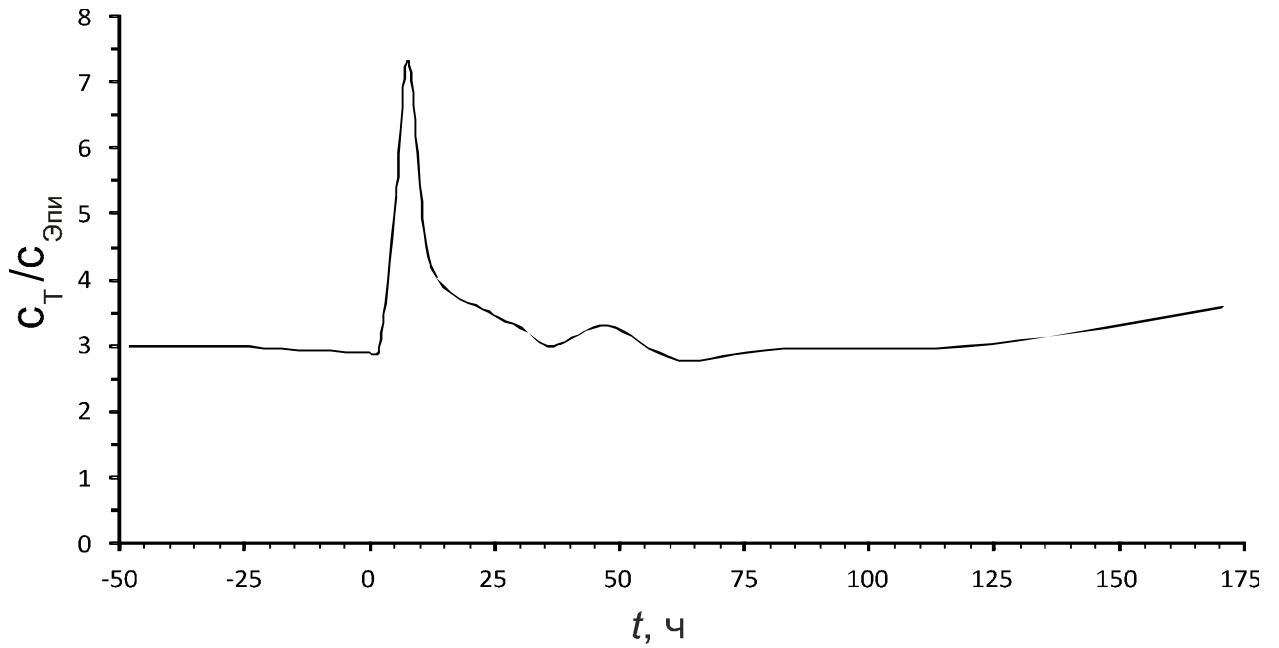


Рисунок 64 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №1

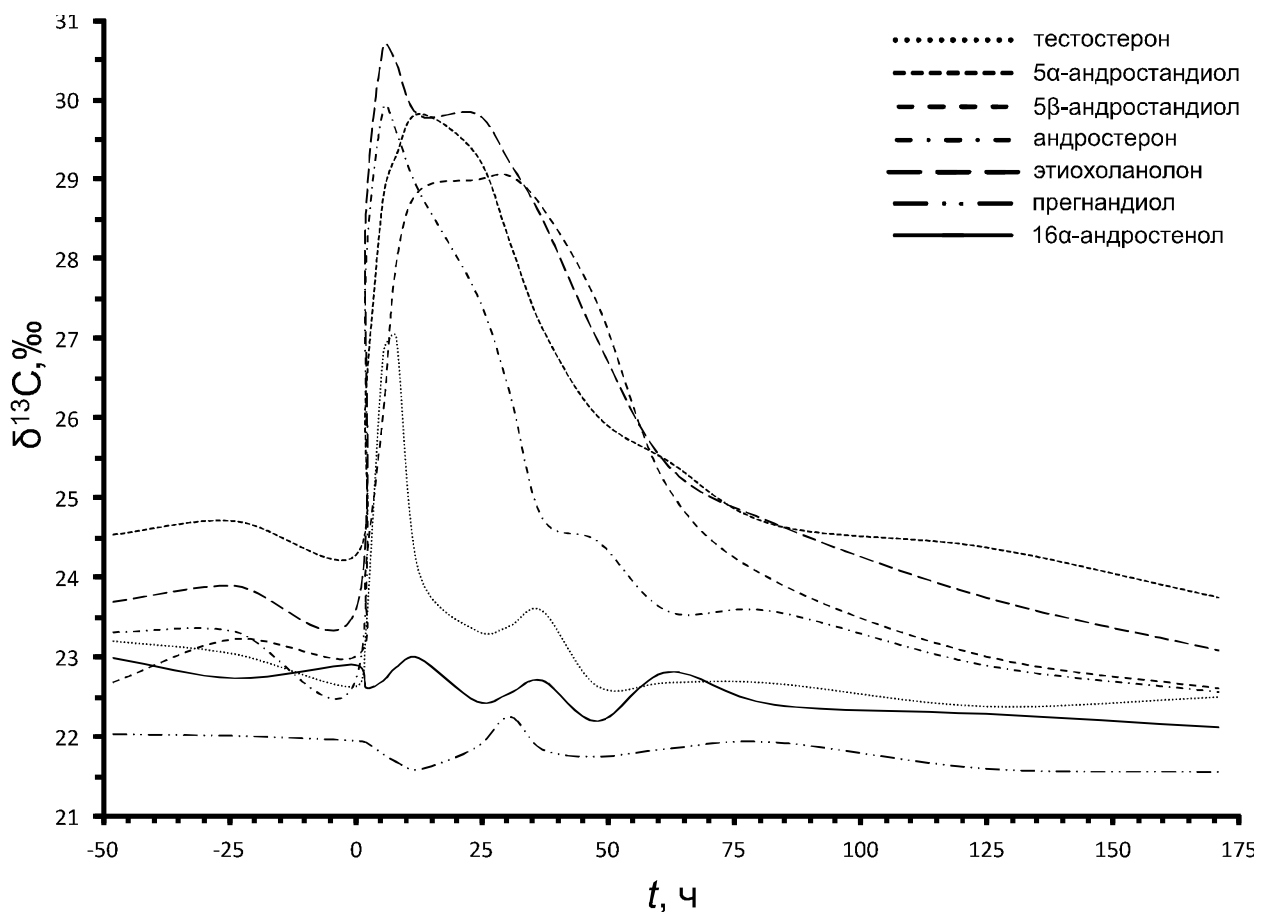


Рисунок 65 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-en* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №1 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 39 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	1.2	2.5	0.6	1.3	1.7
-24	1.0	2.7	1.2	1.3	1.9
0	0.7	2.3	1.0	0.8	1.6
2	1.4	4.4	2.2	5.9	6.6
6	5.0	7.0	4.3	8.1	8.9
8	5.3	7.6	6.2	7.9	8.8
13	2.5	8.2	7.3	7.3	8.2
24	1.4	7.4	7.1	5.7	7.9
31	1.1	6.0	6.8	4.1	7.0
37	1.7	5.3	6.8	2.9	6.7
48	0.9	4.3	5.7	2.7	5.2
62	0.8	3.6	3.3	1.7	3.5
83	0.7	2.7	2.0	1.6	2.7
125	0.8	2.8	1.4	1.3	2.1
171	0.9	2.2	1.0	1.0	1.5

Таблица 40 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	0.2	1.6	-0.3	0.3	0.7
-24	0.3	2.0	0.5	0.6	1.2
0	-0.3	1.4	0.1	-0.2	0.7
2	0.7	3.7	1.5	5.2	5.9
6	4.1	6.1	3.4	7.2	8.0
8	4.1	6.4	5.0	6.7	7.6
13	1.1	6.8	5.9	5.9	6.8
24	0.9	6.9	6.6	5.1	7.4
31	0.8	5.7	6.5	3.8	6.7
37	0.9	4.4	5.9	2.0	5.8
48	0.4	3.8	5.2	2.3	4.8
62	-0.1	2.7	2.3	0.8	2.6
83	0.3	2.3	1.6	1.2	2.3
125	0.1	2.1	0.7	0.6	1.5
171	0.4	1.7	0.5	0.4	1.0

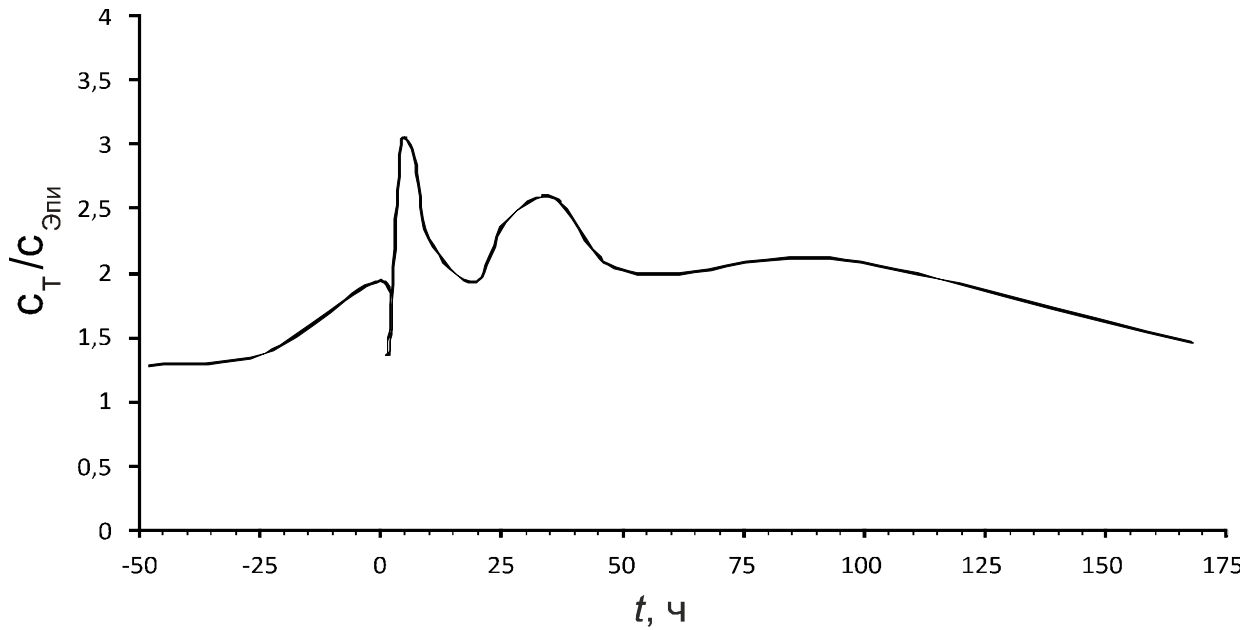


Рисунок 66 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №2

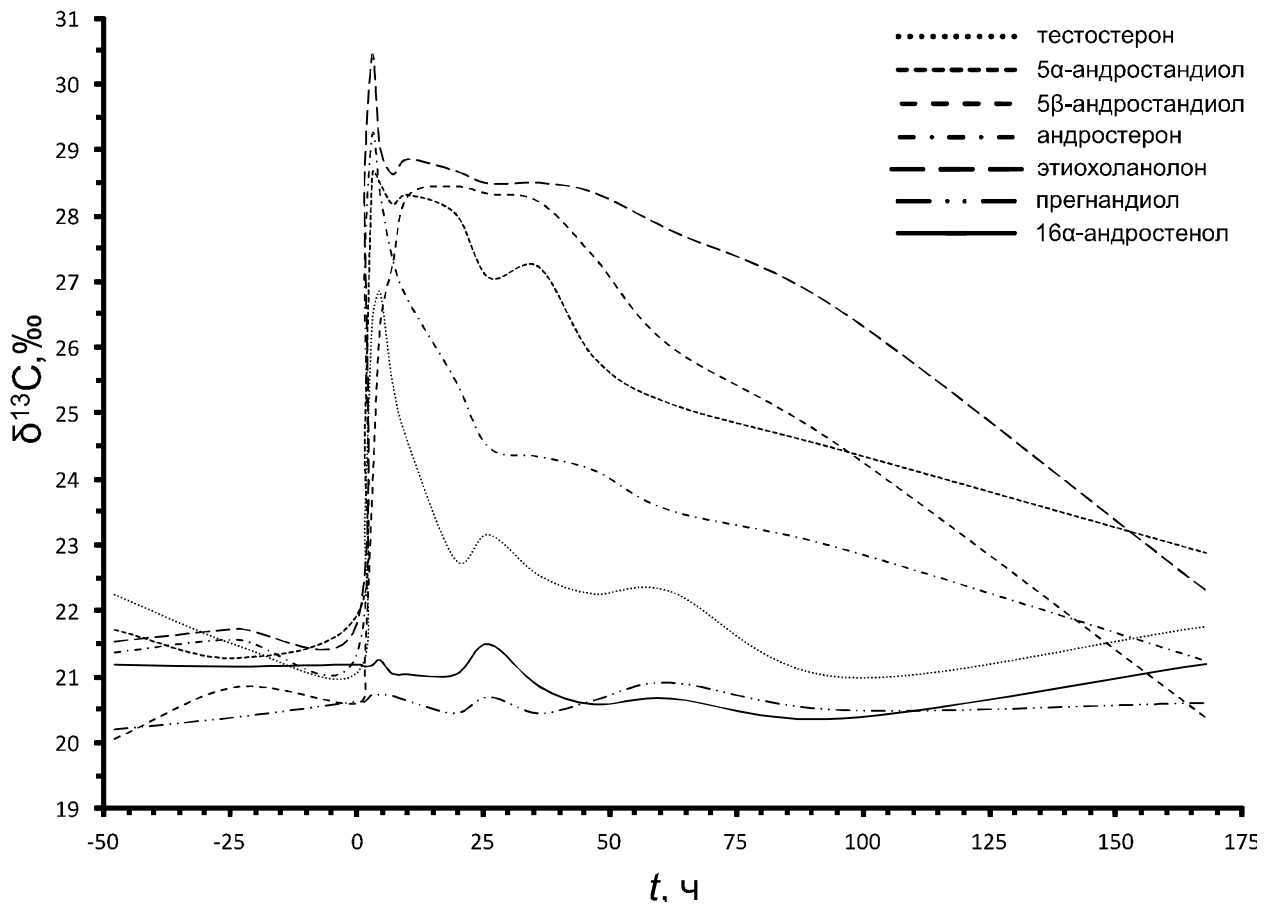


Рисунок 67 — Зависимость изотопного состава Т, 5α-диола, 5β-диола, А, Э, ПД и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №2 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 41 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	2.1	1.5	-0.1	1.2	1.3
-24	1.1	0.9	0.5	1.2	1.3
0	0.4	1.3	0.0	0.7	1.2
2	2.8	4.1	0.7	6.7	8.0
3	5.7	7.9	3.1	8.5	9.7
5	6.1	7.8	5.6	7.6	8.3
7	4.7	7.5	6.6	6.6	7.9
10	3.9	7.7	7.7	6.1	8.2
20	2.3	7.6	8.0	5.0	8.2
26	2.5	6.4	7.6	3.8	7.8
36	2.1	6.8	7.8	3.9	8.0
47	1.6	5.2	6.7	3.5	7.7
62	1.4	4.2	5.1	2.6	6.9
96	0.5	3.9	4.0	2.4	6.0
168	1.2	2.3	-0.2	0.6	1.7

Таблица 42 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-T})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-A})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	1.1	0.5	-1.1	0.2	0.4
-24	0.3	0.1	-0.3	0.4	0.6
0	-0.1	0.8	-0.6	0.2	0.6
2	2.3	3.6	0.1	6.2	7.5
3	5.3	7.5	2.7	8.1	9.3
5	5.6	7.3	5.1	7.1	7.8
7	4.4	7.1	6.2	6.3	7.6
10	3.5	7.3	7.3	5.7	7.8
20	1.7	7.0	7.4	4.5	7.6
26	1.7	5.6	6.9	3.0	7.0
36	1.7	6.4	7.4	3.5	7.6
47	1.7	5.3	6.8	3.6	7.8
62	1.6	4.5	5.4	2.9	7.1
96	0.6	4.1	4.1	2.6	6.2
168	0.6	1.7	-0.8	0.0	1.1

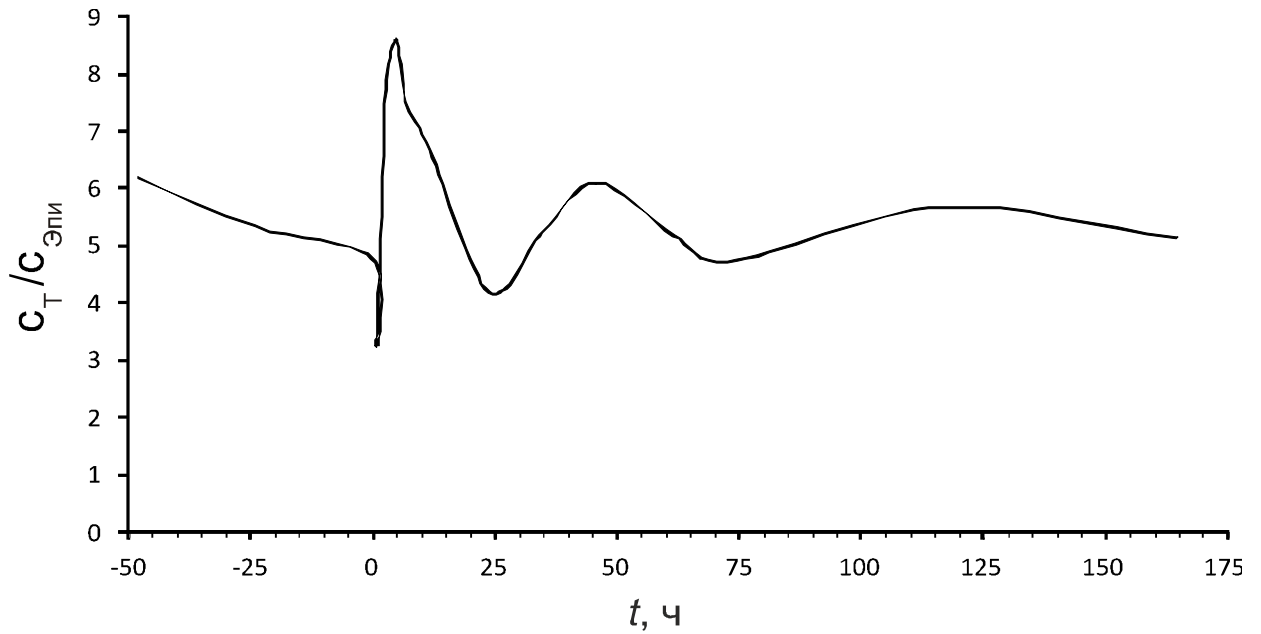


Рисунок 68 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №3

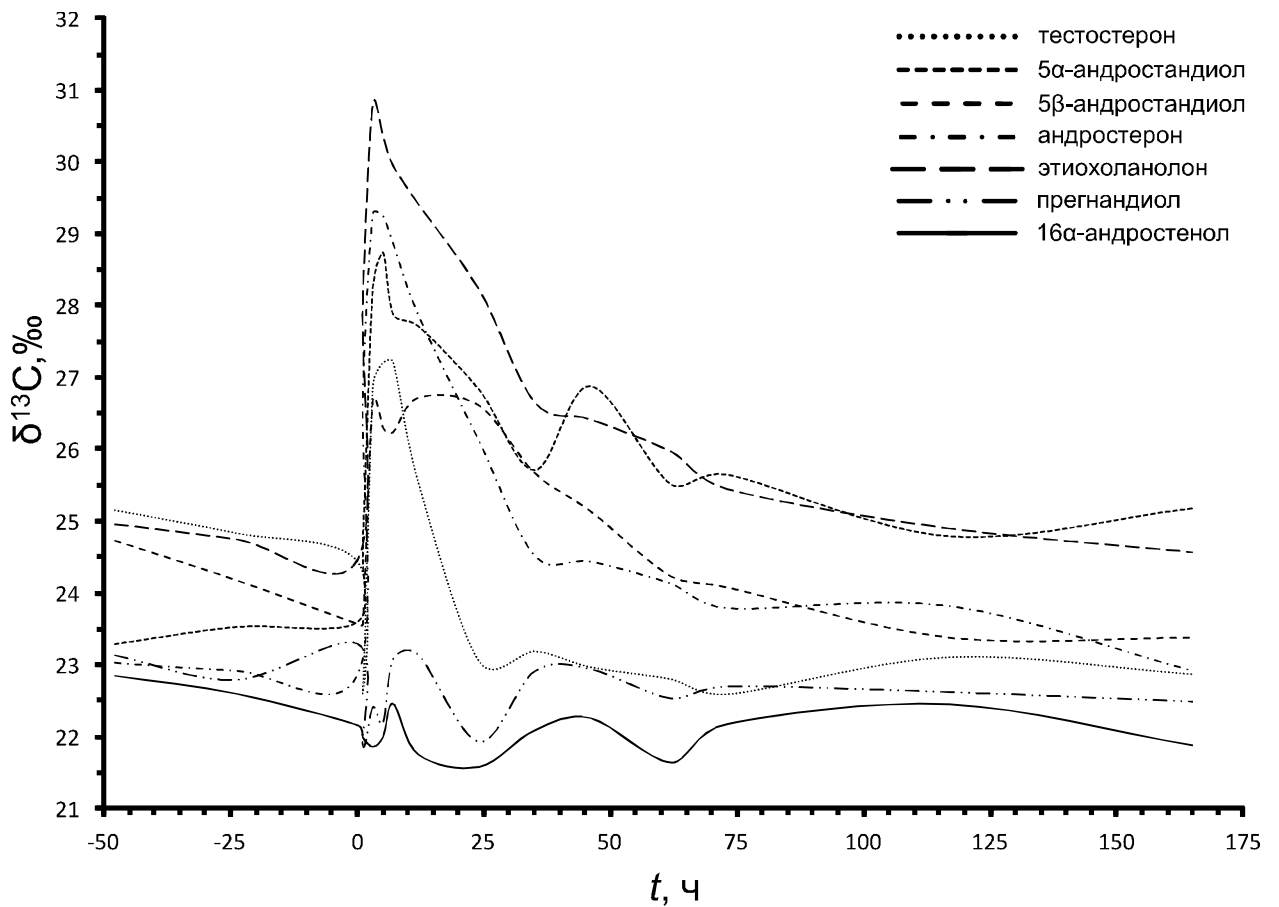


Рисунок 69 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №3 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 43 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	2.0	0.2	1.6	-0.1	1.8
-24	2.1	0.8	1.4	0.1	2.0
0	1.2	0.3	0.3	-0.4	1.2
1	0.8	2.8	1.7	4.9	6.2
3	4.5	5.9	4.3	6.9	8.4
5	5.0	6.6	4.1	7.1	8.2
7	4.2	4.8	3.2	5.8	6.9
12	2.4	4.6	3.6	4.7	6.3
24	1.1	4.9	4.7	4.2	6.3
35	0.3	2.8	2.8	1.6	3.8
46	0.0	4.0	2.2	1.5	3.5
62	0.3	3.0	1.7	1.6	3.4
73	-0.1	3.0	1.4	1.1	2.8
117	0.5	2.2	0.8	1.2	2.3
165	0.4	2.7	0.9	0.4	2.1

Таблица 44 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг дегидроэпиандростерона субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-T})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-A})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	2.3	0.4	1.9	0.2	2.1
-24	2.2	0.9	1.6	0.3	2.1
0	2.3	1.4	1.4	0.7	2.3
1	0.6	2.7	1.6	4.8	6.1
3	5.0	6.4	4.8	7.4	8.9
5	5.2	6.7	4.3	7.2	8.3
7	4.8	5.4	3.8	6.4	7.5
12	3.8	6.0	5.0	6.1	7.7
24	1.5	5.2	5.0	4.5	6.6
35	1.1	3.6	3.6	2.4	4.6
46	0.7	4.6	2.9	2.2	4.1
62	1.1	3.9	2.6	2.5	4.3
73	0.4	3.5	1.9	1.6	3.3
117	0.6	2.3	0.9	1.4	2.4
165	1.0	3.3	1.5	1.0	2.7

6.4. Препарат №3 – прегненолон

Употребление прегненолона не приводит к росту соотношения T/E (рисунки 70, 72 и 74), а вызывает изменение изотопного соотношения только у одного из исследованных в работе соединений – эндогенного маркера прегнандиола. Как видно из рисунков 71, 73 и 75 изотопный состав тестостерона, его метаболитов и 16-андростенола не изменяется при приеме 100 мг синтетического прегненолона у каждого из трех добровольцев. В соответствии с таблицами 46, 48 и 50 остаются постоянными и значения $\Delta\delta$ для пар «16-ен-ЦС». Соотношение T/E превышает 4 только у добровольца №3, естественно предрасположенного к такого рода метаболизму андрогенов.

У субъекта №1 нормализация изотопного состава прегнандиола происходит после 27 часов с момента употребления прегненолона (таблица 45). У добровольца №3 этот же процесс занимает 69 часов (таблица 49), а у субъекта №2 даже после 175 часов после употребления не наблюдается стабилизации изотопного состава прегнандиола (таблица 47).

Прегненолон не относится к группе популярных допинговых препаратов, так как в сравнении с другими субстанциями не производит выраженного анаболического эффекта. Судя по всему, по этой же причине он не включен в запрещенный список ВАДА. Тем не менее, при попадании в организм прегненолон селективно влияет на изотопное соотношение эндогенного маркера прегнандиола. В случае совместного приема 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.

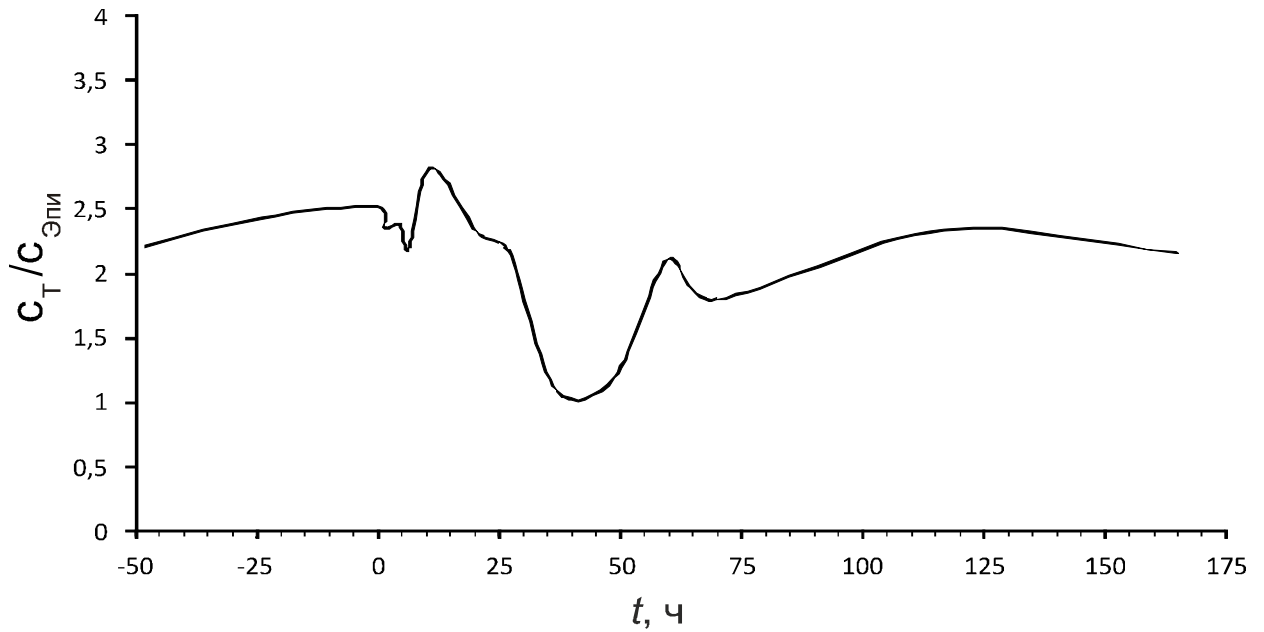


Рисунок 70 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №1

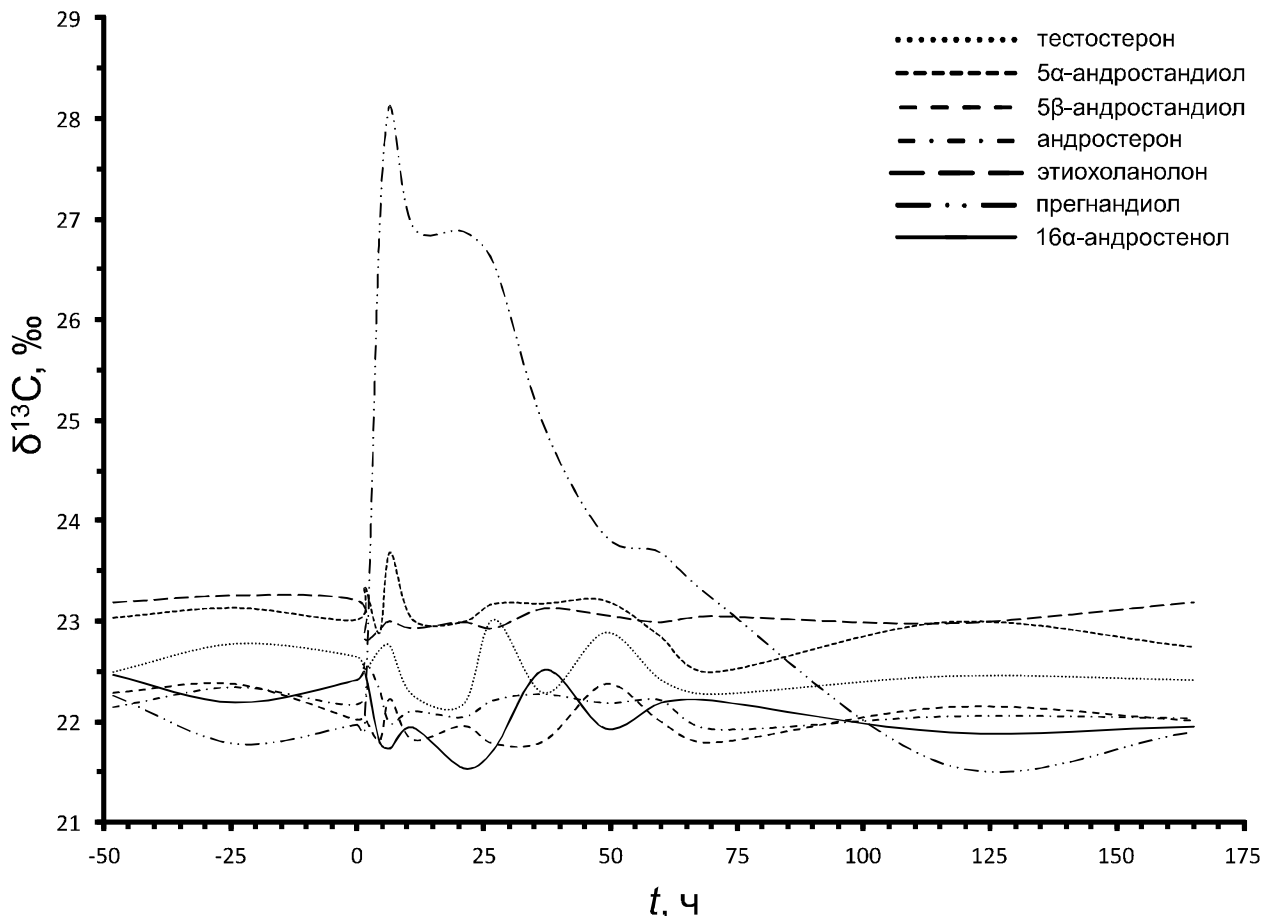


Рисунок 71 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α-диола*, *5β-диола*, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №1 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 45 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.2	0.8	0.0	-0.1	0.9
-24	1.0	1.4	0.6	0.6	1.5
0	0.7	1.0	0.1	0.2	1.2
2	0.6	1.4	0.1	0.7	0.9
5	-4.2	-4.1	-5.2	-4.7	-4.0
7	-5.4	-4.5	-5.9	-6.2	-5.1
11	-4.7	-3.9	-5.1	-4.8	-4.0
21	-4.7	-3.9	-4.9	-4.8	-3.9
27	-3.5	-3.4	-4.8	-4.4	-3.6
37	-2.6	-1.8	-3.1	-2.7	-1.8
49	-1.0	-0.7	-1.5	-1.7	-0.8
60	-1.3	-0.8	-1.7	-1.5	-0.7
70	-0.9	-0.7	-1.4	-1.3	-0.2
117	0.9	1.4	0.6	0.5	1.4
165	0.5	0.8	0.1	0.1	1.3

Таблица 46 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №1

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	0.0	0.6	-0.2	-0.3	0.7
-24	0.6	0.9	0.2	0.1	1.1
0	0.2	0.6	-0.4	-0.3	0.8
2	0.0	0.8	-0.5	0.1	0.3
5	0.9	1.1	0.0	0.5	1.1
7	1.0	2.0	0.5	0.3	1.3
11	0.3	1.1	-0.1	0.2	1.0
21	0.6	1.5	0.4	0.5	1.5
27	1.3	1.5	0.1	0.5	1.2
37	-0.2	0.7	-0.7	-0.3	0.6
49	1.0	1.3	0.4	0.3	1.1
60	0.2	0.6	-0.2	0.0	0.8
70	0.1	0.3	-0.4	-0.3	0.8
117	0.6	1.1	0.3	0.2	1.1
165	0.5	0.8	0.1	0.1	1.2

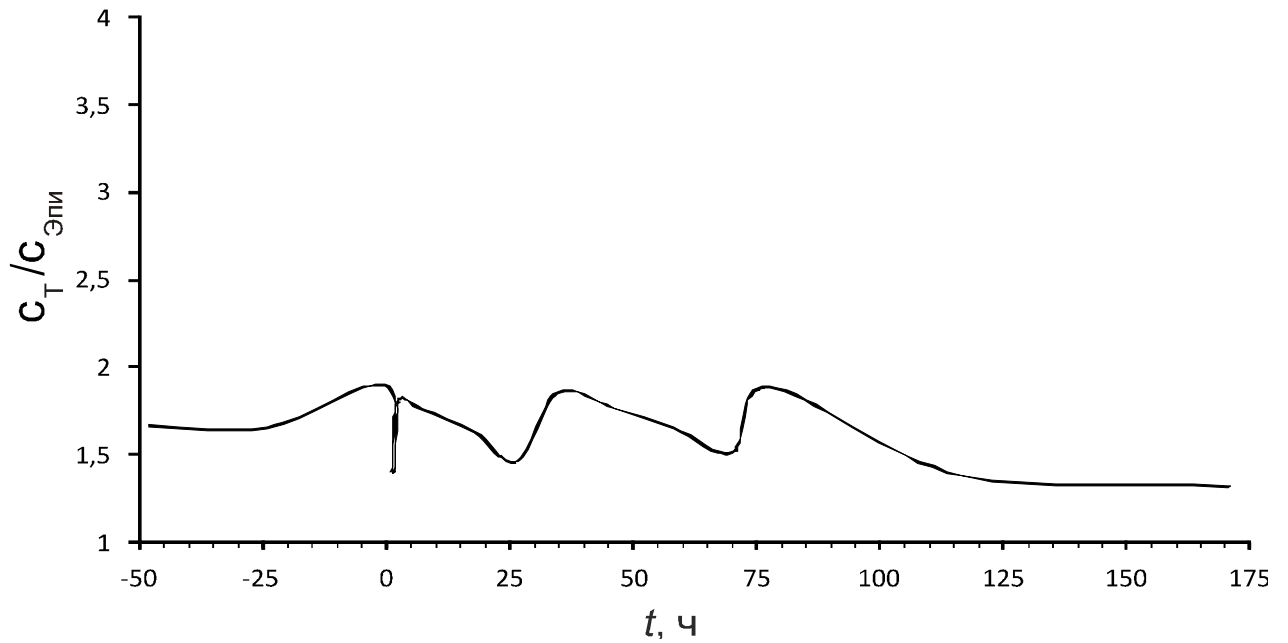


Рисунок 72 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №2

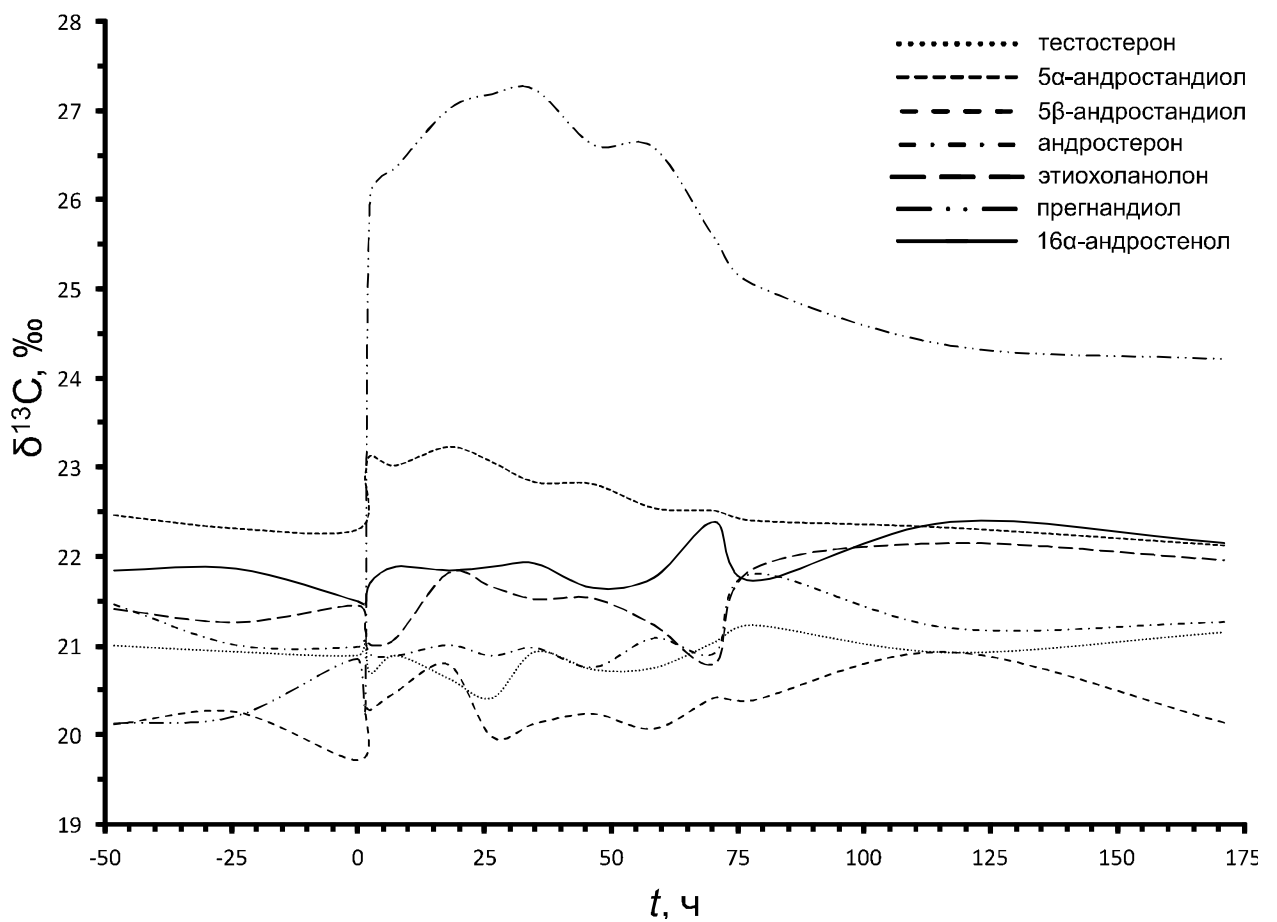


Рисунок 73 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №2 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 47 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.9	2.3	0.0	1.3	1.3
-24	0.7	2.1	0.0	0.8	1.1
0	0.0	1.5	-1.2	0.1	0.6
2	0.8	2.7	0.0	0.8	0.9
3	-5.4	-2.9	-5.8	-5.2	-5.0
8	-5.5	-3.3	-5.9	-5.5	-5.3
18	-6.4	-3.8	-6.2	-6.0	-5.2
27	-6.8	-4.1	-7.2	-6.3	-5.5
35	-6.3	-4.4	-7.1	-6.3	-5.7
47	-5.9	-3.8	-6.4	-5.9	-5.1
59	-5.8	-4.0	-6.5	-5.5	-5.4
71	-4.5	-3.1	-5.2	-4.7	-4.8
78	-3.8	-2.7	-4.7	-3.3	-3.2
117	-3.5	-2.0	-3.5	-3.2	-2.2
171	-3.1	-2.1	-4.1	-3.0	-2.3

Таблица 48 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №2

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	-0.8	0.6	-1.7	-0.4	-0.4
-24	-0.9	0.5	-1.6	-0.9	-0.6
0	-0.6	0.8	-1.8	-0.5	0.0
2	-0.4	1.5	-1.2	-0.4	-0.3
3	-1.0	1.4	-1.4	-0.8	-0.7
8	-1.0	1.2	-1.4	-1.0	-0.8
18	-1.2	1.4	-1.1	-0.8	0.0
27	-1.5	1.2	-1.9	-1.0	-0.2
35	-1.0	0.9	-1.8	-1.0	-0.4
47	-0.9	1.2	-1.4	-0.9	-0.1
59	-1.0	0.8	-1.7	-0.7	-0.5
71	-1.4	0.1	-2.0	-1.5	-1.6
78	-0.5	0.7	-1.3	0.1	0.2
117	-1.5	-0.1	-1.5	-1.2	-0.2
171	-1.0	0.0	-2.0	-0.9	-0.2

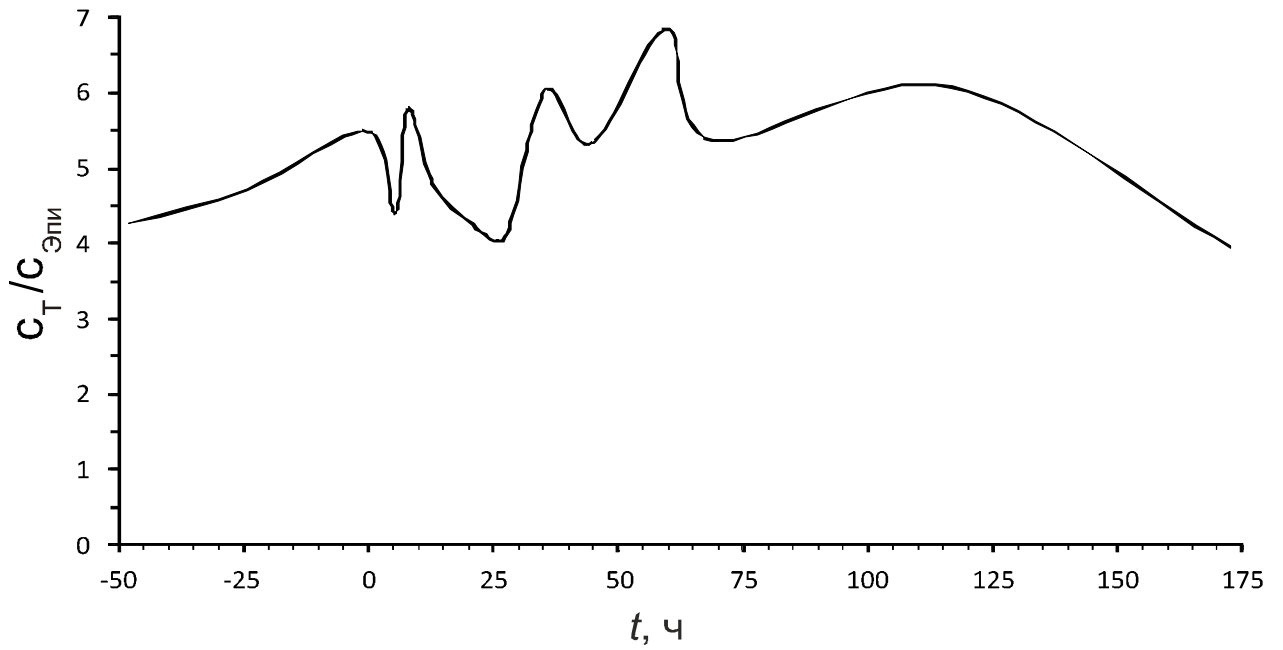


Рисунок 74 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №3

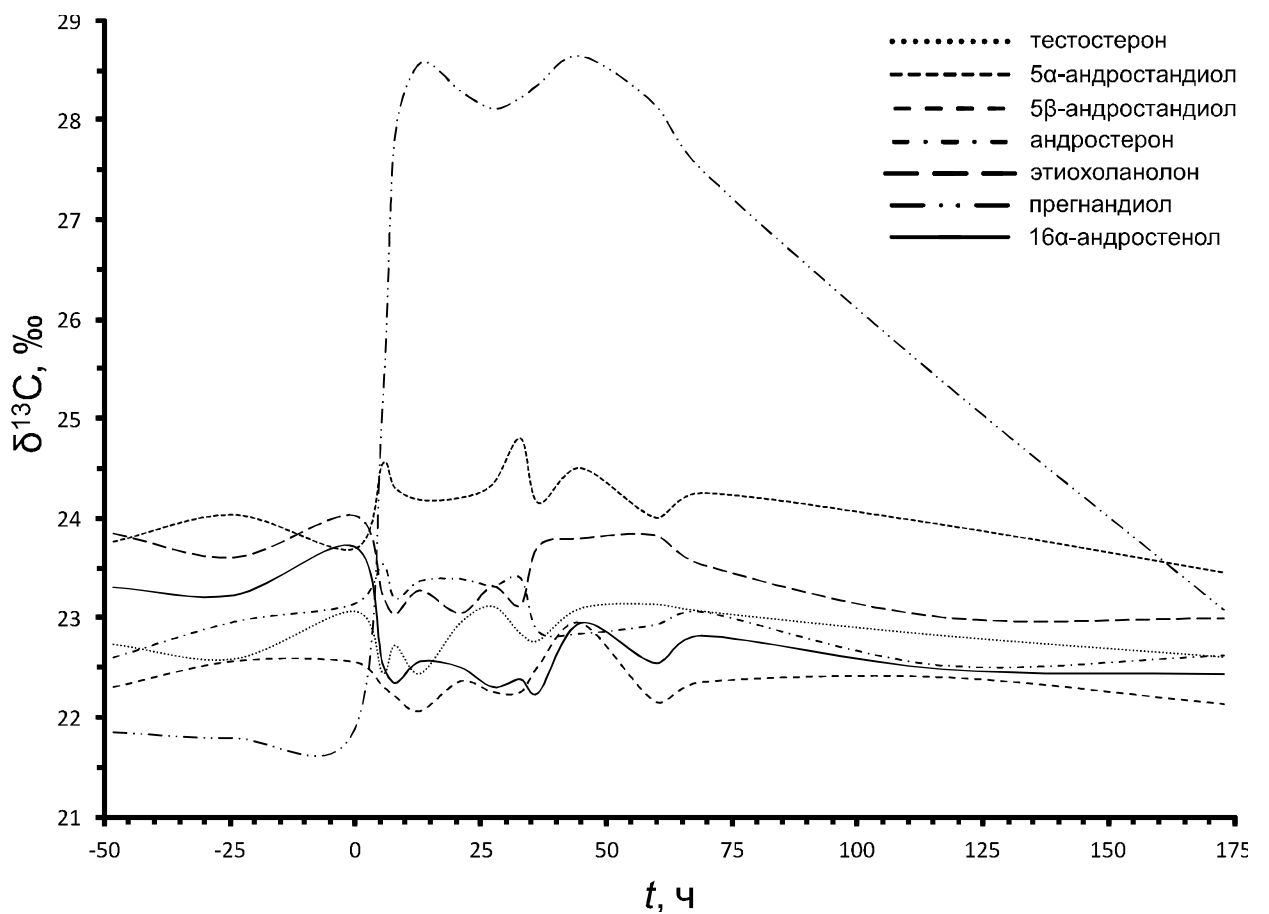


Рисунок 75 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №3 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 49 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.9	1.9	0.4	0.8	2.0
-24	0.8	2.3	0.8	1.2	1.8
0	1.2	1.8	0.7	1.3	2.1
6	-2.7	-0.6	-2.8	-1.6	-1.9
8	-5.1	-3.5	-5.6	-4.7	-4.8
13	-6.1	-4.4	-6.5	-5.2	-5.3
21	-5.3	-4.1	-5.9	-4.9	-5.3
28	-5.0	-3.8	-5.9	-4.8	-4.8
33	-5.4	-3.4	-6.0	-4.8	-5.1
37	-5.6	-4.2	-5.8	-5.5	-4.6
45	-5.5	-4.1	-5.7	-5.8	-4.9
60	-5.0	-4.1	-6.0	-5.2	-4.3
69	-4.4	-3.2	-5.2	-4.4	-4.0
117	-2.6	-1.4	-3.0	-2.9	-2.4
173	-0.5	0.4	-0.9	-0.5	-0.1

Таблица 50 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг прегненолона субъектом №3 (зеленым цветом выделены точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-T})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-A})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	-0.6	0.5	-1.0	-0.7	0.5
-24	-0.7	0.8	-0.7	-0.3	0.4
0	-0.6	0.0	-1.2	-0.6	0.3
6	-0.1	2.0	-0.2	1.0	0.7
8	0.4	2.0	-0.1	0.9	0.7
13	-0.1	1.6	-0.5	0.8	0.7
21	0.4	1.7	-0.1	0.9	0.5
28	0.8	2.1	-0.1	1.0	1.0
33	0.5	2.4	-0.1	1.0	0.7
37	0.5	1.9	0.3	0.6	1.5
45	0.2	1.6	0.0	-0.1	0.8
60	0.6	1.5	-0.4	0.4	1.3
69	0.3	1.4	-0.5	0.2	0.7
117	0.3	1.5	-0.1	0.0	0.5
173	0.2	1.0	-0.3	0.2	0.6

6.5. Препарат №4 – болдион

Употребление болдиона не влияет на соотношение T/E (рисунки 76, 78, 80) и $\delta^{13}C$ тестостерона, однако изменяет изотопный состав его метаболитов. На рисунках 77, 79, 81 представлены диаграммы, отражающие зависимость изотопного состава тестостерона, его метаболитов, прегнандиола и 16-андростенола от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона каждым из трех добровольцев.

У субъекта №1 (таблицы 51, 52) значения $\Delta\delta$ для пар «ПД-А» и «16-ен-А» превышают или равны 3‰ в интервале от 5 до 18 часов с момента приема препарата, у пар «ПД-5 β -диол» и «16-ен-5 β -диол» – от 18 до 47 часов, для пар «ПД-5 α -диол», «16-ен-5 α -диол», «ПД-Э» и «16-ен-Э» – от 5 до 40 часов.

У субъекта №2 (таблицы 53, 54) завышенные значения $\Delta\delta$ для пар «ПД-А» и «16-ен-А» регистрируются в интервале от 5 до 29 и 12 часов соответственно, у пар «ПД-5 β -диол», «16-ен-5 β -диол», «ПД-Э» и «16-ен-Э» – от 12 до 56 часов, для пар «ПД-5 α -диол» и «16-ен-5 α -диол» – от 5 до 86 часов.

У субъекта №3 (таблицы 55, 56) значения $\Delta\delta$, выходящие за рамки порогового, для пар «ПД-А» и «16-ен-А» наблюдается в промежутке от 6 до 20 и 25 часов, соответственно, у пар «ПД-5 β -диол», «ПД-Э», «16-ен-5 β -диол» и «16-ен-Э» – от 6 до 33 часов, а для пар «ПД-5 α -диол» и «16-ен-5 α -диол» – от 6 до 50 часов.

Согласно экспериментальным данным, представленным в таблицах 43–48, при попадании синтетического болдиона в человеческий организм наибольшему влиянию подвергается изотопное соотношение 5 α -андростандиола, в меньшей степени – 5 β -андростандиола и этиохоланолона. Значения $\Delta\delta$ для пар этих соединений с эндогенными маркерами превышают 3‰ в интервале от 30 до 80 часов с момента приёма болдиона в зависимости от субъекта. Пары эндогенных маркеров с андростероном имеют меньший временной интервал детектирования и потому не так информативны в случае установления факта употребления болдиона.

Поскольку основной метаболит болдиона имеет схожую с этиохоланолоном химическую структуру и, как следствие, хроматографические свойства, фракцию III (целевые компоненты фракции – А и Э) 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.

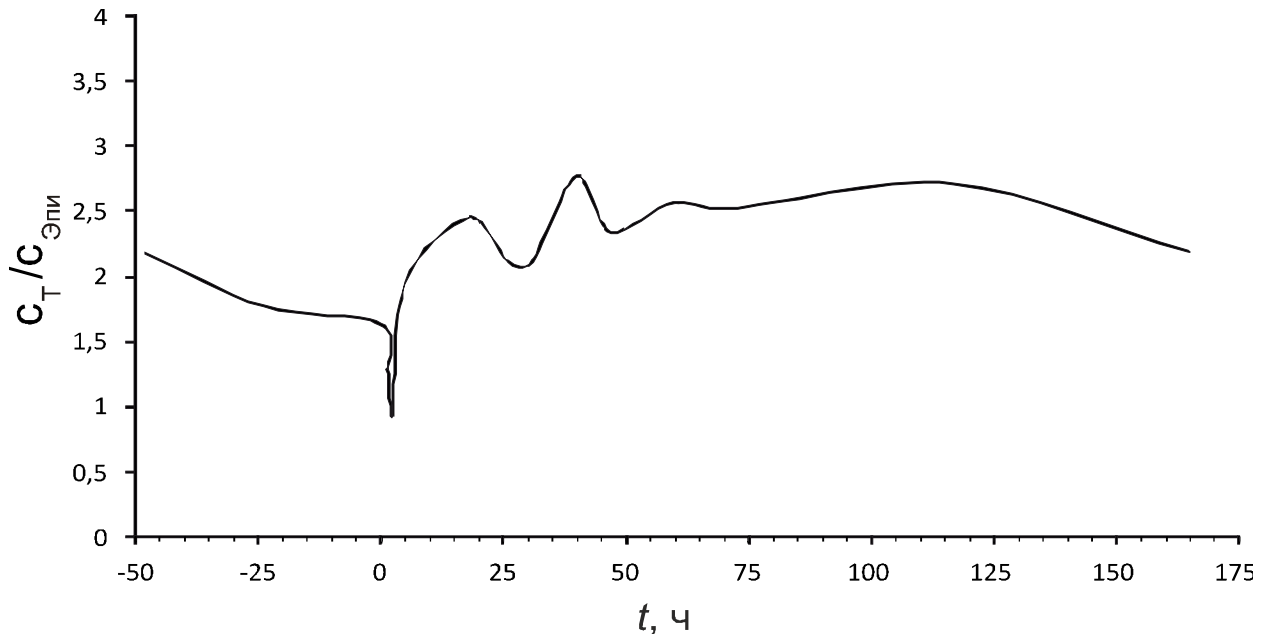


Рисунок 76 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №1

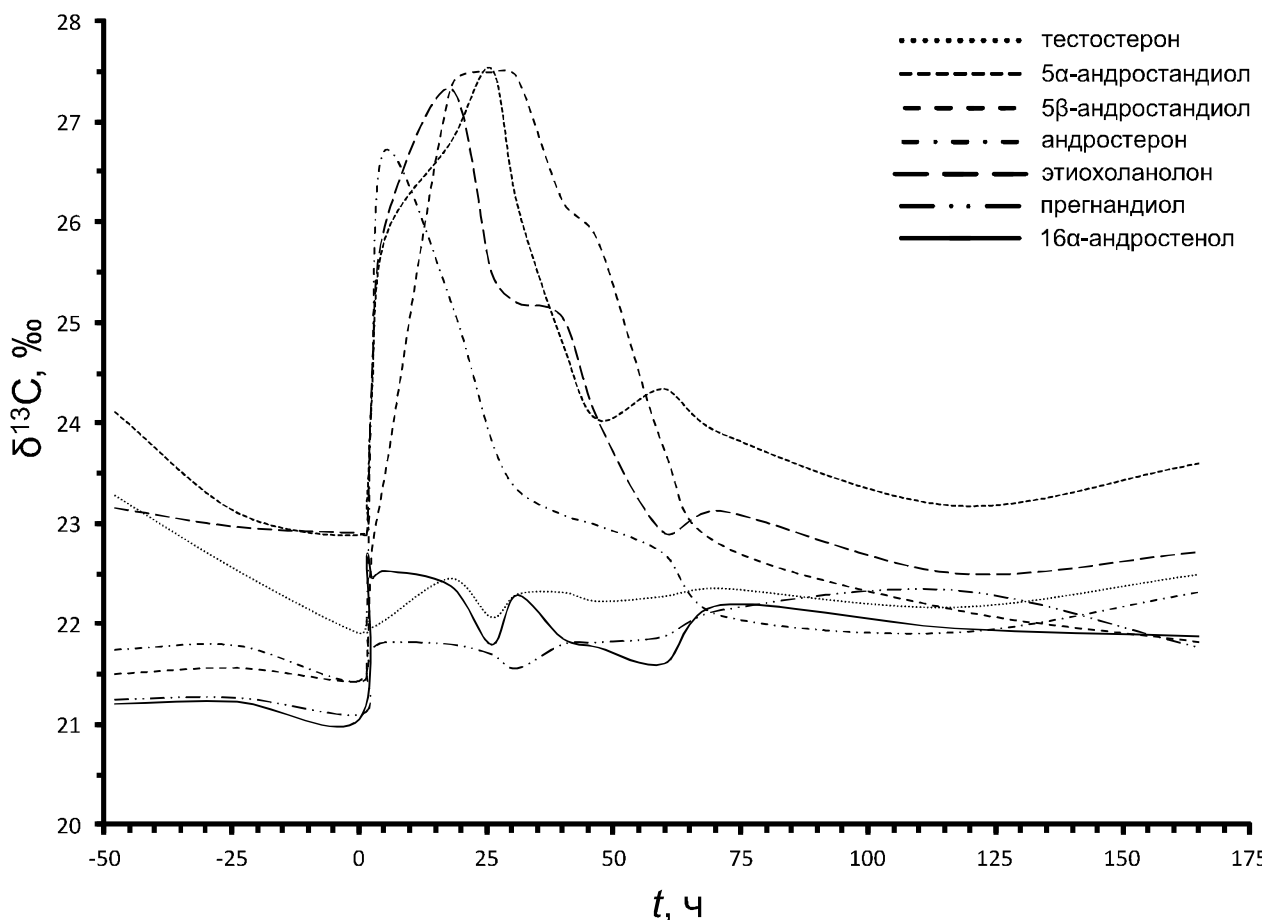


Рисунок 77 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №1 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 51 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	2.0	2.9	0.3	0.5	1.9
-24	1.3	1.8	0.3	0.5	1.7
0	0.8	1.8	0.3	0.3	1.8
2	0.5	1.7	0.1	0.6	1.4
3	0.2	2.6	1.0	2.7	2.7
5	0.2	4.0	1.7	4.9	4.1
18	0.6	5.0	5.6	3.4	5.5
26	0.4	5.8	5.8	2.1	3.8
31	0.7	4.6	5.9	1.8	3.6
40	0.5	3.0	4.4	1.3	3.3
47	0.4	2.2	4.0	1.2	2.2
60	0.4	2.5	1.9	0.8	1.0
71	0.2	1.8	0.6	-0.1	1.0
117	-0.2	0.8	-0.2	-0.4	0.2
165	0.7	1.8	0.1	0.6	0.9

Таблица 52 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	2.1	2.9	0.3	0.6	2.0
-24	1.3	1.9	0.3	0.6	1.8
0	0.8	1.8	0.4	0.4	1.9
2	-0.6	0.6	-1.0	-0.5	0.2
3	-0.5	1.9	0.3	2.0	2.0
5	-0.5	3.3	0.9	4.2	3.4
18	0.1	4.4	5.0	2.8	5.0
26	0.3	5.7	5.7	2.0	3.7
31	0.0	3.9	5.2	1.1	2.9
40	0.5	2.9	4.4	1.2	3.2
47	0.5	2.3	4.1	1.2	2.3
60	0.7	2.7	2.1	1.1	1.3
71	0.2	1.7	0.6	-0.1	0.9
117	0.2	1.2	0.2	0.0	0.6
165	0.6	1.7	-0.1	0.4	0.8

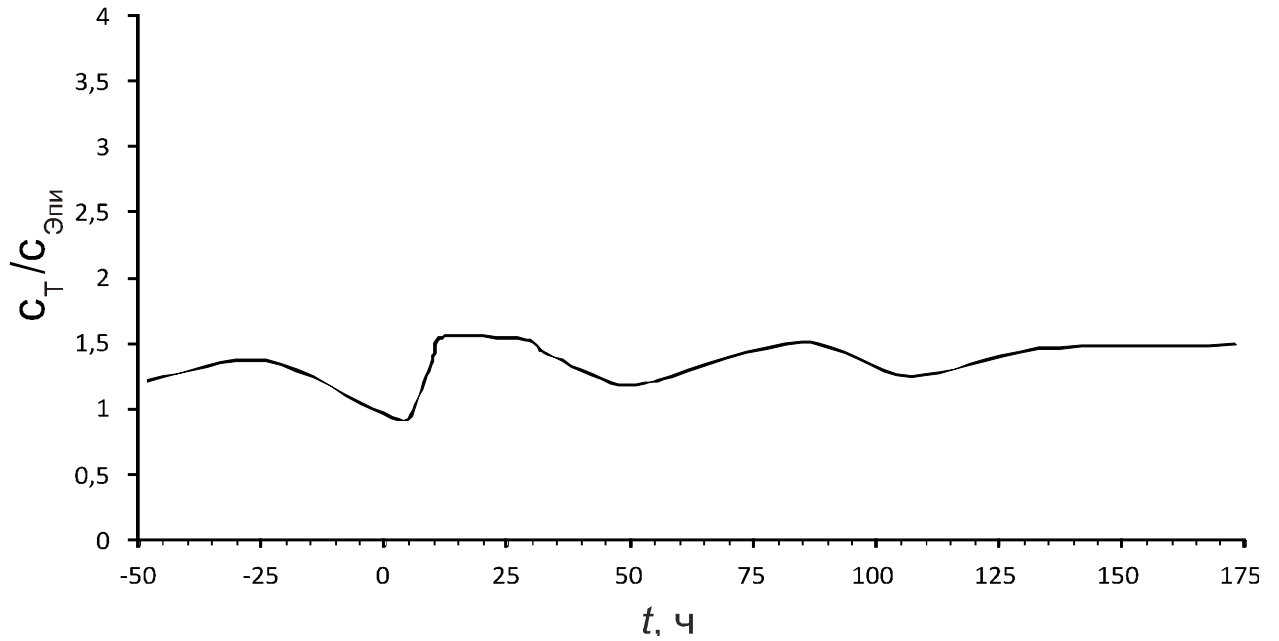


Рисунок 78 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №2

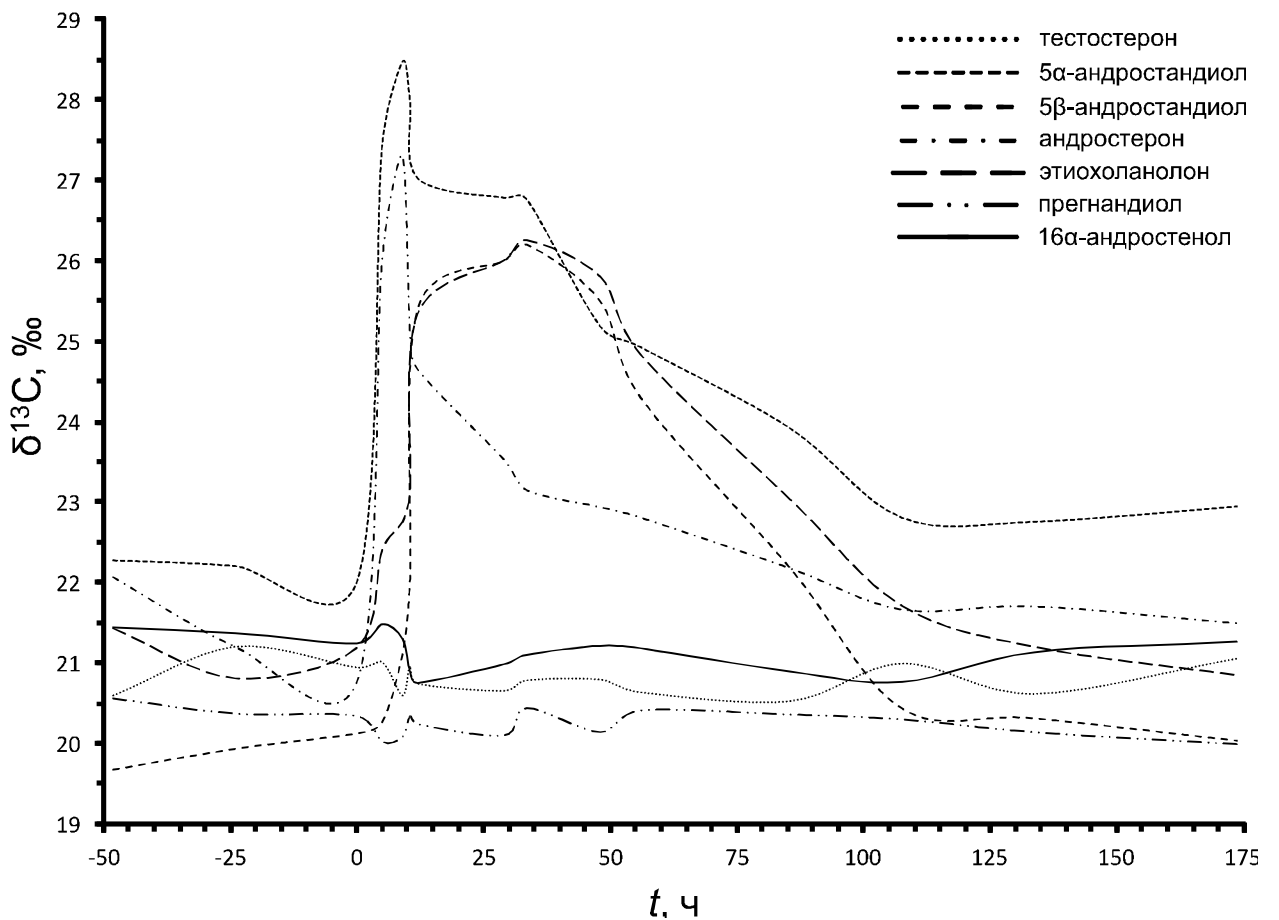


Рисунок 79 — Зависимость изотопного состава Т, 5α-диола, 5β-диола, А, Э, ПД и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №2 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 53 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.0	1.7	-0.9	1.5	0.9
-24	0.8	1.8	-0.4	0.8	0.4
0	0.6	1.7	-0.2	0.4	0.8
5	1.0	7.4	0.2	6.0	2.4
9	0.5	8.4	1.0	7.2	2.7
11	0.6	7.6	1.7	4.8	2.8
12	0.5	6.8	5.2	4.4	5.1
29	0.6	6.7	5.9	3.4	5.9
34	0.3	6.3	5.8	2.7	5.8
48	0.7	5.0	5.4	2.8	5.7
56	0.2	4.5	3.9	2.4	4.4
86	0.2	3.5	1.8	1.8	2.7
108	0.7	2.5	0.1	1.4	1.4
134	0.5	2.6	0.2	1.6	1.1
174	1.1	2.9	0.0	1.5	0.9

Таблица 54 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	-0.8	0.8	-1.8	0.6	0.0
-24	-0.2	0.8	-1.4	-0.2	-0.6
0	-0.3	0.8	-1.1	-0.5	-0.1
5	-0.5	5.9	-1.2	4.5	0.9
9	-0.7	7.2	-0.2	6.0	1.4
11	0.1	7.1	1.2	4.2	2.2
12	0.0	6.3	4.7	3.9	4.6
29	-0.3	5.8	5.0	2.5	5.0
34	-0.3	5.7	5.1	2.0	5.1
48	-0.4	4.0	4.3	1.7	4.6
56	-0.6	3.7	3.1	1.6	3.6
86	-0.4	3.0	1.3	1.3	2.1
108	0.2	2.0	-0.3	0.9	0.9
134	-0.5	1.6	-0.8	0.6	0.1
174	-0.2	1.7	-1.2	0.2	-0.4

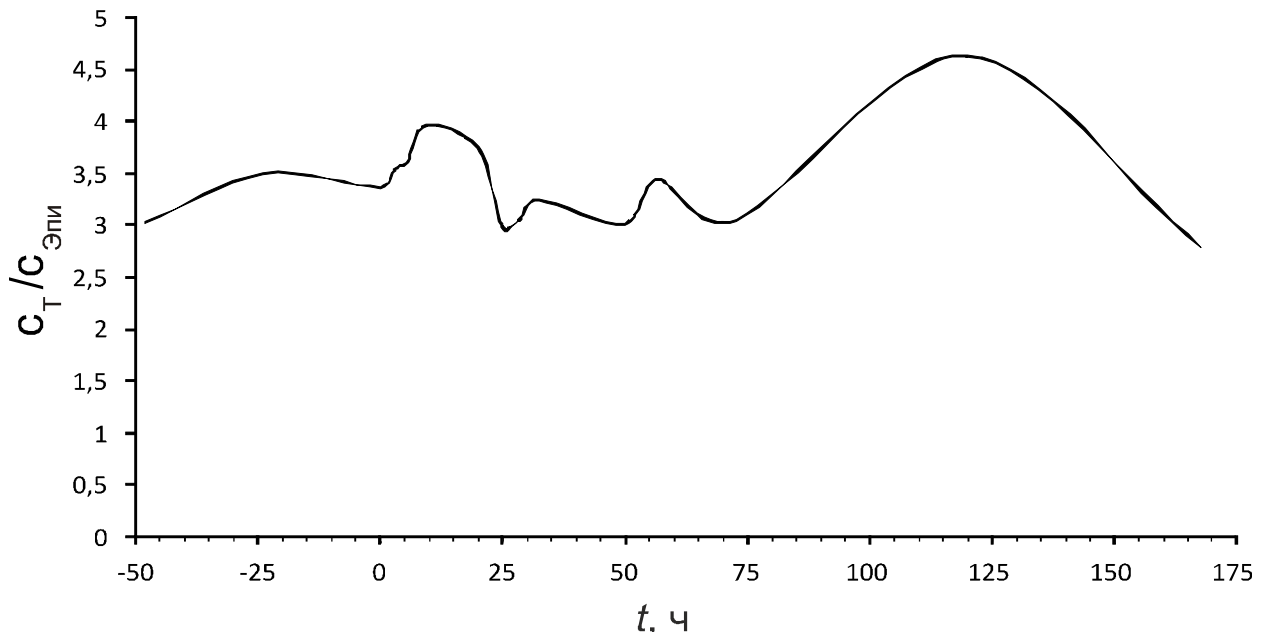


Рисунок 80 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №3

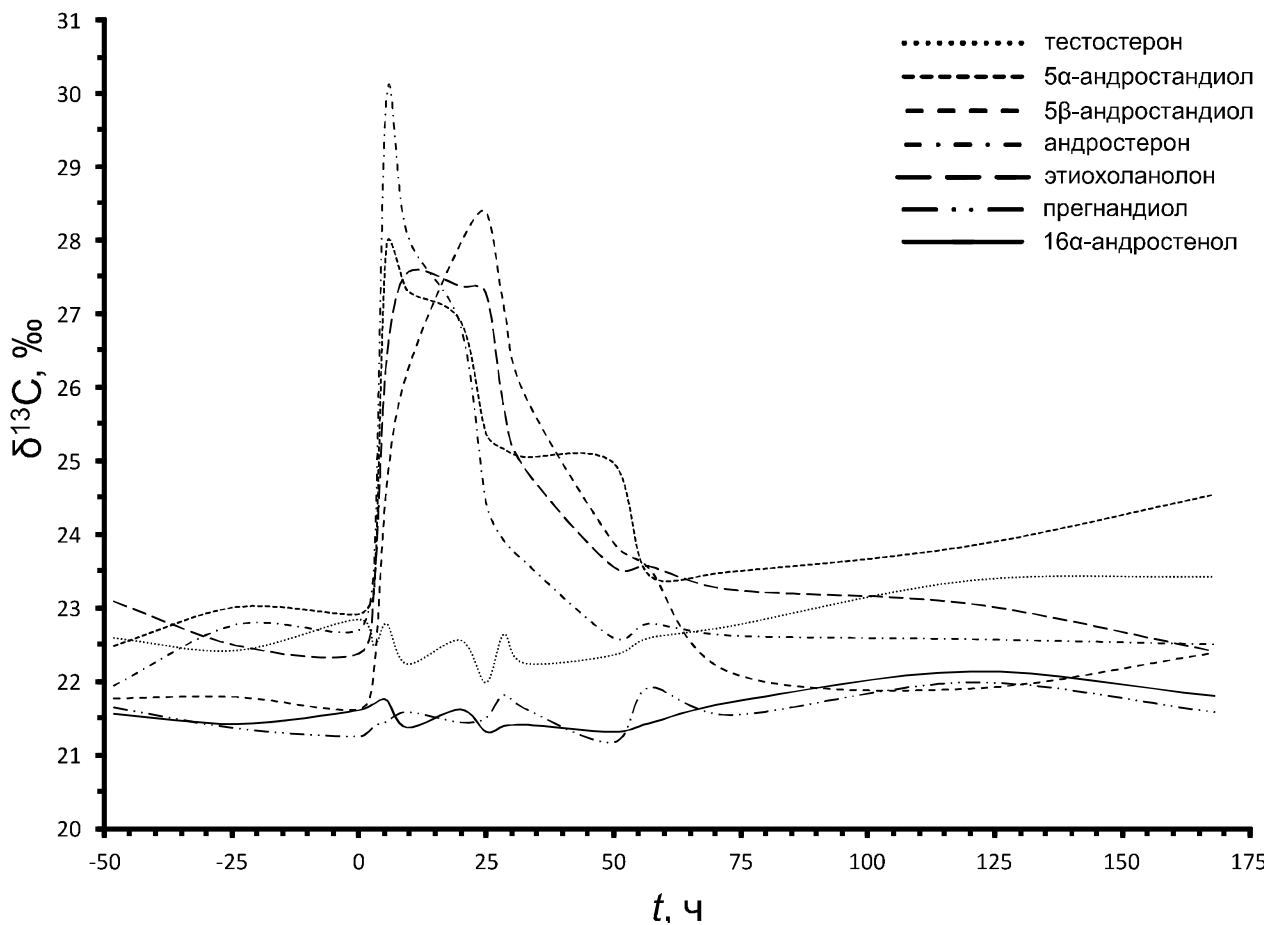


Рисунок 81 — Зависимость изотопного состава *T*, *5α*-диола, *5β*-диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №3 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 55 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.9	0.8	0.1	0.3	1.5
-24	1.1	1.7	0.4	1.4	1.1
0	1.6	1.7	0.4	1.5	1.1
3	1.1	1.8	0.8	2.2	1.9
6	1.3	6.5	3.2	8.5	5.0
10	0.7	5.8	4.6	6.5	6.0
20	1.1	5.5	6.5	5.4	5.9
25	0.5	3.9	6.9	2.9	5.8
29	0.8	3.4	5.3	2.1	3.9
33	0.6	3.4	4.3	2.0	3.3
50	1.2	3.8	2.7	1.4	2.4
57	0.7	1.5	1.6	0.9	1.7
73	1.2	2.0	0.6	1.1	1.7
120	1.4	1.9	-0.1	0.6	1.1
168	1.8	3.0	0.8	0.9	0.8

Таблица 56 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг болдиона субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	1.0	0.9	0.2	0.4	1.5
-24	1.0	1.6	0.4	1.4	1.1
0	1.2	1.3	0.0	1.1	0.8
3	0.8	1.5	0.4	1.9	1.6
6	1.0	6.2	2.9	8.2	4.7
10	0.9	6.0	4.8	6.7	6.2
20	0.9	5.3	6.3	5.2	5.8
25	0.7	4.1	7.1	3.1	6.0
29	1.3	3.8	5.7	2.5	4.4
33	0.9	3.7	4.5	2.2	3.5
50	1.1	3.7	2.6	1.3	2.3
57	1.2	2.0	2.1	1.4	2.2
73	1.0	1.8	0.4	0.9	1.5
120	1.2	1.7	-0.3	0.4	0.9
168	1.6	2.8	0.6	0.7	0.6

6.6. Препарат №5 – 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол

При попадании в человеческий организм 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол не вызывает изменения соотношения T/E (рисунки 82, 84, 86). Наблюдаемые у добровольца №3 превышающие 4 значения этого соотношения обусловлены генетической предрасположенностью и не зависят от факта приема препарата. Влияние данного прогормона на изотопный состав целевых соединений носит селективный характер, нацеленный на 5 α -метаболиты тестостерона. На рисунках 83, 85, 87 представлены диаграммы, отражающие зависимость изотопного состава тестостерона, его метаболитов, прегнандиола и 16-андростенола от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола каждым из трех добровольцев.

У субъекта №1 (таблицы 57, 58) превышение критерия 3‰ для $\Delta\delta$ по парам «ПД-5 α -диол», «16-ен-5 α -диол», «ПД-А» и «16-ен-А» наблюдается в промежутке от 5 до 47 часов после приема препарата.

У субъекта №2 (таблицы 59, 60) завышенные по парам «ПД-5 α -диол» и «ПД-А» значения $\Delta\delta$ детектируются от 5 до 124 часов с момента употребления. Для пары «16-ен-А» превышение порогового значения детектируется в интервале от 5 до 78 часов, у пары «16-ен-5 α -диол» – от 5 до 124 часов.

У субъекта №3 (таблицы 61, 62) в случае эндогенных маркеров прегнандиола и 16-андростенола $\Delta\delta$, превышающие 3‰, регистрируются для 5 α -диола в промежутке от 22 до 36 часов с момента попадания прогормона в организм. Для пары «16-ен-А» повышенное значение $\Delta\delta$ наблюдается только в одном образце, соответствующем 36 часам после приема.

Судя по полученным экспериментальным данным, значительные изменения изотопного соотношения 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола и его метаболита андростерона свидетельствуют о необходимости использования этих соединений в качестве целевых при установлении факта приема препарата №5.

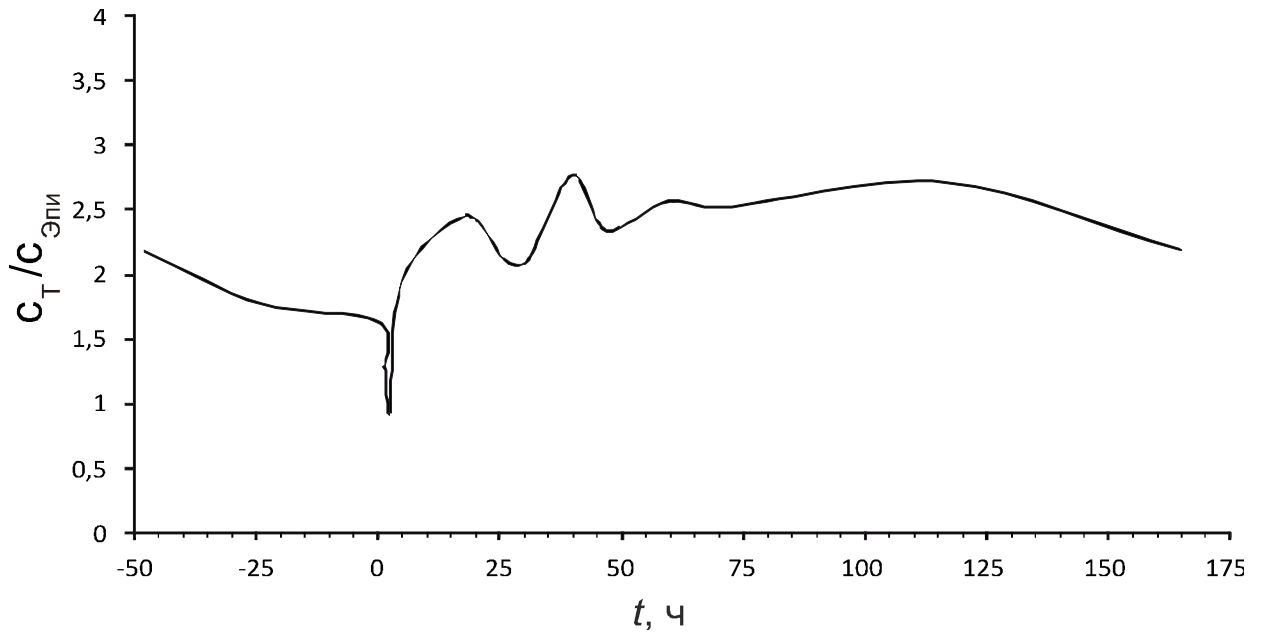


Рисунок 82 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №1

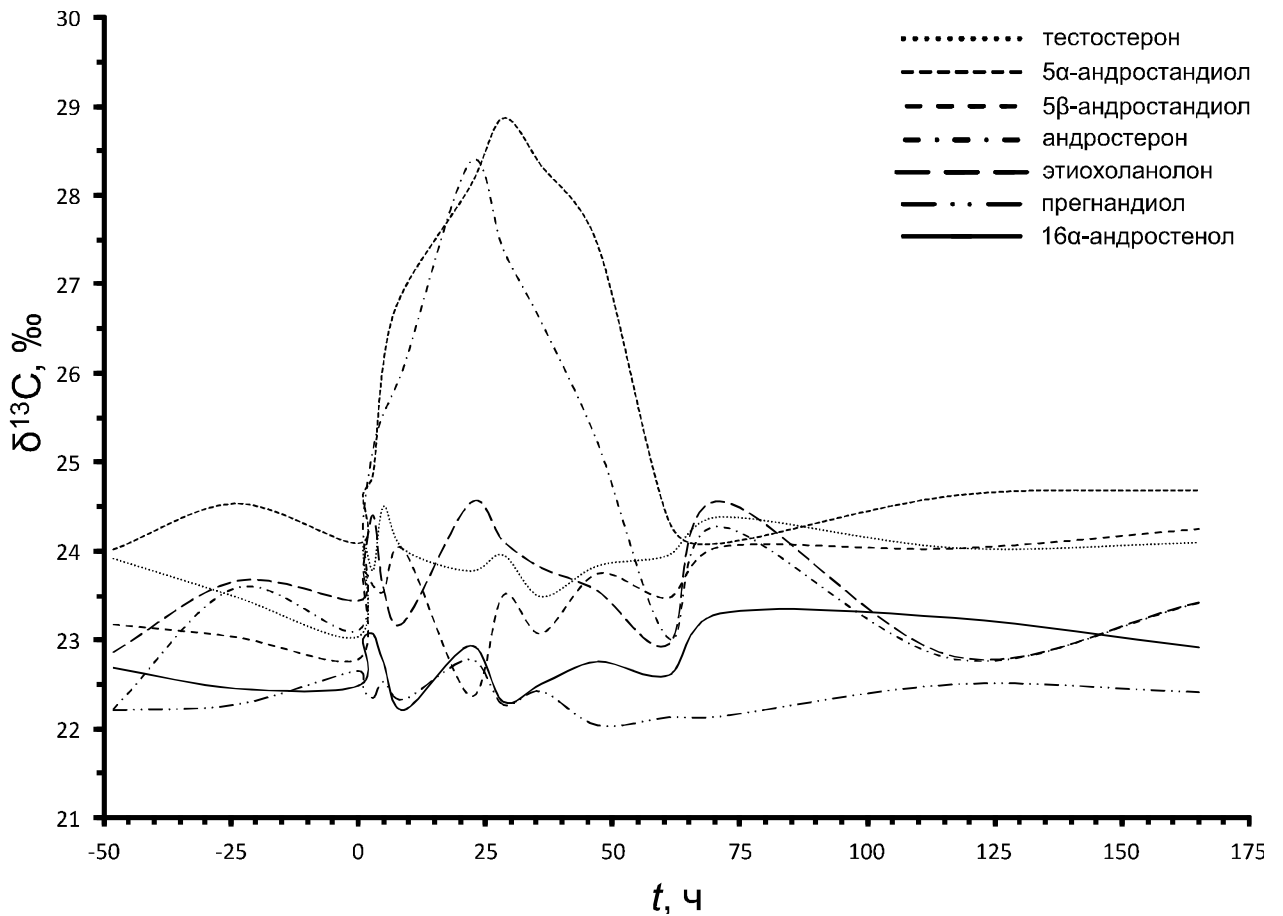


Рисунок 83 — Зависимость изотопного состава Т, 5 α -диола, 5 β -диола, А, Э, ПД и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №1 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 57 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5α -андростан- $3\beta,17\beta$ -диола субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-}5\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-}5\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	1.7	1.8	1.0	0.0	0.6
-24	1.2	2.3	0.8	1.3	1.4
0	0.4	1.4	0.1	0.5	0.8
1	1.6	2.2	1.3	1.9	1.4
3	1.4	2.5	1.3	2.8	2.1
5	2.0	3.6	1.0	3.0	1.0
9	1.7	4.6	1.7	3.8	0.9
22	1.0	5.3	-0.4	5.6	1.8
29	1.7	6.6	1.2	5.1	1.8
36	1.1	5.9	0.7	4.2	1.4
47	1.8	5.4	1.7	3.2	1.5
61	1.8	2.2	1.4	0.9	0.8
71	2.3	1.9	1.9	2.1	2.4
117	1.5	2.1	1.5	0.3	0.3
165	1.7	2.3	1.8	1.0	1.0

Таблица 58 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5α -андростан- $3\beta,17\beta$ -диола субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-T})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-}5\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-}5\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-A})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	1.2	1.3	0.5	-0.4	0.2
-24	1.0	2.1	0.6	1.1	1.2
0	0.6	1.6	0.3	0.6	1.0
1	1.1	1.6	0.7	1.4	0.8
3	0.7	1.8	0.6	2.1	1.3
5	1.8	3.4	0.8	2.8	0.8
9	1.8	4.7	1.8	3.9	1.0
22	0.9	5.2	-0.6	5.4	1.6
29	1.7	6.6	1.2	5.1	1.8
36	1.0	5.8	0.6	4.1	1.3
47	1.1	4.7	1.0	2.5	0.8
61	1.4	1.7	0.9	0.4	0.3
71	1.1	0.8	0.8	1.0	1.3
117	0.8	1.4	0.8	-0.4	-0.4
165	1.2	1.8	1.3	0.5	0.5

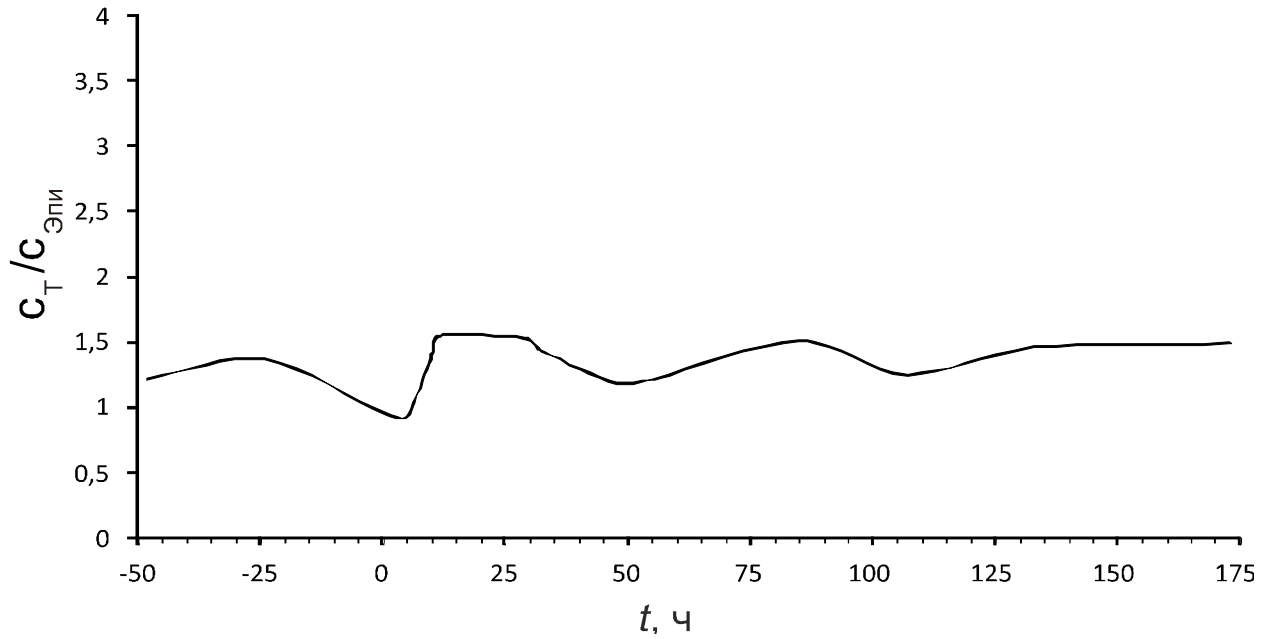


Рисунок 84 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №2

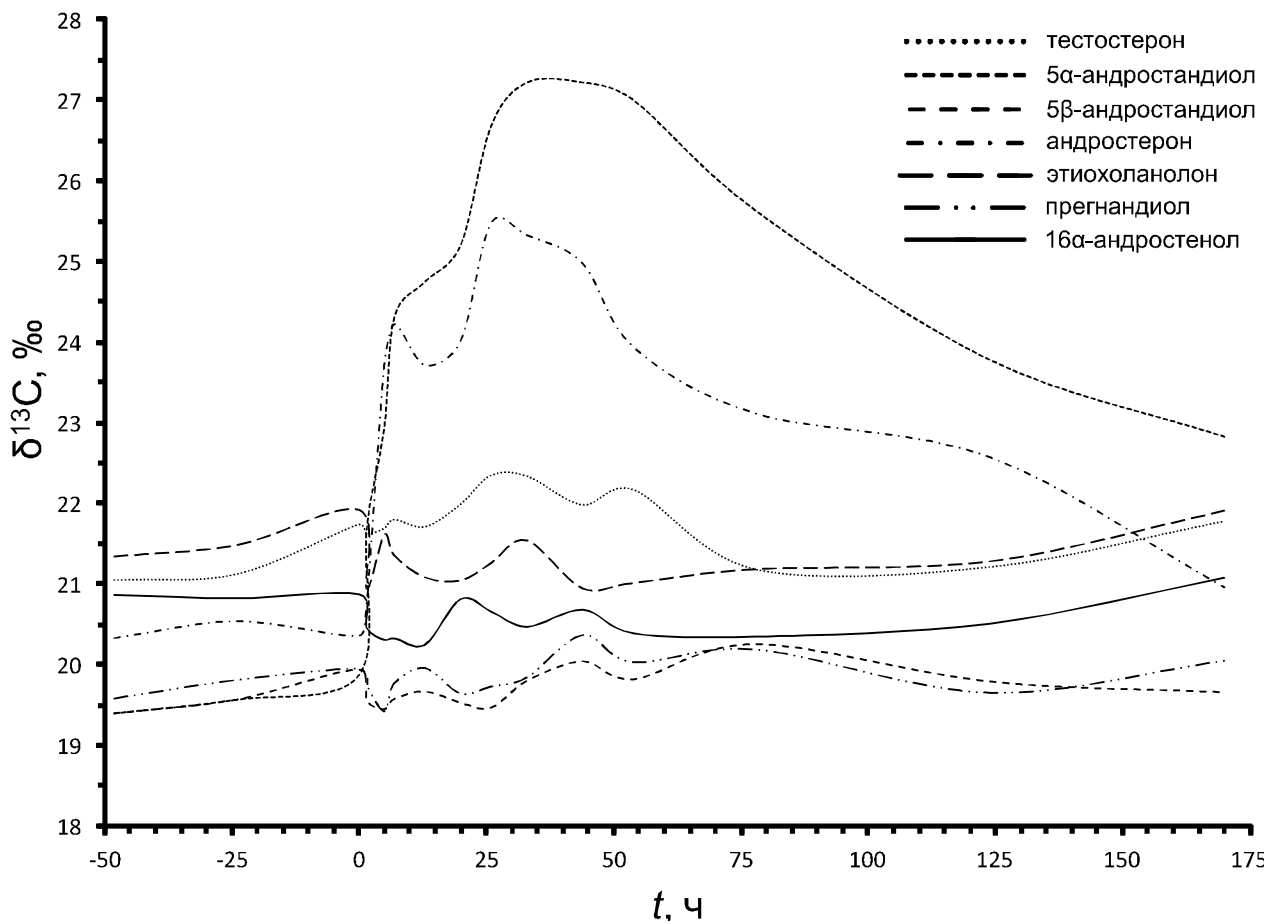


Рисунок 85 — Зависимость изотопного состава *T*, 5 α -диола, 5 β -диола, *A*, *Э*, *ПД* и *16-ен* от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №2 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 59 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5α -андростан- $3\beta,17\beta$ -диола субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-}5\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-}5\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	1.5	-0.2	-0.2	0.8	1.8
-24	1.3	-0.2	-0.2	0.7	1.7
0	1.8	-0.1	0.0	0.4	2.0
2	1.9	1.9	-0.2	1.0	1.2
5	2.3	3.5	0.0	4.3	2.2
7	2.0	4.6	-0.2	4.5	1.6
13	1.8	4.8	-0.3	3.8	1.1
20	2.4	5.6	-0.1	4.4	1.4
26	2.6	7.0	-0.3	5.7	1.5
33	2.5	7.4	0.0	5.5	1.7
44	1.6	6.9	-0.3	4.6	0.6
54	2.1	7.0	-0.2	3.9	1.0
78	1.0	5.4	0.1	2.9	1.0
124	1.6	4.1	0.1	2.9	1.6
170	1.7	2.8	-0.4	0.9	1.9

Таблица 60 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5α -андростан- $3\beta,17\beta$ -диола субъектом №2 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-}5\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-}5\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	0.2	-1.5	-1.5	-0.5	0.5
-24	0.3	-1.3	-1.3	-0.3	0.7
0	0.9	-1.0	-0.9	-0.5	1.1
2	1.2	1.2	-0.9	0.3	0.5
5	1.4	2.6	-0.9	3.4	1.3
7	1.5	4.0	-0.8	3.9	1.0
13	1.5	4.5	-0.6	3.5	0.8
20	1.2	4.4	-1.3	3.2	0.2
26	1.7	6.0	-1.2	4.8	0.6
33	1.9	6.8	-0.7	4.9	1.1
44	1.3	6.5	-0.6	4.3	0.3
54	1.8	6.6	-0.6	3.5	0.6
78	0.8	5.3	-0.1	2.8	0.8
124	0.7	3.3	-0.7	2.1	0.8
170	0.7	1.8	-1.4	-0.1	0.8

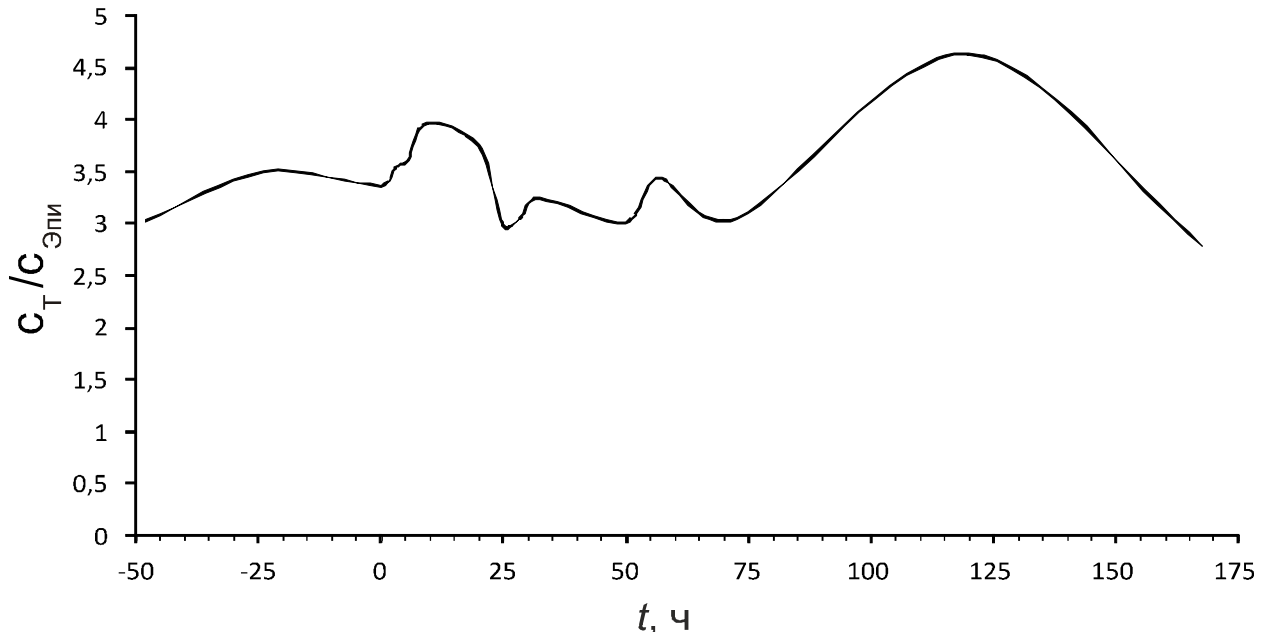


Рисунок 86 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №3

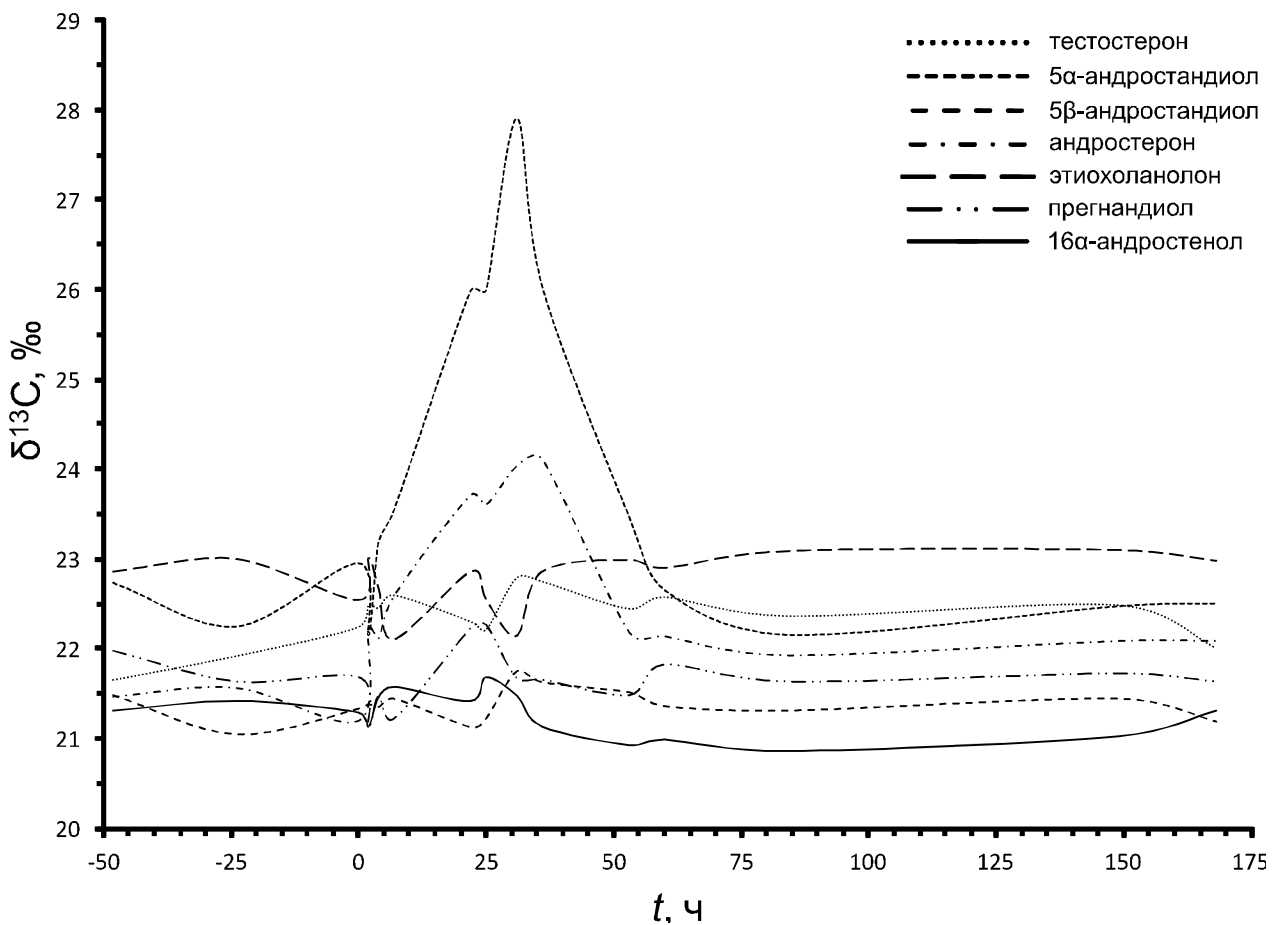


Рисунок 87 — Зависимость изотопного состава *T*, 5 α -диола, 5 β -диола, *A*, *Э*, *ПД* и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №3 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 61 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	-0.3	0.8	-0.5	-0.5	0.9
-24	0.3	0.6	-0.6	-0.1	1.4
0	0.6	1.3	-0.4	-0.5	0.9
2	1.3	1.0	0.2	1.1	1.9
4	1.0	1.7	-0.1	0.7	1.2
7	1.4	2.3	0.2	1.4	0.9
22	0.1	3.8	-1.1	1.5	0.6
25	-0.1	3.7	-1.0	1.3	0.3
31	1.1	6.2	0.1	2.4	0.5
36	1.1	4.4	0.0	2.5	1.2
53	1.0	2.0	0.0	0.7	1.5
60	0.8	0.8	-0.5	0.3	1.1
84	0.7	0.5	-0.3	0.3	1.5
149	0.8	0.8	-0.3	0.4	1.4
168	0.4	0.9	-0.4	0.5	1.4

Таблица 62 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-T})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-A})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	0.4	1.4	0.2	0.2	1.6
-24	0.5	0.8	-0.4	0.1	1.6
0	0.9	1.7	0.0	-0.1	1.3
2	1.4	1.0	0.3	1.1	1.9
4	1.0	1.7	-0.1	0.7	1.2
7	1.0	2.0	-0.1	1.0	0.5
22	0.9	4.6	-0.3	2.3	1.4
25	0.5	4.3	-0.5	1.9	0.9
31	1.3	6.4	0.3	2.6	0.7
36	1.6	4.9	0.5	3.0	1.7
53	1.5	2.6	0.6	1.3	2.1
60	1.6	1.7	0.4	1.2	1.9
84	1.5	1.3	0.5	1.1	2.2
149	1.5	1.5	0.4	1.1	2.1
168	0.7	1.2	-0.1	0.8	1.7

6.7. Препарат №6 – 1-андростен-3 β ,17 β -диол

Прием препарата №6, содержащего 1-андростен-3 β ,17 β -диол, также не влечет за собой ни изменения изотопного состава, ни концентрации тестостерона в моче, и, как следствие, изменения соотношения T/E (рисунки 88, 90, 92). От остальных препаратов, исследованных в настоящей работе, это вещество отличается способом производства – сырьем для синтеза послужили растения с C4-механизмом фотосинтетического потребления CO₂, обогащенные изотопом ¹³C. Согласно экспериментальным данным, представленным в таблице 32, изотопное соотношение для данного препарата составляет минус 19.9‰ и сильно отличается от значений $\delta^{13}C$ других прогормонов. Как видно из графических зависимостей, приведенных на рисунках 89, 91 и 93, изменение изотопного состава целевых соединений сдвинуто в противоположную сторону.

У субъекта №1 (таблицы 63, 64) $\Delta\delta$ для пар «*ПД-5 α -диол*» и «*16-ен-5 α -диол*» выходит за пределы 3‰ в интервале от 32 и 35 до 55 часов с момента употребления, соответственно, для пар «*ПД-5 β -диол*» и «*16-ен-5 β -диол*» – только в случае одного образца, собранного после 35 часов. У пары «*16-ен-А*» аномальное значение $\Delta\delta$ детектируется также только для одной пробы – через 9 часов с момента приема.

У субъекта №2 (таблицы 65, 66) употребление препарата №6 не вызывает каких-либо изменений в изотопном составе целевых соединений. Доброволец №2 принимал этот прогормон дважды – результат в обоих случаях идентичный. С учетом вышеизложенного можно прийти к выводу, что у добровольца №2 наблюдается нетипичный метаболизм. Двойная связь в положении 1 не восстанавливается вероятнее всего в связи с пониженной активностью 1-гидрогеназы, в результате чего 1-андростен-3 β ,17 β -диол не трансформируется до целевых соединений. По этой же причине, согласно данным $ГХ-МС$ анализа, содержание ненасыщенных метаболитов данного препарата в моче у субъекта №2, в несколько раз выше, чем у №1 и №3. Также следует добавить, что для №2 в случае приёма прегненолона время детектирования аномального изотопного состава *ПД* значительно больше, чем для №1 и №3, что ещё раз свидетельствует о нетипичном метаболизме у добровольца №2.

У субъекта №3 (таблицы 67, 68) $\Delta\delta > 3\text{‰}$ регистрируется только в случае пар «ПД–5 α –диол» и «1 β –ен–5 α –диол» во временном промежутке от 25 до 36 часов с момента попадания препарата в организм.

Проанализировав представленную на рисунках и в таблицах информацию, можно заключить, что влиянию 1–андростен–3 β ,17 β –диола напрямую подвержен 5 α –андростан–3 α ,17 β –диол, и, в гораздо меньшей степени, 5 β –андростан–3 α ,17 β –диол, что проясняет путь биотрансформации этого препарата в человеческом организме. Таким образом, выявление факта приема 1–андростендиола необходимо осуществлять по $\delta^{13}\text{C}$ и $\Delta\delta$ для 5 α/β –диолов.

Следует также отметить, что поскольку III фракция (целевые компоненты фракции – А и Э) 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 среднем в течение 48 часов. После однократного приёма препарата №6 пробы мочи дают положительный результат методом ГХ–С–ИМС также ориентировочно в течение 2 суток с момента употребления.

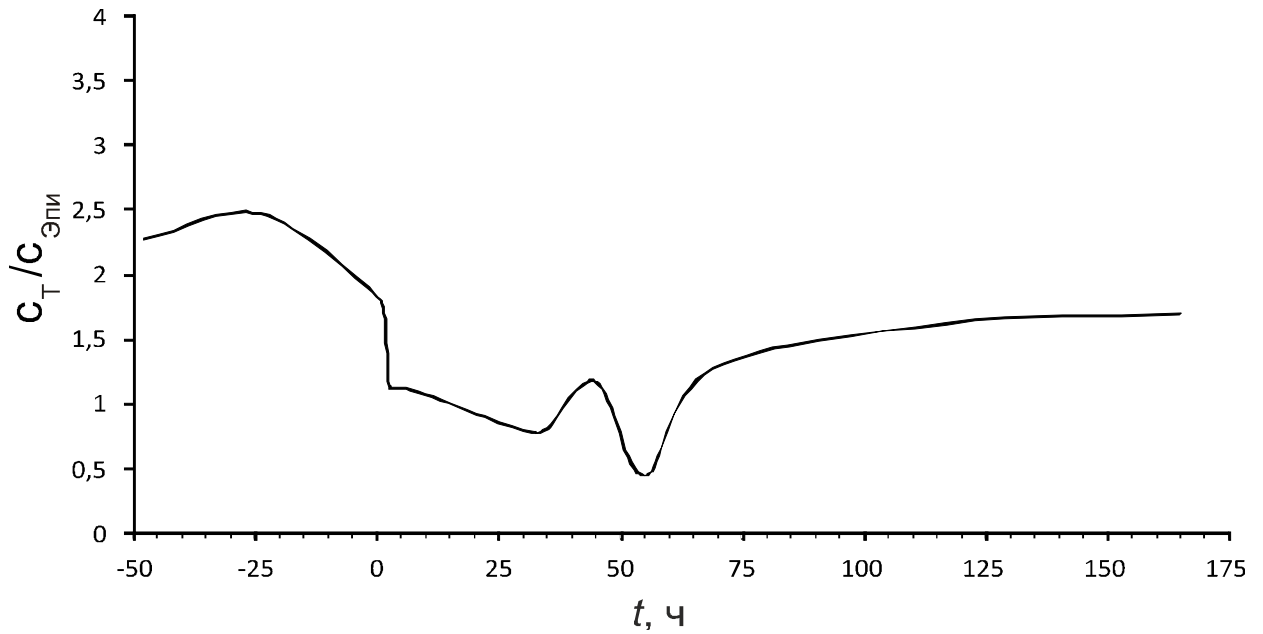


Рисунок 88 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №1

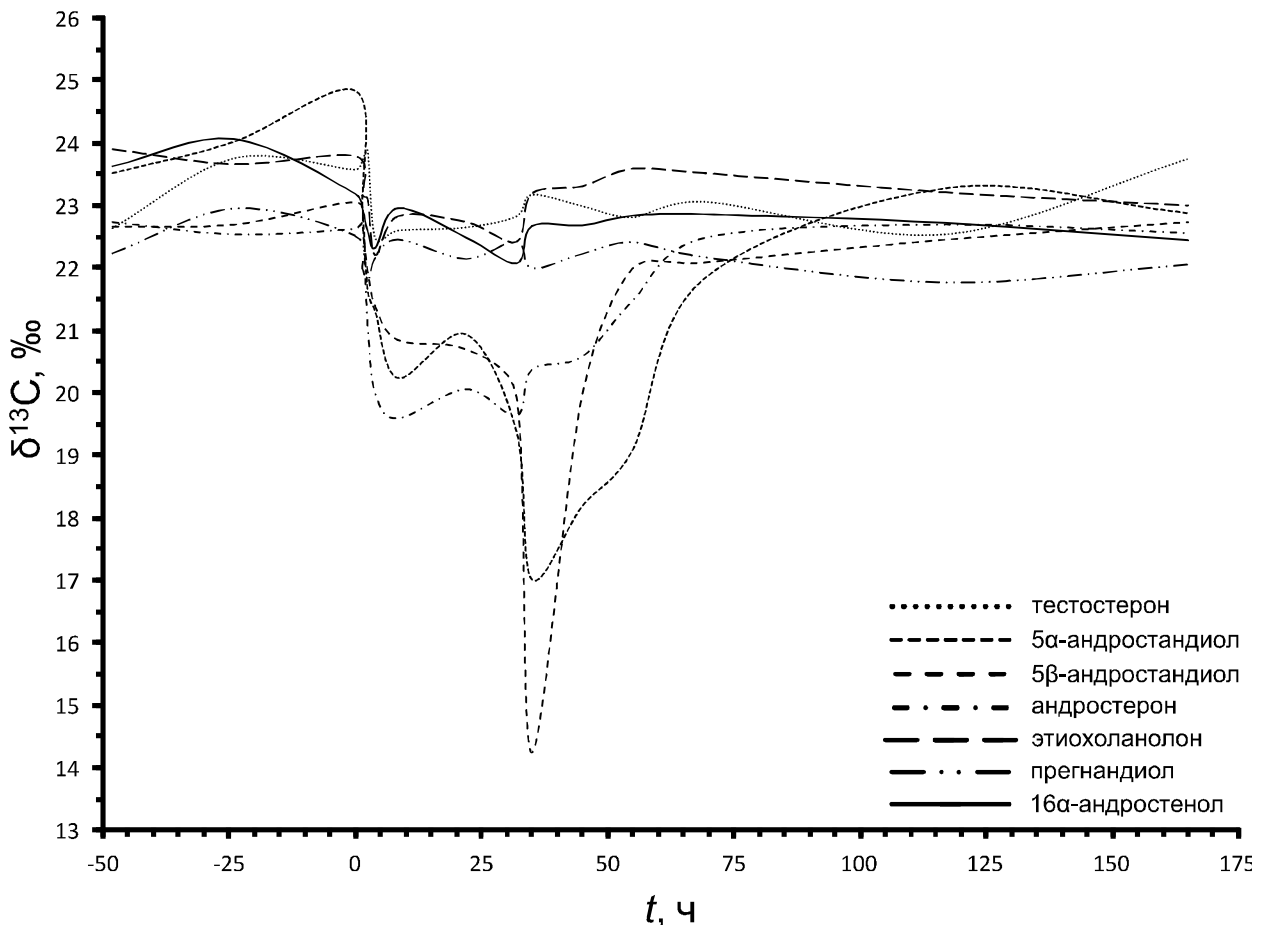


Рисунок 89 — Зависимость изотопного состава *T*, 5 α -диола, 5 β -диола, *A*, *Э*, *ПД* и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №1 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 63 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-T})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-A})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.4	1.3	0.4	0.5	1.7
-24	0.8	1.1	-0.3	-0.4	0.7
0	1.1	2.3	0.5	0.1	1.3
2	1.7	1.0	0.7	0.7	1.2
3	2.1	-0.1	0.2	-0.7	1.4
4	0.3	-0.8	-0.8	-2.2	0.1
9	0.2	-2.2	-1.6	-2.9	0.4
22	0.5	-1.2	-1.5	-2.1	0.6
32	0.4	-3.1	-2.5	-2.8	0.0
35	1.2	-5.0	-7.8	-1.6	1.2
45	0.8	-4.0	-2.3	-1.6	1.1
55	0.4	-3.3	-0.4	-0.9	1.2
69	0.9	-0.4	-0.1	0.3	1.4
117	0.8	1.5	0.7	0.9	1.5
165	1.7	0.8	0.7	0.5	1.0

Таблица 64 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №1 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3‰)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-T})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-A})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	-1.0	-0.1	-1.0	-0.9	0.3
-24	-0.3	0.0	-1.4	-1.5	-0.4
0	0.4	1.7	-0.1	-0.5	0.6
2	0.8	0.1	-0.3	-0.2	0.3
3	1.3	-0.9	-0.6	-1.5	0.5
4	0.2	-1.0	-0.9	-2.3	-0.1
9	-0.3	-2.7	-2.1	-3.4	-0.1
22	0.2	-1.5	-1.8	-2.4	0.3
32	0.8	-2.7	-2.1	-2.4	0.4
35	0.5	-5.6	-8.4	-2.3	0.5
45	0.3	-4.5	-2.7	-2.1	0.6
55	0.0	-3.7	-0.8	-1.3	0.8
69	0.2	-1.0	-0.8	-0.4	0.7
117	-0.2	0.6	-0.3	0.0	0.5
165	1.3	0.4	0.3	0.1	0.6

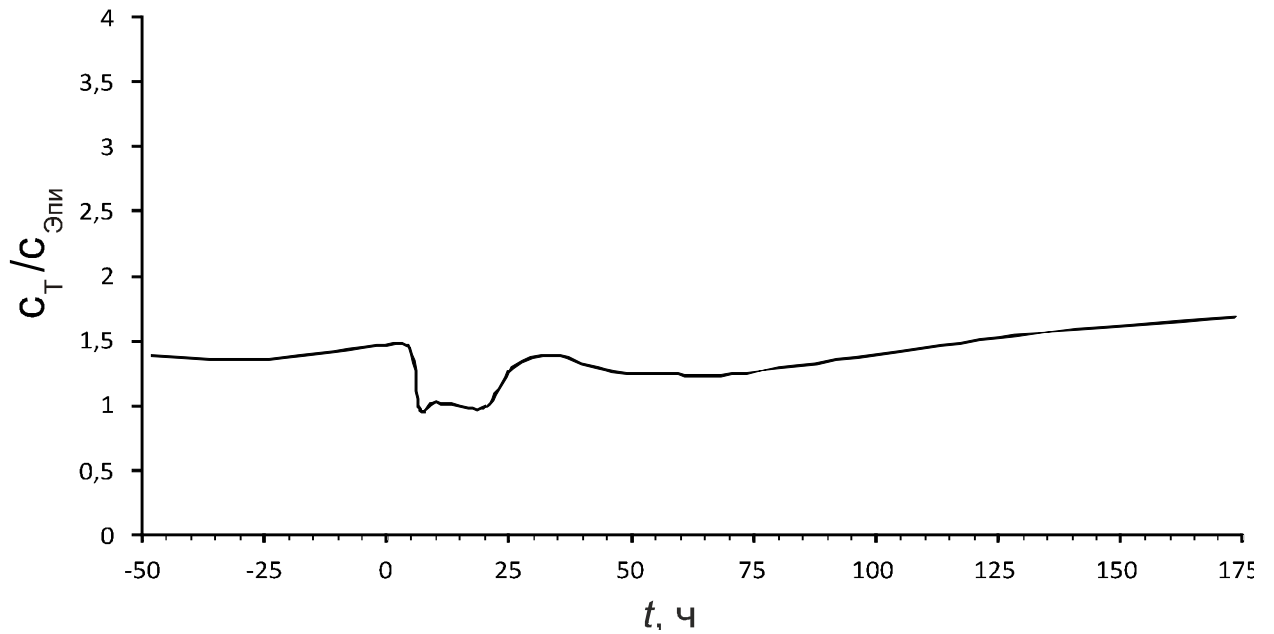


Рисунок 90 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №2

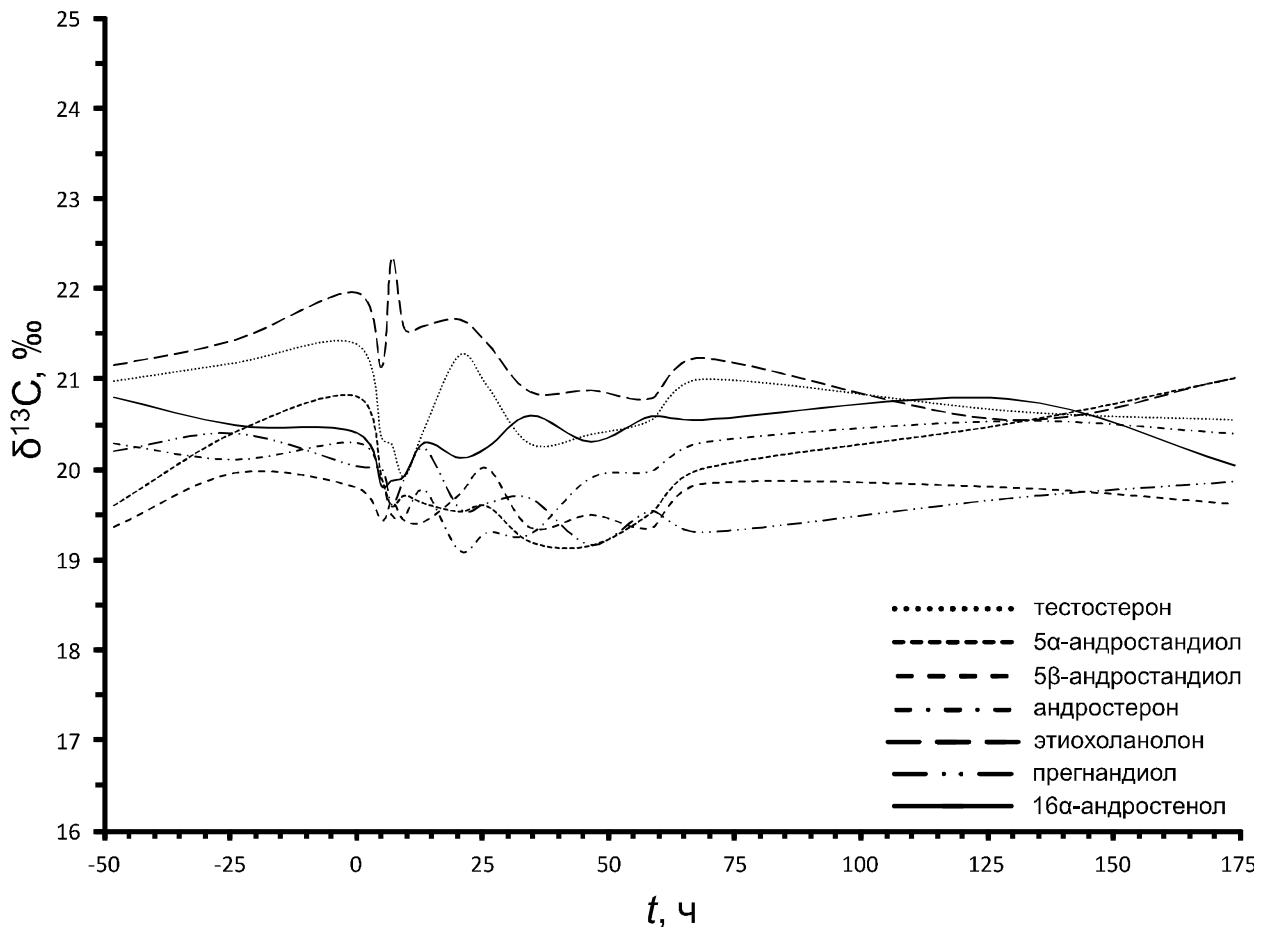


Рисунок 91 — Зависимость изотопного состава *T*, 5 α -диола, 5 β -диола, *A*, *Э*, *ПД* и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №2 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 65 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №2

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	0.8	-0.6	-0.8	0.1	0.9
-24	0.8	0.0	-0.4	-0.3	1.0
0	1.4	0.8	-0.2	0.3	1.9
5	0.3	-0.1	-0.6	-0.1	1.1
7	0.7	0.0	0.0	-0.1	2.7
10	0.0	-0.2	-0.5	-0.4	1.7
14	0.2	-0.6	-0.8	-0.5	1.4
21	1.7	0.0	0.2	-0.5	2.1
26	1.3	0.0	0.4	-0.3	1.8
35	0.6	-0.5	-0.3	-0.4	1.2
47	1.2	0.0	0.3	0.8	1.7
59	1.0	0.0	-0.2	0.4	1.2
69	1.7	0.7	0.5	1.0	1.9
129	1.0	0.8	0.1	0.9	0.9
174	0.7	1.2	-0.3	0.5	1.1

Таблица 66 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №2

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	0.2	-1.2	-1.4	-0.5	0.3
-24	0.7	-0.1	-0.5	-0.4	0.9
0	1.0	0.4	-0.6	-0.1	1.6
5	0.5	0.1	-0.4	0.1	1.3
7	0.4	-0.3	-0.2	-0.4	2.5
10	0.0	-0.2	-0.5	-0.4	1.6
14	0.2	-0.7	-0.9	-0.5	1.3
21	1.2	-0.6	-0.4	-1.0	1.5
26	0.7	-0.7	-0.2	-0.9	1.1
35	-0.3	-1.4	-1.2	-1.3	0.3
47	0.1	-1.2	-0.8	-0.4	0.6
59	0.0	-1.1	-1.2	-0.6	0.2
69	0.5	-0.5	-0.7	-0.3	0.7
129	-0.1	-0.3	-1.0	-0.2	-0.2
174	0.5	1.0	-0.4	0.3	1.0

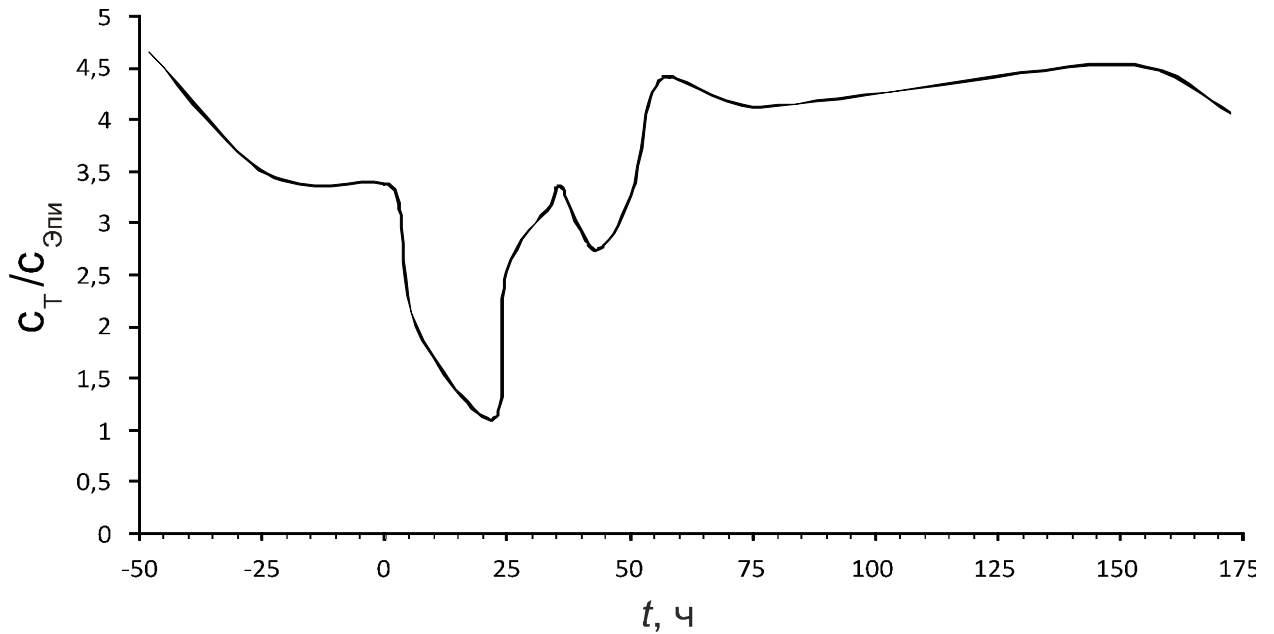


Рисунок 92 — Зависимость соотношения концентраций тестостерона и эпитестостерона от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №3

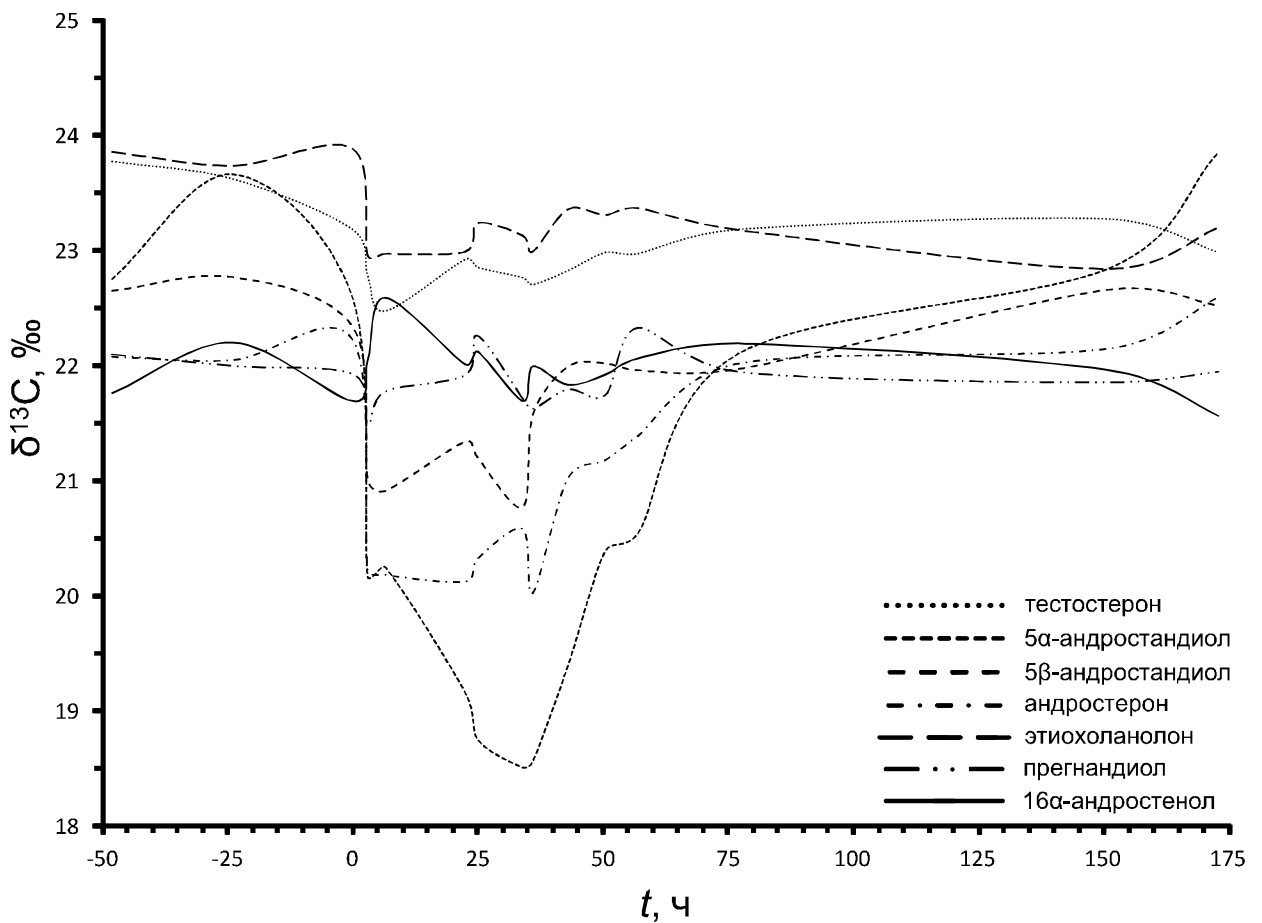


Рисунок 93 — Зависимость изотопного состава *T*, 5 α -диола, 5 β -диола, *A*, *Э*, *ПД* и 16-ен от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №3 (значения $\delta^{13}\text{C}$ даны по модулю)

Таблица 67 — Значения $\Delta\delta(\text{ПД-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(\text{ПД-Т})$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\alpha)$	$\Delta\delta(\text{ПД-5}\beta)$	$\Delta\delta(\text{ПД-А})$	$\Delta\delta(\text{ПД-Э})$
-48	1.7	0.6	0.6	0.0	1.8
-24	1.6	1.7	0.8	0.1	1.7
0	1.3	0.7	0.4	0.3	2.0
3	1.3	-1.3	-0.5	-1.3	1.5
7	0.7	-1.5	-0.9	-1.6	1.2
23	1.0	-2.8	-0.6	-1.8	1.1
25	0.6	-3.5	-1.1	-1.9	1.0
34	1.0	-3.2	-0.9	-1.1	1.4
36	1.1	-3.1	-0.1	-1.6	1.4
43	1.0	-2.4	0.2	-0.8	1.6
51	1.2	-1.4	0.3	-0.6	1.6
57	0.6	-1.8	-0.4	-0.9	1.0
77	1.2	0.1	0.0	0.1	1.2
151	1.4	1.0	0.8	0.3	1.0
173	1.0	1.9	0.6	0.6	1.3

Таблица 68 — Значения $\Delta\delta(16\text{-ен-ЦС})$ в зависимости от времени, прошедшего с момента употребления 100 мг 1-андростен-3 β ,17 β -диола субъектом №3 (желтым цветом выделены $\Delta\delta$, превышающие 3%, зеленым – точки с $T/E > 4$)

$t, \text{ч}$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Т})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\alpha)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-5}\beta)$	$\Delta\delta(16\text{-ен-А})$	$\Delta\delta(16\text{-ен-Э})$
-48	2.0	1.0	0.9	0.3	2.1
-24	1.4	1.5	0.6	-0.2	1.5
0	1.5	0.9	0.6	0.5	2.2
3	0.7	-1.9	-1.0	-1.8	0.9
7	-0.1	-2.4	-1.7	-2.4	0.4
23	0.9	-2.9	-0.7	-1.9	1.0
25	0.7	-3.4	-0.9	-1.8	1.1
34	1.1	-3.2	-0.9	-1.1	1.4
36	0.7	-3.4	-0.4	-2.0	1.0
43	1.0	-2.5	0.2	-0.8	1.5
51	1.1	-1.5	0.1	-0.8	1.4
57	0.9	-1.5	-0.1	-0.7	1.3
77	1.0	-0.1	-0.2	-0.2	1.0
151	1.3	0.9	0.7	0.2	0.9
173	1.4	2.3	1.0	1.0	1.6

В главе 6 описаны результаты экспериментов по биотрансформации 6 синтетических аналогов эндогенных стероидов, на основании которых методом *ГХ-С-ИМС* выявлены закономерности в изменении изотопного состава эндогенных стероидов и определены пары «эндогенный маркер–целевое соединение», наиболее информативные в случае выявления их использования в спорте (таблица 69).

Таблица 69 — Пары «ЭМ–ЦС» $\Delta\delta$, которых наиболее информативны в случае установления факта употребления каждого из изученных прогормональных препаратов (ЭМ являются *16-en* и *ПД*)

<i>Прогормональный препарат</i>	<i>Пары «ЭМ–ЦС»</i>	<i>Среднее время детектирования, ч</i>
№1 (тестостерона ундеcanoат)	«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

Заключение

Согласно изначальной гипотезе, синтетические аналоги эндогенных стероидов при попадании в человеческий организм вызывают лишь изменение концентрационных соотношений стероидного профиля, не образуя специфических метаболитов, детектируемых в моче классическими методами (газовая хроматография–масс–спектрометрия). Поскольку подавляющее большинство препаратов этого класса получают из растительного сырья с изотопным составом углерода около минус 30‰ и ниже, факт их применения может быть выявлен только с использованием изотопной масс–спектрометрии. Метод основан на измерении отношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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‰.

На этапе пробоподготовки при помощи методов твердофазной экстракции и полупрепаративного ВЭЖХ–фракционирования из мочи выделяют две группы стероидов. Первая группа – соединения, чей изотопный состав изменяется в случае приема прогормонов, вторая – так называемые «эндогенные маркеры», которые сохраняют постоянное изотопное соотношение вне зависимости от употребления запрещенных препаратов. Сравнение изотопного состава соединений из указанных групп в соответствии с установленными критериями позволяет делать выводы относительно происхождения стероидов в моче.

На первом этапе настоящей работы проведен анализ литературных данных по способам определения синтетических аналогов эндогенных стероидов в моче человека и их метаболизму в человеческом организме для прогнозирования наиболее вероятных направлений их биотрансформации. На основе изучения существующих данных установлено, что определить 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. Напрямую выявить факт употребления прогормональных препаратов позволяет только изотопная хромато–масс–спектрометрия. Учитывая достоинства и недостатки рассмотренных методов, было показано, что наиболее подходящим способом пробоподготовки для анализа методом изотопной хромато–масс–спектрометрии является комбинация твердофазной экстракции и полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Анализ литературных данных по проблеме метаболизма синтетических аналогов эндогенных стероидов показал, что большинство препаратов данного класса влияют на процесс биотрансформации тестостерона и его метаболитов, в связи с чем в качестве целевых соединений при измерении изотопного состава стероидов, выделенных из мочи человека, необходимо использовать тестостерон и его метаболиты.

В главе 2 описана серия экспериментов, направленная на поиск условий каждой из стадий многоступенчатого процесса пробоподготовки и анализа образцов мочи методом изотопной хромато–масс–спектрометрии. Методика установления происхождения стероидов подразумевает использование широкого круга физико–химических методов на стадии пробоподготовки (*ЖЖЭ*, *ТФЭ*, *ВЭЖХ*). Наряду с селективностью выделения и полнотой концентрирования целевых соединений оптимизировали временные затраты на каждую из стадий подготовки пробы. Важно отметить, что чувствительность и селективность методики в целом напрямую зависит от условий процесса пробоподготовки и при корректно подобранных условиях обеспечивает правильное измерение изотопного состава целевых соединений. Подбор оптимальных условий анализа методом *ГХ–С–ИМС* осуществляли, варьируя различные параметры на стадиях газохроматографического разделения, окислительной конверсии стероидов и масс–спектрометрической идентификации продукта конверсии. Целесообразность выбранных условий обоснована в соответствующих главах.

В главах 3 и 4 решена задача выбора наиболее подходящих условий процесса пробоподготовки биообразцов и анализа экстрактов методом изотопной хромато–масс–спектрометрии. На основании изучения хроматографических свойств целевых стероидных гормонов и продуктов, их содержащих, были

разработаны условия для их селективного выделения из мочи человека с применением методов жидкостно–жидкостной и твердофазной экстракции, высокоэффективной жидкостной хроматографии и дериватизации. Выбраны условия газохроматографического разделения и масс–спектрометрической идентификации исследуемых соединений, а также окислительной конверсии стероидов и последующей масс–спектрометрической идентификации продукта конверсии. Выбор условий каждой из стадий анализа обоснован в соответствующих подразделах. Практическое применение полученной в ходе экспериментальной деятельности информации обеспечило высокую правильность при определении изотопного состава целевых соединений и позволило приступить к исследованию процесса биотрансформации ряда синтетических аналогов эндогенных стероидов и изучению влияния их приема на изотопное соотношение целевых соединений.

В главе 5 приведена информация по изотопному составу целевых соединений, определенному для 923 проб мочи спортсменов и добровольцев. Посредством методов математической статистики был обработан весь объем данных и сформулированы внутрилабораторные критерии оценки результатов анализа.

В главе 6 описаны результаты экспериментов по биотрансформации 6 синтетических аналогов эндогенных стероидов, на основании которых методом *ГХ–С–ИМС* выявлены закономерности в изменении изотопного состава эндогенных стероидов и определены пары «эндогенный маркер–целевое соединение», наиболее информативные в случае выявления их использования в спорте.

В результате проведенного исследования нами предложен способ обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато–масс–спектрометрии. Способ, основанный на данных описанных в работе экспериментов, в течение 5 лет применяется в повседневной работе *ФГУП АДЦ*, а методика на его основе была использована для выявления случаев употребления допинга во время проведения зимних Олимпийских и Паралимпийских игр в г. Сочи в 2014 году.

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 ацетилирования 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 сокращений

- ГХ–МС* – газовая хроматография/масс–спектрометрия;
ГХ–С–ИМС – газовая хроматография/сжигание/изотопная масс–спектрометрия;
ВАДА – Всемирное антидопинговое агентство;
БАД – биологически активная добавка;
Т – тестостерон;
Е – эпитестостерон;
Т/Е – соотношение концентраций тестостерона и эпитестостерона в образце;
ДГТ – дигидротестостерон;
5 α –диол – 5 α –андростан–3 α ,17 β –диол;
5 β –диол – 5 β –андростан–3 α ,17 β –диол;
А – андростерон;
Э – этиохоланолон;
11 β –ОН–А – 11 β –гидроксиандростерон;
11 β –ОН–Э – 11 β –гидроксиэтиохоланолон;
16–ен – 16(5 α)–андростен–3 α –ол;
ПД – 5 β –прегнан–3 α ,20 α –диол;
ПТ – прегнантриол;
ДГЭА – дегидроэпиандростерон;
ЦС – целевое соединение;
ЭМ – эндогенный маркер;
ЖЖЭ – жидкостно–жидкостная экстракция;
ТФЭ – твердофазная экстракция;
ТСХ – тонкослойная хроматография;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ИАХ – иммуноаффинная хроматография;
ТМС – триметилсилил;
ЭИ – электронная ионизация;
МСТФА – *N*–метил–*N*–триметилсилилтрифторацетамид;
ДТТ – 4–дитио–*DL*–триетол;
МТБЭ – метилтретбутиловый эфир;
АСN – ацетонитрил;
Et₂O – диэтиловый эфир;
Py – пиридин;
Ac₂O – уксусный ангидрид;
СКО – среднее квадратичное отклонение.

Список литературы

1. Matthews, D.E. Isotope–ratio–monitoring gas chromatography–mass spectrometry [Text] / D.E. Matthews, J.M. Hayes // *Anal. Chem.* — 1978. — V. 50. — No 11. — P. 1465—1473.
2. Carter, J.F. Isotope ratio measurements [Text] : book / J.F. Carter, R. Sleeman — Bristol: Elsevier, 2005. — P. 560.
3. Sessions, A.L. Isotope–ratio detection for gas chromatography [Text] / A.L. Sessions // *J. Sep. Sci.* — 2006. — V. 29. — No 12. — P. 1946—1961.
4. Groot, P.A. Handbook of stable isotope analytical techniques [Text] : book / P.A. Groot — Bristol: Elsevier, 2004. — P. 857.
5. Mosandl, A. Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils [Text] / A. Mosandl // *Food Rev. Int.* — 1995. — V. 11. — No 4. — P. 597—664.
6. Woodbury, S.E. Delta 13C analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis [Text] / S.E. Woodbury, R.P. Evershed, J.B. Rossel. // *J. Chromatogr. A.* — 1998. — V. 805. — No 1—2. — P. 249—257.
7. Dowling, L.M. Carbon isotopic composition of hydrocarbons in ocean–transported bitumens from the coastline of Australia [Text] / L.M. Dowling, C.J. Boreham, J.M. Hope, A.P. Murray, R.E. Summons // *Org. Geochem.* — 1995. — V. 23. — No 8. — P. 729—737.
8. Hofmann, D. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ analysis of amino acids with GC–C–IRMS – methodical investigations and ecotoxicological applications [Text] / D. Hofmann, K. Jung, H.J. Segschneider, M. Gehre, G. Schuurmann // *Isot. Environ. Health Stud.* — 1995. — V. 31. — No 3—4. — P. 367—375.
9. Галимов, Э.М. Идентификация географического места происхождения наркотических веществ на основе изотопного анализа углерода и азота [Текст] / Э.М. Галимов, В.С. Севастьянов, Е.В. Кульбачевская, А.А. Голявин // *Масс–спектрометрия.* — 2004. — Т. 1. — № 1. — С. 1—8.
10. Thermo Finnigan GC–C/TC III. GC interface for compound specific isotope analysis Combustion Interface Operating Manual [электронный ресурс] // Thermo : [сайт] :

- URL:
http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_27059.pdf. Дата обращения: 17.10.2013.
11. Schmitt, J. Amount dependent isotopic fractionation during compound-specific isotope analysis [Text] / J. Schmitt, B. Glaser, W. Zech // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2003. — V. 17. — No 9. — P. 970—977.
 12. Хайвер, К. Высокоэффективная газовая хроматография [Текст] : Пер. с англ. / К. Хайвер, Б. Ньютон, П. Сандра, М. Уилсон, Э.В. Смит, У.Д. Снайдер, П. Гудли, Р. Лейбранд, Р.Дж. Филипс, Р. Гирхарт, У. Дж. Сандерс ; под ред. К. Хайвера — М. : Изд-во Мир, 1993. — 288 с., ил. — ISBN 5-03-002597-9.
 13. Horning, S. Measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratios to confirm misuse of endogenous steroids [Text] / S. Horning, E. Nolteernsting, H. Geyer, U. Flenker, W. Schänzer // *Recent advances in doping analysis (6) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 17th Cologne Workshop on Dope Analysis, March 14 — 19, 1999* : [abstract book] — Cologne, Germany. — 1999. — P. 243—256.
 14. Platzner, I.T. Modern isotope ratio mass spectrometry [Text] : book / I.T. Platzner — London: Wiley, 1999. — P. 350.
 15. The 2003 World Anti-doping Code [электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency : [сайт] : — URL: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/Code_Review/1st_Consultation/WADA_Code_2003_EN.pdf. Дата обращения: 17.10.2013.
 16. Сейфулла, Р.Д. Спортивная фармакология [Текст] : справочник / Р.Д. Сейфулла — М. : Изд-во Моск. правда, 1999. — 118 с.
 17. The 2004 WADA Technical Document TDEAAS2004. Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids [электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency : [сайт] : — URL: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2004EAAS_Reporting_Evaluation_Testosterone_Epitestosterone_TE_Ratio_EN.pdf. Дата обращения: 17.10.2013.

18. Meldensohn, D. Carbon-13 in natural cholesterol [Text] / D. Meldensohn, A.R. Immelman, J.C. Vogel, G. von la Chevallier // Biomed. Environ. Mass Spectrom. — 1986. — V. 13. — No 1. — P. 21—24.
19. Von Kuk, C. Influence of changes in diet on the dynamics of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratio in selected urinary steroids. Part I: study design, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratio of applied foodstuffs and effect on anthropometrical data [Text] / C. von Kuk, U. Flenker, U. Guntner, F. Hulsemann, W. Schänzer // Recent advances in doping analysis (13) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 23rd Cologne Workshop on Dope Analysis, February 27 — March 4, 2005 : [abstract book] — Cologne, Germany. — 2005. — P. 219—225.
20. Flenker, U. Influence of changes in diet on the dynamics of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratio in selected urinary steroids: diet free from cholesterol [Text] / U. Flenker, C. von Kuk, U. Guntner, F. Hulsemann, V. Gougoulidis, W. Schänzer // Recent advances in doping analysis (13) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 23rd Cologne Workshop on Dope Analysis, February 27 — March 4, 2005 : [abstract book] — Cologne, Germany. — 2005. — P. 227—233.
21. Cawley, A.T. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control [Text] / A.T. Cawley, U. Flenker // J. Mass Spectrom. — 2008. — V. 43. — No 7. — P. 854—864.
22. Кольман, Я. Наглядная биохимия [Текст] : справочник / Я. Кольман, К.-Г. Рем — М. : Изд-во Мир, 2000. — 469 с.
23. Ueki, M. Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry [Text] / M. Ueki, M. Okano // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1999. — V. 13. — No 22. — P. 2237—2243.
24. Becchi, M. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport [Text] / M. Becchi, R. Aguilera, Y. Farizon, M. Flament, H. Casabianca, P. James // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1994. — V. 8. — No 4. — P. 304—308.
25. Ferry, M. Influence of pregnenolone administration on IRMS analysis [Text] / M. Ferry, J.C. Mathurin, M. Becchi, J. de Ceaurriz // Recent advances in doping analysis (8) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 18th Cologne Workshop

- on Dope Analysis, February 20 — 25, 2000 : [abstract book] — Colonge, Germany. — 2000. — P. 209—213.
26. Trout, G.J. Developments in sports drug testing [Text] / G.J. Trout, J.H. Rogerson, A.T. Cawley, C.W. Alma // *Aust. J. Chem.* — 2003. — V. 56. — No 3. — P. 175—180.
27. Saudan, C. Urinary analysis of 16(5 α)-androst-3 α -ol by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: implications in anti-doping analysis [Text] / C. Saudan, N. Baume, P. Mangin // *J. Chromatogr. B.* — 2004. — V. 810. — No 1. — P. 157—164.
28. Piper, T. Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes [Text] / T. Piper, U. Mareck, H. Geyer, U. Flenker, M. Thevis, P. Platen, W. Schänzer // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 22. — No 14. — P. 2161—2175.
29. Meier-Augenstein, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry [Text] / W. Meier-Augenstein // *J. Chromatogr. A.* — 1999. — V. 842. — No 1—2. — P. 351—371.
30. Perry, P.J. Detection of anabolic steroid administration: ratio of urinary testosterone to epitestosterone vs the ratio of urinary testosterone to luteinizing hormone [Text] / P.J. Perry, J.H. MacIndoe, W.R. Yates, S.D. Scott, T.L. Holman // *Clin. Chem.* — 1997. — V. 43. — No 5. — P. 731—735.
31. Carlström, K. Detection of testosterone administration by increased ratio between serum concentrations of testosterone and 17 α -hydroxyprogesterone [Text] / K. Carlström, E. Palonek, M. Garle, H. Oftebro, J. Stanghelle, I Björkhem // *Clin. Chem.* — 1992. — V. 38. — No 9. — P. 1779—1184.
32. Davidson, D.W. Increasing circulating androgens with oral testosterone undecanoate in eugonadal men [Text] / D.W. Davidson, R. O'Carroll, J. Bancroft // *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.* — 1987. — V. 26. — No 6. — P. 713—715.
33. Giagulli, V.A. Comparison of plasma androgen glucuronide levels after percutaneous or peroral androgen treatment in men: evidence for important splanchnic contribution to plasma 17 β -hydroxyandrogen glucuronides [Text] / V.A. Giagulli, L. Verdonck, J.P. Deslypere, R. Giorgino, A. Vermeulen // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1993. — V. 76. — No 2. — P. 429—31.

34. Nieschlag, E. Plasma androgen levels in men after oral administration of testosterone or testosterone undecanoate [Text] / E. Nieschlag, J. Mauss, A. Coert, P. Kicovic // *Acta Endocrinol.* — 1975. — V. 79. — No 2. — P. 366—374.
35. Coert, A. The pharmacology and metabolism of testosterone undecanoate (TU), a new orally active androgen [Text] / A. Coert, J. Geelen, J. de Visser, J. van der Vies // *Acta Endocrinol.* — 1975. — V. 79. — No 4. — P. 789—800.
36. Wright, F. Long term study of steroid and peptidic hormones in the plasma of healthy young men under controlled testosterone undecanoate therapy [Text] / F. Wright, J.P. Lafarge, J. Antreassian, M. Lagoguey, G. Peres // *Blood samples for doping control.* — 1994. — V. 7. — No 1. — P. 65—74.
37. Maitre, A. Urinary analysis of four testosterone metabolites and pregnanediol by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry after oral administrations of testosterone [Text] / A. Maitre, C. Saudan, P. Mangin, M. Saugy // *J. Anal. Toxicol.* — 2004. — V. 28. — No 6. — P. 426—431.
38. Peng, S.H. Plasma and urinary markers of oral testosterone undecanoate misuse [Text] / S.H. Peng, J. Segura, M. Farre, J.C. Gonzalez, X. de la Torre // *Steroids.* — 2002. — V. 67. — No 1. — P. 39—50.
39. Korenman, S.G. Isolation of 17 α -hydroxyandrost-4-en-3-one (epitestosterone) from human urine [Text] / S.G. Korenman, H. Wilson, M.B. Lipsett // *J. Biol. Chem.* — 1964. — V. 239. — No 4. — P. 1004—1006.
40. Dehennin, L. Secretion by the human testis of epitestosterone, with its sulfoconjugate and precursor androgen 5-androstene-3 β ,17 α -diol [Text] / L. Dehennin // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1993. — V.44. — No 2. — P. 171—177.
41. Wilson, H. Metabolism of epitestosterone in man [Text] / H. Wilson, M.B. Lipsett // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1966. — V. 26. — No 8. — P. 902—914.
42. Dorfman, R.I. *Androgens* [Text] : book / R.I. Dorfman, R.A. Shipley — New York: John Wiley & Sons, 1956. — P. 124.
43. Dehennin, L. Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alterations of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sport [Text] / L. Dehennin, A.M. Matsumoto // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1993. — V. 44. — No 2. — P. 179—189.

44. Uralets, V.P. Over-the-counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 β ,17 β -diol; and 19-nor-4-androsten-3,17-dione: excretion studies in men [Text] / V.P. Uralets, P.A. Gillette // *J. Anal. Toxicol.* — 1999. — V. 23. — No 5. — P. 357—366.
45. Bowers, L.D. Oral dehydroepiandrosterone supplementation can increase the testosterone/epitestosterone ratio [Text] / L.D. Bowers // *Clin. Chem.* — 1999. — V. 45. — No 2. — P. 295—297.
46. Aguilera, R. Detection of epitestosterone doping by isotope ratio mass spectrometry [Text] / R. Aguilera, C.K. Hatton, D.H. Catlin // *Clin. Chem.* — 2002. — V. 48. — No 4. — P. 629—636.
47. Randall, V.A. Role of 5 alpha-reductase in health and disease [Text] / V.A. Randall // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1994. — V. 8. — No 2. — P. 405—431.
48. Van Renterghem, P. Subject-based steroid profiling and the determination of novel biomarkers for DHT and DHEA misuse in sports [Text] / P. Van Renterghem, P. Van Eenoo, P. E. Sottas, M. Saugy, F. T. Delbeke // *Drug Test. Anal.* — 2010. — V. 2. — No 11—12. — P. 582—588.
49. Kickman, A.T. Proposed confirmatory procedure for detecting 5 alpha-dihydrotestosterone doping in male athletes [Text] / A.T. Kickman, S.B. Coutts, C.J. Walker, D.A. Cowan // *Clin. Chem.* — 1995. — V. 41. — No 11. — P. 1617—1627.
50. Donike, M. Detection of dihydrotestosterone (DHT) doping: alterations in the steroid profile and reference ranges for DHT and its 5 alpha-metabolites [Text] / M. Donike, M. Ueki, Y. Kuroda, H. Geyer, E. Nolteernsting, S. Rauth, W. Shänzer, U. Shindler, E. Völker, M. Fujisaki // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* — 1995. — V. 35. — No 4. — P. 235—250.
51. Van Renterghem, P. Development of a GC/C/IRMS method – confirmation of a novel steroid profiling approach in doping control [Text] / P. Van Renterghem, M. Polet, L. Brooker, W. Van Gansbeke, P. Van Eenoo // *Steroids.* — 2012. — V. 77. — No 11. — P. 1050—1060.
52. Horton, R. Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of conversion to testosterone [Text] / R. Horton, J.F. Tate // *J. Clin. Invest.* — 1966. — V. 45. — No 3. — P. 301—313.

53. Longcope, C. Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women [Text] / C. Longcope, T. Kato, R. Horton // *J. Clin. Invest.* — 1969. — V. 48. — No 12. — P. 2191—2201.
54. Weinstein, R.L. Secretion of unconjugated androgens and estrogens by the normal and abnormal human testis before and after human chorionic gonadotropin [Text] / R.L. Weinstein, R.P. Kelch, M.R. Jenner, S.L. Kaplan, M.M. Grumbach // *J. Clin. Invest.* — 1974. — V. 53. — No 1. — P. 1—6.
55. Wang, J. Profiling of urinary steroids by gas chromatography–mass spectrometry detection and confirmation of androstenedione administration using isotope ratio mass spectrometry [Text] / J. Wang, M. Wu, X. Liu, Y. Xu // *Steroids.* — 2011. — V. 76. — No 14. — P. 1560—1565.
56. Baulieu, E.E. An adrenal–secreted "androgen": dehydroisoandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man [Text] / E.E. Baulieu, C. Corpechot, F. Dray, R. Emiliozzi, M.C. Lebeau, P. Mauvais, P. Robel // *Recent Prog. Horm. Res.* — 1965. — V. 21. — No 1. — P. 411—500.
57. Longcope, C. Metabolism of dehydroepiandrosterone [Text] / C. Longcope // *Ann. NY Acad. Sci.* — 1995. — V. 774. — No 1. — P. 143—148.
58. Mareck, U. Detection of Dehydroepiandrosterone misuse by means of gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry [Text] / U. Mareck, H. Geyer, U. Flenker, T. Piper, M. Thevis, W. Schänzer // *Eur. J. Mass. Spectrom.* — 2007. — V. 13. — No 6. — P. 419—426.
59. Payne, A.H. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones [Text] / A.H. Payne, D.B. Hales // *Endocr. Rev.* — 2004. — V. 25. — No 6. — P. 947—970.
60. Stock, J.P. Pregnenolone in the treatment of rheumatoid arthritis [Text] / J.P. Stock, E.C. McClure // *Lancet.* — 1950. — V. 2. — No 4. — P. 125—128.
61. Roberts, E. Pregnenolone – from Selye to Alzheimer and a model of the pregnenolone sulfat binding site on the GABA_A receptor [Text] / E. Roberts // *Biochem. Pharmacol.* — 1995. — V. 49. — No 1. — P. 1—16.

62. Ritsner, M.S. Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and schizophrenia: Alterations and clinical trials [Text] / M.S. Ritsner // *CNS Neurosci. Ther.* — 2010. — V. 16. — No 1. — P. 32—44.
63. The 2013 Prohibited List. International Standard [электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency : [сайт] : — URL: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2013/WADA-Prohibited-List-2013-EN.pdf. Дата обращения: 17.10.2013.
64. Piper, T. Investigations on changes in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids after pregnenolone administration [Text] / T. Piper, C. Schlug, U. Mareck, W. Schänzer // *Drug Test. Anal.* — 2011. — V. 3. — No 5. — P. 283—290.
65. Schwarzel, W.C. Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. VIII. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta [Text] / W.C. Schwarzel, W.G. Kruggel, H.J. Brodie // *Endocrinology.* — 1973. — V. 92. — No 3. — P. 866—880.
66. Brodie, A.M.H. Inhibition of peripheral aromatization by aromatase inhibitors, 4-hydroxy- and 4-acetoxy-androstene-3,17-dione [Text] / A.M.H. Brodie, C. Longcope // *Endocrinology.* — 1980. — V. 106. — No 1. — P. 19—21.
67. Coombes, R.C. 4-hydroxyandrostenedione in treatment of postmenopausal patients with advanced breast cancer [Text] / R.C. Coombes, P. Goss, M. Dowsett, J.C. Gazet, A. Brodie // *Lancet.* — 1984. — V. 324. — No 8414. — P. 1237—1239.
68. Goss, P.E. Treatment of advanced postmenopausal breast cancer with aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione: Phase II report [Text] / P.E. Goss, T.J. Powles, M. Dowsett, G. Hutchinson, A.M.H. Brodie, J.C. Gazet, R.C. Coombes // *Cancer Res.* — 1986. — V. 46 — No 9. — P. 4823—4826.
69. P.E. Goss, P.E. Metabolism of the aromatase inhibitor 4-hydroxyandrostenedione in vivo. Identification of the glucuronide as a major urinary metabolite in patients and biliary metabolite in the rat [Text] / P.E. Goss, M. Jarman, J.R. Wilkinson, R.C. Coombes // *J. Steroid Biochem.* — 1986. — V. 24 — No 2. — P. 619—622.
70. Piper, T. Investigations on carbon isotope ratios and concentrations of urinary formestane [Text] / T. Piper, G. Fushöller, C. Emery, W. Schänzer, M. Saugy // *Drug Test. Anal.* — 2012. — V. 4 — No 12. — P. 942—950.

71. Van Puymbroeck, M. Metabolites in feces can be important markers for the abuse of anabolic steroids in cattle [Text] / M. Van Puymbroeck, L. Leysens, D. Vanderzande, J. Gelan, J. Raus // *Analyst*. — 1998. — V. 123. — No 12. — P. 2449—2452.
72. O'Connor, J.J. Evaluation of boldenone undecylenate as an anabolic agent in horses [Text] / J.J. O'Connor, M.C. Stillions, W.A. Reynolds, W.H. Linkenheimer, D.C. Maplesden // *Can. Vet. Jour.* — 1973. — V. 14. — No 7. — P. 154—158.
73. Van Puymbroeck, M. Identification of some important metabolites of boldenone in urine and feces of cattle by gas chromatography–mass spectrometry [Text] / M.V. Puymbroeck, M. E.M. Kuilman, R.F. Maas, R. F. Witkamp, L. Leysens, D. Vanderzande, J. Gelan, J. Raus // *Analyst*. — 1998. — V. 123. — No 12. — P. 2681—2686.
74. Brabander, H.F. Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review [Text] / H.F. de Brabander, S. Poelmans, R. Schilt, R.W. Stephany, B. le Bizec, R. Draisci, S.S. Sterk, L.A. van Ginkel, D. Courtheyn, N. van Hoof, A. Macri, K. de Wasch // *Food Addit. Contam.* — 2004. — V. 21. — No 6. — P. 515—525.
75. Schänzer, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids [Text] / W. Schänzer // *Clin. Chem.* — 1996. — V. 42. — No 7. — P. 1001—1020.
76. Owen, R.W. The degradation of cholesterol by *Escherichia coli* isolated from human faeces [Text] / R.W. Owen, M.E. Tenneson, R.F. Bilton, A.N. Mason // *Biochem. Soc. Trans.* — 1978. — V. 6. — No 2. — P. 377—379.
77. Owen, R.W. The biotransformation of hyodeoxycholic acid by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under anaerobic conditions [Text] / R.W. Owen, R.F. Bilton // *J. Steroid Biochem.* — 1983. — V. 19. — No 3. — P. 1355—1362.
78. Piper, T. Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of urinary excreted boldenone and its main metabolite 5β -androst-1-en-17 β -ol-3-one [Text] / T. Piper, H. Geyer, V. Gougoulidis, U. Flenker, W. Schänzer // *Drug Test Anal.* — 2010. — V. 2. — No 5. — P. 217—224.
79. Muller, L. Quantification of 5α - and 5β -androstanediols in urine by gas chromatography–mass spectrometry [Text] / L. Muller, G. Phillipou // *Clin. Chem.* — 1987. — V. 33. — No 2. — P. 256—260.

80. Shackleton, C.H.L. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstane diols [Text] / C.H.L. Shackleton, A. Phillips, T. Chang, Y. Li // *Steroids*. — 1997. — V. 62. — No 4. — P. 379—387.
81. Shackleton, C.H.L. Androstane diol and 5 α -androstane diol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry [Text] / C.H.L. Shackleton, E. Roitman, A. Phillips, T. Chang // *Steroids*. — 1997. — V. 62. — No 10. — P. 665—673.
82. Aguilera, R. Detection of testosterone misuse: Comparison of two chromatographic sample preparation methods for gas chromatographic–combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis [Text] / R. Aguilera, M. Becchi, C. Grenot, H. Casabianca, C.K. Hatton // *J. Chromatogr. B*. — 1996. — V. 687. — No 1. — P. 43—53.
83. Schänzer, W. Immunoaffinity chromatography in isolation of anabolic steroids [Text] / W. Schänzer, P. Delahaut, E. Volker, M. Donike // *Proceedings of the Manfred Donike Workshop, 10th Cologne Workshop on Dope Analysis, March 7 — 12, 1992* : [abstract book] — Cologne, Germany. — 1992. — P. 307—320.
84. Machnik, M. Purification and concentration of anabolic steroids by IAC [Text] / M. Machnik, P. Delahaut, S. Horning, W. Schänzer // *Recent advances in doping analysis (4) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 15th Cologne Workshop on Dope Analysis, February 23 — 28, 1997* : [abstract book] — Cologne, Germany. — 1997. — P. 223—237.
85. Wa, C. Distinguish endogenous and exogenous epitestosterone using GC/C/IRMS with TLC purification [Text] / C. Wa, M. Wu, Y. Zhang, X. Liu, C. Zhang // *Recent advances in doping analysis (9) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 19th Cologne Workshop on Dope Analysis, March 18 — 23, 2001* : [abstract book] — Cologne, Germany. — 2001. — P. 155—165.
86. Wang, J. Androsterone, 5 α -androstane diol and testosterone for GC/C/IRMS – discussion with case analysis [Text] / J. Wang, M. Wu, Y. Zhang, X. Liu, Y. Zhiyong // *Recent advances in doping analysis (11) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 21st Cologne Workshop on Dope Analysis, March 16 — 21, 2003* : [abstract book] — Cologne, Germany. — 2003. — P. 195—205.

87. Wang, J. Delta values of different steroids [Text] / J. Wang, M. Wu, Y. Zhang, X. Liu, H. Zhang // Recent advances in doping analysis (12) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 22nd Cologne Workshop on Dope Analysis, March 7 — 12, 2004 : [abstract book] — Cologne, Germany. — 2004. — P. 241—250.
88. Aguilera, R. Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols [Text] / R. Aguilera, D.H. Caltin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, R.S. Swerdloff, H.G. Pope, C.K. Hatton // J. Chromatogr. B. — 1999. — V. 727. — No 1—2. — P. 95—105.
89. Aguilera, R. A rapid screening assay for measuring urinary androsterone and etiocholanolone $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ values by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry [Text] / R. Aguilera, D.H. Caltin, T.H. Chapman // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2000. — V. 14. — No 23. — P. 2294—2299.
90. Aguilera, R. Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios [Text] / R. Aguilera, D.H. Caltin, T.H. Chapman, C.K. Hatton, B. Starcevic // Clin. Chem. — 2001. — V. 47. — No 2. — P. 292—300.
91. Saudan, C. Validation and performance comparison of two carbon isotope ratio methods to control the misuse of androgens in humans [Text] / C. Saudan, C. Emery, F. Marclay, E. Strahm, P. Mangin, M. Saugy // J. Chromatogr. B. — 2009. — V. 877. — No 23. — P. 2321—2329.
92. Horning, S. Detection of exogenous testosterone by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analysis [Text] / S. Horning, H. Geyer, M. Machnik, W. Schänzer, A. Hilker // Recent advances in doping analysis (4) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 15th Cologne Workshop on Dope Analysis, February 23 — 28, 1997 : [abstract book] — Cologne, Germany. — 1997. — P. 275—283.
93. Horning, S. Detection of exogenous steroids by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analysis [Text] / S. Horning, H. Geyer, U. Flenker, W. Schänzer // Recent advances in doping analysis (5) proceedings of the Manfred Donike Workshop, 16th Cologne Workshop on Dope Analysis, March 15 — 20, 1998 : [abstract book] — Cologne, Germany. — 1998. — P. 135—148.

94. Sobolevsky, T. Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine [Text] / T. Sobolevsky, G. Rodchenkov // J. Steroid Mol. Biochem. — 2012. — V. 128. — No 3–5. — P. 121—127.
95. Torre, X. 13C/12C isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations [Text] / X. Torre, J.C. González, S. Pichini, J.A. Pascual, J. Segura // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2001. — V. 24. — No 4. — P. 645—650.
96. The 2012 International Standard for Laboratories. Versio,,n 7.0 [электронный ресурс] // World Anti-Doping Agency : [сайт] : — URL: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf. Дата обращения: 17.10.2013.