

Отзыв официального оппонента  
на диссертационную работу Ильи Сергеевича Прасолова  
«Обнаружение стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека,  
методом изотопной хромато-масс-спектрометрии»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия

**Актуальность темы исследования.**

Аналитическая практика в допинг-контроле всегда привлекает особенное внимание как относящаяся к общественно значимым областям. Поэтому методы допинг-контроля непрерывно развиваются, чтобы, с одной стороны, постараться обнаружить по возможности все запрещенные препараты, с другой стороны, обеспечить максимальную достоверность результатов. Данная работа посвящена именно этому - улучшить надежность выявления случаев употребления допинговых препаратов с помощью современных методов анализа, поэтому актуальность ее не вызывает сомнений.

Синтетические стероидные гормоны, применяемые в составе допинг-препаратов, часто имеют эндогенные аналоги, что затрудняет их надежное определение. Сейчас существуют два способа определения таких соединений: установление индивидуального стероидного профиля или применение изотопной хромато-масс-спектрометрии - прямого метода выявления происхождения препарата. Данная диссертационная работа посвящена развитию этого последнего метода.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, вполне обоснованы тем, что базируются на большой экспериментальной работе с широкой выборкой спортсменов, рассмотрении вкладов возможных прекурсоров, использовании современной высокоточной аппаратуры и тщательной проработкой всех аспектов аналитической процедуры.

**Достоверность и новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Достоверность результатов подтверждается процедурами контроля качества, систематическим характером исследования, а также большим объемом экспериментального материала - более 900 отрицательных и 220 положительных образцов мочи спортсменов и добровольцев российской популяции. Это впервые позволило установить критерии оценки результатов анализа по референтным интервалам различий изотопного состава в парах «эндогенный маркер-целевое соединение» для российской популяции спортсменов. Получены новые данные по биотрансформации шести прогормональных препаратов, влияющих на изотопный состав углерода стероидов человеческого организма, и установлены маркеры употребления, наиболее информативные при выявлении случаев их использования в спорте. На основании ряда



экспериментов установлены оптимальные режимы подготовки проб и анализа целевых соединений.

#### **Значение полученных результатов для науки и практики.**

Результаты диссертационной работы вносят большой вклад в совершенствование аналитических методов допинг-контроля, увеличивая их надежность и достоверность и расширяя арсенал возможностей Антидопингового Центра.

Результаты диссертационной работы внедрены в практику антидопингового Центра.

Разработанная методика прошла валидацию и метрологическую аттестацию и показала высокую эффективность на практике.

В последние годы методы допинг-контроля получили значительное развитие как в результате появления более совершенной аппаратуры с новыми более широкими возможностями, так и в результате создания новых методов контроля, таких как «стероидный паспорт спортсмена» и т.п. Одним из таких новых методов является сочетание изотопной масс-спектрометрии с капиллярной газовой хроматографией. Этот метод рекомендован ВАДА для использования в допинг-контроле, но для его реализации нужна не только высокая квалификация аналитика, но и тщательное исследование всех стадий процедуры и их доработка и усовершенствование, прежде всего, для обеспечения надежности, что является первостепенным для этого вида анализа. Результат работы - методика, реализующая этот тонкий и сложный метод анализа, прошедшая валидацию и метрологическую аттестацию и принятая для практического использования. Следует отметить, что ввиду сложности и ответственности анализа (не просто достаточно точное определение каких-либо компонентов или из свойств, а заключения о действиях спортсмена) методики, подобные этой, не могут ограничиваться просто получением каких-то цифровых данных, а этих данных должно быть достаточно для однозначного заключения. Поэтому важным результатом работы является также исследование биотрансформации шести прогормональных препаратов, влияющих на изотопный состав углерода стероидов человеческого организма, что позволило определить временные интервалы сохранения в организме измененных изотопных отношений и выбрать маркеры этих препаратов для выявления случаев их употребления.

#### **Общая оценка содержания диссертации, ее завершенность.**

Диссертационная работа изложена на 166 листах, состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 96 ссылок, содержит 93 рисунка, 69 таблиц.

Во введении обоснована актуальность работы, ее цели и задачи.

Глава 1 представляет собой обзор литературы по принципам изотопной хромато-масс-спектрометрии, особенностям метаболизма стероидных гормонов и взаимному влиянию на него разных стероидов, а также эффективным методам их определения в допинг-контроле. Анализ литературных данных показал, что большинство эндогенных стероидов влияют на биотрансформацию тестостерона и его метаболитов, и следовательно при определении изотопного состава стероидов, выделенных из мочи



человека, необходимо в число целевых соединений, кроме тестостерона, включать его метаболиты.

Рассмотрены основные варианты пробоподготовки и дан из сравнительный анализ. На основании анализа литературных данных отдано предпочтение сочетанию твердофазной экстракции и препаративной ВЭЖХ.

В главе 2 описана экспериментальная часть: оборудование и методика эксперимента. Представлены все стадии многоступенчатого процесса пробоподготовки и анализа образцов мочи методом изотопной хромато-масс-спектрометрии. экстракции, дериватизации, взаимодействия с реагентом Жерара, газовой хроматографии и изотопной масс-спектрометрии. Большое внимание уделено рассмотрению окислительной конверсии стероидов - одной из важнейших стадий анализа, влияющих на точность определения изотопных отношений. Здесь же дано описание экспериментов по поиску оптимальных условий.

В главе 3 описаны исследования по выработке и оптимизации процедуры подготовки проб к анализу. Специальные исследования посвящены подбору оптимальных условий ЖЖЭ и ТФЭ, препаративной ВЭЖХ, реакции с реагентом Жерара для удаления кетостероидов, получению ацетильных производных. Найдены условия ацетилирования, обеспечивающие полную степень конверсии эндогенного маркера 16-андростенола в ацетильную форму и корректное измерение его изотопного соотношения.

В главе 4 решена задача выбора наиболее подходящих условий анализа экстрактов методом изотопной хромато-масс-спектрометрии, а также окислительной конверсии стероидов и последующей масс-спектрометрической идентификации продукта конверсии и измерения изотопных отношений. Выбраны оптимальные условия газохроматографического разделения целевых стероидов.

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. Приводимые масс-хроматограммы свидетельствуют о высокой степени очистки проб и хорошем разделении определяемых соединений.

Глава 5 посвящена валидации и аттестации разработанной методики. Проверены степень извлечения целевых соединений на стадии ВЭЖХ-фракционирования, стабильность изотопного состава целевых соединений в процессе ВЭЖХ-фракционирования, линейность сигнала изотопного масс-спектрометра, повторяемость, промежуточная прецизионность.

Один из важных результатов работы - установление статистически обоснованных референтных интервалов для разности изотопного состава углерода тестостерона и других целевых стероидов для российской популяции на основании анализа образцов мочи спортсменов и добровольцев. Было проанализировано более 900 отрицательных и 220 положительных образцов мочи. В результате статистической обработки полученных данных впервые установлены референтные интервалы в парах «эндогенный маркер -



целевое соединение» для российской популяции, что необходимо для однозначной интерпретации аналитических данных. Межлабораторные сличительные испытания подтвердили правильность результатов, получаемых с помощью разработанной методики.

В главе 6 приведены результаты исследования изменения изотопного состава эндогенных стероидов после употребления их синтетических аналогов - приема, позволяющего скрыть факт употребления допинг-препаратов. Определены интервалы времени и установлены характеристичные маркеры, позволяющие установить факт употребления допинг-препаратов.

На основании результатов эксперимента по *in vivo* биотрансформации шести синтетических аналогов эндогенных стероидов выявлены закономерности в изменении изотопного состава эндогенных стероидов и определены времена сохранения изменений изотопных отношений и пары «эндогенный маркер - целевое соединение», наиболее информативные в случае установления факта употребления каждого из препаратов.

В результате проведенного исследования предложен способ обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато-масс-спектрометрии.

#### **Публикации и апробация.**

Основные результаты работы были представлены в виде докладов на российских и международных конференциях и опубликованы в трех статьях и четырех тезисах докладов.

#### **Достоинства и недостатки диссертационной работы**

Диссертационная работа И.С. Прасолова посвящена актуальному вопросу - повышению надежности и достоверности результатов определения изотопных отношений методом газовой хроматографии-сжигания-изотопной масс-спектрометрии (ГХ-С-ИМС) в допинг-контроле. Им разработана ГХ-С-ИМС методика обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, на фоне таких же эндогенных веществ. На основании обработки выборки из 923 образцов мочи спортсменов и волонтеров установлены статистически обоснованные референтные интервалы для пар «целевое соединение - эндогенный маркер» для российской популяции. Методика прошла валидацию и метрологическую аттестацию и применяется в аналитической практике Антидопингового Центра.

В работе изучена биотрансформация шести прогормональных препаратов, влияющих на изотопный состав углерода стероидов человеческого организма. Это что позволило определить кинетику изменения изотопных отношений и выбрать маркеры этих препаратов для выявления случаев их употребления.

Диссертация написана хорошим языком, хорошо иллюстрирована рисунками, данные подробно представлены в таблицах.

Работа не лишена недостатков. Имеется определенная путаница с терминами. Результат работы иногда называется разработкой способа, иногда - методики, иногда -



процедуры. По содержанию это, конечно аналитическая методика (согласно ГОСТ Р 52361 -2005).

Разработка методики обнаружения стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато-масс-спектрометрии провозглашается целью работы и в диссертации содержатся все ее процедуры, метрологические характеристики и т.п., однако в выводах этот основной результат работы отсутствует, хотя содержится ряд частных результатов, таких как оптимизация отдельных стадий пробоподготовки. Отсутствует также вывод о результатах изучения биотрансформации прогормональных препаратов экзогенного происхождения и их влияния на изотопный состав эндогенных стероидов, а указан только выбор потенциальных маркеров их употребления. Правда, частично это компенсируется тем, что перед выводами в диссертации помещено заключение, в котором результаты работы представлены гораздо лучше.

Интересен также вопрос о границах применимости методики. Критерии в методике основаны на обработке данных для российской популяции спортсменов. Отличается ли российская популяция от других? Как известно, пробы в лабораторию допинг-контроля поступают в зашифрованном виде. Как оценить возможность применения данной методики в данном случае, а также международные соревнования?

В обзоре литературы есть ссылка на Руководство ВАДА по применению изотопной ХМС для целей допинг-контроля, но нет его описания. Отсутствует также обзор работ по применению метода ГХ-С-ИМС в допинг-контроле, хотя этот развивающийся метод не просто привлекает большое внимание, но и стал официальным методом ВАДА.

Следует отметить также ряд недосмотров при оформлении диссертации.

На с.5 отсутствуют ссылки там, где это необходимо.

На с.63, формула 3: размерность не соответствует объему.

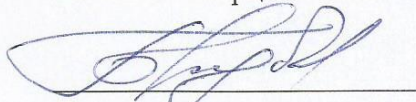
В ряде случаев автор использует жаргонные или неудачные выражения типа «пробоподготовка образцов» (с.3 и далее), контроль качества ... топливных ресурсов (с.9), «вязкое» (вместо вязкостное) натекание (с.14), «при пероральном приеме спортсмен может быть обнаружен ...» (с.16), низкая летучесть стероидов ставит необходимость в стадии дериватизации» (с.24), «учитывая специфику аппаратного обеспечения метода, существует ряд жестких требований...» (с.24) и др.

Однако эти недостатки относятся в основном к оформлению диссертации и не влияют на значимость, достоверность и полноту результатов. Диссертационная работа И.С. Прасолова представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком профессиональном уровне, решающее важные научно-практические задачи. По объему выполненных работ, актуальности, научной и практической ценности, надежности и достоверности основных выводов диссертационная работа Ильи Сергеевича Прасолова «Обнаружение стероидов экзогенной природы, выделенных из мочи человека, методом изотопной хромато-масс-спектрометрии», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия, соответствует требованиям п.9 постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание



ученой степени кандидата химических наук, а Илья Сергеевич Прасолов заслуживает присуждения ему искомой степени по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

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



Е.С.Бродский

4.сентября 2015 г.

Москва, 119071  
Ленинский проспект, 33  
Тел. (499) 135 13 80. [efbr@mail.ru](mailto:efbr@mail.ru)

