

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Кубанский государственный университет»



На правах рукописи

АЗАРЯН АЛИСА АНДРЕЕВНА

**ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
НЕКОТОРЫХ КСЕНОБИОТИКОВ И КАТЕХОЛАМИНОВ В  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
Темердашев Азамат Зауалевич,  
кандидат химических наук, доцент

Краснодар 2019

## Оглавление

|   |     |
|---|-----|
| Введение.....   | 3   |
| 1 Литературный обзор .....  | 7   |
| 1.1 Развитие наркотических соединений и психоактивных веществ и<br>применение их в спорте.....  | 7   |
| 1.2 Скрининг и идентификация наркотических и психоактивных веществ....  | 10  |
| в продуктах спортивного питания.....  | 10  |
| 1.3 Определение наркотических и психоактивных веществ в биологических<br>объектах .....   | 14  |
| 1.4 Определение «аптечных наркотиков» в биологических жидкостях<br>человека.....  | 24  |
| 1.5 Мельдоний, как представитель группы модуляторов метаболизма.....  | 33  |
| 1.6 Хроматографическое определение катехоламинов в моче .....   | 35  |
| 1.7 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования .....  | 38  |
| 2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов .....  | 40  |
| 2.1 Материалы, реактивы и использованное оборудование.....  | 40  |
| 2.2 Обоснование выбора метода исследования для определения некоторых<br>ксенобиотиков и катехоламинов в биологических жидкостях человека.....       | 42  |
| 2.3 Скрининг и идентификация наркотических и психоактивных веществ..<br>в продуктах спортивного питания.....  | 46  |
| 2.4 Определение тестостерона и эфедрина в моче .....  | 56  |
| 2.5 Определение некоторых наркотических соединений в моче.....  | 62  |
| 2.6 Мельдоний, как модулятор метаболизма, его определение в режиме<br>гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием<br>..... | 83  |
| 2.7 Изучение возможности дериватизации катехоламинов на патронах для<br>ТФЭ в целях мониторинга биологического паспорта.....                        | 93  |
| Выводы .....  | 102 |
| Список сокращений .....   | 104 |
| Список литературы .....   | 106 |

## ВВЕДЕНИЕ

Развитие фармацевтической индустрии приводит к созданию новых препаратов, требующих разработки современных методов контроля, отличающихся экспрессностью, высокой точностью и надежностью. Помимо возможности их применения для лечения различных заболеваний, известны случаи применения новых субстанций в качестве допинг-агентов, хотя далеко не все препараты проходят полный цикл клинических испытаний. Немаловажным является то, что они становятся доступными на черном рынке биологически активных добавок и вспомогательных препаратов для спортсменов, попадая сначала в мониторинговый лист ВАДА, а затем в список запрещенных веществ при выявлении свойств, характерных для допинг-агентов. Ряд препаратов, примененных в качестве стимуляторов в профессиональном спорте, позже получили распространение среди лиц с наркотической зависимостью, т.к., с увеличением концентрации, они начинали проявлять типичные свойства наркотических средств. Наблюдается также рост популярности «аптечных наркотиков» - веществ, находящихся в открытой продаже и являющихся, по сути, лекарственными препаратами без ярко выраженных психоактивных свойств. Отсутствие методик их контроля в биологических жидкостях, а также сведений о периоде их выведения и метаболизме в организме, делает актуальной задачу их идентификации и определения в коммерчески доступных продуктах и биологических жидкостях человека.

Для решения подобных задач наиболее эффективными, как показывает анализ литературных данных, представляются методы хромато-масс-спектрометрии в различных вариантах их исполнения. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) позволяет проводить идентификацию различных ксенобиотиков в криминалистических и токсикологических лабораториях с последующим подтверждением полученных результатов с помощью методов газовой хромато-масс-спектрометрии.

Применение этих методов также позволяет установить факт фальсификации продукции и обнаружить не декларированные компоненты, что особенно важно в случаях контроля спортивного питания и биологически активных добавок.

Употребление различных допинг-агентов также может приводить к высвобождению нейромедиаторов, таких, как норадреналин, дофамин из нервных окончаний и блокирует их обратный захват, тем самым оказывая влияние на биосинтез катехоламинов в организме человека. С другой стороны, изменение содержания уровней катехоламинов может указывать на нарушения, протекающие в нервной и сердечно-сосудистой системах. Важно также и то, что катехоламины являются маркерами в клинической диагностике, например, при оценке вероятности заболевания болезнью Паркинсона.

**Цель диссертационного исследования** – разработка аналитических схем хромато-масс-спектрометрического определения некоторых психоактивных веществ, допинг-агентов и катехоламинов в биологической жидкости человека.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС анализ различных видов продуктов спортивного питания и вспомогательных препаратов, проведение скрининговых исследований с целью обнаружения в них психоактивных веществ, допинг-агентов и запрещенных ВАДА;

- разработка методик определения некоторых наркотических и психоактивных соединений в биологической жидкости человека, оптимизация условий их разделения, оценка матричных эффектов;

- разработка методики ВЭЖХ-МС/МС определения мельдония в моче, характеризующая высокой точностью, экспрессностью, надежностью и высокой чувствительностью;

- изучение возможности хромато-масс-спектрометрического определения производных катехоламинов в моче человека, с применением аналитической дериватизации на патроне для твердофазной экстракции.

В работе представлены результаты хромато-масс-спектрометрического исследования ряда продуктов спортивного питания, реализованных в период с

2014 по 2016 гг. В ходе исследований в составе предтренировочных комплексов, жиросжигателей и прогормонов обнаружены запрещенные ВАДА вещества. Приводятся результаты исследований по определению психоактивных соединений, допинг-агентов и запрещенных ВАДА веществ в образцах спортивного питания и вспомогательных препаратов для спортсменов, а также разработанные аналитическая схема определения некоторых катинонов, тропановых алкалоидов и «аптечных» наркотиков в моче, методики определения мельдония и производных катехоламинов в моче человека.

**Научная новизна** проведенных исследований заключается в разработке методики определения некоторых наркотических и психоактивных веществ (катинонов, тропановых алкалоидов, производных гамма-аминомасляной кислоты) в моче, включающая подготовку проб к анализу и определение аналитов методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с электрораспылительной ионизацией. Предложен способ количественного определения мельдония в моче методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии, отвечающий требованиям точности, экспрессности, надежности и чувствительности. Продемонстрирована возможность применения данной методики в практике допинг-контроля и клинической диагностики. Разработана методика количественного определения производных катехоламинов в моче человека путем их дериватизации на патроне для твердофазной экстракции. Показано, что работа позволяет существенно сократить время, затрачиваемое на пробоподготовку, а также повысить чувствительность. С учетом простоты и воспроизводимости предлагаемая методика может быть использована в клинической лабораторной практике для диагностики различных заболеваний, а также для мониторинга биологического паспорта спортсмена.

**Практическая значимость.** Разработанная оригинальная методика определения мельдония в моче человека (патент РФ на изобретение № 2639475 «Способ определения мельдония в моче человека») метрологически аттестована и внесена в Федеральный реестр методик измерений МИ 02067847.02-2017

«Массовая концентрация мельдония в моче человека методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием». Методика введена в практику и используется в ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета с 28.08.2017 г.

Результаты работы обсуждались на IV Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2014 г.), II Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2015 г.), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2015 г.), III Всероссийской конференции по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу с международным участием (Краснодар, 2017 г.), III Съезде Аналитиков России (Москва, 2017 г.), V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2018 г.).

Настоящая диссертационная работа выполнялась в рамках проекта Госзадания Минобрнауки РФ (4.2612.2017/ПЧ) и гранта РФФИ (№ 18-33-20009 мол\_а\_вед) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр», уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

## 1 Литературный обзор

### 1.1 Развитие наркотических соединений и психоактивных веществ и применение их в спорте

История употребления наркотических средств (НС) и психоактивных веществ (ПВ) в повседневной жизни и профессиональном спорте уходит корнями в глубокое прошлое. Одними из наиболее известных допинг-агентов нового времени стали кокаин и стрихнин, а после появления синтетических производных фенилэтиламина произошла популяризация использования в спорте синтетических наркотических средств.

Термин «допинг» впервые был упомянут в 1889 году в английском словаре, первоначально описывался как доза лекарства, содержащая опиум, и используемая как «наркотик» лошадей. Также «допингом» называли спиртной напиток, приготовленный из винограда, который африканские воины использовали в качестве «стимулятора» во время боев и религиозных обрядов.

Позднее понятие «допинг» широко распространилось и на другие напитки со стимулирующими свойствами. Наконец, выражение было введено в английские дерновые виды спорта примерно в 1900 году за незаконную наркотику скаковых лошадей [1].

История спорта знает примеры употребления допинга, которые сейчас могут показаться абсурдными. Стрихнин - широко известный на сегодняшний день яд, является одним из первых примеров попытки употребления стимулирующих соединений. По статистике, стимуляторы являются одними из наиболее распространенных видов допинга. Яркими представителями этого класса соединений являются метилгексанамины, метилфенидат, эфедрин, амфетамин и др.

Растущая популярность различных видов допинга, стремление получить результат любой ценой привели к тому, что со временем Международный Олимпийский комитет (МОК) вынужден был сформировать специальную

группу, создавшую первый запрещенный к употреблению список веществ. В него вошли наркотические анальгетики, стимуляторы и алкоголь [2]. Начиная с этого периода, МОК, а позже – Всемирное антидопинговое агентство (ВАДА) обновляли список запрещенных веществ в соответствии с новыми исследованиями в области допинга [3,4]. Тем временем, постоянно возрастающий ассортимент доступных лекарственных средств и изощренность в области их применения, привели к необходимости применения более сложных, чувствительных и селективных методов анализа, предназначенных для определения и идентификации подобного рода соединений.

Однако со временем тенденция применения известных природных и простейших полусинтетических наркотиков в качестве допинг-агентов перешла в обратную сторону: все чаще стали отмечаться случаи, когда спустя несколько лет после применения в большом спорте, препараты уходили на черный рынок в качестве наркотических средств.

Наиболее ярким примером подобного развития событий стало начало 2000-х годов, когда новые синтетические катионы сначала попали в большой спорт и использовались в качестве стимуляторов, и лишь потом массово вышли на черный рынок. И это, несмотря на то, что исходные структуры данных препаратов были получены и частично изучены уже в 50-х и 60-х годах XX века. Уже тогда эти вещества не смогли пройти доклинические и клинические испытания из-за обилия побочных эффектов, что заставило крупные фармацевтические компании отказаться от их продвижения на рынок лекарственных средств.

Ряд препаратов, применяемых в профессиональном спорте в качестве стимуляторов с 2000-х годов, также получили распространение среди лиц с наркотической зависимостью. Одним из таких веществ стал метилendioксипировалерон, более известный как MDPV, стимулятор, получивший распространение как в профессиональном спорте, так и на черном рынке [5]. Помимо него широкое распространение получили  $\alpha$ -PVP, метилон, флэфедрон, метадон и ряд других стимуляторов.



В Российской Федерации пик нахождения этих веществ на черном рынке пришелся в период с 2010 по 2014 г.г., к тому моменту они и их метаболиты были известны многим антидопинговым лабораториям мира.

Нередки случаи, когда источником запрещенных препаратов становятся не только заведомо известные субстанции, на употребление которых осознанно могут идти некоторые недобросовестные спортсмены, но и продукты спортивного питания, в составе которых, как правило, открыто не указывается наличие запрещенных или психоактивных компонентов. Но данный факт не отменяет ответственности спортсмена за употребление допинг-агентов в случае их обнаружения во время прохождения допинг-контроля. Отчасти, это стало причиной активного развития новых классов допинг-агентов – релизинг-пептидов гормона роста, селективных модуляторов андрогенных рецепторов, модуляторов метаболизма и даже генного допинга. Относительно небольшие эффективные концентрации веществ, отсутствие методического обеспечения и полноценных характеристик структур позволяли им, до недавнего времени, успешно применяться в спорте высоких достижений.

До сих пор отсутствует информация о том, как влияют данные препараты в долгосрочной перспективе на организм человека. Приводят ли они к искажениям биологического паспорта (в частности, на стероидный профиль и содержание катехоламинов)? Насколько длительным оказывается их влияние? Для большинства новых соединений подобные сведения отсутствуют, а, принимая во внимание интенсивное развитие инструментальных методов анализа, подобные исследования целесообразно проводить вместе с адаптацией новых методов для решения уже известных задач, с целью повышения не только точности и надежности получаемых результатов, но и экспрессности, позволяя, тем самым существенно повысить продуктивность лабораторий.

## 1.2 Скрининг и идентификация наркотических и психоактивных веществ в продуктах спортивного питания

В последние годы в рамках правительственных программ ведется активная популяризация здорового образа жизни. Помимо роста вовлеченности населения в спортивные мероприятия разного рода, также растет и теневой рынок спортивного питания, добавок и препаратов, позволяющих достичь высоких атлетических результатов в короткий период. Зачастую подобные препараты содержат в своем составе запрещенные Всемирным Антидопинговым Агентством (ВАДА) соединения. Важно отметить то, что продукция подобного вида свободно продается в интернет-магазинах, и, зачастую, не содержит на этикетках информации о возможных рисках [6]. На сегодняшний день большинство веществ, содержащихся в их составе, не входит в список соединений, запрещенных к обороту со стороны правоохранительных органов на территории Российской Федерации, а также отсутствует обязательная сертификация продукта.

Наибольшую популярность в последние три года получили такие продукты, как селективные модуляторы андрогенных рецепторов (SARM), «пептиды» (релизинг-пептиды гормона роста), жиросжигатели, предтренировочные комплексы и прогормоны.

SARM – это новый класс препаратов, позиционирующийся на рынке как альтернатива анаболическим стероидам. Наиболее известными представителями данного класса соединений являются реверол, андарин, остарин, радарин, ибутаморен, миостоп (рисунке 1).

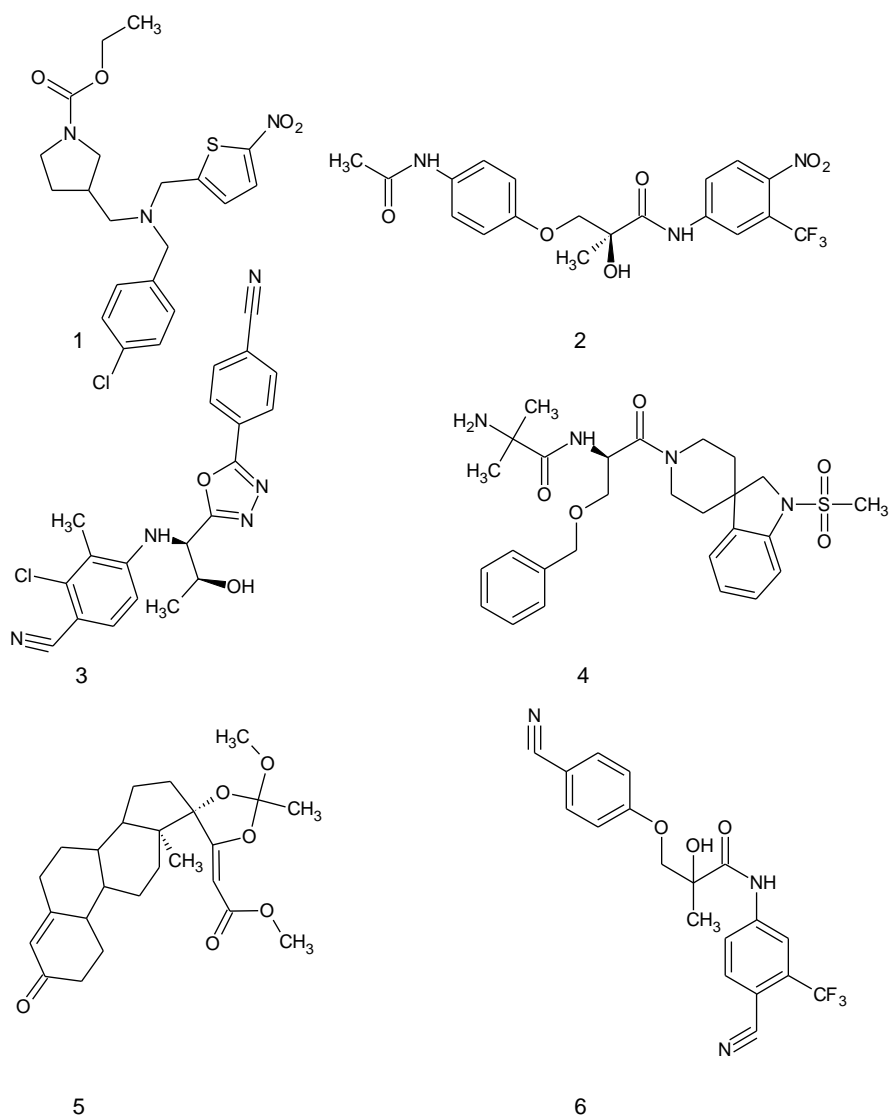


Рисунок 1 – структурные формулы некоторых наиболее распространенных SARM: 1 – реверол (SR9009), 2 – андарин, 3 – радарин (RAD140), 4 – ибутаморен, 5 – миостоп, 6 – остарин

Среди соединений, известных в качестве пептидного допинга, широкое распространение получили меланотан-2, селанк, гексарелин, ипаморелин, GHRP-2, GHRP-6 и другие (рисунке 2).

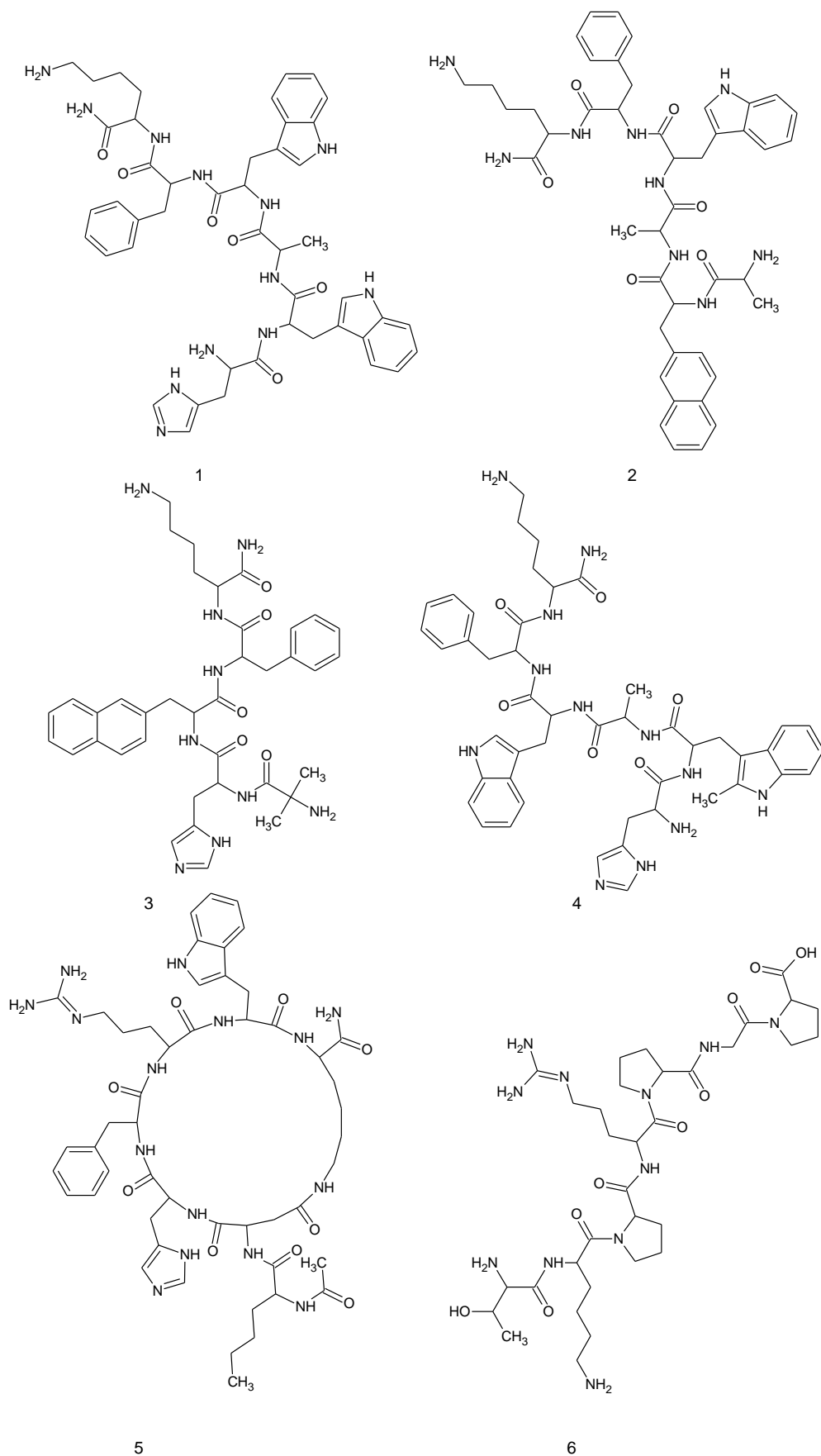


Рисунок 2 – структурные формулы некоторых пептидов: 1 – GHRP-6, 2 – GHRP-2, 3 – ипаморелин, 4 – гексарелин, 5 – меланотан 2, 6 – селанк

Небольшие эффективные концентрации, быстрое выведение и ряд затруднений при аналитическом определении данных соединений, быстро сделали их популярными на черном рынке. Стоит отметить, что, как и в случае с наркотическими средствами, отдельные представители данных классов веществ известны уже более 5 лет [7-9], а некоторые пептиды легально реализуются в аптеках в качестве лекарственных средств. Широкое распространение и известность в последние годы они получили в качестве допинг-препаратов, поскольку стали все чаще попадать в поле зрения антидопинговых лабораторий [10-14].

Для обоих классов препаратов (SARM и пептиды) продавцы заявляют отсутствие необходимости в проведении дополнительной терапии после курса приема, обязательной при употреблении анаболических стероидов, поскольку эти вещества не влияют на биологический паспорт. В частности, по уверению большинства лиц, занимающихся реализацией данных соединений, они не оказывают никакого влияния на стероидный профиль, не имеют побочных эффектов и не определяются при прохождении допинг-контроля, что, зачастую, не соответствует действительности.

В то же время сохраняют популярность традиционные виды спортивного питания, используемые в связке с описанными выше соединениями. Среди них большой популярностью пользуются жиросжигатели, предтренировочные комплексы и прогормоны, состав которых также отличается у разных производителей и не подлежит сертификации на территории Российской Федерации.

В работе [15] проведено исследование 24 образцов пищевых добавок. Образцы были проанализированы с помощью методов газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДМД). Было показано, что пищевые добавки содержат в своем составе следующие анаболические стероиды:

дегидроэпиандростерон, андростендион, метастерон, метилтестостерон, а также диметилтриптамин.

Во всем мире спортивное питание выпускается на рынок без предварительного исследования безопасности для здоровья потребителей. Тщательные исследования проводятся только в том случае, если проявляются факты причинения вреда здоровью, а также побочные эффекты, что может приводить как к негативным последствиям как для организма, так и для деятельности употреблявших данную продукцию людей.

Стоит отметить, что в случае обнаружения запрещенных препаратов во вспомогательных препаратах или спортивном питании, возникает проблема их определения в биологических жидкостях, поскольку в отношении новых классов препаратов зачастую отсутствуют сведения о кинетике их выведения из организма, а также о путях их метаболизма, что существенно затрудняет процесс их определения, требуя, тем самым, проведения полноценного цикла фармакокинетических исследований.

### 1.3 Определение наркотических и психоактивных веществ в биологических объектах

Одной из наиболее сложных задач является определение НС, ПВ и их метаболитов в биологических объектах. В этом случае выбор объекта для анализа и целевых соединений определяется задачами, поставленными перед аналитиком. Синтетические каннабимиметики и катиноны в неизменном состоянии можно обнаружить в волосах [16,17], слюне [18,19] и препаратах крови (сыворотка или цельная кровь) [20,21]. В отношении большинства известных современных синтетических наркотических средств уже известны пути метаболизма и основные их физико-химические свойства, разработка методик их определения в различных объектах по-прежнему ведется с целью повышения экспрессности, чувствительности и точности их определения.

Основными методами определения наркотических средств в биологических объектах, на сегодняшний день, являются иммунохимический анализ (ИХА), ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС.

Определение наркотических средств методом ИХА основано на принципе, при котором анализируемый образец абсорбируется поглощающими участками полоски; при наличии в образце определенного наркотического вещества или его метаболитов она вступает в реакцию со специфическими моноклональными антителами к данному наркотическому веществу, связанными с частицами коллоидного золота, образуя комплекс антиген-антитело. Этот комплекс вступает в реакцию конкурентного связывания с конъюгатом наркотического вещества, иммобилизованного в тестовой зоне полоски, образуя окрашенные линии.

Основным недостатком ИХА является его неселективность, а несомненным достоинством – экспрессность. Этот метод является базовым для ряда токсикологических лабораторий, однако в случае появления новых каннабиметиков он может давать ложноотрицательные результаты. В этом случае полезно опираться также и на клиническую картину: если она показывает признаки наркотического опьянения, то, вне зависимости от результатов ИХА, необходимо проводить хромато-масс-спектрометрический анализ.

Авторами [22] была проведена сравнительная оценка использования методов ИХА и тонкослойной хроматографии (ТСХ), как предварительного метода анализа мочи на наличие алкалоидов группы опия. В качестве подтверждающего метода использовали хромато-масс-спектрометрию (ГХ–МС). Общее число исследованных образцов мочи составило 73 пробы. Исследования показали, что метод ИХА, уступая методу ТСХ в селективности, значительно выигрывает по чувствительности, унификации и простоте выполнения исследования. Несмотря на то, что исследование проведено на ограниченном количестве экспертного материала, уже эти результаты показали возможность применения метода ИХА в рутинной работе по анализу наркотических средств в моче живых лиц, в целях выявления алкалоидов группы

опия. Экспресс-тесты ИХА имеют судебно-отрицательное значение, позволяют отсеивать отрицательные пробы мочи и ограничить круг объектов для дальнейшего инструментального анализа (подтверждающего исследования) только пробам с положительными результатами.

Помимо вышеперечисленных методов анализа особый интерес вызывает использование капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием (КЭ–МС). КЭ–МС на сегодняшний день, такой же общепризнанный метод, как ГХ-МС и ВЭЖХ–МС. Основными достоинствами данного метода считаются: чрезвычайно высокая эффективность разделения, малый расход реактивов и пробы, низкая стоимость капилляра и высокая экспрессность анализа. КЭ–МС позволяет идентифицировать белки, аминокислоты, углеводы, ВМС, в том числе пептиды [23]. Использование КЭ–МС позволяет исследовать такие биологические образцы, как кровь, моча и спинномозговая жидкость. Авторы работы [24] изучили влияние фонового электролита на эффективность разделения наркотических средств, используя КЭ–МС. По результатам исследования наилучшего разделения соединений удалось достичь, используя фосфат аммония. Данным методом были также проанализированы образцы волос.

Однако наиболее распространенным методом, широко используемым для рутинного скрининга наркотических средств и их метаболитов в биологических жидкостях и волосах, является газовая хроматография. Особую популярность, на сегодняшний день, приобретает систематический токсикологический анализ, проводимый методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором, так как этот метод с высокой степенью надежности позволяет детектировать одновременно множество токсикологически важных веществ в биообразцах. В этом случае необходим предварительный гидролиз, после чего довести рН пробы до 9-10 и добавить экстрагент для проведения жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ). Для увеличения степени извлечения из водной среды в ряде случаев целесообразным является применение экстракционного вымораживания, при



этом происходит замерзание водного слоя и для некоторых соединений можно наблюдать большую степень извлечения, нежели при обычной ЖЖЭ [25].

Отбор волос или слюны является неинвазивной процедурой, и с этой точки зрения анализ этих объектов кажется предпочтительным. Однако, анализ волос позволяет установить лишь хронический характер употребления НС, а достоверность анализа слюны представляется не слишком высокой. Вследствие малого содержания НС анализ объектов требует применения методов, позволяющих достигать низких пределов обнаружения, например, ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций. Процедура подготовки проб определяется характером объекта: для волос она включает длительную (около 3 ч) экстракцию этанолом при обработке ультразвуком [16] или гидролиз матрицы в присутствии едкого натра [17]; для слюны – твердофазную экстракцию [26] или осаждение белков.

В России исследования волос на наркотические вещества начали проводиться с 90-х годов. В литературе описан широкий круг примеров и методов исследования наркотических и сильнодействующих веществ в волосах. В то же время, как правило, данные методики рассчитаны на исследование либо конкретных соединений и их метаболитов, либо ограниченных групп. Последнее обусловлено спецификой метода ГХ–МС в режиме мониторинга выделенных ионов (SIM) и не позволяет проводить скрининг всех включаемых в круг исследования веществ за один цикл анализа. Целью исследования [27] была разработка аналитического метода для идентификации синтетических каннабиноидов JWH-018 и JWH-073 и их метаболитов в волосах с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Разработанный метод был проверен на волосах лиц, подозреваемых в употреблении синтетических каннабиноидов. Авторам [16] удалось определить 22 синтетических каннабиноида в волосах методом ВЭЖХ-МС/МС. Метод оказался точным и селективным и поэтому может быть рекомендован для определения новых синтетических каннабиноидов. Группой исследователей был разработан метод для анализа мефедрона в волосах с использованием ГХ-МС [28]. Из 67 образцов волос в 13 из них был обнаружен

мефедрон в диапазоне концентраций от 0,2 до 313,2 нг/мг. Разработанный метод оказался достаточно чувствителен и его вполне можно рекомендовать для определения систематического употребления мефедрона.

Намера с соавторами [29] разработали методику определения наркотиков пирролидинового типа, таких как пировалерон, MDPV,  $\alpha$ -PVP,  $\alpha$ -PBP и MDPBP в волосах методом ВЭЖХ–МС. Разработанная методика имеет предел детектирования 0,2 нг/мг. Пробоподготовку проводили путем щелочного гидролиза с последующей твердофазной экстракцией ТФЭ. Методика зарекомендовала себя как селективная, чувствительная и надежная и была апробирована на трех реальных образцах. В 1 образце  $\alpha$ -PVP и  $\alpha$ -PBP были обнаружены в 10-30 мм волос от скальпа. При этом ни одного наркотического соединения не было обнаружено в волосе на отрезке 0-10 мм от кожи головы, поскольку отбор пробы был произведен через 1 месяц после употребления наркотиков. Во 2 образце  $\alpha$ -PVP был обнаружен в 10-30 мм и 40-90 мм от кожи головы. Не обнаружено наркотических средств в 30-40 мм от кожи головы, поскольку в этот период пациент не употреблял наркотические средства. В 3 образце были обнаружены MDPV,  $\alpha$ -PVP,  $\alpha$ -PBP. Разработанная методика может быть рекомендована для использования в клинических и судебно-медицинских лабораториях.

В работе [30] была разработана и проведена валидация методики скрининга 52 наиболее распространенных наркотических и лекарственных веществ ВЭЖХ-МС/МС в волосах. Пробоподготовку проводили экстракцией аналитов метанолом, предел детектирования составил 0,01 нг/мг. Определение опиоидов и их метаболитов в биологических объектах вызывает большой интерес токсикологических, судебно-медицинских и клинических лабораторий.

Анализ волос удобен для установления хронического употребления опиоидов. Группой исследователей [31] был разработан метод по определению 18 опиоидов и их метаболитов в волосах. Пробоподготовку осуществляли путем проведения экстракции аналитов метанолом в течение 16 часов. Методика была успешно апробирована на 15 образцах волос лиц, употребляющих опиоиды.

В качестве альтернативы биологическим жидкостям на наличие наркотических средств представляет изучение слюны. Авторами [18] был разработан способ определения 30 синтетических каннабиноидов ВЭЖХ-МС/МС при анализе слюны. Метод оказался пригоден для количественного определения 28 веществ, пределы их обнаружения составили от 0,015 до 0,9 нг/мл. Соединения JWH-307 и CRA-13 были определены только качественно в связи с отсутствием надлежащих внутренних стандартов. Группой исследователей [32] предложен ВЭЖХ-МС/МС способ, позволяющий разделить и идентифицировать 24 синтетических каннабиноида в ротовой жидкости человека. Преимущество данного метода заключается в том, что объем образца, необходимый для анализа очень мал (0,5 мл).

Методом ВЭЖХ-МС/МС были определены синтетические каннабиметики: JWH-200, JWH-250, JWH-073, JWH-018, HU-211, CP 47,497 и CP 47,4970-C8 и ТГК в образцах слюны [33]. Пробоподготовку проводили с применением ТФЭ. Ионизация проводилась с использованием электрораспылительного источника ионизации (ИЭР) (+) для JWH-200, JWH-250, JWH-073, JWH-018 и ТГК, а ИЭР (-) для HU-211, CP 47,497 и CP 47,4970-C8. Предел детектирования для JWH-200, JWH-250, JWH-073, JWH-018 составил 0,025 нг/мл, для ТГК - 0,5 нг/мл и для HU-211, CP 47,497 и CP 47,4970-C8 - 1 нг/мл. Влияние матричных компонентов не превысило 35%.

Анализ препаратов крови пригоден для установления острого характера отравления, поскольку концентрация ксенобиотиков (особенно, синтетических каннабимиметиков) в крови быстро снижается во времени [34]. При работе с кровью и тканями целесообразно применение ТФЭ с целью предварительной очистки пробы и концентрирования аналитов. Экстракции может быть подвергнута цельная кровь, плазма или сыворотка. Если для предотвращения свертывания крови использовались антикоагулянты, то необходимо учитывать, что гепарин вытесняет жирные кислоты из мест их связывания с альбумином. Это влияет, с одной стороны, на увеличение связывания токсических веществ с белками, с другой – на переход жирных кислот в органический растворитель при

экстракции. Для уменьшения энзиматической активности кровь рекомендуется хранить в холодильнике в замороженном виде.

Дресен и др. [35] разработали методика ВЭЖХ-МС/МС определения JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-200 в биологических образцах. Апробация была проведена на 101 образце сыворотки крови. Пробоподготовку образцов осуществляли путем ЖЖЭ. Амманн с соавторами [29] с помощью ВЭЖХ-МС/МС определили в образцах крови 25 синтетических каннабиметиков, 7 из которых принадлежали к классу нафтаиндолов (JWH-015, JWH-073, JWH-018, JWH-081, JWH-007, JWH-398, JWH-210). Пробоподготовку проводили путем ЖЖЭ.

Большинство авторов методик определения наркотических средств [36,37] сходятся во мнении, что наиболее удобным и информативным объектом исследования является моча. По сравнению с кровью образцы мочи допускают более продолжительный интервал обнаружения наркотических средств и метаболитов. Кроме того, процедура её пробоподготовки для ВЭЖХ-МС/МС определения достаточно проста и заключается в разбавлении мочи смесью, содержащей органический растворитель (например, ацетонитрил) для денатурации белка. Впервые процедура разбавления пробы мочи была продемонстрирована в работах, направленных на скрининг дизайнерских наркотических соединений [38-41], опиатов [42], алкоголя [43,44] и психоактивных соединений растительного происхождения [45]. Однако в случае использования разбавления не позволяет добиться разрушения конъюгированных форм. Для того, чтобы разрушить конъюгаты, необходимо провести кислотный или ферментативный гидролиз.

При минеральном деконъюгировании для простой эфирной связи (гидроксилированные метаболиты фазы I) предпочтителен кислотный гидролиз, для сложноэфирной (карбоксилированные метаболиты фазы I) – основной. При кислотном гидролизе образцы мочи нагревают в присутствии соляной кислоты (30%) около часа при температуре 90–95 °С [46], при основном – при температуре 60 °С в течение 20 мин в присутствии едкого натра. Достоинствами

минерального деконъюгирования являются малая стоимость, недостатками – возможность модификации структур метаболитов фазы I.

При ферментативном деконъюгировании к образцу добавляют раствор  $\beta$ -глюкуронидазы определенного типа при контроле pH смеси [47]. Условия инкубирования зависят от вида фермента, количества действующих единиц, температуры и pH пробы. Так, например,  $\beta$ -глюкуронидаза *E. coli* обладает наибольшей активностью при pH 6–6.5 и температуре 40°C. Достоинством этого метода является мягкость условий, недостатком – селективность

Определение метаболитов наркотических средств с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС иногда можно проводить и без проведения гидролиза. В этом случае масса детектируемого иона будет складываться из массы метаболита и конъюгата.

Широкий спектр синтетических каннабимиметиков был определен в курительных смесях за последние годы. Одним из таких соединений является AM-694, о котором впервые было сообщено в 2010 году. Однако о метаболизме данного соединения практически ничего не было известно. А. Григорьев и сотрудники в работе [48] идентифицировали AM-694 и его метаболиты в моче человека. По результатам исследования удалось обнаружить шесть метаболитов идентифицируемого соединения.

Авторы [49] идентифицировали метаболиты малоизученного синтетического каннабимиметика AV-PINACA в моче потребителей курительных смесей. Впервые новый каннабимиметик был идентифицирован в Японии в 2012 году. Появление в России отмечено июнем 2013 года. Фармакокинетика каннабимиметика AV-PINACA является пока неисследованной. В связи с этим изучение метаболизма нового каннабимиметика представляется весьма актуальной задачей.

Авторы работы [50] разработали методику количественного определения ВЭЖХ-МС/МС следующих соединений и их метаболитов в моче - JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-200, JWH-210, JWH-250, JWH-398, RCS-4, AM-2201, MAM-2201, UR-144, CP 47,497-C7, CP 47,497-C8.

Пробоподготовку мочи осуществляли путем применения ферментативного гидролиза с последующей ТФЭ на С18 и С8, а также ЖЖЭ. По результатам исследования удалось установить пределы детектирования аналитов, которые составили от 0,05 до 1,0 мкг/л.

Авторы [51] проводили исследования по идентификации метаболита, обнаруженного в моче, давшего положительный результат в тестировании на принадлежность к синтетическим каннабиноидам нафтоиндольного типа. Изначально данное соединение было отнесено к метаболитам JWH-073, поскольку имело те же MRM переходы, однако времена удерживания не совпадали. Новый метаболит был успешно идентифицирован как 3 - (3 - (1-нафтоил)-1Н-индол-1-ил) пропановой кислоты. Образцы мочи были подвержены ферментативному гидролизу и ЖЖЭ. Обнаруженный метаболит был охарактеризован с помощью ЯМР, ИК-спектроскопии и МСВР.

Авторами [52] была разработана методика одновременной идентификации и количественного определения ТМА, ТМА-2, ТМА-6 в моче человека. Пробоподготовку образцов осуществляли с применением ТФЭ на С18. Предел детектирования составил от 4.26 до 9.12 нг/мл. Методика зарекомендовала себя чувствительной и селективной для определения производных амфетамина.

Группой исследователей [53] разработаны методики установления факта приема СР с помощью метода ВЭЖХ-МС при анализе образцов мочи. Пробоподготовка включала стадию жидкостной или твердофазной экстракции. Удалось обнаружить каннабимиметик СР 47,497.

В работе [54] описываются результаты одновременного обнаружения как уже известных, так и новых психоактивных веществ в моче человека с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовка образцов заключалась в применении ферментативного гидролиза и ТФЭ. Разработанная методика позволяет одновременно идентифицировать более 90 психоактивных соединений и их метаболитов. Метод был успешно апробирован на 964 образцах мочи.

В последнее время наибольшее распространение имеет вариант работы с клеточными культурами, поскольку таким образом можно контролировать пути

протекания процессов и получать метаболиты I и II фазы, кроме того, он позволяет избавиться от ряда этических затруднений. Для проведения подобного рода экспериментов требуются клеточные культуры человеческой печени с цитохромами P450 (мироксомы печени человека). Тем не менее, есть и некоторые недостатки этого подхода, например, отсутствие таких ферментов, как N-ацетилтрансферазы или глутатион-S-трансферазы. Другими словами, метаболические пути с участием этих ферментов не могут быть изучены с помощью микросом печени.

Отдельного внимания заслуживают работы группы профессора Мейера и его сотрудников. В работе [55] были идентифицированы метаболиты I и II фазы таких соединений, как 3-ВМС и 3-FМС, получивших распространение в 2009 году. Исследователям удалось определить метаболиты в моче крыс и микросомах печени человека с помощью ГХ-МС и ВЭЖХ-МС. Обзор [56] посвящен определению метаболитов MDPV I и II фазы в биологических жидкостях человека и крыс, а также человеческой печени. Образцы были изучены после и без проведения ферментативного расщепления конъюгатов. Исследования показали, что в биологических жидкостях человека и крыс можно обнаружить как MDPV, так и ряд его метаболитов. Кроме того, данная процедура может быть пригодной для доказательства употребления MDPV человеком. Авторами [57] проведены исследования метаболизма мефедрона *in vitro*, которые показали, что в качестве основного фермента, ответственного за образование метаболитов I фазы, выступает цитохром 2D6. Структура обнаруженных метаболитов была подтверждена ЯМР. В работе [58] был разработан метод, основанный на применении ВЭЖХ-МС, для определения метаболитов JWH-015. Процесс метаболизма протекал в микросомах печени крыс. Благодаря проведенному исследованию удалось идентифицировать 22 метаболита данного соединения. Исследователям [59] удалось обнаружить 16 метаболитов RCS-4 в образцах человеческой мочи. Однако исходное соединение не было обнаружено. Авторами [60] впервые были обнаружены сразу 12 метаболитов JWH-018, поскольку до этого момента считалось, что этот

каннабиметик практически невозможно обнаружить в биологических жидкостях. В работе [61] описывается возможность определения метаболитов MDPPP с применением твердофазной экстракции, а также методика обнаружения данного соединения в моче с помощью ГХ-МС. Исследования позволили определить метаболиты MDPPP в моче крыс. В [62] приводятся данные по определению метаболитов двух известных синтетических каннабиноидов AM-2201 и UR-144 *in vitro* и их последующее сравнение с результатами *in vivo*. Исследования продемонстрировали хорошую согласованность между результатами, полученными *in vitro* и *in vivo*. Также следует отметить, что ими описываются метаболиты приведенных соединений, которые были обнаружены впервые.

Большое количество публикаций посвящено способам использования микроволновой системы пробоподготовки [45,63-65]. Показано, что применение способов микроволнового разложения биологических объектов, позволяет существенно сократить время подготовки проб, а также уменьшить расход растворителей.

Помимо новых синтетических наркотических средств, сохраняют популярность также и так называемые «аптечные наркотики», препараты, которые могут быть приобретены в аптеке с рецептом или даже без него.

#### 1.4 Определение «аптечных наркотиков» в биологических жидкостях человека

Во многих странах отпускаемые по рецепту лекарственные препараты по масштабам злоупотребления занимают второе или третье место среди различных категорий психоактивных веществ. По данным Международного комитета по контролю наркотиков, почти в каждой стране отмечается злоупотребление седативными средствами и транквилизаторами, при этом наиболее часто упоминаемыми веществами являются бензодиазепины, в частности алпрозалам, клоназепам, диазепам и флунитразепам [66]. Исследования, проведенные в



Соединенных Штатах, Канаде и Австралии показали, что число немедикаментозного употребления опиоидосодержащих препаратов уступает лишь употреблению тетрагидроканнабинолу (ТГК) [67].

Из литературных данных известно [68], что лекарственные препараты могут употребляться одновременно с наркотическими средствами, поскольку способны усиливать эффекты, получаемые от употребления наркотических средств, а также используются для уменьшения количества наркотического средства, необходимого для достижения состояния изменения сознания. Кроме того, злоупотребление лекарственными средствами в сочетании с алкоголем и другими препаратами может привести к таким неблагоприятным последствиям, как смерть.

Бензодиазепины были внедрены в 60-е годы и стали одной из популярных групп препаратов, назначаемых в США. Медицинскими показаниями для применения лекарственных препаратов, производных бензодиазепина, являются бессонница, тревожные расстройства, эпилепсия. Однако, вскоре участились случаи немедикаментозного употребления данных препаратов для усиления действий наркотических веществ или для уменьшения их токсичности. Поэтому появилась необходимость в разработке аналитических схем количественного определения бензодиазепинов и их метаболитов в биологических объектах [69].

В настоящее время производные  $\gamma$ -аминомасляной кислоты находят широкое применение в фармации, медицине, биотехнологии, а также спортивной практике. Отмечено, что при введении в  $\beta$ -положении  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, различных радикалов фармакологические свойства соединений изменяются с нарастанием психотропной активности. При замене в  $\beta$ -положении атома углерода на фенольный радикал образуется соединение известное как фенибут (рисунок 3 а), при введении в молекулу  $\gamma$ -амино- $\beta$ -фенил масляной кислоты в бензольном кольце в параположении атома хлора образуется вещество, выпускаемое под торговым наименованием баклофен (рисунок 3б), при введении в молекулу  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в  $\beta$ -положение изобутила образуется вещество, известное как препарат прегабалин (рисунок 3 в), при

дальнейшем изменении структуры  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и введении в  $\beta$ -положении циклогексана образуется вещество известное как габапентин (рисунок 3 г).

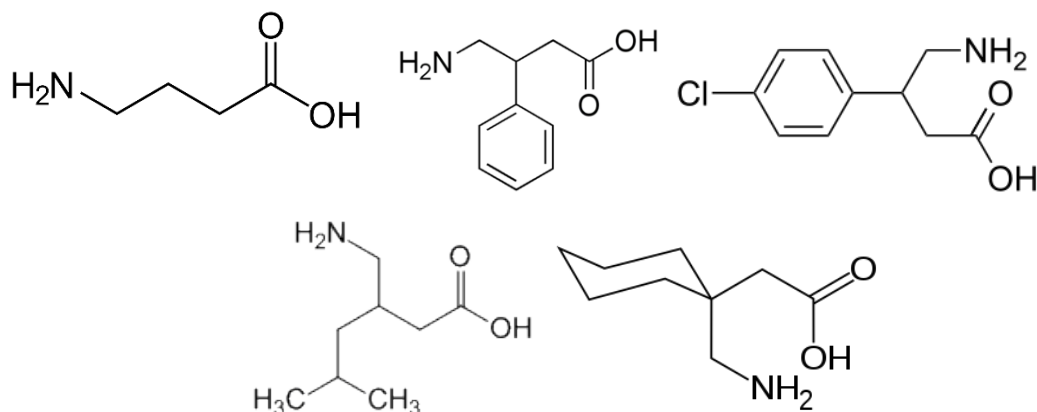


Рисунок 3 – Производные  $\gamma$ -аминомасляной кислоты

Начиная с 2004 года широкое распространение среди лиц с наркотической зависимостью получили противоэпилептические средства [70]. Определения прегабалина, габапентина в биологических объектах проводят с помощью метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Подготовку проб осуществляют путем применения жидкость-жидкостной экстракции дихлорметаном, с последующем проведением дериватизации. В качестве дериватирующих агентов, как правило, используют 9-флуоренилметоксикарбонил хлорид [71], дансилхлорид [72], о-фталевый альдегид [73]. Применение ВЭЖХ-МС/МС позволяет проводить определение аналитов с меньшей трудоемкостью и продолжительностью.

Также к «аптечным» наркотикам можно отнести трамадол – опиоидный синтетический анальгетик. Метаболизируется путем N- и O-деметилирования, а также путем связывания O-деметилированных производных с глюкуроновой кислотой [74]. Из литературных данных известно, что для количественного определения трамадола и его метаболитов в биологических жидкостях применялась ГХ с азотно-фосфорным детектором [75], пламенно-

ионизационным [76], а также масс-спектрометрическим [77, 78]. Также были разработаны ВЭЖХ способы определения с различными видами детекторов: УФ [79], флуориметрическим [80], диодно-матричным [81] и масс-спектрометрическим [82].

Стоит отметить возрастающую популярность анализа ротовой жидкости в качестве альтернативы крови и моче для определения опиоидных препаратов центрального действия. Авторами работы [83] показано определение 30 наркотических соединений в ротовой жидкости методом ГХ-МС.

Ввиду обилия существующих современных методов контроля, часть из них приведена в таблице 1.

Таблица 1 - Определение «аптечных» наркотиков в биологических объектах

| Аналит   | Объект             | Метод      | Предел детектирования         | Подготовка проб                  | Ссылка |
|--|--------------------|------------|-------------------------------|----------------------------------|--------|
| 28 бензодиазепинов   | Моча               | ВЭЖХ-МС/МС | 5-50 нг/мл                    | Ферментативный гидролиз          | [84]   |
| Бромазепам, клоназепам, 7-аминоклоназепам                  | Волосы             | ВЭЖХ-МС/МС | 1-2 пг/мг, 0,5 пг/мг, 2 пг/мг | ЖЖЭ                              | [85]   |
| Диазепам, медазепам, оксазепам, триазолам, хлордиазепоксид | Волосы крыс        | ГХ-МС      | 0,39-13,92 нг/мг              | 7 способов подготовки проб волос | [86]   |
| Алпрозолам, диазепам, лоразепам, оксазепам, флуниотразепам | Слюна, кровь, моча | ВЭЖХ-МС/МС | -                             | -                                | [87]   |
| 23 бензодиазепина  | Кровь              | ГХ-МС      | 0,5-58 нг/мл                  | ЖЖЭ                              | [88]   |

Продолжение таблицы 1

|   |        |            |                                   |                            |      |
|---|--------|------------|-----------------------------------|----------------------------|------|
| Нитразепам,<br>флуниразепам   | Моча   | ВЭЖХ-МС/МС | 0,125 нг/мл                       | ЖЖЭ                        | [89] |
| 13<br>бензодиазепинов   | Моча   | ВЭЖХ-МС/МС | 0,5-2 нг/мл                       | Ферментативный<br>гидролиз | [90] |
| Аопрозолам,<br>бромазепам,<br>диазепам,<br>клоназепам,<br>мидазолам,<br>флуниразепам,<br>хордиазепоксид | Моча   | ВЭЖХ-МС/МС | 0,01-0,5 нг/мл                    | Разбавление                | [91] |
| 43<br>бензодиазепина,<br>золпиден,<br>зопиклон  | Плазма | ВЭЖХ-МС/МС | 0,2-8 нг/мл                       | ТФЭ                        | [92] |
| Диазепам,<br>нордазепам,<br>оксазепам   | Волосы | ГХ-МС      | 0,15 нг/мл, 1<br>нг/мл, 1.5 нг/мл | ЖЖЭ                        | [93] |

Продолжение таблицы 1

|   |                       |            |   |  |      |
|---|-----------------------|------------|---|--|------|
| Квазепам  | Кровь, моча,<br>желчь | ВЭЖХ-МС/МС | 4 нг/мл   | Кровь - ТФЭ,<br>ферментативный<br>гидролиз<br>Моча, желчь –<br>ферментативный<br>гидролиз, ЖЖЭ | [94] |
| Квазепам, 2<br>метаболита   | Моча                  | ГХ-МС      | 0,2 нг/мл   | Ферментативный<br>гидролиз   | [95] |
| 17<br>бензодиазепинов,<br>4 метаболита                                | Моча                  | ВЭЖХ-МС    | 0,5-30 нг/мл                                      | Ферментативный<br>гидролиз, ЖЖЭ  | [96] |
| Бромазепам, 3-<br>ОН-бромазепам,<br>клоназепам, 7-<br>аминоклоназепам | Моча                  | ВЭЖХ-МС/МС | 0,1 нг/мл, 0,5<br>нг/мл, 0,05 нг/мл,<br>0,1 нг/мл | Центрифугирование,<br>упаривание,<br>перерастворение в<br>органическом раст-<br>ле             | [85] |

Продолжение таблицы 1

|                            |                     |            |                                    |   |       |
|----------------------------|---------------------|------------|------------------------------------|---|-------|
| Бензодиазепины,<br>опиоиды | Моча                | ВЭЖХ-МС/МС | 5-50 нг/мл                         | Разбавление,<br>ферментативный<br>гидролиз            | [97]  |
| Бензодиазепины,<br>опиоиды | Ротовая<br>жидкость | ВЭЖХ-МС/МС | 1-4 нг/мл                          | Разбавление   | [97]  |
| Прегабалин                 | Кровь               | ВЭЖХ-МС/МС | 0,004 мкг/мл                       | ТФЭ   | [98]  |
| Прегабалин                 | Моча                | ГХ-МС      | 1) 0,019 мкг/мл<br>2) 0,022 мкг/мл | 1)ТФМЭ,<br>дериватизация<br>2)ДЖЖМЭ,<br>дериватизация | [99]  |
| Габапентин                 | Сыворотка крови     | ВЭЖХ-МС    | -                                  | Разбавление,<br>дериватизация                         | [100] |
| Габапентин                 | Кровь               | ВЭЖХ       | 0,1 мкг/мл                         | ТФЭ, дериватизация                                    | [101] |
| Габапентин                 | Плазма              | ВЭЖХ       | 0,3 мкг/мл                         | Дериватизация   | [102] |
| Габапентин                 | Плазма, моча        | ВЭЖХ       | 0,02 мкг/мл<br>0,05 мкг/мл         | Дериватизация   | [103] |

Продолжение таблицы 1

|   |                     |            |                                |                                   |       |
|---|---------------------|------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Трамадол, о-дезметилтрамадол,<br>п-дезметилтрамадол | Моча                | ГХ-МС      | 5 нг/мл<br>5 нг/мл<br>10 нг/мл | ЖЖЭ                               | [104] |
| Меперидин,<br>трамадол,<br>оксикодон                | Ротовая<br>жидкость | ГХ-МС      | 10 нг/мл                       | ТФЭ, дериватизация                | [105] |
| Трамадол, о-дезметилтрамадол                        | Плазма              | ВЭЖХ-МС/МС | -                              | Разбавление,<br>центрифугирование | [106] |
| Трамадол  | Моча, плазма        | ВЭЖХ       | 0,03 нг/мл<br>0,3 нг/мл        | ТФЭ                               | [107] |
| Трамадол  | Волосы              | ГХ-МС      | 0,5 нг/мг                      | ТФЭ                               | [108] |



При этом практически отсутствуют методики, посвященные определению в моче таких веществ, как цикломед и тропикамид, получивших широкое распространение на территории страны, с использованием ВЭЖХ-МС/МС, для которого возможна реализация наиболее экспрессных и простых способов пробоподготовки.

Таким образом, современные токсикологические скрининги должны обеспечивать определение достаточно широкого круга веществ, используемых как в целях допинга, так и наркотических, психоактивных и даже ряда лекарственных средств на достаточно низких уровнях концентраций в целях их идентификации и количественного определения в различных биологических объектах.

Стоит отметить, что подавляющее большинство рассмотренных методов реализуются с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ, в то время как среди веществ, представляющих интерес в целях допинг-контроля и клинической диагностики достаточно большое количество полярных соединений, определение которых возможно только в режиме гидрофильной хроматографии.

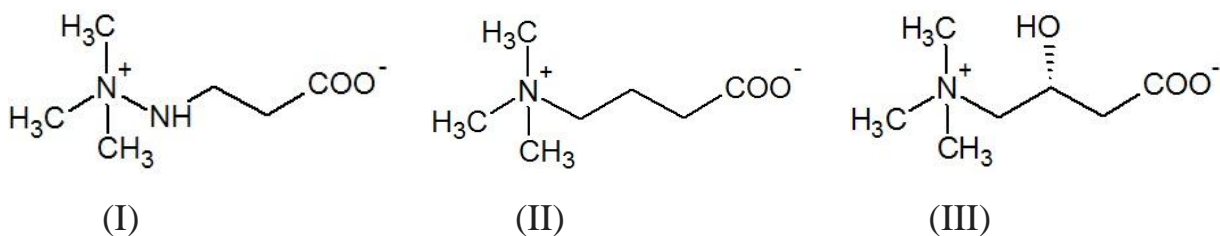
### 1.5 Мельдоний, как представитель группы модуляторов метаболизма

Согласно списку запрещенных ВАДА препаратов, мельдоний был включен в раздел модуляторов метаболизма (пункт S4) согласно которому в спорте запрещены, прежде всего, различные антиэстрогенные субстанции: ингибиторы ароматазы (фермента, катализирующего биотрансформацию холестерина в эстрогены, т.е. реакцию ароматизации), модуляторы рецепторов эстрогена (SERMs), другие антиэстрогенные субстанции.

Мельдоний – 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионата дигидрат – впервые был синтезирован в Институте органического синтеза в Латвии в 1970 г. для ветеринарии [109]. Однако свое первое применение он нашел в странах Восточной Европы в качестве противоишемического средства [110]. В

настоящее время широко применяется в клинической практике на территории стран СНГ для лечения хронической сердечной недостаточности, острых нарушений мозгового кровообращения, физического перенапряжения.

По структуре мельдоний является полным аналогом природного  $\gamma$ -бутиробетаина, предшественника карнитина (схема). Ввиду высокой полярности, а также небольшой молекулярной массы определение мельдония в биологических объектах может быть затруднено сильно выраженными матричными эффектами и практическим отсутствием удерживания в режиме обращено-фазовой ВЭЖХ, что обуславливает необходимость применения гидрофильной хроматографии. Как видно из схемы, в составе мельдония нет хромофорных групп, поэтому его УФ и флуоресцентное детектирование без предварительной дериватизации нецелесообразно. В тоже время данное соединение достаточно легко ионизируется, что в сочетании с гидрофильной хроматографией позволяет достичь достаточно низких пределов обнаружения.



Структурные формулы– мельдоний (I),  $\gamma$ -бутиробетаина (II), карнитина (III)

С 1 января 2016 г. мельдоний включен в список запрещенных к использованию веществ ВАДА [4] ввиду сходного с триметазидином воздействия на организм [111], что и привело к необходимости разработки методик его определения.

Поскольку мельдоний является малой молекулой и высокополярным соединением, для его определения оптимальным является метод гидрофильной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. На сегодняшний день известен определения мельдония в моче

и плазме [112–116], в которых в качестве внутренних стандартов использовали карбахол [112], ацетаминофен [114], мельдоний-d5 [116], а также левокарнитин [113]. Применение левокарнитина, который является эндогенным соединением, в качестве внутреннего стандарта представляется сомнительным, поскольку при этом существенно увеличивается погрешность количественного определения.

Кроме того, употребление мельдония может оказывать влияние на выработку свободного левокарнитина в организме [117].

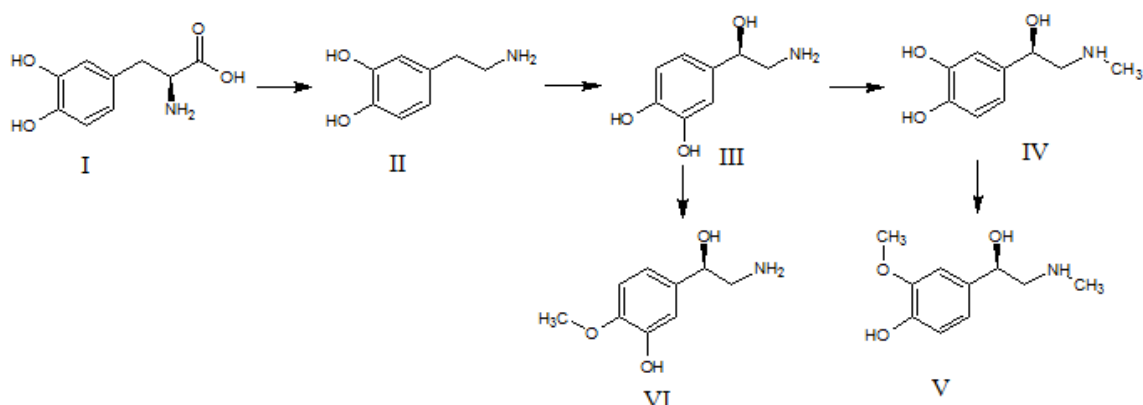
Подобное явление, когда употребление экзогенных препаратов влияет на выработку эндогенных веществ, достаточно распространено. Так, известно, что употребление анаболических стероидов приводит к искажению нормального распределения тестостерон/эпитестостерон, что используется при проведении тестирования на предмет употребления экзогенных стероидов в рутинной практике допинг-контроля с использованием изотопной-масс-спектрометрии. Однако помимо стероидного профиля биологический паспорт включает целый ряд других показателей, среди которых содержание эритропоэтина, а также содержание отдельных катехоламинов, чье определение также представляется затруднительно с использованием традиционной ОФ-ВЭЖХ.

## 1.6 Хроматографическое определение катехоламинов в моче

Катехоламины, такие как дофамин, норадреналин (норэпинефрин), адреналин (эпинефрин), являющиеся нейромедиаторами (нейротрансмиттерами), играют важную роль в деятельности и регуляции центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Взаимодействие этих веществ с соответствующими рецепторами инициируют в клеточной мембране каскад биохимических процессов, заканчивающихся одним или несколькими физиологическими откликами (секреция, сокращение, релаксация, метаболические изменения) [118-120].

Изменение концентраций катехоламинов в организме приводит к неврологическим нарушениям, а также ряду заболеваний [119].

Катехоламины образуются в организме в результате декарбоксилирования небелковых аминокислот. Из 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) синтезируется дофамин. Он является предшественником норадреналина и адреналина, которые в свою очередь продуцируют метанефрины [121,122] (Схема).



Биосинтез катехоламинов – 3,4-дигидроксифенилаланин (I), дофамин (II), норадреналин (III), адреналин (IV), метанефрин (V), норметанефрин (VI)

Стоит отметить, что изучение метаболитов, полученных из тирозина, позволяет осуществлять диагностику заболеваний, прогнозировать и исследовать развитие и прогрессирование широкого спектра патологических нарушений. Например, нарушение метаболизма дофамина – основная причина болезни Паркинсона, для лечения которой применяется препарат на основе 3,4-дигидроксифенилаланина (*L*-ДОФА). Определение норметанефрина и метанефрина – метаболитов норадреналина и адреналина соответственно, является способом скрининга феохромоцитомы [124].

Поскольку при некоторых заболеваниях катехоламины и их метаболиты экскретируются с мочой в повышенных количествах, этот объект исследования является наиболее подходящим для диагностических целей.

Для определения катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях чаще всего используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в сочетании с электрохимическим детектированием (ВЭЖХ-ЭД) [125,126], ВЭЖХ в сочетании с флуориметрическим детектированием [127], ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием [128,129]. Поскольку исследуемые катехоламины обладают высокой полярностью, а также небольшой молекулярной массой, их определение в биологических объектах может быть затруднено сильно выраженными матричными эффектами и практическим отсутствием удерживания в режиме обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, что обуславливает необходимость применения дериватизации.

В качестве дериватирующих агентов, как правило, применяют 1,2-дифенилэтилендиамин [130,131], 9-флуоренил-метоксикарбонил хлорид [127], дансилхлорид [129] и о-фталальдегид [132]. Эти реагенты обеспечивают высокий выход продуктов реакции за короткий временной период, для большинства других реагентов это наблюдается только при более высоких температурах. Одним из преимуществ применения FMOC-Cl является возможность обеспечить количественный выход производных в течение короткого времени при комнатной температуре.

Ввиду многокомпонентности биологической матрицы и низким концентрациям катехоламинов особой задачей является подготовка пробы к анализу. Как правило, используют подготовку проб, включающую стадии извлечения аналитов из матрицы, их дериватизацию, а также повторное применение жидкость-жидкостной экстракции для извлечения дериватизированных форм аналитов [127]. Однако, подобная процедура весьма трудоемка и занимает довольно продолжительное время.

В 1984 году в Университете МакМастер был предложен способ одновременной твердофазной экстракции и дериватизации органических кислот из воды с использованием полимерной смолы ХАД-2 [133]. Позднее, авторами работ [134,135] были предложены способы определения амфетамина и

метамфетамина в моче и фармацевтических препаратах, применяя патроны для твердофазной экстракции для одновременной очистки и дериватизации.

Таким образом, получение дериватов катехоламинов на патроне для твердофазной экстракции позволит сделать процедуру их определения в моче экспресснее и проще, что особенно важно для клинической диагностики при установлении и лечении различных заболеваний.

### 1.7 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Постоянное развитие фармацевтической индустрии, создание новых лекарственных препаратов, появление пищевых добавок диктуют повышенные требования как к контролю качества самих препаратов, так и подходам, применяемым для обеспечения надежности и точности измерений. Наиболее надежными и эффективными методами контроля, на сегодняшний день, являются методы хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. С использованием этих методов возможно установление факта фальсификации продукции и обнаружение не заявленных компонентов, что особенно часто встречается в случае контроля спортивного питания и биологически активных добавок для спортсменов. Эти обстоятельства значительно расширяют возможности исследователей для более детального изучения и идентификации различных ксенобиотиков в биологических жидкостях.

Важным моментом при построении схем анализа являются оптимизация и автоматизация процедур подготовки проб, выбор подходящего аналитического оборудования и условий детектирования аналитов.

Анализ научных публикаций последних лет показывает, что увеличивается количество публикаций, посвященные исследованиям и методическим разработкам, позволяющим проводить оперативный контроль продуктов спортивного питания, новых лекарственных средств, использующихся в спорте высоких достижений, а также веществ, подлежащих контролю на территории РФ [136-140].

Исходя из вышеизложенного анализа, была сформулирована **цель диссертационной работы** – разработка аналитических схем хромато-масс-спектрометрического определения некоторых психоактивных веществ, допинг-агентов и катехоламинов в биологической жидкости человека.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

– ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС анализ различных видов продуктов спортивного питания и вспомогательных препаратов, проведение скрининговых исследований с целью обнаружения в них психоактивных веществ, допинг-агентов и запрещенных ВАДА;

– разработка методик определения некоторых наркотических и психоактивных соединений в биологической жидкости человека, оптимизация условий их разделения, оценка матричных эффектов;

– разработка методики ВЭЖХ-МС/МС определения мельдония в моче, характеризующая высокой точностью, экспрессностью, надежностью и высокой чувствительностью;

– изучение возможности хромато-масс-спектрометрического определения производных катехоламинов в моче человека, с применением аналитической дериватизации на патроне для твердофазной экстракции.

## 2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов

### 2.1 Материалы, реактивы и использованное оборудование

- жидкостный хроматограф ThermoUltimate-3000 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo TSQ Quantum Access Max с источником электрораспылительной ионизации, «Thermo Scientific», США;
- газовый хроматограф Thermo Trace 1310 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором ThermoTSQ Quantum XLS, «Thermo Scientific», США;
- генератор азота Peak NM32LA, «Peak Scientific», США;
- аналитическая колонка Phenomenex Kinetex C18 (100 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм), «Phenomenex», США;
- аналитическая колонка Phenomenex Kinetex HILIC (100 мм × 2.1 мм, 2.6 мкм), «Phenomenex», США;
- аналитическая колонка Phenomenex Kinetex C18 (75 мм × 2.1 мм, 2.6 мкм), «Phenomenex», США;
- Phenomenex Zebron ZB-1MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм)
- патроны для твердофазной экстракции ISOLUTE SCX 100 mg / 1 ml
- микроцентрифуга Eppendorf Mini Spin, «Eppendorf», Германия;
- ультразвуковая ванна «Сапфир 5,7», 35 кГц, «Сапфир», Россия;
- дозаторы с варьируемым объемом дозирования Biohit 5–50, 50–200, 100–1000 мкл, 1–5 мл, «Biohit», Sartorius, США;
- дозаторы с постоянным объемом дозирования Biohit 25, 50, 100, 250, 500, 1000 мкл, «Biohit», Sartorius, США;
- колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2, ГОСТ 1770-74;
- пипетки 1-1-2-1, 1-2-2-1, 1-2-2-5, 1-2-2-10, 2-2-2-5, 2-2-2-10, 2-2-2-25, 3-1-2-1, 3-1-2-2, 3-2-2-5, 3-2-2-20, ГОСТ 29227-91;



- сушильный шкаф «Memmert», Германия;
- кислота соляная о.с.ч., ГОСТ 14261-77;
- этанол перегнанный, ГОСТ 18300-72;
- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83;
- весы аналитические лабораторные, ГОСТ 24104-80, класс точности 1, Ohaus Adventure, США;
- система очистки воды Milli-Q Simplicity, «Millipore», Германия;
- ацетонитрил LC-MS grade, «Biosolve», Израиль;
- муравьиная кислота 99,9%, Acros Organics, «Acros», Бельгия;
- метанол HPLC grade, «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- диэтиловый эфир
- аммиак
- гидроксид натрия
- тетраборат натрия
- ацетат аммония
- стандартный образец прегабалина «Pfizer»;
- стандартный образец габапентина «Pfizer»;
- стандартный образец тропикамида «Pfizer»;
- стандартный образец циклопентолата «Pfizer»;
- стандартный образец аминофенилмасляной кислоты «Pfizer»;
- стандартный образец атропина «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- стандартный образец скополамина «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- стандартный образец мельдония
- стандартный образец дофамина «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- стандартный образец адреналина «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- стандартный образец октопамина «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- стандартный образец кофеина ( $\geq 99\%$ ) «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- стандартный образец теобромина ( $\geq 98\%$ ) «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;

– стандартные образцы эфедрина ( $\geq 90\%$ ), псевдоэфедрин ( $\geq 90\%$ ), метилсинефрин ( $\geq 85\%$ ), фенилэтиламина ( $\geq 95\%$ ), фенилпропиламина ( $\geq 95\%$ ) были предоставлены из коллекции ГУ ЭКЦ МВД России по Краснодарскому краю;

– стандартные образцы НС и ПВ предоставлены РУ ФСКН России по Краснодарскому краю и ГУ ЭКЦ МВД России по Краснодарскому краю.

## 2.2 Обоснование выбора метода исследования для определения некоторых ксенобиотиков и катехоламинов в биологических жидкостях человека

Выбор методов исследования основывался на таких факторах, как необходимость достижения высокой чувствительности, селективности, экспрессности и точности получаемых результатов. Всем без исключения требованиям отвечают методы хромато-масс-спектрометрии, как газовой, так и жидкостной.

Безусловным достоинством метода газовой хромато-масс-спектрометрии и его преимуществом перед жидкостной, является возможность работы в полном ионном токе с применением библиотек масс-спектров, что, в токсикологической практике позволяет как определять уже известные соединения, так и проводить поиск новых веществ и их метаболитов. При этом стоит помнить, что идентификация на основе одного лишь масс-спектра не является достаточно надежной и должна быть подтверждена применением дополнительных параметров удерживания или использованием другого, подтверждающего метода, например, жидкостной хромато-масс-спектрометрии, что позволит свести к минимуму число ложноположительных результатов.

С другой стороны, ГХ-МС имеет также и ряд существенных ограничений, в частности, он не может использоваться для анализа пептидов, а определение сильнополярных малых молекул с его помощью также порой крайне затруднено и может требовать, как минимум, дериватизации. Кроме того, стоит помнить, что большинство универсальных и, при этом, неполярных колонок (на основе

полидиметилсилаксана с различными добавками фенила) негативно относятся к воде в пробах и агрессивным средам: они способствуют деградации неподвижной жидкой фазы, что также обуславливает введение дополнительных стадий пробоподготовки, например, жидкость-жидкостной экстракции. Также стоит отметить, что наиболее распространенные дериватизирующие агенты (MSTFA и BSTFA) также не могут использоваться в водной среде. Таким образом, введение этих двух этапов пробоподготовки могут привести к существенному увеличению времени, затрачиваемого на подготовку проб.

Таким образом, в большинстве случаев оптимальным решением является применение методов высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Поскольку большинство соединений, представлявших интерес в рамках выполнения работы, являются достаточно полярными, выбор источника ионизации сузился до электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении. Несмотря на то, что источник фотоионизации при атмосферном давлении (ФИАД) может быть использован для анализа полярных соединений при введении модификаторов подвижной фазы, способствующих ионизации, применение подобного подхода может быть осложнено матричными эффектами и привести к снижению чувствительности и воспроизводимости получаемых результатов.

Химическая ионизация при атмосферном давлении лишена подобных недостатков и, в отличие от электрораспылительной ионизации, существенно меньше подвержена матричным эффектами, однако для определения соединений, подобных мельдонию и релизинг-пептидам гормона роста, малопригодна.

Таким образом, очевидно, что оптимальным решением станет применение электрораспылительной ионизации, как наиболее универсального источника, позволяющего не жертвовать чувствительностью, а применение сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии обеспечивает

возможность подбора условий, при которых матричные эффекты не будут оказывать повышенного влияния на конечный результат.

В целях повышения эффективности ионизации малых молекул и обеспечения возможности варьирования скорости потока подвижной фазы в широком диапазоне, целесообразным представлялось применение модификации источника электрораспылительной ионизации, оснащенной дополнительным контуром нагрева, обеспечивающим нагрев оболочного газа, что способствует повышению эффективности распыления и ионизации.

Следующим этапом, после выбора источника ионизации, стал выбор типа масс-спектрометра, подходящего для выполнения исследований. К сожалению, применение моноквадрупольных масс-спектрометров для решения поставленных задач – невозможно. Недостаточные чувствительность и селективность существенно ограничивают область их применения, сужая его, фактически, до контроля чистоты и качества фармацевтических субстанций и относительно простых фармакокинетических исследований.

Современные времяпролетные масс-спектрометры позволяют частично устранить указанные выше недостатки благодаря возможности регистрации точных масс, однако количество структурной информации, которую можно получить с его помощью достаточно ограничено: электрораспылительная ионизация является мягким методом, способствующим образованию, преимущественно, молекулярного протонированного (или депротонированного) иона. При этом возможности фрагментации в источнике (путем повышения напряжения на экстрагирующей оптике) не только ограничено, но и не всегда воспроизводимо, а также приводит к существенным потерям ионов.

Ионная ловушка, позволяющая проводить  $MS^n$  эксперименты, позволяет достигать достаточной селективности для масс-спектрометров низкого разрешения и является удобным решением для проведения токсикологического скрининга, но, к сожалению, малоприспособна для ультраследового анализа, в отличие от масс-спектрометров на основе тройного квадруполя.

Тандемная масс-спектрометрия позволяет достигать большей чувствительности и селективности определения благодаря возможности проведения MS/MS экспериментов. Несмотря на то, что в процессе образования ионов-продуктов в ячейке соударений, заполненной инертным газом, происходит потеря в выходе ионизации от 2 до 10 раз, регистрация переходов в режиме множественного мониторинга реакций (MMP, MRM) в совокупности с повышением напряжения на электронном умножителе, позволяет получить существенный выигрыш не только в селективности, но и чувствительности.

Сопоставимые или превосходящие результаты по чувствительности и селективности могут быть получены только с применением тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения, позволяющей, кроме того, проводить ретроспективный анализ. К сожалению, подобные системы достаточно дороги и требуют тщательного контроля условий эксплуатации, в противном случае, результаты могут быть нестабильны.

Существенно проще был проведен выбор хроматографической системы. Возможности, предоставляемые ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией, позволяют существенно повысить производительность и эффективность разделения благодаря применению более коротких колонок с сорбентами малого зёрнения, которые, в сочетании с насосами сверхвысокого давления позволили многократно сократить время анализа.

Получение поверхностно-пористых сорбентов позволило существенно снизить сопротивление массопереносу и, как следствие, понизить рабочее давление при сохранении эффективности разделения, идентичной классическому, пористому силикагелю.

Учитывая физико-химические свойства веществ и конструктивные особенности приборов было установлено, что оптимальными техниками для разделения исследуемых веществ станут обращенно-фазовая и гидрофильная хроматография. Обращенно-фазовый вариант является наиболее распространенным и, как было показано ранее, позволяет проводить обширные скрининги, в то время гидрофильная хроматография относительно мало

распространена, несмотря на то, что именно она является идеальным вариантом в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием с применением источника электрораспылительной ионизации.

Благодаря тому, что в гидрофильной хроматографии ацетонитрил является слабым элюентом, его содержание в составе подвижной фазы, как правило, достаточно велико на протяжении всей программы элюирования, что положительно сказывается на эффективности ионизации компонентов пробы. Данный вариант хроматографического разделения является оптимальным для сильнополярных веществ.

### 2.3 Скрининг и идентификация наркотических и психоактивных веществ в продуктах спортивного питания

Среди продуктов спортивного питания, как правило, выделяют несколько классов: жиросжигатели, предтренировочные комплексы и др., основной целью которых является не только повышение эффективности при проведении тренировок, но и ускоренное восстановление после них.

Для проведения исследования в различных интернет-магазинах были приобретены следующие образцы спортивного питания: APS Phenadrine (США), Methyldrene 25 Elite (США), EPH Hellfire (США), APS Mesomorph (США), San Fierce Domination (США), Weider Super Nova caps (США), МНР Cyclin (США), Anavar (США), Chosen 1 (США).

Широкое разнообразие продуктов спортивного питания и их достаточно быстрая ротация на рынке обусловили необходимость ограничить перечень исследуемых продуктов наиболее популярными на момент исследования наименованиями. В ходе проведения контрольных закупок было отмечено, что в разных магазинах AICAR и кардарин (GW1516), являющиеся агонистами дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR $\delta$ ), реализовывались и как пептиды, и как SARM,

несмотря на то, что ни структурно, ни по своему воздействию они не могут быть отнесены к этим классам соединений.

Подготовка проб к анализу для СВЭЖХ заключалась в растворении навески исследуемого образца в 0.1% растворе муравьиной кислоты в воде (для пептидов) или метаноле, с получением раствора с массовой концентрацией 100 нг/мл. Образцы SARM растворялись в смеси вода:ацетонитрил 50:50 (v:v). Для проведения газохроматографического анализа пробы жиросжигателей, в состав которых входило растительное сырье, нагревали в воде при 45°C в течение 30 мин с добавлением аммиака до pH 9, после чего проводили жидкость-жидкостную экстракцию диэтиловым эфиром. Подтверждение полученных результатов проводили с использованием метода СВЭЖХ-МС/МС с применением аналогичной пробоподготовки за исключением стадии реэкстракции. Хроматографическое разделение веществ методом СВЭЖХ проводили на аналитической колонке Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм), а методом ГХ – на Phenomenex Zebron ZB-1MS (30м × 0.25мм, 0.25 мкм), соответственно.

Условия анализа полученных проб методами жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии приведены ниже (таблицах 2–5):

Таблица 2 – Условия градиентного элюирования наркотических и психоактивных веществ в продуктах спортивного питания

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% р-р муравьиной кислоты в воде), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|---|-------------------------|
| 0          | 10                 | 90  | 0.6                     |
| 2.5        | 20                 | 80  |                         |
| 3.5        | 30                 | 70  |                         |
| 4          | 50                 | 50  |                         |
| 5          | 90                 | 10  |                         |

## Продолжение таблицы 2

|     |    |    |  |
|-----|----|----|--|
| 7.5 | 90 | 10 |  |
| 7.8 | 10 | 90 |  |
| 9   | 10 | 90 |  |

Таблица 3 – Условия детектирования соединений с использованием метода СВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС

| Thermo TSQ Quantum Access Max                            |               |
|--|---------------|
| Параметр   | Значение      |
| Температура испарителя, °С                               | 400           |
| Температура трансферного капилляра, °С                   | 300           |
| Напряжение на источнике ионизации, В                     | 4000          |
| Режим регистрации ионов                                  | Положительные |
| Расход газа-распылителя, AU*                             | 60            |
| Расход вспомогательного газа, AU                         | 15            |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона), мТорр | 1.5           |
| Agilent 6540 UHD   |               |
| Температура испарителя, °С                               | 350           |
| Напряжение на скиммере, В                                | 65            |
| Напряжение на фрагментаторе, В                           | 100           |
| Напряжение на источнике ионизации, В                     | 3500          |
| Режим регистрации ионов                                  | Положительные |
| Расход газа-распылителя, л/мин                           | 8             |
| Расход вспомогательного газа, л/мин                      | 8             |



Продолжение таблицы 3

|   |     |
|---|-----|
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (азота), мТорр | 1.5 |
|---|-----|

\*AU – arbitrary units

Таблица 4 – Температурная программа при проведении газохроматографического определения анализируемых соединений

| Время, мин | T, °C | Скорость потока газа-носителя, мл/мин |
|------------|-------|---------------------------------------|
| 0          | 60    | 0.8                                   |
| 3          | 60    |                                       |
| 12         | 150   |                                       |
| 20         | 270   |                                       |
| 30         | 270   |                                       |

Таблица 5 – Условия детектирования веществ с использованием метода ГХ-МС/МС

| Параметр                            | Значение |
|-------------------------------------|----------|
| Температура источника ионизации, °C | 220      |
| Температура трансферной линии, °C   | 270      |
| Температура инжектора, °C           | 270      |
| Объем вводимой пробы, мкл           | 1        |
| Деление потоком                     | 1:10     |
| Газ-носитель                        | гелий    |

Результаты исследования ряда жиросжигателей, предтренировочных комплексов и прогормонов приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты исследования жиросжигателей и предтренировочных комплексов

| Название               | Обнаруженное вещество |               |        |           |               |                 |                              |
|------------------------|-----------------------|---------------|--------|-----------|---------------|-----------------|------------------------------|
|                        | Эфедрин               | Метилсинефрин | Кофеин | Теобромин | Фенилэтиламин | Фенилпропиламин | Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) |
| APS Phenadrine         | -                     | -             | +      | -         | +             | +               | -                            |
| Methyldrene 25 Elite   | +                     | +             | +      | +         | -             | -               | -                            |
| Hellfire               | +                     | +             | +      | +         | -             | -               | -                            |
| APS Mesomorph          | -                     | -             | +      | +         | -             | -               | -                            |
| San Fierce Domination  | -                     | -             | +      | +         | -             | -               | -                            |
| Weider Super Nova caps | -                     | -             | +      | +         | -             | -               | -                            |
| MHP Cyclin             | -                     | -             | +      | -         | -             | -               | -                            |
| Anavar                 | -                     | -             | -      | -         | -             | -               | +                            |
| Chosen 1               | -                     | -             | -      | -         | -             | -               | +                            |

Несмотря на то, что в продуктах Anavar и Chosen 1 заявлялась смесь эфиров ДГЭА, в их составе был обнаружен только дегидроэпиандростерон.

Как видно из представленных данных, в состав большинства жиросжигателей и предтренировочных комплексов входят два алкалоида пуринового ряда: кофеин и тебаин, обуславливающие стимулирующий эффект.

В тоже время в ряде жиросжигателей содержатся эфедрин и метилсинефрин, входящие в перечень запрещенных препаратов. Основная сложность определения эфедрина с использованием метода газовой хроматографии заключается в том, что он имеет идентичные параметры удерживания и масс-спектр с псевдоэфедрином, поэтому его идентификация проводилась с использованием подтверждающего метода – СВЭЖХ-МС/МС, позволяющего эффективно разделить эфедрин и псевдоэфедрин. Стоит отметить, что ни в одном продукте не заявлялось напрямую наличие эфедрина, указывался «экстракт эфедры» во избежание трудностей в ходе декларирования и ввоза продукции на территорию ряда стран.

Следующим этапом стала идентификация соединений, продающихся под видом SARM и пептидного допинга. Для этого первичные исследования проводились с использованием СВЭЖХ-МС/МС низкого разрешения и последующим подтверждением результата с использованием МСВР.

Результаты исследования SARM и агонистов PPAR $\delta$  (AICAR и GW1516) приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты исследований некоторых SARM и агонистов PPAR $\delta$

| Заявленное вещество | Элементарная композиция | Теоретическая моноизотопная масса, Да | Детектируемое значение $m/z$ | Детектируемый ион | Точность определения массы, $\Delta ppm$ |
|---------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------|--|
| Andarine (S-4)      | $C_{19}H_{18}F_3N_3O_6$ | 441.1148                              | 442.1201                     | $[M+H]^+$         | 4.5                                      |
| Ostarine (MK-2866)  | $C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$ | 389.0987                              | 390.1049                     | $[M+H]^+$         | 2.8                                      |

Продолжение таблицы 7

|                               |                          |          |          |               |      |
|-------------------------------|--------------------------|----------|----------|---------------|------|
| Cardarine<br>(GW1516)         | $C_{21}H_{18}F_3NO_3S_2$ | 453.0680 | 454.0733 | $[M+H]^+$     | 4.4  |
| Ligandrol<br>(LGD-<br>4033)   | $C_{14}H_{12}F_6N_2O$    | 338.0854 | 339.0918 | $[M+H]^+$     | 2.7  |
| Laxogenin                     | $C_{27}H_{42}O_4$        | 430.3083 | 445.2948 | –             | –    |
| Radarine<br>(RAD140)          | $C_{20}H_{16}CLN_5O_2$   | 393.0993 | 394.1052 | $[M+H]^+$     | 3.6  |
| AICAR<br>(A9788)              | $C_9H_{15}N_4O_8P$       | 258.0964 | 259.1034 | $[M+H]^+$     | 1.2  |
| Reverol<br>(SR9009)           | $C_{20}H_{24}CLN_3O_4S$  | 437.1176 | 438.1226 | $[M+H]^+$     | 5.2  |
| Miostop<br>(YK-11)            | $C_{25}H_{34}O_6$        | 430.2355 | 399.2154 | $[M-OCH_3]^+$ | 4.3  |
| Ibutamoren<br>(MK-677)        | $C_{27}H_{36}N_4O_5S$    | 528.2406 | 529.2462 | $[M+H]^+$     | 3.2  |
| Sarmastol<br>(AC-<br>262,356) | $C_{18}H_{18}N_2O$       | 278.1419 | 279.1496 | $[M+H]^+$     | -1.4 |

Для расчета точности определения масс во внимание принимались возможность образования аддуктов и фрагментация исследуемых веществ на источнике, поэтому в таблице приведены теоретические моноизотопные массы, после чего рассчитывались теоретические массы ионов и сопоставлялись с зарегистрированными значениями  $m/z$ . Стоит отметить, что применение ГХ-МС в качестве подтверждающего метода не представлялось возможным – данные соединения, за исключением ТМС-производного AICAR, имеют низкую летучесть и термически нестабильны.

Из представленных данных видно, что в случае лаксогенина заявленное и обнаруженное вещество отличаются. Вероятно, в данном случае в качестве действующего вещества был использован 20-гидроксиэкдизон (20E), также применявшийся ранее в профессиональном спорте. При его ионизации происходит элиминирование двух гидроксильных групп из положений 1 и 2 (рисунок 4), при этом отщепление второй группы происходит с захватом протона и образованием кратной связи. В этом случае моноизотопная масса иона составляет 445.2949 Да, что хорошо согласуется с полученными данными.

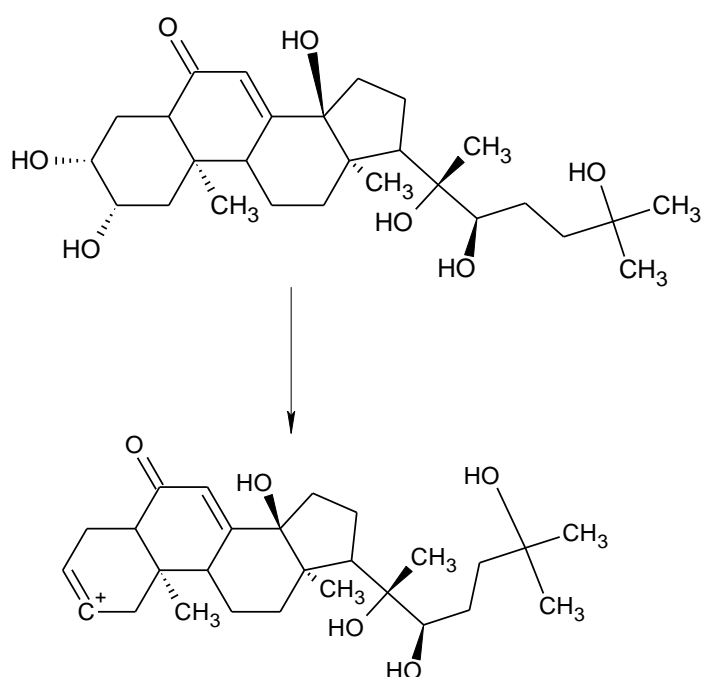


Рисунок 4 – фрагментация 20-гидроксиэкдизона на источнике ЭРИ

При проведении анализа соединений пептидной природы ситуация осложняется также тем, что для них является критичным температурный режим хранения и транспортировки, который практически никогда не соблюдается при покупке в интернет-магазинах.

Как и в случае с другими рассматриваемыми продуктами, исследуемые пептиды имеют различные механизмы воздействия на организм. В первом, достаточно грубом приближении, их можно разделить на несколько групп: 1)

фрагмент гормона роста, обладающий липолитическим эффектом; 2) рилизинг-пептиды гормона роста, стимулирующие его выработку; 3) пептиды, способствующие восстановлению организма (так, например, в случае пептида MGF это происходит за счет активации мышечных стволовых клеток-сателлитов [10]).

Результаты исследования пептидов приведены в таблице 8.

Таблица 8 – результаты исследований некоторых пептидов

| Заявленное вещество | Структурная формула                                   | Теоретическая моноизотопная масса, Да | Детектируемое значение $m/z$ | Детектируемый ион    | Точность определения массы, $\Delta ppm$ |
|---------------------|---|---------------------------------------|------------------------------|----------------------|--|
| Ipamorelin          | Aib-His-(D- $\beta$ -Nal)-(D-Phe)-Lys-NH <sub>2</sub> | 711.3850                              | 356.7006                     | [M+2H] <sup>2+</sup> | -2.2                                     |
| Hexarelin           | H-His-D-Trp(2-Me)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>   | 886.4602                              | 444.2369                     | [M+2H] <sup>2+</sup> | 1.1                                      |
| Selank              | H-Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro-OH                      | 751.4341                              | 376.7239                     | [M+2H] <sup>2+</sup> | 1.2                                      |
| DSIP                | L-Trp-L-Ala-Gly-Gly-L-Asp-L-Ala-L-Ser-Gly-L-Glu-OH    | 848.3301                              | 425.1706                     | [M+2H] <sup>2+</sup> | 4.1                                      |
| MGF                 | YQPPSTNK<br>NTKSQRRK<br>GSTFEERK                      | 2866.4786                             | 478.7564                     | [M+6H] <sup>6+</sup> | -5.6                                     |

Продолжение таблицы 8

|                     |   |                   |          |                      |     |
|---------------------|---|-------------------|----------|----------------------|-----|
| MGF-PEG             | YQPPSTNK<br>NTKSQRRK<br>GSTFEERK-<br>PEG  | 2866.4786+PE<br>G | 478.7561 | —                    |     |
| CJC-1295            | YADAIFTQ<br>SYRKVLA<br>QLSARKLL<br>QDILSR-<br>NH <sub>2</sub>   | 3367.9046         | 842.9753 | [M+4H] <sup>4+</sup> | 9.7 |
| Melanotan 2         | Ac-Nle-<br>c[Asp-His-<br>D-Phe-Arg-<br>Trp-Lys]-<br>NH <sub>2</sub>   | 1023.5403         | 512.7763 | [M+2H] <sup>2+</sup> | 2.3 |
| TB-500              | (Acetyl)Leu-<br>Lys-Lys-<br>Thr-Glu-Thr-<br>Gln   | 4921.4158         | 828.2583 | —                    | —   |
| PT-141              | Ac-Nle-<br>cyclo(Asp-<br>His-D-Phe-<br>Arg-Trp-<br>Lys-OH)  | 1024.5243         | 513.2684 | [M+2H] <sup>2+</sup> | 2.1 |
| Long-R3-IGF-1       | MFPAMPLS<br>SLFVNGPR<br>TL-<br>CGAELVD<br>A<br>LQFVCGDR<br>GFYFNKPT<br>GYGSSRR<br>APQTGIVD<br>ECCFRSCD<br>LRRLEMY<br>CAPLKPAK<br>SA | 9111.4531         | —        | —                    | —   |
| HGH frag<br>176-191 | YLRIVQCR<br>SVEGSCGF  | 1815,8760         | 908.9431 | [M+2H] <sup>2+</sup> | 2.4 |
| GHRP-2              | 1. Ala-beta-<br>Nal-Ala-Trp-<br>Phe-Lys-NH <sub>2</sub>   | 817.4275          | 409.7207 | [M+2H] <sup>2+</sup> | 0.9 |

Продолжение таблицы 8

|        |   |          |          |                      |     |
|--------|---|----------|----------|----------------------|-----|
| GHRP-6 | His-Trp-Ala-<br>Trp-Phe-<br>Lys-NH <sub>2</sub> | 872.4446 | 437.2293 | [M+2H] <sup>2+</sup> | 0.7 |
|--------|---|----------|----------|----------------------|-----|

Анализируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы: в ряде случаев заявленное вещество либо полностью отсутствует (Long-R3-IGF-1), либо не соответствует заявленному (MGF-PEG). Также из представленных данных видно, что, как и в случае, описанном в [141], образец пептида ТВ-500 представляет собой фрагмент белка тимозин бета-4, ацилированного по *N*-концу полипептидной цепи.

При исследовании ряда продуктов спортивного питания и препаратов, реализующихся через интернет-магазины, на соответствие заявленному составу и наличию в них запрещенных препаратов, установлены и показаны несоответствия заявленного и фактического состава (в том числе «пустышки»). Также обнаружены продукты, содержащие в своем составе препараты, подлежащие контролю со стороны правоохранительных органов и входящие в перечень запрещенных ВАДА препаратов, при этом на этикетке отсутствует указание об их возможном наличии в составе продукта. Поскольку подобные факты не являются единичными и проявлялись из партии в партию, можно утверждать, что даже при отсутствии умысла в употреблении запрещенных препаратов, они могут попадать в организм человека вместе со спортивным питанием, например, что в последствии может приводить к негативным последствиям, вплоть до дисквалификации спортсменов в случае отсутствия надлежащего предварительного контроля качества спортивного питания.

#### 2.4 Определение тестостерона и эфедрина в моче

Рассмотренные ранее методические подходы к анализу продуктов спортивного питания являются достаточно гибкими и позволяют проводить анализ широкого круга веществ, в том числе и объектов криминалистических



экспертиз, однако их унификация и распространение на биологические жидкости, в частности, мочу, затруднительна, поскольку они не учитывают особенности матрицы и не позволяют учесть влияние эндогенных компонентов. Так, для тестостерона актуальным является не просто установление самого факта его присутствия, что является нормальным, сколько подтверждение наличия экзогенного тестостерона, возникающего после употребления эфиров тестостерона, например.

Для проведения исследований были использованы образцы мочи добровольцев, не употреблявших анаболических стероидов или стимуляторов, а также образец мочи мужчины 28 лет с положительной реакцией на стимуляторы при проведении предварительного ИХА исследования, в отношении которого было известно, что он занимается силовыми видами спорта и употребляет целый ряд продуктов спортивного питания (жиросжигателей) и вспомогательных препаратов (эфиров тестостерона).

Из проведенных ранее исследований было известно, что целый ряд жиросжигателей содержит в своем составе эфедру, и, как следствие, их употребление могло повлечь за собой положительную реакцию из-за присутствия следовых количеств эфедрина, в то время как эфиры тестостерона, метаболизируя в организме, образуют глюкурониды тестостерона, что приводит к необходимости установления его экзогенного происхождения.

В этом случае целесообразным является применение пробоподготовки с предварительным ферментативным гидролизом. Для этого к 3 мл мочи добавили 1 мл фосфатного буфера (рН 6.3), содержащего 30 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы *E. Coli*, содержащего 10 нг/мл метилтестостерона и 100 нг/мл фенибута, используемых в качестве внутренних стандартов. Образцы мочи (исследуемые и холостые) инкубировались в течение 1 часа при температуре 57 °С. Затем к гидролизату добавляли 1 мл карбонатного буфера с рН 10, 2 г сульфата натрия и 3 мл диэтилового эфира, после чего перемешивали 20 мин и помещали в криостат при температуре – 25 °С. После вымораживания водной части пробы, эфир переносили в отдельные пробирки, упаривали при 70 °С и перерастворяли сухой

остаток в 200 мкл смеси 0.1% водного раствора муравьиной кислоты и метанола (50:50; v:v). 10 мкл пробы вводили в УВЭЖХ-МС/МС систему в условиях, представленных в таблицах 9-10. Разделение осуществлялось с использованием хроматографической колонки Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (75 × 2.1 мм, 1.7 мкм).

Таблица 9 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | А (метанол), % | В (0.1% раствор муравьиной кислоты в воде), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|----------------|---|-------------------------|
| 0.0        | 5              | 95  | 0.4                     |
| 1.0        | 5              | 95  |                         |
| 3.5        | 90             | 10  |                         |
| 7.5        | 90             | 10  |                         |
| 8.0        | 5              | 95  |                         |
| 9.5        | 5              | 95  |                         |

Таблица 10 – Условия детектирования аналитов

| Вещество    | t <sub>R</sub> , мин | Напряжение на экстракционной линзе, В | Ион-прекурсор, m/z | Энергия коллизии, эВ | Ион-продукт, m/z |
|-------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------|----------------------|------------------|
| Эфедрин     | 1.84                 | 53                                    | 166.1              | 27                   | 115.1 (q)        |
|             |                      |                                       |                    | 33                   | 91.2 (d)         |
|             |                      |                                       |                    | 17                   | 133.1 (d)        |
| Фенибут     | 0.60                 | 41                                    | 180.1              | 35                   | 91 (d)           |
|             |                      |                                       |                    | 17                   | 117 (q)          |
|             |                      |                                       |                    | 12                   | 145 (d)          |
| Тестостерон | 6.63                 | 78                                    | 289.2              | 23                   | 97.2 (q)         |
|             |                      |                                       |                    | 25                   | 109.1 (d)        |
|             |                      |                                       |                    | 36                   | 79.2 (d)         |

Продолжение таблицы 10

|                  |      |    |       |    |           |
|------------------|------|----|-------|----|-----------|
| Эпитестостерон   | 6.70 | 78 | 289.2 | 23 | 97.2 (q)  |
|                  |      |    |       | 25 | 109.1 (d) |
|                  |      |    |       | 36 | 79.2 (d)  |
| Метилтестостерон | 6.95 | 83 | 303.2 | 27 | 109.1 (q) |
|                  |      |    |       | 27 | 97.1 (d)  |
|                  |      |    |       | 42 | 79.1 (d)  |

q – ион для количественного анализа, d – диагностический ион

В ходе проведения исследований было подтверждено присутствие как эфедрина, так и аномального соотношения тестостерон/эпитестостерон (Т/Е), равное 9:1 (рисунке 5). На сегодняшний день, согласно исследованиям ВАДА, соотношение Т/Е более 4 (в отдельных случаях – более 6) считается подозрительным и, в 95% случаев, подтверждается при тщательном исследовании [4].

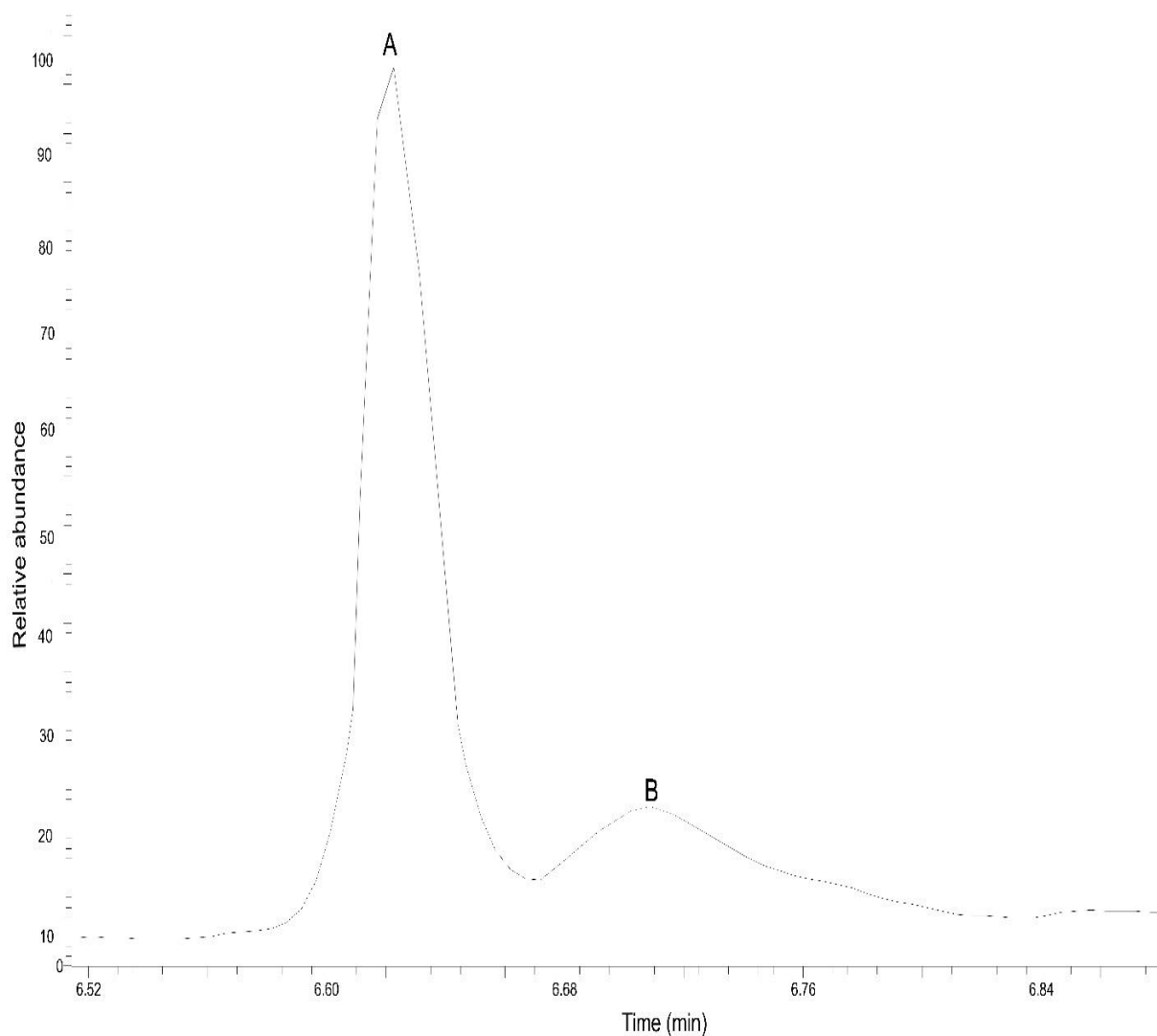


Рисунок 5 – установление соотношения тестостерон (А)/эпитестостерон (В) в моче с помощью УВЭЖХ-МС/МС

Классическое установление факта употребления андрогенных анаболических стероидов включает в себя не только хромато-масс-спектрометрическое определение содержания тестостерона, но и оценку изотопного соотношения, что необходимо для подтверждения его экзогенного происхождения. Поскольку в данном случае проведение подобного исследования было невозможно, вывод о употреблении анаболических стероидов может носить лишь вероятностный характер.

Другим затруднением при проведении количественного анализа являлось фоновое содержание тестостерона в холостых образцах мочи (его эндогенное

содержание варьируется в широких пределах). Идеальным способом проведения количественного анализа является применение изотопно-меченного стандарта, позволяющего полностью учесть возможные матричные эффекты. Ввиду отсутствия изотопно-меченных стандартов, было принято решение провести изучение градуировочной зависимости в отношении тестостерона на модельных водно-спиртовых растворах, в то время как для эфедрина, типичного ксенобиотика, подобных затруднений не возникало и установление матричных эффектов происходило в матрице мочи. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Некоторые метрологические характеристики методики.

| Аналит      | Предел детектирования, нг/мл | Линейный диапазон, нг/мл   | Точность в один день |                         | Точность между днями |                         | МЕ, % |
|-------------|------------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------|
|             |                              |                            | Конц., нг/мл         | Коэффициент вариации, % | Конц., нг/мл         | Коэффициент вариации, % |       |
| Тестостерон | 0.05                         | 0.1-200<br>( $r = 0.997$ ) | 1                    | 12.4                    | 1                    | 15.2                    | 10    |
|             |                              |                            | 50                   | 9.2                     | 50                   | 11.5                    |       |
|             |                              |                            | 200                  | 6.3                     | 200                  | 7.9                     |       |
|             |                              |                            | 250                  | 12.2                    | 250                  | 14.2                    |       |
|             |                              |                            | 1000                 | 8.4                     | 1000                 | 9.3                     |       |
| Эфедрин     | 1                            | 5-2000<br>( $r = 0.995$ )  | 5                    | 14.7                    | 5                    | 16.4                    | 10    |
|             |                              |                            | 250                  | 10.6                    | 250                  | 12.7                    |       |
|             |                              |                            | 1000                 | 9.8                     | 1000                 | 10.8                    |       |

В результате проведения исследований было установлено, что содержание эфедрина в образце мочи составляло 1.2 мкг/мл, а тестостерона – 130 нг/мл.

Таким образом, принимая во внимание повсеместное распространение продуктов спортивного питания, целесообразным может являться проведение расширенных токсикологических скринингов, включающих в себя не только определение ряда известных и новых наркотических средств, но и стимуляторов, а также психоактивных препаратов, реализующихся в аптечных сетях и называющихся «аптечными наркотиками» в рамках одного аналитического цикла.

## 2.5 Определение некоторых наркотических соединений в моче

В последние годы стремительно растет популярность синтетических наркотических средств, так называемых «дизайнерских наркотиков». Это обусловлено их доступностью и, во многом, легальностью, что позволило им быстро выйти на уровень уже известных наркотических средств и даже превзойти их. Известные под названиями «Спайс» «соли» и «удобрения» они продаются через интернет, в магазинах, реализующих табачную продукцию и даже в мини-маркетах на заправочных станциях [142]. Несмотря на действия специализированных органов, постоянно пополняющих список запрещенных веществ, полностью взять ситуацию под контроль не получается до сих пор, поскольку на смену запрещенным приходят новые, не уступающие, а порой и превосходящие по своему воздействию вещества [143]. При этом сохраняют популярность и классические наркотические и психоактивные вещества (опиаты, тропановые алкалоиды и др.) [144].

В то же время наблюдается рост популярности «аптечных наркотиков» – например, прегабалина, цикломеда, тропикамида и других препаратов, реализующихся через аптечные сети, что и послужило причиной возникновения подобного названия.

Стоит отметить, что случаи злоупотребления лекарственными препаратами, содержащими психоактивные компоненты, не уступают, а порой даже превосходят случаи употребления наркотических средств. Поэтому чрезвычайно важной является задача разработки методики количественного определения лекарственных препаратов, используемых не по назначению и наркотических веществ в ходе проведения скрининга.

Ввиду отсутствия изотопно-меченых стандартов для целей идентификации, которые являлись бы идеальными внутренними стандартами и позволили учесть все матричные эффекты, в качестве внутреннего стандарта использовали аминифенилмасляную кислоту. Одним из ключевых её достоинств, в данном качестве, является то, что после употребления она

практически полностью метаболизирует, что позволяет избежать возможных наложений и искажений результатов анализа. В качестве внутреннего стандарта изучали также инодометацин и катадолон, однако от их использования пришлось отказаться ввиду сильного и невоспроизводимого подавления ионизации и, как следствие, получения нестабильных результатов. Структурные формулы определяемых веществ представлены на рисунке 6.

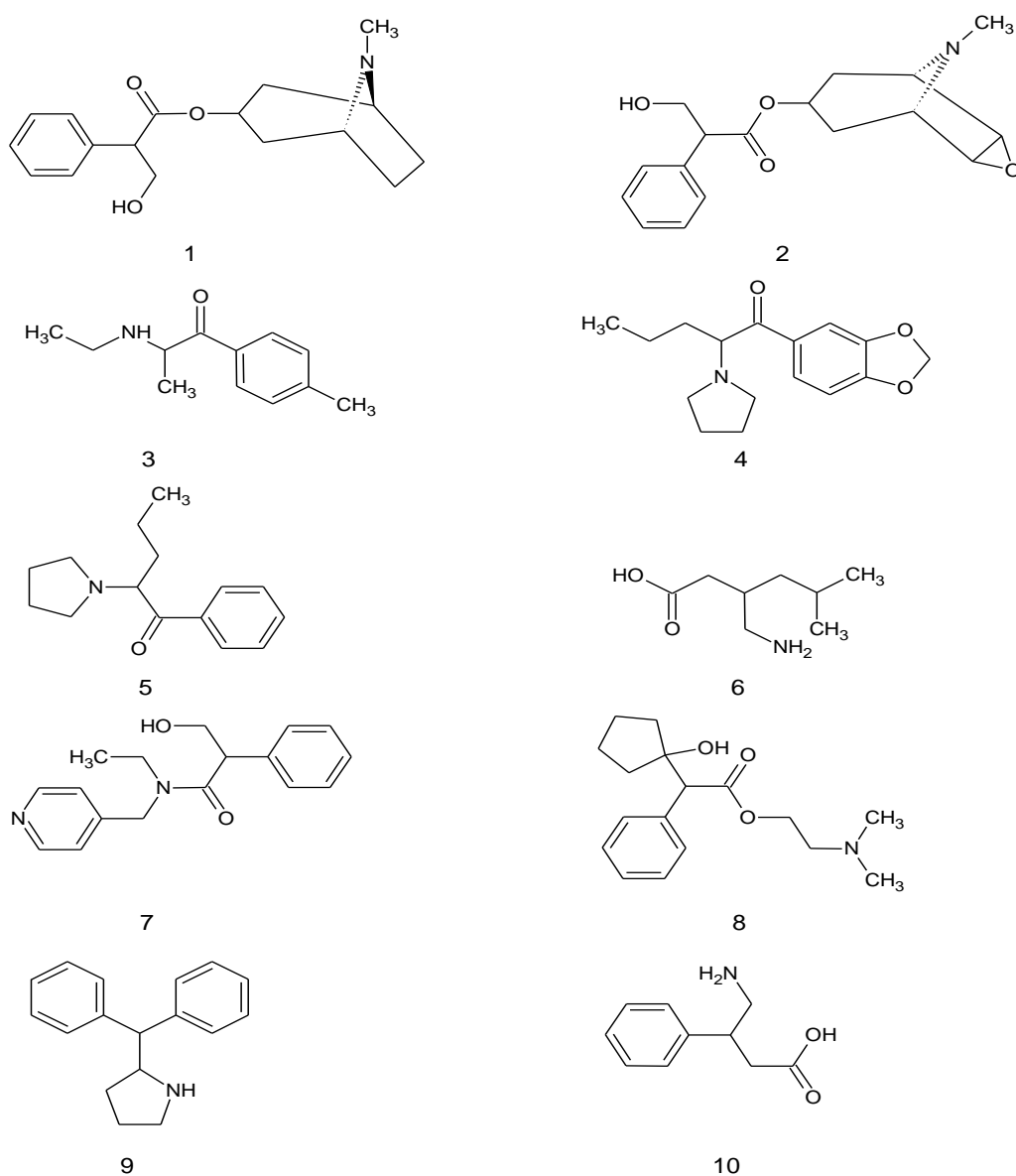


Рисунок 6 – Структурные формулы атропина (1); скополамина (2); 4-метилэтилкатинона (3); MDPV (4);  $\alpha$ -PVP (5); прегабалина (6); тропикамида (7); циклопентанолата (8); дифенил-2-пирролидинилметана (9); фенибута (10)

Разделение осуществлялось с использованием аналитической колонки Phenomenex Kinetex C18 (100мм × 2.1мм, 1.7 мкм) с аналогичной предохранительной колонкой Phenomenex с поверхностно-пористым сорбентом. При выборе метода нами были варьированы следующие параметры:

- скорость потока;
- температура термостата;
- процентное соотношение компонентов подвижной фазы.

При работе на низких скоростях потока (до 0.3 мл/мин включительно) наблюдалось значительное уширение пиков, что в последствие приводило к коэлюированию двух различных аналитов. Увеличение скорости потока позволило разрешить пики. Оптимальным значением скорости потока, обеспечивающей как достаточную эффективность разделения, так и способствующую повышению экспрессности анализа, стало значение 0.6 мл/мин. Стоит отметить, что сохранение эффективности ионизации при таких высоких потоках подвижной фазы возможно только при использовании нагреваемых источников электрораспылительной ионизации, работающих как при больших температурах, так и оперирующих высокими потоками газораспылителя и газа-осушителя.

Варьирование такого параметра как температура термостата приводит к изменению рабочего давления, а также разрешения системы, несмотря на то, что при 60 °С рабочее давление системы было относительно невысоким, предсказуемо ухудшилась разрешающая способность системы. Поэтому оптимальным являлось использование температуры 40 °С.

Варьирование соотношения компонентов и состава подвижной фазы осуществлялось, исходя из групп анализируемых веществ. Принципиальным было достижение достаточной эффективности разделения разных классов веществ для последующего использования данного способа с расширенным кругом аналитов, но без изменений в условиях элюирования.



Анализ полученных хроматограмм (рисунок 7) позволил выбрать метод, с помощью которого удалось разделить аналиты с очень близкими временами удерживания.

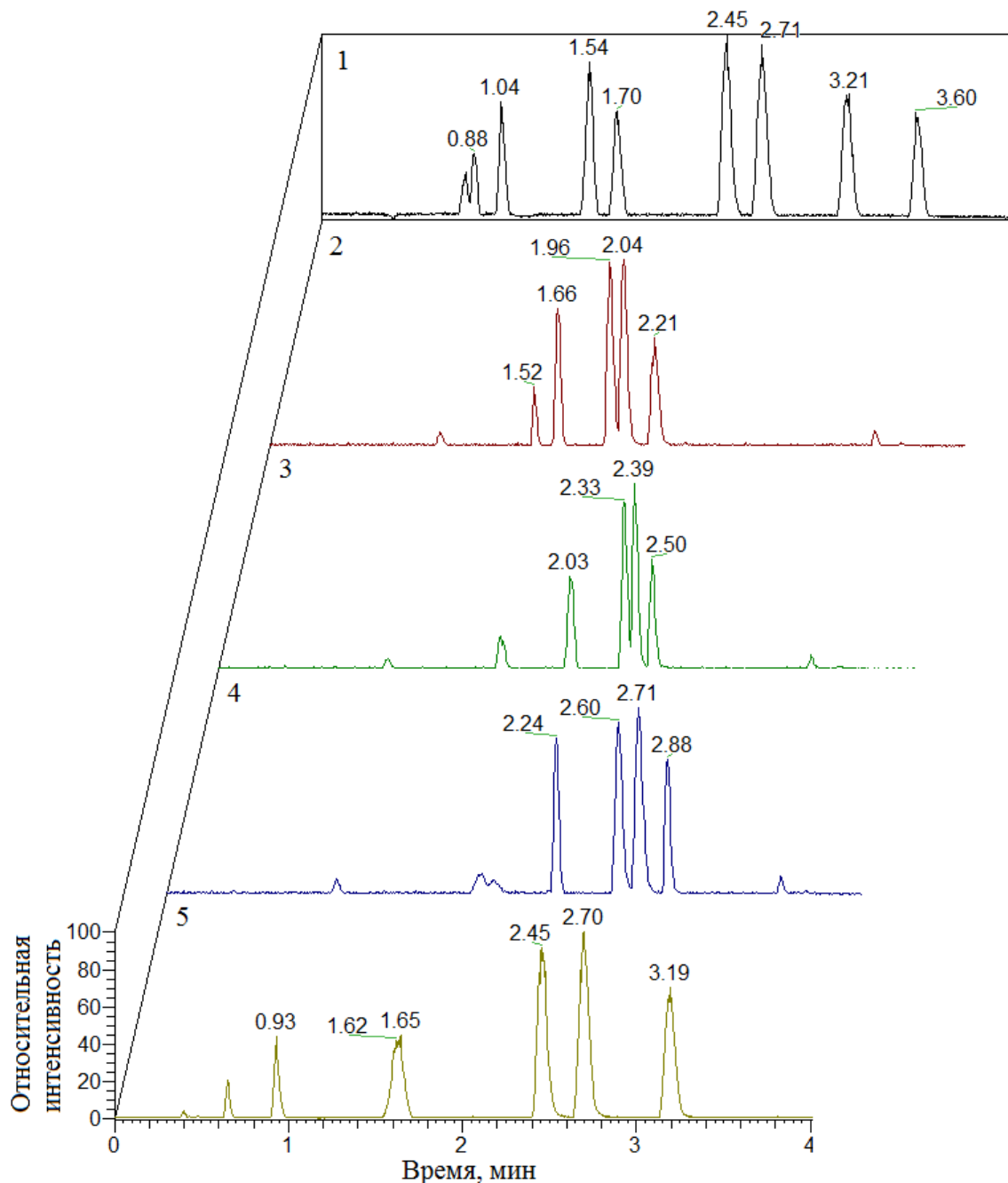


Рисунок 7 – Изучение параметров удерживания аналитов с целью оптимизации их разделения и последующего детектирования

В качестве подвижной фазы были изучены несколько систем: метанол:0.1% муравьиная кислота, метанол:ацетатный буфер (pH 3),

ацетонитрил:ацетатный буфер (pH 3) и ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота. Принимая во внимание наличие как слабоудерживающихся, так и достаточно сильно удерживающихся в режиме ОФ-УВЭЖХ компонентов, критичным становился выбор первых ступеней элюирования. При использовании в качестве подвижной фазы смеси, состава ацетонитрил:0.1% раствор муравьиной кислоты в воде в соотношении 5:95 (v:v) с дальнейшим плавным увеличением элюирующей силы, удалось добиться хорошего разрешения ряда пиков, однако для компонентов, слабо удерживающихся на колонке, наблюдалось коэлюирование, что в реальных объектах, отягощенных матрицей, приводило к существенному ухудшению чувствительности, даже в отношении хорошо разрешенных пиков (рис. 7(2)). По мере увеличения скорости изменения элюирующей силы пики становились уже, но, при этом, несколько ухудшалось их разрешение (рис. 7(3), 7(4)), что компенсировалось возможностями масс-спектрометрического детектора, поскольку компоненты имели существенно отличающиеся значения  $m/z$  даже для ионов-прекурсоров. Применение в качестве сильного элюента метанола также не дало желаемой эффективности разделения, более того, в этих условиях наблюдалось уширение и расщепление пика тропикамида (рис. 7(5)), вероятно, обусловленное одновременным присутствием как молекулярной, так и частично ионизированной формы, поскольку оба пика имели одинаковые значения  $m/z$  ионов-прекурсоров и ионов-продуктов, а последующий анализ стандартного раствора тропикамида подтвердил, что расщепленный пик соответствует лишь ему одному.

Наибольшую эффективность разделения удалось достичь при использовании системы ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота с начальным составом подвижной фазы 5:95 (v:v) (рис. 7(1)). При этом для ряда соединений наблюдалась большая эффективность ионизации, что, вероятно, обусловлено большим содержанием ацетонитрила по сравнению с рассматриваемыми ранее методами. С использованием данной системы удалось добиться полного разделения и разрешения пиков аналитов, а отсутствие коэлюирующихся компонентов позволило использовать времена сканирования не менее 50 мсек на

каждый MRM-переход, что позволило избежать потери чувствительности из-за малого времени сканирования и использовать большее количество переходов для идентификации. Гашения ионизации из-за одновременного присутствия всех компонентов в пробе выявлено также не было.

Условия градиентного элюирования приведены в таблице 12. Объем вводимой пробы 5 мкл.

Таблица 12 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% муравьиная кислота), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 0          | 5                  | 95                             | 0.6                     |
| 0.6        | 5                  | 95                             |                         |
| 0.8        | 20                 | 80                             |                         |
| 2.0        | 25                 | 75                             |                         |
| 3.5        | 90                 | 10                             |                         |
| 6.5        | 90                 | 10                             |                         |
| 6.7        | 5                  | 95                             |                         |
| 8.2        | 5                  | 95                             |                         |

Все определяемые соединения разделены в описанных выше условиях.

Помимо хроматографических параметров, варьировались также и условия детектирования. В частности, одним из этапов оптимизации условий разделения стал выбор источника ионизации для проведения исследований. В ходе оптимизации условий анализа было установлено, что чувствительность определений для большинства веществ с использованием источника химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) недостаточна, что послужило причиной выбора нагреваемого источника электрораспылительной ионизации (ИЭР) для отработки методики (таблице 13).

Таблица 13 – Условия детектирования аналитов

| Параметры                            | Значения      |
|--------------------------------------|---------------|
| Температура испарителя               | 400 °С        |
| Температура капилляра                | 300°С         |
| Напряжение на источнике ионизации    | 4000 V        |
| Полярность                           | Положительная |
| Давление газа-распылителя            | 60 (AU)       |
| Давление вспомогательного газа       | 15 (AU)       |
| Давление в ячейке соударений (аргон) | 2 мТорр       |

Оптимизацию условий детектирования проводили с использованием напуска аналитов в камеру источника ионизации.

В ходе оптимизации принимали во внимание такие параметры, как энергия соударений и оценка селективности отдельных MRM-переходов, напряжение на экстрагирующей линзе и давление газа-мишени в ячейке соударений. Одним из критериев выбора MRM-перехода, при оценке селективности, являлась разница между массой иона-прекурсора и иона-продукта. В случае, если эта разность составляла 18 Да, переход отбрасывался, поскольку соответствовал потере воды, данные переходы являются неселективными и, в большинстве случаев, приводят к существенно возрастающим случайным ошибкам в ходе количественного анализа.

Другим этапом оптимизации условий стало изменение давления газа-мишени (аргона) в ячейке соударений в диапазоне от 1.5 до 3 мТорр. Дальнейшее увеличение давления приводит к существенным потерям вакуума, и, как следствие, потере ионов ввиду возникновения трудностей их переноса через ячейку соударений, в то время как уменьшение давления приводит к понижению вероятности соударительной диссоциации, и, как следствие, падению выхода

ионов-продуктов. Таким образом, в ходе проведения исследований было установлено, что для данного набора веществ оптимальной энергией соударений является 2 мТорра, что, в сочетании с установленными ранее параметрами удерживания позволило составить общую программу детектирования исследуемых веществ (таблице 14).

Таблица 14 – Аналиты, MRM-переходы, энергии соударений, времена удерживания и напряжение на входной линзе, использованные при оптимизации метода

| Соединение       | Ион-прекурсор, m/z | Ион-продукт, m/z | Энергия соударений, эВ | Время удерживания, мин | Напряжение на экстрагирующей линзе, В |
|------------------|--------------------|------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Фенибут          | 180                | 91 (d)           | 35                     | 0.57                   | 41                                    |
|                  | 180                | 117 (q)          | 17                     |                        |                                       |
|                  | 180                | 145 (d)          | 12                     |                        |                                       |
| Прегабалин (PGB) | 160                | 55 (d)           | 20                     | 0.82                   | 37                                    |
|                  | 160                | 124 (q)          | 14                     |                        |                                       |
| Скополамин       | 304                | 138 (q)          | 21                     | 1.05                   | 72                                    |
|                  | 304                | 156 (d)          | 15                     |                        |                                       |
| Тропикамид       | 285                | 93 (q)           | 35                     | 1.53                   | 77                                    |
|                  | 285                | 135 (d)          | 22                     |                        |                                       |
| Атропин          | 290                | 93 (d)           | 33                     | 1.62                   | 80                                    |
|                  | 290                | 124 (q)          | 29                     |                        |                                       |
| 4-МЕС            | 192                | 91 (d)           | 32                     | 1.75                   | 44                                    |
|                  | 192                | 130 (d)          | 31                     |                        |                                       |
|                  | 192                | 144 (q)          | 29                     |                        |                                       |
| $\alpha$ -PVP    | 232                | 77 (d)           | 42                     | 2.43                   | 62                                    |
|                  | 232                | 91 (q)           | 23                     |                        |                                       |
|                  | 232                | 126 (d)          | 26                     |                        |                                       |

Продолжение таблицы 14

|                                 |     |         |    |      |    |
|---------------------------------|-----|---------|----|------|----|
| MDPV                            | 276 | 126 (q) | 25 | 2.70 | 83 |
|                                 | 276 | 149 (d) | 29 |      |    |
|                                 | 276 | 205 (d) | 17 |      |    |
| Циклопентол<br>ат<br>(Цикломед) | 292 | 72 (d)  | 20 | 3.21 | 22 |
|                                 | 292 | 129 (q) | 31 |      |    |
|                                 | 292 | 157 (d) | 22 |      |    |
| Дифенилпир<br>ролидин           | 238 | 65 (d)  | 54 | 3.56 | 68 |
|                                 | 238 | 91 (q)  | 29 |      |    |
|                                 | 238 | 117 (d) | 16 |      |    |

q – ион для количественного анализа, d – диагностический ион

Использование как минимум двух MRM-переходов при проведении исследований позволяет повысить надежность исследования, поскольку в этом случае появляется возможность применения соотношений между переходами в качестве дополнительного характеристичного признака при проведении идентификации. Кроме того, нарушение соотношений между переходами будет свидетельствовать о возможности наличия матричных эффектов ввиду наложений по отдельным переходам и позволит также свести к минимуму количество ложноположительных идентификаций.

После окончания оптимизации условий разделения и детектирования на модельных образцах, необходимо было установить возможности и ограничения предлагаемой методики при её реализации на реальных образцах. Принимая во внимание свойства и структуры определяемых веществ, интерес представляло изучение двух способов подготовки проб: «разбавил-и-вкол» и минеральный гидролиз. С точки зрения гидролизных способов подготовки проб биологических жидкостей к анализу, ферментативный гидролиз является более мягким, позволяющим предотвратить возможность деградации аналитов в ходе пробоподготовки, но гораздо более дорогим и трудоемким способом.

Применение гидролиза необходимо в том случае, если определяемые вещества активно метаболизируют, а их метаболиты в дальнейшем связываются, образуя конъюгированные формы, которые и разрушаются в процессе проведения гидролиза. Кислотный гидролиз не является селективным и разрушает все виды конъюгатов, однако в случае данной задачи аналиты способны выводиться и в нативном виде ввиду их достаточно высокой полярности, что делает возможным их определение с использованием простой процедуры разбавления с осаждением белка. Условия проведения пробоподготовки представлены ниже:

1) *«Разбавил и вколал»*. В эппендорф, объемом 2 мл внести 100 мкл анализируемой мочи и 900 мкл разбавить смесью ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота (50:50, v:v), содержащей внутренний стандарт, перемешать, после чего провести центрифугирование при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант переносили в стеклянные виалы и анализировали в описанных выше условиях.

2) *Минеральный гидролиз*. Для подготовки образцов мочи к 1000 мкл пробы добавляли 250 мкл концентрированного раствора соляной кислоты и инкубировали 60 минут при температуре 90 °С, после чего центрифугировали 10 минут при 10 000 об/мин.

Для проведения количественного анализа готовили ряд градуировочных растворов. Головной раствор с концентрацией аналитов 1 мг/мл получали растворением навески вещества в смеси метанол:0.1% раствор муравьиной кислоты в воде (60:40, v:v). Рабочие растворы готовили последовательным разбавлением головного раствора и хранили при 4 °С не более месяца. Для градуировки использовали прием введения аналитов в контрольную пробу мочи в следующих концентрациях: 100, 200, 250, 500 пг/мл; 1, 2, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50 нг/мл.

В качестве внутреннего стандарта использовали аминофенилмасляную кислоту (фенибут) с концентрацией в конечном экстракте 10 нг/мл. Полученные

пробы хранили не более 48 ч при комнатной температуре (спустя 48 ч на дне виалы начинает образовываться осадок из-за деградации пробы).

В ходе проведения исследований строились калибровочные кривые для каждого вещества в виде зависимости отношения площадей (площадь аналита/площадь внутреннего стандарта) от концентрации и обрабатывались как линейные зависимости для установления коэффициента корреляции. Для всех определяемых веществ линейность сохранялась во всем выбранном диапазоне концентраций.

Для определения точности анализа готовили несколько растворов контроля качества (РКК) с высокой (20 нг/мл), средней (5 нг/мл) и низкой (200 пг/мл) концентрациями; растворы РКК анализировали в течение одного дня по 5 раз. Междудневную точность контролировали определением концентраций РКК в разные дни. Концентрации РКК рассчитывали по градуировочным графикам, полученным в день анализа РКК. Результат признавали удовлетворительным, если погрешность определения не превышала 15% [145]. Предел детектирования устанавливали экспериментально, он составил 100 пг/мл. Вывод о наличии вещества в пробе делали при соотношении сигнал/шум не менее чем 3:1. Нижнюю границу определяемых концентраций также устанавливали построением экспериментального градуировочного графика и она составила 200 пг/мл, при этом соотношение сигнал/шум всегда было более 10:1.

В таблицах 15–17 приведены основные результаты, полученные в ходе апробации и адаптации методики на реальных бланковых образцах, с установленными матричными эффектами для процедур разбавления и кислотного гидролиза, которые представляют собой максимальные значения, полученные в ходе серии экспериментов. Матричные эффекты вычислены сопоставлением аналитических сигналов аналитов в чистых растворах и матрице. Как видно из представленных данных, матричные эффекты достаточно сильно влияют на величину аналитического сигнала и пренебречь ими нельзя.



Таблица 15 – Некоторые метрологические характеристики при определении аналитов в моче с использованием способа «разбавил-и-вколол»

| Соединение    | Концентрация раствора контроля качества | Точность в один день                 |                 |                      | Точность между днями                 |                 |                      |
|---------------|---|--------------------------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------|
|               |   | Определяемая конц., $\pm$ SD (нг/мл) | Правильность, % | Воспроизводимость, % | Определяемая конц., $\pm$ SD (нг/мл) | Правильность, % | Воспроизводимость, % |
| Атропин       | Низкая                                  | 0.178 $\pm$ 0.023                    | 11              | 12.8                 | 0.172 $\pm$ 0.018                    | 14              | 10.4                 |
|               | Средняя                                 | 4.50 $\pm$ 0.39                      | 10              | 8.7                  | 4.41 $\pm$ 0.33                      | 11.8            | 7.5                  |
|               | Высокая                                 | 19.1 $\pm$ 1.0                       | 4.5             | 5.2                  | 18.7 $\pm$ 0.9                       | 6.5             | 4.8                  |
| Скополамин    | Низкая                                  | 0.183 $\pm$ 0.02                     | 8.5             | 12.3                 | 0.177 $\pm$ 0.020                    | 11.5            | 11.2                 |
|               | Средняя                                 | 4.52 $\pm$ 0.37                      | 9.6             | 8.1                  | 4.52 $\pm$ 0.35                      | 9.6             | 7.7                  |
|               | Высокая                                 | 19.3 $\pm$ 0.9                       | 3.5             | 4.8                  | 19.0 $\pm$ 0.7                       | 5               | 3.9                  |
| 4-МЕС         | Низкая                                  | 0.212 $\pm$ 0.022                    | -6              | 10.3                 | 0.207 $\pm$ 0.018                    | -3.5            | 8.7                  |
|               | Средняя                                 | 4.81 $\pm$ 0.35                      | 3.8             | 7.2                  | 4.86 $\pm$ 0.31                      | 2.8             | 6.3                  |
|               | Высокая                                 | 19.2 $\pm$ 0.83                      | 4               | 4.3                  | 19.0 $\pm$ 0.8                       | 5               | 4.1                  |
| $\alpha$ -PVP | Низкая                                  | 0.183 $\pm$ 0.021                    | 8.5             | 11.7                 | 0.181 $\pm$ 0.018                    | 9.5             | 10.1                 |
|               | Средняя                                 | 4.77 $\pm$ 0.44                      | 4.6             | 9.2                  | 4.75 $\pm$ 0.37                      | 5               | 7.8                  |
|               | Высокая                                 | 19.1 $\pm$ 1.12                      | 4.5             | 6.1                  | 19.1 $\pm$ 0.7                       | 4.5             | 3.8                  |

Продолжение таблицы 15

|                   |         |             |        |      |             |        |      |
|-------------------|---------|-------------|--------|------|-------------|--------|------|
| MDPV              | Низкая  | 0.188±0.023 | 6      | 12.1 | 0.184±0.019 | 8      | 10.3 |
|                   | Средняя | 4.81±0.34   | 3.8    | 7.1  | 4.72±0.35   | 5.6    | 7.5  |
|                   | Высокая | 19.3±1.1    | 3.5    | 5.7  | 18.9±0.8    | 5.5    | 4.0  |
| Прегабалин        | Низкая  | 0.171±0.023 | 14.5*  | 13.5 | 0.164±0.024 | 18**   | 14.6 |
|                   | Средняя | 4.47±0.48   | 10.6   | 10.7 | 4.34±0.53   | 13.2   | 12.2 |
|                   | Высокая | 18.3±1.5    | 8.5    | 8.2  | 17.9±1.6    | 10.5   | 9.1  |
| Тропикамид        | Низкая  | 0.169±0.024 | 15.5** | 14.3 | 0.153±0.022 | 23.5** | 14.3 |
|                   | Средняя | 4.44±0.50   | 11.2   | 11.2 | 4.33±0.49   | 13.4   | 11.2 |
|                   | Высокая | 18.6±1.7    | 7      | 9.2  | 18.3±1.7    | 8.5    | 9.2  |
| Цикломед          | Низкая  | 0.171±0.022 | 14.5*  | 12.8 | 0.163±0.018 | 18.5** | 11.2 |
|                   | Средняя | 4.62±0.49   | 7.6    | 10.5 | 4.56±0.43   | 8.8    | 9.4  |
|                   | Высокая | 18.8±1.5    | 6      | 8.1  | 18.7±1.6    | 6.5    | 8.6  |
| Дифенилпирролидин | Низкая  | 0.183±0.018 | 8.5    | 9.8  | 0.181±0.015 | 9.5    | 8.4  |
|                   | Средняя | 4.84±0.36   | 3.2    | 7.4  | 4.84±0.28   | 3.2    | 5.8  |
|                   | Высокая | 19.3±1.0    | 3.5    | 5.1  | 19.2±0.8    | 4      | 4.3  |

\* – сомнительное значение

\*\* – неудовлетворительное значение

Таблица 16 – Некоторые метрологические характеристики при определении аналитов в моче с использованием кислотного гидролиза

| Соединение | Концентрация раствора контроля качества | Точность в один день                 |                 |                      | Точность между днями                 |                 |                      |
|------------|---|--------------------------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------|
|            |   | Определяемая конц., $\pm$ SD (нг/мл) | Правильность, % | Воспроизводимость, % | Определяемая конц., $\pm$ SD (нг/мл) | Правильность, % | Воспроизводимость, % |
| Атропин    | Низкая                                  | 0.171 $\pm$ 0.018                    | 14.5*           | 10.7                 | 0.162 $\pm$ 0.016                    | 19**            | 10.1                 |
|            | Средняя                                 | 4.51 $\pm$ 0.36                      | 9.8             | 7.9                  | 4.48 $\pm$ 0.33                      | 10.4            | 7.3                  |
|            | Высокая                                 | 18.9 $\pm$ 1.1                       | 5.5             | 5.8                  | 18.7 $\pm$ 1.0                       | 6.5             | 5.4                  |
| Скополамин | Низкая                                  | 0.174 $\pm$ 0.018                    | 13              | 10.2                 | 0.172 $\pm$ 0.017                    | 14              | 9.8                  |
|            | Средняя                                 | 4.60 $\pm$ 0.38                      | 8               | 8.1                  | 4.51 $\pm$ 0.33                      | 9.8             | 7.4                  |
|            | Высокая                                 | 18.8 $\pm$ 1.1                       | 6               | 5.6                  | 18.6 $\pm$ 1.1                       | 7               | 6.1                  |
| 4-МЕС      | Низкая                                  | 0.178 $\pm$ 0.017                    | 11              | 9.3                  | 0.181 $\pm$ 0.015                    | 9.5             | 8.5                  |
|            | Средняя                                 | 4.71 $\pm$ 0.32                      | 5.8             | 6.7                  | 4.77 $\pm$ 0.30                      | 4.6             | 6.2                  |
|            | Высокая                                 | 19.1 $\pm$ 1.0                       | 4.5             | 5.1                  | 19 $\pm$ 1.0                         | 5               | 5.4                  |

Продолжение таблицы 16

|               |         |             |       |       |             |       |      |
|---------------|---------|-------------|-------|-------|-------------|-------|------|
| $\alpha$ -PVP | Низкая  | 0.179±0.016 | 10.5  | 8.9   | 0.179±0.015 | 10.5  | 8.4  |
|               | Средняя | 4.74±0.34   | 5.2   | 7.2   | 4.76±0.29   | 4.8   | 6.1  |
|               | Высокая | 19.2±0.9    | 4     | 4.7   | 19.1±1.2    | 4.5   | 6.3  |
| MDPV          | Низкая  | 0.182±0.016 | 9     | 8.6   | 0.179±0.016 | 10.5  | 8.8  |
|               | Средняя | 4.79±0.31   | 4.2   | 6.5   | 4.75±0.35   | 5     | 7.3  |
|               | Высокая | 19.1±0.8    | 4.5   | 4.4   | 19.1±1      | 4.5   | 5.8  |
| Прегабалин    | Низкая  | 0.166±0.024 | 17**  | 14.2* | 0.173±0.023 | 13.5  | 13.5 |
|               | Средняя | 4.62±0.58   | 7.6   | 12.5  | 4.68±0.55   | 6.4   | 11.7 |
|               | Высокая | 18.7±1.9    | 6.5   | 10.2  | 19.0±1.9    | 5     | 9.8  |
| Тропикамид    | Низкая  | 0.173±0.023 | 13.5  | 13.3  | 0.171±0.021 | 14.5* | 12.5 |
|               | Средняя | 4.57±0.50   | 8.6   | 10.9  | 4.60±0.47   | 8     | 10.2 |
|               | Высокая | 18.5±1.4    | 7.5   | 7.3   | 18.7±1.4    | 6.5   | 7.1  |
| Цикломед      | Низкая  | 0.171±0.020 | 14.5* | 11.8  | 0.176±0.022 | 12    | 12.4 |
|               | Средняя | 4.61±0.39   | 7.8   | 8.5   | 4.71±0.42   | 5.8   | 8.9  |
|               | Высокая | 18.4±1.0    | 8     | 5.3   | 18.8±1.38   | 6     | 7.3  |

Продолжение таблицы 16

|                   |         |             |     |     |             |     |      |
|-------------------|---------|-------------|-----|-----|-------------|-----|------|
| Дифенилпирролидин | Низкая  | 0.183±0.016 | 8.5 | 8.8 | 0.182±0.024 | 9   | 13.2 |
|                   | Средняя | 4.81±0.33   | 3.8 | 6.8 | 4.74±0.38   | 5.2 | 8    |
|                   | Высокая | 19.1±1.1    | 4.5 | 6.0 | 19±1.2      | 5   | 6.2  |

\* – сомнительное значение

\*\* - неудовлетворительное значение

Таблица 17 – Матричные эффекты

| Соединения        | Разбавление | Кислотный гидролиз |
|-------------------|-------------|--------------------|
|                   | МЕ, %       | МЕ, %              |
| Атропин           | 18±4        | 14±4               |
| Скополамин        | 16±3        | 12±4               |
| 4-МЕС             | 10±4        | 12±3               |
| α-PVP             | 12±3        | 10±3               |
| MDPV              | 10±3        | 10±3               |
| Прегабалин        | 24±5        | 18±6               |
| Тропикамид        | 17±5        | 14±4               |
| Цикломед          | 14±4        | 12±4               |
| Дифенилпирролидин | 8±3         | 6±3                |

На рисунке 8 приведены хроматограммы растворов контроля качества низшей концентрации, соответствующей нижнему пределу обнаружения. Как видно, все сигналы аналитов свободны от коэлюирующихся изобарных интерференций, что позволяет обеспечить наибольшую точность получаемых данных.

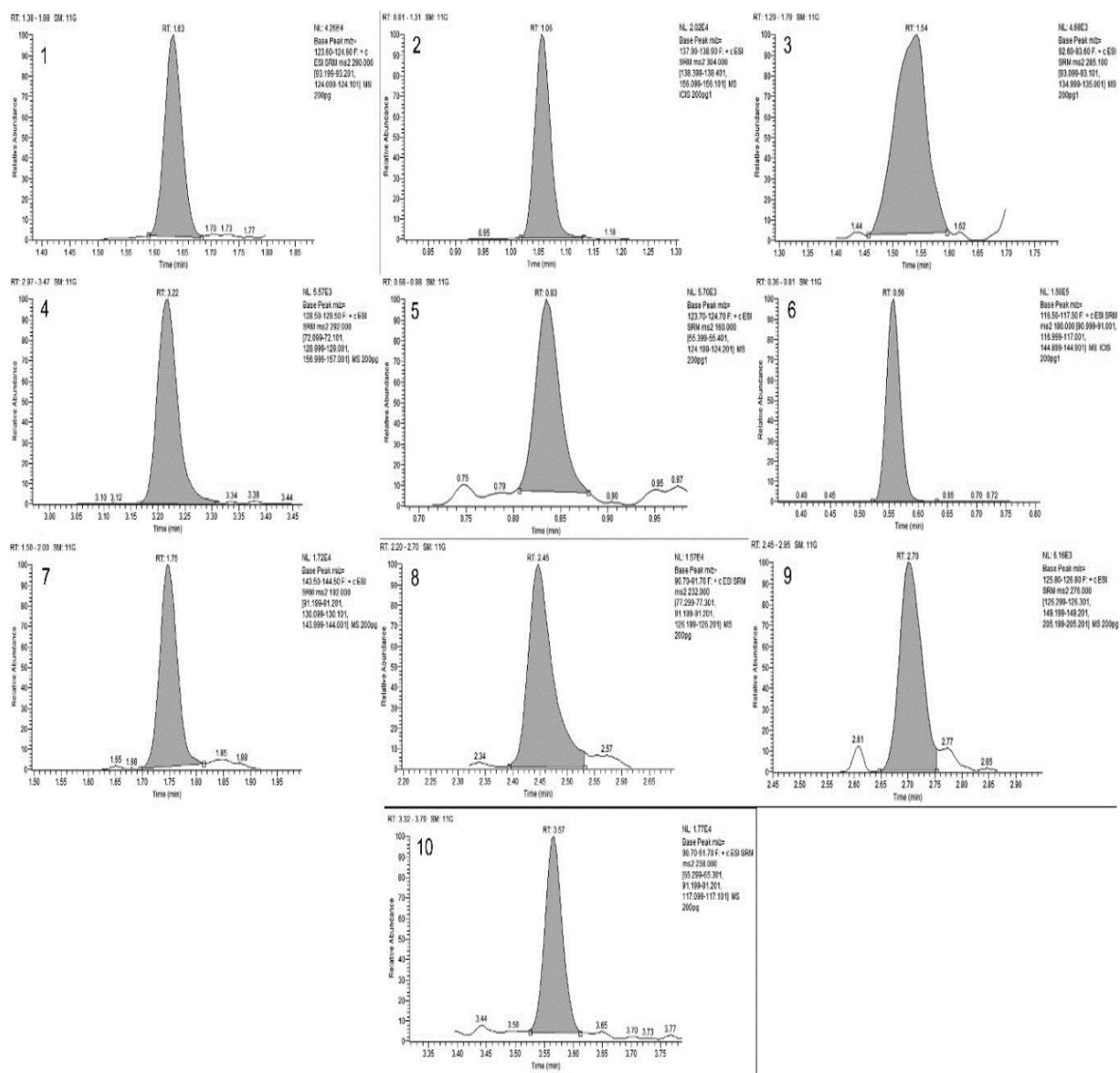


Рисунок 8 – Хроматограммы растворов контроля качества на уровне низких концентраций: 1 – атропин; 2 – скополамин; 3 – тропикамид; 4 – цикломед; 5 – прегабалин; 6 – фенибут; 7 – 4-МЕС; 8 –  $\alpha$ -PVP; 9 – MDPV; 10 – дифенилпирролидин

Оценив чувствительность, селективность, точность и матричные эффекты на модельных и холостых образцах, целесообразным представлялось проведение исследования реальных образцов мочи, полученных из наркологического диспансера г. Краснодара.

В ходе проведения анализа было установлено, что содержание аналитов в пробах существенно превышают линейный диапазон калибровочного графика и

для их определений целесообразно проведение предварительного разбавления проб до 100 раз (рисунок 9 и 10). С одной стороны, чувствительность предложенной методики можно назвать несколько избыточной, однако в ряде случаев, особенно при проведении токсикологических экспертиз, требуется определение наркотических и психоактивных веществ через несколько дней после совершения правонарушения. В таких случаях требуется применение методики, отвечающей требованиям высокой чувствительности и надежности.

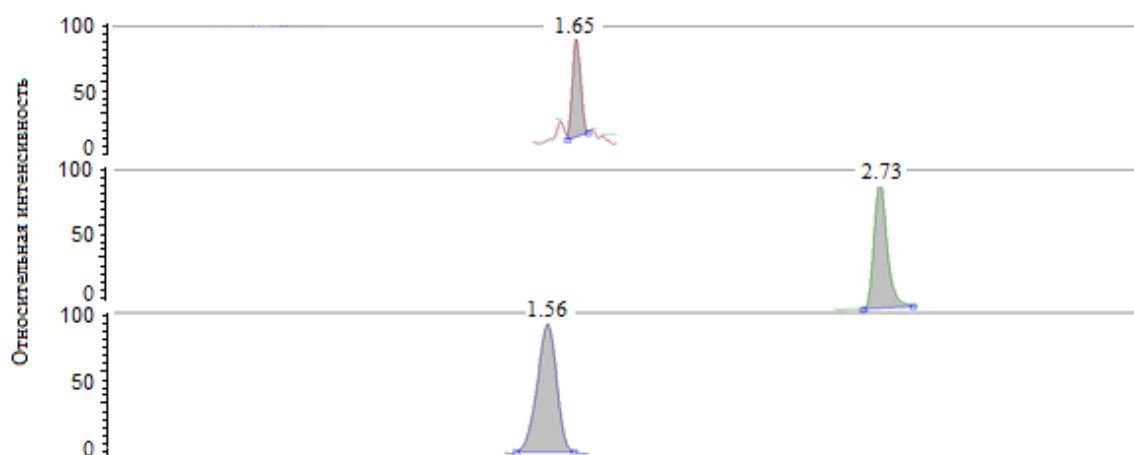


Рисунок 9 – Хроматограмма 1 образца мочи после кислотного гидролиза (разбавление в 20 раз)

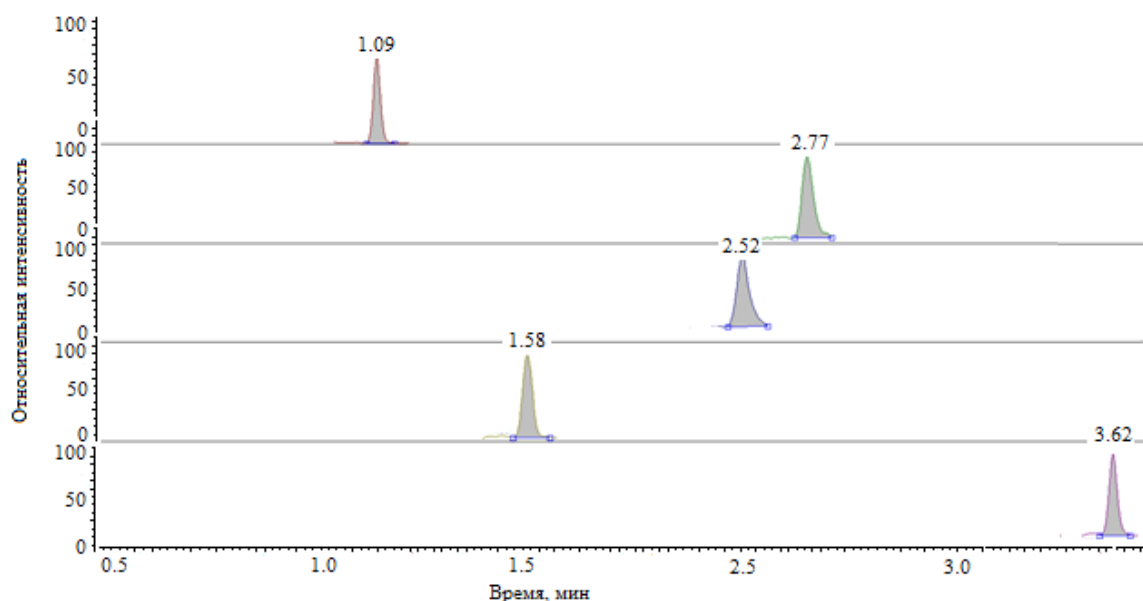


Рисунок 10 – Хроматограмма 2 образца мочи после кислотного гидролиза (разбавление в 100 раз)



В ряде образцов были выявлены MDPV (рисунок 11) и  $\alpha$ -PVP (рисунок 12), наиболее распространенные на сегодняшний день синтетические катионы, а также ряд метаболитов MDPV (рисунок 13).

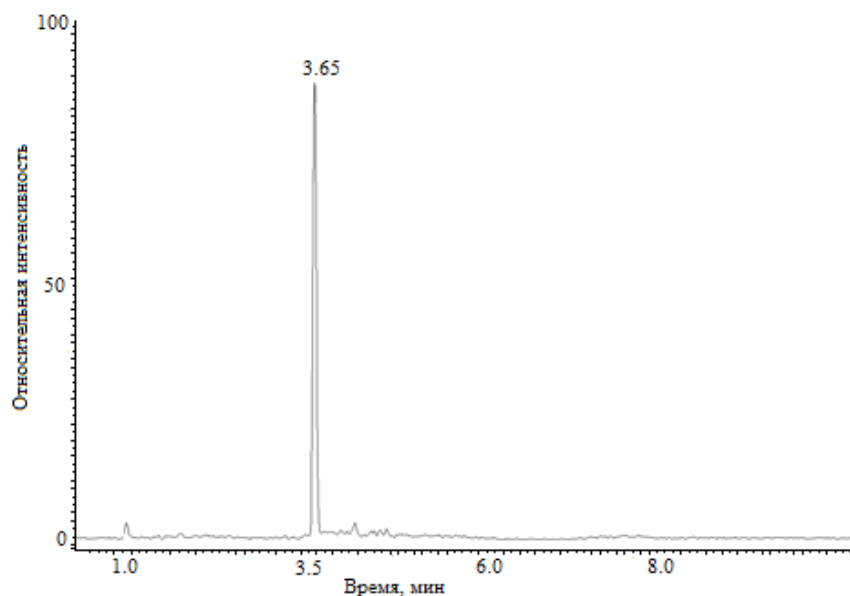


Рисунок 11 – Хроматограмма образца мочи, содержащей MDPV по выделенному протонированному молекулярному иону

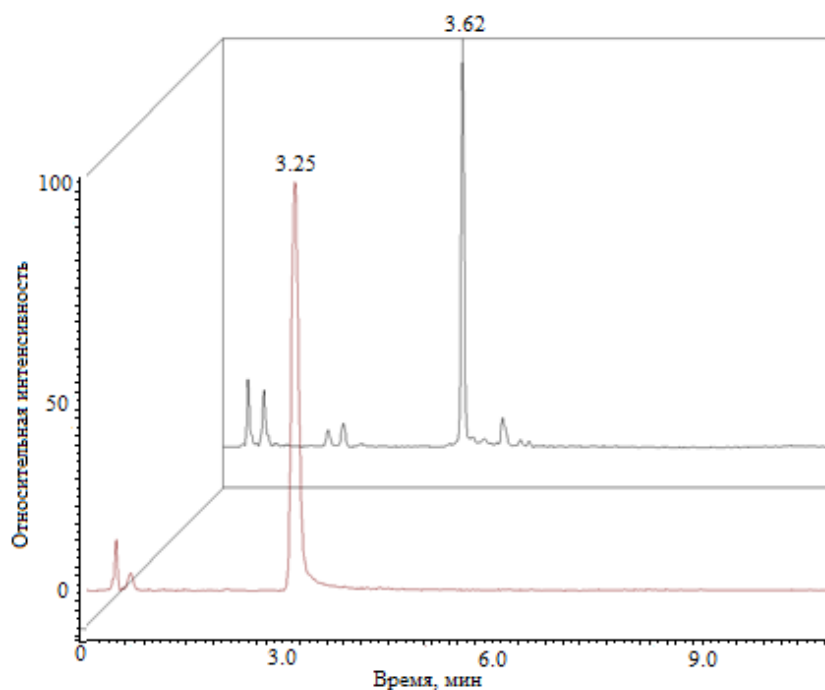


Рисунок 12 – Хроматограмма образца мочи, содержащей  $\alpha$ -PVP и MDPV по выделенным протонированным молекулярным ионам

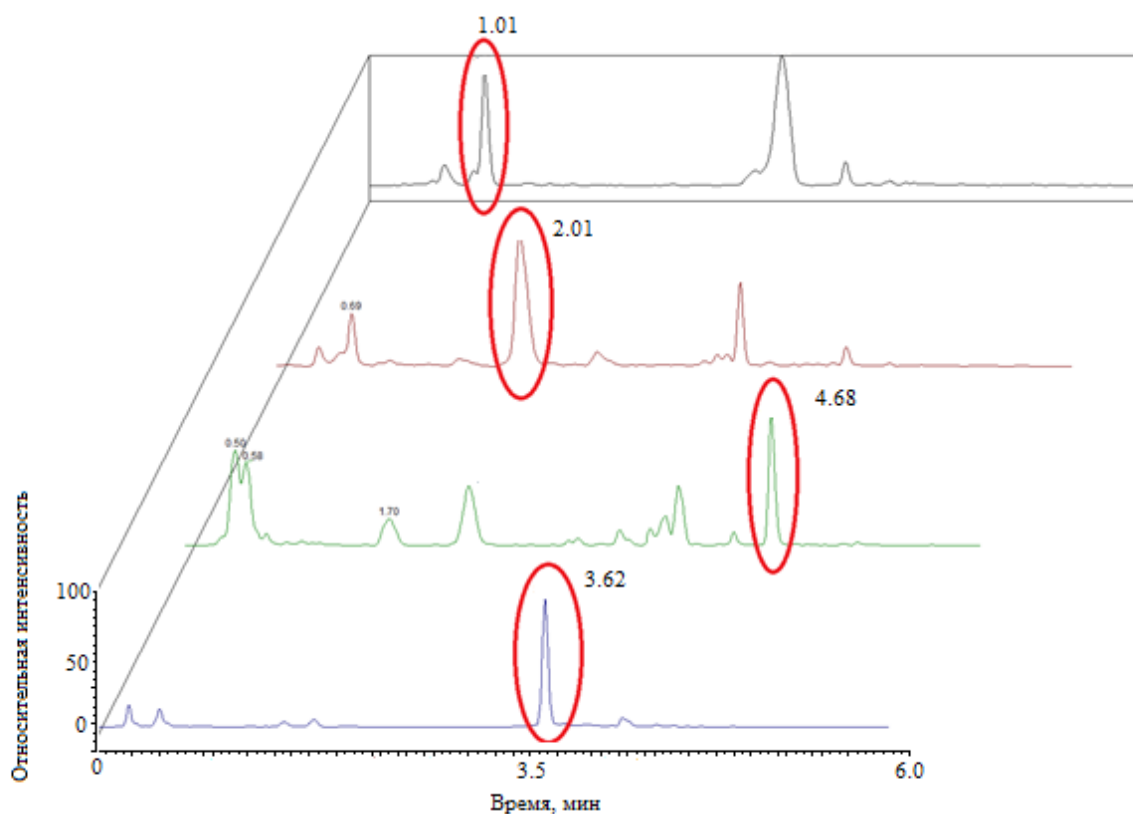


Рисунок 13 – Одновременное определение MDPV и некоторых его метаболитов в моче

Из рисунка видно, что наряду с нативным соединением в образцах мочи удалось обнаружить ряд его метаболитов. Предположительно метаболиты имеют следующие структуры [56] (рисунок 14).

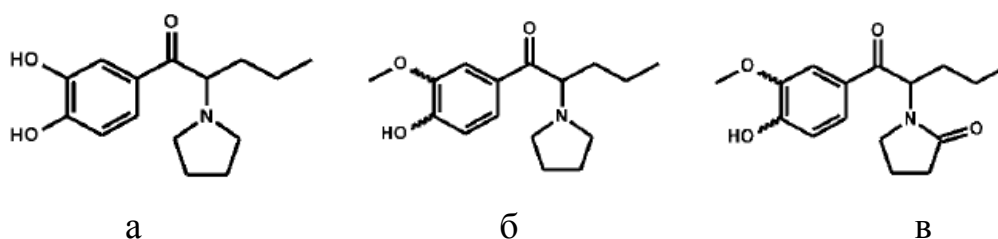


Рисунок 14 – Структурные формулы метаболитов MDPV: а) MDPV-M (деметил-); б) MDPV-M (деметил-метил-); в) MDPV-M (деметил-метил-окси)

Исходя из полученных данных, можно предположить, что данный метод может быть использован как в токсикологических целях (в этом случае существенное разбавление матрицы положительно скажется как на сроке

эксплуатации хроматографической колонки, так и приведет к уменьшению матричных эффектов, и, как следствие, улучшению точности и воспроизводимости получаемых результатов), так и в целях допинг-контроля, поскольку полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАДА к чувствительности и воспроизводимости хромато-масс-спектрометрических методов анализа.

Однако помимо классических стимуляторов, включенных в перечень запрещенных препаратов, существует еще несколько классов веществ, среди которых присутствуют, например, модуляторы метаболизма, среди которых присутствуют полярные вещества, чье определение с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии не представляется возможным.

## 2.6 Мельдоний, как модулятор метаболизма, его определение в режиме гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

На сегодняшний день, с точки зрения допинг-контроля, мельдоний относится к запрещенным препаратам, включенным в группу модуляторов метаболизма, и, как следствие, подлежит обязательному контролю. По структуре он является полным аналогом природного  $\gamma$ -бутиробетаина, предшественника карнитина (рисунок 15).

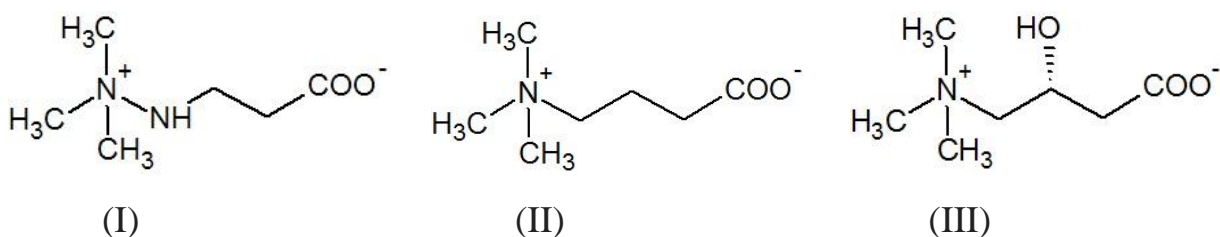


Рисунок 15 – структурные формулы– мельдония (I),  $\gamma$ -бутиробетаина (II), карнитина (III)

Ввиду высокой полярности, а также небольшой молекулярной массы определение мельдония в биологических объектах может быть затруднено

сильно выраженными матричными эффектами и практическим отсутствием удерживания в режиме обращено-фазовой ВЭЖХ, что обуславливает необходимость применения гидрофильной хроматографии. Как видно из представленного выше рисунка, в составе мельдония нет хромофорных групп, поэтому его УФ и флуоресцентное детектирование без предварительной дериватизации нецелесообразно. В тоже время данное соединение достаточно легко ионизируется, что в сочетании с гидрофильной хроматографией позволяет достичь достаточно низких пределов обнаружения.

В качестве внутреннего стандарта при хромато-масс-спектрометрическом определении был использован габапентин. Его выбор был обусловлен тем, что он достаточно близок по структуре к мельдонию и также не является эндогенным соединением, что позволяет избежать существенных искажений полученных результатов.

Разделение осуществлялось на колонке Phenomenex Kinetex HILIC (100мм × 2.1мм, 2.6 мкм) при температуре термостата 30 °С. Для обеспечения воспроизводимости результатов и минимизации перекрестного загрязнения образцов иглу автосамплера пятикратно промывали до и после ввода пробы смесью вода:ацетонитрил:метанол (70:20:10, v:v). Подобный состав промывочной жидкости допустим лишь в том случае, если при проведении промывки не происходит частичного заполнения дозирующей петли хроматографа, поскольку большое содержание воды в составе вводимой пробы приведет к потере воспроизводимости времен удерживания в режиме гидрофильной хроматографии.

В качестве подвижной фазы изучали следующие системы:

- 1) ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота в воде;
- 2) ацетонитрил:0,1% муравьиная кислота в метаноле;
- 3) ацетонитрил:10 мМ ацетат аммония.

Традиционно в гидрофильной хроматографии в качестве слабого элюента используется апротонный растворитель – ацетонитрил, однако учитывая большое количество полярных соединений, присутствующих в моче, было

принято решение изучить возможность применения метанола для осуществления разделения. Несмотря на то, что ряд пиков удалось разделить в системе, содержащей метанол, добиться необходимой чувствительности и снизить матричные эффекты не удалось, что вынудило отказаться от дальнейших экспериментов с его применением (рис. 16(2)).

Применение классической фазы для гидрофильной хроматографии, содержащей ацетонитрил также предсказуемо позволило добиться удовлетворительного результата, однако повышение температуры термостата колонки привели к серьезному ухудшению разделения компонентов (рис. 16(1)), а в процессе апробации на реальных образцах мочи привело к существенным матричным эффектам, обусловленным коэлюирующимися компонентами.

Уменьшив температуру термостата до 30 °С удалось добиться лучшей эффективности разделения компонентов и существенного снижения матричных эффектов, в том числе, гашения ионизации (рис. 16(3)). Наибольшей же эффективности разделения и воспроизводимости получаемых результатов удается добиться при использовании системы ацетонитрил:10 мМ ацетат аммония.

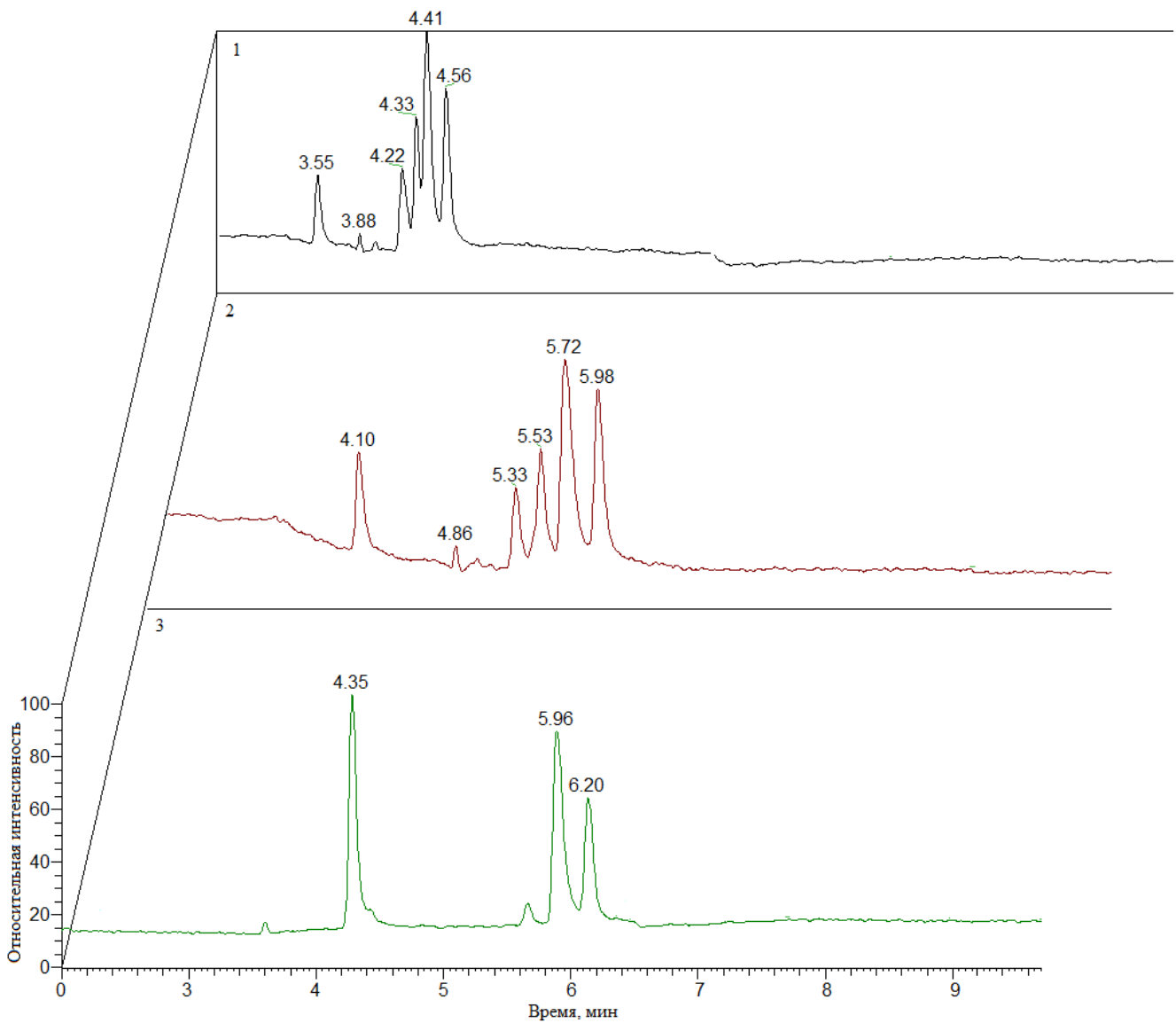


Рисунок 16 – Изучение параметров удерживания аналитов с целью оптимизации их разделения и последующего детектирования

Условия градиентного элюирования приведены в таблице 15. Объем вводимой пробы 10 мкл.

Таблица 15 – Условия градиентного элюирования мельдония

| Время,<br>мин | А (ацетонитрил), % | В (10 мМ раствор<br>ацетата аммония), % |
|---------------|--------------------|---|
| 0             | 95                 | 5                                       |
| 2             | 83                 | 17                                      |
| 4             | 62                 | 38                                      |
| 6             | 42                 | 58                                      |
| 8             | 35                 | 65                                      |
| 10            | 35                 | 65                                      |
| 12            | 35                 | 65                                      |
| 14            | 35                 | 65                                      |
| 16            | 95                 | 5                                       |

Из-за высокой полярности аналита оптимальным является применение электрораспылительной ионизации. В ходе исследований выбрали оптимальные условия детектирования: температура 350 °С, температура трансферного капилляра 320 °С, напряжение на источнике ионизации 3000 В, режим регистрации положительных ионов, давление газа – распылителя (азот) 60 усл.ед., давление вспомогательного газа (азот) 10 усл.ед., давление газа-мишени в ячейке соударений (аргон) 1.5 мторр. Условия МС/МС-детектирования оптимизировали путем напуска определяемых вещества в камеру источника с использованием шприцевого ввода. К сожалению, ввиду того, что мельдоний имеет малую молекулярную массу, в ходе оптимизации условий МС/МС-детектирования было установлено, что он имеет лишь один интенсивный и селективный переход (табл. 16), что стало дополнительным поводом уделить особое внимание эффективности хроматографического разделения, позволяющего избежать искажения результатов из-за коэлюирования матричных компонентов.

Таблица 16 – Времена удерживания, MRM-переходы и энергии соударений для анализов при их определении методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

| Вещество   | Время удерживания, мин | Напряжение на экстрагирующей линзе, В | Ион-прекурсор, $m/z$ | Ион-продукт, $m/z$ | Энергия соударения, эВ |
|------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| Мельдоний  | 6.2                    | 57                                    | 147.1                | 58.3               | 32                     |
| Габапентин | 4.35                   | 75                                    | 172.3                | 137.2              | 14                     |
|            |                        |                                       |                      | 95.3               | 20                     |
|            |                        |                                       |                      | 67.3               | 28                     |

В описанных выше условиях на хроматограммах (рисунок 17) отсутствуют пики с временами удерживания и соотношением интенсивностей между MRM-переходами, аналогичными аналитам, мешающие их определению. Это свидетельствует о том, что выбранные условия отвечают требованиям селективности, и эндогенные соединения не мешают при применении техники «разбавил-и-вколл».



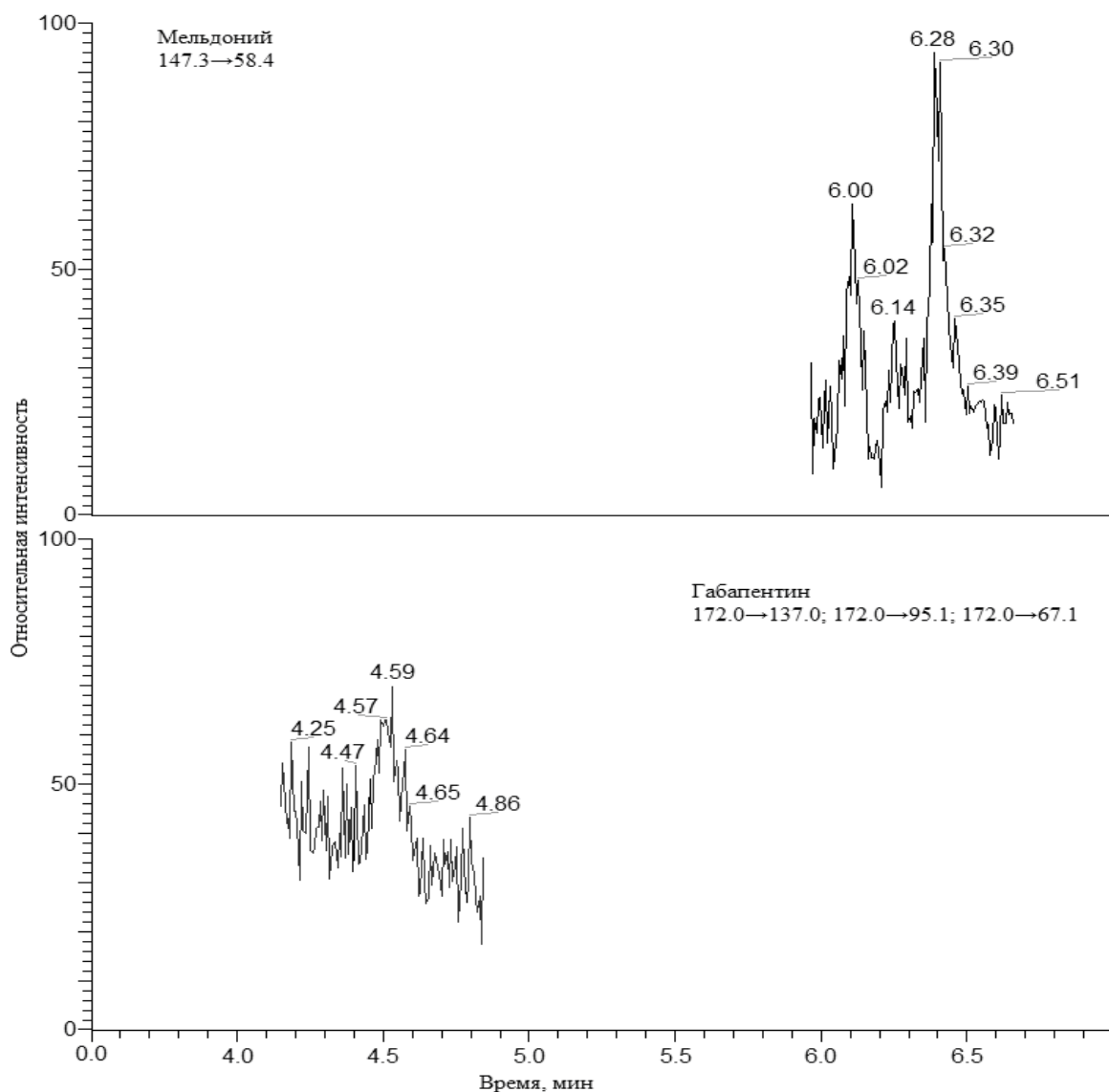


Рисунок 17 – ВЭЖХ-МС/МС-хроматограмма контрольного образца мочи после применения методики «разбавил-и-вколол»

Известно, что мельдоний выводится в неизменном виде практически полностью, а, значит, наиболее целесообразной и удобной схемой подготовки проб будет являться разбавление. Поскольку хроматографическое разделение осуществляется в режиме гидрофильной хроматографии, разбавитель должен представлять из себя слабый элюент, чтобы привести состав конечной пробы к близкому по составу элюенту первой ступени при хроматографическом разделинии. Следовательно, в качестве разбавителя целесообразным являлось применение ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт. Таким образом,

на 2 мл пробы приходилось 200 мкл анализируемой мочи и 1800 мкл разбавителя. Полученную пробу перемешивали и центрифугировали при 10000 об/мин 10 мин. Супернатант переносили в стеклянные виалы и анализировали в описанных выше условиях. Подготовленные таким образом образцы мочи можно также использовать при прямом способе введения пробы в систему масс-спектрометрического детектирования без предварительного хроматографического разделения, однако в этом случае обнаружение мельдония в концентрациях ниже 20 нг/мл затруднительно из-за матричных эффектов. Кроме того, происходит стремительное загрязнение ионной оптики и трансферного капилляра и уже после 100 вводов пробы требуется их очистка.

Для проведения количественного анализа готовили ряд градуировочных растворов. Исходный раствор с концентрацией аналитов 1 мг/мл получали растворением навески вещества в смеси вода–ацетонитрил (20:80, v:v). Рабочие растворы готовили последовательным разбавлением ацетонитрилом исходного раствора. Для градуировки аналиты вводили в контрольную пробу мочи в концентрациях 10, 12.5, 25, 50, 100, 125 и 250 нг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали габапентин с концентрацией в полученном экстракте 50 нг/мл. Полученные пробы хранили не более 48 ч при комнатной температуре.

Градуировочные растворы анализировали как описано выше для установления линейного диапазона ( $n=3$ ). Градуировочные кривые строили в виде зависимости отношения площадей пиков (площадь пика аналита/площадь пика внутреннего стандарта) от концентрации и обрабатывали как линейные зависимости для установления коэффициента корреляции, который составил 0.994.

Для характеристики точности анализа готовили несколько растворов контроля качества (РКК) с высокой (250 нг/мл), средней (100 нг/мл) и низкой (25 нг/мл) концентрациями; каждый раствор РКК анализировали в течение одного дня по 5 раз. Правильность результатов в разные дни также контролировали путем анализа РКК. Концентрации растворов находили по градуировочным графикам, полученным в день анализа. Результат признавали (табл. 16).

Таблица 16 – Результаты определения мельдония в моче после применения техники «разбавил-и-вколол»

| Мельдоний | Введено,<br>нг/мл | Точность в один день |                        | Точность между днями |                        |
|-----------|-------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|           |                   | найдено,<br>нг/мл    | погрешность,<br>отн. % | найдено,<br>нг/мл    | погрешность,<br>отн. % |
|           | 25                | 27.9±0.2             | 11.97                  | 24.30±0.05           | -2.79                  |
|           | 100               | 117.3±0.2            | 17.73*                 | 111.4±0.2            | 11.42                  |
|           | 250               | 249.2±0.2            | -0.30                  | 246.78±0.03          | -1.29                  |

\*Неудовлетворительный результат

Предел обнаружения аналита устанавливали экспериментально путем снижения концентрации стандартных растворов до тех пор, пока соотношение сигнал/шум не составит 3:1 при концентрации мельдония 7.5 нг/мл. Нижнюю границу определяемых концентраций также устанавливали экспериментально и она составила 10 нг/мл.

Предложенный способ использовали для анализа проб мочи, полученных от добровольцев через 12 и 24 ч после приема мельдония в дозе 500 мг (рисунок 18).

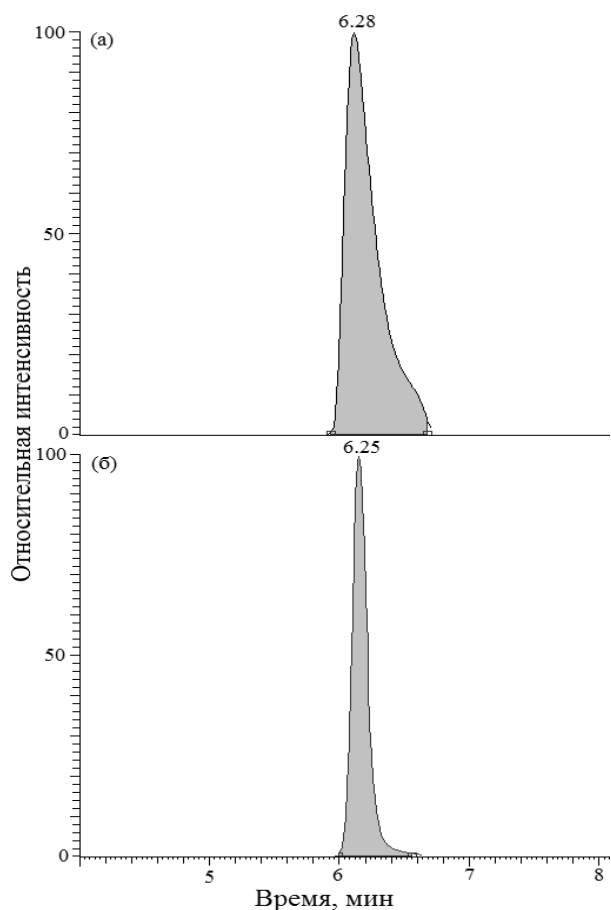


Рисунок 18 – ВЭЖХ-МС/МС-хроматограммы образцов мочи через 12 ч (а) и 24 ч (б) после приема мельдония с дозировкой 500 мг.

Из представленного рисунка видно, что даже спустя 12 часов после однократного употребления мельдония, его концентрация в моче настолько высока, что наблюдается перегрузка колонки, что приводит к существенному искажению формы хроматографического пика. Лишь спустя 24 часа после употребления концентрация снижается до того уровня, когда пик перестает быть перегруженным.

Интересно то, что кинетика выведения мельдония из организма, достаточно сильно растянута и представляет собой не классическое Гауссово распределение, а имеет затянутый участок на конце выведения препарата, позволяя определять остаточные количества мельдония после его однократного употребления даже спустя 2 месяца.

Подобные явления, а также комбинации употребляемых препаратов, могут приводить к искажениям в биологическом паспорте человека, включающего в себя не только сведения об эритропоезе и стероидном профиле, но и содержании ряда катехоламинов, определение которых также сопряжено с рядом трудностей как в части подготовки проб, так и их анализе.

## 2.7 Изучение возможности дериватизации катехоламинов на патронах для ТФЭ в целях мониторинга биологического паспорта

Поскольку катехоламины относятся к малым полярным соединениям, их прямое определение с использованием ОФ-ВЭЖХ может быть затруднено. Ранее было отмечено, что оптимальным методом их определения без дериватизации является применение электрохимического детектирования, обеспечивающего высокую чувствительность, но требующего постоянного контроля стабильности получаемых результатов. В случае получения производных катехоламинов, возникает возможность варьировать методы детектирования – от УФ- и флуориметрического до масс-спектрометрического.

Получение производных катехоламинов возможно с использованием разных техник дериватизации, одной из которых является твердофазная аналитическая дериватизация, при которой аналиты модифицируются непосредственно на патроне для ТФЭ.

Для реализации подобного подхода необходимо использовать подходящий сорбент, способный эффективно извлекать катехоламины из матрицы. Подобным требованиям отвечают сильные катионнообменные сорбенты, в частности, патроны ISOLUTE SCX 100 мг/1 мл.

Перед проведением исследования были приготовлены следующие стандартные и буферные растворы: для приготовления боратного буферного раствора с рН 9.5 были использованы гидроксид натрия и тетраборат натрия. Стандартные растворы катехоламинов (адреналина, дофамина, октопамина) 1 мг/мл готовили путем растворения точной навески вещества в 0.1%

муравьиной кислоте, из которых затем готовили рабочие растворы путем последовательного разбавления ацетонитрилом. Раствор дериватирующего агента (9-флуоренил-метоксикарбонил хлорида) 1 мг/мл готовили путем растворения точной навески вещества в ацетонитриле. Для элюирования готовили 5% раствор ацетата аммония в метаноле. Для количественного анализа готовили ряд градуировочных растворов путем десятикратного разбавления рабочих растворов катехоламинов 0,1% муравьиной кислотой с получением серии калибровочных растворов с концентрациями 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 и 500 нг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали габапентин с концентрацией в полученном экстракте 50 нг/мл.

Активацию патронов проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя, после чего образец исследуемой мочи, объемом 1 мл пропускали через патрон для твердофазной экстракции, промывали патрон 1 мл раствором 1% муравьиной кислоты в воде и 1 мл метанола, далее пропускали 500 мкл боратного буфера (рН 9.5) и 500 мкл дериватирующего агента (9-флуоренил-метоксикарбонил хлорида), после чего патрон выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут. Элюирование производных катехоламинов осуществляли 5% раствором ацетата аммония в метаноле. Элюат переносили в стеклянные вials.

При использовании данного подхода дериватизация происходит не в растворе, как это делается в классическом варианте, а на поверхности сорбента, что позволяет одновременно совместить процесс очистки и концентрирования пробы с модификацией аналитов. В этом случае происходит взаимодействие дериватирующего агента с катехоламинами по первичной аминогруппе, которая, во многом, и обуславливает основные свойства веществ. Полученные после дериватизации производные обладают более липофильными свойствами, что позволяет обеспечить легкость и полноту их извлечения с использованием раствора ацетата аммония в аммиаке и дальнейшим ОФ-УВЭЖХ-МС/МС анализом.

Для хроматографического разделения использовали аналитическую колонку Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) с аналогичной предохранительной колонкой. В качестве подвижной фазы использовалась система ацетонитрил:0.1% раствор муравьиной кислоты в воде. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 17. Объем вводимой пробы 10 мкл.

Таблица 17 – Условия градиентного элюирования производных катехоламинов

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% муравьиная кислота), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 0          | 5                  | 95                             | 0.45                    |
| 1.0        | 5                  | 95                             |                         |
| 1.7        | 60                 | 40                             |                         |
| 3.5        | 60                 | 40                             |                         |
| 6.5        | 90                 | 10                             |                         |
| 9.0        | 90                 | 10                             |                         |
| 9.0        | 5                  | 95                             |                         |
| 10.5       | 5                  | 95                             |                         |

В ходе исследований выбрали оптимальные условия детектирования: температуру испарителя источника ионизации, температуру трансферного капилляра, напряжение на источнике ионизации, режим регистрации ионов, давление газа – распылителя (азот), давление вспомогательного газа (азот), давление газа-мишени в ячейке соударений (аргон) (таблица 18).

Таблица 18 – Условия детектирования аналитов методом ВЭЖХ–МС/МС

| Параметры              | Значения |
|------------------------|----------|
| Температура испарителя | 400 °С   |
| Температура капилляра  | 300 °С   |

Продолжение таблицы 18

|                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| Напряжение на источнике ионизации    | 4000 В        |
| Полярность                           | Положительная |
| Давление газа-распылителя            | 60 (AU)       |
| Давление вспомогательного газа       | 15 (AU)       |
| Давление в ячейке соударений (аргон) | 2 мТорр       |

Условия МС/МС-детектирования оптимизировали путем напуска определяемых вещества в камеру источника с использованием шприцевого ввода. Детектирование определяемых веществ проводили в режиме мониторинга заданных реакций (таблица 19).

Таблица 19 – Времена удерживания, MRM-переходы и энергии соударений для аналитов при их определении методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ионизация электрораспылением)

| Соединение   | $t_R$ , мин | Ион-прекурсор, m/z | Продукт-ион, m/z | Энергия соударений, эВ |
|--------------|-------------|--------------------|------------------|------------------------|
| Катехоламины |             |                    |                  |                        |
| Адреналин    | 0.54        | 166.2*             | 107.1;77.2;135.0 | 19;33;14               |
| Дофамин      | 0.52        | 154.1              | 137.1;91.0       | 6;30                   |
| Октопамин    | 0.64        | 136.2*             | 91.2;65.3;119.2  | 17;31;11               |



Продолжение таблицы 19

| Производные катехоламинов                    |      |       |                   |          |
|--|------|-------|-------------------|----------|
| 9-флуоренил-<br>метоксикарбонил<br>адреналин | 2.54 | 388.2 | 210.0;166.0;178.0 | 10;20;35 |
| 9-флуоренил-<br>метоксикарбонил<br>дофамин   | 2.56 | 376.2 | 179.0;137.2;91.0  | 15;20;40 |
| 9-флуоренил-<br>метоксикарбонил<br>октопамин | 2.70 | 358.0 | 154.0;179.0;198.0 | 15;30;10 |

\*Ионы, образующиеся благодаря потере воды на источнике ионизации

Как видно из таблицы 19, во всех случаях в масс-спектре ионов-продуктов присутствуют ионы, характерные потере дериватирующего агента, FMOС-Cl. Зачастую именно эти потери обуславливают наиболее интенсивные пики в масс-спектре, что делает их удобными для количественного анализа, однако подобные потери не являются селективными и, поскольку процесс дериватизации тоже малоизбирателен, стоит принимать во внимание возможность интерференций даже в режиме MRM.

На рисунке 19 представлены хроматограммы растворов контроля качества производных катехоламинов и внутреннего стандарта с концентрацией 500 нг/мл. Из представленных данных можно отметить отсутствие коэлюирующихся компонентов, что позволяет обеспечить наибольшую точность получаемых данных.

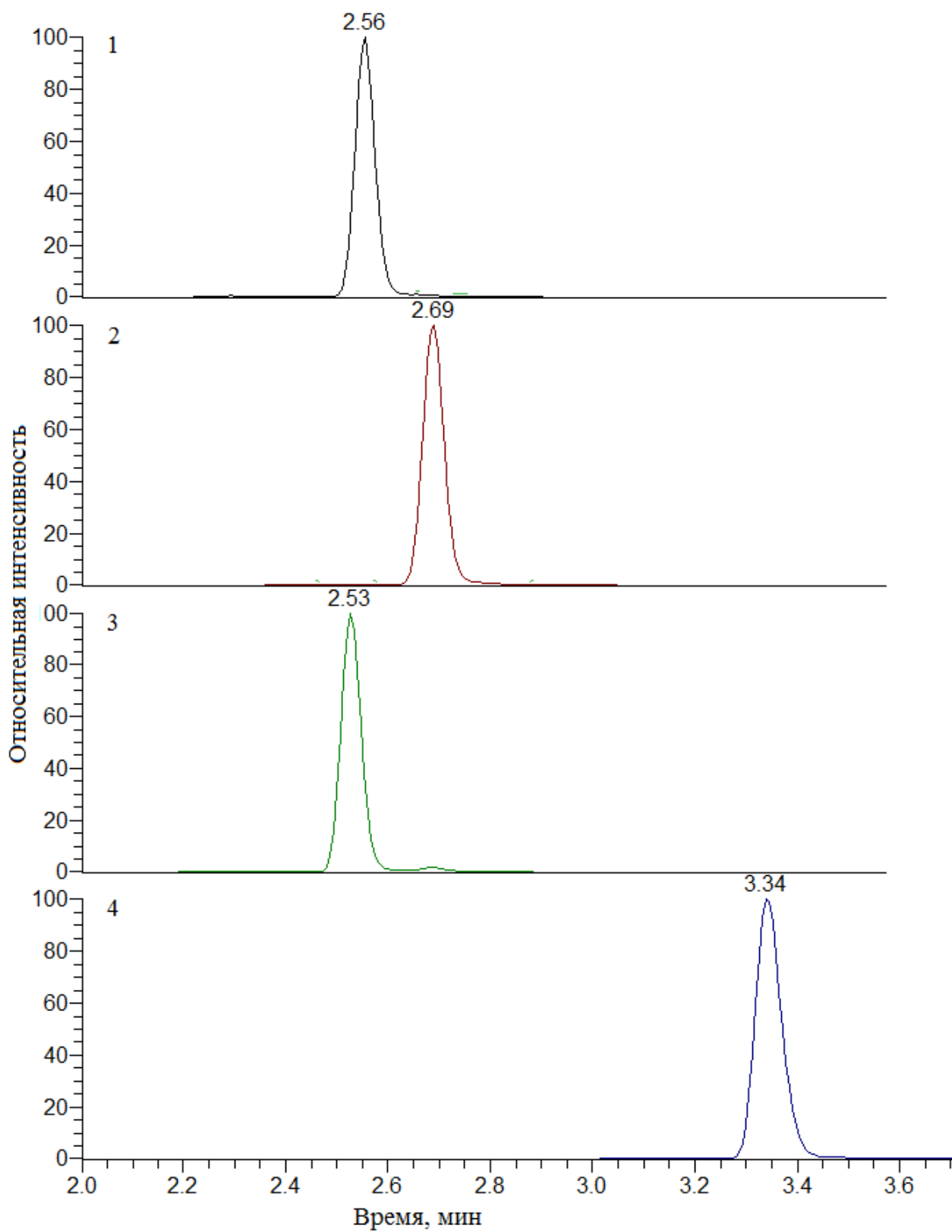


Рисунок 19 – Хроматограммы растворов контроля качества на уровне высоких концентраций

Для проверки точности анализа готовили несколько растворов контроля качества с низкой, средней и высокой концентрациями; каждый раствор анализировали в течение одного дня по 3 раз. Правильность результатов в разные дни также контролировали путем анализа растворов контроля качества. Концентрации растворов находили по градуировочным графикам, полученным в день анализа. Результат признавали удовлетворительным, если погрешность определения не превышала 15% (таблица 20).

Таблица 20 – Валидационные характеристики определения аналитов в моче

| Производные катехоламинов             | Введено (нг/мл) | В один день     |                      | В разные дни    |                      |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
|                                       |                 | Правильность, % | Воспроизводимость, % | Правильность, % | Воспроизводимость, % |
| 9-флуоренил-метоксикарбонил адреналин | 10              | -7.9            | 11.5                 | -10.1           | 14.8                 |
|                                       | 100             | 3.5             | 7.4                  | 3.9             | 11.6                 |
|                                       | 500             | 1.1             | 5.5                  | 1.5             | 8.1                  |
| 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамин   | 25              | 13.1            | 9.3                  | 14.2            | 13.2                 |
|                                       | 100             | 5.6             | 6.2                  | 5.9             | 9.9                  |
|                                       | 500             | 2.3             | 2.1                  | 3.1             | 4.1                  |
| 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамин | 10              | 11.7            | 8.8                  | 13.2            | 13.5                 |
|                                       | 100             | 6.5             | 4.6                  | 9.4             | 9.7                  |
|                                       | 500             | 2.1             | 4.5                  | 3.4             | 9.5                  |

Предел обнаружения аналита устанавливали экспериментально путем снижения концентрации стандартных растворов до тех пор, пока соотношение сигнал/шум не составит 3:1 при концентрации нг/мл. Нижнюю границу определяемых концентраций также устанавливали экспериментально, и она составила 2.5 нг/мл для 9-флуоренил-метоксикарбонил адреналина, 5 нг/мл для 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамина, 25 нг/мл для 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамина (таблица 21).

Эффективность дериватизации рассчитывали по формуле:

$$E (\%) = ( S_{\text{пика после дериватизации на патроне}} / S_{\text{пика после дериватизации в растворе}} ) \times 100$$

Таблица 21 – Аналитические характеристики определения аналитов в моче

| Производные катехоламинов                                   | Предел обнаружения, нг/мл | Предел определения, нг/мл | Диапазон линейности, нг/мл | Эффективность дериватизации, % |
|---|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Продолжение таблицы 219-флуоренил-метоксикарбонил адреналин | 2.5                       | 5                         | 2.5-500                    | 106                            |
| 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамин                         | 25                        | 50                        | 2.5-500                    | 86                             |
| 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамин                       | 5                         | 10                        | 2.5-500                    | 87                             |

Разработанный способ был использован для проведения анализа проб, полученных от добровольцев (мужчин и женщин) в возрасте от 20 до 45 лет. Пробы консервировали с помощью азидата натрия, после чего хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализа с целью установления содержания производных катехоламинов в режиме обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Результаты исследования одной из подобных таких проб представлены на рисунке 19. Концентрации определяемых соединений составили  $65 \pm 10$  нг/мл для адреналина,  $258 \pm 38$  нг/мл для дофамина,  $73 \pm 11$  нг/мл для октопамина.

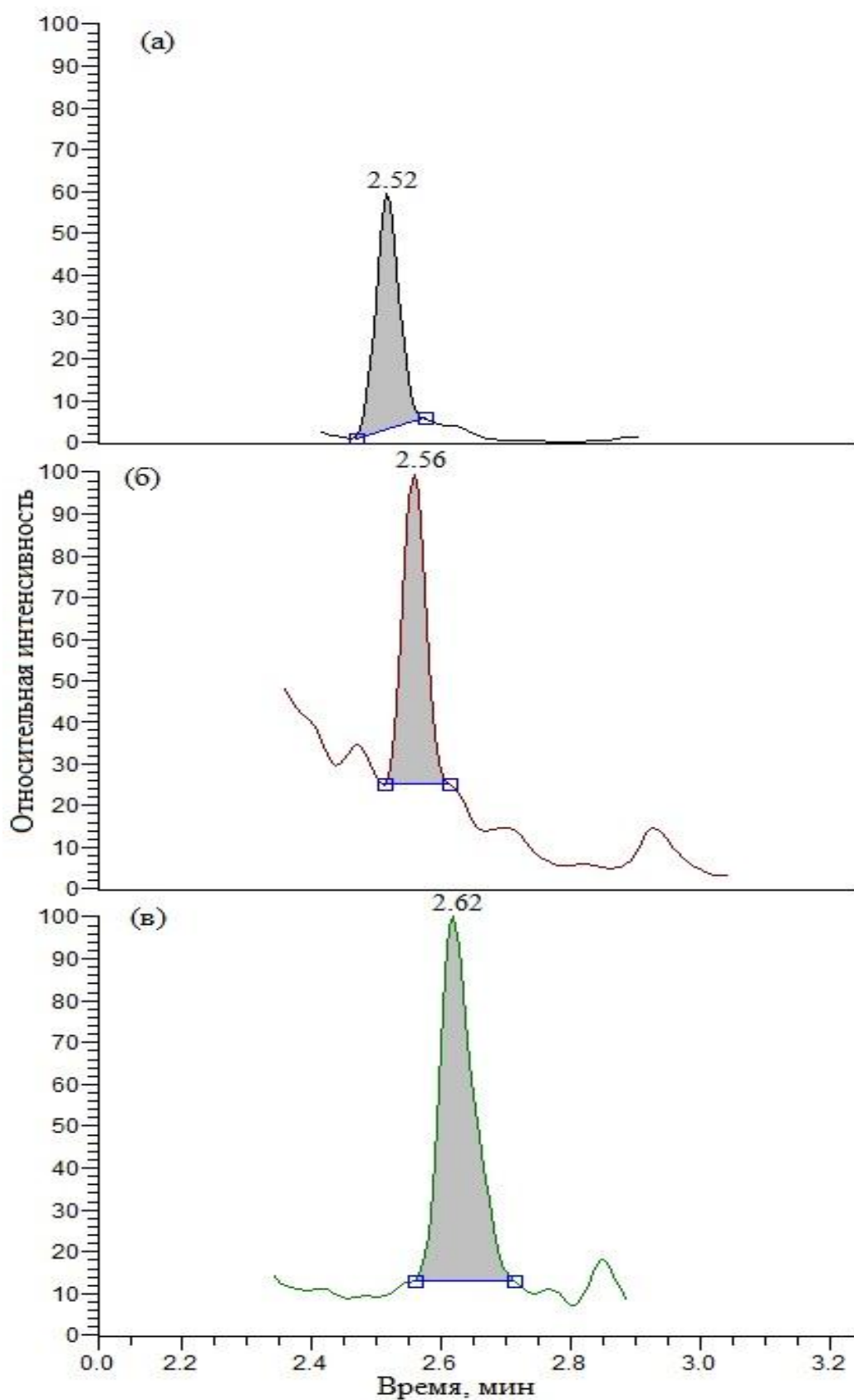


Рисунок 19 – Хроматограммы проб мочи, полученных от добровольца: (а) – 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамин, (б) – 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамин, (в) – 9-флуоренил-метоксикарбонил адреналин

## ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены основные классы, проблемы идентификации и определения некоторых ксенобиотиков в биологических жидкостях человека. Проведены скрининговые исследования различных видов продуктов спортивного питания и вспомогательных препаратов для обнаружения в них психоактивных соединений, допинг-агентов методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС. В ходе хромато-масс-спектрометрического исследования ряда продуктов, реализованных в период с 2014 по 2016 гг., в составе предтренировочных комплексов, жиросжигателей и прогормонов обнаружены запрещенные ВАДА вещества.

2. Разработана методика определения некоторых наркотических соединений и психоактивных веществ (катинонов, тропановых алкалоидов, производных гамма-аминомасляной кислоты) в моче, включающая подготовку проб к анализу и определение аналитов методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с электрораспылительной ионизацией. Изучены матричные эффекты при проведении ВЭЖХ–МС/МС-анализа при применении двух наиболее распространенных способов подготовки проб: разбавление пробы и применение минерального гидролиза. Предложенный способ использован для анализа проб, полученных из Краснодарского наркодиспансера.

3. Разработана методика ВЭЖХ-МС/МС определения мельдония в моче в режиме гидрофильной хроматографии, отвечающая требованиям точности, экспрессности, надежности и чувствительности. Продемонстрирована возможность применения данной методики в практике допинг-контроля и клинической диагностики. Разработанная методика определения мельдония в моче человека метрологически аттестована и внесена в Федеральный реестр методик измерений МИ 02067847.02-2017 «Массовая концентрация мельдония в моче человека методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием».

4. Разработана методика количественного хромато-масс-спектрометрического определения производных катехоламинов в моче человека путем их дериватизации на патроне для твердофазной экстракции. Нижние границы определяемых концентраций составили для: 9-флуоренил-метоксикарбонил адреналина - 2.5, 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамина - 5 нг, 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамина - 25 нг/мл.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- НС – наркотическое средство
- ПВ – психоактивное вещество
- МОК – Международный олимпийский комитет
- ВАДА – Всемирное антидопинговое агентство
- MDPV – метилendiоксипировалерон
- $\alpha$ -PVP –  $\alpha$ -пирролидинопентиофенон
- SARM – селективные модуляторы андрогенных рецепторов
- ГХ – газовая хроматография
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием
- ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием
- КЭ-МС – капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия
- ИХА – иммунохимический анализ
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ИЭР – ионизация электрораспылением
- ХИАД – химическая ионизация при атмосферном давлении
- ФИАД – фотоионизация при атмосферном давлении
- УВЭЖХ-МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография–масс спектрометрия
- ТОФ – времяпролетный масс-спектрометр
- МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения
- ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
- ТФЭ – твердофазная экстракция
- МС/МС, МС<sup>n</sup> – тандемная масс-спектрометрия
- MRM – мониторинг выбранных реакций
- SIM – мониторинг выделенных ионов



FMOC-Cl – 9-флуоренил-метоксикарбонил хлорид

DNS-Cl – дансил хлорид

РКК – раствор контроля качества

MSTFA – N-метил-N- (триметилсилил) трифторацетамид

BSTFA – N, O-бис (триметилсилил) трифторацетамид

ТГК – тетрагидроканнабинол

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller, R.K. Doping control. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009. – 195 p.
2. Saudan, C. Testosterone and doping control / C. Saudan, N. Baume, N. Robinson, L. Avois, P. Mangin, M. Saugy // *Br J Sports Med.* – 2006. – V. 40. – P.21-24.
3. Bagchi, D. *Nutrition and Enhanced Sports Performance.* Academic Press. –2018. – 568 p.
4. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard. URL: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2018\\_EN.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2018_EN.pdf) (дата обращения: 01.03.2018).
5. Kesha, K. Methylenedioхупроvalerone (“Bath Salts”), Related Death: Case Report and Review of the Literature / K. Kesha, C. L. Boggs, M. G. Ripple, [et. al] // *J. Forensic Sci.* – 2013. – V. 58. – №6. – P. 1654-1659.
6. De Hon, O. The continuing story of nutritional supplements and doping infractions. / O. De Hon, B. Coumans // *Br. J Sports. Med.* – 2007. – V. 41. – P.800-805.
7. Thevis, M. Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes / M. Thevis, A. Thomas, G. Fubholler, S. Beuck, H. Geyer, W. Schänzer // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 24. – P. 2245-2254.
8. Herriman, M. Dietary Supplements and Young Teens: Misinformation and Access Provided by Retailers / M. Herriman, L. Fletcher, A. Tchaconas, A. Adesman, R. Milanaik // *Pediat.* – 2017. – V. 139. – P.1-7.
9. Thevis, M. Mass spec-trometric characterization of urinary metabolites of the selective androgenreceptor modulator S-22 to identify potential targets for routine doping controls / M. Thevis, A. Thomas, I. Möller, H. Geyer, J.T. Dalton, W. Schänzer // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2011. – V. 25. – P. 2187-2195. Thevis, M. Doping

control analysis of selected peptide hormones using LC–MS(/MS) / M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer // *Forensic Sci. Int.* – 2011. – V. 213. – P. 35-41.

10. Esposito, S. Characterization and identification of a C-terminal amidated mechano growth factor (MGF) analogue in black market products / S. Esposito, K. Deventer, P. Van Eenoo // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2012. – V. – 26. – P. 686-692.

11. Thevis, M. Mass spectrometric characterization of a biotechnologically produced full-length mechano growth factor (MGF) relevant for doping controls / M. Thevis, A. Thomas, H. Geyer, W. Schänzer // *Growth Horm. IGF Res.* – 2012. – V. 24. – P. 276-280.

12. Thomas, A. Immunoaffinity purification of peptide hormones prior to liquid chromatography-mass spectrometry in doping controls / A. Thomas, W. Schänzer, P. Delahaut, M. Thevis // *Methods.* – 2012. – V. 56. – P. 230-235.

13. Thomas, A. Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry / A. Thomas, S. Höppner, H. Geyer, W. Schänzer, M. Petrou, D. Kwiatkowska, A. Pokrywka, M. Thevis // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 401. – P. 507-516.

14. Abbate, V. Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements – a significant risk to public health / V. Abbate, A. T. Kicman, M. Evans-Brown, J. McVeigh, D. A. Cowan C. Wilson, S. J. Colese, C. J. Walker // *Drug Test. Anal.* – 2015. – V. 7. – P. 609-618.

15. Hutter, M. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Hutter M., Kneisel S., Auwärter V., Neukamm M.A. // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 903. – P. 95-101.

16. Salomone, A. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples / Salomone A., Gerace E., D'Urso F., DiCorcia D., Vincenti M. // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – V. 47. – P. 604-610.

17. Coulter, C. Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid / Coulter C., Garnier M., Moore C. // *J. Anal. Toxicol.* – 2011. – V. 35. – P. 424-430.
18. Kneisel, S. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry / Kneisel S., Auwarter V., Kempf J. // *Drug Test. Anal.* – 2013. – V. 5. – P. 657-669.
19. Beyer, J. Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization / Beyer J., Peters F. T., Kraemer T., Maurer H.M. // *J. Mass Spectrom.* – 2007. – V. 42. – P. 150-160.
20. Ammann, J. Detection and Quantification of New Designer Drugs in Human Blood: Part 1 – Synthetic Cannabinoids / Ammann J., McLaren J. M., Gerostamoulos D., Beyer J. // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – V. 36. – P. 372-380.
21. Катаев, С.С. Иммунохроматографический тест мочи, как предварительный метод обнаружения алкалоидов группы опия/ С.С. Катаев, В.П. Гаранин, И.Ю. Смирнова // *Актуальные аспекты судебной медицины.* – Выпуск VII. Сборник научных работ.- Ижевск: Экспертиза, 2001, с. 62-66.
22. Pioch, M. Capillary electrophoresis/mass spectrometry relevant to pharmaceutical and biotechnological applications / M. Pioch, S. Bunz, C. Neus"uß // *Electrophoresis.* – 2012. – V. 33. – P. 1517–1530.
23. Muijselaar, P. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for impurity profiling of basic pharmaceuticals using non-volatile background electrolytes / A.M. van Wijk, P.G. Muijselaar, K. Stegman, G.J. de Jong // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1159. – P. 175-184.
24. Бехтерев, В.Н. Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракцией в сочетании с вымораживанием / В. Н. Бехтерев // Патент № 2303476.
25. Kneisel, S. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows / Kneisel S., Speck M., Moosmann B., Corneillie T.M., Butlin N.G., Auwärter V. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. DOI: 10.1007/s00216-013-6887-0.

26. Salomone, A. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples / A. Salomone, E. Gerace, F. D'Urso, D. DiCorcia, M. Vincenti // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – V. 47. – P. 604-610.
27. Martin, M. Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS / M. Martin, J. F. Muller, K. Turner, M. Duez, V. Cirimele // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – V. 218. – P. 44-48.
28. Namera, A. Simple segmental hair analysis for  $\alpha$ -pyrrolidinophenone-type designer drugs by MonoSpin extraction for evaluation of abuse history / A. Namera, K. Konuma, T. Saito, S. Ota, H. Oikawa, S. Miyazaki, S. Urabe, H. Shiraishi, M. Nagao // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 942-943. P. 15-20.
29. Nielsen, M. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF–MS / M. Nielsen, S. Johansen, P. Dalsgaard, K. Linnet // *Forensic Sci. Int.* – 2010. – V. 196. – P. 85-92.
30. Kim, J. Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC–MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis / J. Kim, D. Ji, S. Kang, M. Park, W. Yang, E. Kim, H. Choi, S. Lee // *J. of Pharm. and Biomed. Anal.* – 2014. – V. 89. – P. 99-105.
31. Strano-Rossi, S. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid / S. Strano-Rossi, L. Anzillotti, E. Castrignano, F. S. Romolo, M. Chiarotti // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1258. – P. 37-42.
32. Castro, A. Quantification of selected synthetic cannabinoids and 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / A. Castro, B. Pineiro, E. Lendoiro, A. Cruz, M. Lypez-Rivadulla // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1295. – P. 99-106.
33. Teske, J. Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum

by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Teske J., Weller J.-P, Fieguth A., Rothämel T., Schulz Y., Tröger H.D. // *J. Chromatogr. B.* – 2010. –V. 878. – P. 2659-2663.

34. Dresen, S. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples / S. Dresen, S. Kneisel, W. Weinmann, R. Zimmermann, V. Auwärter // *J. Mass Spectrom.* – 2011. – V. 46. – P. 63-71.

35. Sauer, C. New designer drugs N-(1-phenylcyclohexyl)-2-ethoxyethanamine (PCEEA) and N-(1-phenylcyclohexyl)-2-methoxyethanamine (PCMEA): Studies on their metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques / Sauer C., Peters F.T., Staack R.F., Fritschi G., Maurer H.H. // *J. Mass Spectrom.* – 2008. – V. 43. – P. 305-316.

36. Fernandez, P. Microwave assisted extraction of drugs of abuse from human urine / P. Fernandez, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Bermejo, A. M. Carro, M. J. Tabernerero // *J. Appl. Toxicol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 373-379.

37. Zhang, Z. Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine / Z. Zhang, C. Zhang, X. Su, [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V. 621. – P. 185-192.

38. Grapp, M. GC–MS analysis of the designer drug  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone and its metabolites in urine and blood in an acute poisoning case / M. Grapp, C. Sauer, C. Vidal, D. Müller // *Forensic Sci. Int.* – 2016. – V. 252. – P. 14-19.

39. Boatto, G. Determination of amphetamine-derived designer drugs in human urine by SPE extraction and capillary electrophoresis with mass spectrometry detection / G. Boatto, M. Nieddu, A. Carta, A. Pau, M. Palomba, B. Asproni, R. Cerri // *J. Chromatogr. B.* – 2005. –V. 814. – P. 93-98.

40. Lai, F.Y. Liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for screening in vitro drug metabolites in humans: investigation on seven

phenethylamine-based designer drugs / F.Y. Lai, C. Erratico, J. Kinyua, J.F. Mueller, A. Covaci, A.L. van Nuijs // *J Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – V. 114. – P. 355-375.

41. Glicksberg, L. Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry / L. Glicksberg, K. Bryand, S. Kerrigan // *J. Chromatogr. B.* – 2016. – V. 1035. – P. 91-103.

42. Adams, K. J. Analysis of isomeric opioids in urine using LC-TIMS-TOF MS / K. J. Adams, C. E. Ramirez, N. F. Smith, A. C. Muñoz-Muñoz, L. Andrade F. Fernandez-Lima // *Talanta.* – 2018. – T. 183. – P. 177-183.

43. Weinmann, W. Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines / W. Weinmann, P. Schaefer, A. Thierauf, A. Schreiber, F.M. Wurst // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2004. – T. 15. – P. 188-193.

44. Stephanson, N. Direct Quantification of Ethylglucuronide in Clinical Urine Samples by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / N. Stephanson, H. Dahl, A. Helander, O. Beck // *Therap. Drug Monitor.* – 2002. – T. 24. – P. 645-651.

45. Dziadosz, M. LC-MS/MS screening strategy for cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, benzodiazepines and methadone in human serum, urine and post-mortem blood as an effective alternative to immunoassay based methods applied in forensic toxicology for preliminary examination / M. Dziadosz, J. Teske, K. Henning, M. Klintschar, F. Nordmeier // *Forensic Chem.* – 2018. – V. 7. – P. 33-37.

46. Grigoryev, A. Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures / Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Moskaleva N., Dzhurko J. // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – V. 879. – P. 1126-1136.

47. Sobolevsky, T.G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine/ T.G. Sobolevsky , I.S. Prasolov, G.M. Rodchenkov // *Forensic Sci. Int.* – 2010. – V. 200. – P. 141-147.

48. Grigoryev, A. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl) methanone (AM-694), a high affinity

cannabimimetic, by gas chromatography – mass spectrometry / Grigoryev A., Melnik A., Kavanagh P. // Drug. Test. Anal. 2012. DOI 10.1002/dta.1336

49. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-РНАСА в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Борисова, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 35. – №9. – С. 131-138.

50. Scheidweiler, K.B. Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxymetabolites in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / K. B. Scheidweiler, M. A. Huestis // J. Chromatogr. A.-2014.-V.1327.-P.-105-117

51. Lovett, D.P. Structure elucidation and identification of a common metabolite for naphthoylindole-based synthetic cannabinoids using LC-TOF and comparison to a synthetic reference standard / D.P. Lovett, E.G. Yanes, T.W. Herbelin, T.A. Knoerzer, J.A. Levisky // Forensic Sci. Int.-2013.-V.226.-P. 81-87.

52. Nieddu, M. LC–MS analysis of trimethoxyamphetamine designer drugs (TMA series) from urine samples / M. Nieddu, G.Boatto, M.Pirisi, E.Azara, M.Marchetti // J. Chromatogr. B. – 2008. – V. 867. – P. 126-130.

53. Dowling, G. A method for CP 47, 497 a synthetic non-traditional cannabinoid in human urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry / Dowling G., Regan L. // J. Chromatogr. B. – 2011. – V. 879. – P. 253-259.

54. Tang, M. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS / M.H.Y. Tang, C.K. Ching, C.Y.W. Lee, Y.-H. Lam, T.W.L. Mak // J. Chromatogr. B. – 2014. DOI 10.1016/dta.19095

55. Meyer, M.R. New cathinone-derived designer drugs 3-bromomethcathinone and 3-fluoromethcathinone: studies on their metabolism in rat urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and their detectability in urine / M. R. Meyer, C. Volmar, A. E. Schwaninger, E. Wolf, H. H. Maurer // J. Mass Spectrom. – 2012. – V. 47. – P. 253-262.



56. Meyer, M.R. Studies on the metabolism of the  $\alpha$ -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and its detectability in urine by GC–MS / M. R. Meyer, P. Du, F. Schuster, H. M. Maurer // *J. Mass. Spectrom.* – 2010. – V. 45. – P. 1426-1442.

57. Pedersen, A.J. In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases / A. J. Pedersen, L. A. Reitzel, S. S. Johansen, K. Linnet // *Drug Test. Anal.* 2012. DOI 10.1002/dta.1369

58. Zhang, Q. Identification of in vitro metabolites of JWH 015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC-MS/MS / Q. Zhang, P. Ma, R. B. Cole, G. Wang // *Anal. Bioanal.Chem.* – 2006. – V. 386. - P. 1345-1355.

59. Kavanagh, P. The Identification of the Urinary Metabolites of 3-(4-Methoxybenzoyl)-1-Pentylindole (RCS-4), a Novel Cannabimimetic, by Gas Chromatography – Mass Spectrometry/ P. Kavanagh, A. Grigoryev, A. Melnik, A. Simonov // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – V. 36. – P. 303-311.

60. Sobolevskii, T.G. Application of Mass Spectrometry to the Structural Identification of the Metabolites of the Synthetic Cannabinoid JWH-018 and the Determination of Them in Human Urine / T. G. Sobolevskii, I. S. Prasolov, G. M. Rodchenkov // *J. Anal. Chem.* – 2011. – V. 66. – № 13. – P. 1314-1323.

61. Springer, D. Metabolism of the new designer drug - pyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of PPP and 4-methylpyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry / D. Springer, G. Fritschi, H.H. Maurer // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – V. 796. – P. 253-266.

62. Sobolevsky T.G. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids / T.G. Sobolevsky, I.S. Prasolov, G.M. Rodchenkov // *Drug Test. Anal.* – 2012. – V. 4. – P. 745-753.

63. Ganzler, K. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography / K. Ganzler, A. Salgo, K. Valko // *J. Chromatogr. A.* – 1986. – V. 371. – P. 299-306.
64. Fernandez, P. Microwave-Assisted Extraction and HPLC-DAD Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma / P. Fernandez, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo, M. J. Tabernero // *J. Appl. Toxicol.* – 2007. – V. 31. – P. 388-393.
65. Development and application of microwave-assisted extraction technique in biological sample preparation for small molecule analysis / C. C. Teo, W. P. K. Chong, Y.S. Ho // *Metabolom.* – 2013. – V. 9. – P. 1109-1128.
66. Порсева, Н. Регламентация, обращения лекарственных препаратов, производных бензодиаземина / Н. Порсева, О. Дворская, А. Солонина // *Современ. проблемы науки и обр.* – 2013. - №3.- С.3-9.
67. Hulme, S. The source and diversion of pharmaceutical drugs for non-medical use: A systematic review and meta-analysis / S. Hulme, D. Bright, S. Nielsen // *Drug Alcohol Depend.* – 2018. – V. 86. – P. 242-256.
68. Manchester, K.R. The emergence of new psychoactive substance (NPS) benzodiazepines: A review / K.R. Manchester, E.C. Lomas, L. Waters, F.C. Dempsey, P.D. Maskell // *Drug. Test. Anal.* – 2018. – V. 10. – P. 37-53.
69. Hsu, R.-Y. Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography - tandem mass spectrometry / R.-Y. Hsu, S.-A. Chan, S.-L. Lin, T.-Y. Lin, W.-L. Chu, M.-R. Fuh // *J. Food Drug Anal.* – 2013. – V. 21. – P. 376-383.
70. Dworkin, R.H. Pregabalin / R.H. Dworkin, P. Kirkpatrick // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2005. – V. 4. – P. 455-456.
71. Bahrami, G. Sensitive high-performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid-liquid extraction and pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate / G. Bahrami, A. Kiani // *J. Chromatogr. B.* – 2006 – V. 835. – P. 123-126.

72. Krivanek, P. Simultaneous isocratic HPLC determination of vigabatrin and gabapentin in human plasma by dansyl derivatization / P. Krivanek, K. Koppatz, K. Turnheim // *Ther Drug Monit.* – 2003. – V. 25. – P. 374-377.
73. Chollet, D.F. Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum / D.F. Chollet, L. Goumaz, C. Juliano, G. Anderegg // *J. Chromatogr. B.* – 2000. – V. 746. – P. 311-314.
74. Noblhs, M. High-performance liquid chromatographic determination of tramadol in human plasma / M. Noblhs, J. Pastera, P. Anzenbacher, D. Svoboda, J. Kopecky, F. Perlfk // *J. Chromatogr. B.* – 1996. – V. 681. – P. 177-183.
75. Tao, Q. Gas chromatographic method using nitrogen-phosphorus detection for the measurement of tramadol and its O-desmethyl metabolite in plasma and brain tissue of mice and rats / Q. Tao, D.J. Stone Jr, M.R. Borenstein, Jean-Bart V, E.E. Codd, T.P. Coogan, Desai-Krieger D, S. Liao, R.B. Raffa // *J Chromatogr. B* – 2001. – V. 763. – P. 165-171.
76. Ho, S.T. Determination of tramadol by capillary gas chromatography with flame ionization detection. Application to human and rabbit pharmacokinetic studies / S.T. Ho, J.J. Wan, W.J. Liaw, C.M. Ho, J.H. Li // *J Chromatogr. B* – 1999. – V. 736. – P. 89-96.
77. Hadidi, K.A. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC-MS / K.A. Hadidi, J.K. Almasad, T. Al-Nsour, S. Abu-Ragheib // *Forensic Sci. Int.* – 2003. – V. 135. – P. 129-136.
78. Sha, Y.F. Rapid determination of tramadol in human plasma by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry / Y.F. Sha, S. Shen, G.L. Duan // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 37. – P. 143-147.
79. Elsing, B. Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its major metabolites in urine after oral administration of racemic tramadol / B. Elsing, G. Blaschke // *J. Chromatogr.* – 1993. – V. 612. – P. 223-230.

80. Mehvar, R. Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of tramadol and its O-demethylated (M1) and N,O-demethylated (M5) metabolites in human plasma / R. Mehvar, K. Elliott, R. Parasrampur, O. Eradiri // *J. Chromatogr. B* – 2007. – V. 852. – P. 152-159.
81. Küçük, A. Investigation of the pharmacokinetics and determination of tramadol in rabbit plasma by a high-performance liquid chromatography-diode array detector method using liquid-liquid extraction / A. Küçük, Y. Kadioğlu, F. Celebi // *J. Chromatogr. B* – 2005. – V. 816. – P. 203-208.
82. Gergov, M Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Gergov, P. Nokua, E. Vuori, I. Ojanperä // *Forensic Sci. Int.* – 2009. – V. 186. – P. 36-43.
83. Gunnar, T. Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/electron impact mass spectrometry / T. Gunnar, K. Ariniemi, P. Lillsunde // *J Mass Spectrom.* – 2005. – V. 186. – P. 36-43.
84. Bergstrand, M.P. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry / M. P. Bergstrand, O. Becka, A. Helander // *Clin. Mass Spectrom.* – 2018. – V. 40. – P. 739-753.
85. Cheze, M. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes / M. Cheze, M. Villain, G. Pepin // *Forensic Sci. Int.* – 2004. – Vol. 145. – P. 123-130.
86. Scott, K.S. A study into the rate of incorporation of eight benzodiazepines into rat hair / K. S. Scott, Y. Nakahara // *Forensic Sci. Int.* – 2003. – Vol. 133. – P. 47-56.
87. Vindenes, V. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers / V. Vindenes, H.M.E. Lund, W. Andresen, H. Gjerde, S.E. Ikdahl, A.S. Christophersen, E.L. Øiestad // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 219. – P. 165-171.

88. Papoutsis, I.I. Development and validation of an EI–GC–MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology / I.I. Papoutsis, S.A. Athanaselis, P.D. Nikolaou, C.M. Pistos, C.A. Spiliopoulou, C.P. Maravelias // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 53.- P. 609-614.
89. Lee, H.H. Simultaneous quantification of urine flunitrazepam, nimetazepam and nitrazepam by using liquid chromatography tandem mass spectrometry / Lee Lee, J.F. Lee, S.Y. Lin, Y.Y. Lin, C.F. Wu, M.T. Wu, B. H. Chen // *Clin. Chim. Acta.*- 2013.- Vol. 420.- P. 134-139.
90. Ming, D.S. A rapid and accurate UPLC-MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine / D.S. Ming, J. Heathcote // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 421-428.
91. Hsu, R.-Y. Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography - tandem mass spectrometry / R.-Y. Hsu, S.-A. Chan, S.-L. Lin, T.-Y. Lin, W.-L. Chu, M.-R. Fuh // *J. Food Drug Anal.* – 2013. – Vol. 21. – P. 376-383.
92. Ishida, T. Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column / T. Ishida, K. Kudo, M. Hayashida, N. Ikeda // *J. Chromatogr. B.* – 2009. – V. 877. – P. 2652-2657.
93. Kinani, S. A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography–tandem mass spectrometry / S. Kinani, S. Bouchonnet, N. Milan, I. Ricordel // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1141. – P. 131-137.
94. Zhou, J. Quantitative analysis of quazepam and its metabolites in human blood, urine, and bile by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / J. Zhou, K. Yamaguchi, Y. Ohno // *Forensic Sci. Int.* – 2014. – V. 241. – P. 95-103.
95. Terada, M. Analysis of quazepam and its metabolites in human urine by gas chromatography–mass spectrometry: Application to a forensic case / M. Terada,

T. Shinozuka, C. Hasegawa, E. Tanaka, M. Hayashida, Y. Ohno, K. Kurosaki // *Forensic Sci. Int.* – 2013. – V. 227. – P. 95-99.

96. Salomone, A. A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest / A. Salomone, E. Gerace, P. Brizio, M. Gennaro, M. Vincenti // *J. of Pharm. and Biomed. Anal.* – 2011. – V. 56. – P. 582-592.

97. Petridesa, A.K. Monitoring opioid and benzodiazepine use and abuse: Is oral fluid or urine the preferred specimen type? / A.K. Petridesa, S.E.F. Melanson, M. Kantartjisa, R.D. Led, C.A. Demetriou, J.G. Flood // *Clin. Chim. Acta.* – 2018. – V. 481. – P. 75-82.

98. Dahl, S. R. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC–MSMS / S. R. Dahl, K. M. Olsen, D. H. Strand // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 885-886. – P. 37-42.

99. Mudiam, M.K. Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometric analysis / M.K. Mudiam, A. Chauhan, R. Jain, R. Ch, G. Fatima, E. Malhotra, R.C. Murthy // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – V. 70. – P. 310-319.

100. Bahrami, G. Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study / G. Bahrami, B. Mohammadi // *J. Chromatogr. B.* – 2006. – V. 837. – P. 24-28.

101. Mercolinia, L. Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma / L. Mercolinia, R. Mandriolia, M. Amoreb, M. A. Raggi // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – V. 53. – P. 62-67.

102. Zhu, Z. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma / Z. Zhu, L. Neirinck // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – V. 779. – P. 307-312.

103. Sagirli, O. Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV–vis detection / O. Sagirli, S. M. Cetin, A. Onal // *J Pharm Biomed Anal.* – 2006. – V. 42. – P. 618-624.
104. El-Sayeda, A.A.Y. Simultaneous determination of tramadol, O-desmethyltramadol and N-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography–mass spectrometry / A.A.Y. El-Sayeda, K. M. Mohamed, A.Y. Nasserc, J. Buttond, D. W. Holt // *J. Chromatogr. B.* – 2013. – V. 926. – P. 9-15.
105. Moore, C. Determination of meperidine, tramadol and oxycodone in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry / C. Moore, S. Rana, C. Coulter // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – V. 850. – P. 370-375.
106. Patel, B. N. An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC–MS/MS / B. N. Patel, N. Sharma, M. Sanyal, P. S. Shrivastav // *J Pharm Biomed Anal.* – 2009. – V. 49. – P. 354-366.
107. Javanbakht, M. On-line clean-up and determination of tramadol in human plasma and urine samples using molecularly imprinted monolithic column coupling with HPLC / M. Javanbakht, M. M. Moein, B. Akbari-adergani // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 911. – P. 49-54.
108. Hadidi, K. A. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC–MS / K. A. Hadidi, J. K. Almasad, T. Al-Nsour, S. Abu-Ragheib // *Forensic Sci. Int.* – 2003. – V. 135. – P. 129-136.
109. Eremeev A., Kalvinsh I., Semenikhina V., Liepinsh E., Latvieti Y., Anderson P., Astapenok E., Spruzh Y., Trapentsiers P., Podoprigora G., Giller S. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium) propionate and method for the preparation and use thereof // US Patent No. 4481218. 06.11.1984.
110. Dambrova, M. Mildronate: Cardioprotective action through carnitine-lowering effect / M. Dambrova, E. Liepinsh, I. Kalvinsh // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2002. – V. 12. – P. 275–279.

111. Thevis, M. Annual banned substance review: Analytical approaches in human sports drug testing / M. Thevis, T. Kuuranne, H. Geyer, W. Schänzer // *Drug Test. Anal.* –2013. –V. 5. –P. 1–19.
112. Cai, L.-J. Determination of Mildronate in Human Plasma and Urine by UPLC–Positive Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry / L.-J. Cai, J. Zhang, W.-X. Peng, R.-H. Zhu, J. Yang, G. Cheng, X.-M. Wang // *Chromatogr.* – 2011. – V. 73. – P. 659–665.
113. Lv, Y.-F. Determination by of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Y.-F. Lv, X. Hu, K.-S. Bi // *J. Chromatogr. B.* –2007. –V. 852. – P. 35–39.
114. Peng, Y. Determination of mildronate by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers / Y. Peng, J. Yang, Z. Wang, J. Wang, Y. Liu, Z. Luo, A. Wen // *J. Chromatogr. B.* –2010. –V. 878. –P. 551–556.
115. Pidpruzhnykov, Y. UPLC-MS/MS method for bioequivalence study of oral drugs of meldonium / Y. Pidpruzhnykov, V. Sabko, V. Iurchenko I. Zupanets // *Biomed. Chromatogr.* –2012. –V. 26. –P. 599–605.
116. Görgens, C. Mildronate (Meldonium) in professional sports – monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography – high resolution/high accuracy mass spectrometry / C. Görgens, S. Guddat, J. Dib, H. Geyer, W. Schänzer, M. Thevis // *Drug Test. Anal.* –2015. –V. 7. –P. 973–976.
117. Arduiani, A. Carnitine in metabolic disease: Potential for pharmacological intervention / A. Arduiani, M. Bonomini, V. Savica, A. Amato, V. Zammit // *Pharmacol Ther.* –2008. –V. 120. –P. 149–56.
118. Gu, Q. Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry / Q. Gu, X. Shi, P. Yin, P. Gao, X. Lu, G. Xu // *Anal. Chim. Acta.* –2008. –V. 609. – P. 192-200
119. Seckin, Z.E. Flow injection fluorescence determination of dopamine using a photo induced electron transfer(PET) boronic acid derivative / Z.E. Seckin, M. Volkan // *Anal. Chim. Acta* – 2005. – V. 574. – P. 104-108



120. Berridge, C.W. Psychostimulants as Cognitive Enhancers: The Prefrontal Cortex, Catecholamines, and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder / C.W. Berridge, D.M. Devilbiss // *Biol Psychiatry*– 2011. – V. 69. – P. 101-111
121. Raggi, M.A. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / M.A. Raggi, C. Sabbioni, G. Casamenti, G. Gerra, N. Calonghi, L. Masotti, // *J. Chromatogr. B.* –1999. –V. 730. –P. 201-211
122. Siren, H. Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis / H. Siren, U. Karjalainen // *J. Chromatogr. A.* –1999. –V. 853. –P. 527-533
123. Volin, P. Determination of free urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *J. Chromatogr. B.* –1994. –V. 655. –P. 121-126
124. Eisenhofer, G. Age at Diagnosis of Pheochromocytoma Differs According to Catecholamine Phenotype and Tumor Location / G. Eisenhofer, H. J. Timmers, J. W.M. Lenders, S. R. Bornstein, O. Tiebel, M. Mannelli, K. S. King, C. D. Vocke, W. M. Linehan, G. Bratslavsky, K. Pacak // *J. Clin Endocrinol Metab.* –2011. –V. 96. –P. 375-384
125. Hubbard, K. E. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection / K.E. Hubbard, A. Wells, T. S. Owens, M. Tagen, C. H. Fraga, C. F. Stewart // *Biomed. Chromatogr.* – 2010. – V. 24. – P. 626-631
126. Parrot, S. A rapid and sensitive method for the analysis of brain monoamine neurotransmitters using ultra-fast liquid chromatography coupled to electrochemical detection / S. Parrot, P.- C. Neuzeret, L. Denoroy // *J. Chromatogr. B.* –2011. –V. 879. –P. 3871-3878
127. Chan, E.C.Y. High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9-

fluorenylmethyloxycarbonyl chloride derivatization / E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.Y. Ho, P.C. Ho // *J. Chromatogr. B.* –2000. –V. 749. –P. 179-189

128. Bourcier, S. Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / S. Bourcier, J.-F. Benoist, F. Clerc, O. Rigal, M. Taghi, Y. Hoppilliard // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2006. – V. 20. – P. 1405-1421

129. Nirogi, R. A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography–tandem mass spectrometry / R. Nirogi, P. Komarneni, V. Kandikere, R. Boggavarapu, G. Bhyrapuneni, V. Benade, S. Gorentla // *J. Chromatogr. B.* – 2013. –V. 913-914. –P. 41-47

130. Nohta, H. High-performance liquid chromatographic determination of urinary catecholamines by direct pre-column fluorescence derivatization with 1,2-diphenylethylenediamine / H. Nohta, A. Mitsui and Y. Ohkura // *J. Chromatogr.* –1986. –V. 380. –P. 229-231.

131. van der Hoorn, F.A.J. Improved measurement of urinary catecholamines by liquid–liquid extraction, derivatization and highperformance liquid chromatography with fluorometric detection // F.A.J. van der Hoorn, F. Boomsma, A.J. Man in't Veld, M.A.D.H. Schalekamp // *J. Chromatogr.* –1991. –V. 563. – P. 348-355.

132. Zhao, H.-X. A rapid method for the determination of dopamine in porcine muscle by pre-column derivatization and HPLC with fluorescence detection / H.-X. Zhao, H. Mun, Y.-H. Bai, H. Yu, Y.-M. Hu // *J. Pharmaceut.* –2011. –V. 1. –P. 208-212.

133. Rosenfeld, J. M. Macroreticular resin xad-2 as a catalyst for the simultaneous extraction derivatization of organic acids from water / J. M. Rosenfeld, M. Mureika-Russell, A. Phatak // *J. Chromatogr. A.* – 1984. –V. 283. –P. 127-135.

134. Campins-Falco, P. Amphetamine and methamphetamine determination in urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with simultaneous sample clean-up and derivatization with 1,2- naphthoquinone 4-sulphonate on solid-

phase cartridges / P. Campins-Falco, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, M. Kohlmann // *J. Chromatogr. B.* 1996. V. 687. P. 239-246.

135. Campins-Falco, P. Derivatization of Amphetamine and Methamphetamine With 1,2-Naphthoquinone 4-Sulfonic Acid Into Solid-phase Extraction Cartridges. Determination of Amphetamine in Pharmaceutical and Urine Samples / P. Campins-Falco, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R.P. Serrano // *Analyst.* 1997. V. 122. P.673-677.

136. Favretto, D. New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the “New Psychoactive Substances” / D. Favretto, J.P. Pascali, F. Tagliaro // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1287. – P. 84-95.

137. Aikawa, K. Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part I / K. Aikawa, T. Miyawaki, T. Hitaka, Y.N. Imai, T. Hara, J. Miyazaki, M. Yamaoka, M. Kusaka, N. Kanzaki, A. Tasaka, M. Shiraishi, S. Yamamoto // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – V. 23. –P. 2568-2578.

138. Saito, T. simultaneous determination of ephedrines, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC–MS / T. Saito, H. Mase, S. Takeichi, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – V. 43. – P. 358.

139. Pizzolato, T. LC-based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine / T. Pizzolato, M. J. de Alda, D. Barcelo // *TrAC Trends in Anal. Chem.* – 2007. – V. 26. – P. 609-624.

140. Dresen, S. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 QTRAP LC-MS/MS system and library searching / S. Dresen, N. Ferreirós, H. Gnann, R. Zimmermann, W. Weinmann // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – V. 396. – P. 2425-2434.

141. Зверева И., Семенистая Е., Кротов Г., Родченков Г. Идентификация допинговых соединений пептидной природы, распространяемых через интернет // *Аналитика.* 2014. Т. № 3. С. 58.

142. Dersen, S. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds / S. Dresen [et al.] // *J. Mass Spectr.* - 2010.- V. 45.-P. 1186-1194.

143. Lindigkeit, R. Spice: a neverendingstory? / R. Lindigkeit, A. Boehme, I. Eiserloh, M. Luebbecke, M. Wiggermann, L. Ernst, T. Beuerle // ForensicSci. Int. – 2009. – V. 191. – P. 58-63.

144. K. Wimmer, S. Screening for illicit drugs on Euro banknotes by LC–MS/MS / K. Wimmer, S. Schneider // Forensic Sci. Int. -2011. -V. 206. -P. 172-177.

145. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). URL: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf> (дата обращения: 11.08.2016).5