



На правах рукописи

Азарян Алиса Андреевна

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

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Краснодар

2019

Работа выполнена на кафедре аналитической химии факультета химии и высоких технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Научный руководитель: **Темердашев Азамат Зауалевич** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник УНПК «Аналит», доцент

Официальные оппоненты: **Шпигун Олег Алексеевич** – чл.-корр. РАН, доктор химических наук, профессор МГУ имени М.В. Ломоносова

Апполонова Светлана Александровна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией фармакокинетики и метаболомного анализа ПМГМУ им. Сеченова

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие «**Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека**»

Защита диссертации состоится «30» мая 2019 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.101.16 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Министерства науки и высшего образования РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

Актуальность работы. 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.

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.

Цель данной 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 соединений;

– 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.

Научная новизна. Разработана аналитическая схема хромато-масс-спектрометрического определения некоторых ксенобиотиков (фенибута, прегабалина, габапентина, α -PVP, 4-МЕС, MDPV, цикломеда, тропикамида,

дифенилпирролидина, атропина и скополамина) в биологической жидкости человека и продуктах спортивного питания, позволяющая проводить экспрессное и высокочувствительное определение аналитов для целей клинической диагностики и допинг-контроля.

Разработана методика ВЭЖХ-МС/МС определения производных катехоламинов в моче человека, включающая дериватизацию исследуемых соединений на патроне для твердофазной экстракции и определение аналитов.

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.

Положения, выносимые на защиту:

- Результаты исследований по определению психоактивных соединений, допинг-агентов и запрещенных ВАДА веществ в образцах спортивного питания и вспомогательных препаратов для спортсменов.

- Аналитическая схема определения некоторых катионов, тропановых алкалоидов и «аптечных» наркотиков в моче, результаты оценки матричных влияний.

- Методика определения мельдония в моче человека.

- Методика определения производных катехоламинов в моче.

Апробация работы. 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.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи, 6 тезисов докладов и получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицу и 19 рисунков, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части и обсуждения результатов, общих выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 145 наименований.

Личный вклад автора состоял в постановке и выполнении автором экспериментальных исследований, интерпретации результатов, написании статей, подготовке докладов и выступлениях на конференциях, практической апробации полученных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования.

Литературный обзор посвящен анализу появления синтетических наркотических средств и психоактивных веществ, их распространению в качестве стимуляторов в профессиональном спорте, а также среди лиц с наркотической зависимостью. Обсуждены и систематизированы методы определения некоторых наркотических средств и психоактивных соединений в различных биологических жидкостях. Рассмотрены основные проблемы аналитического контроля ряда различных ксенобиотиков, включенных в запрещенный список ВАДА, и катехоламинов в биологической жидкости человека. Анализ литературных данных показывает, что основным методом исследования анализируемых объектов является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Показаны основные подходы и проблемы, связанные с подготовкой проб к анализу и задачи инструментального и методического обеспечения для определения некоторых ксенобиотиков в биологических жидкостях человека.

В экспериментальной части указаны объекты исследования, реактивы и материалы, описаны методы и методики проведения анализа, а также результаты проведенных исследований определения некоторых наркотических и психоактивных соединений, допинг-агентов и катехоламинов в биологической жидкости человека

Исследования проводили с использованием стандартных образцов прегабалина ($\geq 75\%$, Pfizer), тропикамида (1%, Promed Exports), циклопентанолата (1%, Promed Exports), аминифенилмасляной кислоты (90%, Jiangxi Xintian Pharmaceutical Co Ltd.) атропина ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) и гидрохлорида скополамина ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich); образцы дифенилпирроллидина ($\geq 90\%$), α -пирролидинвалерофенона ($\geq 90\%$), 4-метилэтилкатинона ($\geq 90\%$) и 3,4-метилendioксипировалерона ($\geq 90\%$) были предоставлены ЭКЦ МВД Краснодарского края. Для разработки методики определения производных катехоламинов использовали стандартные образцы дофамина ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), октопамина ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), адреналина ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich). Дериватизацию катехоламинов проводили с применением 9-флуоренилметоксикарбонил хлорида ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich).

Твердофазную экстракцию аналитов осуществляли на патронах ISOLUTE SCX 100 mg/1 ml (Biotage UK, Великобритания).

Хроматографические исследования проводили с использованием системы ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС), состоящей из тройного квадрупольного масс-спектрометра Thermo TSQ Access Max (San-Jose, USA) с нагреваемым источником электрораспылительной ионизации и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate-3000 с дегазатором, бинарным градиентным насосом, автоматическим дозатором проб и термостата.

Скрининг и идентификация наркотических и психоактивных веществ в продуктах спортивного питания

Спортивное питание и вспомогательные препараты имеют широкое распространение как среди профессиональных спортсменов, так и любителей. Большой популярностью пользуются жиросжигатели, предтренировочные комплексы и прогормоны, реализующиеся под видом биологически активных

добавок, состав которых достаточно сильно отличается у разных производителей и не подлежит сертификации на территории Российской Федерации. Следует отметить, что в составе ряда прогормонов указываются производные анаболических стероидов, запрещенных к обороту на территории Российской Федерации.

В качестве объектов исследования нами использовались 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). Для обеспечения представительной выборки исследуемые образцы изучение проводилось на объектах спортивного питания, приобретенных в период с 2014 по 2016 гг. Широкое разнообразие продуктов спортивного питания и их достаточно быстрая ротация на рынке обусловили необходимость ограничить перечень исследуемых продуктов наиболее популярными на момент исследования наименованиями.

Проведенные исследования показали, что для проведения скрининга подготовка проб к анализу исследуемого образца методом УВЭЖХ достаточно растворения навески в 0.1%-ном растворе муравьиной кислоты в воде или метаноле с получением раствора с концентрацией 100 нг/мл.

Как показали исследования, в состав большинства жиросжигателей и предтренировочных комплексов входят два алкалоида пуринового ряда: кофеин и теобромин, обуславливающие стимулирующий эффект. В ряде жиросжигателей обнаружены также эфедрин и метилсинефрин, входящие в перечень запрещенных препаратов ВАДА. Особо следует отметить, что ни в одном сопроводительном документе на продукт не заявляется напрямую наличие эфедрина, для некоторых объектов был указан «экстракт эфедры» во избежание трудностей в ходе декларирования и ввоза продукции на территорию страны.

При исследовании ряда продуктов спортивного питания и препаратов, реализуемых через интернет-магазины, на соответствие заявленному составу и наличию в них запрещенных препаратов, установлены несоответствия заявленного и фактического составов (в том числе “пустышки”). Во многих продуктах обнаружены продукты, содержащие в своем составе эфедрин,

дегидроэпиандростерон и метилсинефрин, подлежащие контролю со стороны правоохранительных органов и входящие в перечень запрещенных ВАДА препаратов. Факт возможного наличия этих компонентов в изученных материалах отсутствует в сопроводительных документах.

Определение некоторых наркотических соединений в моче

В последние годы существенно выросла популярность новых, так называемых «дизайнерских наркотиков». Некоторые из них впервые получены и описаны еще в конце 60-х годов, активное распространение они получили в 2003–2005 гг., пика популярности достигли в 2008 г., затем наблюдается очередная волна роста популярности «аптечных наркотиков» – веществ, находящихся в открытой продаже и являющихся, по сути, лекарственными препаратами без ярко выраженных психоактивных свойств. В качестве представителя подобных веществ можно привести прегабалин, структурный аналог γ -аминомасляной кислоты, получивший широкое распространение в качестве средства для лечения нейропатических болей, который также активно используется и как психоактивное вещество. Поэтому чрезвычайно важной является задача разработки методики контроля наркотических веществ и такого рода веществ в лекарственных препаратах, используемых не по назначению.

Нами изучена возможность разработки экспрессной и достоверной методики определения в моче часто встречаемых в токсикологической практике веществ (фенибута, прегабалина, габапентина, α -PVP, 4-MEC, MDPV, цикломеда, тропикамида, дифенилпирролидина, атропина и скополамина) методом ВЭЖХ–МС/МС с электрораспылительной ионизацией (ЭРИ) с последующей ее апробацией на реальных образцах, предоставленных химико-токсикологической лабораторией наркологического диспансера.

Для проведения исследований в качестве внутреннего стандарта была выбрана аминофенилмасляная кислота. Как показали наши исследования, даже в случае ее употребления она практически полностью метаболизирует в организме человека, что позволяет избежать возможных наложений и искажений результатов анализа. После проведенных исследований для изучения параметров удерживания аналитов была выбрана аналитическая колонка Phenomenex Kinetex C18 (100мм×

2.1мм, 1.7 мкм) с аналогичной предохранительной колонкой Phenomenex с поверхностно-пористым сорбентом, позволяющая работать с высокой эффективностью и при низких давлениях, по сравнению с традиционными сорбентами для УВЭЖХ. В ходе оптимизации условий градиентного элюирования варьировались следующие параметры: скорость потока; температура термостата; процентное соотношение компонентов подвижной фазы.

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. Наибольшая эффективность разделения достигалась при использовании системы ацетонитрил - 0.1% муравьиная кислота. При этом оптимальная скорость потока составила 0.6 мл/мин, что позволило добиться более узких пиков и, как следствие, более низких пределов детектирования и пределов обнаружения. Условия градиентного элюирования с объемом вводимой пробы 5 мкл приведены в таблице 1. Все определяемые соединения делятся в приведенных условиях.

Таблица 1 – Условия градиентного элюирования наркотических соединений

Время, мин	А (ацетонитрил), %	В (0.1% муравьиная кислота), %	Скорость потока, мл/мин
0.0	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	

Принимая во внимание то, что компоненты биологической матрицы могут элюироваться совместно с определяемыми аналитами, тем самым подавляя или усиливая процесс ионизации, целесообразным представлялось сопоставление источника химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) по сравнению с источником электрораспылительной ионизацией (ИЭР) при

проведении токсикологических скринингов по процедуре «разбавил и вколел», в условиях которой не происходит очистки образцов от матрицы. В ходе оптимизации условий анализа было установлено, что чувствительность определений большинства веществ с использованием источника ХИАД недостаточна, что послужило причиной выбора нагреваемого источника электрораспылительной ионизации (ИЭР) для постановки метода.

Таблица 2 – Оптимальные условия детектирования аналитов методом ВЭЖХ–МС/МС

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 mTorr

Оптимизацию условий детектирования фенибуты, прегабалина, габапентина, α -PVP, 4-MEC, MDPV, цикломеда, тропикамида, дифенилпирролидина, атропина и скополамина проводили в автоматическом режиме, путем напуска вещества в камеру источника.

Все определяемые соединения (рис. 1) были разделены в оптимизированных условиях. При этом на хроматограммах отсутствовали какие-либо пики, имеющие время удерживания, аналогичное аналитам и мешающие их определению, что свидетельствует о том, что выбранные условия отвечают требованиям селективности и эндогенные соединения не оказывают серьезных мешающих влияний. После этого были проанализированы 10 разных бланковых образцов мочи, чтобы убедиться в отсутствии наложений в присутствии эндогенных веществ в анализируемой пробе. Затем были проанализированы 2 образца с внесением в них внутреннего стандарта для его идентификации на хроматограмме и соблюдении интенсивностей пиков продукт-ионов.

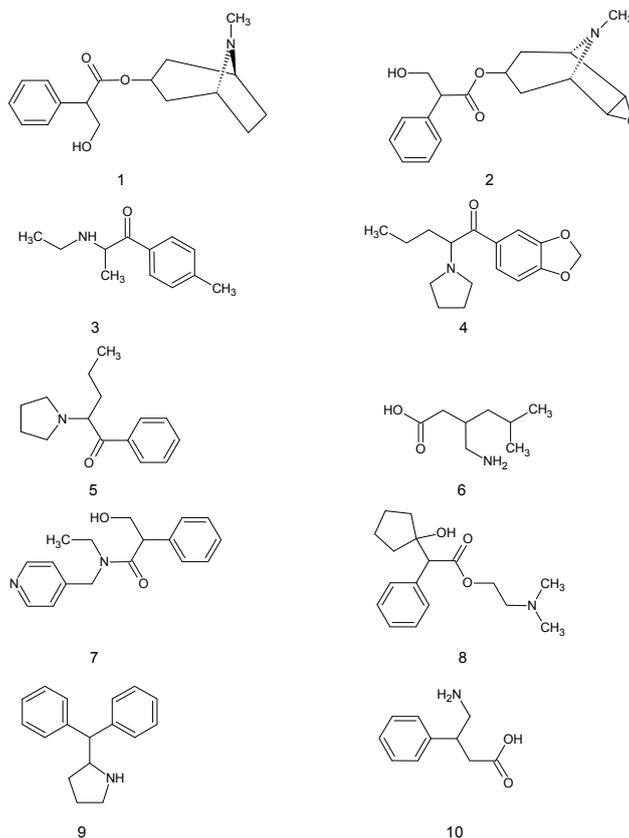


Рисунок 1 – структурные формулы атропина (1); скополамина (2); 4-метилэтилкатинона (3); MDPV (4); α -PVP (5); прегабалина (6); тропикамида (7); циклопентанолата (8); дифенилпирролидина (9); фенибута (10)

Подготовка проб биологических жидкостей осуществлялась двумя способами:

1) *«Разбавил и вколел»*. В эппендорф, объемом 2 мл, вносили 100 мкл анализируемой мочи и 900 мкл смеси ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота (50:50) (v:v), содержащей внутренний стандарт, тщательно перемешивали и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант переносили в стеклянные виалы и анализировали в описанных выше условиях.

2) *Минеральный гидролиз*. В стеклянную пробирку, объемом 5 мл, вносили 1000 мкл пробы мочи и 250 мкл концентрированного раствора соляной кислоты, инкубировали 60 минут при температуре 90 °С, после чего отбирали аликвоту, объемом 1 мл и центрифугировали 10 минут при 10 000 об/мин.

Несмотря на простоту выполнения каждого из выше описанного способа, существует ряд существенных ограничений, не позволяющих выделить один из них. Так, применение процедуры «разбавил и вколел» целесообразно для поиска гидрофильных веществ, способных хотя бы частично выводиться из организма в нативном виде, в то время как метаболиты остаются в форме конъюгатов, что

затрудняет их определение в силу необходимости учета особенностей ионизации и влияния на параметры удерживания наиболее распространенных сульфатных и глюкуронидных форм метаболитов.

В случае применения минерального гидролиза возможно разрушение как метаболитов, так и нативных аналитов из-за достаточно жестких условий среды (рН, температура). Например, при увеличении времени инкубирования наблюдается деградация тропановых алкалоидов, что приводит к искажению результатов. Но при проведении анализа веществ, стабильных в подобных условиях, подобная пробоподготовка может являться удобным и доступным аналогом ферментативного гидролиза ввиду разрушения различного рода конъюгатов.

Рассмотренный способ («разбавил и вколол») был использован для проведения анализа проб, полученных из наркологического диспансера с целью установления наличия и содержания психоактивных веществ. В ходе анализа было установлено, что концентрации аналитов в пробах существенно превышают линейный диапазон калибровочного графика и для их определений целесообразно проведение предварительного разбавления проб до 100 раз (рис. 2 и 3). С одной стороны, чувствительность предложенной методики можно назвать несколько избыточной, однако, в ряде случаев, особенно при проведении токсикологических экспертиз, требуется определение наркотических и психоактивных соединений через несколько дней после совершения правонарушения. В таких случаях требуется применение методики, отвечающей требованиям высокой чувствительности и надежности.

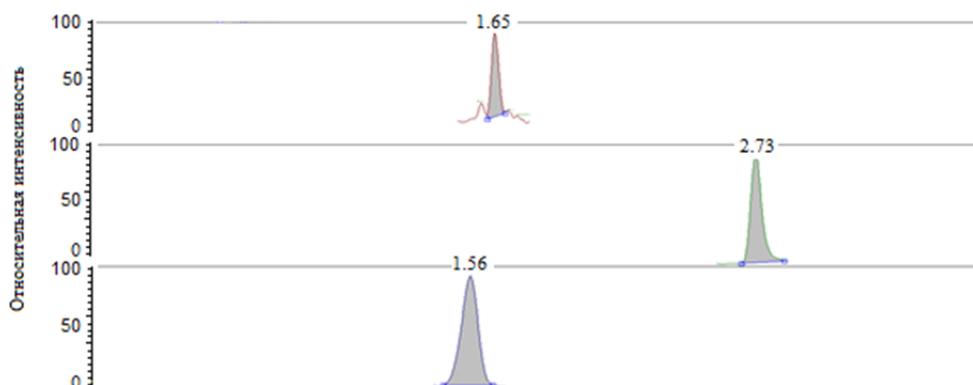


Рисунок 2 – Хроматограмма образца мочи после кислотного гидролиза при разбавлении анализируемого раствора в 20 раз

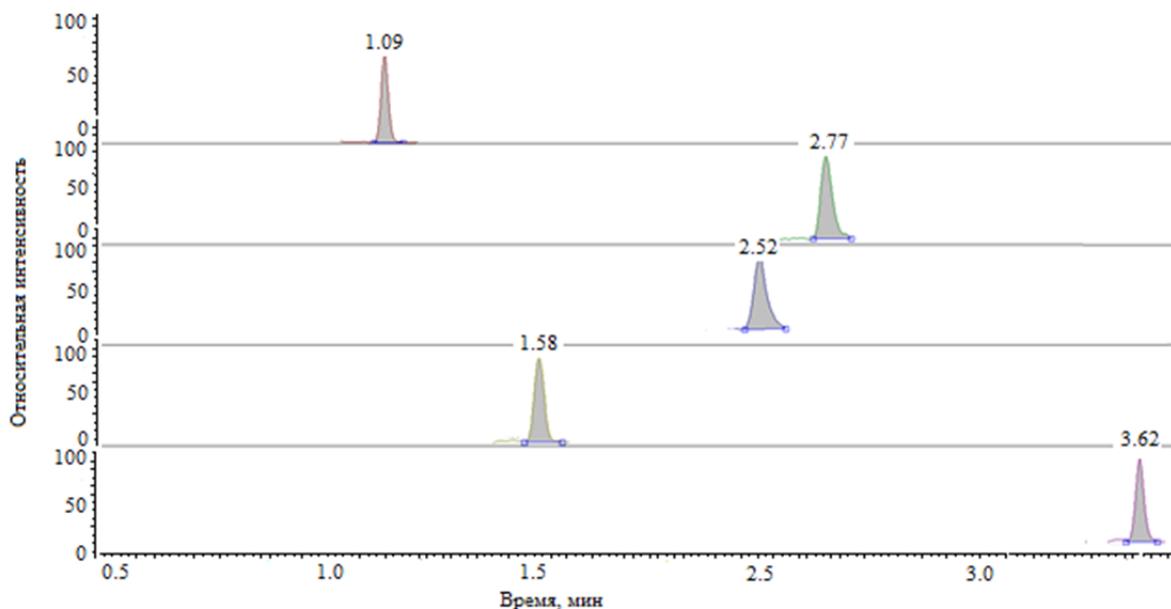


Рисунок 3 – Хроматограмма образца мочи после кислотного гидролиза при разбавлении анализируемого раствора в 100 раз

Модуляторы метаболизма, мельдоний, его определение в режиме гидрофильной хроматографии

По структуре мельдоний является полным аналогом природного γ -бутиробетанина, предшественника карнитина. 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.

С 01.01.2016 г. мельдоний включен в список запрещенных к использованию веществ Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) ввиду сходного с триметазидином воздействия на организм, что обуславливает актуальность разработки способа определения следовых количеств мельдония в моче методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ–МС/МС).

Для хроматографического разделения использовали систему ацетонитрил – 10 мМ раствор ацетата аммония. Наиболее воспроизводимые результаты и лучшая форма пиков достигаются при скорости потока подвижной фазы 0.3 мл/мин и температуре термостата колонок 30 °С. В результате проведенных исследований были оптимизированы условия подготовки проб к анализу: в пробирки Эппендорф

(2 мл) вносили 200 мкл анализируемой мочи и 1800 мкл ацетонитрила, содержащего габапентин, который использовался в качестве внутреннего стандарта, перемешивали, после чего центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Затем 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 ниже 20 нг/мл затруднительно из-за матричных эффектов. Кроме того, происходит существенное загрязнение ионной оптики и трансферного капилляра и уже после 100 вводов пробы требуется их очистка.

При проведении качественного и количественного анализа проб ориентировались на критерии ВАДА, согласно которым времена удерживания аналита и стандартного вещества не должны отличаться более чем на 0.1 мин воспроизводимости абсолютных отношений относительных интенсивностей ионов.

Следует отметить, что ввиду малой молекулярной массы мельдоний имеет только один характеристичный переход, что существенно осложняет обеспечение надежности его определения и требует тщательного подбора условий разделения (табл. 3).

Таблица 3 – Времена удерживания, MRM-переходы и энергии соударений при определении аналитов методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ионизация электрораспылением)

Вещество	Время удерживания, мин	Ион-прекурсор, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	Напряжение на экстрагирующей линзе, В
Мельдоний	6.20	147.1	58.3	32	57
Габапентин	4.35	172.3	137.2	14	75
			95.3	20	
			67.3	28	

Предложенный способ использовали для анализа проб мочи, полученных от добровольцев через 12 и 24 ч после приема мельдония в дозе 500 мг (рис. 4). Как видно из представленных результатов, концентрация мельдония, даже спустя сутки, после однократного употребления достаточно высока. Принимая во

внимание тот факт, что он не метаболизирует и имеет достаточно длительный срок выведения из организма, при курсовом употреблении возможно определение его остаточных концентраций даже спустя несколько месяцев, что особенно актуально в случае проведения исследований в целях допинг-контроля.

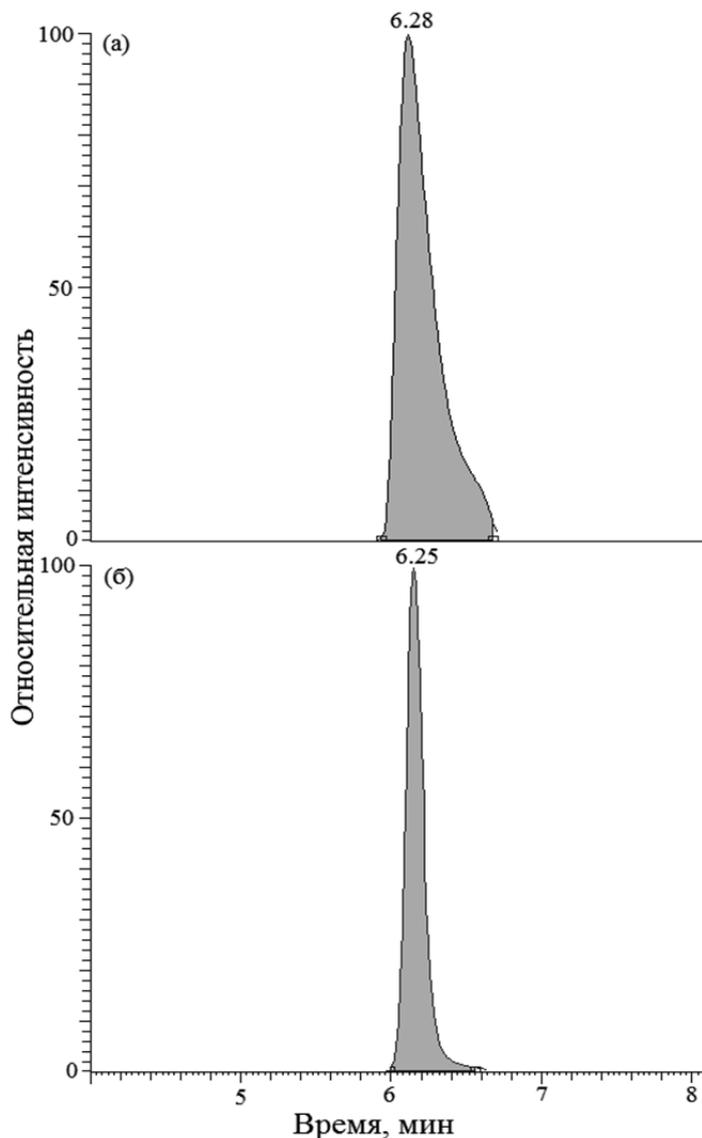


Рисунок 4 – ВЭЖХ-МС/МС-хроматограммы образцов мочи через 12 ч (а) и 24 ч (б) после однократного приема мельдония в дозе 500 мг.

Изучение возможности дериватизации катехоламинов на патронах для твердофазной экстракции

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).

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

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 (рис. 5).

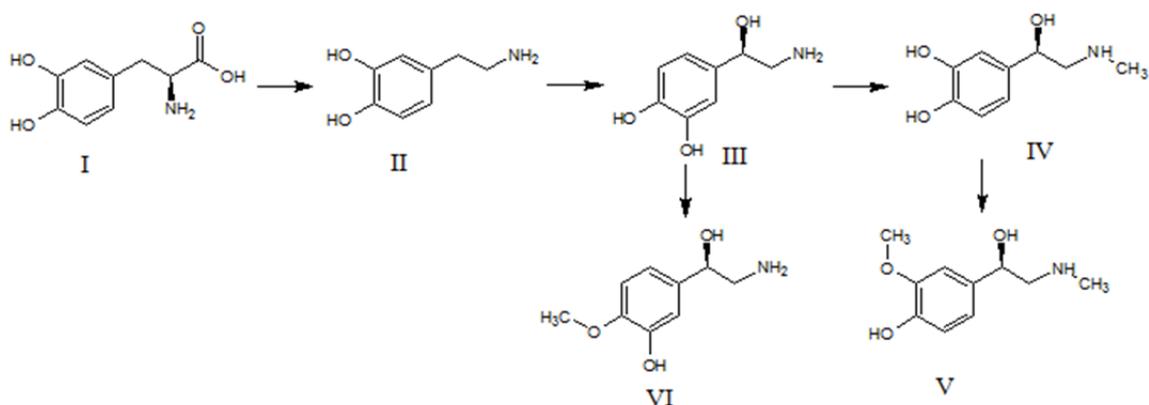


Рисунок 5 – биосинтез катехоламинов – 3,4-дигидроксифенилаланин (I), дофамин (II), норадреналин (III), адреналин (IV), метанефрин (V), норметанефрин (VI)

Для определения катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях чаще всего используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в сочетании с электрохимическим детектированием (ВЭЖХ-ЭД), ВЭЖХ в сочетании с флуориметрическим детектированием и предколоночной дериватизацией, ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Поскольку исследуемые катехоламины являются достаточно полярными соединениями с относительно 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.

Ввиду многокомпонентности биологической матрицы и низких содержаний катехоламинов особой задачей является подготовка пробы к анализу. Для таких систем, как правило, используют подготовку проб, включающую стадии извлечения аналитов из матрицы, их дериватизацию, а также повторную жидкость-жидкостную экстракцию для извлечения дериватизированных форм аналитов. Подобная процедура весьма трудоемка и занимает довольно продолжительное время.

После проведенных исследований нами предложен способ получения производных катехоламинов путем их дериватизации на патроне для твердофазной экстракции (ТФЭ) и последующее их УВЭЖХ-МС/МС определение в моче человека.

Для количественного определения производных катехоламинов в моче необходимо минимизировать влияние мешающих компонентов матрицы. Для этого изучалась возможность проведения процедуры дериватизации на патроне для твердофазной экстракции. Из литературных данных известно, что для сорбции аминов и отдельных представителей катехоламинов могут быть использованы сильные катионообменные сорбенты. Принимая во внимание особенности анализируемой матрицы, интерес представляла, в первую очередь, возможность предварительной очистки пробы. Для данного вида проб подходящее использование патронов для ТФЭ ISOLUTE SCX, позволяющих проводить экстракцию соединений и водных и водно-органических растворов. На используемый патрон происходила загрузка пробы мочи, его промывка 1 мл раствора 1% муравьиной кислоты в воде и 1 мл метанола, после чего пропускали 500 мкл боратного буфера (рН 9.5) и 500 мкл дериватирующего агента (9-флуоренил-метоксикарбонил хлорида), затем патрон выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут. Т.к. образующиеся дериваты имеют меньшее сродство к сорбенту, представляется возможным их полное извлечение при элюировании 5% раствором ацетата аммония в метаноле.

Оценка точности анализа проводилась путем приготовления нескольких растворов контроля качества (QC) с низкой, средней и высокой концентрациями; каждый раствор QC анализировали в течение одного дня по 3 раз. Правильность результатов в разные дни также контролировали путем анализа QC. Концентрации

аналитов находили по градуировочным графикам, полученным в день анализа. Результат признавали удовлетворительным, если погрешность определения компонента не превышала 15% (табл. 4, 5).

Таблица 4 – Аналитические характеристики определения аналитов в моче

Производные катехоламинов	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Диапазон линейности, нг/мл	Эффективность дериватизации, %
9-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

Таблица 5 – 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

Пределы обнаружения аналитов устанавливали экспериментально путем снижения концентрации стандартных растворов, пока соотношение сигнал/шум не составит 3:1 при концентрации нг/мл. Нижние границы определяемых концентраций аналитов устанавливали также экспериментально и они составили для: 9-флуоренил-метоксикарбонил адреналина - 2.5, 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамина - 5 нг, 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамина - 25 нг/мл.

Разработанный способ был использован для выполнения анализа проб, полученных от добровольцев с целью установления содержания производных катехоламинов в режиме обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (рис. 6). Концентрации

соединений составили для: адреналина - 65 ± 10 , дофамина - 258 ± 38 , октопамина - 73 ± 11 нг/мл.

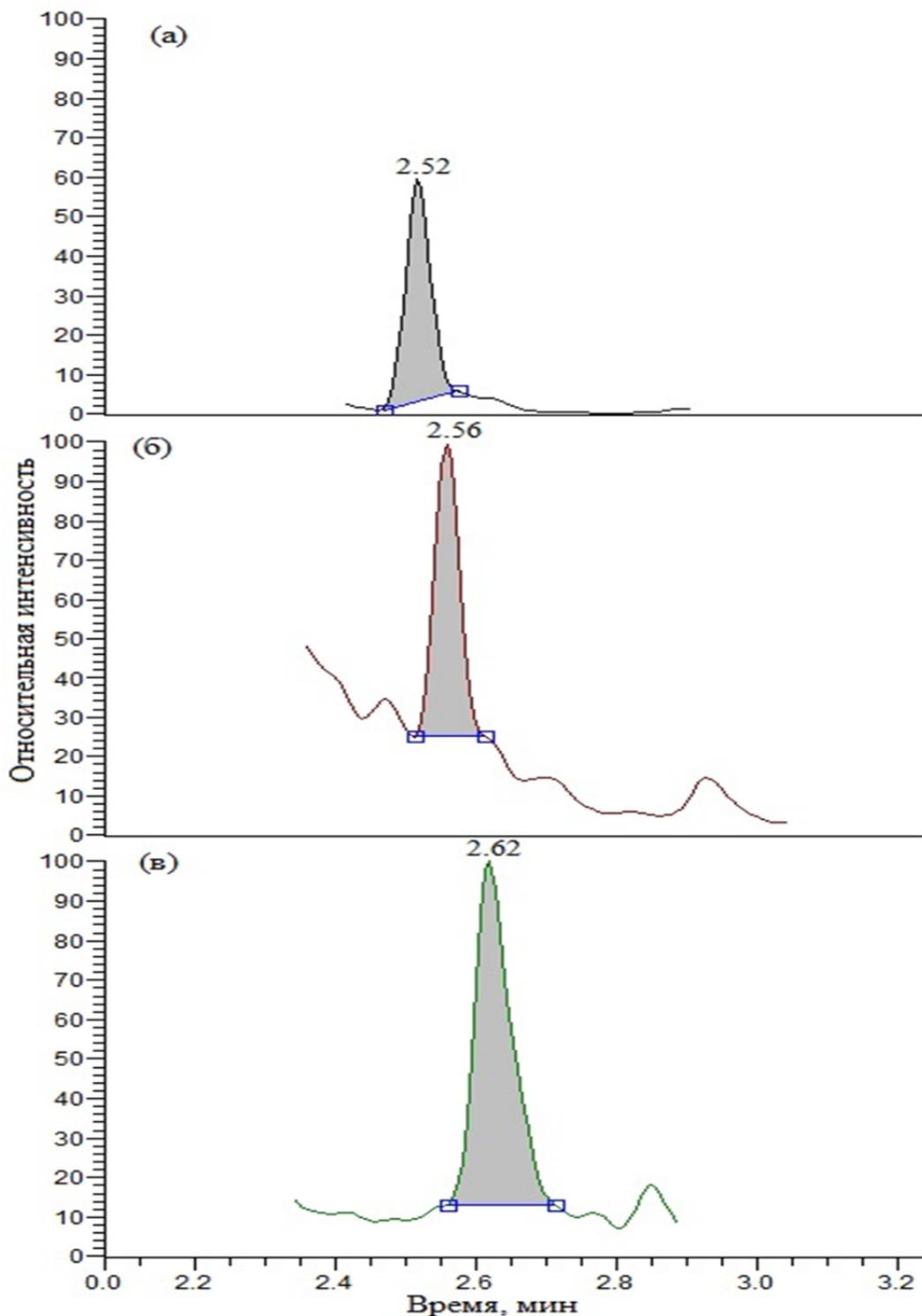


Рисунок 6 – Хроматограммы проб мочи добровольцев: (а) – 9-флуоренил-метоксикарбонил октопамин, (б) – 9-флуоренил-метоксикарбонил дофамин, (в) – 9-флуоренил-метоксикарбонил адреналин

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.

Основное содержание диссертационного исследования опубликованы в:

1. Azaryan, A. LC–MS/MS determination of catecholamines in urine using FMOC-Cl derivatization on solid-phase extraction cartridge / A. Azaryan, T. Ligor, B. Buszewski, A. Temerdashev, E. Dmitrieva, E. Gashimova // *Chromatographia*. – 2018. – V. 81. – № 11. – P. 1487–1494.

2. Пат. 2639475 Российская Федерация, МПК G01N 30/72. Способ определения мельдония в моче человека / Азарян, А.А., Темердашев А.З., Киселева, Н.В.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО "КубГУ" - № 2017112225; заявл. 10.04.17, опубл. 21.12.2017. Бюл. №36.

3. Темердашев, А.З. Применение методов хромато-масс-спектрометрии для контроля спортивного питания и препаратов, реализующихся через интернет / А.З. Темердашев, А.А. Азарян, А.В. Лабутин, М.А. Дикунец, И.О. Зверева, И.И. Подольский, Г.Т. Беродзе, И.А. Балабаев // *Журн. аналит. химии*. – 2017. – Т. 72. – № 11. – С. 1032.

4. Азарян, А.А. Определение мельдония в моче человека методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева // *Журн. аналит. химии*. – 2017. – Т. 72. – № 10. – С. 885.

5. Азарян, А.А. Определение некоторых катионов, тропановых алкалоидов и «аптечных наркотиков» в моче / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Светличная, А.Г. Кальницкий, И.А. Балабаев // *Журн. аналит. химии*. – 2016. – Т. 71. – № 9. – С. 995.

6. Азарян, А.А. Дериватизация катехоламинов на патроне для твердофазной экстракции / А.А. Азарян, А.З.Темердашев, Е.В. Дмитриева, Э.М. Гашимова // *Материалы V Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием*. 2018. – С.135.

7. Азарян, А.А. Изучение возможности применения предколоночной дериватизации для ОФ-ВЭЖХ/МС/МС определения мельдония в моче /А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева, Э.М. Гашимова // *Материалы III Съезда аналитиков России*. 2017. – С.190.

8. Азарян, А.А. ВЭЖХ-МС/МС определение мельдония в моче /А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева, Н.В. Киселева // *Материалы III Всероссийской*

конференции по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу с международным участием. 2017. – С. 60.

9. Азарян, А.А. Определение некоторых селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Светличная, А.Г. Кальницкий // Материалы XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. 2016. – Т. 4. – С.386.

10. Азарян, А.А. Определение некоторых наркотических средств в волосах / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Светличная, И.А. Балабаев // Материалы II Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием. 2015. – С.231.

11. Азарян, А.А. Определение некоторых стимуляторов в биологических жидкостях / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Н.В. Киселева, Е.В. Светличная // Разделение и концентрирование в аналитической химии. Материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием. 2014. – С. 292.

Автореферат

Азарян Алиса Андреевна

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

Подписано в печать 27.03.2019 г. Формат 60x84¹/₁₆.

Бум. тип. № 1. Усл. печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ № 3705.2

Издательско-полиграфический центр
Кубанского государственного университета
350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149.