

На правах рукописи



Темердашев Азамат Зауалевич

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ
ТОКСИКОЛОГИИ И ДОПИНГ-КОНТРОЛЕ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Краснодар
2021

Работа выполнена на факультете химии и высоких технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Официальные оппоненты: Шпигун Олег Алексеевич –

чл.- корр. РАН, доктор химических наук,
профессор МГУ имени М.В. Ломоносова

Савчук Сергей Александрович –

доктор химических наук, судебный эксперт
отделения судебно-химической экспертизы
ФГКУ «111 Главный государственный центр
Судебно-медицинских и криминалистических
экспертиз» Минобороны России

Карцова Людмила Алексеевна –

доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»,
профессор кафедры органической химии

Ведущая организация:

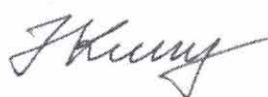
Федеральное государственное унитарное
предприятие "Научно-исследовательский
институт гигиены, профпатологии и экологии
человека" Федерального медико-биологического
агентства

Защита диссертации состоится 24 июня 2021 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. 30301

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной
библиотеке ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет", на сайтах
ВАК Минобрнауки РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБОУ ВО "Кубанский
государственный университет" <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан «13» апреля 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

Актуальность работы. Психоактивные, сильнодействующие и наркотические вещества были известны с глубокой древности и их использовали в лекарственных и иных целях. С начала 60-х гг. наблюдается рост активности исследований в области синтеза новых соединений, отсутствующих в природе, но имеющих некоторое структурное подобие нейромедиаторам и природным психоактивным соединениям. Вне зависимости от степени воздействия на организм, большинство соединений, относящихся к природным и синтетическим наркотикам, а также психоактивным веществам, опасные и подлежат контролю.

В период с 2008 по 2016 гг. стремительно выросла популярность синтетических наркотических средств, так называемых «дизайнерских наркотиков». Это было обусловлено их доступностью и легальностью на момент распространения, что позволило им быстро выйти на уровень уже известных наркотических средств и даже превзойти их. Известные под названиями «Спайс», «соли» и «удобрения» они продавались через интернет и магазины, реализующие табачную продукцию, и даже в мини-маркетах на заправочных станциях.

С 2000-х годов подавляющее большинство исследований, посвященных вопросам аналитической токсикологии, допинг-контроля и криминалистики, решаются методами хроматомасс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии. Наиболее распространенным методом определения наркотических и психоактивных средств в различных средах, на сегодняшний день, является газовая хроматомасс-спектрометрия. Данный метод имеет ряд существенных ограничений, не позволяющих проводить исследования новых сильнодействующих веществ и допинг-агентов, делая, таким образом, актуальным комбинирование методов жидкостной и газовой хроматомасс-спектрометрии с новыми методами пробоподготовки для проведения исследования различных объектов. Развитие методов хроматомасс-спектрометрии привело к возникновению и распространению целого ряда направлений, наиболее перспективным из которых является развитие масс-спектрометрии высокого разрешения.

Существует большое количество нормативных документов и научных публикаций, посвященных выделению и определению действующих веществ в растительном сырье и лекарственных формах. С другой стороны, актуальным представляется создание методологии комплексного подхода к анализу наркотических, психоактивных веществ и современных допинг - агентов для решения задач криминалистики, аналитической токсикологии и допинг-контроля. Учитывая, что большинство современных наркотических соединений успешно применяются в качестве допинг-агентов (стимуляторы, анаболики и

др.), методология комплексного подхода должна отвечать не только требованию скрининга широкого круга известных веществ, но и использоваться при проведении исследований по типу поиска «неизвестного в частично известном» или «неизвестного в неизвестном» с достаточно высокой вероятностью и чувствительностью. Такая методология может быть использована и в допинг-контроле, а также при изучении метаболизма новых ксенобиотиков.

Диссертационное исследование выполнялось в рамках реализации проектов Госзаданий Минобрнауки РФ (№ 4.873.2014/К и № 4.2612.2017/ПЧ) и РФФИ (15-03-02453 А, 14-03-31015 мол_а и 18-33-20009 мол_а_вед) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

Целями диссертационного исследования являлись:

1. Разработка методологии комплексного анализа объектов биологического, растительного и синтетического происхождения с целью выявления и определения наркотических и психоактивных средств, а также их метаболитов.

2. Обоснование и реализация методов целевого и нецелевого скрининга, новых подходов пробоподготовки и мониторинга при изучении стероидного и катехоламинового профиля, метаболизма новых ксенобиотиков в организме человека.

3. Разработка подходов к анализу наркотических средств природного и синтетического происхождения в биологических жидкостях человека с использованием подходов целевого и нецелевого скрининга

Для достижения поставленных целей решались следующие **задачи:**

1. Возможности и ограничения методологии нецелевого скрининга в аналитической токсикологии и проведении исследований метаболизма новых ксенобиотиков;

2. Оценка возможности применения методологии нецелевого скрининга для контроля качества спортивного питания, биологически активных добавок и продуктов питания;

3. Применение твердофазной аналитической дериватизации при разработке пробоподготовки биологических жидкостей;

4. Возможности дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для извлечения веществ различных классов соединений на примере селективных модуляторов андрогенных рецепторов и стероидов;

5. Изучение проблем идентификации основных классов наркотических, психоактивных средств и новых допинг-агентов, а также подходов их определения в различных объектах;

6. Анализ подходов и решений скрининга и количественного определения наркотических средств, оптимизация условий пробоподготовки при их определении, изучение матричных эффектов.

Научная новизна диссертационного исследования:

Разработан комплексный подход целевого и нецелевого скрининга различных ксенобиотиков с использованием методов газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии, включая жидкостную хроматомасс-спектрометрию высокого разрешения.

Предложена методология полного цикла анализа образцов - от нативных веществ, их смесей, растворов, средств и препаратов на их основе, растительных материалов до их обнаружения в биологических жидкостях в нативном виде и форме метаболитов.

Предложена аналитическая схема определения 52 наиболее распространенных наркотических и психоактивных средств природного и синтетического происхождения (тропановые, опиинные алкалоиды, α -аминоарилкетоны, а также ряд производных N-алкилиндолилкетонов, N-алкилиндазолилкетонов) в различных объектах, включающая скрининг, идентификацию и определение аналитов хроматографическими методами.

Для всех изученных наркотических соединений выявлены минимум два MRM-перехода при их исследовании методом УВЭЖХ-МС/МС, которые, в совокупности с установленными индексами удерживания и основными характеристичными ионами их ГХ-МС определения, позволяют проводить достоверное обнаружение следовых количеств аналитов.

Изучены возможности различных вариантов нецелевого скрининга при изучении метаболизма ксенобиотиков, а также для целей аналитической токсикологии. Изучены особенности пробоподготовки мочи и спортивного питания методами дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции и твердофазной аналитической дериватизации.

Выявлены и идентифицированы представители новых классов допинг-агентов: релизинг-пептидов гормона роста, селективных модуляторов андрогенных рецепторов, некоторых стимуляторов и наркотических веществ. Показана возможность унификации методик скрининга широкого спектра допинг-агентов – анаболических стероидов, глюкокортикостероидов, селективных модуляторов андрогенных рецепторов и их метаболитов, наркотиков и стимуляторов.

Практическая значимость. Разработаны методики скрининга и определения некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения, включая новые, «дизайнерские» катионы и синтетические каннабиноиды, отвечающие требованиям экспрессности, точности и надежности. Разработанные методики используются в экспертно-криминалистическом центре Главного управления МВД России по Краснодарскому краю и бюро судебно-медицинской экспертизы г. Краснодара.

Разработанная методика определения мельдония в моче с использованием УВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией в режиме гидрофильной хроматографии валидирована, метрологически аттестована (МИ 02067847.02-2017 "Определение мельдония в моче человека. Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием") и внесена в Федеральный реестр аттестованных методик (методы) измерений ФР.1.31.2018.29251.

Методика определения мельдония в молоке использовалась для проведения исследования в рамках урегулирования спора с РУСАДА в целях демонстрации возможности контаминации продуктов питания запрещенными веществами. Исследование выполнено в рамках обращения юридической группы «КлеверКонсалт».

Показана возможность применения скрининга некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях для химико-токсикологических и антидопинговых лабораторий.

Предложена методика определения некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты обоснования методологии твердофазной аналитической дериватизации для определения катехоламинов;
2. Методика определения стероидных гормонов с использованием метода дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции;
3. Методологический подход к изучению метаболизма ксенобиотиков;
4. Результаты исследования образцов спортивного питания для выявления в них запрещенных ВАДА веществ и идентификации новых допинг-агентов;
5. Методика определения мельдония в продуктах питания и биологических жидкостях;

6. Результаты исследований по экстракции, концентрированию и определению опийных алкалоидов в образцах мака пищевого методом ВЭЖХ-ДМД.

7. Результаты оптимизации условий подготовки проб, концентрирования и определения тропановых алкалоидов в образцах дурмана индийского методами ВЭЖХ-ДМД, ВЭЖХ-МС и ГХ-МС.

8. Методики скрининга и определения некоторых наркотических и психоактивных веществ природного и синтетического происхождения в растительных объектах и лекарственных формах методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС;

9. Методика определения некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях, результаты оценки матричных влияний.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность сформулированных научных положений, полученных результатов и выводов к работе обеспечена использованием современных методов исследования и научного оборудования для хроматографических и масс-спектрометрических измерений, высокой степенью корреляции полученных экспериментальных результатов с теоретически ожидаемыми и независимыми методами исследования, согласованностью с литературными данными. Разработанные методики определения наркотических, психоактивных веществ и допинг-агентов в растительном сырье, лекарственных препаратах и биологических жидкостях отвечают требованиям всемирного антидопингового агентства (ВАДА).

Апробация работы. Результаты диссертационной работы обсуждались на II съезде аналитиков России с международным участием (Москва, 2013 г.), III Всероссийской конференции «Аналитика России» с международным участием (Краснодар, 2009 г.), I–IV Всероссийских конференциях «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (Краснодар, 2010, 2013, 2017 и 2020 г.г.), XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Волгоград, 2011 г.), III–V Всероссийских симпозиумах «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2011, 2014, 2018 г.г.), Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012 г.), I–III Всероссийских конференциях по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2012, 2015 и 2019 г.г.), международной конференции «IMA 2013-Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications» (Салоники, Греция, 2013 г.), международной конференции «25th

International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2019)» (Торунь, Польша, 2019 г.),

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 25 статей, получены 4 патента РФ на изобретение, опубликована глава в учебнике.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 375 страницах машинописного текста, содержит 80 таблиц и 78 рисунков, состоит из введения, литературного обзора, 14 глав экспериментальной части, общих выводов, списка цитируемой литературы из 621 наименования и 4 приложений.

Личный вклад автора состоял в постановке и выполнении теоретических и экспериментальных исследований, интерпретации данных, написании статей, подготовке докладов и выступлениях на конференциях, практической апробации полученных результатов, обосновании и реализации методологии комплексного подхода целевого и нецелевого скрининга различных ксенобиотиков с использованием хроматографических методов. Работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, отвечали целям и задачам исследования, а анализ и систематизация полученных экспериментальных данных способствовали достижению поставленным целям диссертационного исследования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Реактивы и оборудование

Для идентификации тропановых алкалоидов использовали стандартные образцы атропина ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) и скополамина ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich). Образцы морфина и кодеина были предоставлены из коллекции регионального управления ФСКН России по Краснодарскому краю. Дериватизацию проб проводили силилирующими агентами BSTFA и MSTFA. Идентификацию фенольных соединений проводили с применением стандартных образцов ванилиновой, кофейной, транс-феруловой, 4-гидроксibenзойной, кумаровой кислот и ванилина. Стандартные образцы наркотических средств (чистота $\geq 90\%$) были предоставлены экспертно-криминалистическим центром (ЭКЦ) МВД Краснодарского края. Образцы селективных модуляторов андрогенных рецепторов были предоставлены Shanghai Soyoung Biotech. Inc (Китай), пептидного допинга – Bioorganika (Китай).

Исследования проводили с использованием приборного парка ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ»: газового хроматографа Shimadzu GC-2010 с пламенно-ионизационным детектором, газового хромато-

масс-спектрометра Shimadzu GC-2010 с квадрупольным масс-спектрометром Shimadzu QP-2010 Ultra, жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD-20MA и масс-спектрометрическим детектором Shimadzu LCMS-2010EV. Для проведения скрининга с использованием быстрой газовой хроматографии использовали газовый хроматомасс-спектрометр Thermo Trace-1310 с тройным квадрупольным масс-спектрометром Thermo TSQ Quantum XLS и системой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии Dionex Ultimate-3000 с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum Access Max. Нецелевой скрининг проводили с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Agilent 6540, соединенного с жидкостным хроматографом Agilent 1290 и УВЭЖХ-МСВР системы, состоящей из жидкостного хроматографа Bruker Elute и квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker MaXis Impact. Экспериментальные исследования по нецелевому скринингу маркеров употребления синтетических каннабиноидов проводили на базе химико-токсикологической лаборатории (ХТЛ) наркодиспансера г. Томск.

Интерпретацию масс-спектров проводили с использованием библиотек масс-спектров Nist'08, Nist'11 и путем сопоставления параметров удерживания аналитов и стандартных веществ.

Объекты исследования: семена мака пищевого и спортивного питания, приобретенные в розничной торговой сети; продукты питания, приобретенные на фермерской ярмарке, дурман индийский, собранный на территории г. Краснодара; образцы курительных смесей, «солей для ванн» и «удобрений», предоставленные ЭКЦ МВД Краснодарского края и региональным управлением ФСКН России по Краснодарскому краю. Образцы биологических жидкостей предоставлялись ХТЛ наркодиспансера г. Краснодара.

Во введении обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования.

В обзоре литературы проведен анализ основных классов наркотических средств природного и синтетического происхождения, приведена их классификация. Обсуждаются проблемы идентификации и определения наркотических веществ в растительном сырье и биологических объектах, а также лекарственных формах. Анализируются аналитические аспекты определения фармацевтических препаратов, употребляемых в немедицинских целях, в моче, плазме и крови. Рассмотрены особенности определения как нативных селективных модуляторов андрогенных рецепторов, так и их метаболитов для целей допинг-контроля. Изучены состояние и аспекты определения стероидов и катехоламинов в биологических жидкостях человека. Рассмотрены особенности

применения методологии нецелевого скрининга, в том числе для аналитической токсикологии. Анализ методов исследования анализируемых объектов показал, что, на сегодняшний день, основными методами определения наркотических и психоактивных средств в различных объектах являются методы газовой, жидкостной хроматографии и хроматомасс-спектрометрии. Отмечена постоянно возрастающая роль масс-спектрометрии высокого разрешения для целей целевого и нецелевого скрининга.

В экспериментальной части и обсуждении результатов описаны объекты исследования, реактивы и материалы, основное и вспомогательное научное оборудование, методы и методики анализа. Приводятся результаты исследований, посвященные целевому и нецелевому скринингу ксенобиотиков в биологических жидкостях человека, аспектам применения твелофазной аналитической дериватизации катехоламинов и применению дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции при определении стероидных гормонов. Рассмотрены проблемы и подходы к анализу растительного сырья хроматографическими методами анализа. Изучены проблемы спортивной пищевой безопасности при использовании и потреблении продуктов спортивного питания, вспомогательных препаратов, биологически активных добавок, а также обычных пищевых продуктов, которые могут быть приобретены в розничных сетях и фермерских ярмарках.

Определение наркотических и психоактивных веществ в растительном сырье

Природные наркотические и психоактивные вещества – опийные и тропановые алкалоиды, триптамины и фенилэтиламины, практически все они широко используются в медицинских и иных целях. Каждый тип этих соединений по-своему воздействует на определенные типы рецепторов в организме человека, все они являются психоактивными и наркотическими соединениями.

Основным источником наркотических алкалоидов опия является опий-сырец, который представляет собой свернувшийся млечный сок растения мака масличного, попадающего на семена при обмолоте, который производится в стадии технической зрелости мака. Большая часть млечного сока остается в маковой соломе, но он также попадает на поверхность семян и остается на них в виде наслоений. При определении опийных алкалоидов на семенах мака известные схемы извлечения включают трудоемкие, длительные, многократные

стадии экстракции и рекстракции анализов и дальнейшее их определение методом ВЭЖХ.

Для определения опиоидных алкалоидов на семенах мака пищевого методом ВЭЖХ проводили исследования по оптимизации подготовки проб и выбора состава экстрагента для проведения анализа. Была разработана оригинальная аналитическая схема определения низких содержаний опиоидных алкалоидов на семенах мака масличного пищевого. На рис. 1 приведена хроматограмма экстракта семян мака, полученная в ходе оптимизации состава экстрагента. Наилучший результат достигается при использовании экстрагента состава вода:ацетонитрил:о-фосфорная кислота в соотношении 40:10:0.05 мл. Определение анализов проводилось методом ВЭЖХ-ДМД. Т.к. морфин и кодеин слабо удерживаются, было принято решение использовать ион-парный реагент (додecilсульфат натрия), который позволил добиться большей эффективности разделения на используемой аналитической колонке Separon SGX C18 (75 × 2.1, 5 мкм). Несмотря на то, что реагент считается динамическим модификатором подвижной фазы, в дальнейшем его достаточно сложно полностью удалить с сорбента.

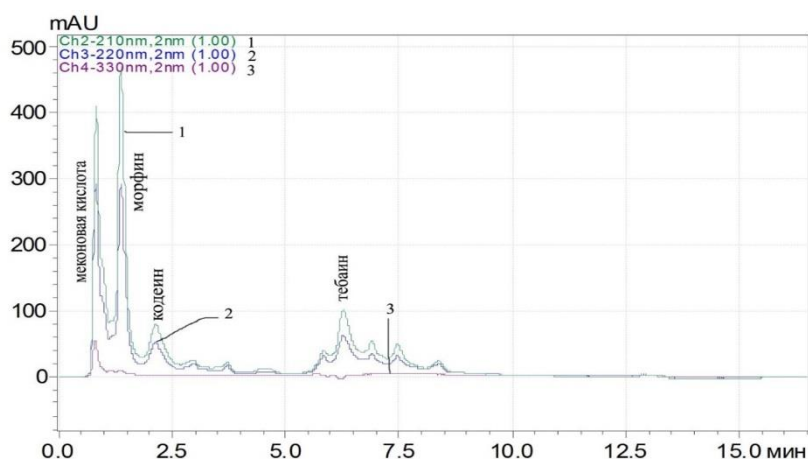


Рисунок 1 – Хроматограмма экстракта семян мака

В качестве подтверждающего метода идентификации использовали ГХ-МС, для этого вводили дополнительные стадии пробоподготовки – защелачивание экстракта и его упаривание до сухого остатка с дальнейшим перерастворением анализа в хлороформе, что неминуемо приводило к определенным потерям. Идентификацию веществ в полученных пробах осуществляли с использованием параметров удерживания (путем сравнения их с параметрами удерживания стандартных образцов) и библиотечного поиска (ГХ-МС). Предложенная схема позволяла проводить достаточно точное и экспрессное определение опиатов, но, в дальнейшем, было принято решение

изменить не только подготовку проб, но и условия детектирования с целью расширения круга определяемых соединений.

При проведении исследований дурмана индийского, содержащего тропановые алкалоиды (атропин и скополамин), были рассмотрены несколько вариантов пробоподготовки с целью оптимизации условий их извлечения и определения аналитов. Состав экстрагента оптимизировали по эффективности извлечения тропановых алкалоидов путем перевода их в органическую фазу с последующей реэкстракцией в водную среду или экстракцией аналитов подкисленными солянокислыми водными и водноспиртовыми растворами. При этом учитывали тот факт, что атропин и скополамин, представляющие наибольший интерес для медицинских целей, являются эфирами, а нагревание экстракта выше 60 °С вызывает их гидролиз. При проведении экстракции алкалоидов с использованием стандартизированного метода возможны потери аналитов за счет стадии реэкстракции, поэтому наибольший интерес представляла экстракция 0.1 М раствором соляной кислоты. Оптимизацию проводили путем варьирования условий извлечения: при встряхивании, под действием ультразвука, нагреве на водяной бане при 60 °С. В ходе экспериментов установили, что наибольшая степень извлечения алкалоидов обеспечивается при нагреве и введении этанола в состав экстрагента (рис. 2), а полнота экстракции обеспечивается при использовании смеси 0.1 М соляной кислоты и спирта (70%) в соотношении 1:1 (v:v).

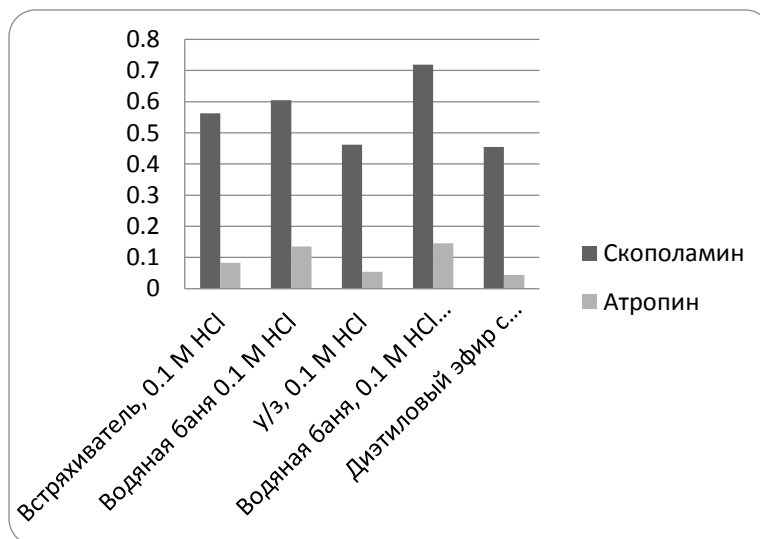


Рисунок 2 – Сравнительная оценка эффективности извлечения алкалоидов при различных условиях пробоподготовки (30 мин) и по фармакопейной методике

Количественное определение тропановых алкалоидов проводили с использованием ВЭЖХ-ДМД ввиду их большой концентрации в конечном экстракте.

При оптимизации условий детектирования и извлечения алкалоидов было также отмечено, что количество соэкстрактивных необратимо сорбирующихся веществ очень велико, что приводит к резкому ухудшению эффективности их разделения. После 20 вколов эффективность разделения пиков существенно ухудшается (число теоретических тарелок уменьшается на 15%), а через 30 вколов – разделение аналитов в используемых условиях не происходит (рис. 3).

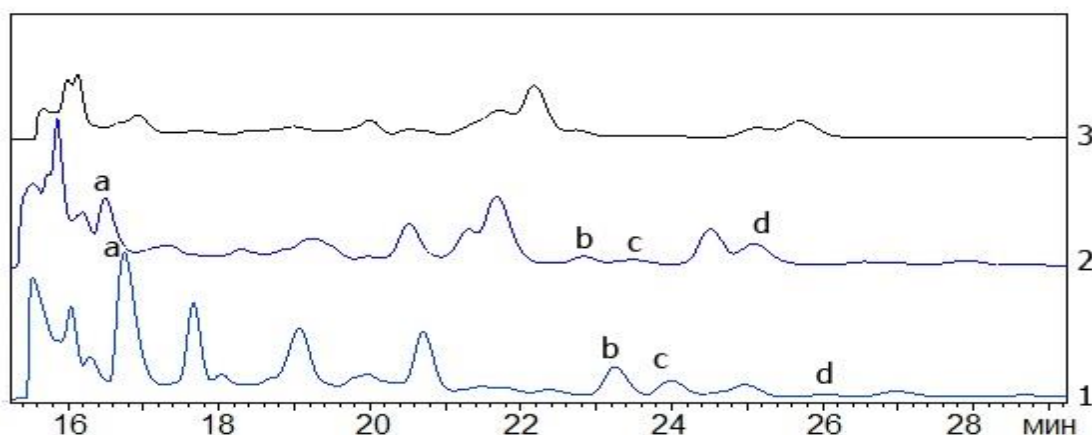


Рисунок 3 – Сравнение эффективности работы хроматографической колонки после первого (1), двадцатого (2) и тридцатого ввода пробы (3) без ТФЭ (а – скополамин, b – ванилиновая кислота, с – атропин, d – кофейная кислота)

Для очистки и предварительного концентрирования аналитов использовали твердофазную экстракцию (ТФЭ) с концентрирующим патроном Диапак C_{18} . Степень извлечения составила для скополамина 96%, а атропина – 89%, при этом пределы их детектирования и обнаружения составили 3 и 10 мкг/мл соответственно. Применение ТФЭ позволило использовать конечную пробу для проведения качественного анализа исследуемого материала методом ГХ-МС. Отдельно отметим, что полученная проба деградирует в течение 24 ч.

Предложенный способ подготовки проб был положен в основу разработки методики определения каннабиноидов, содержащихся в конопле. Для удобства применения ГХ-ПВД детектирования при проведении подобного рода экспертиз пробоподготовка была незначительно видоизменена. Для экстракции аналитов из растительного сырья использовали 96.8% этиловый спирт и ультразвуковое извлечение, после чего полученные пробы могут быть проанализированы как с применением ГХ, так и ВЭЖХ-определением каннабиноидов.

Как всегда, лимитирующей стадией определения наркотических и психоактивных средств синтетического происхождения является подготовка проб к анализу. Предложенная нами для определения природных каннабиноидов пробоподготовка была апробирована при анализе курительных смесей и показала возможность её использования. Ввиду высокой концентрации аналитов в курительных смесях перед проведением анализа целесообразно предварительное существенное разбавление пробы (до 200 раз). Поскольку используемый способ экстракции аналитов не является селективным, целесообразной представлялась оценка количества соэкстрактивных веществ с целью установления возможных матричных влияний. Как видно из хроматограммы экстракта (рис. 5), в данных условиях количество соэкстрактивных веществ достаточно мало и не может оказывать существенного мешающего влияния.

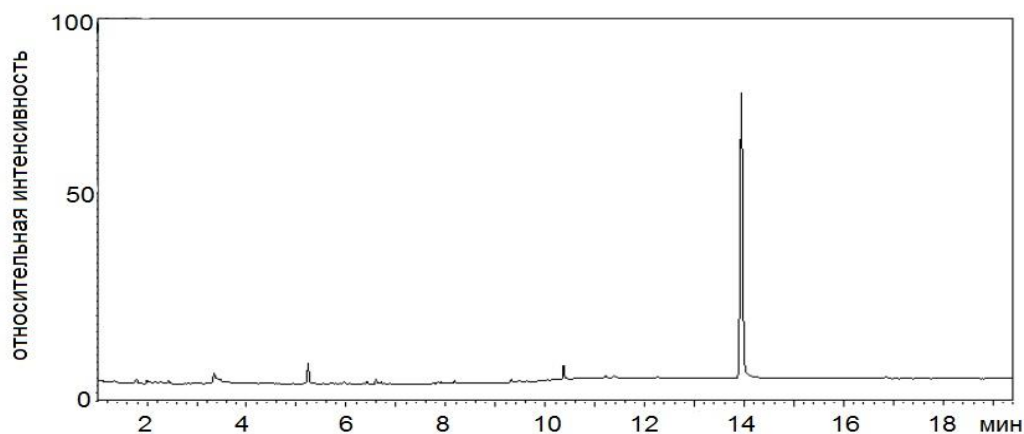


Рисунок 5 – Хроматограмма экстракта курительной смеси по полному ионному току (TIC)

При разработке методики определения наркотических соединений для подтверждения наличия определяемого соединения в пробе учитывали критерии ВАДА, согласно которым для подтверждения наличия определяемого соединения в пробе необходимо использовать не менее 3 характеристичных ионов, а время удерживания стандартного образца и компонента пробы не должно отличаться более, чем на 1% или 0.1 минуты. Для соединений, дающих малоинформативные спектры ЭИ, рекомендуется использовать как минимум один подтверждающий метод, особенно для веществ, дающих малоинформативные спектры ЭИ. Например, MDPV, α -PVP и нафирон дают единственный характеристичный ион со значением m/z 126, но они имеют существенно отличающиеся индексы удерживания, по значениям которых их можно легко дифференцировать.

Для повышения надежности определений аналитов показана целесообразность проведения анализа сочетанием методов ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС) и газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Применение метода УВЭЖХ-МС/МС позволило существенно повысить экспрессность, точность и надежность определения. При этом общее время проведения аналитического цикла, позволяющего определять одновременно 52 соединения, не превышало 1 ч.

Определение запрещенных ВАДА веществ в пище и спортивном питании

Биологически активные добавки и вспомогательные продукты спортивного питания – известный и популярный способ ускорения восстановления спортсмена между тренировками. Ввиду отсутствия контроля качества этих продуктов существует опасность попадания в них и употребления запрещенных веществ. Во избежание этого необходим превентивный контроль их качества, направленный на установление их соответствия требованиям пищевой безопасности, но и на наличие в них запрещенных ВАДА веществ и их метаболитов. Нами были проведены комплексные исследования ряда биологически активных добавок и вспомогательных продуктов спортивного питания.

Образцы пептидов, SARM и спортивного питания приобретали для обеспечения представительной выборки исследуемых образцов в период 2014 - 2016 гг. в интернет-магазинах. Широкое разнообразие продуктов спортивного питания и достаточно быстрая их ротация на потребительском рынке ограничили перечень исследуемых образцов наиболее популярными на момент проведения исследований наименованиями.

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 растворяли в смеси вода:ацетонитрил 50:50 (v:v). Для газохроматографического анализа проб жиросжигателей, в состав которых входило растительное сырье, проводили нагревание в воде при 45°C в течение 30 мин с добавлением аммиака до pH 9, после чего проводили жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) аналитов диэтиловым эфиром. В результате проведенных исследований установили, что в целом ряде предтренировочных комплексов и жиросжигателей содержатся запрещенные ВАДА эфедрин, метилсинефрин и даже дегидроэпиандростерон, обнаружение которых (или их

метаболитов) на этапе допинг-контроля приводит к однозначной дисквалификации спортсмена.

Стоит отметить, что основная сложность определения эфедрина в этих продуктах методом газовой хроматографии заключается в том, что он имеет идентичные с псевдоэфедрином параметры удерживания и масс-спектр. Для устранения возможных несоответствий его идентификацию проводили с использованием подтверждающего метода – УВЭЖХ-МС/МС, позволяющего эффективно разделить эфедрин и псевдоэфедрин. Отдельно отметим, что ни в одном продукте поставщиками напрямую не заявлялось наличие эфедрина, указывался «экстракт эфедры» во избежание трудностей в ходе декларирования и ввоза продукции на территорию ряда стран.

Следующим этапом стала идентификация соединений, продаваемых под видом SARM и пептидного допинга. Первичные исследования этих продуктов проводили с использованием СВЭЖХ-МС/МС низкого разрешения и последующим подтверждением результата с использованием МСВР (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты исследований МСВР некоторых SARM и агонистов PPAR δ

Заявленное вещество	Теоретическая моноизотопная масса, Да	Детектируемое значение m/z	Детектируемый ион	Точность определения массы, Δ ppm
Andarine (S-4)	441.1148	442.1201	[M+H] ⁺	4.5
Ostarine (MK-2866)	389.0987	390.1049	[M+H] ⁺	2.8
Cardarine (GW1516)	453.0680	454.0733	[M+H] ⁺	4.4
Ligandrol (LGD-4033)	338.0854	339.0918	[M+H] ⁺	2.7
Laxogenin	430.3083	445.2948	–	–
Radarine (RAD140)	393.0993	394.1052	[M+H] ⁺	3.6
AICAR (A9788)	258.0964	259.1034	[M+H] ⁺	1.2
Reverol (SR9009)	437.1176	438.1226	[M+H] ⁺	5.2
Miostop (YK-11)	430.2355	399.2154	[M-OCH ₃] ⁺	4.3
Ibutamoren (MK-677)	528.2406	529.2462	[M+H] ⁺	3.2
Sarmastol (AC-262,356)	278.1419	279.1496	[M+H] ⁺	-1.4

Из представленных в табл. 1 данных видно, что заявленное и обнаруженное вещество в случае лаксогенина отличаются. Вероятно, в данном случае в качестве действующего вещества использовали 20-гидроксиэкдизон

(20E), который применялся ранее в профессиональном спорте. При его ионизации происходит элиминирование двух гидроксильных групп из положений 1 и 2 (рис. 6), 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.

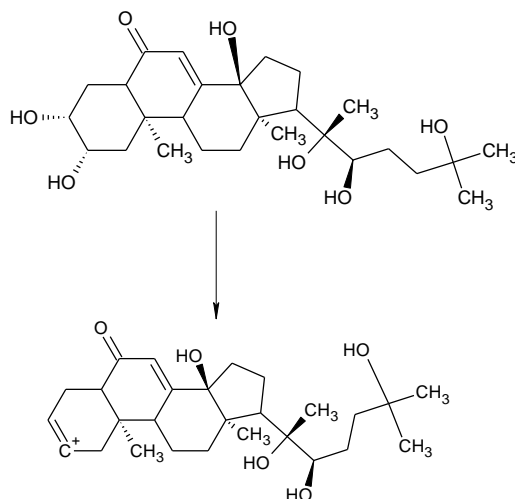


Рисунок 6 – Фрагментация 20-гидроксиэкдизона на источнике ЭРИ

В ходе проведения исследования образцов, продаваемых под видом пептидного допинга, было установлено, что в ряде случаев заявленное вещество либо отсутствовало, либо не соответствовало заявленному, что можно объяснить как нарушениями условий хранения и транспортировки, так и фальсификацией продукции.

В большинстве случаев продукты питания контролируются исключительно на соответствие критериям пищевой безопасности, как и со спортивным питанием, а возможность присутствия и применения в них вспомогательных ветеринарных препаратов, не подлежащих обязательному контролю, не обсуждается и не нормируется. К таковым относится и мельдоний, внесенный в перечень запрещенных ВАДА соединений, как модулятор метаболизма. Он может входить в состав ветеринарных препаратов, например «Эмидонол», используемых при скученном содержании птицы и домашнего скота, что делает актуальным его определение в продуктах питания. Нами проводился комплекс исследований по возможному установлению содержания мельдония в молоке, мясе и печени.

Для предотвращения потерь аналита в молоке ходе пробоподготовки использовали процедуру «разбавил и вколол». Для этого 200 мкл молока разбавляли 800 мкл ацетонитрила в эппендорфе объемом 1.5 мл, после чего

перемешивали 1 мин с использованием лабораторного миксера и центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин. 300 мкл полученного супернатанта переносили в стеклянные вials с понижающими объем стеклянными вставками. В ходе пробоподготовки образцов мяса и печени 1 г исследуемого образца гомогенизировали с кварцевым песком и экстрагировали 5 мл смеси, состоящей из воды и ацетонитрила (10:90, v:v), после чего перемешивали 2 мин с помощью лабораторного миксера и центрифугировали 1 мл полученного экстракта при 10000 об./мин с последующим переносом 300 мкл супернатанта в стеклянную вial со стеклянной вставкой.

Ввиду склонности аналитов к образованию интенсивных протонированных молекулярных ионов ($[M+H]^+$) использовали режим регистрации положительных ионов (рис. 7). Теоретические и наблюдаемые массы представлены в таблице 2.

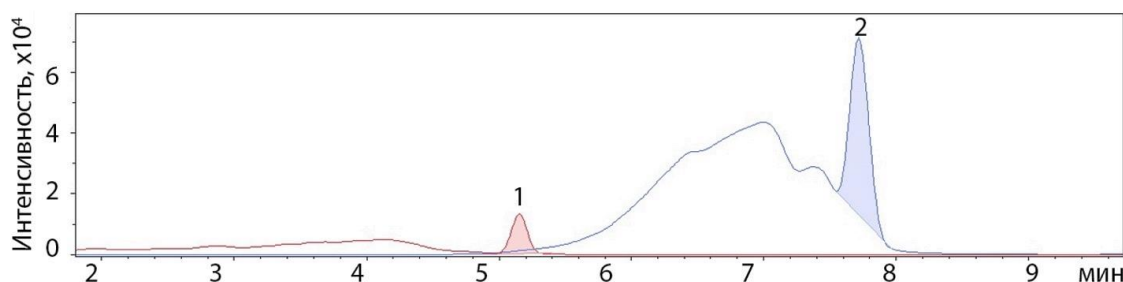


Рисунок 7 – Хроматограмма образца молока с внесенным мельдонием на уровне низких концентраций: 1 – габапентин (внутренний стандарт), 2 – мельдоний

Таблица 2 – Времена удерживания, наблюдаемые и теоретические массы аналитов, ошибка определения масс

Вещество	Время удерживания, мин	$[M+H]^+$, теор.	$[M+H]^+$, практ.	Ошибка определения масс (MS), ppm	Продукт-ион (практ.), m/z
Мельдоний	7.75	147.1128	147.1126	-0.8	58.0652
Габапентин	5.16	172.1332	172.1331	0.6	137.0960 95.0855 67.0543

Результаты валидации процедуры определения мельдония представлены в таблице 3. Согласно критериям FDA точность проводимого анализа должна находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальной концентрации аналита при проведении анализа растворов на уровне низких, средних и высоких концентраций.

Таблица 3 – Валидация процедуры определения мельдония (n=6)

Объект исследования	Концентрация РКК, нг/мл	В один день		В разные дни		Матричные эффекты, %
		Точность, %	ОСКО, %	Точность, %	ОСКО, %	
Молоко	25	-4.8	13.5	-5.7	11.8	9.4
	100	3.4	9.2	-2.1	10.4	6.2
	250	2.7	5.1	1.9	7.2	2.8
Мясо/печень	50	-12.1	11.3	-14.1	12.9	11.6
	100	6.2	9.5	10.5	11.2	7.4
	250	4.7	8.4	6.6	9.0	3.9

После установления метрологических характеристик методики определения мельдония проводили анализ реальных образцов молока, мяса и печени. Мельдоний обнаружили в целом ряде объектов в концентрациях, значительно превышающих даже значения растворов контроля качества (РКК) с высоким содержанием аналита, достигая 920 нг/мл. Употребление подобной загрязненной мельдонием продукции может привести к дисквалификации спортсмена.

Определение некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях

Злоупотребление фармацевтическими препаратами в немедицинских целях влечет за собой необходимость разработки и внедрения в токсикологическую практику ряда методик, направленных на оперативный контроль «аптечных наркотиков» в биологических жидкостях. Ввиду отсутствия изотопно-меченных стандартов, являющихся идеальными внутренними стандартами, которые позволили бы учесть все матричные эффекты, в качестве внутреннего стандарта использовали аминокислоту – аминифенилмасляную кислоту. Как показали исследования, даже в случае её употребления, она практически полностью метаболизируется в организме человека и позволяет избежать возможных наложений и искажений результатов анализа. В качестве внутреннего стандарта также рассматривали возможность применения инодометацина и катадолона, однако от их использования пришлось отказаться ввиду сильного подавления ионизации и, как следствие, получения нестабильных результатов.

Наиболее простой процедурой подготовки проб биологических жидкостей к анализу является разбавление пробы. В таком случае не происходит потерь аналитов, но возможно определение только конъюгированных форм

метаболитов. С другой стороны, данный способ пригоден для определения нативных веществ (рис. 8).

Предложенный способ пробоподготовки использовали при анализе проб, полученных из Краснодарского наркодиспансера, с целью установления наличия и содержаний психоактивных веществ. В ходе анализа было установлено, что содержания аналитов в пробах существенно превышают линейный диапазон калибровочного графика и для их определений целесообразно проведение предварительного разбавления проб до 100 раз ввиду высокой концентрации аналитов в реальной пробе (рис. 9). Чувствительность предложенной методики можно назвать несколько избыточной, но при проведении токсикологических экспертиз может потребоваться установление факта употребления наркотических и психоактивных веществ после совершения правонарушения спустя несколько дней. В таких случаях требуется применение методики, отвечающей требованиям высокой чувствительности и надежности.

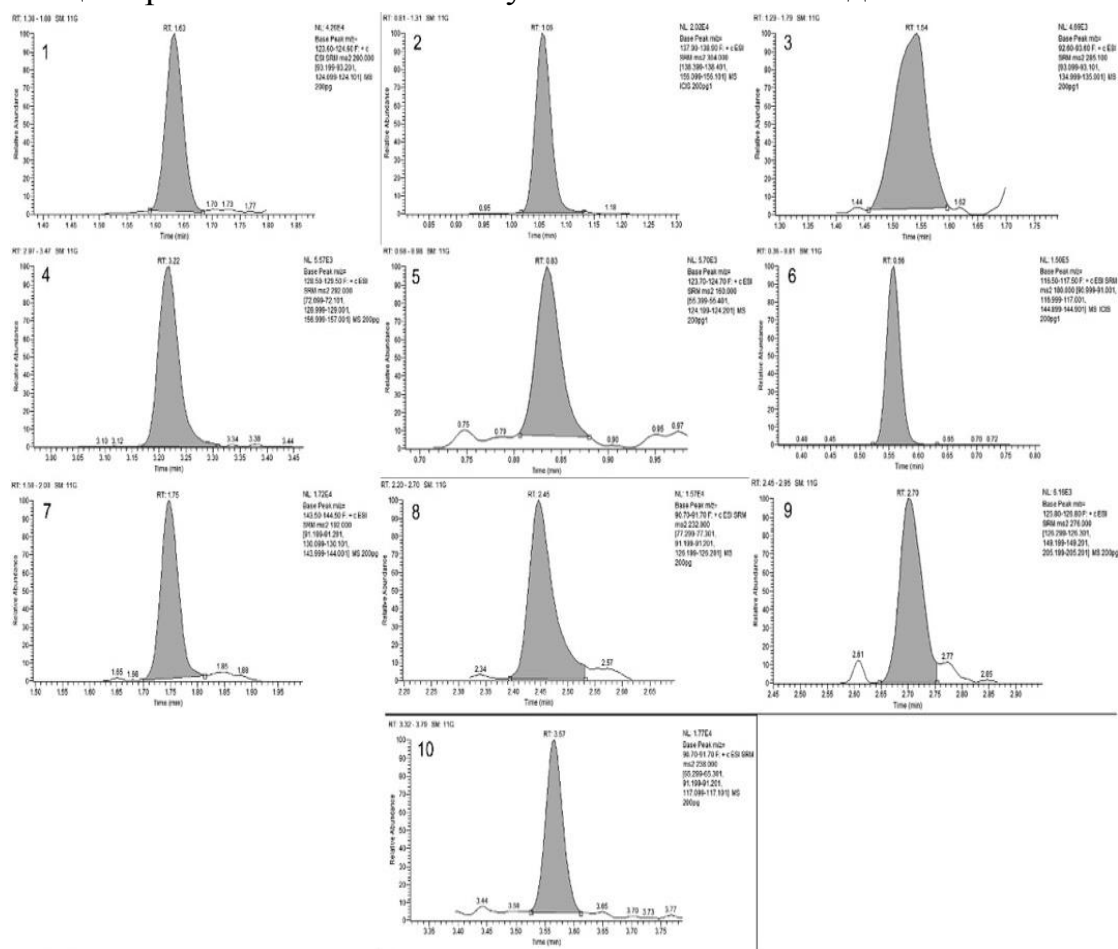


Рисунок 8 – Хроматограммы РКК (низк): атропин (1); скополамин (2); тропикамид (3); цикломед (4); прегабалин (5); фенибут (6); 4-метилэтилкатинон (4-МЕС) (7); α -пирролидинопентиофенон (α -PVP) (8); метилендиоксипировалерон (MDPV) (9); дифенил-2-пирролидинилметан (DPhPrd) (10)

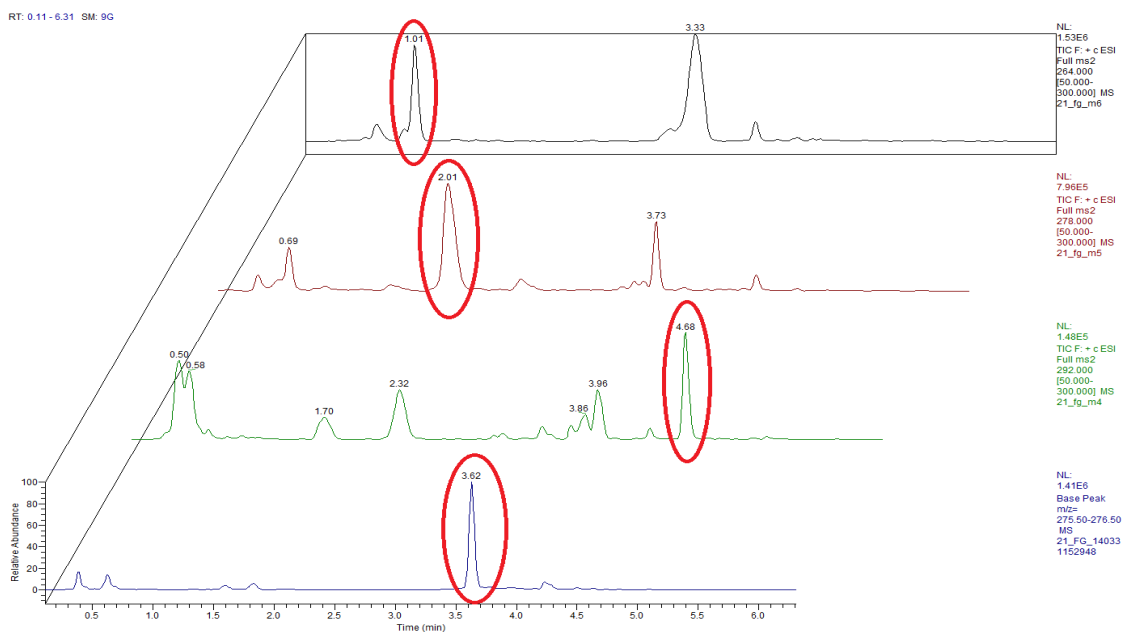


Рисунок 9 – Одновременное определение MDPV и некоторых его метаболитов в моче

Описанная выше пробоподготовка испытуемого образца имеет серьезный недостаток, т.к. не позволяет очистить пробу от матрицы и приводит к быстрому выходу из строя хроматографической колонки. Очистка проб возможна ТФЭ или с применением минерального гидролиза, разрушающего ряд высокомолекулярных соединений. Однако в последнем случае необходимо помнить, что на некоторые соединения минеральный гидролиз может оказать негативное влияние (например, тропановые алкалоиды подвержены гидролизу). Ферментативный гидролиз является более мягким и экспрессным способом подготовки проб для определения не только нативных стимуляторов, но и их метаболитов, но предпочтительным все же является применение минерального гидролиза, как более доступного и простого способа подготовки проб.

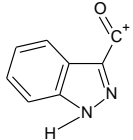
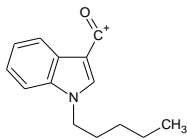
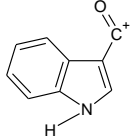
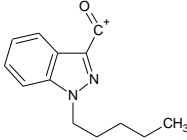
Для проведения нецелевого скрининга рекомендуется использовать масс-спектрометрию высокого разрешения, поскольку практически все синтетические каннабиноиды в организме полностью метаболизируют. Учитывая разнообразие образующихся метаболитов, проведение целевого скрининга синтетических каннабиноидов крайне затруднено.

Нами предложен подход по нецелевому скринингу синтетических каннабиноидов с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения, основанный на том, что большинство известных синтетических каннабиноидов «конструируются» вокруг известной базовой структуры – индольной или индазольной. Зная структуры конкретных каннабиноидов и основные пути метаболизма можно предположить набор молекулярных и псевдомолекулярных

ионов метаболитов и, исходя из исходной, базовой структуры аналита, можно предположить возможные общие продукт-ионы и рассчитать их точную массу. В качестве иллюстрации применения такого подхода в таблице 4 приведены несколько подобных фрагментов. Основным преимуществом такого подхода является возможность проведения ретроспективного анализа по выбранным ионам с учетом вновь поступившей информации, что особенно важно в случаях работы с малыми количествами испытуемого образца.

Используя изложенный алгоритма скрининга, проводили поиск и идентификацию метаболитов AM(N)-2201 в моче (рисунок 10).

Таблица 4 – Массы некоторых фрагментов и их структурные формулы, соответствующие ряду наиболее распространенных синтетических каннабиметиков

Точная масса фрагмента (а.е.м)	Структурная формула фрагмента	Точная масса фрагмента (а.е.м)	Структурная формула фрагмента
145.0396		214.1226	
144.0443		215.1179	

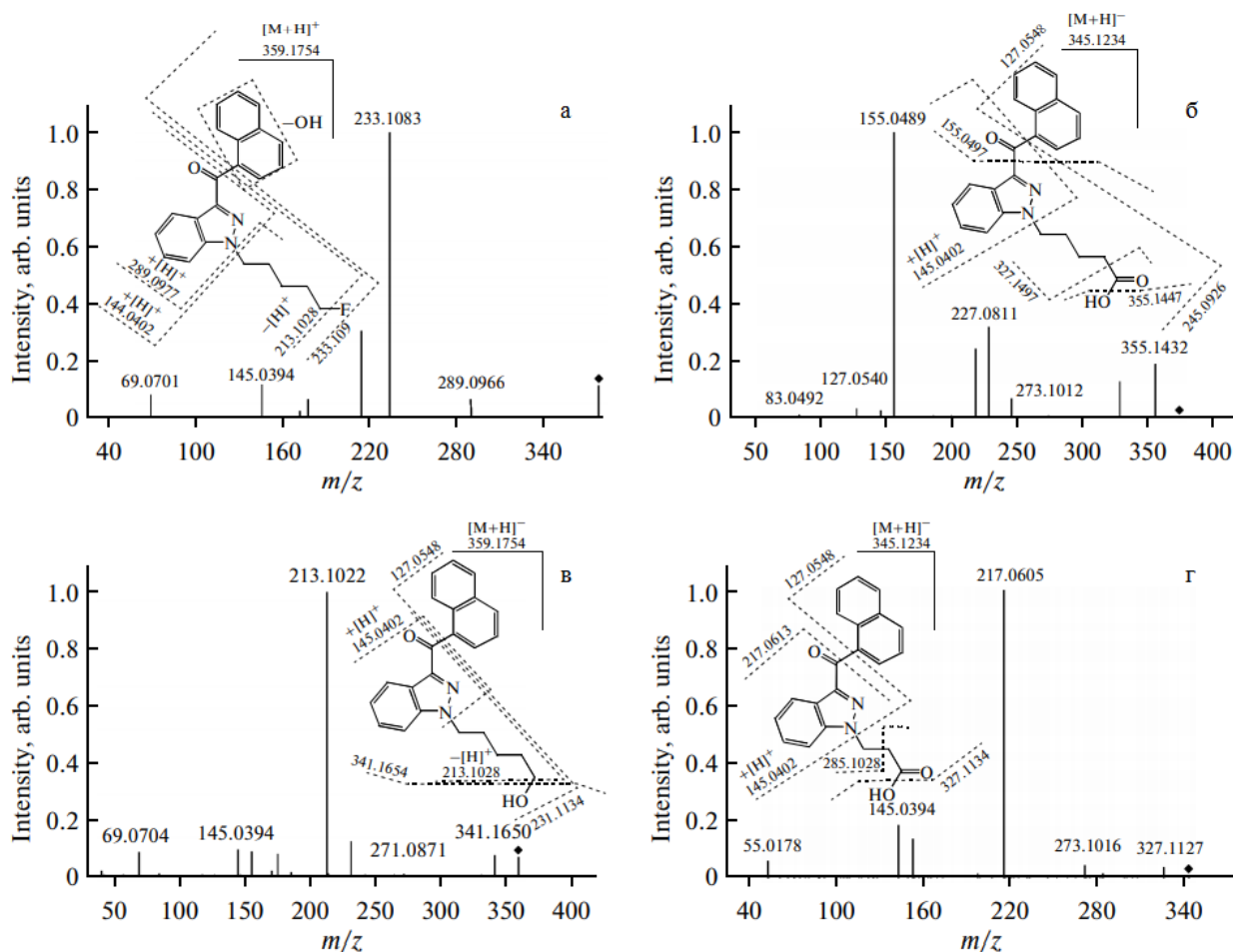


Рисунок 10 – Основные метаболиты синтетического каннабимиметика AM(N)–2201: а – моногидроксилированный метаболит, б – C₅-карбокси- метаболит, в – C₅-дезфторгидрокси-метаболит, г – дезэтилкарбокси-метаболит

Применение подобного подхода позволяет проводить исследование также метаболизма других ксенобиотиков, например, ноотропного препарата унифирама. Несмотря на то, что в ряде стран он уже прошел клинические испытания и допущен к применению (например, США), его метаболизм не изучен. Известно лишь то, что он частично выводится в нативном виде, а значит, весьма актуален поиск его метаболитов.

Дополнительным вспомогательным инструментом при проведении такого рода исследований может являться применение программно-аппаратных комплексов, таких, как MetWorks (Thermo Scientific) и GLORY (университет Гамбурга), базирующиеся на эмпирических правилах протекания метаболизма с участием различных сред, в том числе цитохромов печени P450.

После анализа хроматограмм мочи (рис. 11) с применением описанных выше критериев удалось выделить два потенциально возможных метаболита унифирама (рис. 12).

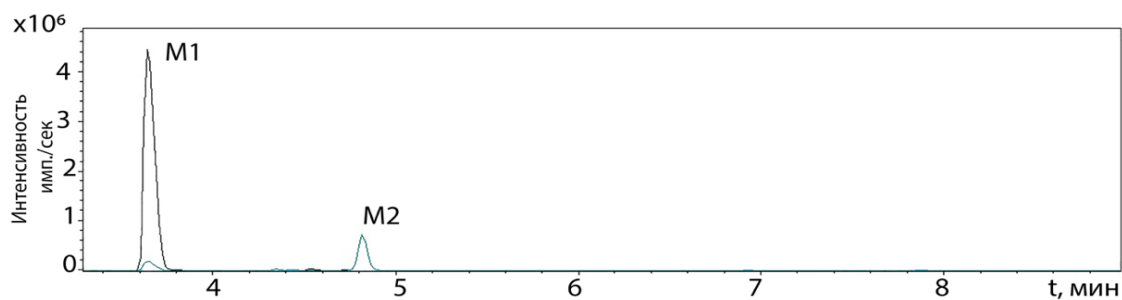


Рисунок 11 – Хроматограмма образца мочи (четвертый день после употребления унифирама), содержащего предполагаемые метаболиты по выделенным протонированным молекулярным ионам (M1 – m/z 313.0853, M2 – m/z 315.0809)

Анализируя полученные ионы-прекурсоры и соответствующие им ионы-продукты можно сделать вывод о том, что образование дефтордигидроксилированного метаболита (M1) происходит именно подобным образом, а не путем замещения фтора на гидроксильную группу, о чем свидетельствует наблюдаемая фрагментация (рис. 13 и 14).

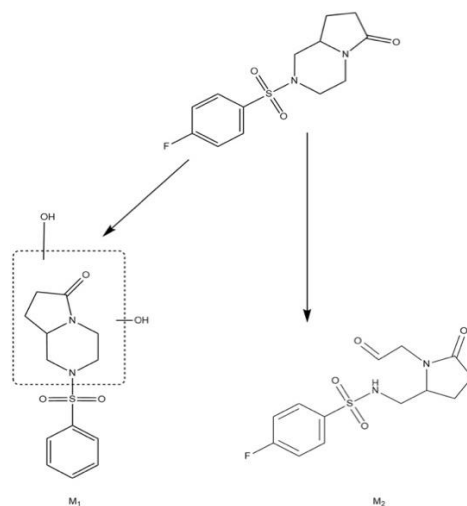


Рисунок 12 – Предполагаемые метаболиты унифирама

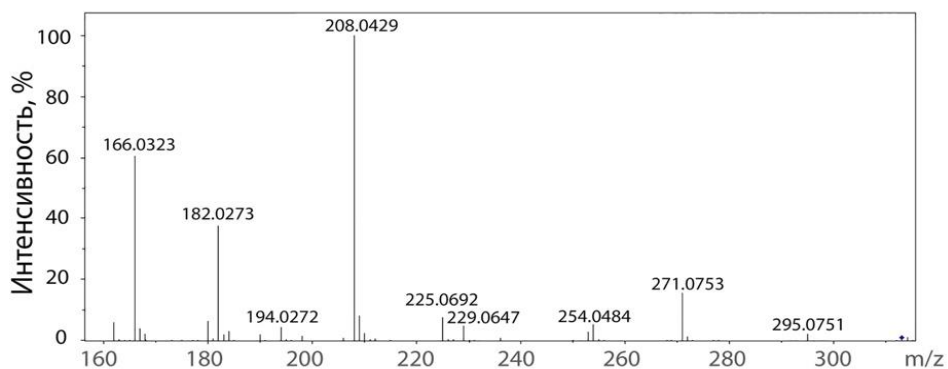


Рисунок 13 – Масс-спектр продукт-ионов, полученный для предполагаемого метаболита унифирама M1

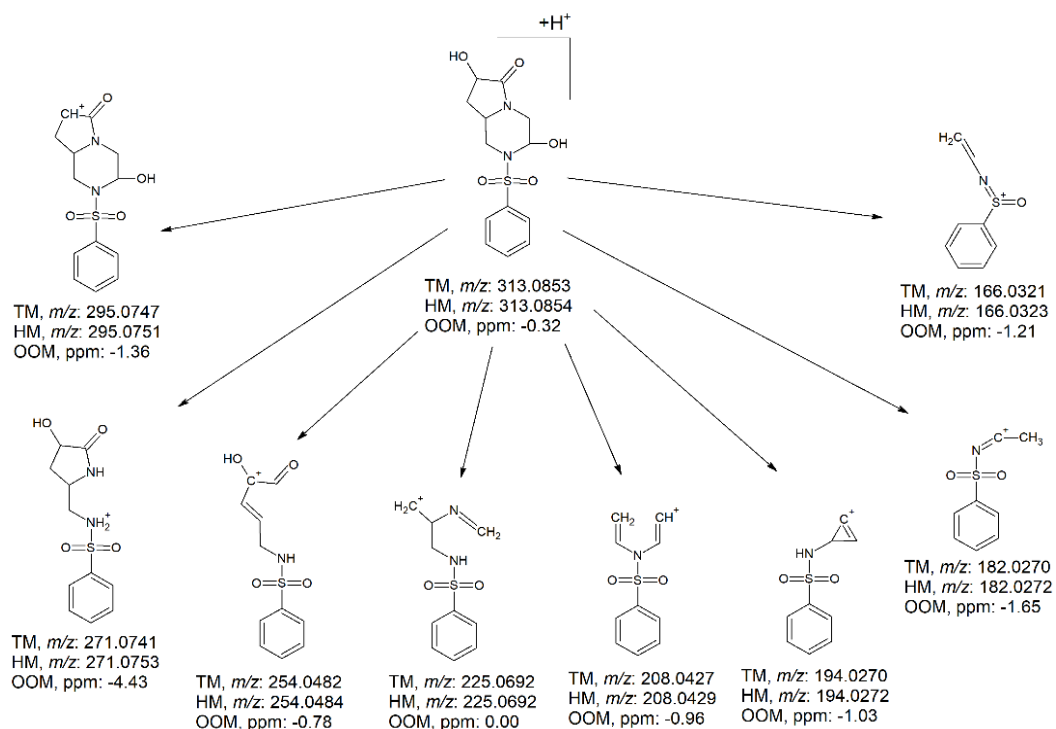


Рисунок 14 – Предлагаемая интерпретация зарегистрированного масс-спектра вероятного метаболита унифирама M1 (TM – теоретическая масса, HM – наблюдаемая масса, OOM – ошибка определения массы)

Положение гидроксильных групп в приведенной схеме фрагментации является допущением и приведено для удобства расчета масс.

Исходя из точной массы второго потенциального метаболита и закономерностей протекания метаболизма ксенобиотиков, можно сделать вывод о том, что это моногидроксилированный метаболит или сформировавшийся в результате dealкилирования и карбонилирования метаболит. В пользу последнего варианта выступает наблюдаемая фрагментация (рис. 15 и 16).

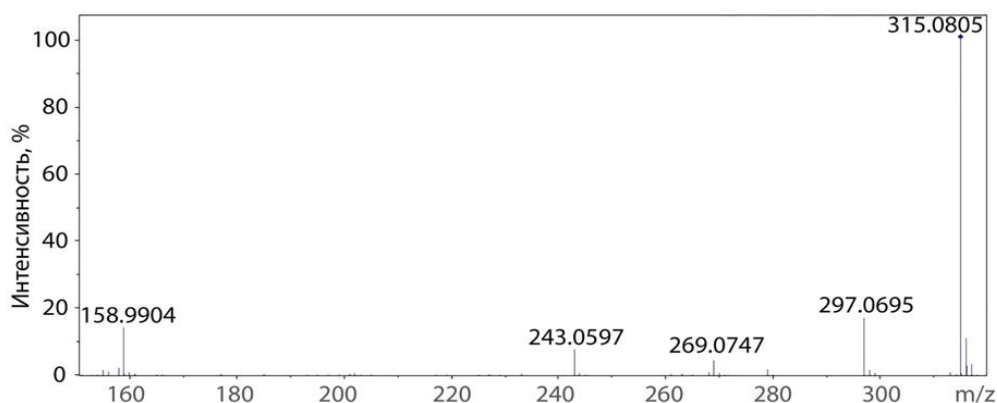


Рисунок 15 – Масс-спектр продукт-ионов, полученный для предполагаемого метаболита унифирама M2

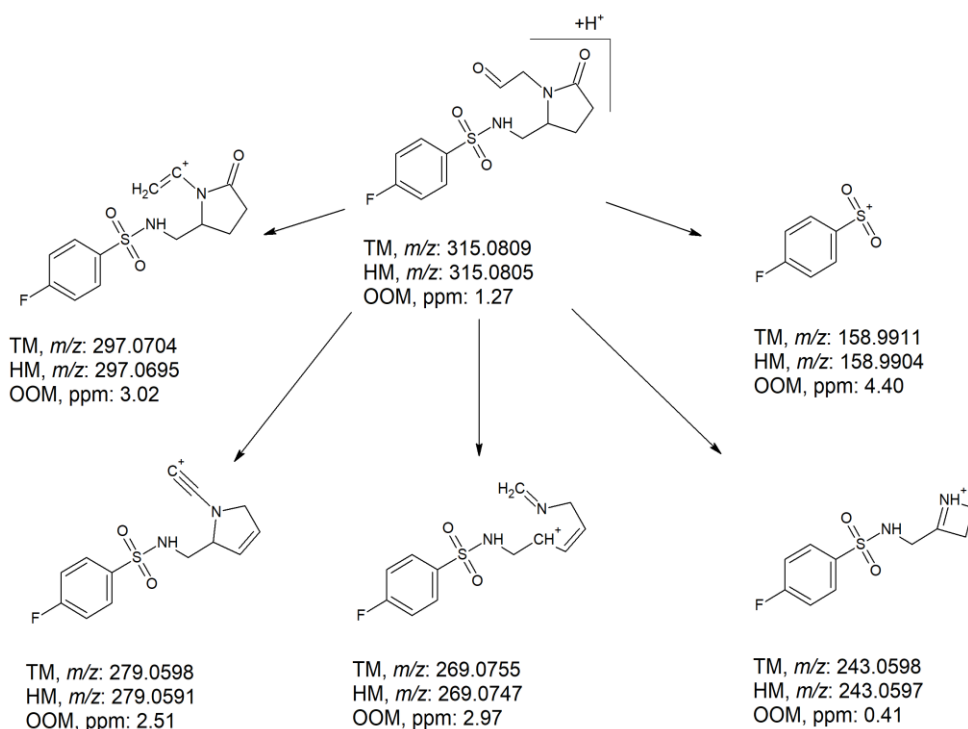


Рисунок 16 – Предлагаемая интерпретация зарегистрированного масс-спектра вероятного метаболита унифирама М1 (ТМ – теоретическая масса, НМ – наблюдаемая масса, ООМ – ошибка определения массы)

Определение некоторых рилизинг-пептидов гормона роста и селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче

Высокая чувствительность и селективность масс-спектрометрии сделала её также оптимальным решением для определения рилизинг-пептидов гормона роста. Этот вид допинга представляет особенный интерес, поскольку их эффективные концентрации крайне малы. Учитывая физико-химические свойства рилизинг-пептидов гормона роста и диапазон определяемых концентраций, наиболее целесообразным представляется сочетание подходов их твердофазного концентрирования с методами хромато-масс-спектрометрии. Для этого, помимо оптимизации условий разделения и детектирования аналитов, требовалась оптимизация условий их концентрирования (табл. 5).

Предварительное кондиционирование патронов для ТФЭ осуществляли смесью метанол:вода (50:50, $v:v$), а элюирование (объемом 0.5 мл) осуществляли смесью ацетонитрил:вода (90:10) для патронов C_{18} . Ввиду отличий в механизме удерживания катионообменных сорбентов (SCX и WCX), их кондиционирование осуществляли 2.5% водным раствором аммиака в воде с последующим пропуском смеси ацетонитрил:вода (10:90). Элюирование осуществляли 5 % раствором ацетата аммония в метаноле.

Таблица 5 – Эффективность различных сорбентов при твердофазном концентрировании аналитов из мочи ($C = 20$ нг/мл, $n = 3$)

Аналит	Степень извлечения, %		
	Biotage Isolute C ₁₈	Phenomenex Strata WCX	Biotage Isolute SCX
Селанк	35 ± 4	89 ± 5	76 ± 5
Ипаморелин	48 ± 5	94 ± 4	82 ± 5
GHRP-6	53 ± 5	91 ± 4	80 ± 5
Гексарелин	54 ± 5	91 ± 4	78 ± 5
PT-141 (IS)	70 ± 5	92 ± 4	86 ± 4

Как видно из табл. 5, наибольшая степень извлечения аналитов достигается при использовании патронов для твердофазной экстракции со слабым катионообменным сорбентом (WCX). Меньшая степень извлечения патронами SCX обусловлена тем, что аналиты сильнее удерживаются на сорбенте, количественное их извлечение удастся достигнуть увеличением объема элюента в 2 раза, что снижает их концентрирование. При использовании октадецильного сорбента уже в начале загрузки наблюдается существенный проскок аналитов.

При оптимизации условий разделения и детектирования аналитов отдельное внимание уделяли также способам повышения чувствительности и селективности разделения путем применения различных вариантов разделения (рис.17–19), включая гидрофильную хроматографию и методологию «Wrong-way round ionization».

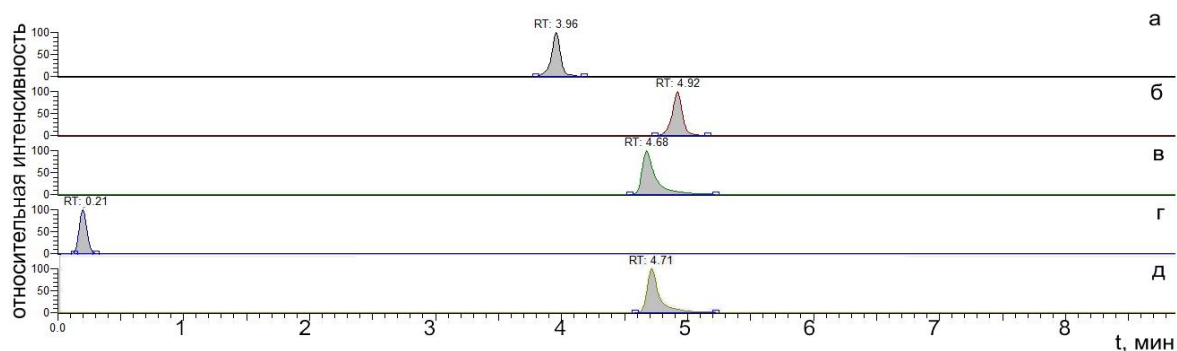


Рисунок 17 – Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в режиме гидрофильной хроматографии: меланотан-2 (а); GHRP-2 (б); GHRP-6 (в); DSIP (г); гексарелин (д)

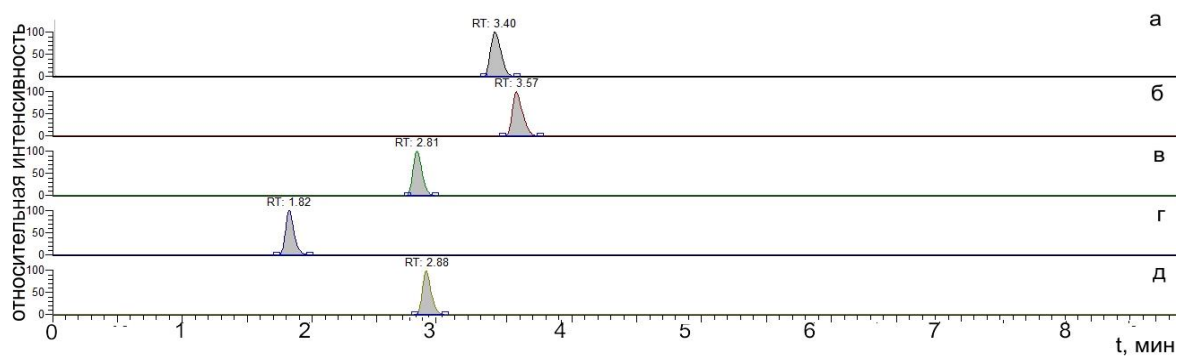


Рисунок 18 – Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в кислой среде (pH = 2.5): меланотан-2 (а); GHRP-2 (б); GHRP-6 (в); DSIP (г); гексарелин (д)

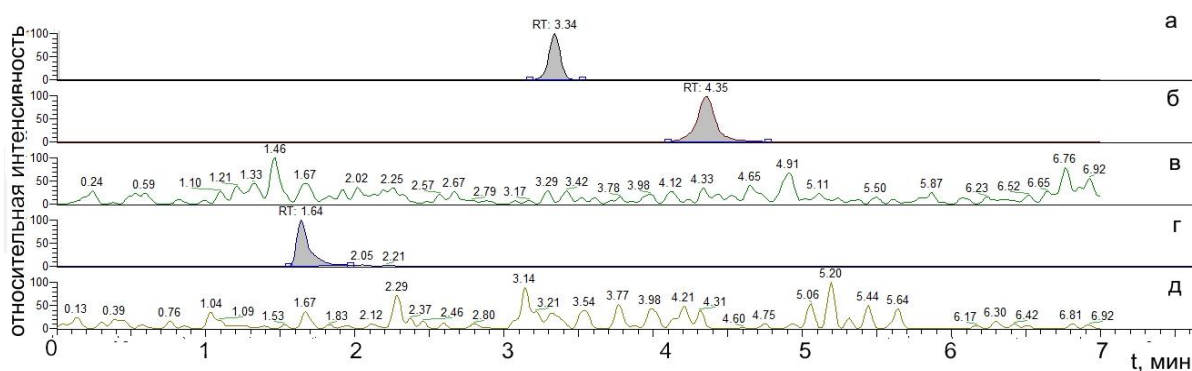


Рисунок 19 – Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в щелочной среде (pH = 10): меланотан-2 (а); GHRP-2 (б); GHRP-6 (в); DSIP (г); гексарелин (д)

Анализ полученных результатов показывает, что переход к альтернативным вариантам разделения не обеспечивает большую чувствительность по сравнению с традиционным обращено-фазовым режимом, базирующемся на использовании подкисленной подвижной фазы.

Аналогичные исследования по оптимизации условий твердофазного концентрирования проводили в отношении селективных модуляторов андрогенных рецепторов, некоторые из которых могут быть обнаружены в моче и в нативном виде. При изучении условий твердофазной экстракции было установлено, что проскок определяемых веществ не наблюдается при загрузке образцов до объема 3 мл на всех исследуемых патронах с содержанием аналитов в образцах до 100 нг/мл. Для промывки всех патронов в качестве оптимальной была выбрана смесь метанол: вода (5:95, по объему). При использовании растворов, содержащих больше 5 об.% метанола, наблюдался проскок аналитов при промывке. В табл. 6 представлены результаты эксперимента по оптимизации объема для элюирования аналитов. Как видно, для количественного извлечения целевых соединений с патронов достаточно 0.5 мл метанола.

Таблица 6 – Степень извлечения аналитов с патронов для ТФЭ (концентрации аналитов 10 нг/мл)

Патрон	Аналит	Степень извлечения (%) при указанных объемах элюента (n = 6)		
		0.5 мл	1.0 мл	1.5 мл
С8	Андарин	97 ± 6	98 ± 7	98 ± 7
	Ибутаморен	99 ± 10	100 ± 10	100 ± 10
	Лаксогенин	111 ± 12	111 ± 12	111 ± 12
	Лигандрол	106 ± 9	106 ± 9	106 ± 9
	Остарин	107 ± 9	107 ± 10	107 ± 10
С18	Андарин	94 ± 9	96 ± 9	96 ± 9
	Ибутаморен	109 ± 12	112 ± 14	113 ± 15
	Лаксогенин	112 ± 12	115 ± 16	115 ± 16
	Лигандрол	108 ± 11	108 ± 11	108 ± 11
	Остарин	102 ± 9	105 ± 10	106 ± 10
HLB	Андарин	105 ± 6	106 ± 7	107 ± 7
	Ибутаморен	104 ± 15	114 ± 16	114 ± 16
	Лаксогенин	115 ± 16	115 ± 16	115 ± 16
	Лигандрол	112 ± 14	112 ± 14	112 ± 14
	Остарин	109 ± 11	111 ± 12	111 ± 12

Полученные аналитические характеристики методики определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов сведены в табл. 7. Как видно, использование патрона Oasis HLB является наиболее оптимальным, хотя использование остальных патронов также дает удовлетворительные результаты. Полученные результаты могут быть связаны с близким и гидрофобным механизмом удерживания аналитов при использовании исследуемых патронов.

Таблица 7 – Аналитические характеристики методики определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов

Патрон	Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2	Матричные эффекты, %
С8	Андарин	0.5	1	1–50	0.999	89 ± 10
	Ибутаморен	0.5	1	1–50	0.999	104 ± 6
	Лаксогенин	0.25	1	1–50	0.996	108 ± 8
	Лигандрол	0.5	2.5	2.5–50	0.999	105 ± 7
	Остарин	0.1	0.5	0.5–25	0.998	92 ± 8
С18	Андарин	0.5	1	1–50	0.999	90 ± 10
	Ибутаморен	0.5	1	1–50	0.998	109 ± 8
	Лаксогенин	0.5	1	1–50	0.997	112 ± 12
	Лигандрол	0.5	2.5	2.5–50	0.999	110 ± 11
	Остарин	0.1	0.5	0.5–25	0.998	94 ± 8
HLB	Андарин	0.5	2.5	2.5–50	0.999	95 ± 6
	Ибутаморен	0.25	0.5	0.5–50	0.999	105 ± 7
	Лаксогенин	0.25	1	1–50	0.997	113 ± 12
	Лигандрол	0.5	2.5	2.5–50	0.999	101 ± 6
	Остарин	0.1	0.5	0.5–25	0.998	94 ± 7

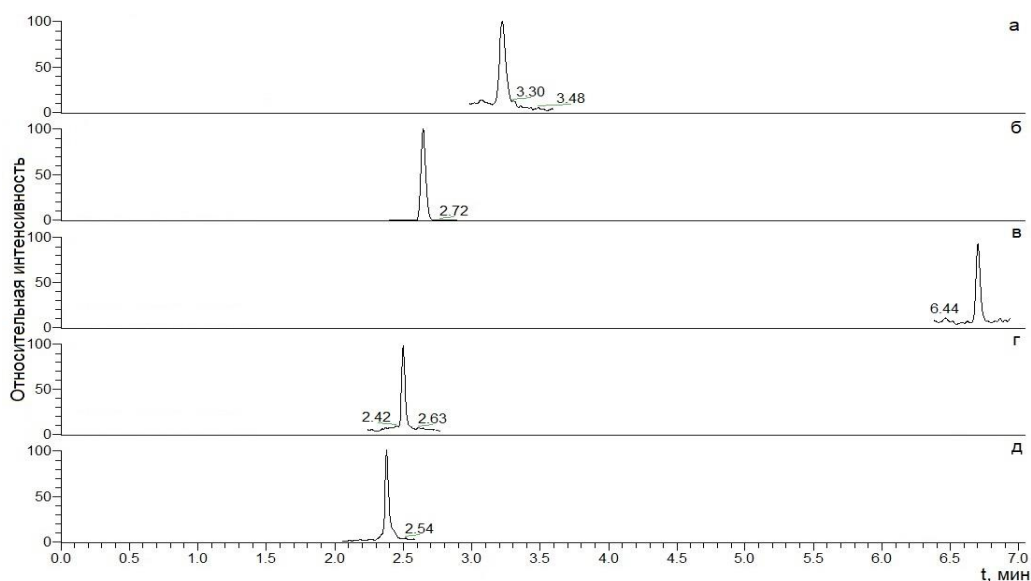


Рисунок 20 – Хроматограммы проб мочи после однократного перорального употребления 15 мг действующего вещества: андарин (а), ибутаморен (б), лаксогенин (в), лигандрол (г) и остарин (д)

Определение мельдония в моче

Далеко не все вещества, содержание и определение которых регламентируется ВАДА, могут быть обнаружены с использованием обращено-фазовой жидкостной хроматографии. Так, например, для определения мельдония наиболее целесообразно применение метода гидрофильной ВЭЖХ. При этом пробоподготовка заключается в разбавлении проб мочи ацетонитрилом, содержащим внутренний стандарт (габапентин) и их дальнейшим центрифугированием.

Ввиду малой молекулярной массы мельдоний имеет только один характеристичный переход, что существенно осложняет обеспечение надежности его определения, и требует тщательного подбора условий разделения – время удерживания, MRM- переходы и энергия соударений для аналитов (табл. 8).

Таблица 8 – Времена удерживания, MRM–переходы и энергии соударений при ВЭЖХ-МС/МС-ЭРИ определении мельдония

Вещество	Время удерживания, мин	Ион-прекурсор, m/z	Продукт-ион, 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	

В оптимизированных условиях проводили анализы проб мочи, полученных от добровольцев через 12 ч и 24 ч после приема мельдония в дозе 500 мг (рис. 21).

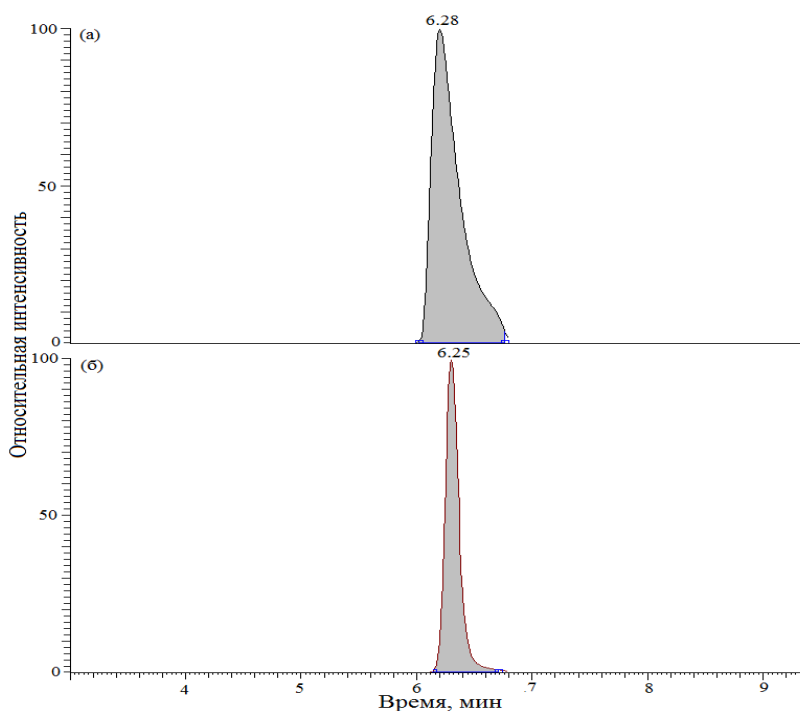


Рисунок 21 – ВЭЖХ-МС/МС хроматограммы образцов мочи через 12 часов (а) и 24 часа (б)

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

Определение стероидных гормонов в моче с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции

Дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция (DLLME) – относительно новый метод пробоподготовки, главным преимуществом которого является возможность работы с малыми количествами проб и экстрагента. Учитывая общемировую тенденцию перехода к процессам, отвечающим требованиям «зеленой химии», DLLME довольно быстро стала конкурировать с классической ЖЖЭ для решения ряда аналитических задач. Учитывая большое количество переменных, которые необходимо принимать во внимание в процессе оптимизации процесса экстракции, целесообразно применение таких статистических подходов, как центрально-композиционный план и план Бокса-Бенкена, позволяющие варьировать сразу несколько показателей одновременно.

Среди факторов, способных оказывать влияние на получаемые результаты, нами были выбраны такие основные переменные, как рН среды, из которой проводилась экстракция, влияние солевого фона, количество экстрагента, диспергента, растворители, способные исполнять роль экстрагента и диспергента, время ферментативного гидролиза и время экстракции.

Согласно процедуре оптимизации с использованием плана Бокса-Бенкена, количество экспериментов, необходимых для проведения вычисляли по уравнению:

$$N = 2k \times (k-1) + C_p,$$

где k – это количество факторов, принимаемых во внимание при оптимизации эксперимента;

C_p – количество центральных точек при оптимизации.

При оптимизации условий эксперимента также принимали во внимание необходимость использования минимум трех значений (-1; 0; +1) для каждого значимого фактора в его оптимизации (табл. 9).

Таблица 9 – Факторы и их уровни значений, используемые для оптимизации эксперимента по определению стероидных гормонов в моче

Фактор	Значение уровня		
	-1	0	+1
Объем диспергента, мкл	600	850	1100
Объем экстрагента, мкл	100	150	200
Содержание хлорида натрия, %	0	5	10
Время перемешивания, сек	5	15	30

Поскольку стероидные гормоны выводятся из организма преимущественно в конъюгированной форме, при их определении зачастую используют стадию деконъюгации. Без её применения извлечение аналитов из мочи возможно только с помощью твердофазной экстракции.

В отличие от ряда ксенобиотиков стероиды разрушаются при длительной экспозиции в среде минеральных кислот и нагревании, что может привести к искажениям получаемых результатов и полной деградации пробы. Ферментативный гидролиз, протекающий при значительно меньших температурах, может осуществляться двумя разными способами – с

использованием глюкуронидазы кишечной палочки и глюкуронидазы виноградной улитки. Последний фермент, помимо β -глюкуронидазы, содержит также арилсульфатазу, способную расщеплять сульфатные конъюгаты. В процессе проведения исследования установили, что оба фермента одинаково эффективны в отношении определяемых веществ и в дальнейших экспериментах использовали β -глюкуронидазу кишечной палочки в целях унификации с остальными предлагаемыми методиками.

Деконъюгирование проводили при 50 и 55 °С, т.к. в этих условиях требуется меньше времени для полного протекания процесса, а наибольшая эффективность дальнейшей экстракции достигается при рН 9 (рис. 22).

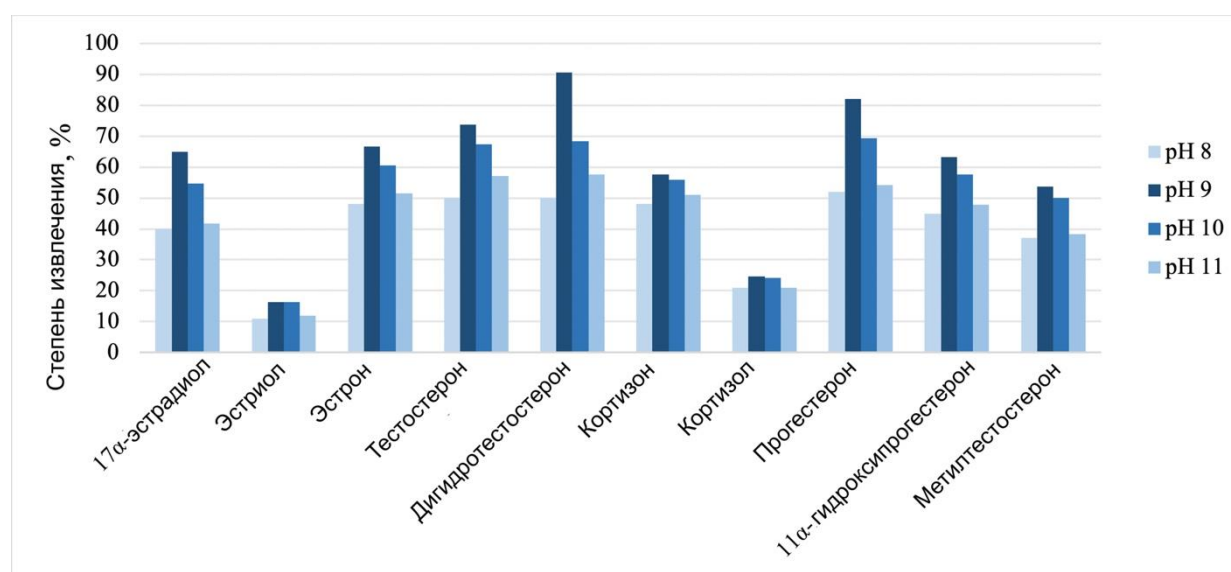


Рисунок 22 – Эффективность извлечения стероидных гормонов при различных рН

Поскольку содержание стероидов в моче может варьироваться в широких пределах, разрабатываемый подход должен позволять определять физиологически и диагностически значимые концентрации. Предлагаемая методика DLLME извлечения с последующим УВЭЖХ-МСВР определением аналитов позволяет достичь предела их детектирования на уровне от 0.25–10 нг/мл, что полностью перекрывает значимые диапазоны концентраций и сохраняет возможность проведения нецелевого скрининга. Кроме того, описанные условия позволяют эффективно разделять тестостерон и его эпитестостерон (рис. 23), что является немаловажным при осуществлении допинг-контроля, где соотношение Т/Е является диагностически важным.

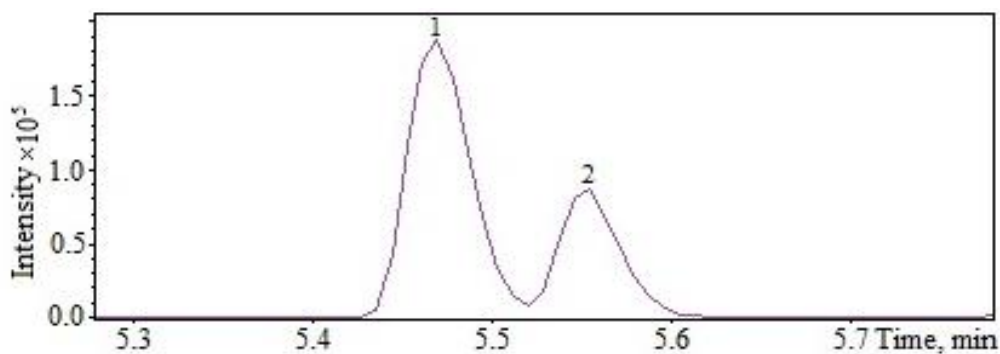


Рисунок 23 – Хроматограмма пробы мочи по выделенному иону с m/z 289.2162; тестостерон (1) и эпитестостерон (2)

Помимо чувствительности определения немаловажным фактором являются также и предел обнаружения аналита, линейный диапазон, правильность, точность и стабильность получаемых результатов (табл. 10).

Таблица 10 – Некоторые аналитические характеристики методики

Аналит	Предел детектирования, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R ²
17 α -эстрадиол	10	50	50–500	0.996
Эстриол	10	50	50–500	0.996
Эстрон	10	50	50–500	0.995
Тестостерон	0.25	1.0	1.0–500	0.998
Дигидротестостерон	0.5	2.5	2.5–500	0.998
Кортизон	0.25	1.0	1.0–500	0.998
Кортизол	0.25	1.0	1.0–500	0.997
Прогестерон	0.5	2.5	2.5–500	0.997
11 α -гидроксипрогестерон	0.5	2.5	2.5–500	0.997

Применение твердофазной аналитической дериватизации для определения катехоламинов в моче

Как и стероидные гормоны, катехоламины играют важную диагностическую роль в организме, что требует разработки простых и надежных методов их определения. Учитывая их высокую полярность и достаточно высокие концентрации в моче, наиболее целесообразным является применение методов очистки и дериватизации.

Проведенные исследования показали, что предъявляемым требованиям в полной мере соответствует подход твердофазной аналитической дериватизации,

в условиях которой аналит сорбируется на патроне, после чего не элюируется с него, а подвергается модификации непосредственно на патроне.

В случае определения катехоламинов наиболее эффективное извлечение из мочи возможно с использованием катионообменных сорбентов (Biotage Isolute SCX 100 мг). Для этого их надо предварительно кондиционировать и активировать для обеспечения эффективной сорбции аналита из матрицы 1 мл метанола и 1% раствором муравьиной кислоты в воде. Затем 1 мл аликвоты мочи пропускали через патрон для ТФЭ, после чего загружали 500 мкл боратного буфера (рН 9.5) и 500 мкл дериватирующего агента FMOC-Cl. Патрон оставляли при комнатной температуре на 20 мин для протекания реакции дериватизации. Полученные дериваты смывали 1 мл 5% раствором ацетата аммония, элюат собирали в стеклянные вials для проведения дальнейшего анализа.

Модификация катехоламинов на поверхности сорбента SCX несколько осложняется тем, что для протекания реакции необходима загрузка не только самого агента, но и буры, которая способна частично (или полностью, в зависимости от объема) элюировать аналиты с патрона, обеспечив тем самым проскок. По сравнению с другими видами сорбентов применение катионообменного сорбента имеет еще одно преимущество: поскольку элюирование осуществляется водным раствором, уширения пика из-за присутствия большого количества органической фазы в пробе не происходит, а растворенные в пробе соли также не удерживаются на сорбенте во время загрузки пробы. Оптимизация условий дериватизации представлена на рис 24.

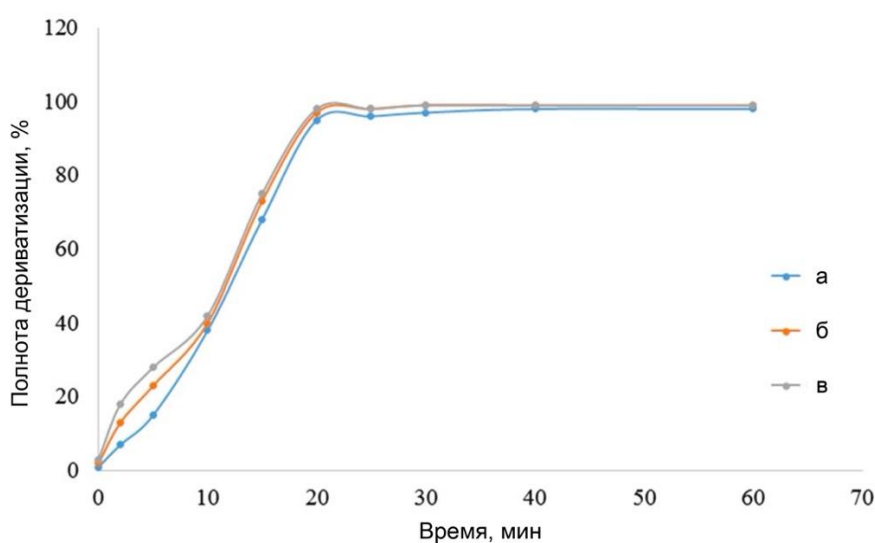


Рисунок 24 – Зависимость полноты дериватизации от времени реакции (а – FMOC-адреналин, б – FMOC-октопамин, в – FMOC-допамин)

Метрологические характеристики предложенной методики приведены в табл. 11.

Таблица 11 – Некоторые метрологические характеристики методики определения катехоламинов и их производных*

*Е – полнота дериватизации

Вещество	Е, %	Линейность		РКК (нг/мл)	Точность (%)		Воспроизводимость (%)		Предел детектирования (нг/мл)
		r ²	n		в один день	в разные дни	в один день	в разные дни	
ФМОС-адреналин	106	0.996	3	10	-7.9	-10.1	11.5	14.8	2.5
				100	3.5	3.9	7.4	11.6	
				500	1.1	1.5	5.5	8.1	
ФМОС-допамин	86	0.993	3	25	13.1	14.2	9.3	13.2	25
				100	5.6	5.9	6.2	9.9	
				500	2.3	3.1	2.1	4.1	
ФМОС-октопамин	87	0.996	3	10	11.7	13.2	8.8	13.5	5
				100	6.5	9.4	4.6	9.7	
				500	2.1	3.4	4.5	9.5	

Оценку полноты дериватизации катехоламинов и их производных проводили по уравнению:

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

где S – соответствующие площади пиков.

Таким образом, применение твердофазной аналитической дериватизации катехоламинов и их производных позволило достичь не только количественного выхода реакции, сопоставимого с протеканием процесса в растворе, но и значительно сократить затрачиваемое на неё время.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность применения методологии твердофазной аналитической дериватизации для анализа биологических жидкостей на примере модификации катехоламинов на поверхности ионнообменного сорбента, обеспечивающей одновременную очистку и модификацию аналитов для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа. Изучены особенности применения методологии твердофазной аналитической дериватизации к реальным объектам, проведено её сопоставление с известным подходом дериватизации в растворе.

2. Рассмотрены различные варианты применения методологии нецелевого скрининга с использованием квадруполь-времяпролетных масс-спектрометров для решения задач аналитической токсикологии и изучения метаболизма ксенобиотиков, основанные на автоматическом выборе ионов-прекурсоров и ионов-продуктов, а также широкополосном пропускании ионов-прекурсоров в ячейку соударений. В зависимости от задачи нецелевого скрининга предпочтение может отдаваться одному из описанных алгоритмов исследования.

3. С использованием методологии нецелевого скрининга изучен метаболизм нового ноотропного препарата унифирама, выявлены два потенциальных метаболита, которые могут определяться в широких временных рамках, особенно при курсовом употреблении препарата. Оценка метаболизма проводилась с использованием смешанного подхода пробоподготовки с целью выявления наличия конъюгатов и их типа – глюкуронидные или сульфатные. Установлено, что после минерального гидролиза определить унифирам или его метаболиты ввиду их деградации не представляется возможным.

4. Рассмотрены возможности дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для концентрирования и количественного определения некоторых андрогенных анаболических стероидов, эстрагенов и глюкокортикостероидов в моче. Изучено влияние различных диспергентов, экстрагентов и их соотношений, оценено влияние солевого фона, pH среды и условий деконъюгирования на эффективность экстракции и чувствительность определения аналитов, изучена стабильность образцов и воспроизводимость результатов при хранении проб.

5. Обоснована необходимость применения полного цикла исследования в вопросах пищевой безопасности профессиональных спортсменов: отмечены потенциальные источники запрещенных ВАДА соединений не только в биологически активных добавках, но и продуктах питания. Показано, что термическая обработка этих продуктов не всегда позволяет избавиться от запрещенных препаратов, а употребление загрязненной ими продукции способно привести к дисквалификации спортсмена.

6. Предложен полный аналитический цикл обнаружения наркотических и психоактивных веществ от растительного сырья до биологических жидкостей человека, приведены метрологические характеристики разработанных методик, обсуждены вопросы концентрирования аналитов в различных объектах, приведены методы их определения с использованием различных методов хроматографии и хроматомасс-спектрометрии для целей аналитической токсикологии, криминалистической экспертизы и допинг-контроля.

7. Разработана, валидирована и аттестована методика определения мельдония в моче с использованием УВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией в режиме гидрофильной хроматографии. Аттестованная методика МИ 02067847.02-2017 «Массовая концентрация мельдония в моче человека методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием» внесена в Федеральный реестр аттестованных методик (методы) измерений ФР.1.31.2018.29251.

8. Выявлены и идентифицированы представители новых классов допинг-агентов: релизинг-пептидов гормона роста, селективных модуляторов андрогенных рецепторов, некоторых стимуляторов и наркотических веществ. Показано, что в отношении селективных модуляторов андрогенных рецепторов и их метаболитов, а также исследованных стимуляторов и наркотических веществ возможна унификация методик, направленных на скрининг широкого спектра допинг-агентов, таких как анаболические стероиды, глюкокортикостероиды, наркотики и стимуляторы, описанных ранее.

9. Разработаны методики целевого скрининга наиболее распространенных наркотических и психоактивных веществ в растительном сырье и биологических жидкостях человека, включая «аптечные наркотики».

10. Проведено сравнение методологии «Wrong-way round ionization» с известными методами определения релизинг-пептидов гормона роста в режиме гидрофильной хроматографии и классическим определением с использованием обращено-фазовой УВЭЖХ-МС/МС. Показано, что несмотря на возможность переноса протона в газовой среде от аммиака на молекулы аналита и формирование преимущественно монозарядных ионов добиться большей чувствительности по сравнению с использованием подкисленной подвижной фазы не удастся. Кроме того, применение подщелоченной подвижной фазы требует подбора подходящей хроматографической колонки, способной длительное время обеспечивать устойчивость системы в щелочной среде.

11. Проведено сравнение эффективности различных сорбентов для извлечения релизинг-пептидов гормона роста и селективных модуляторов

андрогенных рецепторов из мочи, оценена их емкость, фактор концентрирования для их последующего УВЭЖХ-МС/МС определения.

12. Оценена эффективность применения неэндкепированного октадецильного сорбента для извлечения тропановых алкалоидов и ряда фенольных соединений из растительного сырья для последующего анализа методами газовой и жидкостной хроматографии. Показано, что применение ТФЭ позволяет достичь предела обнаружения 10 мкг/мл при их ВЭЖХ определении с использованием диодноматричного детектора.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Учебник

1 Аналитическая химия. В 3 т. Т. 3 Инструментальные методы анализа. Часть 2 / [А.З. Темердашев и др.] под ред. проф. А.А. Ищенко. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2020 — 504 с.

Статьи, входящие в систему цитирования WoS, Scopus и Перечень ВАК:

2 Колычев, И.А. ВЭЖХ определение некоторых алкалоидов опия на семенах мака пищевого / И.А. Колычев, А.З. Темердашев, Н.В. Киселева, А.Г. Кальницкий // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2011. — Т. 77. — № 6. — С. 14–17.

3 Темердашев, А.З. Хроматографическое определение некоторых тропановых алкалоидов в дурмане индийском / А.З. Темердашев, И.А. Колычев, Н.В. Киселева // Журн. аналит. химии. — 2012. — Т. 67. — № 12. — С. 1084–1090.

Temerdashev, A.Z. Chromatographic determination of some tropane alkaloids in *Datura metel* / A.Z. Temerdashev, I.A. Kolychev, N.V. Kiseleva // J. Anal. Chem. — 2012. — Vol. 67. — P. 960–966.

4 Темердашев, А.З. ГХ-МС и ВЭЖХ-МС-определение некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения — производных n-алкил-3-индолилкетонов, α-аминоарилкетонов, p-аминобензойных кислот, каннабиноидов и тропановых алкалоидов / А.З. Темердашев, Н.В. Киселева, И.А. Колычев, А.Г. Кальницкий // Аналитика и контроль. — 2012. — Т. 16. — № 3. — С. 240–247.

5 Темердашев, А.З. Эволюция новых наркотических средств и методы их определения / А.З. Темердашев, А.М. Григорьев, И.В. Рыбальченко // Журн. аналит. химии. — 2014. — Т. 69. — № 9. — С. 899–926.

Temerdashev, A.Z. Evolution of new narcotic substances and methods of their determination / A.Z. Temerdashev, A.M. Grigor'ev, I.V. Rybal'chenko // J. Anal. Chem. — 2014. — Vol. 69. — P. 817–844.

6 Темердашев, А.З. Определение некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения с использованием методов хромато-масс-спектрометрии / А.З. Темердашев, Н.В. Киселева, В.Г. Матвиенко // Аналитика и контроль. — 2014. — Т. 18. — № 3. — С. 266–279.

7 Лабутин, А.В. Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / А.В. Лабутин, А.З. Темердашев // Масс-спектрометрия. — 2015. — Т. 12. — № 1. — С. 30–38.

Labutin, A.V. Nontarget screening of the markers of synthetic cannabinoids in urine using HPLC–MS/MS / A.V. Labutin, **A.Z. Temerdashev** // J. Anal. Chem. – 2015. – Vol. 70. – № 14. – P. 1620–1628.

8 Определение некоторых катинонов, тропановых алкалоидов и "аптечных наркотиков" в моче / А.А. Азарян, **А.З. Темердашев**, Е.В. Светличная, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2016. – Т. 71. – № 9. – С. 995–1004.

Determination of some cathinones, tropane alkaloids, and "pharmaceutical narcotics" in urine / A.A. Azaryan, **A.Z. Temerdashev**, E.V. Svetlichnaya, [et al.] // J. Anal. Chem. – 2016. – Vol. 71. – № 9. – P. 955–964.

9 **А.З. Темердашев** Применение ВЭЖХ-МС/МС для определения некоторых инсулиноподобных факторов мышечного роста / А.З. Темердашев, А.В. Горшенина, Е.В. Светличная // Аналитика и контроль. – 2016. – Т. 20. – № 2. – С. 154–160.

10 Применение методов хромато-масс-спектрометрии для контроля спортивного питания и препаратов, реализующихся через интернет / **А.З. Темердашев**, А.А. Азарян, А.В. Лабутин, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2017. – Т. 72. – № 11. – С. 1032–1043.

Application of chromatography–mass spectrometry methods to the control of sport nutrition and medicines marketed via internet / **A.Z. Temerdashev**, A.A. Azaryan, A.V. Labutin, [et al.] // J. Anal. Chem. – 2017. – Vol. 72. – № 11. – P. 1184–1192.

11 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. 885–889.

Azaryan, A.A. Determination of meldonium in human urine by hplc with tandem mass spectrometric detection / A.A. Azaryan, **A.Z. Temerdashev**, E.V. Dmitrieva // J. Anal. Chem. – 2017. – Vol. 72. – № 10. – P. 1057–1060.

12 Лабутин, А.В. Идентификация (2-аминопропил)бензофурана и его метаболитов в моче человека / А.В. Лабутин, **А.З. Темердашев** // Журн. аналит. химии. – 2017. – Т. 72. – № 7. – С. 650–656.

Labutin, A.V. Identification of (2-aminopropyl)benzofuran and its metabolites in human urine / A.V. Labutin, **A.Z. Temerdashev** // J. Anal. Chem. – 2017. – Vol. 72. – № 7. – P. 770–776.

13 Определение андарина (S-4), селективного модулятора андрогенных рецепторов, и ибутаморена (МК-677), непептидного секретатога гормона роста, в моче ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / Е.В. Дмитриева, **А.З.**

Темердашев, А.А. Азарян, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2018. – Т. 73. – № 7. – С. 523–528.

Determination of andarine (S-4), a selective androgen receptor modulator, and ibutamoren (МК-677), a nonpeptide growth hormone secretagogue, in urine by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometric detection / E.V. Dmitrieva, **A.Z. Temerdashev**, A.A. Azaryan, [et al.] // J. Anal. Chem. – 2018. – Vol. 73. – № 7. – P. 674–678.

14 Использование твердофазной экстракции для определения используемых в спорте лекарственных средств в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС / Е.В. Дмитриева, **А.З. Темердашев**, А.А. Азарян, [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 236–244.

15 LC–MS/MS determination of catecholamines in urine using FMOC-Cl derivatization on solid-phase extraction cartridge / **A. Temerdashev**, A. Azaryan, E. Dmitrieva, [et al.] // Chromatographia. – 2018. – Vol. 11. – № 11. – P. 1487–1494.

16 Применение УВЭЖХ-МС/МС для определения в моче некоторых анаболических агентов и ноотропов / Е.В. Дмитриева, **А.З. Темердашев**, А.А. Азарян, [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – № 1. – С. 28–34.

17 Использование твердофазной экстракции для определения AICAR в моче методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии / Е.В. Дмитриева, **А.З. Темердашев**, А.А. Азарян, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2019. – Т. 74. – № 9. – С. 668–672.

Application of solid-phase extraction for the quantification of urinary AICAR by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry / E.V. Dmitrieva, **A.Z. Temerdashev**, A.A. Azaryan, [et al.] // J. Anal. Chem. – 2019. – Vol. 74. – № 9. – P. 861–864.

18 A novel approach to the quantification of urinary aryl- propionamide-derived SARMs by UHPLC–MS/MS / **A. Temerdashev**, E. Dmitrieva, A. Azaryan, [et al.] // Biomed. Chromatogr. – 2019. – Vol. 34. – № 1. – e4700.

19 **Темердашев**, **А.З.** Применение методов хромото-масс-спектрометрии в целях проведения комплексной посмертной химико-токсикологической экспертизы / А.З. Темердашев, Э.М. Гашимова // Сорбц. хроматогр. проц. – 2019. – Т. 19. – № 5. – С. 542–549.

20 УВЭЖХ-МСВР – определение некоторых рилизинг-пептидов гормона роста в моче / **А.З. Темердашев**, Е.В. Дмитриева, А.А. Азарян, [и др.] // Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23. – № 4. – С. 509–516.

21 **Temerdashev**, **A.** Meldonium determination in milk and meat through UHPLC-HRMS / A. Temerdashev, E. Dmitrieva, A. Azaryan // Heliyon. – 2020. – Vol. 6. – № 8. – e04771.

22 **Темердашев, А.З.** Методы определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов / А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева // Журн. аналит. химии. – 2020. – Т. 75. – № 7. – С. 579–596.

Temerdashev, A.Z. Methods for the Determination of Selective Androgen Receptor Modulators / A.Z. Temerdashev, E.V. Dmitrieva // J. Anal. Chem. – 2020. – Vol. 75. – № 7. – P. 579–596.

23 Подольский, И.И. Хроматографическая оценка влияния остарина и эрдистерона на стероидный профиль мужчин и женщин / И.И. Подольский, Е.С. Мочалова, **А.З. Темердашев** // Сорб. хроматогр. проц. – 2020. – Т. 20. № 4. – С. 445–453.

24 Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-
HRMS detection / E. Dmitrieva, **A. Temerdashev**, A. Azaryan, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2020. – Vol. 1159. – 122390.

25 Азарян, А.А. УВЭЖХ-МСВР определение дансильных производных адреналина и дофамина в слюне человека / А.А. Азарян, Е.В. Дмитриева, **А.З. Темердашев** // Аналитика и контроль. – 2020. – Т. 24. – № 4. – С. 298–304.

26 Изучение метаболизма нового ноотропного препарата – унифирама методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии высокого разрешения / **А.З. Темердашев**, М.О. Зорина, Е.В. Дмитриева, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2021. – Т. 76. – № 2. – С. 143–150.

A Study of the Metabolism of the New Nootropic Preparation Unifiram by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry / **A.Z. Temerdashev**, M.O. Zorina, E.V. Dmitrieva, [et al.] // J. Anal. Chem. – 2021. – Vol. 76. – № 2. – P. 202–209.

Патенты:

27 Патент № 2429238 Российская Федерация, МПК C07D 489/02, B01D 11/00. Способ определения опийных алкалоидов : № 2010112141 : заявл. 29.03.2010 : опубл. 20.09.2011 / **Темердашев А.З.**, Колычев И.А., Киселева Н.В., Кальницкий А.Г. : заявитель ФГБОУ ВПО КубГУ. – 13 с. : ил. – Текст : непосредственный.

28 Патент № 2639475 Российская Федерация, МПК G01N 30/72, G01N 33/49. Способ определения мельдония в моче человека : № 2017112225 : заявл.: 10.04.2017 : опубл.: 21.12.2017 / Азарян А.А., **Темердашев А.З.**, Киселева Н.В. : заявитель ФГБОУ ВО «КубГУ». – 11 с. : ил. – Текст : непосредственный.

29 Патент № 2688184 Российская Федерация, МПК G01N 33/48, G01N 33/50. Способ определения производных катехоламинов в моче : № 2018112124 : заявл.: 03.04.2018 : опубл.: 21.05.2019 / Азарян А.А., **Темердашев А.З.**,

Дмитриева Е.В., Гашимова Е.В. : заявитель ФГБОУ ВО «КубГУ». – 11 с. : ил. – Текст : непосредственный.

30 Патент № 2695033 Российская Федерация, МПК G01N 30/72. Способ стабилизации шкалы масс и калибрانت для его осуществления : № 2018114008 : заявл. 16.04.2018 : опубл. 18.07.2019 / **Темердашев А.З.**, Азарян А.А, Дмитриева Е.В., Гашимова Э.М. : заявитель ФГБОУ ВО КубГУ. – 7 с. : ил. – Текст : непосредственный.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам УНПК «Аналит» и кафедры аналитической химии, к.х.н. И.А. Колычеву, А.Г. Кальницкому, сотрудникам главного управления ЭКЦ МВД по Краснодарскому краю, Бюро СМЭ г. Краснодара, ХТЛ наркодиспансеров г. Краснодара и г. Томска за оказанную помощь и содействие.

Темердашев Азамат Зауалевич

**Хроматомасс-спектрометрические методы в аналитической
токсикологии и допинг-контроле**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора химических наук

Подписано в печать 16.03.2021 г. Формат 60 84 ¹/₁₆
Печать цифровая. Уч.-изд. л. 2,1. Тираж 110 экз. Заказ № 4421.1
Издательско-полиграфический центр
Кубанского государственного университета
350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149