

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

На правах рукописи



ПОДОЛЬСКИЙ ИЛЬЯ ИГОРЕВИЧ

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
«СТЕРОИДНОГО ПРОФИЛЯ» СПОРТСМЕНОВ**

1.4.2 – Аналитическая химия (химические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
доцент Темердашев А.З.

Краснодар

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 Аналитический обзор	11
1.1 Общие сведения о стероидах.....	11
1.2 Развитие органов надзора по контролю за применением допинга в спорте 15	
1.3 Матрица для построения градуировки	18
1.4 Популяционные границы, влияние генотипа на «стероидный профиль» ..	20
1.5 Вещества, оказывающие влияние на «стероидный профиль».....	23
1.5.1 Не входящие в перечень запрещенных к употреблению веществ (не допинговые препараты).....	23
1.5.2 Запрещённые ВАДА препараты	27
1.6 Деградация мочи.....	32
1.7 Стероидомика.....	34
1.8 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования.....	36
2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.2 Материалы, реактивы и использованное оборудование	38
2.3 Приготовление вспомогательных растворов	46
2.3.1 Фосфатный буферный раствор	46
2.3.2 Карбонатный буферный раствор	46
2.3.3 Раствор для дериватизации	46
2.4 Оптимизация условий хромато-масс-спектрометрического определения «стероидного профиля» в моче	46
2.5 Оптимизация условий УВЭЖХ-МС/МС определения соединений, искажающих «стероидный профиль»	62
2.6 Пробоподготовка мочи для последующего ГХ-МС/МС анализа.....	66
2.7 Обоснование выбора маркеров пробоподготовки при проведении ГХ- МС/МС анализа	67

2.8	Пробоподготовка мочи для последующего УВЭЖХ-МС/МС анализа	68
2.9	Выбор матрицы для приготовления калибровочных растворов мочи	68
2.10	Маркеры деградации мочи	72
2.11	Построение градуировочной зависимости для маркеров «стероидного профиля»	74
2.12	Измерение относительной плотности мочи.....	77
2.13	Метрологическая аттестация методики определения маркеров «стероидного профиля».....	79
2.14	Вычисление собственных критериев определения «стероидного профиля» 82	
2.15	Применение собственных критериев оценки «стероидного профиля» для реальных образцов	87
2.15.1	Пробоподготовка для ГХ-С-ИМС анализа.....	89
2.15.2	Твердофазная экстракция.....	89
2.15.3	Гидролиз и ЖЖЭ.....	90
2.15.4	Первичное ВЭЖХ фракционирование.....	91
2.15.5	Дериватизация	94
2.15.6	Вторичное ВЭЖХ фракционирование.....	94
2.15.7	Параметры системы ГХ-С-ИМС	97
2.15.8	Результаты анализа	98
2.16	Поиск новых критериев оценки деградации мочи.....	99
2.17	Влияние остарина на маркеры «стероидного профиля»	112
2.18	Влияние эрдистерона на маркеры «стероидного профиля».....	119
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВАДА – Всемирное Антидопинговое Агентство
ADAMS – Anti-Doping Administration & Management System
МОК – Международный Олимпийский Комитет
МС – масс-спектрометрия
МС/МС – тандемная масс-спектрометрия
ГХ – газовая хроматография
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
УВЭЖХ – ультра высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ-С-ИМС – газовая хроматография-сжигание-изотопная масс-спектрометрия
МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения
ЭИ – электронный удар
«СМ» - «Свободная моча»
МВИ – мониторинг выделенных ионов
МЗР – мониторинг заданных реакций
ВС – внутренний стандарт
РКК – раствор контроля качества
ТМС – триметилсилил
МСТФА – N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамид
ДТТ – дитиотреитол
ДГТ – дигидротестостерон
Т – тестостерон
Е – эпитестостерон
5 α -диол – 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол
5 β -диол – 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол
5 β -дион – 5 β -андростан-3 α ,17 β -дион
Андро – андростерон
Этио – этиохоланолон
ЭпиАндро – эпиандростерон

ДГЭА – дегидроэпиандростерон

ХГЧ – хорионический гонадотропин

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ТФЭ – твердофазная экстракция

SARM – селективный модулятор андрогенных рецепторов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ПКО – предел количественного обнаружения

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

МГК – метод главных компонентов

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирного Антидопингового Агентства (ВАДА) за 2020 г. на обнаружение анаболических стероидов приходится 47% от общего числа положительных проб, из которых 9.5% составляют эндогенные стероиды экзогенного происхождения [1]. На сегодняшний день антидопинговые лаборатории проводят определение экзогенных стероидов и их метаболитов методами газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС/МС) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС). Стоит отметить, что, на данный момент, единой стандартизированной методики их определения не существует, поскольку ВАДА регламентирует лишь требования, предъявляемые к применяющимся в лабораториях методикам, но не занимается созданием методического обеспечения. Единичные технические документы, представленные на сайте и содержащие описания процедур подготовки проб к анализу, являются частными разработками отдельных лабораторий, приведенными в качестве примера при определении отдельных показателей.

Критерием оценки пригодности методики служит регулярное прохождение специализированных тестирований [2]. При этом, главной задачей в разработке новых методик и подходов к проведению анализа, является снижение пределов обнаружения и поиск новых долгоживущих метаболитов [3], но для выявления факта употребления эндогенных стероидов требуется применение нестандартного для химической токсикологии метода.

Альтернативным вариантом для решения такого рода задач стал предложенный в 1994 г. [4] метод газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией (ГХ-С-ИМС), не совсем характерный для лабораторий допингового контроля [5-9]. Используя разницу между отношениями изотопов углерода $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ эндогенных и экзогенных стероидов, метод позволяет с высокой точностью определять природу происхождения. С другой стороны, даже после усовершенствований, повышающих экспрессность и снижающих цену анализа,

метод имеет ряд существенных ограничений, не позволяющих применять его ко всем поступающим в лабораторию образцам [10-14]. Исходя из этого, лабораторной комиссией ВАДА в 1995 г. было принято решение проводить анализ ГХ-С-ИМС только при повышенном значении отношения тестостерона к его эписимеру – эпитестостерону ($T/E > 4$). Данный критерий был разработан еще в 1980 г. профессором Манфредом Доники и изначально был выше ($T/E > 6$) [15]. В ходе проведения дальнейших популяционных исследований было установлено, что природное отношение T/E имеет зависимость от этнической принадлежности. Например, люди с азиатским типом метаболизма имеют T/E не больше 0.4, а с африканским типом метаболизма природное значение T/E может превышать 6 [16]. Некоторые спортсмены попадали под постоянное подозрение из-за особенностей своего персонализированного значения T/E , а другие использовали свои низкие значения данного отношения, и безнаказанно принимали синтетический тестостерон. Во избежание подобных случаев в 2014 г. ВАДА ввела во всех аккредитованных лабораториях обязательное количественное определение шести эндогенных стероидов (тестостерон, эпитестостерон, андростерон, этиохоланолон, 5α -андростан- $3\alpha,17\beta$ -диол и 5β -андростан- $3\alpha,17\beta$ -диол). Данный набор стероидов получил название «стероидный профиль». Каждая аккредитованная ВАДА лаборатория обязана отправлять данные о «стероидном профиле» в систему управления результатами (ADAMS), где для каждого спортсмена формируется собственная база данных с результатами анализа. Согласно требованиям этой системы в случае, когда значение одного или нескольких параметров «стероидного профиля» не соответствует ранее полученным, система автоматически отправляет запрос в лабораторию на подтверждающий анализ методом ГХ-С-ИМС [17]. В подавляющих случаях подтверждающий анализ дает отрицательный результат, так как изменение параметров «стероидного профиля» зачастую связано не с приемом запрещенных препаратов, а с другими факторами, которые также необходимо учитывать.

Цель диссертационного исследования – разработка оригинальных хромато-масс-спектрометрических методик определения маркеров «стероидного профиля» спортсменов, отвечающих международным требованиям к допинговому контролю.

Для достижения поставленных целей решали следующие задачи:

- разработка и оптимизация условий хромато-масс-спектрометрического разделения и детектирования маркеров «стероидного профиля»;
- обоснование состава матрицы с известным содержанием стероидов для приготовления образцов мочи и установления маркеров ее деградации;
- разработка методик определения веществ, влияющих на концентрацию маркеров «стероидного профиля» в моче человека; апробация разработанной методики в анализе реальных образцов;
- уточнение популяционных границ соотношений и концентраций маркеров «стероидного профиля» и разработка методологии выявления вероятно положительных образцов;
- разработка методики установления природы происхождения 19-норандростерона с использованием газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией;
- применение уточненных популяционных границ для оценки влияния остарина и экидистерона на маркеры «стероидного профиля».

Научная новизна диссертационного исследования – разработка методик хромато-масс-спектрометрического определения маркеров «стероидного профиля» – тестостерона, эпитестостерона, форместана, 5 β -андростандиона (от 1 нг/мл), 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола (от 2 нг/мл), 5 β -андростан-3 α ,17 β -диола (от 5 нг/мл), дегидроэпиандростерона (от 10 нг/мл) а эндогенных стероидов с более высокими содержаниями - на нижнем уровне эндогенных концентраций (андростерона и этиохоланолона – от 200 нг/мл).

Разработана оригинальная методика установления эндогенного или экзогенного происхождения 19-норандростерона с использованием газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией.

Хемометрическим анализом уточнены популяционные границы соотношений и маркеров «стероидного профиля» спортсмена по данным их содержаний в более чем 10000 образцах мочи мужчин и женщин.

Практическая значимость. Разработанная методика определения эндогенных анаболических стероидов, отвечающая критериям ВАДА, внедрена в практику антидопинговой лаборатории.

Разработана методика определения ряда соединений, существенно влияющих на концентрации маркеров «стероидного профиля» (финасетрид, дутастерид, пробенецид, этанол). Показано влияние деградации образцов мочи, остарина и экдистерона на содержание стероидных гормонов в моче.

Положения, выносимые на защиту:

- методика установления природы происхождения 19-норандростерона;
- методика хроматомасс-спектрометрического разделения и определения эндогенных стероидных гормонов (маркеров «стероидного профиля»);
- результаты хемометрического анализа более чем 10000 образцов мочи для уточнения популяционных границ соотношений и маркеров «стероидного профиля» в моче;
- влияние остарина на содержание андрогенных стероидов в моче.
- методическое обоснование состава матрицы с известным содержанием стероидов для приготовления образцов мочи и установления маркеров ее деградации;
- хемометрическое обоснование уточнения популяционных границ соотношений и концентраций маркеров «стероидного профиля» спортсмена.

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 эндогенных стероидов и 19-норандростерона отвечают требованиям всемирного антидопингового агентства (ВАДА). Оценка правильности предлагаемых подходов основывается на результатах анализа более чем 10000 образцов мочи мужчин и женщин.

Теоретическая значимость. С помощью метода изотопной масс-спектрометрии подтверждён прием запрещенного стероидного препарата, предварительно обнаруженного с использованием предложенной методологии выявления вероятно положительных проб.

Изучено влияние незапрещенного фитостероида экидистерона на маркеры «стероидного профиля». Изучено влияние селективного модулятора андрогенных рецепторов остарина на маркеры «стероидного профиля».

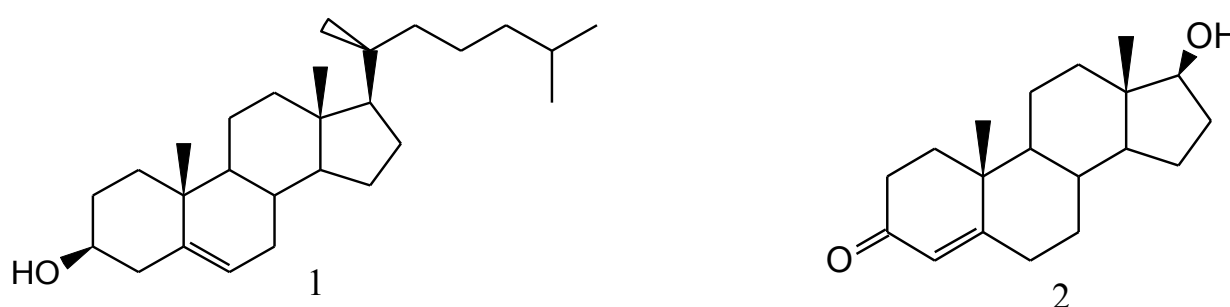
Предложенная методология выявления вероятно положительных проб соответствует требованиям ВАДА. Калибровочные образцы, приготовленные на матрице мочи, пропущенной через патрон твердофазной экстракции, снижают искажения результатов, связанных с матричными эффектами при определении маркеров «стероидного профиля» в моче. Применение тандемной масс-спектрометрии и идентификация целевого соединения по двум селективным переходам значительно снижают возможность ошибки. Использование дейтерированных внутренних стандартов позволяет с высокой точностью проводить количественный анализ целевых соединений в моче.

Применение методики изотопной хромато-масс-спектрометрии в тандеме с методикой определения маркеров «стероидного профиля» позволяет безошибочно определять применение стероидов, которые могут иметь как эндогенное, так и экзогенное происхождение.

1 Аналитический обзор

1.1 Общие сведения о стероидах

Тестостерон – стероидный гормон, преимущественно синтезируемый у мужчин из холестерина клетками Лейдига, а также в небольших количествах яичниками у женщин и корой надпочечников и у мужчин, и у женщин (рисунок 1).



1 – холестерин; 2 – тестостерон

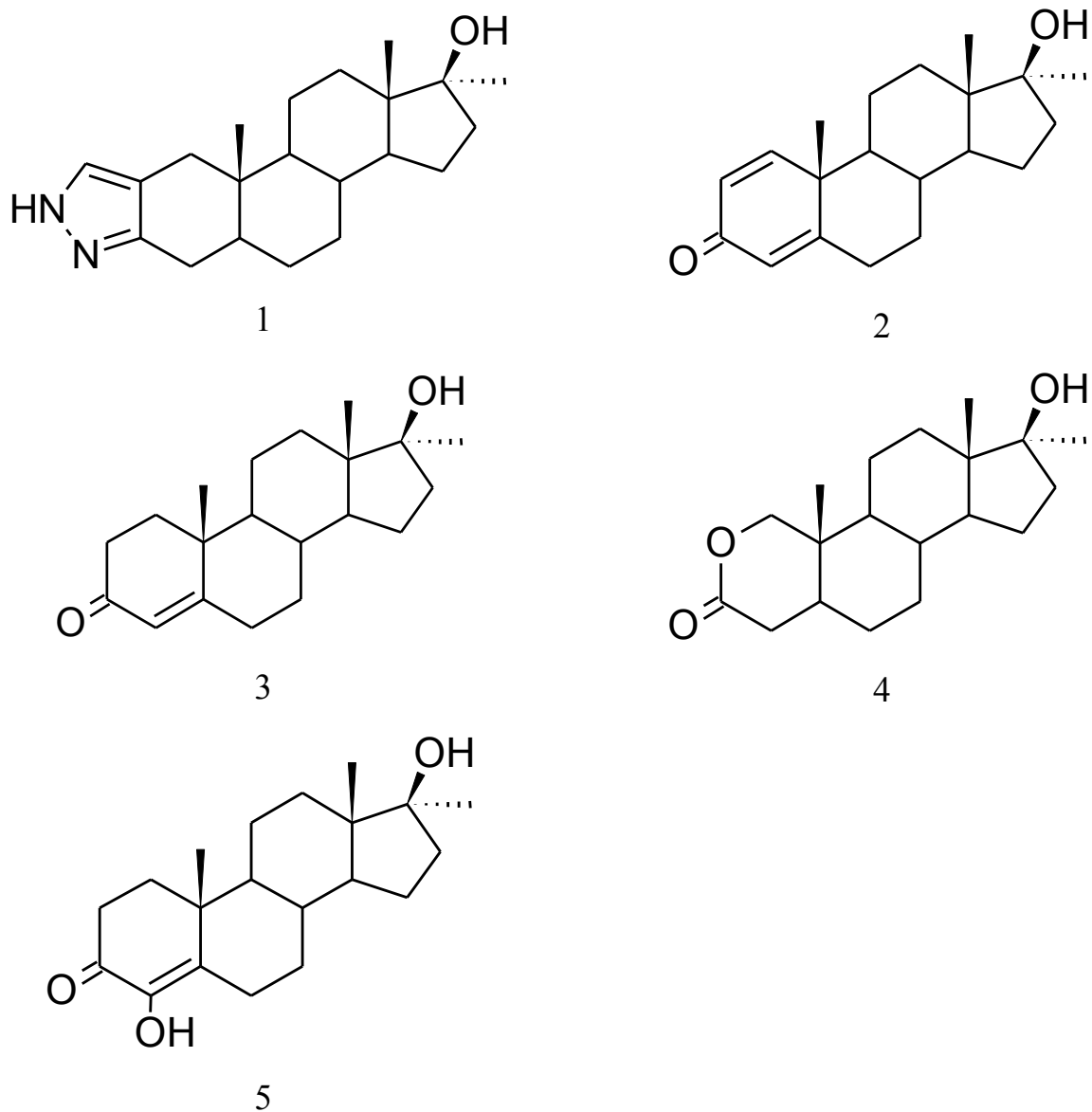
Рисунок 1 – Структурные формулы холестерина и тестостерона

Тестостерон выполняет различные функции на разных этапах жизни человека. На стадии формирования эмбриона действие андрогенов имеет решающее значение при формировании мужского фенотипа. В период полового созревания гормон отвечает за формирование вторичных половых признаков. У взрослых тестостерон регулирует многие физиологические процессы, такие как сексуальные и когнитивные функции, эритропоэз, уровни липидов в плазме, костный метаболизм, а также синтез белка.

Впервые он был выделен в 1935 г. из яичек быка Эрнстом Лако, в том же году химик из Югославии Леопольд Ружичка синтезировал его из холестерина, за что в 1939 г. совместно с Бутенандтом получил Нобелевскую премию по химии. Вскоре было обнаружено, что при пероральном приеме, тестостерон всасывается в тонкий кишечник и попадает в печень через воротную вену, где быстро метаболизирует,

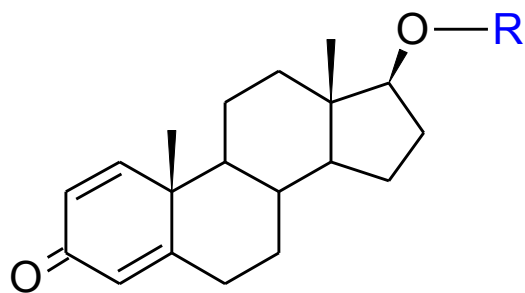
главным образом в неактивные соединения [18]. Открытие тестостерона подтолкнуло ученых к синтезу его аналогов, которые имели такие же анаболические и андрогенные свойства, но обладали бы меньшей скоростью инактивации. Такие вещества в основном представляют собой 17 α -алкилированные производные тестостерона, устойчивые к деградации в печени. Этерификация 17 β -гидроксильной группы делает молекулу жирорастворимой, что позволяет использовать препараты в виде инъекций и, следовательно, замедлять высвобождение введенного стероида в кровоток. Структурные формулы наиболее распространенных синтетических анаболических стероидов приведены на рисунках 2 и 3.

Анаболический и андрогенный эффекты возникают при активации андрогенных рецепторов. Разница данных эффектов зависит от органов и тканей-мишеней. Дигидротестостерон отвечает за андрогенный эффект. Из-за повышенного сродства к андрогенным рецепторам данный стероид более эффективен, чем тестостерон. Его образование происходит в ходе первой стадии метаболизма тестостерона при действии фермента 5 α -редуктазы. Активность этого фермента важна в яичках, коже, предстательной железе, кишечнике, мозге, костях и жировых тканях. Поэтому в данных органах преобладает андрогенный эффект. Анаболические эффекты сконцентрированы в мышцах, костях, сердце и почках. Эти органы содержат малое количество 5 α -редуктазы, поэтому в них анаболические-андрогенные стероиды, особенно тестостерон, способствуют синтезу белка, развитию мышечных волокон, эритропоэзу, а также стимуляции или ингибированию роста костей. Более того, анаболические стероиды вытесняют глюкокортикоиды из глюкокортикоидных рецепторов и ингибируют катаболизм мышечного белка, усиливая, таким образом, рост мышечной массы [18].



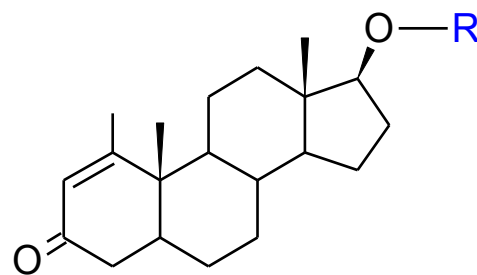
1 – станозолол; 2 – метандиенон; 3 – метилтестостерон; 4 – оксандролон;
5 – оксиместерон

Рисунок 2 – Структурные формулы 17 α -алкилированных производных тестостерона



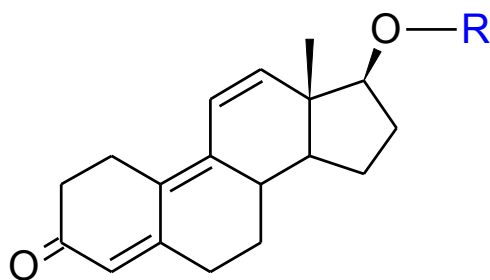
R – ундеционат

1



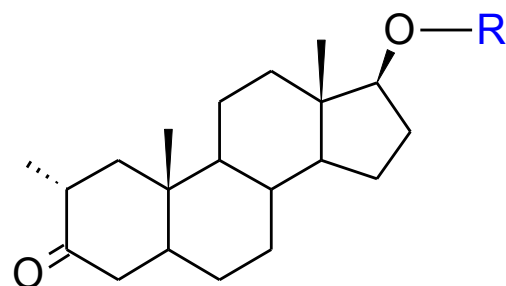
R – ацетат, энантат

2



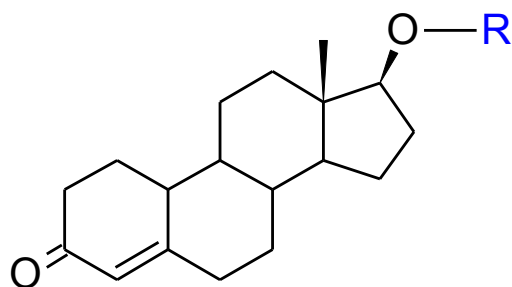
R – ацетат, гексагидробензилкарбонат

3



R – пропионат

4



R – деканоат, фенилпропионат

5

1 – болденон; 2 – метенолон; 3 – тренболон; 4 – дростанолон; 5 – нандролон

Рисунок 3 – Структурные формулы наиболее популярных экзогенных анаболических стероидов в виде 17β-гидроксилированных эфиров

Проводимые с использованием разных подходов клинические исследования доказали положительный анаболический эффект на различных популяциях пациентов. Тестостерон применяли для стимуляции сексуального развития в

случаях задержки полового созревания, а также в случаях, когда яички были удалены хирургическим путем из-за травмы или опухоли. Основным клиническим применением анаболических стероидов является ингибирование потери белка и регенерация мышечной массы после операции. Поскольку анаболические-андрогенные стероиды оказывают влияние практически на весь организм, наблюдаются множественные побочные эффекты, которые зависят как от препарата, дозировки, длительности приема, так и от индивидуальных факторов. Их можно разделить на несколько категорий: сердечно-сосудистые, печеночные, эндокринные/репродуктивные, сухожильные и психологические [18].

1.2 Развитие органов надзора по контролю за применением допинга в спорте

Первое официально задокументированное применение анаболических-андрогенных стероидов человеком датируется 1 июня 1889 г., когда была выпущена статья французского медика Шарля Эдуар Брбун-Секара в журнале *Société de Biologie* в Париже. В этой статье Шарль Эдуар Брбун-Секара рассказал о полученном из яичек собак и морских свинок водном экстракте, который он вводил себе подкожно. По его заявлению, инъекции увеличивали его физическую силу, а также интеллектуальные способности. К сожалению, современники с недоверием отнеслись к его работе, и посчитали, что наблюдаемые положительные эффекты вызваны силой самовнушения автора [19].

В 1945 г. американский микробиолог и писатель Поль Генри де Крюи популяризировал исследования, посвященные тестостерону, в книге “Мужской гормон”. Публикация дала огромный толчок в продвижении тестостерона среди атлетов, что, предположительно, привело к экспериментам с препаратами тестостерона в конце 40-х, начале 50-х бодибилдерами с Западного побережья.

К 60-м годам тестостерон проник практически во все виды спорта, где требовалась сила и выносливость. Ключевым моментом в создании органов контроля за употреблением допинговых субстанций в спорте стал произошедший 26 августа 1960 г. случай в Риме, когда датский велогонщик Кнуд Энемарк Йёнсен,

участвовавший в командной раздельной гонке, упал с велосипеда и погиб. Смерть велогонщика привела к тому, что Международный Олимпийский Комитет (МОК) сформировал в 1961 г. новую структуру – Медицинский комитет. В середине 60-х спортивные федерации стали запрещать спортсменам использовать допинг и к 1967 г. Международный олимпийский комитет поддержал эту идею. Первый в истории допинг контроль был проведен на Зимних Олимпийских играх 1968 г. в Гренобле, Франция. Тогда были протестированы 86 атлетов, но ни один из анализов не дал положительного результата. Масштабное допинг тестирование на стероиды было введено только к 1976 г. на Олимпийских играх в Монреале и, в основном, было основано на радиоиммунологических методах. Тогда были дисквалифицированы 11 человек, 8 из них за употребление анаболических стероидов.

Следующая Олимпиада 1980 г. в Москве показала, что большинство спортсменов использует в качестве допинга тестостерон. Самым важным преимуществом тестостерона в то время было то, что аналитические лаборатории не умели выявлять случаи его применения, так как не могли отличить экзогенный тестостерон от эндогенного. После Олимпиады член Медицинской комиссии МОК Манфред Доники неофициально проанализировал часть собранных во время игр образцов мочи. Результаты его исследований легли в основу формирования новой техники тестирования, принятой в 1983 г. Доники определил, что отношение глюкуронидов тестостерона и эпитестостерона, его неактивного эписмера, не может превышать 6 у нормального человека. Исключением могли выступать только люди с низким уровнем экскреции эпитестостерона, либо с опухолью, производящей андрогены [15]. За счет того, что эпитестостерон отличается от тестостерона только стерической ориентацией гидроксильной группы в 17 положении, а также его уровень в сформировавшемся человеческом организме постоянен, делает его идеальным образцом сравнения для тестостерона. В 1995 г. регламент изменился, и порог для Т/Е снизили до 4.

В то время уже была разработана процедура, позволяющая определять происхождение тестостерона по отношению изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Принцип

обнаружения экзогенного тестостерона заключается в различии отношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в молекуле.

Базовым сырьем для синтеза тестостерона, употребляемого атлетами, являются растительные компоненты сои, риса и пшеницы – ситостерол и стигмастерол (рисунок 4). Содержание изотопа ^{13}C в данных соединениях, а, следовательно, и в синтезируемом из них тестостероне, значительно ниже, чем в эндогенном тестостероне, что позволяет с помощью изотопного анализа определить природу происхождения стероида. Ввиду особенностей развития аналитического приборного парка и стоимости подобного оборудования, данная методика была доступна немногим, и только к 2004 г. ВАДА опубликовало документ, регламентирующий изотопный анализ.



1 – ситостерол; 2 – стигмастерол

Рисунок 4 – Соединения, участвующие в синтезе тестостерона

В настоящее время данный анализ вошел в рутинную практику Антидопинговых лабораторий по всему миру, но, в силу своей сложности, длительности и высокой стоимости, процедуру определения природы происхождения стероидов проводят не для всех образцов.

До 2014 г. данную процедуру проводили только по специальному запросу ВАДА или Спортивной федерации. Она проводилась также в случае, если при скрининговом анализе выполнялся один из следующих критериев: значение Т/Е больше 4, концентрация тестостерона или эпитестостерона превышает 200 нг/мл

для мужчин, концентрация андростерона или этиохоланолона больше 10000 нг/мл, концентрация дегидроэпиандростерона больше 100 нг/мл [20].

В настоящее время к алгоритму выбора проб на изотопный анализ добавлен «стероидный профиль», который включает в себя количественное определение тестостерона и его метаболитов: андростерон, этиохоланолон, 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол и 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол, а также его эписмер – эпитестостерон [21]. «Стероидный профиль» спортсмена записывается в единую систему сбора данных ADAMS при каждом анализе, что позволяет построить индивидуальные референсные интервалы. При выпадении одного из параметров «стероидного профиля» за границу значений, система автоматически отправляет запрос в лабораторию для проведения дополнительного анализа с применением изотопной масс-спектрометрии. Если анализ не приводит к обнаружению запрещенных субстанций, референсный интервал в базе увеличивается.

1.3 Матрица для построения градуировки

Рассматривая состав мочи как матрицу при проведении пробоподготовки необходимо учитывать, что она не имеет постоянного состава и не может иметь единого стандарта, так как зависит от огромного числа переменных, которые невозможно контролировать. Таковыми являются особенность метаболизма индивида и режим питания. Выбор матрицы для приготовления калибровочных растворов имеет огромное значение для определения «стероидного профиля». На данный момент существует три подхода для решения данной задачи.

Первый подход – использование модельных растворов. Данный подход является классическим для количественного анализа, но для определения концентраций стероидов он не подходит. Это было продемонстрировано в работе 1993 г. [22], где авторы в качестве матрицы использовали воду, тем самым доказав, что ошибка при данном способе калибровки может составлять до 30%. Также при использовании растворов на основе матрицы метанола происходит занижение градуировочных коэффициентов [23].

Второй подход – искусственная моча. Когда стало очевидно, что при использовании простых матриц возникают большие погрешности, группа исследователей из Германии предложила использовать “искусственную мочу” [24], которая представляла смесь N,N-диизопропиламиноалканов с длиной боковой цепи C₁₄-C₂₃, но, к сожалению, в работе не проведено сравнение коэффициентов градуировки относительно матрицы мочи. Антидопинговая лаборатория в Лос-Анжелесе, США, для приготовления искусственной матрицы использует значительно большее число компонентов. Матрица готовится путем растворения в 1 литре деионизованной воды 1.3 г хлорида аммония, 0.37 г дигидрата хлорида кальция, 0.45 г лимонной кислоты, 0.80 г креатинина, 0.0012 г гептагидрата сульфата железа II, 0.083 г молочной кислоты, 0.49 г гептагидрата сульфата магния, 0,95 г одноосновного фосфата калия, 2,1 г бикарбоната натрия, 3.2 г декагидрата сульфата натрия, 10 г мочевины, 0.070 г мочевой кислоты и 5.2 г хлорида натрия [25].

Третий подход – использование реальной мочи. Для обнаружения экзогенных стероидов достаточно использовать мочу взрослого человека, не принимавшего анаболические стероиды, куда искусственно можно добавить определяемые соединения. Для определения «стероидного профиля» такая моча не подойдет, так как очевидно будет содержать исследуемые соединения в неизвестных концентрациях. Некоторые исследователи предлагают использовать мочу детей [26]. Авторы не указывают их возраст, но логично предположить, что моча была собрана у детей возраста от 0 до 9 лет, до препубертатного периода, когда уровень андрогенов еще не высок [27]. Однако стоит помнить, что по мере взросления состав мочи также значительно меняется и, в результате, позволяет лишь частично учесть матричные эффекты. В диссертационной работе Е. А. Кочновой [23] проведено сравнение нескольких видов матриц, приготовленных на основе мочи, а также воды и метанола. Основным видом матрицы в итоге была выбрана «Свободная Моча» («СМ»).

Способ ее приготовления заключается в добавлении в мочу фосфатного буфера (рН~6.4), извлечении диэтиловым эфиром из мочи неконъюгированных

стероидов и последующем выпаривании остатков эфира. Таким образом, в полученную матрицу можно добавить исследуемые эндогенные стероиды, но только в неконъюгированном виде. Также в работе Е.А. Кочновой описан метод подготовки матрицы мочи с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ), но он был отвергнут в силу высокой стоимости и низкой экспрессности по сравнению со “свободной мочой”. Первый метод очистки мочи от стероидов с помощью ТФЭ предложил Ханс Гейер в 1995 г. на 12 симпозиуме по допинговым анализам в Кёльне [28]. Для своего исследования он использовал полистерановую смолу Amberlite XAD-2. Но в то время не было необходимости рутинно проводить количественный анализ эндогенных стероидов, поэтому данная методика имела больше научное значение, чем практическое.

1.4 Популяционные границы, влияние генотипа на «стероидный профиль»

В многочисленных исследованиях, проведенных после введения методики определения Т/Е, прослеживается четкая зависимость отношения Т/Е от популяционной принадлежности. Так в Лозаннской антидопинговой лаборатории было проведено фундаментальное исследование, основанное на определении «стероидного профиля» профессиональных футболистов из 4 этнических групп [16]. Всего в эксперименте принимал участие 171 человек (57 африканцев, 32 азиата, 50 европейцев и 32 латиноамериканца). Средние значения Т/Е составили 0.8 для африканцев, 0.2 для азиатов, 1.1 для европейцев и 1.2 для латиноамериканцев. Также были предложены пороговые значения Т/Е для каждой популяции: 5.6 для африканцев, 3.8 для азиатов, 5.7 для европейцев и 5.8 для латиноамериканцев. На рисунке 5 приведено частотное распределение Т/Е, включающее всех участников эксперимента. Тем не менее, зачастую очень сложно определить принадлежность человека к определенной популяции, кроме того, это может вызвать ряд этических затруднений. Подобные исследования лишней раз демонстрируют необходимость установления индивидуальных границ «стероидного профиля».

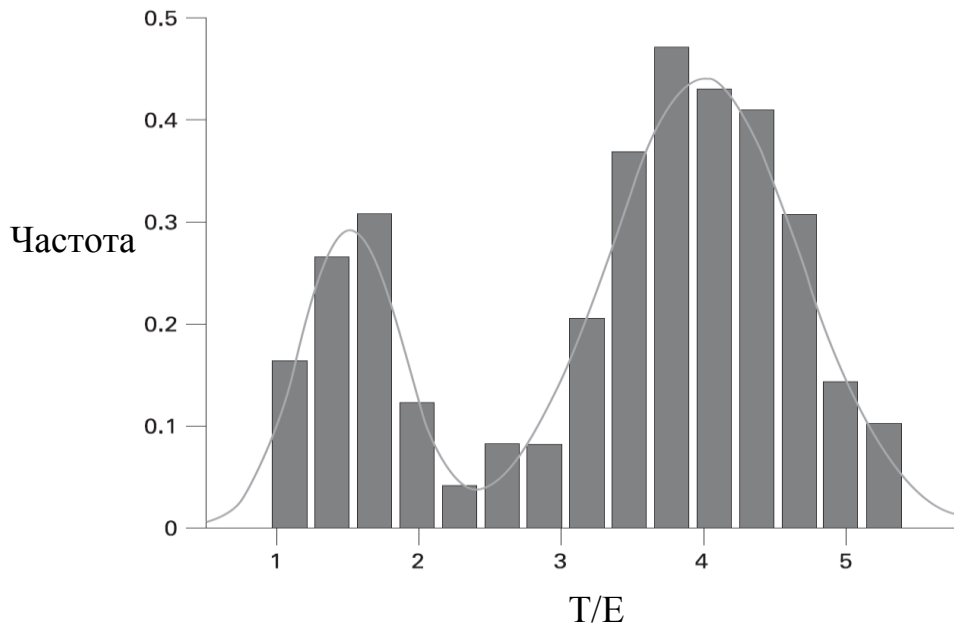


Рисунок 5 – Частотное распределения отношения Т/Е среди участников эксперимента (n=171) [16]

Тестостерон преимущественно выводится из организма в виде глюкуронида, за образование которого отвечают ферменты уридиндифосфат (UDP) и глюкуронилтрансфераза (UGT). Ферменты UGT2B7, UGT2B15 и UGT2B17 известны как основные глюкуронирующие катализаторы андрогенов и их метаболитов у людей [29]. Тестостерон в основном конъюгируется UGT2B17 (96 %) и в меньшей степени UGT2B15 (4 %). Основным андрогенным субстратом UGT2B15 является андростан-3 α -17 β -диол. Фермент UGT2B7 также обладает способностью конъюгировать эпитестостерон, тогда как тестостерон является плохим субстратом для этого фермента. Установлено, что делеционный (del) полиморфизм в гене, кодирующий UGT2B17 [30], коррелирует с уровнями тестостерона в моче [31]. Было обнаружено, что испытуемые, у которых отсутствует этот ген, показывают отношение Т/Е ниже 0.4 [30-32]. Такой полиморфизм гораздо чаще встречается в азиатской популяции, чем в европейской, а его распространенность оценивается в 66.7% у азиатов против 9.3% у европейцев [29].

Всего существуют три вида полиморфизма: аллель дикого типа гомозигота (ins/ins), гетерозигота (ins/del) и мутировавшая аллель гомозигота (del/del) [33]. В исследовании [34], проведенном в Швеции, продемонстрировано, что порог $T/E > 4$ не показателен для людей с полиморфизмом типа del/del. Для инъекций ученые использовали тестостерона энантат. Особенностью данного препарата является то, что он поддерживает высокий уровень тестостерона в организме на протяжении 15 дней после его употребления. В исследовании принимали участие 55 человек, возраст которых от 18 до 55 лет с разными типами полиморфизма. Только 5.9% испытуемых с полиморфизмом del/del превысили порог в 4 единицы на второй день испытания, к 6 дню их количество увеличилось до 58.8%, но к 9 дню опять упало до 29.4%. Сводные данные по исследованию продемонстрированы в таблице 1.

Таблица 1 – Успешные обнаружения приема тестостерона с использованием различных критериев оценки в зависимости от полиморфизма гена UGT2B17*, %

Критерий	del/del			ins/del			ins/ins		
	День 2	День 6	День 11	День 2	День 6	День 11	День 2	День 6	День 11
T/E>4	5.9	58.8	29.4	62.5	100	100	100	100	100
T/E>0.6 T/E>6.0	70.6	100	100	54.2	100	100	92.9	100	100
Байес	88.2	100	100	70.8	100	100	100	100	100

*Для полиморфизма del/del использован критерий $T/E > 0.6$, для остальных - $T/E > 6.0$

Предполагалось, что полиморфизм гена UGT2B17 влияет на метаболизм тестостерона, но полученные в лаборатории Кёльна результаты [35] ставят под сомнение данную теорию. В то же время, надо отметить, что полученные данные носят предварительный характер, так как в исследовании принимало участие всего 4 человека. Подобная выборка является непрезентативной, не позволяет интерполировать результаты и внедрять их в популяционные границы.

Имеющиеся данные о влиянии генетического полиморфизма UGT2B17 на «стероидный профиль», привело к тому, что ученые, работающие в сфере допинг-контроля, активно продвигают идею рутинного проведения анализа на принадлежность спортсменов к определенной группе на основе этого признака, однако на данный момент ВАДА не ввело подобные требования.

1.5 Вещества, оказывающие влияние на «стероидный профиль»

Принимая во внимание широкий спектр препаратов, способных оказывать влияние на «стероидный профиль» человека, необходимо оценить целый ряд факторов, способных вносить вклад в погрешность определения входящих в него соединений [36-43]. В первом приближении их можно разделить на две большие группы препаратов: допинговые (входят в запрещенный список ВАДА [44]) и не допинговые (формально не входят в перечень запрещенных к употреблению веществ). Их источником и могут являться как биологические добавки, так и различное спортивное питание [45-48]. Нередки случаи, когда на этикетках данных продуктов не указываются действующие вещества, которые уже включены в список ВАДА, что, в последствии, может привести к положительным тестам при прохождении допинг-контроля.

1.5.1 Не входящие в перечень запрещенных к употреблению веществ (не допинговые препараты)

Одним из самых часто встречающихся соединений, мешающих корректному определению «стероидного профиля», является этанол. На данный момент этанол исключен из перечня запрещенных к употреблению веществ. Авторами [49, 50] продемонстрировано, что прием больших доз этанола (2 г/кг) приводит к увеличению отношения Т/Е и снижению отношения Андро/Т из-за увеличения экскреции глюкуронида тестостерона и уменьшения глюкуронида андростерона. Данный эффект оказался более выражен для женщин, чем мужчин [51]. В недавно

опубликованной работе [25] показано, что и малые дозы этанола 0,2–0,4 г/кг оказывают существенное влияние на увеличение Т/Е.

Противогрибковый агент кетоконазол, напротив, снижает экскрецию эндогенного глюкуронида тестостерона в мочу. Это происходит из-за ингибирования фермента цитохром Р450 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза, который принимает непосредственное участие в стероидогенезе тестостерона, и, как следствие, прием кетоконазола приводит к ингибированию биосинтеза тестостерона и занижению его значений при анализе «стероидного профиля». На тестостерон экзогенного происхождения данный препарат не оказывает никакого влияния [52].

Антидепрессант аминептин ингибирует процесс гидролиза стероидов при пробоподготовке с β -глюкуронидазой *E.coli*. При его обнаружении на первичном скрининге рекомендуется изменить фермент на β -глюкуронидазу/арилсульфатазу *Helix pomatia*. [53].

Оральные контрацептивы увеличивают отношение Т/Е за счет подавления экскреции эпитестостерона, на тестостерон и его метаболиты не оказывается влияния [54].

Препарат Ко-тримоксазол – антибиотик, состоящий из сульфаметоксазола и триметоприма. Метаболиты данных соединений интерферируют с пиками эндогенных стероидов на хроматограмме, что в некоторых случаях приводит к невозможности определения «стероидного профиля». Данный эффект можно устранить, используя для экстракции н-пентан [55].

Циклодекстрин относится к соединениям, которые подмешивают в мочу для маскирования запрещенных соединений. Особенность его заключается в том, что он может образовывать клатраты, которые приводят к занижению значений «стероидного профиля» [56].

Беременность вносит значительные изменения в женский «стероидный профиль». Существенно повышается уровень прегнандиола, содержание которого до беременности колеблется в рамках 80–3000 нг/мл [57]. В это же время, во время начального периода беременности его концентрации могут возрасти до 5000–10000

нг/мл, а на последних неделях достигать 20000 нг/мл [58]. Такое количество прегнандиола вызывает перегрузку хроматографической колонки в процессе подготовки и анализа проб, что приводит к значительному уширению пика и его коэлюированию с другими стероидами.

Иногда спортсмены прибегают к менее простым, но не менее эффективным методам маскирования запрещённых веществ. Таким методом является разбавление уже сданной мочи или “водный диурез”, когда спортсмен употребляет большое количество воды [59]. Данные методы снижают концентрацию определяемых в моче соединений и, как следствие, вероятность их обнаружения допинг-контролем. Корректное определение «стероидного профиля» в таких случаях невозможно. Однако, отношения эндогенных стероидов остаются неизменными.

В 2020 г. в программу мониторинга ВАДА [60] был включен экдистерон. Эффективность данного препарата вызывает сомнения, но, тем не менее, он пользуется большой популярностью среди профессиональных спортсменов. На данный момент (2022 г.) препарат не запрещен, но, исходя из анализа интернет-ресурсов, у некоторых спортсменов возникают вопросы в части влияния данного препарата на маркеры «стероидного профиля».

Экдистероиды — это полярные полигидроксилированные стероиды, участвующие в линьке насекомых и ракообразных. Они также присутствуют в различных растениях, таких как шпинат (*Spinacia oleracea* L.), и являются одними из основных биологически активных компонентов трав. В шпинате наиболее распространенным экдистероидом является экдистерон (рисунок 6), который в зависимости от скорости роста растения присутствует в диапазоне концентраций от 50 до 800 мкг/г [61, 62].

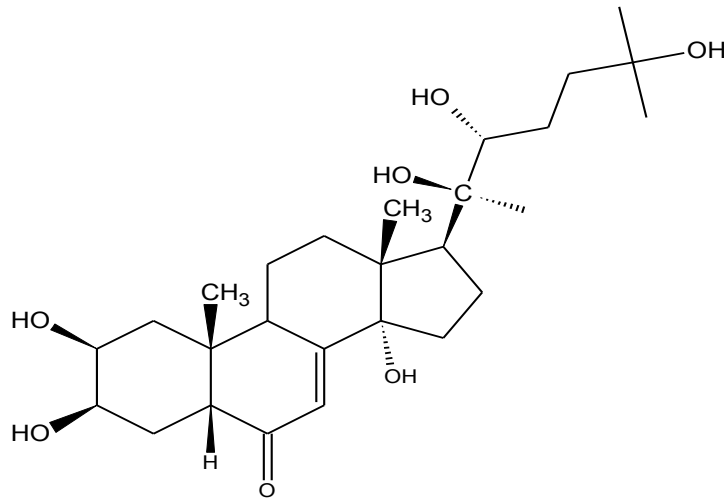


Рисунок 6 – Структурная формула экдистерона

В нескольких исследованиях, проведенных *in vitro* и на животных, сообщалось о разнообразных фармакологических эффектах экдистерона: усилении метаболизма углеводов и жирных кислот, стимуляции иммунного ответа, а также усилении синтеза белка и физической силы [63, 64]. Экдистерон рекламируют как средство увеличения силы и мышечной массы во время тренировок с отягощениями, а также для снижения усталости, облегчения восстановления и стимулирования анаболических эффектов без каких-либо классических побочных эффектов анаболических андрогенных стероидов, таких как вирилизация [62, 65, 66]. На данный момент, опубликованы результаты множества исследований о возможных стимулирующих рост эффектах экдистерона у различных видов животных (крыс, мышей, японских перепелов и крупного рогатого скота), также несколько исследованиях, которые недавно были проведены на людях [62, 66-80]. Технически, экдистерон не способен связываться как с андрогенными, так и с эстрогеновыми рецепторами (тип альфа) и глюкокортикоидными рецепторами, о чем более подробно изложено в работах [77, 81]. Только в недавних исследованиях было доказано связывание экдистерона с эстрогеновыми рецепторами (типа бета) методами *in vitro* и *in silico* [62, 82, 83].

1.5.2 Запрещённые ВАДА препараты

Прием препаратов из класса эндогенных стероидов запрещен ВАДА, но выявление применения данного вида допинга является одной из самых сложных задач, стоящих перед Антидопинговой лабораторией до сих пор. Данные препараты, оказывают существенное и разнонаправленное влияние на «стероидный профиль».

Основными препаратами данного класса являются оральные и инъекционные формы тестостерона. Их прием приводит к увеличению отношения Т/Е и снижению отношения Андро/Т. Нативный тестостерон также применяется в виде трансдермального геля. В этих случаях изменяются отношения 5 α -диол/Е, Андро/Е и Т/Е, которые связаны с уменьшением концентраций Е и повышением Т и 5 α -диол. При этом метаболизм тестостерона идет преимущественно в сторону образования 5 α -метаболитов (5 α -диол и Андро). Это связывают с высокой активностью 5 α -редуктазы в кожных покровах [84].

Прием дигидротестостерона (ДГТ) также приводит к увеличению экскреции 5 α -метаболитов. В проведенном на 4631 мужчине и 1341 женщине исследовании были продемонстрированы количественные характеристики отношений метаболитов тестостерона, характеризующие прием дигидротестостерона [85]. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры «стероидного профиля», характерные при приеме ДГТ

Параметр	Мужчины	Женщины
конц. ДГТ (нг/мл)	>21	>18
конц. 5 α -диол (нг/мл)	>204	>89
конц. Андро (нг/мл)	>9103	>7562
Андро/Этио	>2.9	>2.1
5 α -диол/5 β -диол	>1.5	>1.3
ДГТ/Этио	>8.2	>8.5
ДГТ/Е	>0.73	>2.3

5 α -андростандион является прекурсором тестостерона и по своему влиянию на «стероидный профиль» схож с приемом ДГТ [53].

Андростендион также является прекурсором тестостерона. Его прием приводит к увеличению концентрации тестостерона, а также его метаболитов. Косвенным доказательством приема данного препарата может служить наличие 6 α -гидроксиандростендиона в моче [86-90].

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) является прекурсором андростендиона и андростендиола, которые являются прекурсорами тестостерона. Следовательно, прием ДГЭА приводит к увеличению концентрации тестостерона и его метаболитов. В техническом документе ВАДА от 2004 г. [20] на него была установлена пороговая концентрация 100 нг/мл (для глюкуронида), что приводило к частым анализам природы происхождения (ГХ-С-ИМС). В настоящее время в техническом документе ВАДА отсутствует порог для ДГЭА.

Основываясь на документы, сохранившиеся после распада ГДР, стало известно, что с 1983 г. фармацевтическая компания Йенафарм (Jenapharm) производила эпитестостерон пропионат исключительно для нужд государственной допинговой программы [91]. Прием эпитестостерона совместно с тестостероном позволял избежать атлетам повышения отношения Т/Е. Чтобы бороться с таким видом манипуляции, ВАДА ввело обязательный изотопный (ГХ-С-ИМС) анализ для образцов с концентрацией эпитестостерона, превышающей 200 нг/мл. На данный момент порог в 200 нг/мл остался только у мужчин, для женщин он составляет 50 нг/мл.

Длительный прием анаболических андрогенных стероидов приводит к снижению выработки собственных стероидов, что естественно после прекращения приема уменьшает концентрации стероидов в моче. [92, 93]. Также подавляется активность 5 α -редуктазы, что приводит к занижению соотношения Андро/Этио до значений ниже 1 [94].

Пробенецид является урикозурическим препаратом, который в основном применяют для лечения подагры. С точки зрения допинг-контроля он является маскирующим агентом, препятствуя экскреции соединений из почек, тем самым

занижая их концентрации в моче. Так как большинство стероидов и их метаболитов подвергаются метаболизму фазы II, пробенецид снижает экскрецию ассоциированных глюкуронидов. Авторами [95] было продемонстрировано существенное сокращение выведения в мочу как эндогенных, так и экзогенных стероидов.

Ингибиторы 5 α -редуктазы были включены в Запрещенный список в 2005 г. и удалены в 2009 г. Типичными представителями данного класса являются финастерид и дутастерид. В медицине эти препараты используются для лечения гиперплазии простаты, а также как средство от облысения. Для допинг-контроля важным является влияние данного класса на «стероидный профиль». 5 α -редуктаза принимает непосредственное участие в образовании 5 α -стероидов (5 α -диол, андростерон), таким образом ингибирование данного фермента приведет к занижению концентраций метаболитов стероидов.

Хорионический гонадотропин (ХГЧ) – гормон, класса гликопротеинов, больше всего известен как маркер беременности. Может применяться спортсменами мужского пола для стимуляции выработки эндогенного тестостерона или для предотвращения атрофии яичек при длительном приеме анаболических стероидов. Вместе с тестостероном повышается экскреция и эпитестостерона, поэтому отношение Т/Е практически не меняется [96, 97]. Определение ХГЧ проводят с помощью иммуноферментного анализа, хотя последнее время тенденция склоняется к УВЭЖХ-МС/МС определению [98, 99].

Лютенизирующий гормон (ЛГ) – пептидный гормон, секретируемый гонадотропными клетками передней доли гипофиза, стимулирует клетки Лейдига, что приводит к повышению эндогенного тестостерона у мужчин. Повышенные показатели ЛГ могут быть следствием употребления гормона роста, антиэстрогенов или анаболических стероидов. [99].

За последние два десятилетия класс селективных модуляторов андрогенных рецепторов (SARM) является предметом интенсивных и целенаправленных клинических исследований [100, 101]. К данному классу относятся ACP-105, BMS-564929, GLPG0492 (DT-200), LG -121071, LGD-2226, лигандрол (LGD-4033, VK

5211), остарин (энобосарм), радарин (RAD-140), андарин (S-40503), а также стероидные соединения, такие как МК-0773 (PF-05314882) и YK-11. Потенциальные терапевтические применения SARM разнообразны и направлены, в частности, на лечение состояний, проявляющихся при потере мышечной массы [102–109]. Такими состояниями являются, например, общая саркопения, связанная с раком кахексия, мышечная дистрофия и т.д. Направленная анаболическая активность на скелетно-мышечную ткань препаратов класса SARM обладает значительным потенциалом для злоупотребления в спорте, поэтому SARM были включены в Запрещенный список ВАДА в 2008 г. В настоящее время по классификации ВАДА, SARM относятся к классу S 1.2 «Другие анаболические агенты». На рисунке 7 представлена официальная статистика ВАДА с 2012 по 2020 г. по случаям обнаружения SARM [1, 110–117]. Согласно последнему отчету ВАДА за 2020 г. по частоте обнаружения остарин занимает первое место (35 %) в классе *S 1.2 Другие анаболические агенты*, а также первое место среди SARM с 52 % от общего числа случаев обнаружения применения SARM (рисунок 8) [1]. Ни один препарат из класса SARM еще не прошел полный цикл клинических испытаний и, следовательно, не получил клинического одобрения, поэтому применение препаратов данного класса может иметь непредсказуемые результаты. В октябре 2016 г. остарин включен в список сильнодействующих и ядовитых веществ с целью сбыта, ст. 234 УК РФ (Незаконный оборот сильнодействующих или ядовитых веществ с целью сбыта).

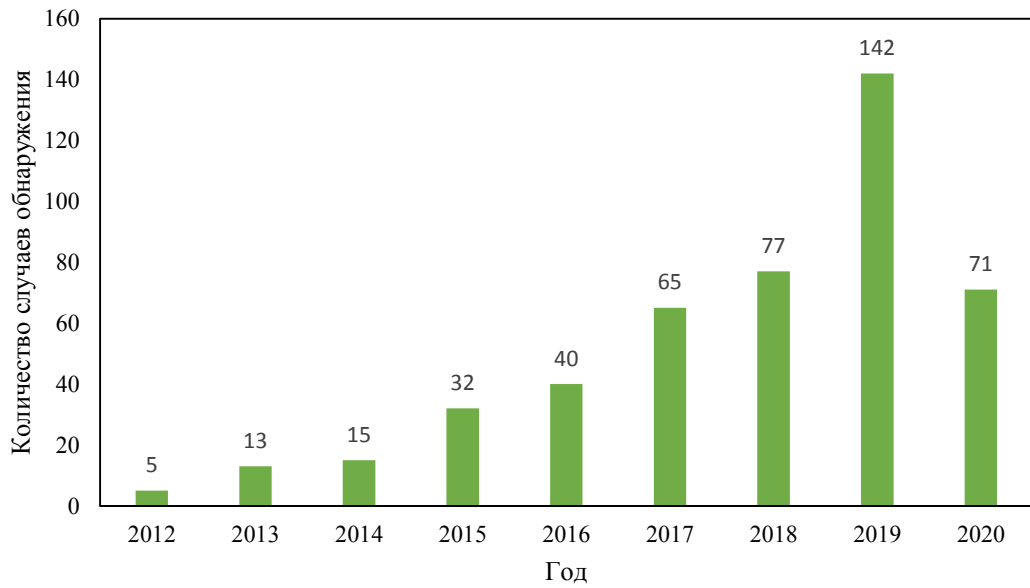


Рисунок 7 – Статистика ВАДА с 2012 по 2020 год по количеству случаев обнаружения SARM

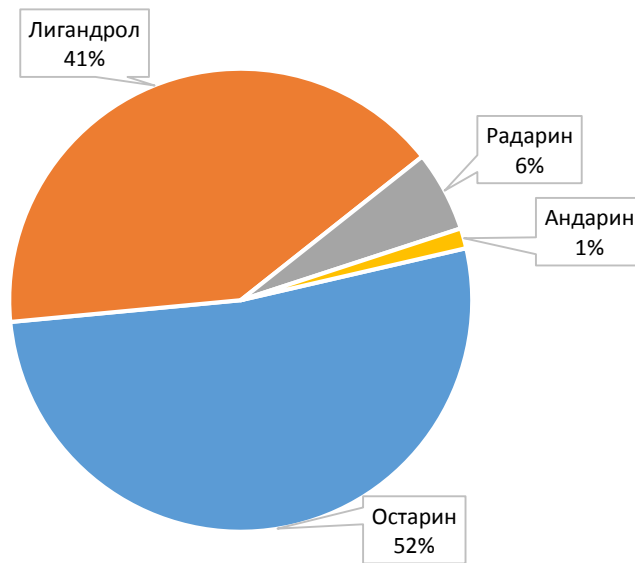


Рисунок 8 – Обнаруженные SARM в пробах спортсменов по всему миру в соответствии с отчетом ВАДА за 2020 г., %

1.6 Деградация мочи

Присутствие микроорганизмов и протекание протеолитических ферментативных процессов в образцах мочи неизбежно и способно оказывать существенное влияние на ряд анализов, проводимых в рамках допингового контроля. По данным исследования Кёльнской лаборатории около 2.2% образцов, доставляемых в лабораторию, имеют признаки деградации [53]. Особое влияние деградация оказывает на концентрацию тестостерона. В ходе бактериального гидролиза 5-андростен-3 β ,17 β -диол сульфата с последующими химическими превращениями, связанными с активностью ферментов 3 β -гидрокси- Δ 5-стероид-дегидрогеназы и стероид- Δ -изомеразы в моче образуется «свободный» (неконъюгированный) тестостерон, что в следствии приведет к завышению его концентрации в пробе. Ускорение процессов деградации происходит при несоблюдении условий хранения и транспортировки образцов, описанных в документе ВАДА [118]. Основными факторами, влияющими на деградацию мочи, является температура и длительность хранения. К сожалению, на сегодняшний день нет универсального консерванта, позволяющего остановить все виды микробиологической и ферментной активности, однако отдельные процессы деградации можно остановить путем ввода ряда веществ и реагентов. Так, например, азид натрия и хлорид ртути эффективно ингибируют бактериальную трансформацию глюкуронида андростерона в 5 α -андростан-3,17-дион в моче [119–121]. Ингибировать активность протеаз можно с использованием хлорида бестатина, ЭДТА, аprotинина и т. д. [119, 122, 123]. Однако, вне зависимости от предлагаемого или используемого метода консервации, необходимо учитывать возможность влияния реагентов на процессы пробоподготовки и анализа, которые могут существенно отличаться у каждой антидопинговой лаборатории ввиду отсутствия унифицированных методик анализа и наличия оригинальных процедур [124–127]. Кроме того, наличие в емкостях для хранения образцов каких-либо жидкостей (консервирующих растворов) или порошков, может быть использовано для опротестования полученных в ходе исследования результатов, по причине того,

что запрещенные соединения могли быть добавлены в саму емкость. В этих ситуациях появляются возможности оспорить или сокрыть ряд положительных проб, выдав их за ложноположительный результат.

Совокупность данных факторов привела к тому, что пробы мочи, на сегодняшний день, не консервируют. Это стало причиной появления многоэтапного контроля, включающего в себя как оценку возможности фальсификации образца, так и оценки его деградации [128–134].

В лабораторной практике антидопинговых лабораторий первыми этапами анализа является определение pH образцов мочи и их относительной плотности. Физиологически нормальными значениями является диапазон от 4.5 до 8.0. Более щелочные значения pH могут говорить о возможной микробиологической деградации образца, а значения <4.5 могут быть следствием подмены образца или его разбавления, например, яблочным соком (pH ~ 3.0).

Более сложным маркером оценки деградации с точки зрения анализа является оценка наличия и соотношения 5 α -андростан-3,17-диона (5 α -дион) и 5 β -андростан-3,17-диона (5 β -дион) в моче [135].

На сегодняшний день известен ряд работ, посвященных не только определению эндогенных стероидов в моче [136–141], распространенности их различных конъюгатов [142–149], но и изучению активности различных микроорганизмов, обуславливающих деградацию стероидов, при хранении проб мочи [119–123, 128–134]. Учитывая отличающуюся скорость деградации различных групп стероидов, отсутствие контроля за протеканием данного процесса может существенно исказить получаемые результаты.

Среди методов контроля деградации и фальсификации проб одним из наиболее перспективных (помимо подхода, основанного на изменении содержания эндогенных стероидов), является метод, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) [133, 134]. В методе ПЦР при деградации наблюдается только изменение соотношений сигналов по выбранным локусам (при длительном хранении возрастает погрешность исследования), и возможность фальсификации,

используя подмену образца на этапе сдачи пробы или даже её хранения, полностью исключается.

1.7 Стероидомика

Несмотря на бесспорные надежность и воспроизводимость результатов ГХ-МС/МС определения стероидов, имеется ряд недостатков [150]. Стадия деконъюгации при пробоподготовке не обеспечивает всестороннего мониторинга метаболитов фазы II, к тому же она требует много времени. Из-за ограничений метода газовой хроматографии и электронной ионизации анализ стероидов в виде конъюгатов становится невозможен. Решением данной проблемы становится проведение ферментативного гидролиза, в ходе которого происходит деконъюгация аналитов, что, с одной стороны, дает возможность анализа на ГХ-МС. С другой стороны, происходит потеря огромного пласта информации о первоначальной структуре и форме конъюгатов. С развитием аналитического оборудования стало возможным исследование метаболитов стероидов с использованием УВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения (УВЭЖХ-МСВР). Пробоподготовка в данном случае проводится без гидролиза и экстракции по принципу «Dilute and Shoot» [151–157], что исключает потери, представляется возможным идентификация первоначальных структур аналитов. Такие аналитические платформы на основе масс-спектрометрии высокого разрешения способны выполнять сбор данных во всем диапазоне масс с высокой точностью и чувствительностью, а приборы, оснащенные квадруполом (QTOF-MS), предоставляет дополнительную информацию, позволяя точно измерять не только массу протонированных и депротонированных аддуктов, но также и их фрагментных ионов.

Квадруполь-времяпролетные масс-спектрометрические системы высокого разрешения, реализующие принцип информационно-зависимого сканирования, предполагают одновременное получение продуктов столкновения как с низкой, так и с высокой энергией. Таким образом, информация о массе прекурсора и массе

фрагмента оценивается за один анализ. Данная возможность имеет большое значение для анализа структурной информации, необходимой для идентификации неизвестных биомаркеров в контексте нецелевого анализа. В сочетании с хемометрическими методами нецелевой анализ представляет собой мощный инструмент для открытия новых биомаркеров, связанных с физиологическими реакциями, а также для фенотипирования [158].

В отличие от классических методов тандемной масс-спектрометрии, где анализ осуществляется только по заданным параметрам, МСВР сканируют полный спектр ионов, что в дальнейшем открывает возможности ретроспективного анализа.

На данный момент биоматериал спортсменов (моча) хранится 10 лет после проведения крупных соревнований, таких, как Олимпийские игры или чемпионаты мира [2]. Данный интервал обусловлен невозможностью и дороговизной хранения такого большого числа образцов. С помощью МСВР можно преодолеть и ограничение по времени хранения образцов, сделав его бессрочным. К недостаткам МСВР можно отнести низкую скорость переключения полярности, из-за которой необходимо проводить 2 серии анализа, одну в режиме регистрации положительных ионов, другую – в режиме регистрации отрицательных ионов.

Немаловажной особенностью приборов, оснащенных источниками электрораспылительной ионизации, является наличие ярко выраженных матричных эффектов, которые способны приводить как к подавлению, так и усилению регистрируемого аналитического сигнала. При этом, единственным надежным методом его нивелирования является применение изотопно-меченных внутренних стандартов, однако это возможно исключительно в случае целевого анализа [159]. Подобный подход противоречит базовым принципам нецелевого анализа в области метаболомики и стероидомики, однако в контексте перспектив развития допинг-контроля, разработка и применение нецелевого анализа представляется перспективным и позволит проводить ретроспективный анализ, направленный на мониторинг изменения уровней и соотношений эндогенных стероидов.

В последние годы было проведено несколько исследований использующих стероидомный подход для поиска характеристичных биомаркеров употребления анаболических стероидов как на людях, так и на животных [160-162], а также для диагностики раковых паталогий [163]. Однако, на данный момент, наиболее релевантным набором эндогенных маркеров, точно описывающих стероидный профиль, остается набор параметров, описанный в документах ВАДА [21].

В отличие от классического подхода к анализу, стероидомика с помощью новейшего аналитического оборудования в сочетании с математическими методами классификации и анализа позволяет быстрее и точнее понимать биологические процессы, происходящие в организме. В рамках допинг контроля стероидомика является мощным исследовательским инструментом, который в будущем позволит на рутинной основе определять дизайнерские стероиды, а также осуществлять поиск новых зависимостей при приеме анаболических стероидов.

1.8 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

На сегодняшний день известны различные подходы к качественному и количественному анализу стероидных гормонов, совмещенных со скринингом ксенобиотиков как в варианте целевого, так и нецелевого скрининга, отвечающие требованиям высокой чувствительности анализа [23–35, 164–175]. Эволюционное развитие современного аналитического оборудования расширяет возможности создания новых, более производительных и информативных подходов нецелевого скрининга с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения, особенно в сочетании с ионной подвижностью [150–156]. С другой стороны, их развитие затруднено малой распространенностью подобного высокотехнологичного, дорогого и сложного в освоении оборудования, а использование его в рутинной практике довольно долгое время будет экономически нецелесообразно. Постоянно растущие требования к точности и надежности представляемых результатов, а также нереализованный потенциал применяющихся в рутинной практике коммерчески доступных приборов делает актуальным создание новых,

высококочувствительных, селективных методов анализа, которые позволят в один аналитический цикл решать не только вопросы качественного и количественного анализа, но и оценивать возможность деградации исследуемого образца.

Исходя из вышеизложенного, была сформулирована цель диссертационной работы - разработка оригинальных хромато-масс-спектрометрических методик определения маркеров «стероидного профиля» спортсменов, отвечающие международным требованиям к допинговому контролю.

Для достижения поставленных целей решали следующие задачи:

- разработка и оптимизация условий хромато-масс-спектрометрического разделения и детектирования маркеров «стероидного профиля»;
- обоснование состава матрицы с известным содержанием стероидов для приготовления образцов мочи и установления маркеров ее деградации;
- разработка методик определения веществ, влияющих на концентрацию маркеров «стероидного профиля» в моче человека; апробация разработанной методики в анализе реальных образцов;
- уточнение популяционных границ соотношений и концентраций маркеров «стероидного профиля» и разработка методологии выявления вероятно положительных образцов;
- применение уточненных популяционных границ для оценки влияния остарина и экидистерона на маркеры «стероидного профиля».

2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования является моча, собранная у спортсменов мужского пола в количестве 6418 образцов и женского пола в количестве 4262 образцов. Пробоотбор проводили тестирующие организации, одобренные ВАДА. Доставка проб в лабораторию занимала не более 7 дней с момента отбора.

2.2 Материалы, реактивы и использованное оборудование

Для проведения экспериментальных исследований использовали следующий перечень научного и вспомогательного оборудования:

– газовый хроматограф фирмы Thermo Fisher Scientific (США) модели Trace GC Ultra, соединенный с тройным квадрупольным масс-спектрометром модели TSQ Quantum GC и автосамплером фирмы CTC Analytics модели GC Pal;

– газовый хроматограф фирмы Thermo Fisher Scientific (США) модели Trace 1310, соединенный с тройным квадрупольным масс-спектрометром модели TSQ Quantum XLS и автосамплером модели TriPlus RSH;

– газовый хроматограф фирмы Thermo Fisher Scientific (США) модели Trace 1310 с интерфейсом модели GC Isolink II и интерфейсом постоянного потока модели ConFlo IV, подсоединенным к изотопному масс-спектрометру Delta V Plus и автосамплеру модели TriPlus RSH;

– жидкостной хроматограф фирмы Thermo Fisher Scientific (США) модели Ultimate 3000, состоящий из дегазатора SRD-3600, блока бинарных насосов HPG-3400RS, автосамплера WPS-3000TRS и колоночного термостата TCC-3000RS, соединенный с масс-спектрометром модели TSQ Vantage;

– препаративный жидкостной хроматограф фирмы Thermo Fisher Scientific (США) модели Ultimate 3000, состоящий из дегазатора SRD-3200, блока бинарных насосов HPG-3200SD, автосамплера WPS-3000SL, колоночного термостата TCC-

3000SD, автоматизированной системы сбора фракций AFC-3000 и детектора типа диодная матрица DAD-3000;

– автоматизированная система для измерения pH и плотности фирмы Mettler Toledo (США), включающая в себя: pH-метр SevenCompact pH/Ion S220, плотномер DM 40, автоматическую систему промывки и подачи проб SC 30;

– бутылочные дозаторы фирмы Eppendorf AG (Германия) серии Research plus 0.5–2.5 мл и 1–5 мл;

– автоматические дозаторы переменного объема фирмы Eppendorf AG (Германия) серии Research plus 0.5–10 мкл; 2–20 мкл; 10–100 мкл; 100–1000 мкл; 500–5000 мкл;

– степпер фирмы Eppendorf AG (Германия) серии Multipette Plus;

– микрошприцы фирмы Hamilton (Швейцария): 10; 25; 50; 100 мкл;

– весы аналитические фирмы Mettler Toledo (США) модели XPE26/A;

– стеклянные пробирки (16×125 мм) с завинчивающимися крышками, Corning Inc, США;

– стеклянные пробирки (16×100 мм) с завинчивающимися крышками, Corning Inc, США;

– наконечники для дозаторов на 5 мл, 1 мл, 200 мкл и 10 мкл, Eppendorf AG, Германия;

– наконечники для степпера на 1 мл, Eppendorf AG, Германия;

– твердотельный нагреватель с программируемой температурой ($\pm 2^\circ\text{C}$) QBD4, Grant Instruments, Великобритания;

– термостат с программируемой температурой BD 115, BINDER GmbH, Германия;

– криостатическая баня с циркуляцией с программируемой температурой ($-35 - 25^\circ\text{C}$, $\pm 2^\circ\text{C}$) R4, Grant Instruments, Великобритания;

– кримпер для крышек 11 мм, Thermo Fisher Scientific, США;

– декаппер для крышек 11 мм, Thermo Fisher Scientific, США;

– центрифуга для пробирок диаметром 16 мм Rotina 420, Hettich, Германия;

– автоматический шейкер, IKA, Германия;

- ротационный перемешиватель, GFL, Германия;
- вакуумный упариватель с программируемой температурой и давлением в камере RapidVar, Labconco, США;
- система для твердофазной экстракции (коллектор фракций, вакуумный насос), Restek, США;
- ультразвуковая баня, Bandelin, Германия;
- капиллярная колонка HP Ultra-1 17 м×0.2 мм, 0.11 мкм, J&W, США;
- капиллярная колонка Rtx-35MS 30 м×0.25 мм×0.25 мкм, Restek, США;
- капиллярная колонка ZB-1MS 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм, Phenomenex, США;
- аналитическая колонка Kinetex C18 2.1×100 мм, размер частиц 1.7 мкм, Phenomenex, США;
- аналитическая колонка Acquity UPLC BEH C18 2.1×100 мм, размер частиц 1.7 мкм, Waters, США;
- предколонка Acquity UPLC BEH C18 2.1×5 мм, размер частиц 1.7 мкм, Waters, США;
- препаративная колонка SunFire C18 4.6×250 мм, размер частиц 5 мкм, Waters, США;
- предколонка SunFire C18 C18 4.6×20 мм, размер частиц 5 мкм, Waters, США;
- препаративная колонка Luna C8 (2) 3.0×250 мм, размер частиц 5 мкм, Phenomenex, США;
- предколонка Security guard cartridge C8 2.0×4 мм, Phenomenex, США;
- картриджи для твердофазной экстракции Bond Elut LRC-C18, 500 мг, Agilent Technologies США.

Для выполнения экспериментальных исследований использовали следующие реактивы и стандартные образцы:

- β-глюкуронидаза Escherichia Coli K12, Roche, Германия;
- метанол «для хроматографии», чистота 99.8%, Merck, Германия;

– вода «для хроматографии», удельное сопротивление 18.2 МОм×см, Fisher Chemical США;

– диэтиловый эфир, чистота 99%, Fisher Chemical США;

– ацетон, чистота 99.8%, Acros Organics США;

– гептан, чистота 99%, Acros Organics США;

– гексан, чистота 95%, Panreac США;

– ацетонитрил «для хроматографии», чистота 99.9%, Merck, Германия;

– пиридин, чистота 99.9%, Sigma Aldrich США;

– уксусный ангидрид, 99%, Sigma Aldrich США;

– гелий марки «6.0», чистота 99.9999%, Линде Газ Рус, Россия;

– кислород ОСЧ, чистота 99.999%, Линде Газ Рус, Россия;

– углекислый газ ОСЧ, чистота 99.995%, Линде Газ Рус, Россия;

– аргон марки «5.0», чистота 99.999%, Линде Газ Рус, Россия;

– N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамид (МСТФА), чистота 99%, Macherey Nagel, Германия;

– азид натрия (NaN_3), чистота 99.5%, Sigma Aldrich США;

– муравьиная кислота, чистота 98%, Fluka США;

– дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4), чистота 99%, Sigma Aldrich, США;

– гидрофосфат натрия двуводный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), чистота 99%, Sigma Aldrich, США;

– йодид аммония (NH_4I), чистота 99%, Sigma Aldrich, США;

– карбонат калия (K_2CO_3), чистота 99%, Sigma Aldrich, США;

– гидрокарбонат калия (KHCO_3), чистота 99.7%, Sigma Aldrich, США;

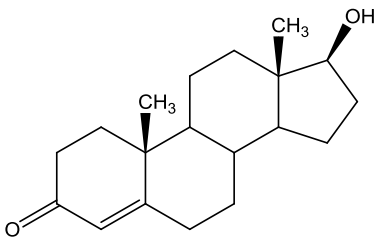
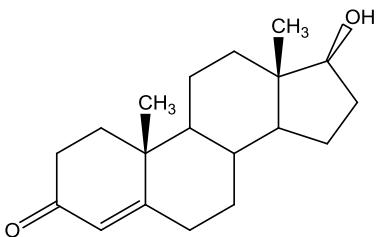
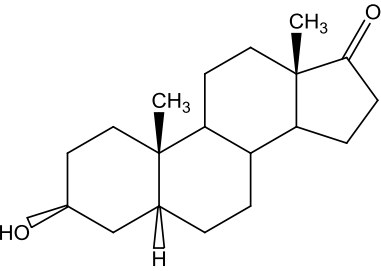
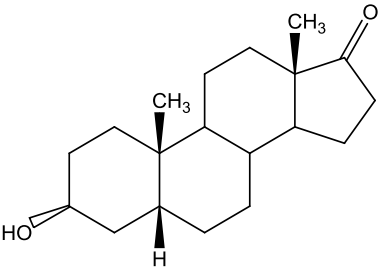
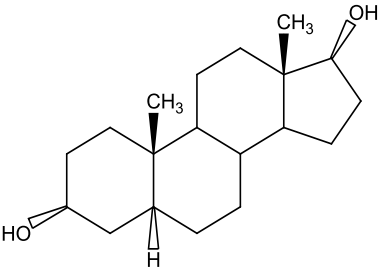
– сульфат натрия (Na_2SO_4), чистота 99%, Sigma Aldrich, США;

– 1,4-дитио-DL-треитол (ДТТ), чистота 98%, Sigma Aldrich, США;

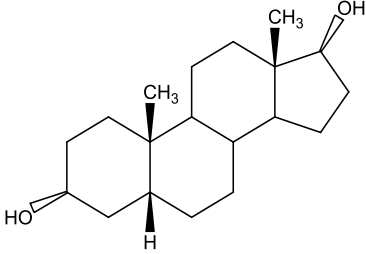
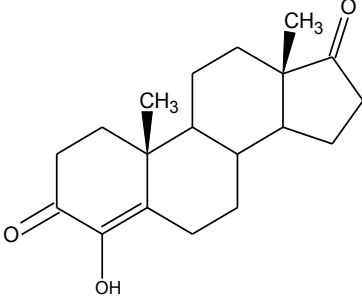
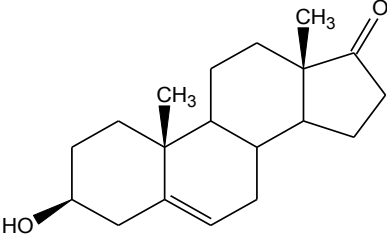
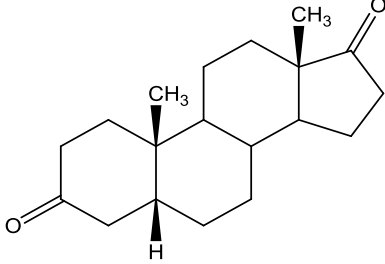
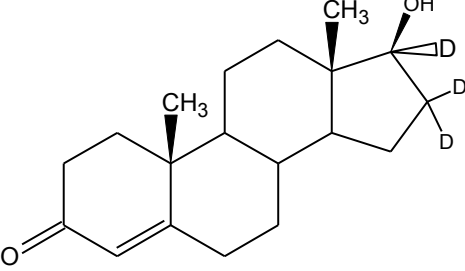
– n-Пентан, чистота 99%, Panreac США;

Стандартные образцы, использованные в работе, приведены в таблице 3.

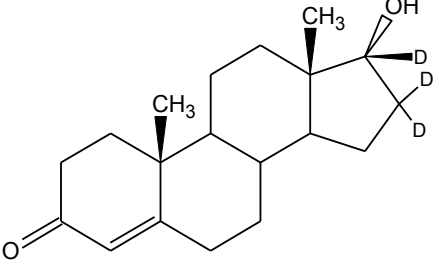
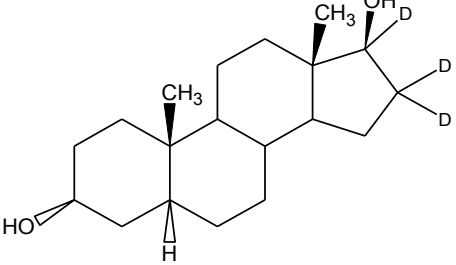
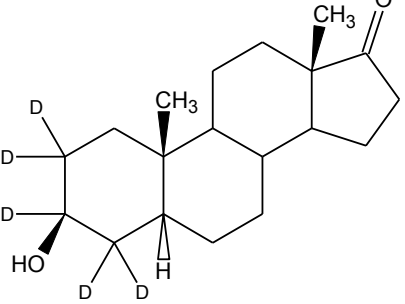
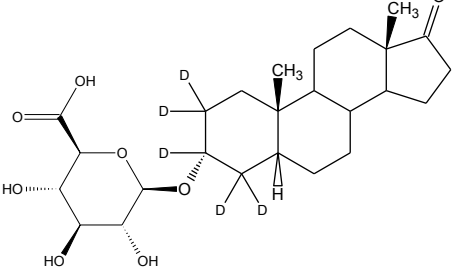
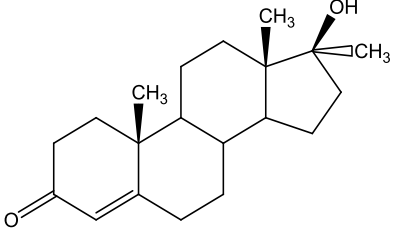
Таблица 3 – Стандартные образцы, использованные в работе

Название	Формула	Чистота и производитель
Тестостерон		98% Cerilliant, США
Эпитестостерон		98% Cerilliant, США
Андростерон		98% Riedel-de-Haen, США
Этиохоланолон		99% Sigma Aldrich, США
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол		99% NMI, Австралия

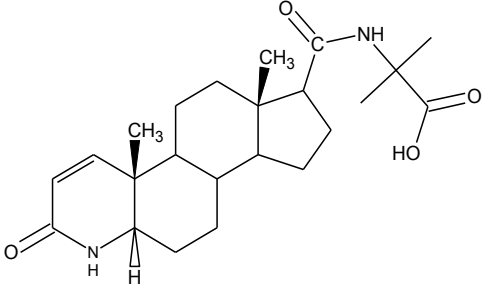
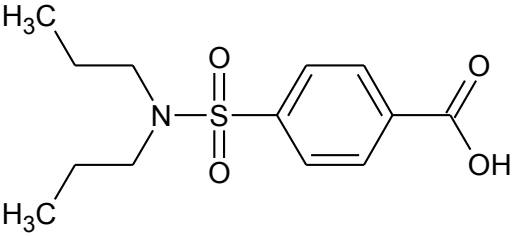
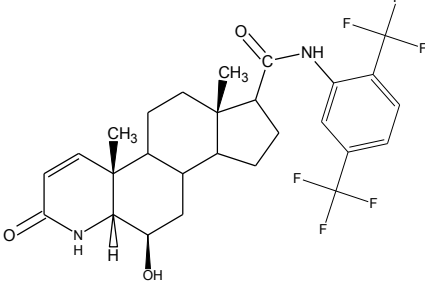
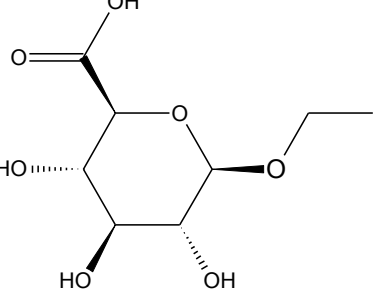
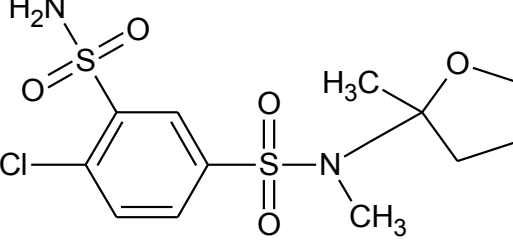
Продолжение таблицы 3

Название	Формула	Чистота и производитель
5β-андростан-3α,17β-диол		99% NMI, Австралия
Форместан		98% Toronto Research Chemical (Канада)
Дегидроэпиандростерон		99% LGC Standards, Великобритания
5β-андростан-3α,17β-дион		99% Steraloids (США)
D ₃ -тестостерон		90% NMI, Австралия

Продолжение таблицы 3

Название	Формула	Чистота и производитель
D ₃ -эпитестостерон		94% NMI, Австралия
D ₃ -5α-андростан-3α,17β-диол		98% ArtMolecule, Франция
D ₅ -эпиандростерон		90% ArtMolecule, Франция
D ₅ -андростерон глюкуронид		90% ArtMolecule, Франция
Метилтестостерон		99% Toronto Research Chemical (Канада)

Продолжение таблицы 3

Название	Формула	Чистота и производитель
Карбокси финастерид		<p>98%</p> <p>Santa Cruz Biotechnology (США)</p>
Пробенецид		<p>99%</p> <p>European Pharmacopeia (Франция)</p>
6β-гидрокси дутастерид		<p>99%</p> <p>Toronto Research Chemical (Канада)</p>
Этил глюкуронид		<p>98%</p> <p>Toronto Research Chemical (Канада)</p>
Мефрузид		<p>99%</p> <p>LGC Standards, Великобритания</p>

2.3 Приготовление вспомогательных растворов

2.3.1 Фосфатный буферный раствор

На технических весах взвешивали 54 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 68 г KH_2PO_4 и 1 г NaN_3 , переносили в мерную колбу, добавляли деионизированную воду и доводили объем до 1000 мл, измеряли рН (~ 6.2–6.4). К полученному фосфатному буферу добавляли 30 мл β -глюкуронидазы *E.Coli* и 150 мкл внутреннего стандарта — метилтестостерона с концентрацией 1 мг/мл. При анализе методом ГХ-С-ИМС использовали фосфатный буфер без добавления β -глюкуронидазы *E.Coli* и метилтестостерона.

2.3.2 Карбонатный буферный раствор

На технических весах взвешивали по 60 г K_2CO_3 и KHCO_3 , переносили в мерную колбу, доводили объем деионизированной водой до 800 мл и измеряли рН (~10.0–10.2).

2.3.3 Раствор для дериватизации

На технических весах взвешивали 60 мг NH_4I и 45 мг дитиотреитола, переносили в стеклянную пробирку со шлифом и добавляли 3 мл *N*-метил-*N*-(триметилсилил)трифторацетамид (МСТФА). Приготовленный раствор перед использованием разбавляли еще в 10 раз МСТФА.

2.4 Оптимизация условий хромато-масс-спектрометрического определения «стероидного профиля» в моче

Авторы [176] ранее рассмотрели аспекты обнаружения запрещенных ВАДА соединений в продуктах спортивного питания. Однако, решения, предложенные в

данной работе направлены на обнаружение только нативных соединений, поэтому данный подход не подходит для анализа стероидов в моче ввиду сложности матрицы и невозможности анализа стероидов в конъюгированном виде. Для решения этой задачи пробоподготовка и анализ образцов биологических жидкостей требуют кардинально иного подхода.

Метод ГХ-МС/МС был выбран для определения маркеров «стероидного профиля» в моче, поскольку удовлетворяет предъявляемым требованиям к чувствительности, точности и воспроизводимости, предъявляемым ВАДА к антидопинговым лабораториям. Кроме того, в отличие от УВЭЖХ-МС/МС, данный метод значительно меньше подвержен матричным эффектам благодаря большей эффективности разделения хроматографической системы и меньшему количеству соединений, достигающих источника ионизации. Для обеспечения экспрессности анализа метод также должен быть совместим с ранее разработанной методикой определения 109 допинговых соединений [124], что позволит определять маркеры «стероидного профиля» и проводить скрининг в ходе одного анализа, повысив производительность лабораторий с использованием уже имеющегося приборного парка. С использованием метода ГХ-МС/МС также проводили оценку качества проведения пробоподготовки (гидролиз, дериватизация) и степень микробиологической деградации мочи (5 β -дион/Этио).

Одной из самых важных задач исследования данной работы являлась разработка методики определения «стероидного профиля», учитывающего максимальное число факторов, влияющих на его точное определение. К сожалению, учесть влияние всех факторов с помощью одного метода невозможно, поэтому в работе также использовали методы:

- УВЭЖХ-МС/МС для определения употребления объектом тестирования допинговых (пробенецид) и не допинговых препаратов (финастерид, дутастерид, этанол);
- ГХ-С-ИМС для определения природы происхождения тестостерона и 19-норандростерона:

– гидростатический плотномер для определения коэффициента пересчета для образцов, чья относительная плотность отличается от стандартной;

– рН-метр для первичной оценки подлинности образцов мочи и наличия деградации.

С учетом специфики определяемых аналитов (высокие молекулярные массы дериватов и температуры их испарения) для проведения экспрессного хроматографического анализа использовали колонку HP Ultra-1 17 м×0.2 мм, 0.11 мкм со следующей температурной программой: начальная температура термостата колонок – 179°C, нагрев до 235°C со скоростью 4°C/мин, нагрев до 310°C со скоростью 20°C/мин, время задержки включения катода для обеспечения выхода растворителя – 2.8 мин. Общее время анализа составило 22 мин. Наибольшее время удерживания имеет ТМС производное экидистерона (включенного в мониторинговый лист ВАДА в 2021 году) – 19.1 мин. Температура инжектора 300°C, температура переходной линии 300°C, газ-носитель – гелий, скорость потока 0.6 мл/мин, объем вводимой пробы – 1 мкл, деление потока – 1:20. Предложенные условия отвечают не только требованиям необходимой чувствительности определения, но и позволяют увеличить межсервисный интервал, так как ионный источник и ионная оптика в этом случае менее подвержены загрязнению, обусловленным анализом силированных производных экстрактов мочи. На рисунке 9 представлено изменение относительной площади внутреннего стандарта (метилтестостерона) к числу инъекций. Относительная площадь рассчитывали, как среднее значение между 10 инъекциями.

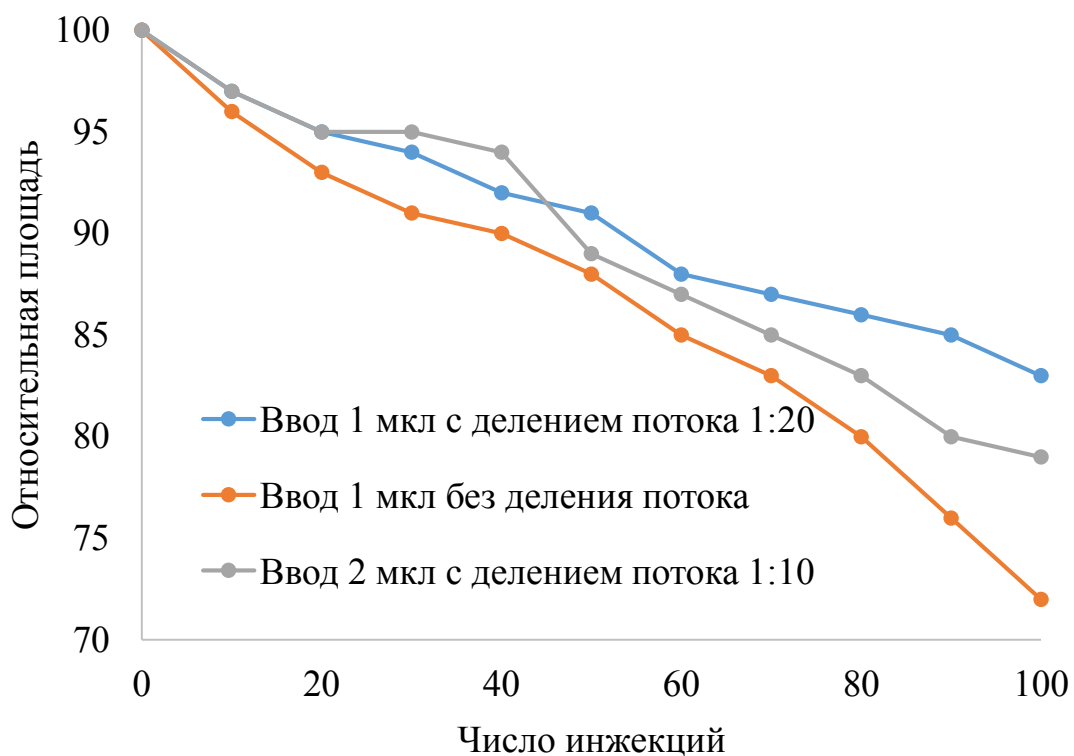


Рисунок 9 – Оценка влияния объема ввода и деления потока на изменение чувствительности при потоковом анализе

Основной особенностью тандемной масс-спектрометрии является режим мониторинга заданных реакций (МЗР), который имеет огромное преимущество перед ранее используемым режимом мониторинга выделенных ионов (МВИ). Как и при ионизации в источнике, соударительная диссоциация характеризуется неполным выходом ионизации, и приводит к потерям в процессе формирования ионов-продуктов, что компенсируется селективностью регистрации конкретных переходов в условиях оптимизированных значений энергии диссоциации и давления газа-мишени в ячейке соударений, позволяя добиться значительно лучшей чувствительности по сравнению с режимом МВИ.

На момент проведения данных исследований некоторые МС/МС спектры исследуемых соединений отсутствовали в открытом доступе, поэтому для выбора оптимальных условий детектирования были получены масс-спектры по полному ионному току для всех дериватов маркеров «стероидного профиля» в диапазоне m/z

50–650. Из полученных спектров выбирали наиболее селективные и интенсивные ионы (ионы-прекурсоры) для последующей регистрации спектров ионов-продуктов в диапазоне энергии соударений от 5 до 35 эВ с шагом 5 эВ. Из полученных спектров ионов-продуктов также выбирали наиболее селективные интенсивные ионы. Основные настройки параметров масс-спектрометра приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Основные настройки масс-спектрометрической системы

Название параметра	Значение
Задержка включения катода	2.9 мин
Энергия электронов	–70 эВ
Ток эмиссии	40 мкА
Скорость сканирования	3.3 Гц
Газ соударения	Аргон
Давление в камере газа соударения (аргон)	1.0 мТорр
Ширина пропускания квадруполя Q1	0.7 Да
Ширина пропускания квадруполя Q3	0.7 Да

Помимо энергии соударений немаловажным фактором, влияющим на чувствительность определения стероидных гормонов, является давление газа-мишени в ячейке соударений. Для каждого значения давления аргона в ячейке соударений от 0.5 до 2 мТорр с шагом 0.5 м Торр была подобрана оптимальная энергия соударений, соответствующая исследуемым компонентам. Результаты исследования представлены на рисунке 10. В процессе оптимизации условий детектирования было установлено, что оптимальным значением является 1 мТорр, так как именно при этом давлении уровень вакуума сохраняется достаточно высоким, что позволяет избежать потерь в чувствительности, обеспечивая при этом воспроизводимый высокий выход ионов-продуктов, формирующихся в процессе соударительной диссоциации.

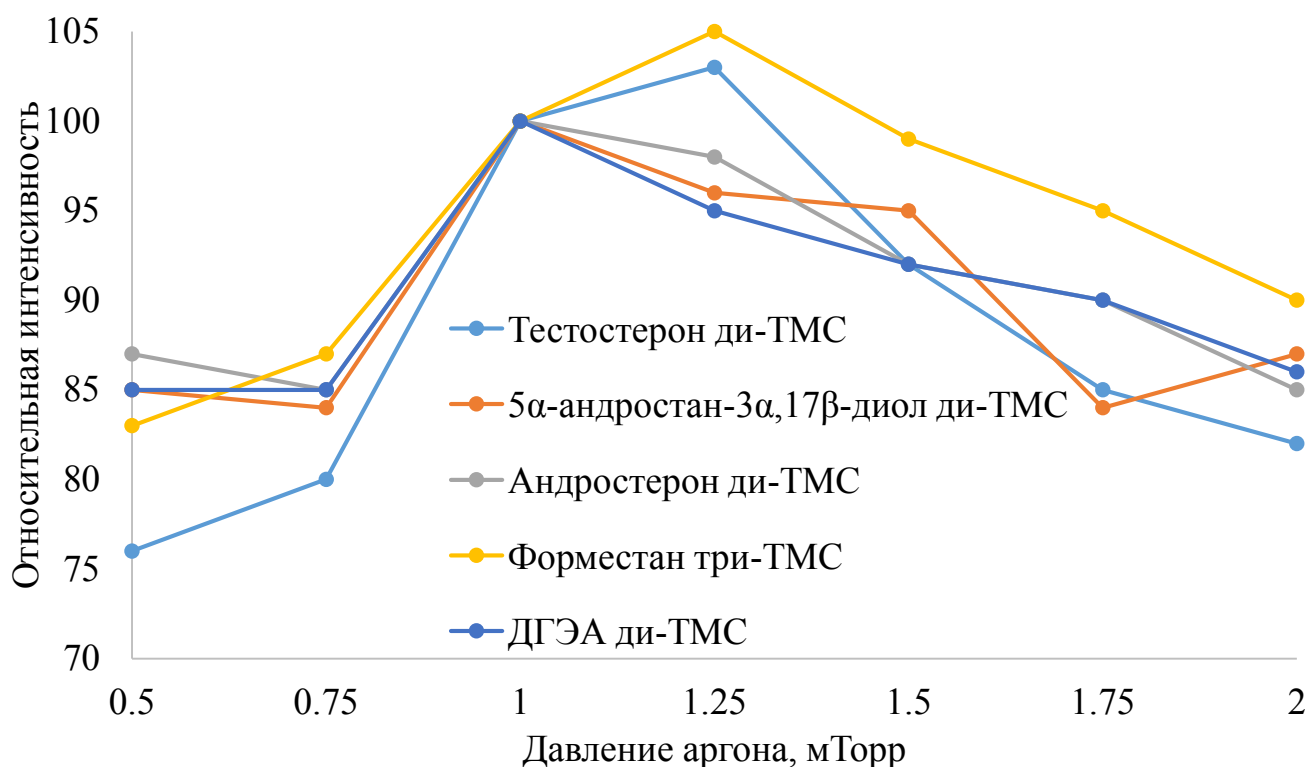


Рисунок 10 – Исследование влияния давления аргона в ячейке соударений на интенсивность сигнала некоторых маркеров «стероидного профиля»

Масс-спектры электронной ионизации (ЭИ) соединений, относящиеся к маркерам «стероидного профиля», а также масс-спектры, полученные из ионов-прекурсоров, приведены на рисунках 11–28. Результаты проведенного исследования приведены в таблице 5. Переходы для дейтерированных стандартов были выбраны по аналогии с их недейтерированными аналогами.

Testosterone #2854-2891 RT: 12.32-12.44 AV: 38 SB: 291 10.29-10.85 , 9.65-10.04 NL: 1.48E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

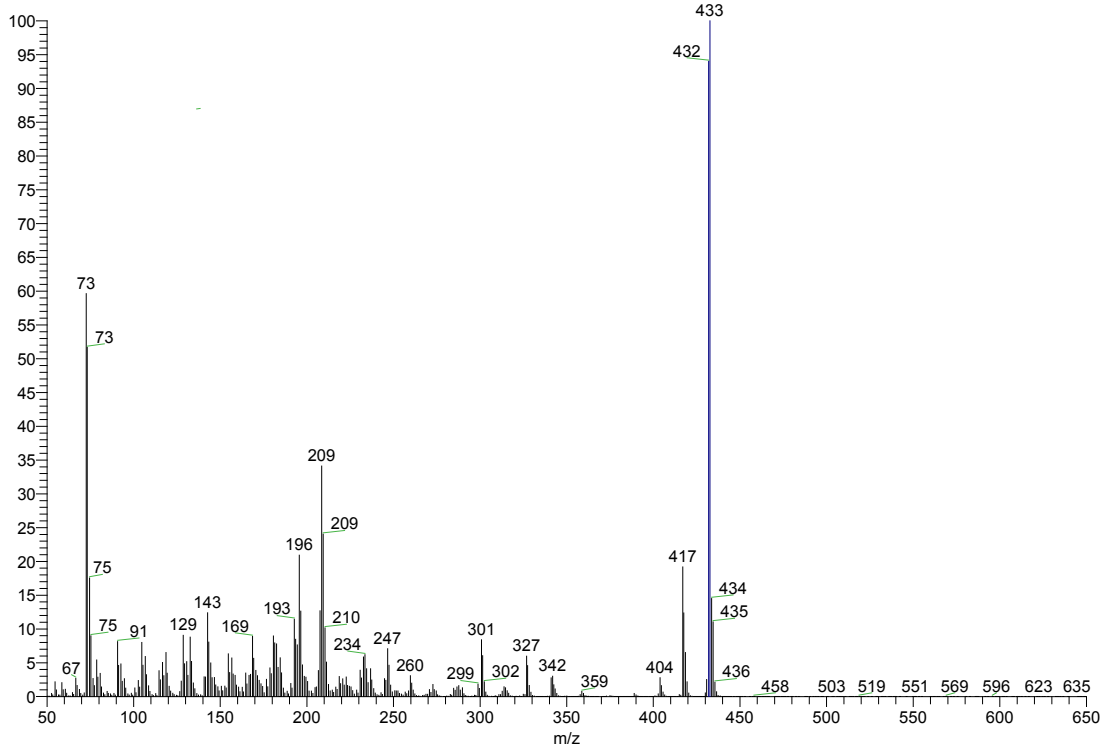


Рисунок 11 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного тестостерона по полному ионному току

Testosterone #4051 RT: 12.36 AV: 1 SB: 27 12.51-12.64 , 12.10-12.27 NL: 2.85E7
F: + c EI Full ms2 432.014 [50.000-450.000]

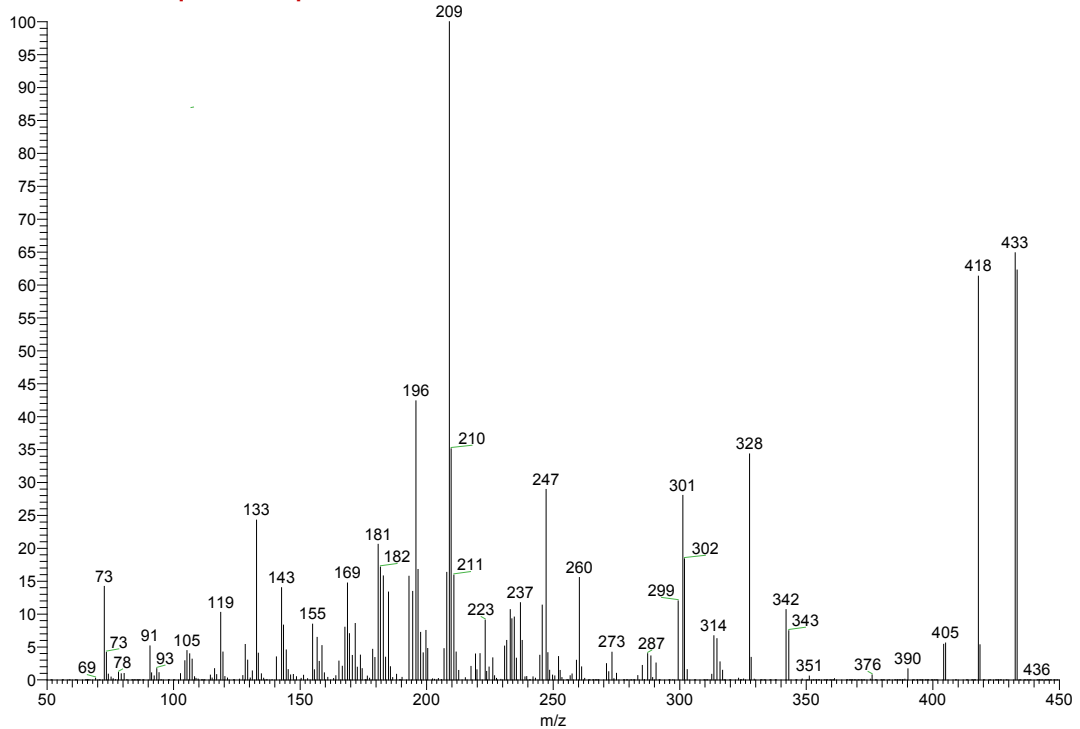


Рисунок 12 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного тестостерона с массой 432 Да при энергии соударения 14 эВ

Epitestosterone #2644-2682 RT: 11.63-11.75 AV: 39 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 1.55E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

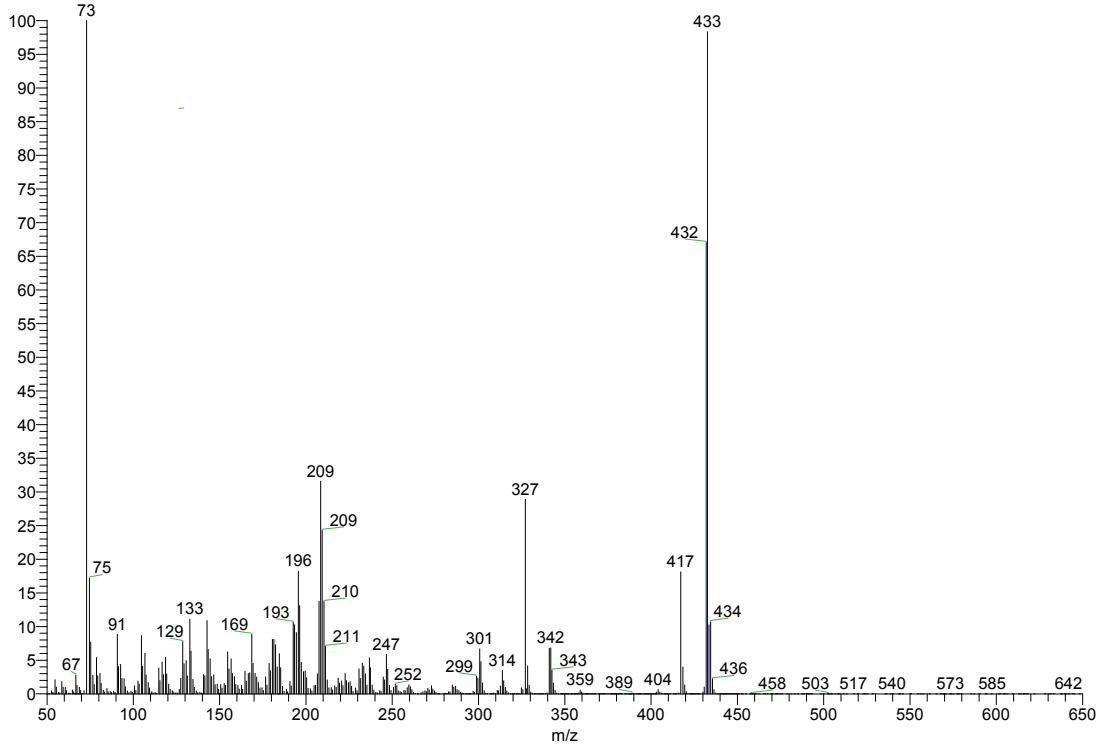


Рисунок 13 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного эпитестостерона

Epitestosterone #3807-3842 RT: 11.67-11.75 AV: 36 SB: 229 11.87-12.17, 11.35-11.57 NL: 5.78E6
F: + c EI Full ms2 432.013 [50.000-450.000]

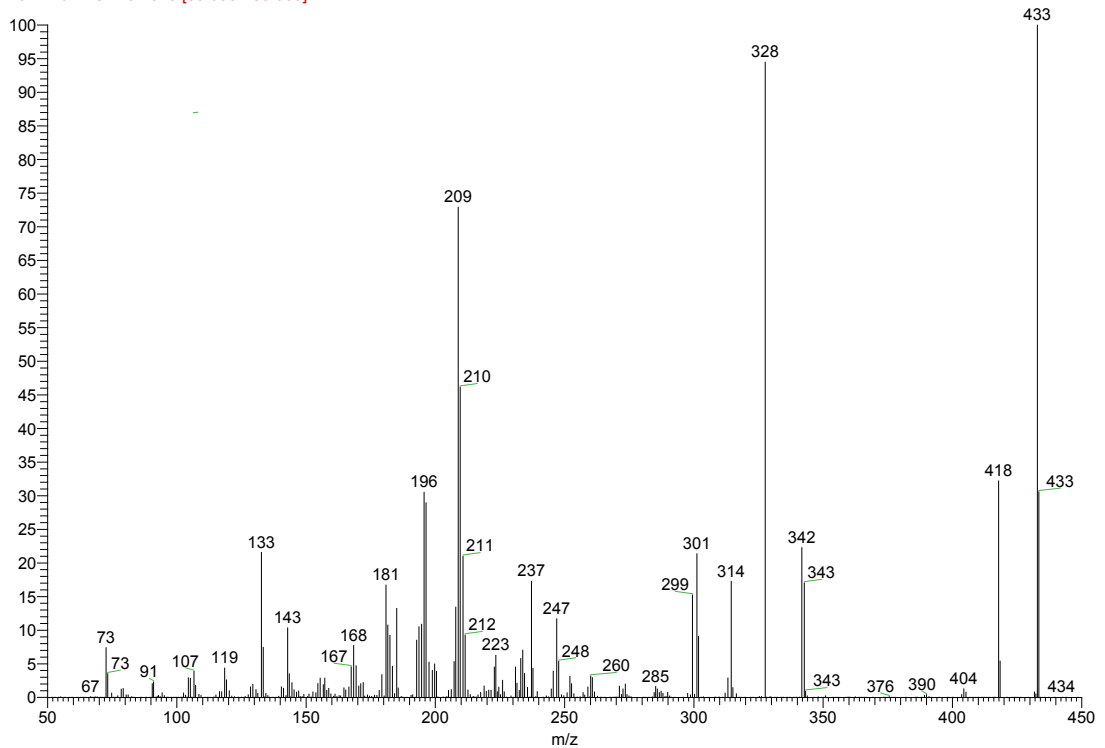


Рисунок 14 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного эпитестостерона с массой 432 Да при энергии соударения 14 эВ

Androsterone #2181-2209 RT: 10.10-10.20 AV: 29 SB: 291 10.29-10.85 , 9.65-10.04 NL: 2.46E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

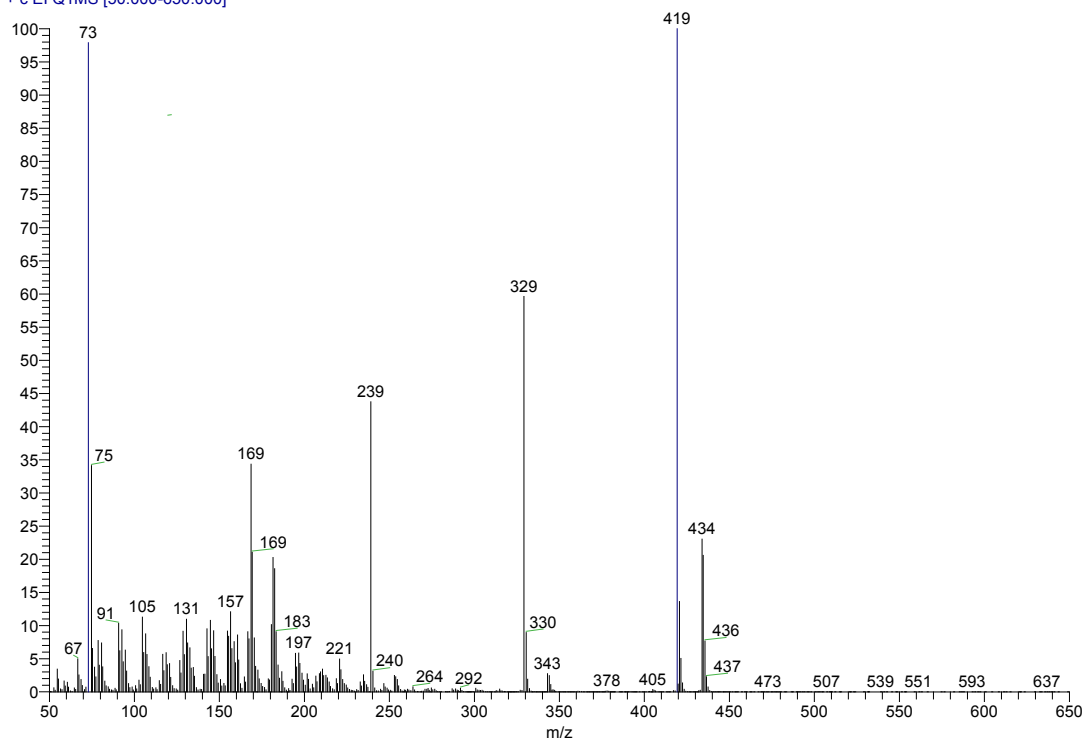


Рисунок 15 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного андростерона

Androsterone #3083-3113 RT: 10.11-10.17 AV: 5 SB: 44 10.30-10.55 , 9.65-10.01 NL: 7.22E6
F: + c EI Full ms2 434.020 [50.000-450.000]

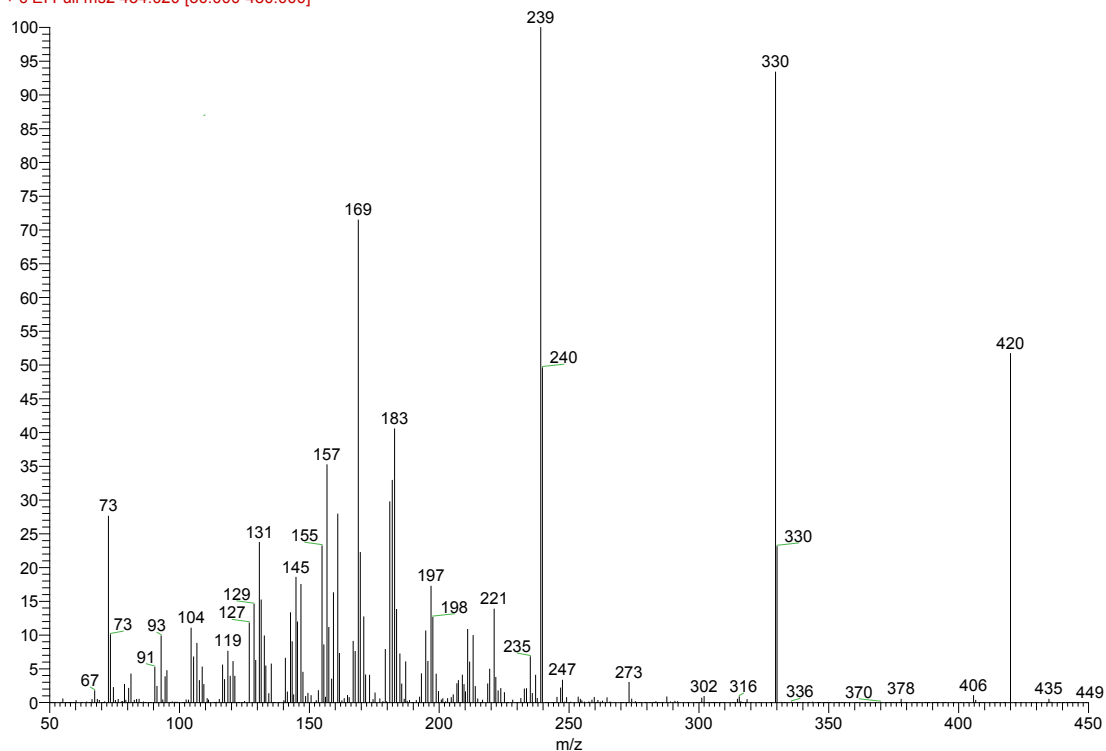


Рисунок 16 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного андростерона с массой 434 Да при энергии соударения 14 эВ

Etiocholanolone #2222-2256 RT: 10.24-10.35 AV: 35 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 1.60E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

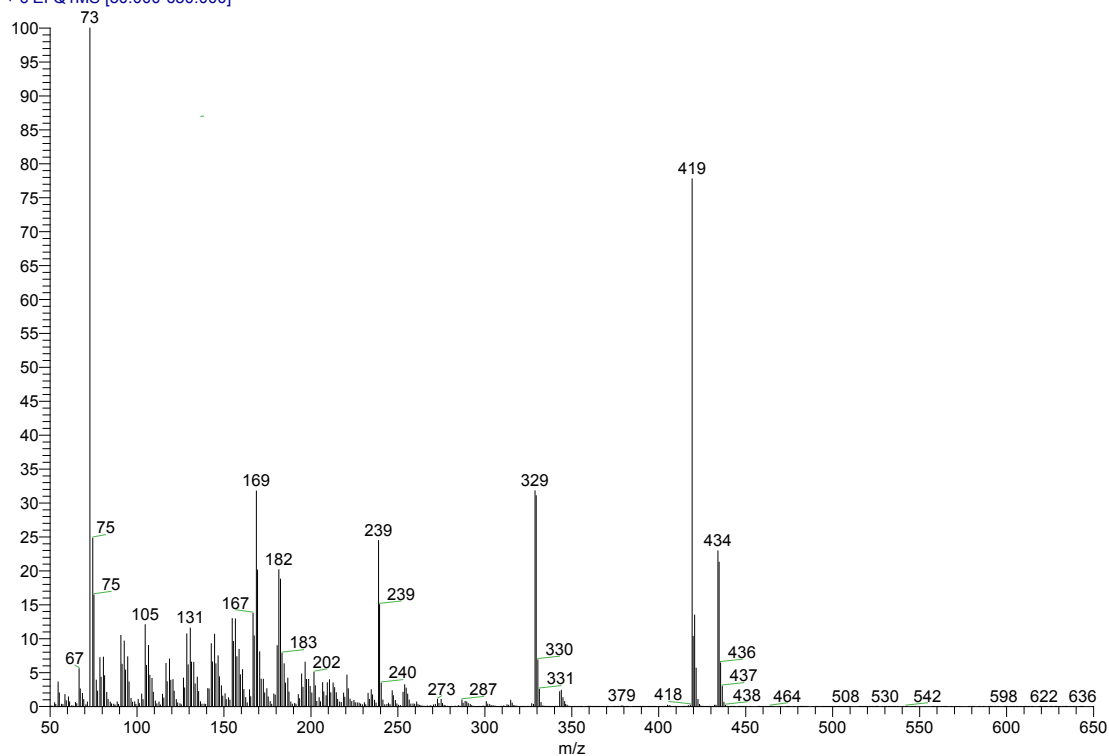


Рисунок 17 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного этиохоланолонна

Etiocholanolone #3146-3171 RT: 10.26-10.30 AV: 4 SB: 42 10.50-10.79, 9.89-10.18 NL: 7.17E6
F: + c EI Full ms2 434.020 [50.000-450.000]

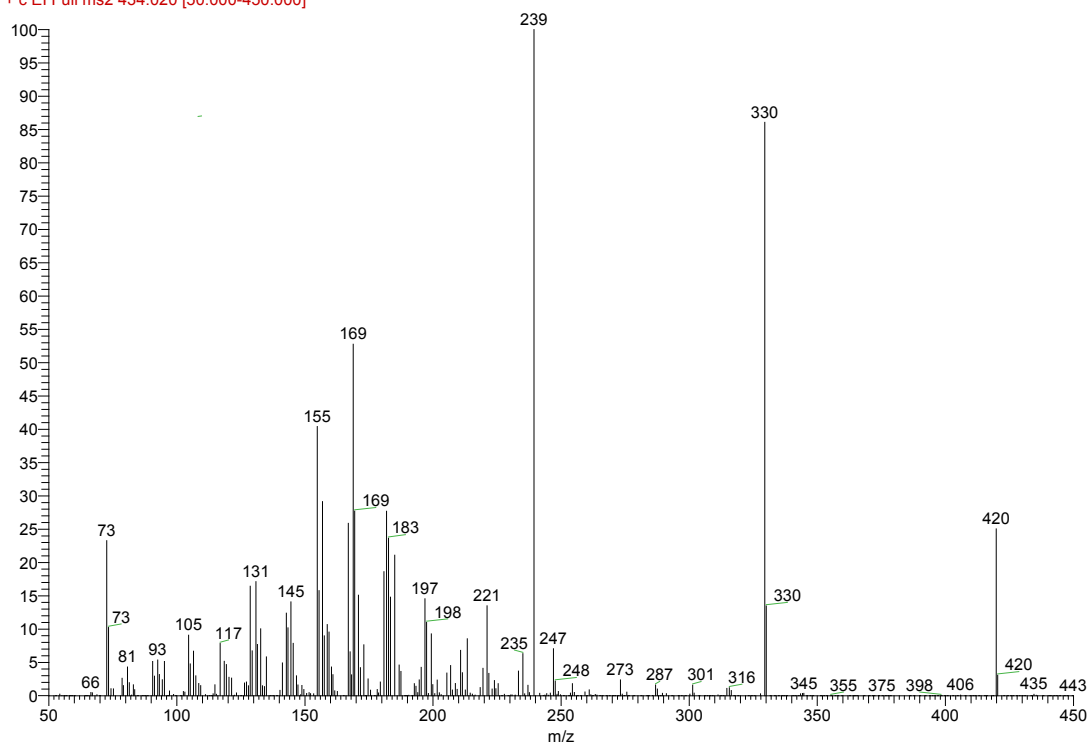


Рисунок 18 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного этиохоланолонна с массой 434 Да при энергии соударения 14 эВ

5 α -diol #2277-2307 RT: 10.42-10.52 AV: 31 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 1.68E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

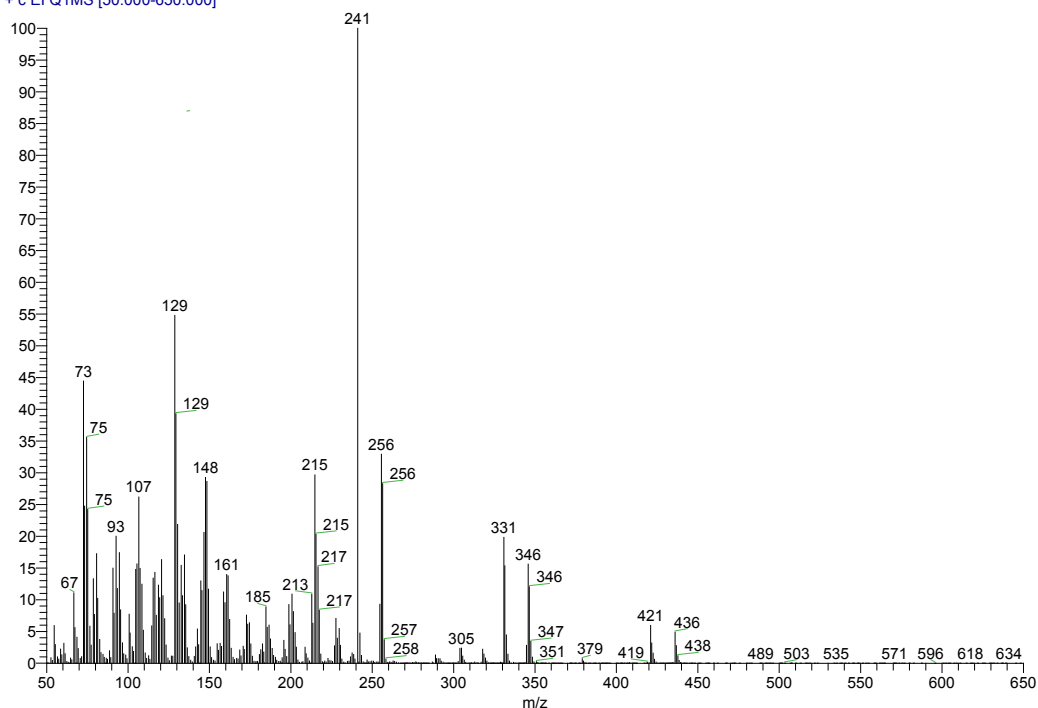


Рисунок 19 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола

5 α -diol #5288-5350 RT: 10.46-10.54 AV: 63 SB: 147 10.62-10.71, 10.31-10.42 NL: 9.14E6
F: + c EI Full ms2 256.014 [50.000-280.000]

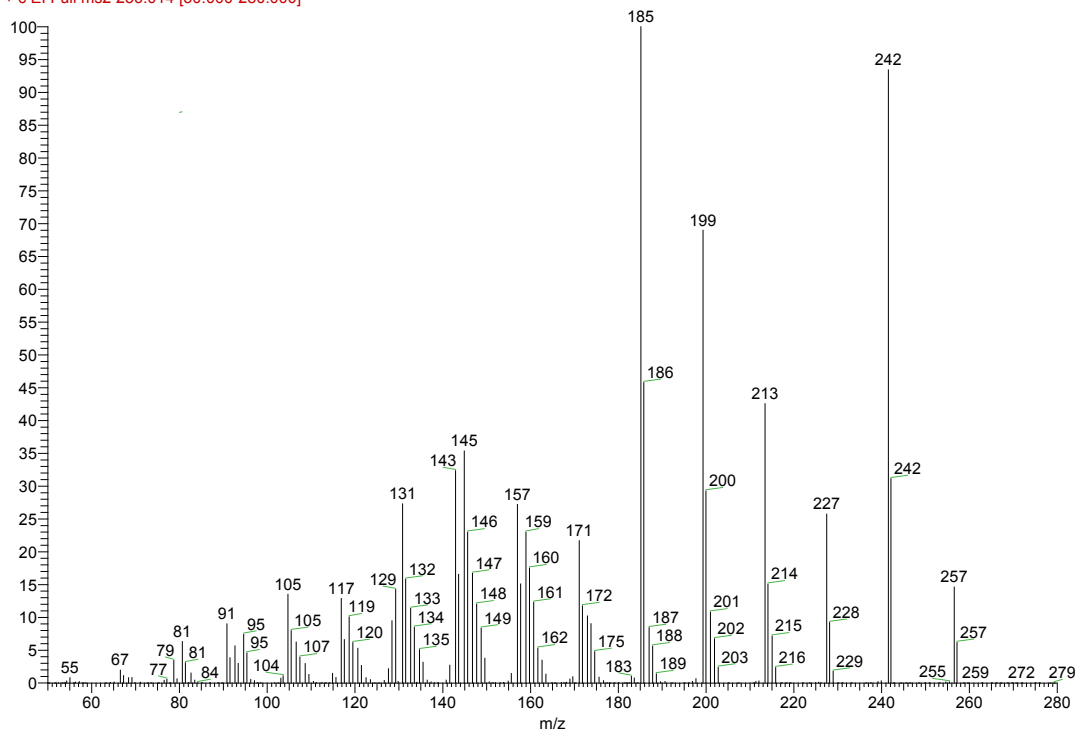


Рисунок 20 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола с массой 256 Да при энергии соударения 8 эВ

5b-diol #2303-2339 RT: 10.50-10.62 AV: 37 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 1.29E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

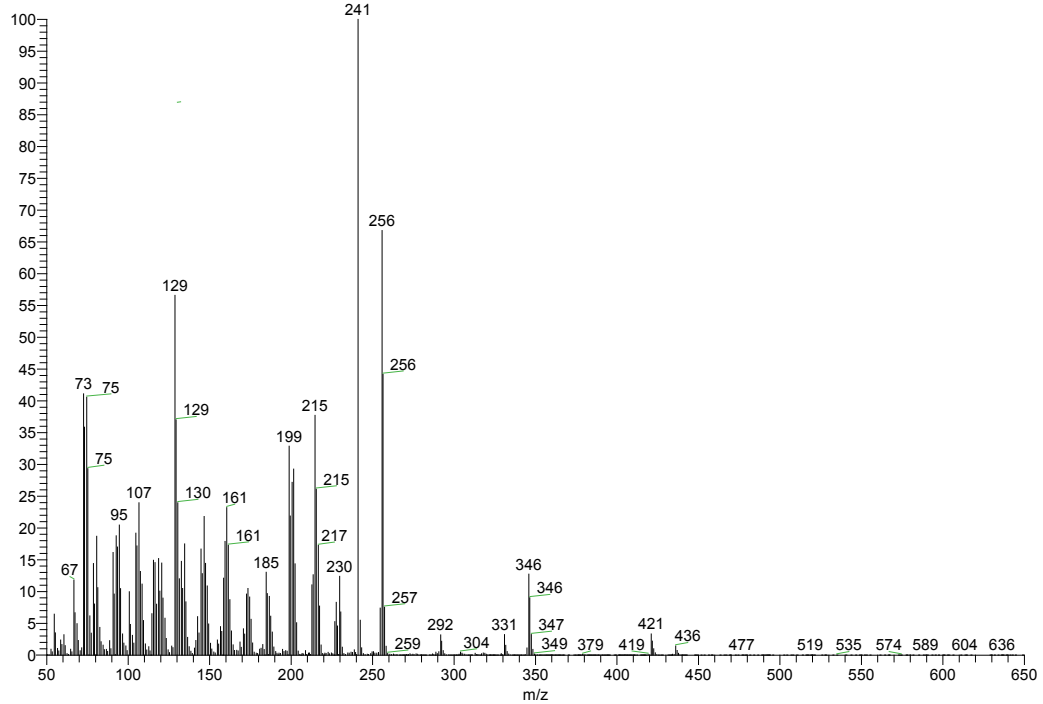


Рисунок 21 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного 5β-андростан-3α,17β-диола

5b-diol #5377-5432 RT: 10.55-10.63 AV: 56 SB: 126 10.69-10.77, 10.44-10.53 NL: 4.99E6
F: + c EI Full ms2 256.014 [50.000-280.000]

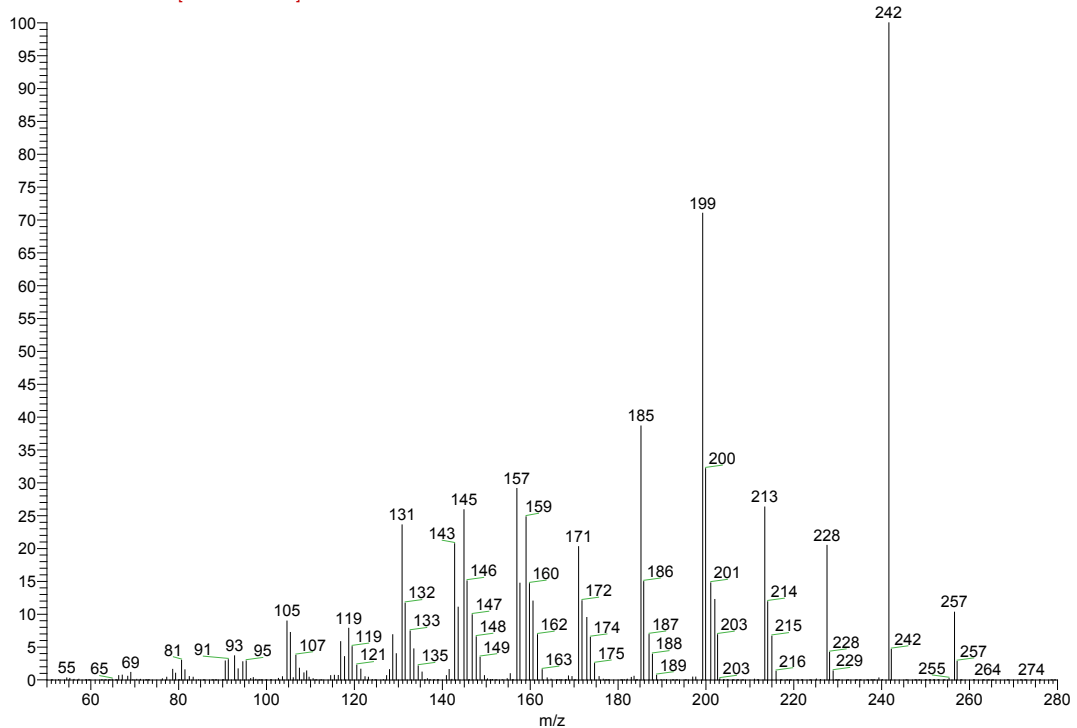


Рисунок 22 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного 5β-андростан-3α,17β-диола с массой 256 Да при энергии соударения 8 эВ

Formestane #3638-3666 RT: 14.90-14.99 AV: 29 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 2.08E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

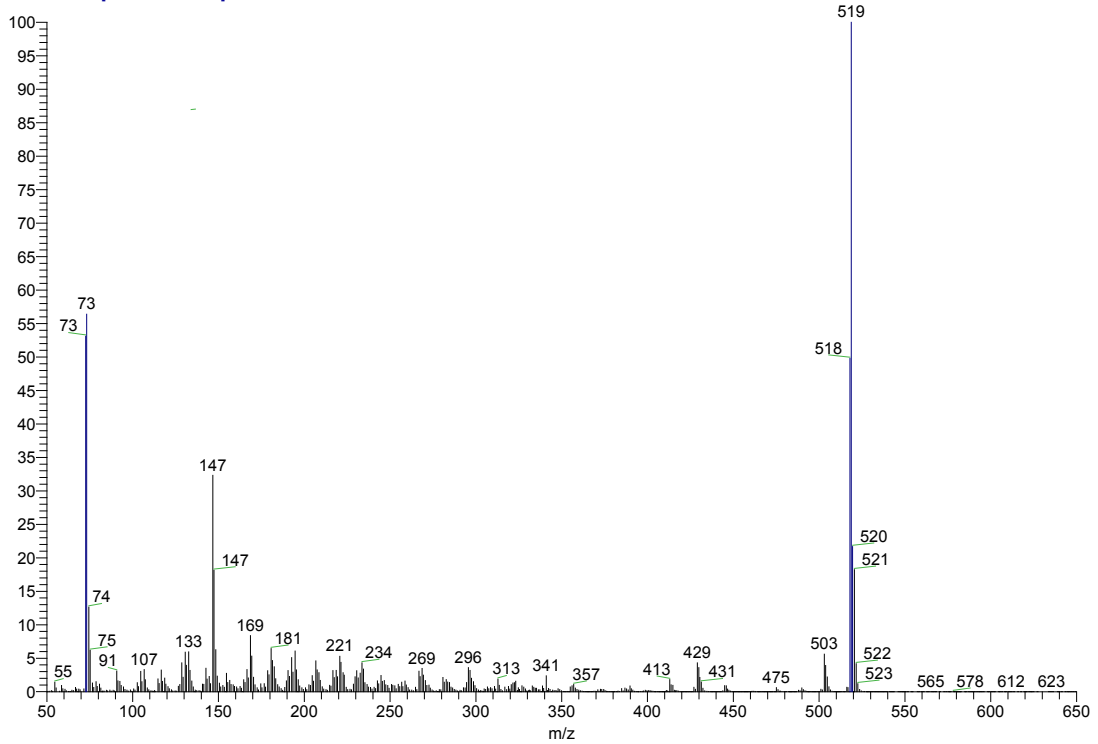


Рисунок 23 – Масс-спектр ЭИ три-ТМС производного форместана

Formestane #4434-4452 RT: 14.91-14.95 AV: 7 SB: 69 15.05-15.31, 14.66-14.85 NL: 1.08E7
F: + c EI Full ms2 518.017 [50.000-520.000]

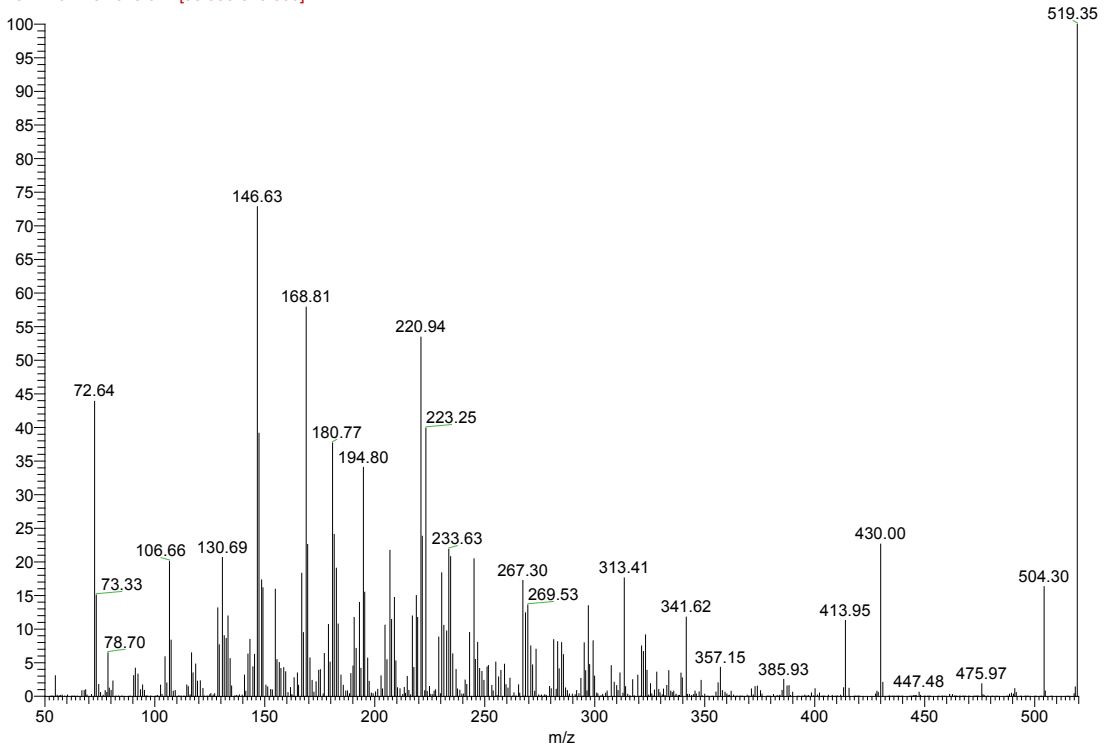


Рисунок 24 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора три-ТМС производного форместана с массой 518 Да при энергии соударения 17 эВ

DHEA #2522-2559 RT: 11.22-11.35 AV: 38 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 1.06E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

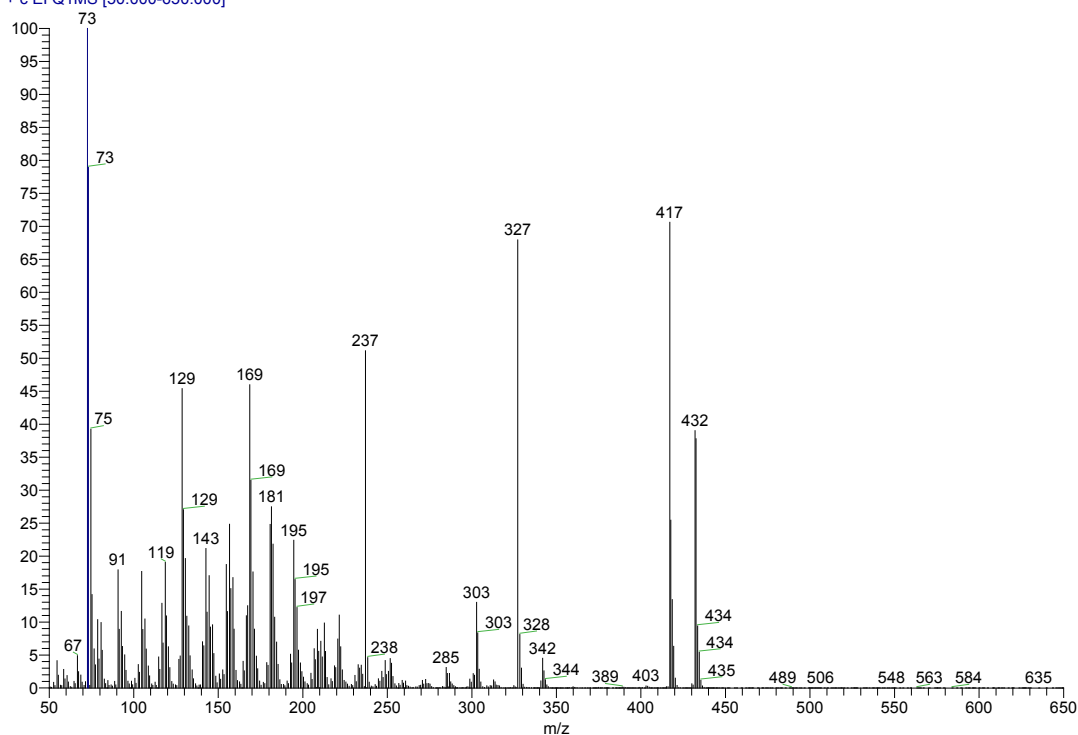


Рисунок 25 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного дегидроэпиандростерона

DHEA #3596-3622 RT: 11.27-11.33 AV: 27 SB: 132 11.38-11.55, 11.11-11.24 NL: 3.98E5
F: + c EI Full ms2 417.010 [50.000-450.000]

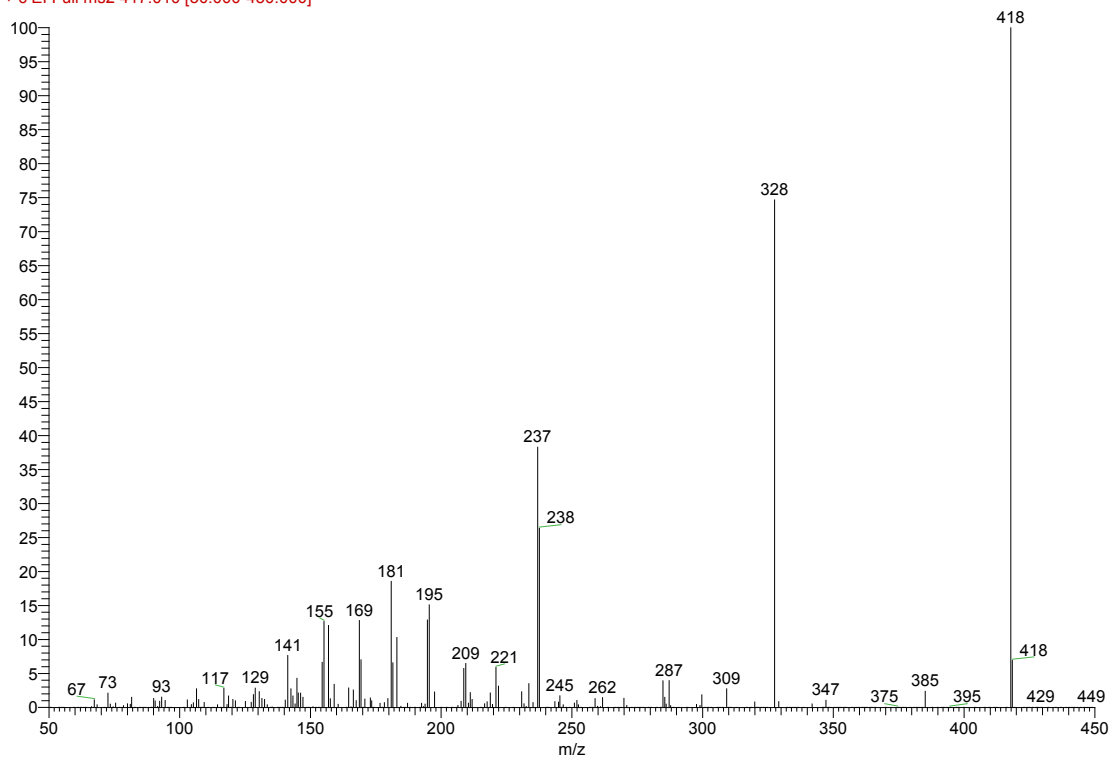


Рисунок 26 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного дегидроэпиандростерона с массой 417 Да при энергии соударения 11 эВ

5 β -dione #1858-1886 RT: 9.04-9.13 AV: 29 SB: 291 10.29-10.85, 9.65-10.04 NL: 2.33E8
T: + c EI Q1MS [50.000-650.000]

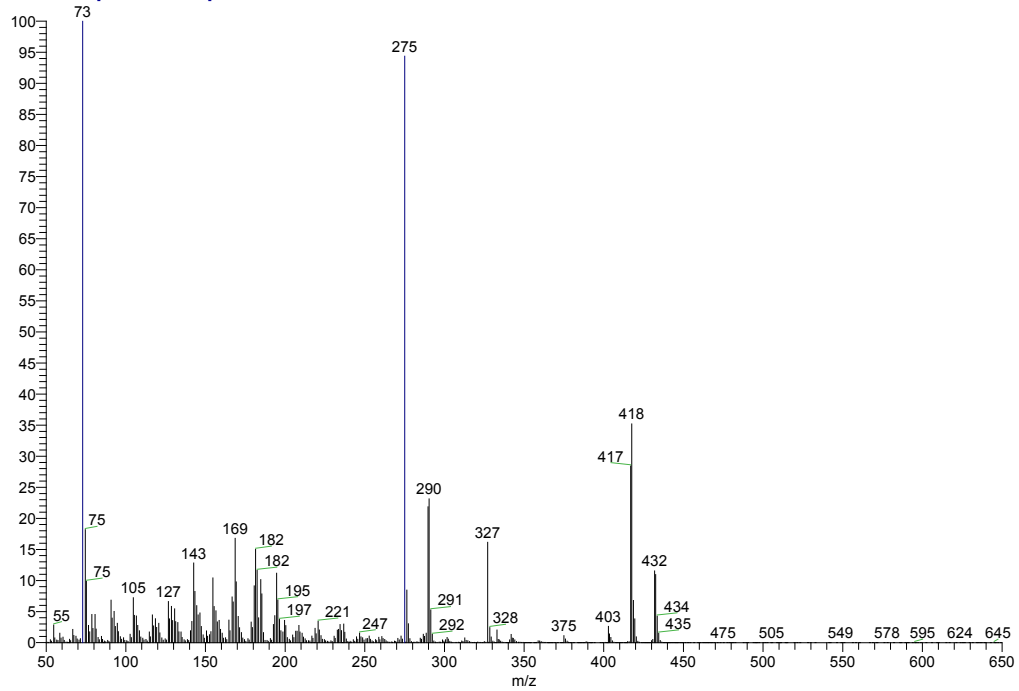


Рисунок 27 – Масс-спектр ди-ТМС производного 5 β -андростандиона

5 β -dione #2678-2709 RT: 9.07-9.14 AV: 32 SB: 195 9.22-9.49, 8.84-9.01 NL: 8.48E5
F: + c EI Full ms2 432.015 [50.000-450.000]

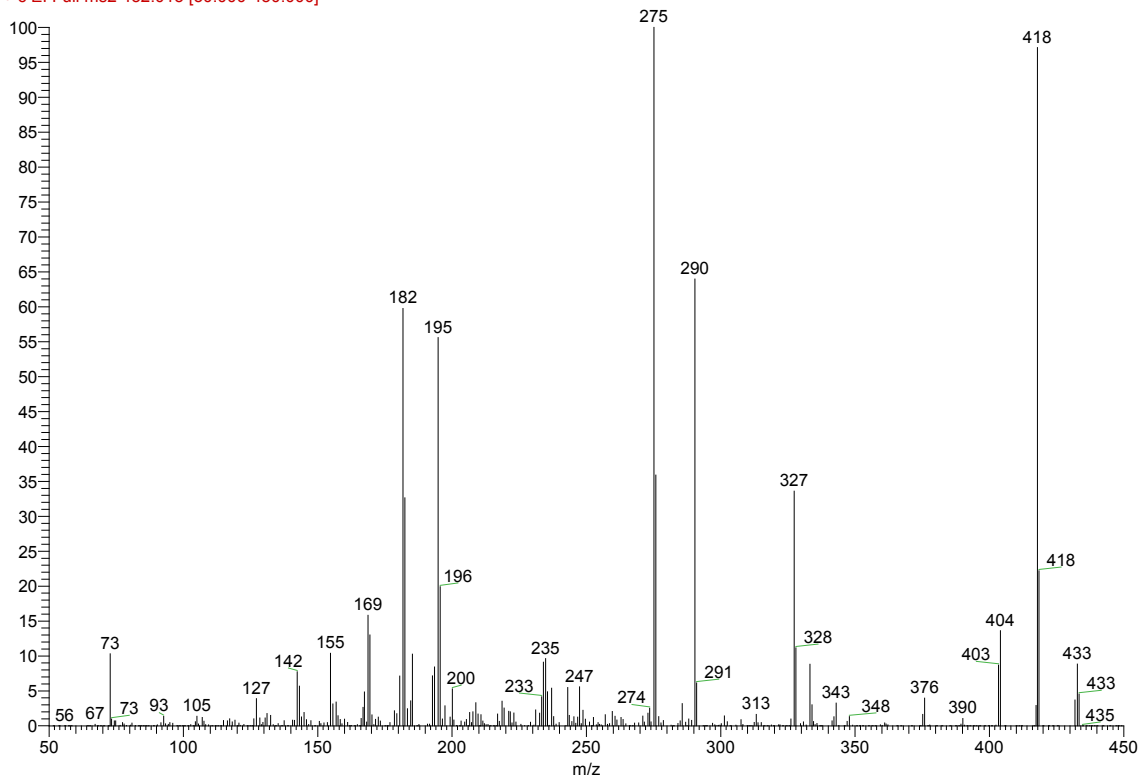


Рисунок 28 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного 5 β -андростандиона с массой 432 Да при энергии соударения 15 эВ

Таблица 5 – МЗР-переходы при определении маркеров «стероидного профиля» с использованием ГХ-МС/МС (ЭИ)

Соединение	Ион-предшественник, Да	Ион-продукт, Да	Энергия соударений, эВ	Время удерживания, мин
Андростерон ди-ТМС	*434.3	239.1	18	10.2
	434.3	329.1	13	
	329.3	239.1	7	
Этиохоланолон ди-ТМС	*434.3	239.1	16	10.4
	434.3	329.1	13	
	329.3	239.1	7	
Тестостерон ди-ТМС	*432.3	209.1	14	12.4
	417.3	327.1	7	
	432.3	417.1	12	
Эпитестостерон ди-ТМС	*432.3	209.1	11	11.7
	417.3	327.1	9	
	432.3	417.1	11	
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол ди-ТМС	*256.1	185.0	12	10.5
	256.1	241.1	9	
	436.3	256.1	5	
5 β -андростан-3 α ,17 β -диол ди-ТМС	*256.1	185.0	14	10.6
	256.1	241.1	9	
	436.3	256.1	5	
Форместан три-ТМС	*518.3	169.0	17	14.9
	518.3	147.0	25	
	518.3	429.3	10	
ДГЭА ди-ТМС	*417.3	237.1	10	11.3
	237.1	195.0	10	
	432.3	169.1	16	
5 β -андростандион ди-ТМС	*432.3	275.1	15	9.16
	432.3	418.1	13	
	432.3	182.1	18	

Продолжение таблицы 5

Соединение	Ион- предшественник, Да	Ион- продукт, Да	Энергия соударений, эВ	Время удерживания, мин
D ₃ -Тестостерон ди-ТМС	*435.3	209.2	22	12.4
D ₃ - Эпитестостерон ди-ТМС	*435.3	209.2	22	11.7
D ₃ -5 α -диола ди- ТМС	*259.1	188.1	23	10.5
D ₅ -Андростерон ди-ТМС	*424.3	244.1	12	10.2
D ₅ - Эпиандростерон ди-ТМС	*424.3	244.1	13	11.4

*Переходы, выбранные для количественного анализа

Второй и третий переходы служат для надежности идентификации. Данные по этим переходам не требуются в случае, когда в образец было добавлено заведомо известное соединение. Поэтому для дейтерированных стандартов приведен только один переход.

2.5 Оптимизация условий УВЭЖХ-МС/МС определения соединений, искажающих «стероидный профиль»

Разделение соединений, искажающих «стероидный профиль», осуществляли с использованием колонки Acquity UPLC BEH C18 (2.1×100 мм 1.7 мкм) с предколонкой Acquity UPLC BEH C18 (2.1×5 мм, 1.7 мкм). Принимая во внимание значительные отличия физико-химических свойств соединений, а также специфике пробоподготовки, разделение аналитов проводили в различных условиях. Ввиду высокой полярности пробеницида и этил глюкуронида, программа

хроматографического разделения должна была включать в себя постепенное увеличение элюирующей силы (таблица 6), чтобы не допустить их элюирования в мертвом времени удерживания.

Таблица 6 – Условия хроматографирования пробенецида и этил глюкуронида

Время, мин	Фаза А (H ₂ O + 0.1 % НСООН)	Фаза В (CH ₃ OH + 0.1 % НСООН)	Скорость потока, мкл/мин	Температура термостата, °С	Объем вводимой пробы, мкл
0.0	95	5	0.3	60	10
0.5	95	5			
5	5	95			
7.5	5	95			
7.51	95	5			
10.0	95	5			

Используя данную программу хроматографического разделения возможно определение всех аналитов, но для карбокси-финастерида и б β -гидроксидутастерида необходимо было создание отдельной методики их определения, обеспечивающей большую чувствительность за счет лучшей формы хроматографических пиков, и минимизирующей матричные эффекты в отношении аналитов. Это также позволило уменьшить объем вводимой пробы (таблица 7).

Таблица 7 – Условия хроматографирования карбокси-финастерида и 6β-гидрокси дутастерида

Время, мин	Фаза А (H ₂ O + 0.1 % НСООН)	Фаза В (CH ₃ ОН + 0.1 % НСООН)	Скорость потока, мкл/мин	Температура термостата, °С	Объем вводимой пробы, мкл
0.0	70	30	0.35	60	5
0.5	70	30			
5	5	95			
7.5	5	95			
7.51	70	30			
10.0	70	30			

Оптимизация условий детектирования аналитов с использованием УВЭЖХ-МС/МС осуществляли путем их напуска в камеру источника ионизации с использованием плунжерного насоса со скоростью 5-10 мкл/мин. Концентрации оптимизационных растворов пробенецида, карбокси-финастерида, 6β-гидрокси дутастерида и этил глюкуронида составляли 100 нг/мл. Результаты проведенного эксперимента приведены в таблице 8.

Для достижения максимальной чувствительности при потоке 0.3 мл/мин с жидкостного хроматографа были установлены оптимальные условия электрораспылительной ионизации (таблица 9).

Таблица 8 – Условия детектирования аналитов с использованием УВЭЖХ-МС/МС

Соединение	Время удерживания, мин	Напряжение на S-линзе	Ион-прекурсор, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударения, эВ	Полярность
пробенецид	5.11	72	284.1	240.1 140.1	17 26	—
карбокси-финастерид	3.79	100	402.2	102.1 357.1	32 29	—

Продолжение таблицы 8

Соединение	Время удерживания, мин	Напряжение на S-линзе	Ион-прекурсор, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударения, эВ	Полярность
6β-гидрокси-дугастерид	5.08	130	545.2	270 280	29 28	+
этил глюкуронид	1.24	78	221	75.1 85.1	19 20	—

Таблица 9 – Основные параметры источника ионизации и масс-спектрометра при определении аналитов*

Название параметра	Значение
Напряжение спрея (+)	4000 В
Напряжение спрея (-)	3000 В
Давление в камере газа соударения (аргон)	1.5 мТорр
Ширина пропускания квадруполя Q1	0.7 Да
Ширина пропускания квадруполя Q3	0.7 Да
Температура капилляра	300 °С
Температура распылителя	370 °С
Значение газа для распыления	50
Значение газа-оболочки	20
Значение встречного газа	0

*Для соединений, приведенных в таблице 7

2.6 Пробоподготовка мочи для последующего ГХ-МС/МС анализа

Стероидные гормоны находятся в моче в конъюгированном виде, преимущественно в виде глюкуронидов и сульфатов. Прямой анализ конъюгатов осуществляется с использованием УВЭЖХ-МС/МС с источниками химической ионизации при атмосферном давлении и электрораспылительной ионизации, однако пределы обнаружения этим методом значительно уступают методу ГХ-МС/МС с ЭИ, и требуют учета обнаружения всех конъюгированных форм, что приводит к значительной суммарной неопределенности химического анализа.

Газохроматографический анализ образцов подразумевает предварительную деконъюгацию проб. Маркеры «стероидного профиля», за исключением ДГЭА, образуют преимущественно глюкуроновые конъюгаты, соответственно для проведения гидролиза была выбрана β -глюкуронидаза. К 3 мл мочи добавляли 50 мкл раствора дейтерированных внутренних стандартов, 1 мл фосфатного буферного раствора (п. 2.3.1) и инкубировали при 57°C. Стероиды, свободные от остатка глюкуроновой кислоты, экстрагировали с помощью 5 мл диэтилового эфира после добавления 1 мл карбонатного буфера (п. 2.3.2) для придания раствору щелочного pH с последующим высаливанием 1.5 г. сульфата натрия. После тщательного перемешивания в течение 10 мин. и центрифугирования (5 мин. при 4000 об/мин), образцы помещали в криостат при температуре -30°C, что приводило к быстрому замораживанию водного слоя, В этом случае одновременно реализовывался подход экстракционного вымораживания, облегчался перенос эфирного слоя для его дальнейшего упаривания в твердотельном нагревателе при 70°C и последующая дериватизация аналитов. Для этого в пробирку с сухим остатком, охлажденную до комнатной температуры, добавляли 50 мкл дериватизирующего раствора (п. 2.3.3) и инкубировали 20 мин при 70°C.

2.7 Обоснование выбора маркеров пробоподготовки при проведении ГХ-МС/МС анализа

Для обеспечения контроля качества в рутинном анализе и учета потерь на стадиях подготовки проб к анализу, на этапе ввода буферной смеси и ферментативного гидролиза в пробы вводили два внутренних стандарта – метилтестостерон (относительно которого проводится пересчет содержания всех аналитов в пробе) и глюкуронид дейтерированного андростерона (D₅-Андро). Но достоверно провести оценку полноты гидролиза возможно только при условии сравнения отклика D₅-Андро с внутренним стандартом, который должен быть близок к нему по свойствам, и находится в образце в виде агликона. Идеальным кандидатом для этих целей является дейтерированный эпиандростерон (D₅-ЭпиАндро), так как отличается от D₅-Андро только ориентацией гидроксигруппы в третьем положении. При этом на выбранной колонке происходит их полное хроматографическое разделение. Значение отношения D₅-Андро/D₅-ЭпиАндро больше 0.8 соответствует 100 % полноте проведения гидролиза. При отношении ниже 0.6, т. е. 75 % полноте гидролиза, необходима повторная пробоподготовка с дополнительным введением 50 мкл β-глюкуронидазы.

В некоторых случаях дериватизация может проходить не полностью из-за протекания конкурирующих реакций с полярными молекулами. Поэтому контроль полноты дериватизации также является неотъемлемой частью анализа. Процесс дериватизации андростерона и этиохоланолона может проходить не полностью из-за высоких концентраций в моче. Продуктами их неполной дериватизации являются моно-ТМС производные. Для контроля полноты протекания реакций целесообразно использование отношений моно-ТМС производных андростерона и этиохоланолона к их ди-ТМС производным. Если данное отношение превышает 0.1, можно утверждать, что дериватизация прошла не полностью.

2.8 Пробоподготовка мочи для последующего УВЭЖХ-МС/МС анализа

В работе использовали два вида пробоподготовки для метода УВЭЖХ-МС/МС. Первый метод идентичен описанной в п. 2.6 пробоподготовке для ГХ-МС/МС анализа до стадии дериватизации. После упаривания пробы перерастворяли в смеси вода/метанол (50/50), объемом 1 мл и переносили в вials для анализа.

Второй способ заключался в разбавлении 200 мкл мочи раствором вода/метанол (97/3) в 5 раз, центрифугировании и переносе 100 мкл в вial.

2.9 Выбор матрицы для приготовления калибровочных растворов мочи

Калибровочные растворы эндогенных стероидов, приготовленные на матрице воды и метанола, имеют в большинстве случаев более высокие коэффициенты чувствительности, но при их использовании невозможно провести достоверное количественное определение маркеров «стероидного профиля» в моче ввиду отсутствия матричных эффектов. Поэтому требуется подбор матрицы, которая была бы максимально похожа на мочу, но при этом не содержала бы определяемых соединений. На данный момент эта проблема однозначно не решена и у каждой антидопинговой лаборатории есть свой подход к решению таких задач.

Одним из таких способов является схема по очистке мочи от стероидов в свободной форме с помощью экстракции диэтиловым эфиром. Остатки эфира выпаривали на твердотельном нагревателе, в полученную «свободную мочу» добавляли стероиды в известной концентрации. Однако, данный метод имеет несколько существенных недостатков. За счет того, что из мочи удалены стероиды только в нативном, а не в конъюгированном виде, пробоподготовка такого образца проводится без гидролиза. При использовании такого способа проба не проходит полный цикл пробоподготовки и поэтому результаты, полученные с помощью «свободной мочи», нельзя считать достоверными.

Еще одной популярной матрицей, используемой во многих лабораториях, является детская моча. Стоит отметить, что нигде не указана какого возраста и пола должен быть ребенок. Известно, что детская моча не содержит стероидов, поэтому в нее можно искусственно добавить целевые соединения. Для исследования мы использовали мочу трехлетнего (МД1) и восьмилетнего (МД2) мальчика и шестилетней (МД3) девочки. Предварительно собранные образцы мочи были проанализированы методом ГХ-МС/МС на присутствие исследуемых эндогенных стероидов. В моче МД1 и МД3 не были найдены стероиды в концентрациях выше предела детектирования. Моча МД2 после проверки оказалась непригодной для дальнейшего исследования, так как содержала целевые соединения в значимых концентрациях, поэтому в дальнейших исследованиях моча МД2 не использовалась. Исходя из этого, был предложен подход, основанный на приготовлении матрицы для калибровки путем пропускания мочи через патрон твердофазной экстракции C_{18} , масса сорбента 500 мг, объем 10 мл. Для приготовления мочи, не содержащей эндогенных стероидов, использовали мочу четверых добровольцев (2 женщины и 2-е мужчин). После смешивания в мочу был добавлен азид натрия (NaN_3) для консервации объединенной пробы. Моча была разлита во флаконы по 50 мл и отцентрифугирована при 3000 об/мин в течение 5 мин. для седиментации взвешенных частиц, присутствующих в образце и способных закупорить поры фриттов и сорбента при проведении твердофазной экстракции. Перед загрузкой образца на патрон, его кондиционировали с использованием 5 мл метанола и 5 мл воды, затем через него пропускали мочу, собирали слив, который представлял собой свободную от конъюгированных и свободных форм стероидов мочу. Через каждый патрон пропускали не более 40 мл мочи. Схема подготовки холостого образца приведена на рисунке 29.

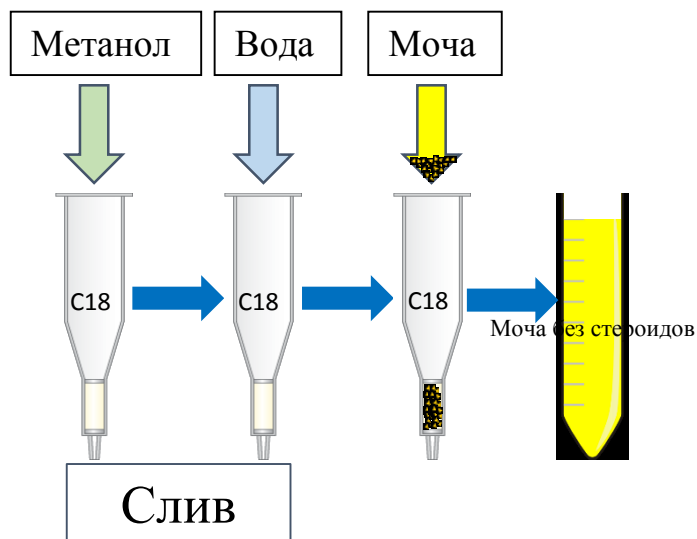


Рисунок 29 – Схема приготовления мочи, не содержащей стероидов.

Оценка точности и воспроизводимости результатов проводилась путем сопоставления полученного холостого образца мочи с коммерчески доступным стандартом МХ005 (NMI, Австралия), содержащим известное количество шести основных стероидов, входящих в биологический паспорт. Градуировочную зависимость строили в соответствии с концентрациями, приведенными в таблицах 10 и 11. Стандартное отклонение рассчитывалось из 5-ти вводов образца МХ005.

Таблица 10 – Уровни концентраций маркеров «стероидного профиля»

Соединение	Уровень концентрации маркеров, нг/мл						
	1	2	3	4	5	6	7
Тестостерон	1	5	10	50	100	150	200
Эпитестостерон	1	5	10	50	100	150	200
5 α -диол	2	30	50	100	150	200	250
5 β -диол	5	50	100	300	500	600	800
Андростерон	200	1000	3000	4000	6000	8000	10000
Этиохоланолон	200	1000	3000	4000	6000	8000	10000
ДГЭА	10	20	50	80	100	120	150
Форместан	1	5	10	15	20	25	50
5 β -андростандион	1	5	10	15	20	25	50

Таблица 11 – Конечные концентрации внутренних стандартов, входящих в состав «Нулевого градуировочного раствора» (в пересчете 50 мкл на 3 мл мочи)

Соединение	Нулевой градуировочный раствор
D ₃ -тестостерон	50 нг/мл
D ₃ -эпитестостерон	50 нг/мл
D ₅ -андростерон глюкуронид*	1000 нг/мл
D ₅ -эпиандростерон	1000 нг/мл
D ₃ -5 α -диол	50 нг/мл

* в пересчете на агликон

Таблица 12 – Результаты анализа стандартного образца мочи МХ005 по градуировочным графикам, построенным на приготовленных на различных видах матриц образцах, нг/мл (n = 6, P= 0,95)

Соединение	Аттестовано в МХ005	ТФЭ	«СМ»	МД1	МД3
Т	40 ± 2	40 ± 1	39 ± 1	36 ± 1	38 ± 1
Е	11 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	8 ± 1	9 ± 1
Андро	1187 ± 39	1162 ± 38	1152 ± 33	1101 ± 30	1092 ± 32
Этио	1293 ± 44	1288 ± 40	1281 ± 46	1242 ± 44	1222 ± 46
5 β -диол	21 ± 2	20 ± 1	20 ± 1	18 ± 1	19 ± 1
5 α -диол	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	7 ± 1

Из полученных результатов (таблица 12) можно сделать вывод, что самым близким к сертифицированному значению являются результаты, полученные с помощью калибровки на матрице мочи, пропущенной через патрон твердофазной экстракции С18. «Свободная моча» («СМ») тоже показала удовлетворительные результаты, но, учитывая описанные выше недостатки, уступает применению матрицы мочи после ТФЭ. Матрицы детской мочи МД1 и МД3, как и

предполагалось, не подходят для точного определения маркеров «стероидного профиля», так как значительно занижают результаты анализа.

2.10 Маркеры деградации мочи

Немаловажным аспектом при проведении исследований является оценка пригодности исследуемого образца к анализу и выявление попыток манипуляций с пробами. Одним из наиболее острых аспектов, влияющих на качество получаемых результатов, является деградация проб, обусловленная нарушением условий их хранения или транспортировки. Основной сложностью при изучении особенностей деградации проб мочи или оценке влияния различных ксенобиотиков на стероидный профиль, является необходимость работы с популяционными выборками, обеспечивающими представительность.

Для проведения исследований маркеров деградации мочи, был проведен анализ 6418 проб мочи мужчин и 4262 женщин в соответствии с описанными и валидированными методиками, описанными в п. 2.4 и 2.6. Самым простым методом определения деградации мочи является определение её рН. Физиологические нормы рН мочи человека находятся в диапазоне от 4.5 до 8.0. Отклонение рН в более щелочную среду свидетельствует о микробиологической деградации образца, тогда как отклонение в более кислую среду свидетельствует о вероятной подмене образца мочи, например, яблочным соком (рН ~ 3.0).

Более показательным маркером деградации мочи является отношение ТМС производных 5β -андростандиона к этиохоланолону. Если данное отношение больше 0.1, образец мочи считается не валидным, так как корректные данные «стероидного профиля» получить у данного образца невозможно. По результатам проведенных анализов было выяснено что женские пробы мочи в 2 раза более подвержены деградации, чем мужские. При этом общая доля не валидных проб составила 1.46 % для мужчин и 3.18 % для женщин. Более подробное описание результатов проведенного эксперимента приведено на рисунке 30 и 31.

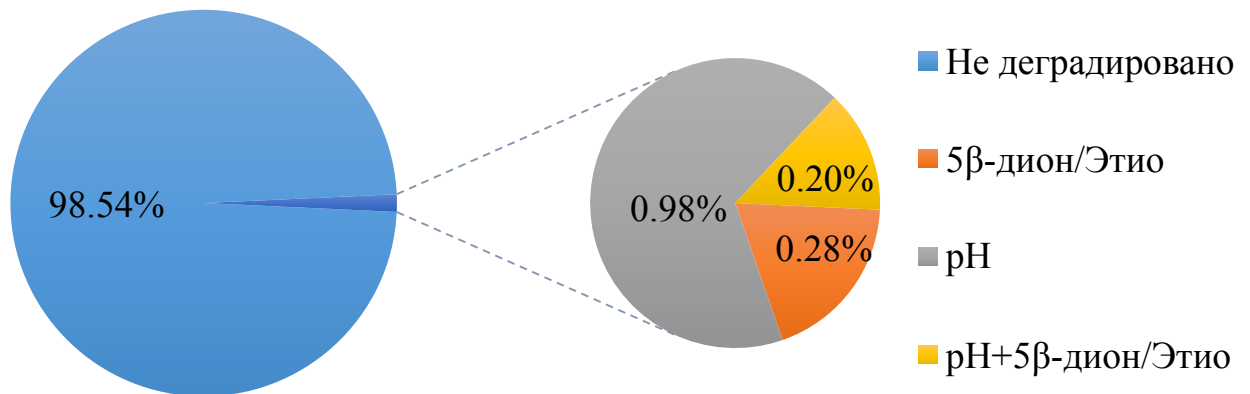
Мужчины

Рисунок 30 – Доля образцов мочи, собранной в мужской популяции, подвергшиеся деградации относительно общего количества проанализированных проб

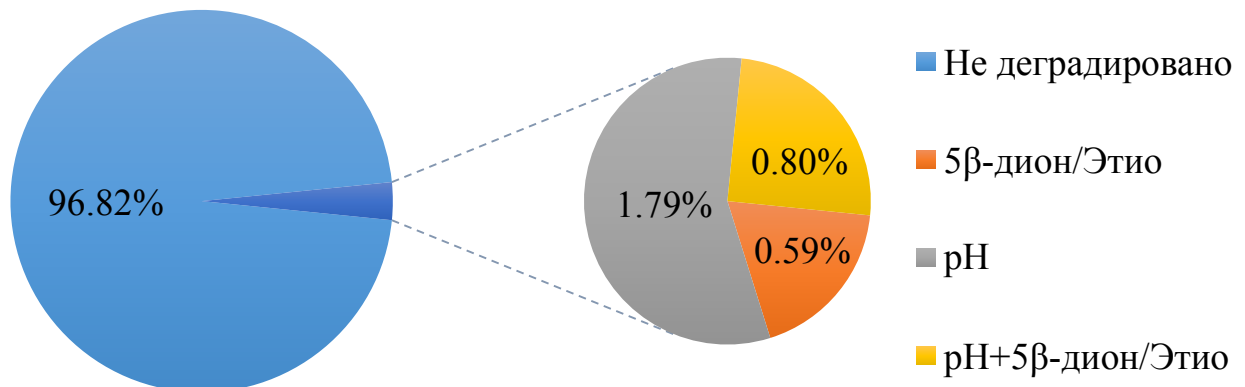
Женщины

Рисунок 31 – Доля образцов мочи, собранной в женской популяции, подвергшиеся деградации относительно общего количества проанализированных проб

2.11 Построение градуировочной зависимости для маркеров «стероидного профиля»

Построение калибровки с учетом литературных и статистических данных, полученных в лаборатории ранее, проводилось с учетом самой низкой и самой высокой точек калибровки для каждого маркера «стероидного профиля». Для достижения максимальной точности готовили 7 значимых уровней калибровки и один нулевой, содержащий только внутренние стандарты (таблицы 10 и 11). Соединения добавляли в заранее приготовленную матрицу мочи, предварительно прошедшую ТФЭ по описанному выше способу. Разными лаборантами было приготовлено всего 3 серии градуировочных растворов.

Пробоподготовку проводили по схеме, описанной в разделе 2.6. Для каждой калибровочной прямой были получены значения коэффициентов детерминации (R^2) (таблица 13).

Все полученные калибровочные зависимости имели линейную зависимость, а также достаточно высокие коэффициенты детерминации.

В более ранних работах, калибровку проводили один раз на 500 анализов. При проведении данных исследований её осуществляли при запуске каждой серии, состоящей не более чем из 50 образцов. Однако приготовление семи уровней калибровки вместе с анализируемыми пробами ежедневно достаточно трудоемкий процесс, который требует дополнительного расхода реагентов и времени на приготовление калибровочных растворов. Также дополнительно семь образцов увеличивали время анализа одной серии не менее, чем на 2.5 часа, что не отвечает требованиям к экспрессности.

Линейность диапазона определяемых концентраций маркеров «стероидного профиля» позволила воспользоваться методом ограничивающих растворов. В нижнем диапазоне использовали градуировочный раствор «Низкий», в верхнем «Высокий». Верификацию калибровки проводили с помощью образца раствора контроля качества «РКК», содержание аналитов в котором соответствовало

рассчитанным на предварительной выборке (100 образцов) медианным значениям маркеров «стероидного профиля» (таблица 14).

Таблица 13 – Значения коэффициентов детерминации для калибровочных графиков для каждого маркера «стероидного профиля»

Соединение	Внутренний Стандарт	Градуировочные растворы (нг/мл)	R ²	Относительное стандартное отклонение между R ² , (n=3)
Тестостерон	D ₃ -Тестостерон	1; 5; 10; 50; 100; 150; 200	0.9918	0.12
Эпитестостерон	D ₃ - Эпитестостерон	1; 5; 10; 50; 100; 150; 200	0.9933	0.16
5 α -диол	D ₃ -5 α -диол	2; 30; 50; 100; 150; 200; 250	0.9903	0.22
5 β -диол	D ₃ -5 α -диол	5; 50; 100; 300; 500; 600; 800	0.9927	0.36
Андростерон	D ₅ -Андростерон глюкуронид	200; 1000; 3000; 4000; 6000; 8000; 10000	0.9955	0.11
Этиохоланолон	D ₅ -Андростерон глюкуронид	200; 1000; 3000; 4000; 6000; 8000; 10000	0.9969	0.23
ДГЭА	D ₃ -Тестостерон	10; 20; 50; 80; 100; 120; 150	0.9903	0.28
Форместан	D ₃ -Тестостерон	1; 5; 10; 15; 20; 25; 50	0.9962	0.26
5 β -андростандион	D ₅ -Андростерон глюкуронид	1; 5; 10; 15; 20; 25; 50	0.9975	0.17

Градуировочные растворы маркеров «стероидного профиля» готовили на матрице мочи после ТФЭ, подготовленную согласно п. 2.9.

Проведение количественного масс-спектрометрического анализа при установлении «стероидного профиля» невозможно без внутренних стандартов. Внутренним стандартом может являться соединение, которое не содержится в анализируемой матрице, и имеет близкие к аналиту физико-химические свойства. Лучшим решением для подобных задач является использование изотопно-меченных аналогов анализируемых соединений. Реализация метода изотопного разбавления требует наличия изотопно-меченных внутренних стандартов в каждом образце. Для этого приготовили раствор на метанольной матрице «Нулевой градуировочный раствор», содержащий 5 внутренних стандартов. Значения конечных концентраций дейтерированных стандартов в пересчете на 3 мл мочи при условии добавления 50 мкл «Нулевого градуировочного раствора» приведены в таблице 11.

Таблица 14 – Используемые для рутинного определения маркеров «стероидного профиля» целевые соединения, входящие в состав градуировочных растворов

Соединение	Название градуировочного раствора и концентрация маркера, нг/мл		
	Низкий	Высокий	РКК
Тестостерон	1	200	10
Эпитестостерон	1	200	10
5 α -диол	2	250	30
5 β -диол	5	800	80
Андростерон	200	10000	2200
Этиохоланолон	200	10000	1800
ДГЭА	10	150	30
Форместан	1	50	5
5 β -андростандион	1	50	2

2.12 Измерение относительной плотности мочи

Корректировка концентрации аналита на относительную плотность играет важную роль в определении маркеров «стероидного профиля». Отклонение от норм свидетельствует о возможном разбавлении мочи с целью сокрытия «положительного» результата. Для корректировки концентраций аналитов с учетом плотности ВАДА предлагает использовать формулу

$$C_{\text{корр}} = C_{\text{изм}} \times (1.02 - 1)/(SG - 1), \quad (1)$$

где $C_{\text{корр}}$ – скорректированная концентрация,

$C_{\text{изм}}$ – измеренная концентрация соединения в моче,

SG – измеренная относительная плотность образца мочи.

Измерение плотности мочи проводили на предварительно калиброванном гидростатическом плотномере, полученные значения переводили в относительную плотность делением на стандартное значение плотности воды при +20 °C (0.998203 г/см³). Собранная статистика измерений по относительной плотности позволила построить диаграммы для мужской и женской популяции (рисунок 32 и 33). Значение медианы для мужской популяции составило 1.020, женской - 1.017, мода составила 1.024 для обеих популяций.

Измерение относительной плотности мочи проводили с точностью до четвертого знака после запятой. Относительная плотность человеческой мочи по установленным физиологическим нормам не может быть ниже 1.001, поэтому пробы, в которых значения относительной плотности были ниже, изначально считаются подозрительными. В ходе работы выявили 17 образцов с относительной плотностью ниже 1.001, из которых в 10 случаях удалось выявить, что пробы были разбавлены спиртосодержащей жидкостью. Данные пробы не соответствуют физиологическим нормам, значения маркеров «стероидного профиля» подобных образцов не учитывали в дальнейшей работе.

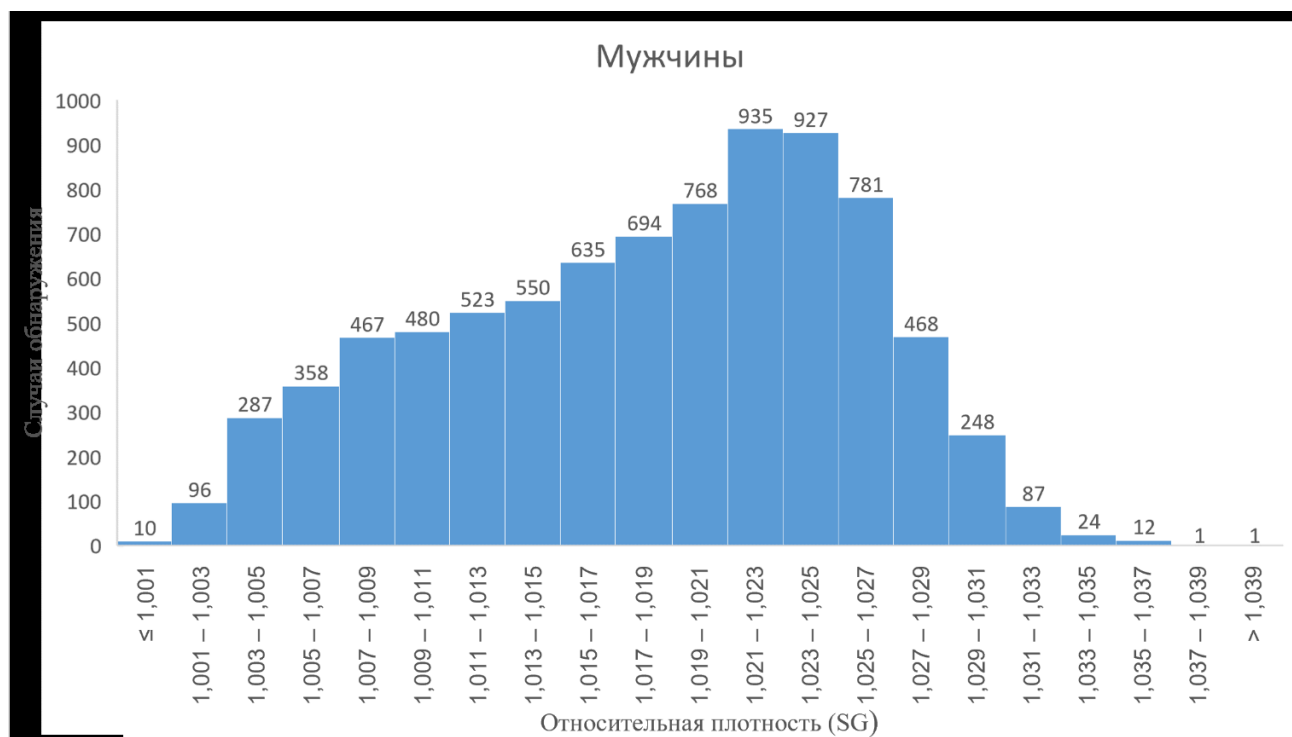


Рисунок 32 – Распределение значений относительной плотности образцов мочи для мужской популяции (8352 образца)

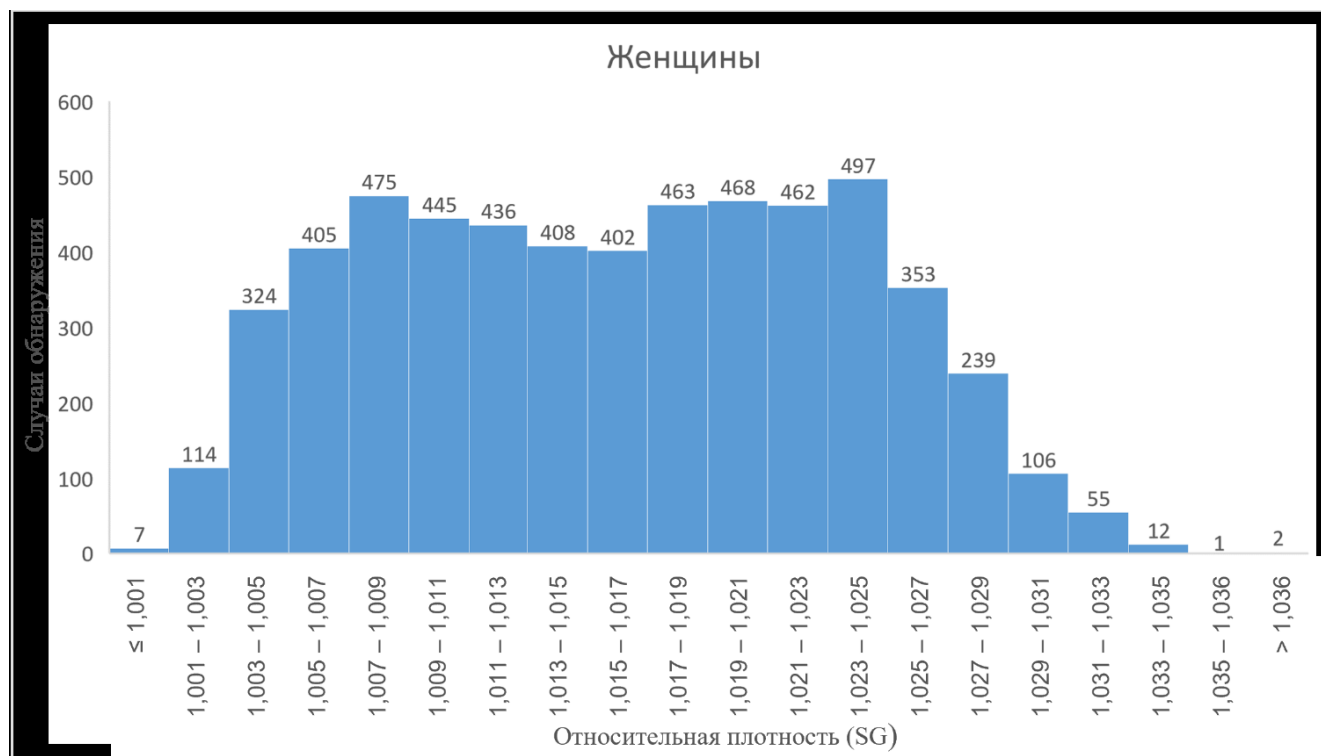


Рисунок 33 – Распределение значений относительной плотности образцов мочи для женской популяции (5674 образца)

2.13 Метрологическая аттестация методики определения маркеров «стероидного профиля»

В документе ВАДА об эндогенных стероидах приведены требования к стандартной неопределенности маркеров «стероидного профиля», которые должны выполняться при прохождении процедуры валидации [21]. На уровне предела количественного обнаружения (ПКО) маркера стандартная неопределённость не должна превышать 30 %. На уровне пяти пределов ПКО для андростерона и этиохоланолона этот показатель не должен быть выше 20 %, а для 5 α - и 5 β - диола – превышать 25 %. Для тестостерона и эпитестостерона стандартная неопределённость не должна превышать 20 % при условии, что их концентрация выше 5 нг/мл.

В ходе валидации разработанной методики были получены следующие метрологические характеристики:

- селективность/специфичность;
- степень извлечения;
- градуировочная зависимость и диапазон линейности;
- стандартное отклонение в условиях воспроизводимости;
- стандартное отклонение в условиях повторяемости;
- промежуточная прецизионность;
- смещение результата измерения от истинного (приписанного) значения;
- стандартная неопределенность;
- расширенная неопределенность.

Степень извлечения маркера оценивали по принципу «введено-найдено» на 10 образцах мочи (5 мужчин, 5 женщин), предварительно прошедших процедуры удаления стероидов с помощью ТФЭ. Образцы были разделены на две группы. В первую группу искусственно были добавлены маркеры «стероидного профиля» перед пробоподготовкой, во вторую группу были добавлены те же концентрации маркеров, но уже после экстракции, что подразумевает 100 % извлечение. Результаты экспериментальных исследований приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Степень извлечения маркеров «стероидного профиля» (n = 10, P = 0.95)

Соединение	Степень извлечения, %
Тестостерон	97 ± 4
Эпитестостерон	94 ± 6
5 α -диол	87 ± 11
5 β -диол	85 ± 11
Андростерон	91 ± 5
Этиохоланолон	91 ± 6
ДГЭА	89 ± 8
Форместан	92 ± 6
5 β -андростандион	85 ± 10

Оценку неопределённости проводили с помощью искусственного образца мочи, приготовленного на пропущенной через патрон ТФЭ матрице (п. 2.9), но отличной от той, которую использовали в градуировочных растворах. Содержание маркеров «стероидного профиля» в данной моче соответствовало нижней точке определения для каждого исследуемого соединения, а второй образец имел концентрации на уровне пяти пределов количественного обнаружения. Также использовали стандартный образец мочи МХ005 с известным содержанием маркеров «стероидного профиля». При расчете объединенной стандартной неопределенности u_c суммируется относительное стандартное отклонение в условиях воспроизводимости (прецизионность) u_{prec} и отклонение результата измерения от истинного (приписанного) значения u_{Trac} . Используемые формулы для расчета приведены в таблице 16. Полученные результаты представлены в таблице 17. В соответствии с критериями ВАДА, разработанный способ определения маркеров «стероидного профиля» прошел валидацию и может быть применен в рутинной практике антидопинговой лаборатории.

Таблица 16 – Формулы для расчета метрологических характеристик

Стандартная неопределенность (u_c)	$u_c = \sqrt{u_{Prec}^2 + u_{Trac}^2}$
Отклонение результата от истинного значения (u_{Trac})	$u_{Trac}^2 = u_{ref}^2 + bias (\%)^2$
Стандартное отклонение результатов по результатам межлабораторного сравнения (u_{ref})	$u_{ref}^2 = \frac{s_{cons}^2}{n_{cons}}$
Отклонение результата измерения в лаборатории ($bias (\%)$)	$bias (\%)^2 = \frac{X_{ref} - X_{method}}{X_{ref}}$
Расширенная неопределенность (U)	$U = k * u_c$

s_{cons} – стандартное отклонение результата межлабораторного сравнения,

n_{cons} – число лабораторий-участников,

X_{ref} – истинное значение концентрации,

X_{method} – измеренное (усредненное из 10 серий) значение концентрации,

k – коэффициент охвата, равен 2, что соответствует 95 % вероятности того, что результат измерения находится в интервале $X \pm U$.

Таблица 17 – Метрологические характеристики способа определения маркеров «стероидного профиля»

Соединение	u_c ПКО, %	u_c 5*ПКО, %
Тестостерон	6	10
Эпитестостерон	15	12
5 α -диол	28	19
5 β -диол	13	11
Андростерон	24	14
Этиохоланолон	25	11
ДГЭА	15	12
Форместан	18	14
5 β -Андростандион	13	11

2.14 Вычисление собственных критериев определения «стероидного профиля»

В техническом документе ВАДА приведены предельные концентрации и отношения некоторых маркеров «стероидного профиля» при достижении которых проба считается подозрительной, значения ВАДА представлены в таблице 18 и 19. Случаи нарушения границ ВАДА представлены в таблице 20.

При детальном сравнении полученных данных по разработанному способу количественного определения «стероидного профиля» с параметрами, предлагаемыми ВАДА, оказалось, что для российской популяции спортсменов данные параметры значительно завышены. Для повышения вероятности выявления приема запрещенных препаратов были выдвинуты более жесткие критерии отбора подозрительных проб. Низкие пределы определения, а также хорошие показатели неопределенности позволили получить новые данные для женской популяции в области низких концентраций. На рисунке 34 представлена диаграмма распределения тестостерона для 4262 образцов женской популяции. В нашем исследовании только одна проба превысила порог ВАДА, при этом не являясь положительной на какие-либо известные допинговые субстанции. 95.5 % образцов находятся в пределах до 18 нг/мл и всего 1.3 % превышает порог в 24 нг/мл. За нижним пределом определения (менее 1 нг/мл) оказались 18.5 % образцов. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что в будущем, для точного определения тестостерона в женской популяции необходимо снизить предел обнаружения. Также следует подвергать более тщательному анализу пробы с концентрацией тестостерона выше 18 ± 1 нг/мл.

Похожую ситуацию наблюдали с эпитестостероном, диаграмма распределения представлена на рисунке 35. В 95% образцах концентрации эпитестостерона были ниже 22 нг/мл, лишь в 9 пробах (0.21%) наблюдали превышение рекомендованного ВАДА предела.

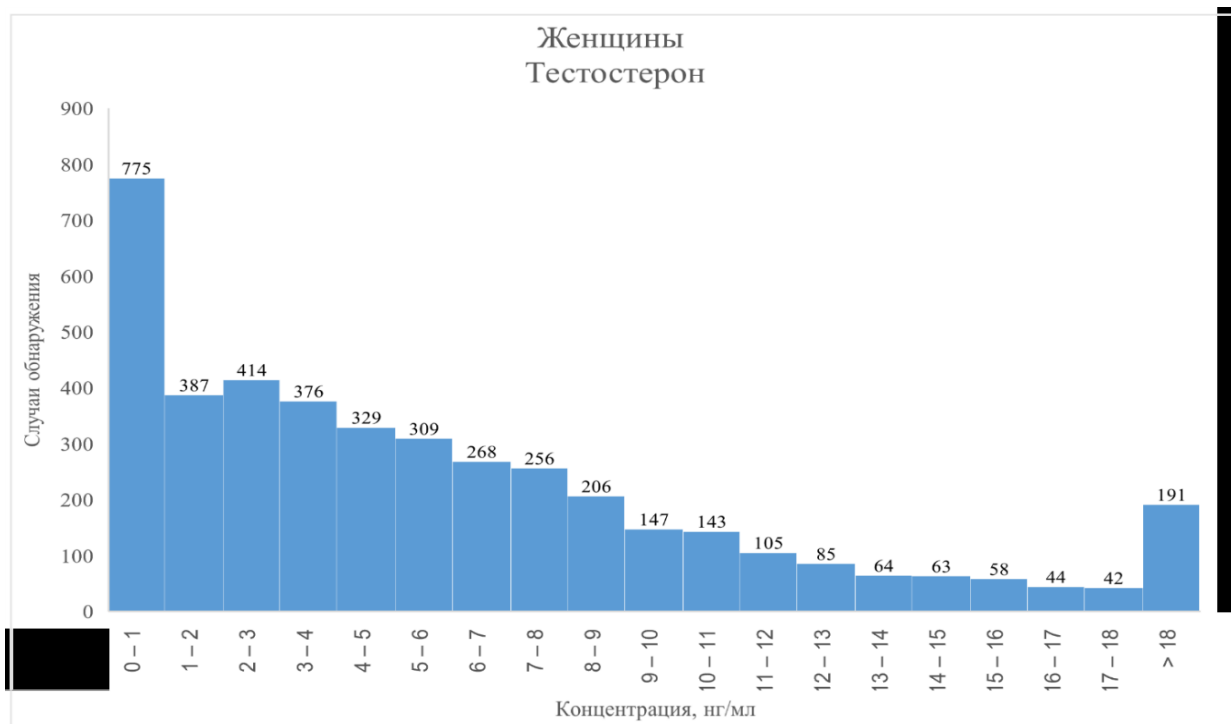


Рисунок 34 – Распределение тестостерона в женской популяции по результатам проанализированных 4262 образцов

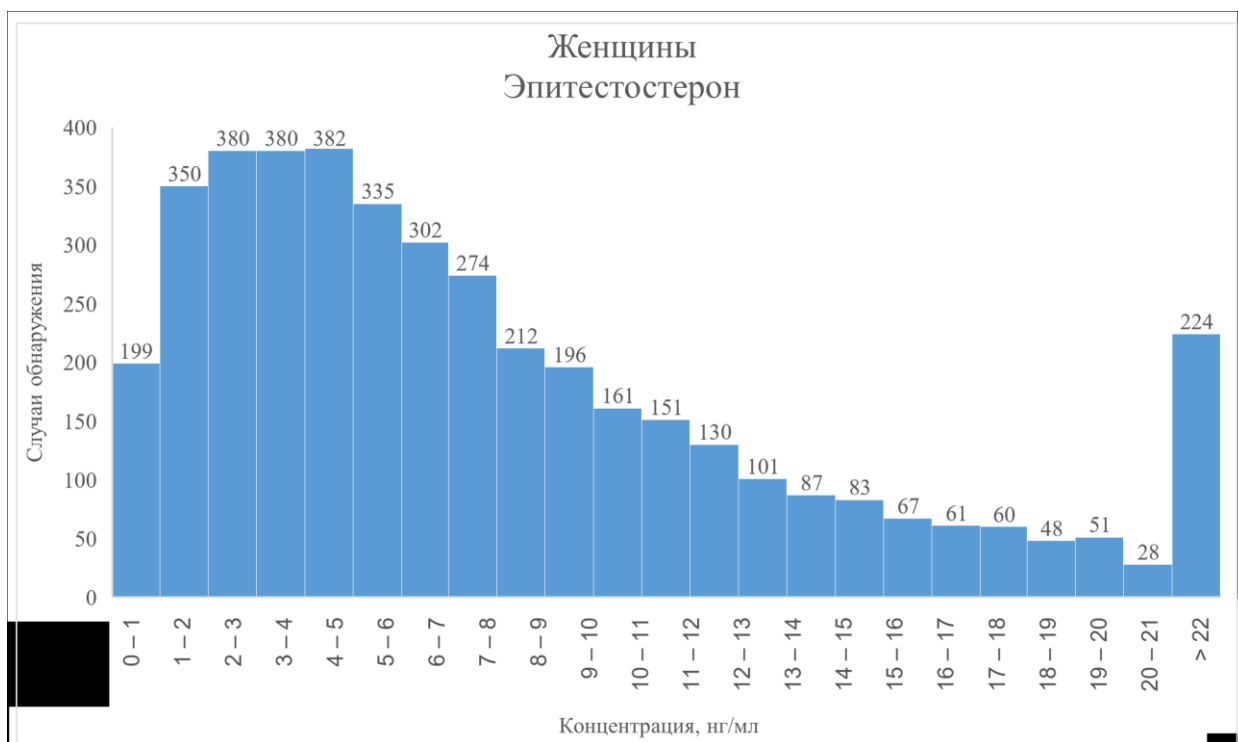


Рисунок 35 – Распределение эпитестостерона в женской популяции по результатам проанализированных 4262 образцов

В мужской популяции наблюдали те же тенденции по уменьшению пределов концентраций для маркеров «стероидного профиля». Однако, в этом случае необходимо поднять порог по отношению тестостерона к эпитестостерону, так как предложенное ВАДА ($T/E > 4$) значение, увеличивает нагрузку на лабораторию по процедуре определения природы происхождения эндогенных стероидов методом ГХ-С-ИМС, что является очень трудоемким и дорогим процессом. Наши исследования показали, что 95 % всех проанализированных отрицательных проб в мужской популяции имеет значение $T/E < 4.2$ (рисунок 36). Таким образом, можно было уменьшить число тестируемых проб на 14 % (53 пробы), что позитивно бы сказалось на работе лаборатории.

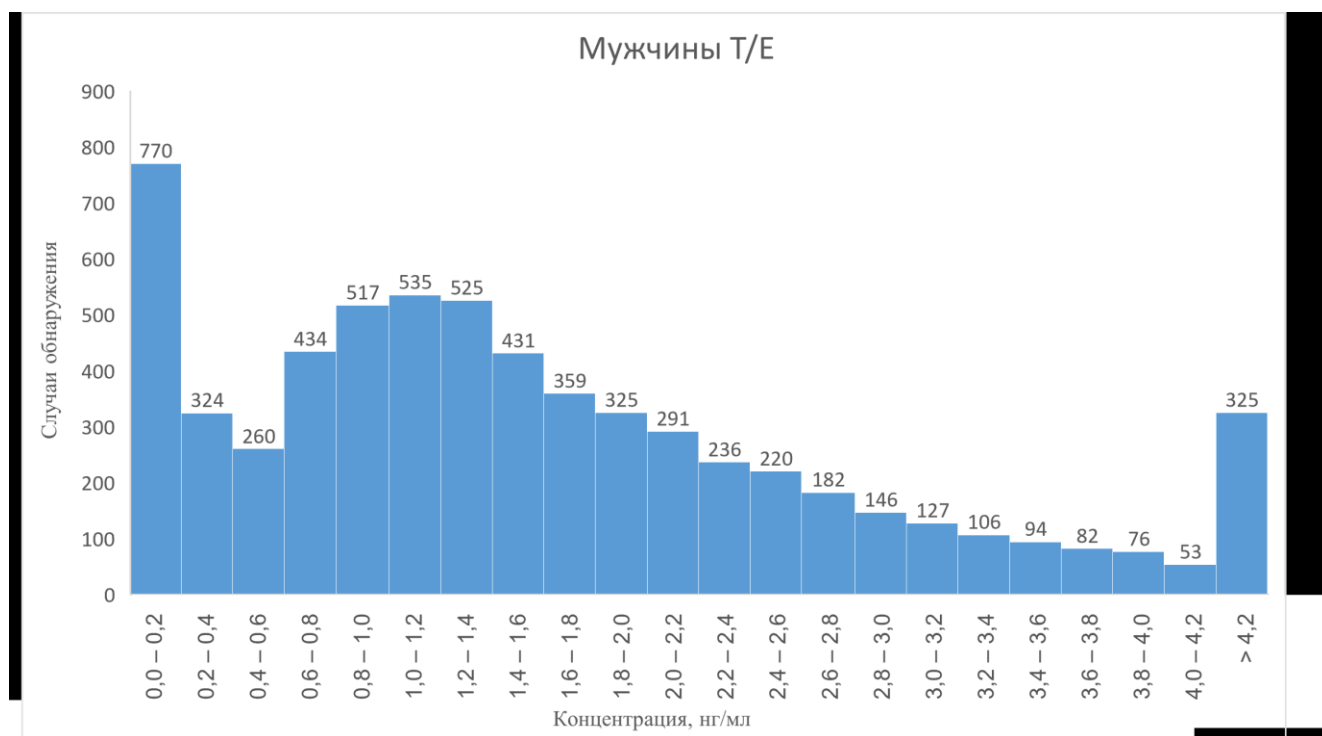


Рисунок 36 – Распределение отношения тестостерона к эпитестостерону (T/E) в мужской популяции по результатам проанализированных 6418 образцов

Аналогичные выводы были сделаны для всех других маркеров «стероидного профиля» как для женской, так и мужской популяции, результаты представлены в таблицах 18 и 19.

Таблица 18 – Критерии ВАДА и предложенные критерии для женской популяции, нг/ил

Параметр	Критерии ВАДА	Предложенные критерии в пределах 95 %
Тестостерон	> 50	> 18
Эпитестостерон	> 50	> 22
Андростерон	> 10000	> 5700
Этиохоланолон	> 10000	> 5260
5 α -диол	> 150	> 57
5 α -диол/Эпитестостерон	> 10	> 7
Тестостерон/Эпитестостерон	> 4	> 2.3
Андростерон/Тестостерон	< 20	< 143
5 α -диол/5 β -диол	> 2.4	> 1.17

Таблица 19 – Критерии ВАДА и предложенные критерии для мужской популяции, нг/мл

Параметр	Критерии ВАДА	Предложенные критерии в пределах 95 %
Тестостерон	> 200	> 90
Эпитестостерон	> 200	> 70
Андростерон	> 10000	> 7200
Этиохоланолон	> 10000	> 5250
5 α -диол	> 250	> 159
5 α -диол/Эпитестостерон	> 10	> 7.8
Тестостерон/Эпитестостерон	> 4	> 4.2
Андростерон/Тестостерон	< 20	< 37
5 α -диол/5 β -диол	> 2.4	> 1.43

Таблица 20 – Случаи нарушения популяционных границ ВАДА для 10680 проб

Параметр	Мужчины	Женщины
Тестостерон	2	1
Эпитестостерон	0	9
Андростерон	65	6
Этиохоланолон	16	2
5 α -диол	77	4
5 α -диол/Эпитестостерон	120	61
Тестостерон/Эпитестостерон	378	13
Андростерон/Тестостерон	37	0
5 α -диол/5 β -диол	25	9

Из полученных данных видно, что предложенные ВАДА критерии не коррелируют с данными, полученными по российской популяции спортсменов. Для большинства параметров критерии существенно завышены, что теоретически может привести к пропуску положительной пробы. На основе полученных данных по популяции, используя диаграммы распределения, нами рассчитаны предложенные критерии оценки отбора проб для дополнительного анализа. Пределом решения являлось пограничное значение параметра, находящееся в рамках 95 % исследованных образцов в популяции, соответственно оставшиеся 5% образцов, превышающие «предел решения», считались подозрительными.

2.15 Применение собственных критериев оценки «стероидного профиля» для реальных образцов

Измененный «стероидный профиль» испытуемых проб является прямым следствием приема эндогенных анаболических стероидов, но изменения могут также происходить и при приеме экзогенных стероидов, препаратов класса селективных модуляторов андрогенных рецепторов, диуретиков, алкоголя, пептидных гормонов, а также препаратов, которые на данный момент могут быть неизвестны антидопинговым лабораториям.

Метод изотопной масс-спектрометрии позволит выявить только природу происхождения стероидов, а в остальных случаях он не даст результата. Концентрирование образца является самым простым и экспрессным решением, но также имеет существенный недостаток. Ввод более концентрированных растворов образцов в ГХ-МС/МС приведет к контаминации узла ввода хроматографа, а также к загрязнению ионной оптики масс-спектрометра. Но, если концентрирование проводить только для образцов, чей «стероидный профиль» выходит за заданные границы, то загрязнение масс-спектрометра будет несущественным.

Используя, разработанный ранее метод отбора, был проведен анализ 56 подозрительных образцов, которые при первичном скрининге были отрицательными. Для удобной визуализации данных были построены диаграммы рассеяния по популяции мужчин и женщин с наложенными предельными границами. Как видно из диаграммы, представленной на рисунке 37, выделенный образец выпадает из общего статистического распределения по популяции.

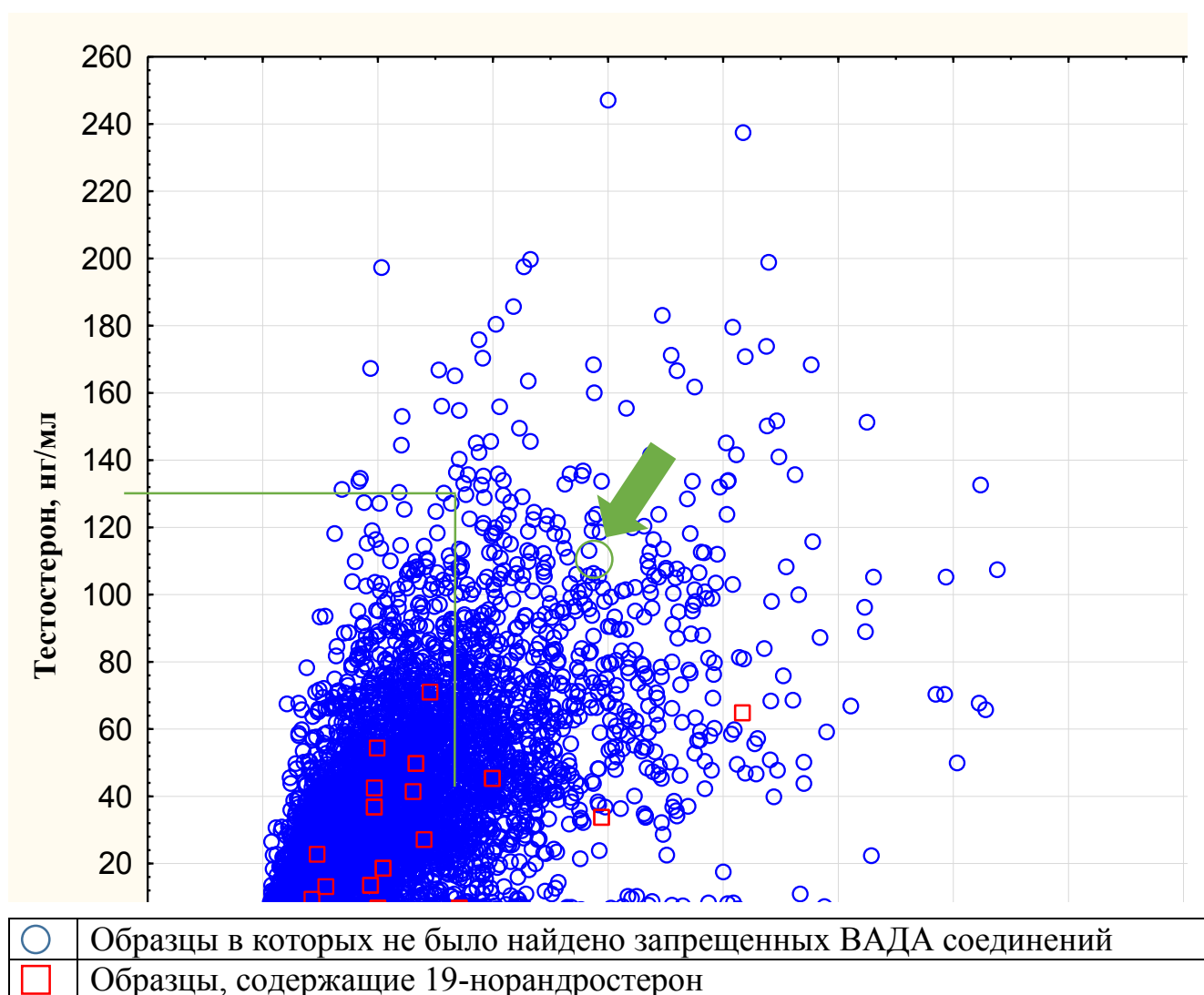


Рисунок 37 – Диаграмма рассеяния тестостерона относительно этиохоланола в мужской популяции

После концентрирования и инъекции образца при делении потока 1:5 в пробе обнаружили 19-норандростерон, но в достаточно малой концентрации - 2 нг/мл. Такое низкое содержание 19-норандростерона в моче может иметь эндогенную природу и согласно документам ВАДА, данное обнаружение можно считать отрицательным. С другой стороны, если лаборатория располагает аналитическими возможностями по осуществлению изотопного подтверждения природы происхождения 19-норандростерона, то она имеет право провести данный анализ. Анализ образца был проведен по ранее разработанной и опубликованной методике [177].

2.15.1 Пробоподготовка для ГХ-С-ИМС анализа

Для установления необходимого объема образца перед проведением анализа определяли концентрации целевых стероидов в моче методом ГХ-МС/МС. Объем мочи необходимый для проведения анализа, рассчитывали с использованием формулы

$$V_{urine} = \frac{V_{FR} \times m}{C_{urine} \times V_{injection} \times k}, \quad (2)$$

где V_{urine} – объем мочи, требуемый для анализа, мл;

V_{FR} – конечный объем фракции для анализа, мкл (≥ 5 мкл, в зависимости от объема образца);

C_{urine} – концентрация определяемого соединения в моче, нг/мл;

$V_{injection}$ – объем пробы, вводимый в систему ГХ-С-ИМС (1 мкл);

m – оптимальное количество определяемого соединения для ввода в систему ГХ-С-ИМС (50 нг, установлено экспериментально по соотношению сигнал:шум $> 6000:1$);

k – степень извлечения определяемого соединения (0.8 для всех определяемых соединений, как установлено при валидации метода).

Рассчитанный объем составил 100 мл мочи.

2.15.2 Твердофазная экстракция

После установления необходимого объема образца, аликвоту мочи центрифугировали при 4000 об./мин в течение 4 мин, после чего наносили на картридж для ТФЭ С18, предварительно кондиционированный 5 мл метанола и 5 мл воды. Нанесение пробы проводили, не допуская высыхания сорбента, со скоростью 1 капля в 3–5 сек. После нанесения пробы картридж промывали 5 мл

воды, элюировали метанолом объемом 4 раза по 1 мл со скоростью 1 капля в 3-5 сек.

Полученный элюат упаривали досуха в вакуумном испарителе RapidVar при 45°C и давлении 150–160 мбар в течение 50–55 мин. В отличие от классических ротационных испарителей, применение систем, подобных RapidVar позволяет избежать распределения аналитов по большой площади стенок пробирок ввиду реализации упаривания в твердотельном вакуумируемом нагревателе без постоянного перемешивания.

К полученному сухому остатку добавляли 1 мл фосфатного буферного раствора (рН 6.4) и помещали пробирку в ультразвуковую ванну на 5 мин, после чего перемешивали на встряхивателе до полного растворения сухого остатка.

2.15.3 Гидролиз и ЖЖЭ

К полученному раствору добавляли 5 мл диэтилового эфира, пробирку герметично закрывали, после чего перемешивали в течение 10 мин, затем центрифугировали 4 мин при 3000 об./мин. Для удаления органического слоя пробирку помещали в криостат (–30°C) до полной заморозки водного слоя, после чего декантировали эфирный слой. Остатки эфира удаляли нагреванием водного слоя в твердотельном нагревателе до 70°C. К полученному раствору, охлажденному до комнатной температуры, добавляли 100 мкл β-глюкуронидазы E. Coli и помещали в термостат на 60 мин при 57°C для проведения ферментативного гидролиза. После его окончания добавляли 1 мл карбонатного буферного раствора (рН 9.6) и 5 мл диэтилового эфира, герметично закрывали и перемешивали 20 мин, после чего центрифугировали 4 мин при 3000 об./мин. Водный слой повторно замораживали, переносили органический слой в новую пробирку и упаривали досуха в твердотельном нагревателе при 70°C. К сухому остатку добавляли 100 мкл метанола, тщательно омывали стенки пробирки, центрифугировали 4 мин при 3000 об./мин и переносили содержимое в виалу с полипропиленовой вставкой уменьшенного объема. Содержимое виалы упаривали досуха в токе азота, в

пробирку повторно добавляли 100 мкл метанола, тщательно омывали стенки, центрифугировали 4 мин при 3000 об./мин, и переносили содержимое в ту же полипропиленовую вials. После упаривания содержимого в токе азота, к сухому остатку добавляли 60 мкл раствора дегидропрегненолона ацетата в метаноле (0.05 мг/мл), добавляли 40 мкл воды и перемешали раствор.

2.15.4 Первичное ВЭЖХ фракционирование

Традиционно для разделения стероидных гормонов используются обращено-фазовые сорбенты, такие как C18 и даже C30. Однако увеличение длины алифатического радикала приводит к увеличению параметров удерживания. Это может быть оправдано при исследовании фармацевтических субстанций или биологических жидкостей с целью проведения количественного химического анализа, так как они позволяют добиться высоких значений числа теоретических тарелок и, благодаря эффективности, частично разрешить матричные эффекты и добиться высокого разрешения хроматографической системы согласно формуле

$$R_s = \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{\sqrt{N}}{4}, \quad (3)$$

где 1, 2 и 3 множитель – это фактор удерживания, селективность и эффективность хроматографической системы соответственно.

Поскольку данные параметры не являются постоянными и зависят от условий разделения (градиент, скорость подачи подвижной фазы, температура термостата колонок, конкурентные процессы сорбции/десорбции, особенности получения сорбентов), их моделирование с использованием различных программных пакетов может носить исключительно предварительный характер и, как правило, гораздо быстрее осуществляется эмпирически.

Поскольку целью фракционирования является не выделение индивидуального соединения, а лишь фракций, содержащей аналиты, значимость

фактора удерживания становятся второстепенным, а наибольший вклад вносят селективность и эффективность хроматографической системы.

Для оптимизации времени анализа и увеличения срока эксплуатации колонки за счет уменьшения количества необратимо сорбирующихся компонентов, оптимальным представляется применение эндкепированного пористого сорбента C8, обладающего устойчивостью в более широком диапазоне pH по сравнению с поверхностно-пористыми сорбентами и имеющего большую эффективность по сравнению с монолитными колонками, эффективная работа которых требует высоких скоростей потока подвижной фазы.

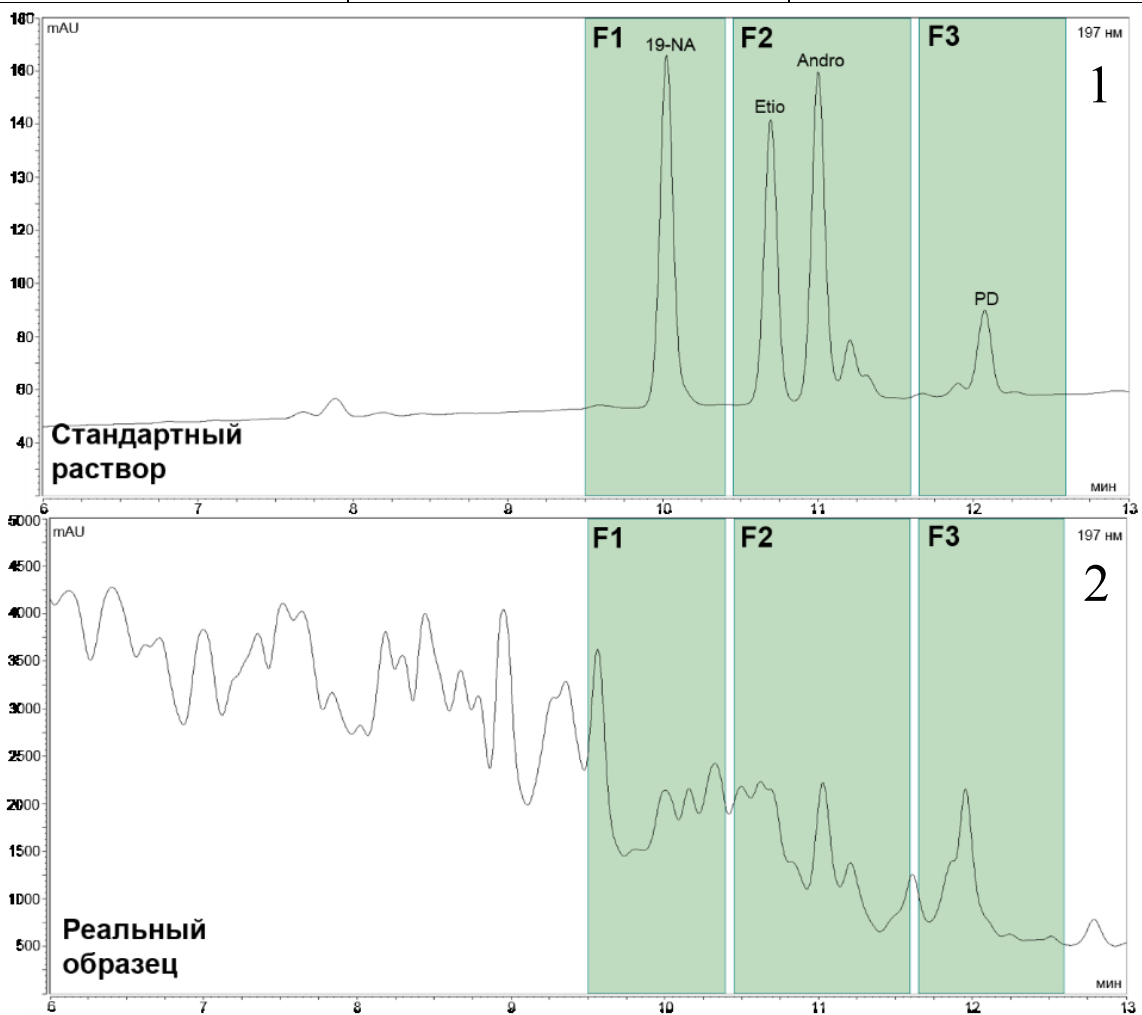
Учитывая необходимость ввода больших объемов проб для фракционирования, минимально подходящим диаметром хроматографической колонки является 4.6 мм, который также совместим с классическими аналитическими хроматографическими системами и не требует перехода на полупрепаративные системы, что позволяет реализовывать быстрые градиентные разделения. Применение колонок с меньшим внутренним диаметром может приводить к перегрузке сорбента и даже возникновению эффекта памяти, что негативно будет сказываться на надежности получаемых результатов. В целях повышения эффективности хроматографической системы целесообразно использование колонки длиной 250 мм, позволяющей обеспечить достаточную эффективность разделения.

Таким образом, для повышения производительности пробоподготовки без значительных потерь эффективности и селективности хроматографической системы наиболее обоснован выбор сорбент C8 в следующих условиях: осуществление хроматографического разделения веществ на аналитической колонке Phenomenex Luna C8 (250×4.6 мм, 5 мкм, США) с предколонкой Phenomenex Luna C8 (20×4.6 мм, 5 мкм, США) с использованием диодно-матричного детектора при длинах волн 190, 200 и 293 нм. В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (В), колонку термостатировали при 40°C, постоянная скорость потока составляла 1 мл/мин. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 21. Хроматограммы с результатом

фракционирования стандартного образца стероидов, содержащего все определяемые соединения и реального образца мочи, приведены на рисунке 38.

Таблица 21 – Условия градиентного элюирования для первичного ВЭЖХ фракционирования образцов

Время, мин	А, %	В, %
0	70	30
11.5	40	60
14.5	0	100
19.5	0	100
22.5	70	30
26.0	70	30



1 – стандартный раствор стероидов; 2 – реальный образец мочи

Рисунок 38 – Хроматограммы первичного ВЭЖХ-фракционирования образцов

Для определения 19-норандростерона собирали фракцию 9.5–10.4 мин, а также фракции, содержащие андростерон и этиохоланолон (10.5–11.5 мин) и прегнандиол (12.4–13.4 мин).

2.15.5 Дериватизация

Для модификации хроматографического поведения 19-норандростерона в условиях ВЭЖХ и улучшения хроматографических характеристик стероидов с последующим ГХ-МС / ГХ-С-ИМС анализом, проводили их ацетилирование. В собранные фракции добавляли маркер полноты дериватизации – раствор андростанола (0.2 мг/мл), который упаривали досуха в вакуумном испарителе при 50°C и давлении 50-55 мбар в течение 30-35 мин. После охлаждения к сухому остатку добавляли 50 мкл пиридина и 50 мкл уксусного ангидрида, пробирки плотно закрывали крышками и выдерживали при 80°C 120–140 мин в твердотельном нагревателе, затем смесь охлаждали до комнатной температуры. Содержимое пробирок упаривали досуха в вакуумном испарителе при 50°C и давлении 50–55 мбар в течение 40-45 мин, после чего в пробирку с ацетатом 19-норандростерона добавляли 100 мкл метанола, тщательно омывали стенки, содержимое пробирки переносили в виалу с полипропиленовой вставкой, и упаривали досуха в токе азота. К сухому остатку добавляли 60 мкл раствора дегидропрегненолона ацетата в метаноле (0.05 мг/мл), добавляли 40 мкл воды и помещали в автоматический встряхиватель на 30-60 сек.

2.15.6 Вторичное ВЭЖХ фракционирование

Дополнительная очистка содержащей 19-норандростерон фракции необходима для удаления соединений, которые могут интерферировать с 19-норандростероном при ГХ-С-ИМС анализе и, как следствие, исказить его изотопный состав.

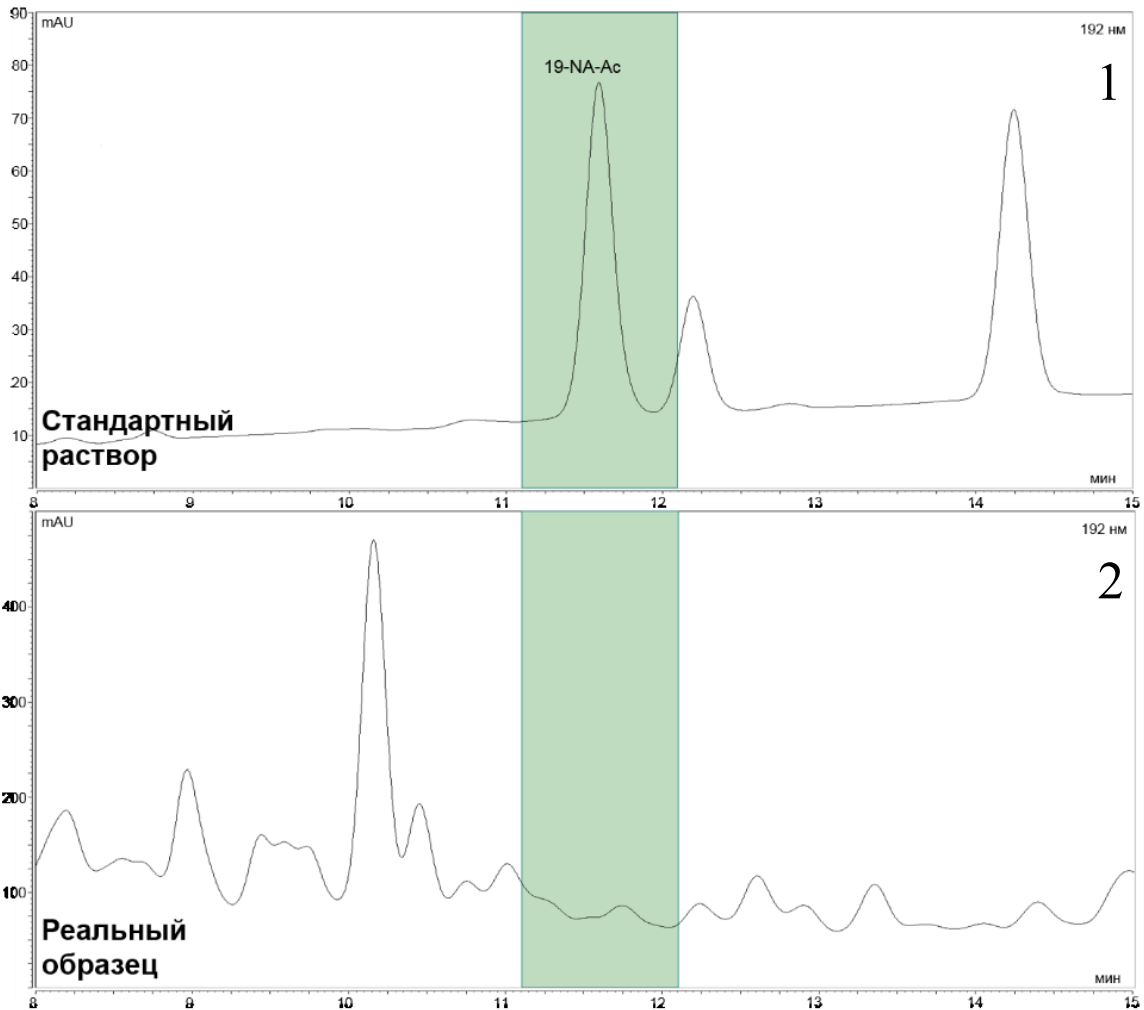
Для вторичного фракционирования использовали аналитическую колонку Waters SunFire C18 (250×4.6 мм, 5 мкм, Ирландия), снабженную предколонкой Waters SunFire C18 (20×4.6 мм, 5 мкм, Ирландия), с использованием диодно-матричного детектора при длинах волн 190 и 200 нм.

Поскольку в данном случае основной целью является выделение индивидуального соединения, необходимо стремиться к максимальным значениям всех множителей, входящих в уравнение расчета разрешения хроматографической системы. В то же время, при проведении вторичного фракционирования, матрица образца значительно легче и, в большей степени, требует большего числа теоретических тарелок и селективности хроматографического разделения. Необратимо сорбирующихся компонентов в данных фракциях уже не будет, что облегчит регенерацию колонки и делает целесообразным и достаточным выбор сорбент C18.

В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (В), колонку термостатировали при 40°C. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 22. Хроматограмма фракционирования стандартного образца ацетата 19-норандростерона и реального образца мочи приведена на рисунке 39. Ацетат 19-норандростерона получали ацетилированием 19-норандростерона по схеме, описанной выше.

Таблица 22 – Условия градиентного элюирования для вторичного ВЭЖХ фракционирования

Время, мин	А, %	В, %
0	30	70
15	17	83
18	0	100
24	0	100
28	30	70
35	30	70



1 – стандартный раствор 19-норандростерон ацетата; 2 – реальный образец мочи

Рисунок 39 – Хроматограмма вторичного ВЭЖХ-фракционирования образцов

В данных условиях 19-норандростерона ацетат элюируется во фракции 11.1–12.1 мин. Собранную фракцию снова упаривали досуха, перерастворяли в 100 мкл ацетона, переносили в виалу с силанизированной вставкой и упаривали досуха в токе азота. Ко всем фракциям, выделенным в результате пробоподготовки, добавляли гептан в количестве 9/10 объема фракции и внутренний стандарт – раствор пентакозана в гептане (0.1 мг/мл) в количестве 1/10 объема фракции.

2.15.7 Параметры системы ГХ-С-ИМС

Параметры условий разделения и настройки интерфейса сжигания для ГХ-С-ИМС представлены в таблице 23. Перед началом анализа регенерировали окислительный реактор, для чего в течение 30 мин через него пропускали кислород, при этом система находилась в режиме обратной продувки. После окисления реактора проводили тест, нацеленный на установление стандартного отклонения между 10 пульсами референсного газа (CO_2). Значение стандартного отклонения для измерений не превышало 0.06‰. Для того чтобы удостовериться, что хроматограмма не имеет посторонних пиков, в систему ГХ-С-ИМС вводили 1 мкл ацетона. Далее, в целях проверки правильности измерения изотопного состава $\delta^{13}\text{C}$, в систему вводили сертифицированную смесь стероидов CU/USADA с известными значениями $\delta^{13}\text{C}$ (таблица 24). Измеренные значения $\delta^{13}\text{C}$ для всех соединений находились в пределах $\pm 0.5\%$ относительно аттестованных значений, что соответствует рекомендациям ВАДА.

Таблица 23 – Условия разделения для ГХ и настройки интерфейса сжигания

Настройки газового хроматографа	
Хроматографическая колонка	Restek RTX-35MS, 30 м×0.25 мм×0.25 мкм с интегрированной предколонкой
Объем вводимой пробы	1 мкл
Температура инжектора	300°C
Режим ввода пробы	Без деления потока
Скорость потока газа-носителя	1 мл/мин
Температурная программа термостата	120°C, 1.1 мин → 260°C (30°C/мин) → 280°C (1°C/мин), 2.5 мин

Продолжение таблицы 23

Настройки интерфейса сжигания	
Температура окислительного реактора	940°C
Давление гелия	1.3 бар
Давление кислорода	0.5 бар
Давление референсного газа (CO ₂)	0.6 – 0.7 бар

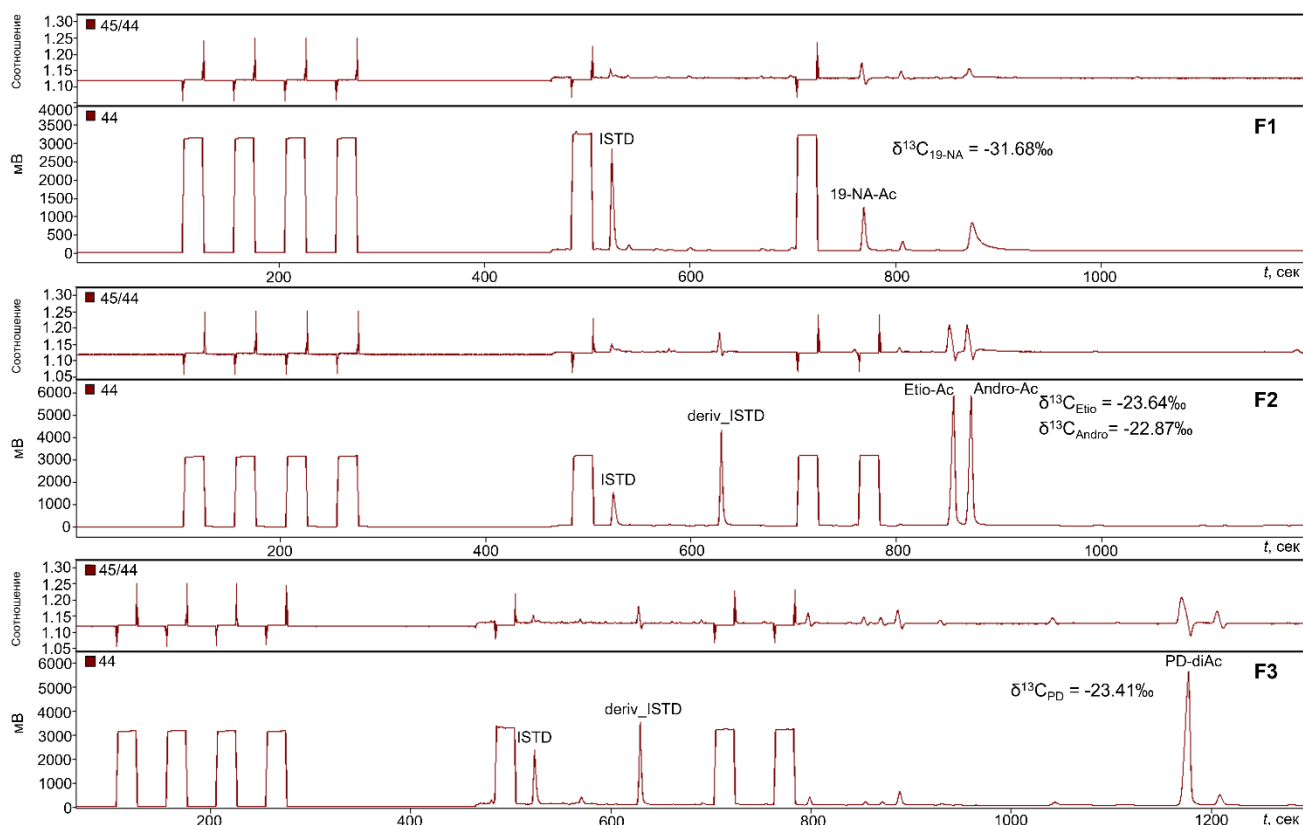
Таблица 24 – Смесь стероидов CU/USADA с аттестованными значениями $\delta^{13}\text{C}$.

CU/USADA-34-2	
Соединение	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
Этиохоланолон	– 28.91
Андростерон	– 27.02
Прегнандиол	– 31.51

2.15.8 Результаты анализа

Полученные хроматограммы представлены на рисунке 40. Оценку происхождения стероида производят по разнице значений $\delta^{13}\text{C}$ между целевым соединением и эндогенным маркером (прегнандиолом). В нашем случае разница превысила 4‰, что, в соответствии с документами ВАДА, является следствием экзогенного происхождения 19-норандростерона. Результат проведенного исследования позволяет с большой вероятностью утверждать, что спортсмен употреблял запрещенный препарат, в состав которого входил 19-нортестостерон, либо его прогормон.

Данный случай демонстрирует возможности разработанной методики выявления вероятно положительных образцов. Внедрение данной методики в рутинную практику допинг контроля может повысить процент обнаружения образцов, содержащих запрещенные соединения.



F1 – хроматограмма фракции, содержащей 19-норандростерон ацетат (19-NA-Ac);
 F2 – хроматограмма фракции, содержащей ацетаты этиохоланолона и андростерона (Etio-Ac и Andro-Ac); F3 – хроматограмма фракции, содержащей диацетат прегнандиола (PD-diAc)

Рисунок 40 – ГХ-С-ИМС хроматограммы фракций (F1, F2, F3), полученных из реального образца мочи объемом 100 мл (ISTD – пентакозан, deriv_ISTD – андростанол)

2.16 Поиск новых критериев оценки деградации мочи

Для поиска новых критериев деградации проб мочи исследование проводили с использованием 10680 образцов мочи (4262 женских и 6418 мужских). Несмотря на то, что в рассматриваемой выборке доля образцов, подвергшихся деградации, невысока, общее количество проб велико и выборка является репрезентативной.

Очевидно, что объективная оценка процесса деградации образцов в отсутствие возможности введения ингибиторов деятельности микроорганизмов

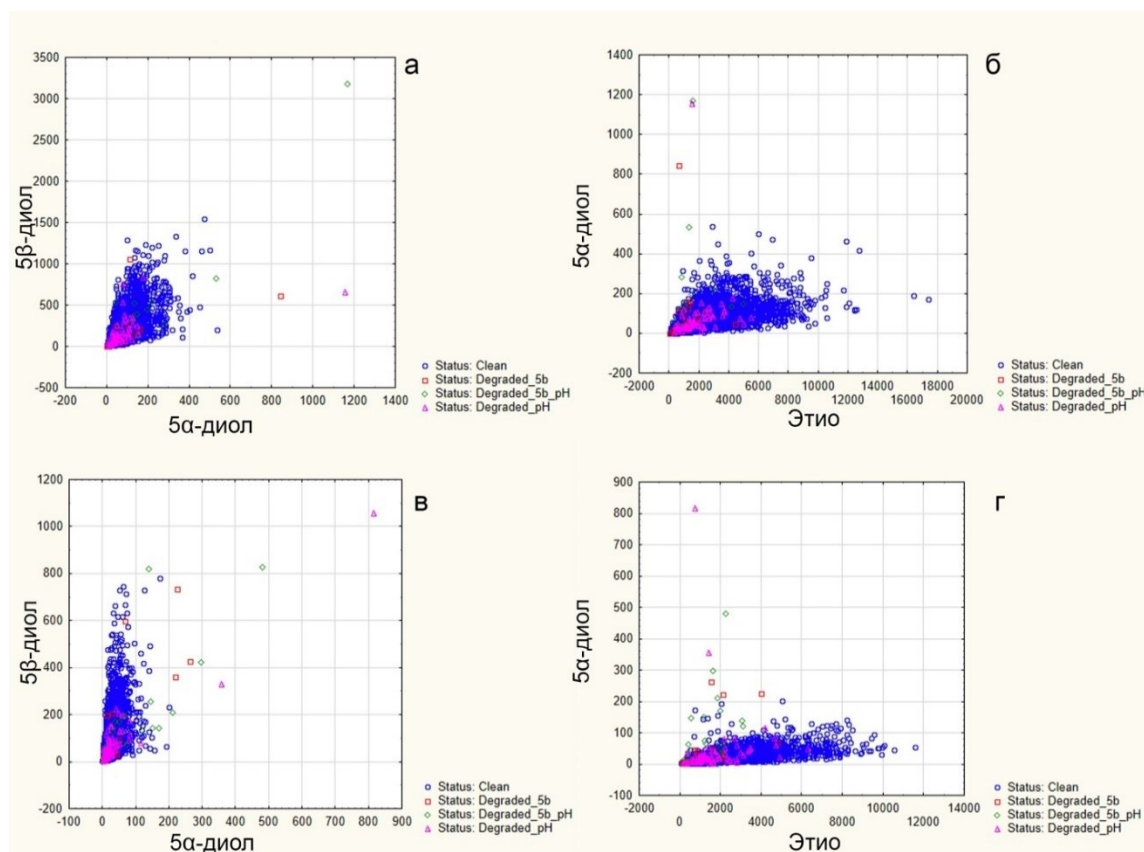
или иных компонентов, повышающих стабильность образцов, возможна исключительно с использованием эндогенных соединений, в частности, других андрогенных стероидов и их соотношений, присутствующих в образцах.

Таковыми соединениями являются 5β -андростандион, тестостерон, андростерон и эпитестостерон, определение которых обязательно для описания «стероидного профиля» человека, а также форместан.

Для выявления отличий между образцами, подвергшимися деградации и недеградированными пробами, были построены диаграммы рассеяния, представленные на рисунке 41. Исходя из данных рисунка 41, сделать однозначный вывод о наличии корреляции между использованными показателями (вышеперечисленными соединениями) сложно, однако может сложиться ощущение, что существует тренд, свидетельствующий об уменьшении концентраций 5α -диол и этиохоланола в ходе деградации. При детальном рассмотрении поддиапазона, соответствующего области, в которой лежит большая часть результатов анализа продеградировавших проб, не удалось выявить явные визуальные взаимосвязи, поэтому было принято решение использовать статистические методы анализа.

Статистический анализ данных применили для оценки влияния деградации на профиль основных контролируемых ВАДА параметров и выявления дополнительных признаков, помимо уже установленных, которые позволят судить о деградации проб, и для изучения эффективности процедуры установления деградации образцов мочи сочетанием различных статистических параметров. Для выявления показателей, наиболее подверженных изменениям в процессе деградации, целесообразным представлялось применение метода главных компонент (МГК). Решение задачи установления факта деградации возможно с применением различных классификационных алгоритмов. Наиболее интересным представляется дискриминантный анализ, преимуществом которого является возможность «визуализации» эффективности разделения проб на группы посредством канонического анализа, предусматривающего разделение исследуемых групп в двумерном пространстве функций (канонических корней).

Одним из условий применения предлагаемых методов статистической обработки данных является нормальность распределения параметров исследуемой выборки с допустимыми умеренными отклонениями.



○	Образцы в которых не было найдено запрещенных ВАДА соединений
□	Признаки деградации по отношению 5β-дион/этиохоланолон
△	Признаки деградации по рН
◇	Признаки деградации по рН и отношению 5β-дион/этиохоланолон

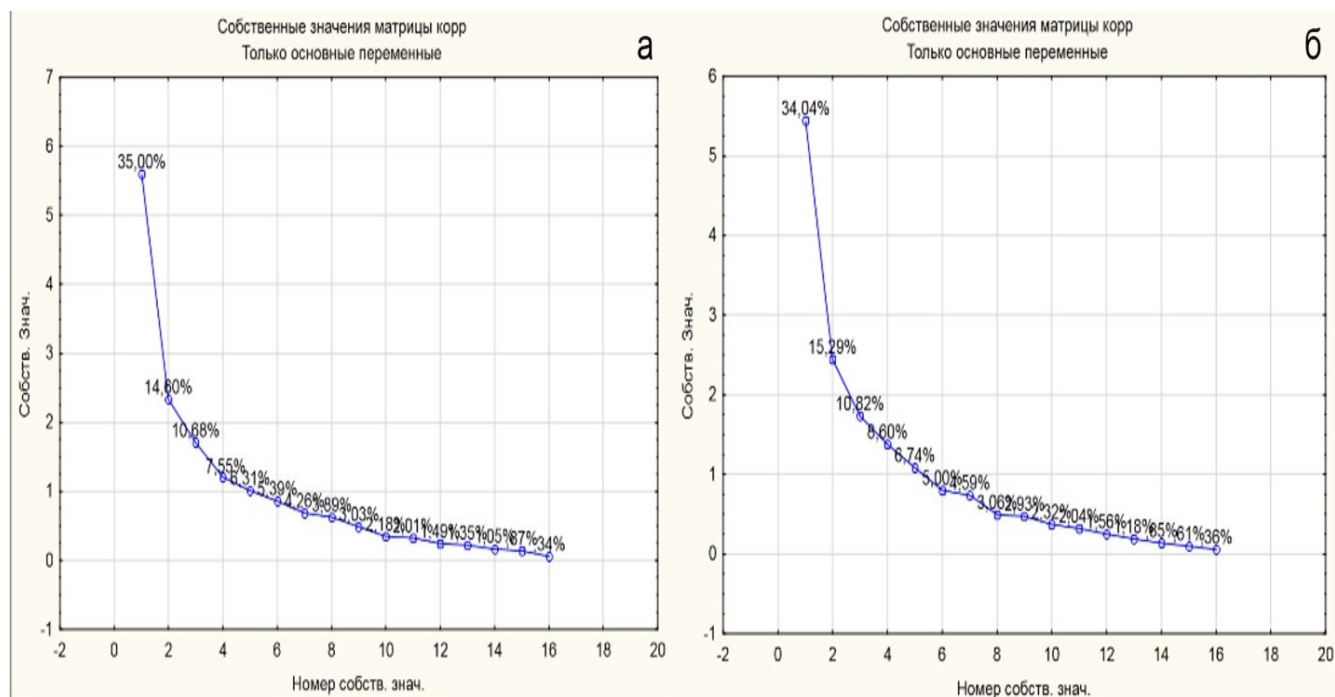
а, б – мужские пробы; в, г – женские пробы

Рисунок 41 – Диаграммы рассеяния для наиболее подверженных деградации компонентов «стероидного профиля»

На первоначальном этапе оценили нормальность распределения исследуемых показателей, для чего использовали гистограммы и тест Колмогорова – Смирнова. Распределение основного массива показателей оказалось близко к нормальному, но имело положительную асимметрию. В случае показателей Т,

отношений Т/Е и Андро/Т наблюдали бинормальное распределение. Для нормализации данных была предпринята попытка применить степенное преобразование Бокса-Кокса. Большинство переменных удалось привести к нормальному распределению, но применение данной техники привело к искажению данных, существенному изменению корреляционных связей между показателями и значительному ухудшению производительности построенных моделей, вследствие чего массив данных подвергся статистической обработке без предварительной нормализации. Учитывая возможные ограничения, связанные с использованием вышеописанных статических методов, для анализа исследуемого массива данных целесообразным представлялось применение более сложных методов, использование которых не предусматривает требований к распределению данных и ориентированных на обработку больших массивов данных, в частности, нейронных сетей.

МГК предусматривает факторный анализ, позволяющий оценить значимость факторов и их вклад посредством графиков «каменистой осыпи» (рисунок 42). Из полученных данных видно, что основной вклад в объяснение общей вариации вносят первые 4 фактора, на долю которых приходится 68–69% общей вариации.



а – мужчины; б – женщины

Рисунок 42 – Графики «каменистой осыпи»

Наибольшие корреляции показателей с факторами наблюдали в случае анализа следующих групп показателей: 1 группа - ряд стероидов, обычно не используемых для выявления деградации; 2 группа – соотношения этих показателей; 4 группа - основные показатели, по которым на сегодняшний день оценивают деградацию пробы: рН и 5β -андростан-3,17-дион; в 3 группу в мужской популяции вошло 1 соотношение 5α -диол/Е, в женской - 5α -диол/Е и Т/Е (таблица 25 и 26).

Таблица 25 – Корреляции исследуемых параметров с факторами для мужчин

Маркер	Мужчины			
	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Андро	-0,87408	0,277442	0,001408	0,075332

Продолжение таблицы 25

Маркер	Мужчины			
	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Этио	-0,84972	-0,11644	-0,22274	-0,18462
T	-0,73621	-0,26605	-0,02506	0,339401
E	-0,7076	0,246876	-0,23614	-0,18688
5 α -диол	-0,71946	-0,00025	0,571458	-0,11621
5 β -диол	-0,66368	-0,44042	0,103634	-0,26059
Форместан	-0,76198	0,099992	-0,20099	-0,03122
ДГЭА	-0,89711	0,124312	-0,04574	0,127471
Андро/T	0,07484	0,621756	-0,02962	-0,35293
Андро/Этио	0,00116	0,662727	0,370324	0,417243
5 α -диол/5 β -диол	0,065076	0,825474	0,340687	0,174148
5 α -диол /E	-0,16325	-0,22411	0,827473	-0,01981
pH	0,136145	-0,1268	0,348335	-0,44798
5 β -дион	-0,10406	-0,07351	0,356089	-0,46644
T/E	-0,0558	-0,62023	0,237106	0,570536

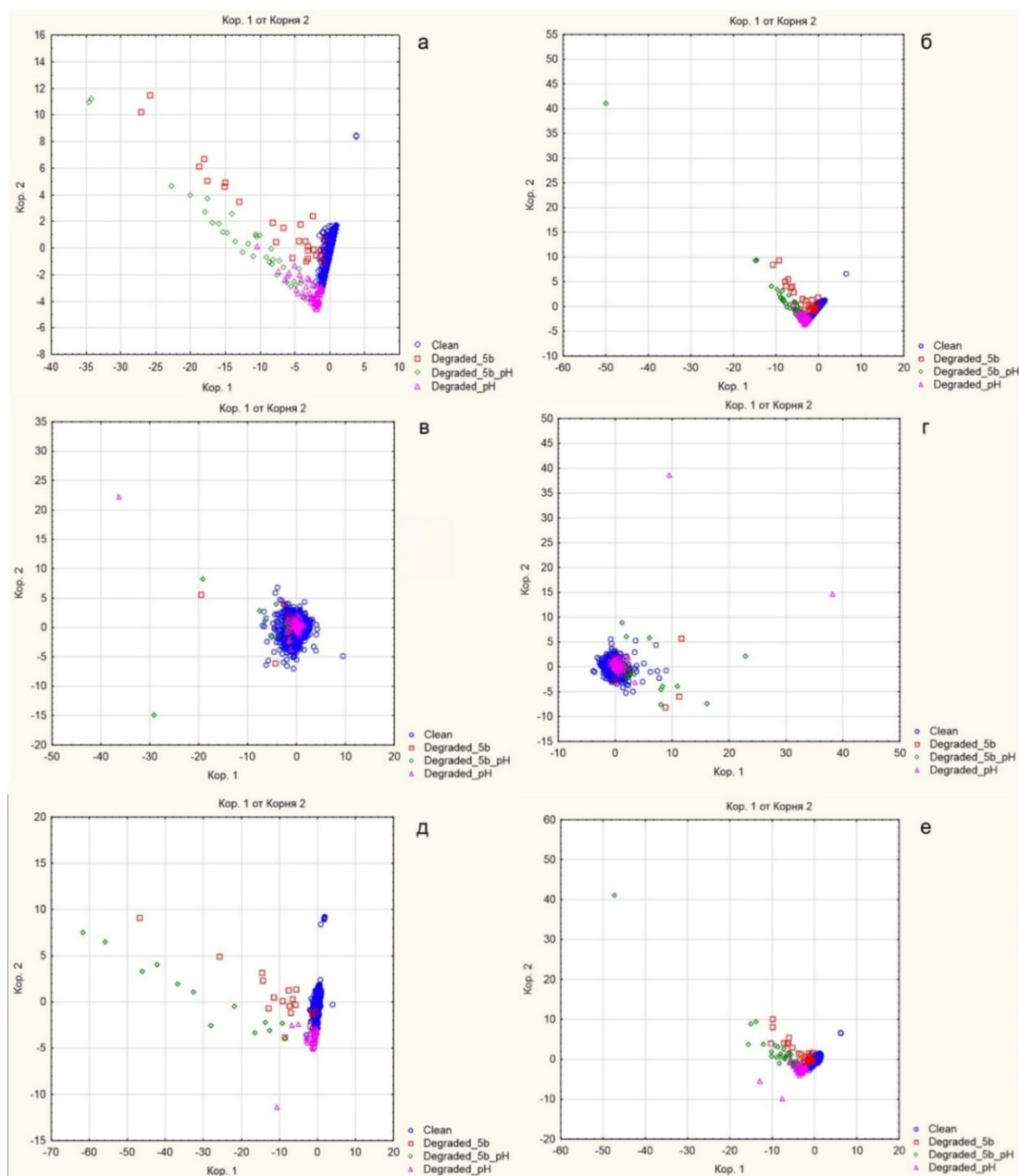
Таблица 26 – Корреляции исследуемых параметров с факторами для женщин

Маркер	Женщины			
	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Андро	0,88348	0,256011	-0,02634	-0,07825
Этио	0,84607	-0,13051	0,229919	0,034853
T	0,77255	-0,30795	-0,06552	-0,11479
E	0,66793	0,104432	0,466914	0,087107

Продолжение таблицы 26

Маркер	Женщины			
	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
5 α -диол	0,816258	0,139766	-0,30605	0,16661
5 β -диол	0,77113	-0,38784	-0,0543	0,164345
Форместан	0,742509	0,179485	0,095076	-0,02091
ДГЭА	0,848224	0,236028	-0,03951	-0,09255
Андро/Т	-0,157	0,619519	0,145629	0,226926
Андро/Этио	-0,06651	0,633306	-0,39857	-0,17782
5 α -диол/5 β -диол	-0,16597	0,882408	-0,11439	0,060737
5 α -диол /Е	0,121551	0,036511	-0,84148	0,082932
рН	-0,10271	-0,13809	-0,07637	0,611784
5 β -дион	0,10178	-0,07989	-0,2335	0,736761
Т/Е	0,080658	-0,43776	-0,60154	-0,31033

Далее для оценки эффективности выявления факта деградации строили классификационные модели с применением дискриминантного анализа. Модели строили в 3 этапа: на 1 этапе проводили оценку эффективности выявления факта деградации с применением стандартных параметров, по которым судят о деградации (рН и 5 β -дион); на втором оценивали способность совокупности остальных показателей, мониторинг которых проводится в рамках контроля «стероидного профиля», а также их соотношений для выявления продеградировавших проб; на 3 этапе строили модели, сочетающие в себе комбинацию как основных, так и остальных показателей.



○	Образцы в которых не было найдено запрещенных ВАДА соединений
□	Признаки деградации по отношению 5β-дион/этиохоланолон
△	Признаки деградации по рН
◇	Признаки деградации по рН и отношению 5β-дион/этиохоланолон

а – рН и 5β-дион у мужчин; б – рН и 5β-дион у женщин; в – все параметры, кроме рН и 5β-дион у мужчин; г – все параметры, кроме рН и 5β-дион у женщин; д – все параметры у мужчин; е – все параметры у женщин

Рисунок 43 – Диаграммы рассеяния канонических значений для образцов мочи в зависимости от наличия деградации и ее характера на основании различных параметров

На рисунке 43 (а,б) представлена визуализация распределения проб в зависимости от наличия деградации и ее характера, которая построена только на основе параметров, по которым судят о деградации (рН и 5 β -дион). Значения лямбды Уилкса, позволяющего оценить качество построенных моделей, изменяются в пределах от 0 до 1, чем ближе значения к 0, тем лучше качество модели. В случае анализа данных по мужчинам значение лямбды Уилкса составило 0,298, женщин – 0,482, что свидетельствует об удовлетворительном качестве модели. Если судить исключительно по правильности отнесения нормальных проб и деградированных вне зависимости от причин деградации, то в мужской популяции 3 пробы из 6418 нормальных были отнесены к продеградированным по рН, а 4 из 18 продеградированных по 5 β -дион проб были отнесены к нормальным; в женской популяции из 4262 нормальных проб 12 отнесли к деградированным по рН, а 14 из 32 продеградированных по 5 β -дион проб были отнесены к нормальным. Остальные ошибки классификации связаны с неправильным указанием причины деградации.

При рассмотрении всех параметров, за исключением основных (рН и 5 β -дион), значение лямбды Уилкса для мужчин составило 0,904, а для женщин - 0,883, что свидетельствует о значительном ухудшении качества модели, в следствие чего можно сделать вывод, что выявление деградации на основании показателей «стероидного профиля», контролируемых ВАДА без основных показателей (рН и 5 β -дион), не представляется возможным и деградация незначительно отражается на основных показателях (рисунок 43 в,г). Проанализировав значения параметров р-критерия, лямбды Уилкса и частной лямбды в модели, были выявлены компоненты, вклад в классификацию которых наиболее значим (таблицы 27 и 28).

В модели, построенной по показателям рН и 5 β -дион, были добавлены значимые параметры, выявленные на предыдущем этапе для популяций мужчин и женщин. В этом случае наблюдали снижение значения параметра лямбды Уилкса по сравнению с моделью, построенной исключительно по показателям рН и 5 β -дион, что составило 0,284 для мужчин и 0,467 – для женщин. Как видно, улучшения оказались незначительными (рисунок 43 (д,е)). Для оценки значимости факторов

из исходной модели исключили заведомо весомые параметры, и это позволило выявить наиболее чувствительные к процессу деградации показатели. Затем для получения комплексной оценки, к выявленным новым критериям добавили уже известные весомые параметры - рН и 5 β -дион, и строили итоговые модели (таблицы 27 и 28). Интересно, что в мужской популяции параметры Андро, Т и 5 α -диол теряют свою значимость, а также значительно снижается значимость всех остальных параметров на фоне рН и 5 β -дион.

Таблица 27 – Уровни значимости переменных, входящих в классификационные модели для мужчин

Показатель	Мужчины			
	Лямбда Вилкса	Частная лямбда	F-remove	р-критерий
Андро	0.284	0.999	1.7	0.162
Т	0.284	0.999	1.3	0.273
Е	0.285	0.997	7.4	0.000
5 α -диол	0.284	0.999	1.5	0.221
5β-диол	0.286	0.993	14	0.000
Т/Е	0.285	0.997	6.2	0.000
5α-диол /Е	0.292	0.973	59	0.000
рН	0.329	0.864	341	0.000
5β-дион	0.773	0.368	3728	0.000

Таблица 28 – Уровни значимости переменных, входящих в классификационные модели для женщин

Показатель	Женщины			
	Лямбда Вилкса	Частная лямбда	F-remove	р-критерий
Андро	0.462	0.991	13	0.000
Т	0.460	0.996	6.5	0.000

Продолжение таблицы 28

Показатель	Женщины			
	Лямбда Вилкса	Частная лямбда	F-remove	p-критерий
5α-диол	0.462	0.990	15	0.000
5β-диол	0.461	0.993	9.8	0.000
T/E	0.458	0.998	2.9	0.032
Андро/Этио	0.460	0.995	6.7	0.000
5α-диол/E	0.459	0.996	5.8	0.001
pH	0.629	0.727	547	0.000
5β-дион	0.623	0.735	527	0.000

По результатам дискриминантного анализа данных для исследуемых мужской и женской популяций были построены по 2 нейросетевые модели типа многослойный персептрон с 1 скрытым слоем, которые включали: первая – только основные показатели (pH и 5 β -дион); вторая – основные и наиболее значимые показатели. Обучение нейронных сетей проводили с применением алгоритма Бройдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно. Выборка предварительно была разделена на 3 части: обучающую, контрольную и тестовую (60%, 10% и 30%). Оптимизация параметров модели осуществляли при обучении, где для проверки точности обучения используется контрольная выборка. После завершения процесса обучения сеть тестировали на независимом тестовом наборе данных. Исследовали различные топологии нейронных сетей и выбрали параметры моделей, обеспечивающие наилучшую производительность: для женской популяции наилучшими оказались сети с логистической функцией активации нейронов скрытого слоя и softmax (обобщение логистической функции для многомерного случая) – выходного слоя; для мужской популяции – гиперболическая функция активации нейронов скрытого слоя и softmax – выходного. На выходном слое количество нейронов соответствовало количеству исследуемых групп (4). Для каждой модели количество нейронов в скрытом слое варьировалось и составило: для основных параметров в мужской популяции – 4; женской – 3; для основных

параметров с добавлением наиболее значимых показателей в мужской популяции – 9, женской – 7.

В таблице 29 и 30 приведены матрицы классификаций моделей, построенных с применением дискриминантного анализа и нейронных сетей на всем массиве данных. По горизонтали отображено количество случаев, задействованных в построении модели, по вертикали – количество случаев, отнесенных в группу соответствующим классификационным алгоритмом.

Таблица 29 – Матрицы классификаций моделей, построенных с использованием дискриминантного анализа и нейронных сетей для мужчин

	Переменные, вошедшие в модель	Группы (подвергшиеся деградации или пригодные для анализа)	Мужчины			
			Пригодные для анализа	5 β -дион	5 β -дион + рН	рН
Дискриминантный анализ	рН+5 β -дион	Пригодные для анализа	6415	0	0	3
		5 β -дион	4	11	2	1
		5 β -дион+рН	0	5	8	0
		рН	0	1	0	63
	Все значимые переменные	Пригодные для анализа	6410	0	0	8
		5 β -дион	5	11	2	0
		5 β -дион+рН	0	5	8	0
		рН	7	1	0	56
Нейронные сети	рН+5 β -дион	Пригодные для анализа	6418	0	0	0
		5 β -дион	4	13	1	0
		5 β -дион+рН	0	0	12	1
		рН	0	1	1	62
	Все значимые переменные	Пригодные для анализа	6415	2	0	1
		5 β -дион	4	11	3	0
		5 β -дион+рН	0	0	13	0
		рН	1	0	1	62

Таблица 30 – Матрицы классификаций моделей, построенных с использованием дискриминантного анализа и нейронных сетей для женщин

	Переменные, вошедшие в модель	Группы (подвергшиеся деградации или пригодные для анализа)	Женщины			
			Пригодные для анализа	5 β -дион	5 β -дион + рН	рН
Дискриминантный анализ	рН+5 β -дион	Пригодные для анализа	4250	0	0	12
		5 β -дион	14	3	8	1
		5 β -дион + рН	0	5	16	14
		рН	0	0	1	78
	Все значимые переменные	Пригодные для анализа	4253	0	0	9
		5 β -дион	14	5	7	0
		5 β -дион+рН	0	2	18	15
		рН	5	1	1	72
Нейронные сети	рН+5 β -дион	Пригодные для анализа	4262	0	0	0
		5 β -дион	4	22	0	0
		5 β -дион+рН	0	0	33	2
		рН	1	0	10	68
	Все значимые переменные	Пригодные для анализа	4262	0	0	0
		5 β -дион	6	20	0	0
		5 β -дион + рН	0	1	34	0
		рН	2	0	0	77

Задача достоверного установления факта деградации является первоочередной, поэтому, в первую очередь, обращали внимание на ошибки, связанные с отнесением продеградированных проб к чистым и наоборот. Введение дополнительных параметров в модель приводит к увеличению такого рода ошибок при использовании любого метода классификации, что негативно отражается в решении основной задачи. Но, для женской популяции можно наблюдать улучшение качества классификации относительно причины деградации. При

анализе используемых алгоритмов классификации видно, что нейронные сети позволяют более правильно классифицировать большое число наблюдений, наблюдается большая устойчивость модели при добавлении других факторов. Например, количество неправильно классифицированных чистых и продеградированных проб в случае дискриминантного анализа увеличивается с 7 до 20, а при использовании нейронных сетей – с 4 до 8. С другой стороны, дискриминантный анализ позволяет визуализировать качество дискриминации, что удобно для представления данных. Сочетание возможностей статистических методов позволило наиболее полно проанализировать данные группировки исследуемых показателей, классификации данных на основе разных показателей и визуализации полученных результатов.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что деградация пробы сказывается не только на рН и концентрации 5β -диона, но и других представленных в таблицах 27 и 28 компонентов, однако их использование в качестве маркеров деградации пробы весьма затруднено, так как эти изменения являются недостаточно значимыми для надежного описания протекающего процесса. Стоит также отметить, что значимость соотношения Андро/Этио в представленной таблице может быть обусловлено высоким уровнем значимости в модели самого Андро [178].

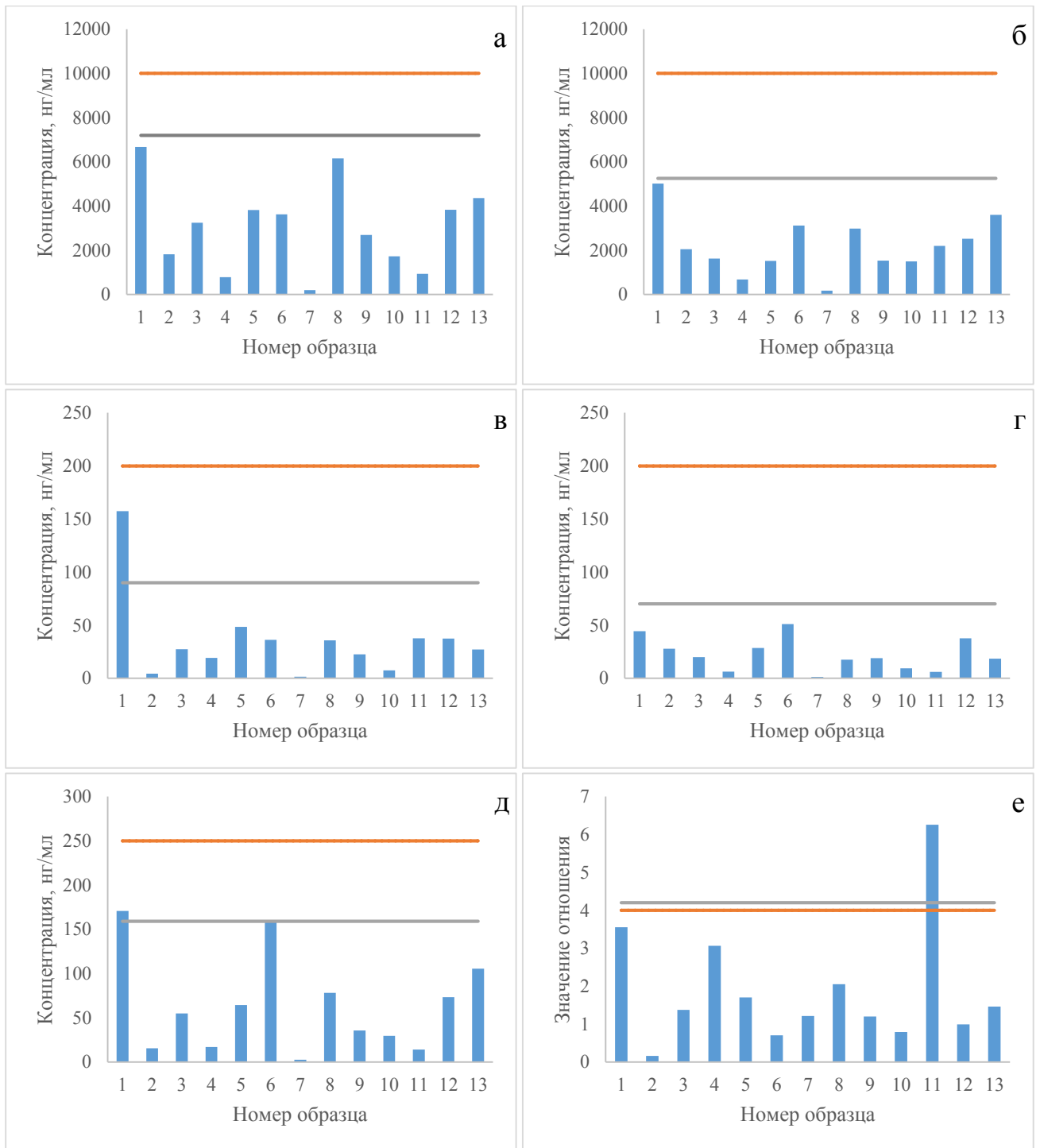
2.17 Влияние остарина на маркеры «стероидного профиля»



Влияние соединений класса SARM на «стероидный профиль» на данный момент практически не изучено, чем пользуются продавцы черного рынка фармакологии, утверждая, что SARM не вызывают изменений «стероидного профиля». Однако, проведенные исследования данных «стероидного профиля» в сочетании с данными скрининга остарина показали иные результаты. Остарин был выбран как наиболее популярный SARM, встречающийся в антидопинговой практике. Всего проанализировали 30 образцов (13 мужских и 17 женских). Некоторые образцы были взяты из коллекции проб прошлых лет, и пересняты с

использованием настоящей методики «стероидного профиля» для получения репрезентативной статистики. На рисунках 44–47 продемонстрированы зависимости показателей «стероидного профиля» содержащих остарин образцов от критериев ВАДА, а также предложенных нами критериев. Для мужских образцов не прослеживаются значимые изменения «стероидного профиля» относительно общей популяции (рисунки 44 и 45), но в женской популяции (рисунки 46 и 47) в 52.9 % рассмотренных случаях превышен как минимум один из, установленных нами критериев.

В таблицах 31 (женщины) и 32 (мужчины) приведены сравнения эффективности применения критериев ВАДА и предложенных критериев. Видно, что в одном образце мужской и двух женской популяции превышены критерии ВАДА. В двух образцах мужской и девяти женской популяции превышены предложенные нами критерии. Наиболее эффективным критерием для женской популяции является отношение Андростерона к Тестостерону (А/Т), его превышение наблюдали в 5 образцах. Отдельно отметим, что все образцы проанализировали на соединения из запрещенного списка ВАДА, ни один из образцов не показал наличие других известных запрещенных субстанций, кроме остарина. Также образцы, в которых наблюдали превышение предложенных критериев, подвергли изотопному анализу для определения природы происхождения тестостерона. Результаты анализа показали отсутствие в них синтетического тестостерона.

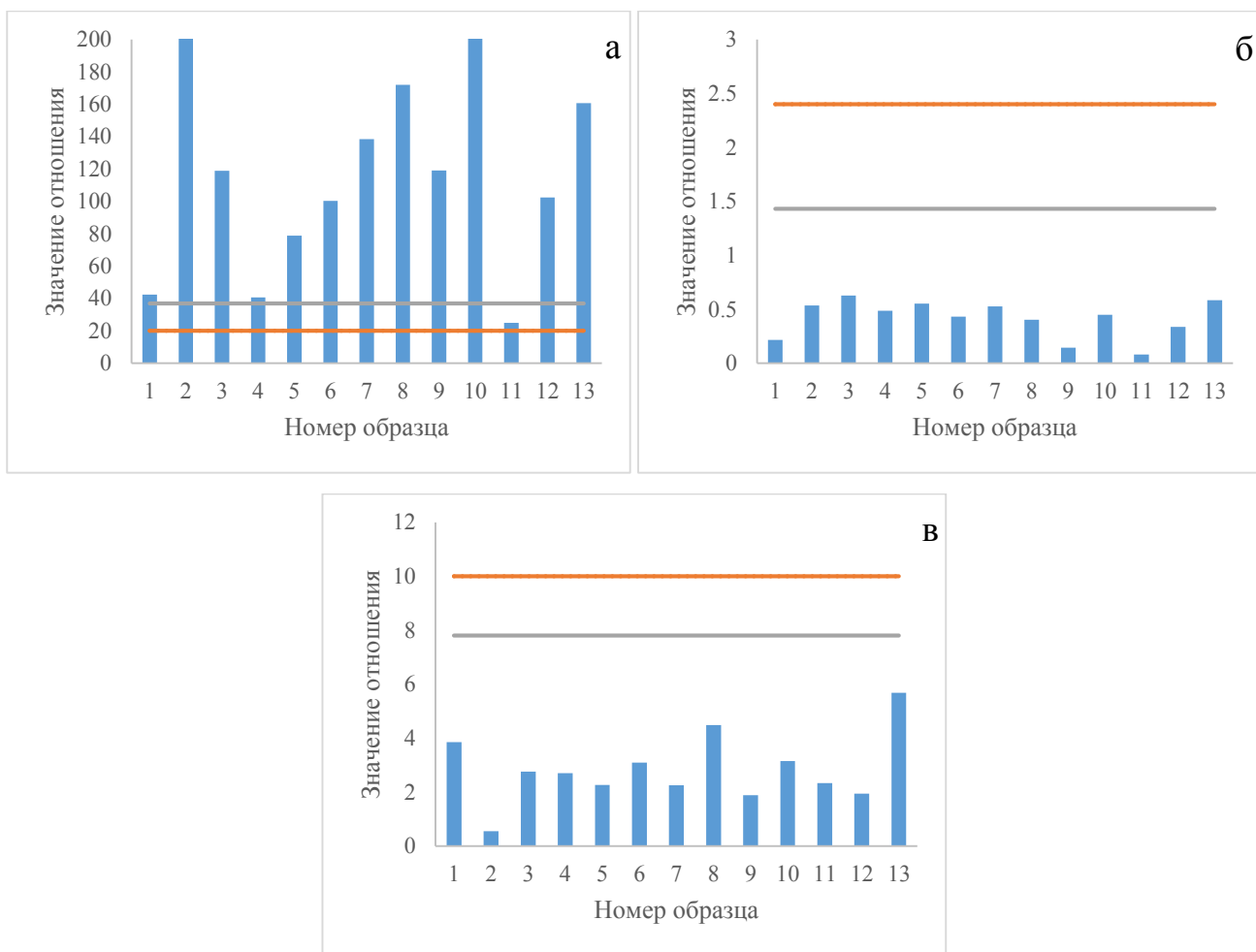
С большой долей вероятности можно утверждать, что остарин влияет на женский «стероидный профиль», но данный вопрос требует более детального изучения с проведением исследований на добровольцах. Полученные первичные данные хорошо демонстрируют возможности методики определения «стероидного профиля» как инструмента исследования влияния различных субстанций на изменение эндогенных стероидов в организме человека [179].





	Допустимые пределы концентраций эндогенных стероидов и некоторых их отношений в соответствии с документами ВАДА
	Критерии, рассчитанные в работе

а – андростерон; б – этиохоланолон; в – тестостерон; г – эпитестостерон; д – 5α-андростан-3α,17β-диол; е – Т/Е

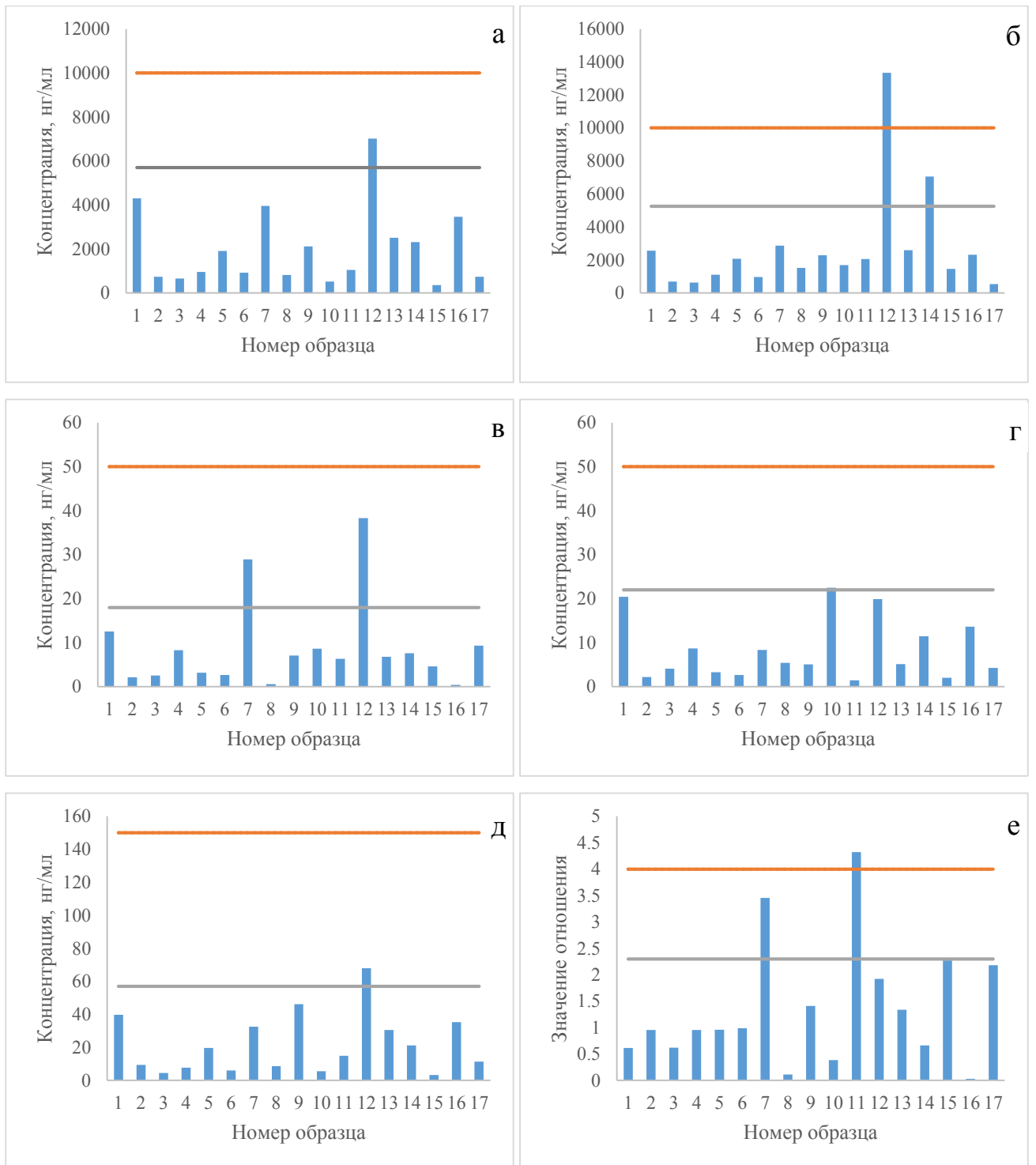
Рисунок 44 – Зависимости параметров «стероидного профиля» (андростерона, этиохоланолона, тестостерона, эпитестостерона, 5α-андростан-3α,17β-диола и Т/Е) от концентрации остарина в образцах спортсменов мужского пола





	Допустимые пределы концентраций эндогенных стероидов и некоторых их отношений в соответствии с документами ВАДА
	Критерии, рассчитанные в работе

а – Андро/Т; б – 5α -диол/ 5β -диол; в – 5α -диол/Е

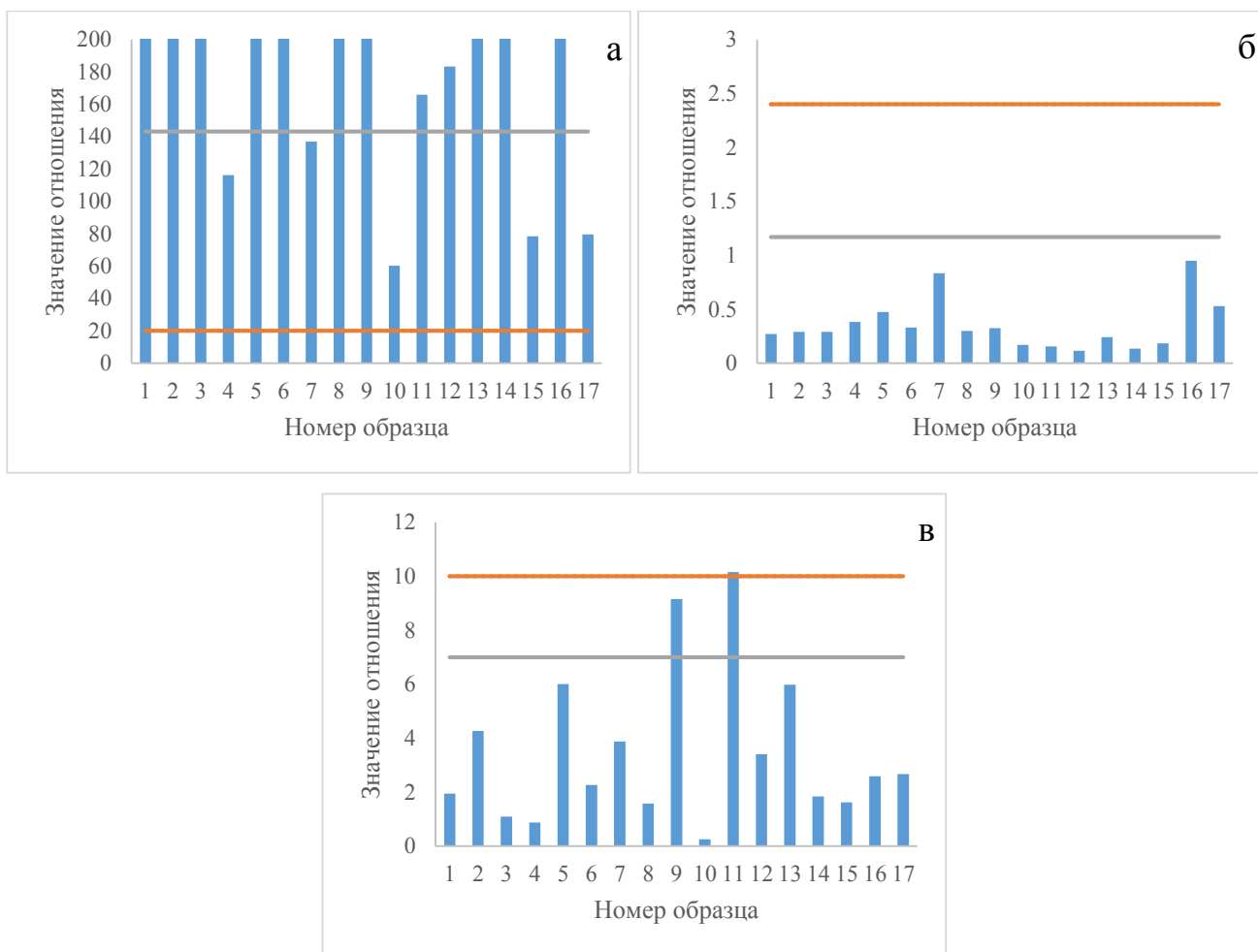
Рисунок 45 – Зависимости параметров «стероидного профиля» (Андро/Т, 5α -диол/ 5β -диола, 5α -диол/Е) от концентрации оstarина в образцах спортсменов мужского пола





	Допустимые пределы концентраций эндогенных стероидов и некоторых их отношений в соответствии с документами ВАДА
	Критерии, рассчитанные в работе

а – андростерон; б – этиохоланолон; в – тестостерон; г – эпитестостерон; д – 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол; е – Т/Е

Рисунок 46 – Зависимости параметров «стероидного профиля» (андростерона, этиохоланолона, тестостерона, эпитестостерона, 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола и Т/Е) от концентрации оstarина в образцах спортсменов женского пола



	Допустимые пределы концентраций эндогенных стероидов и некоторых их отношений в соответствии с документами ВАДА
	Критерии, рассчитанные в работе

а – Андро/Т; б – 5α -диол/ 5β -диол; в – 5α -диол/Е

Рисунок 47 – Зависимости параметров «стероидного профиля» (Андро/Т, 5α -диол/ 5β -диола, 5α -диол/Е) от концентрации остарина в образцах спортсменов женского пола

Таблица 31 – Эффективность применения критериев ВАДА и предложенных критериев для косвенного определения остарина (на примере женской популяции)

Параметр	Превышение порога	
	ВАДА	Предложенные критерии
Тестостерон	0 случаев	2 случая (пробы 7 и 12)
Эпитестостерон	0 случаев	1 случай (проба 10)
Андростерон	0 случаев	1 случай (проба 12)
Этиохоланолон	1 случай (проба 12)	2 случая (пробы 12 и 14)
5 α -диол	0 случаев	1 случай (проба 12)
5 α -диол/Эпитестостерон	1 случай (проба 11)	2 случая (пробы 9 и 11)
Тестостерон/Эпитестостерон	1 случай (проба 11)	2 случая (пробы 7 и 11)
Андростерон/Тестостерон	0 случаев	5 случаев (пробы 4; 7; 10; 15; 17)
5 α -диол/5 β -диол	0 случаев	0 случаев
Итог:	2 уникальных случая	9 уникальных случаев

Таблица 32 – Эффективность применения критериев ВАДА и предложенных критериев для косвенного определения остарина (на примере мужской популяции)

Параметр	Превышение порога	
	ВАДА	Предложенные критерии
Тестостерон	0 случаев	1 случай (проба 1)
Эпитестостерон	0 случаев	0 случаев
Андростерон	0 случаев	0 случаев
Этиохоланолон	0 случаев	0 случаев
5 α -диол	0 случаев	1 случай (проба 1)
5 α -диол/Эпитестостерон	0 случаев	0 случаев
Тестостерон/Эпитестостерон	1 случай (проба 11)	1 случай (проба 11)
Андростерон/Тестостерон	0 случаев	1 случай (проба 11)
5 α -диол/5 β -диол	0 случаев	0 случаев
Итог:	1 уникальный случай	2 уникальных случая

2.18 Влияние экдистерона на маркеры «стероидного профиля»

Проведя мониторинг интернет-ресурсов в сфере спортивного питания, выявили, что экдистероиды пользуются популярностью среди профессиональных атлетов. По заявлению производителя эти вещества оказывают анаболический эффект «значительно больший, чем от приема метандростенолона». При этом экдистероиды не числятся в Запрещенном списке ВАДА, что позволяет спортсменам употреблять данный класс соединений без ограничений. С вводом методики определения «стероидного профиля» у многих тренеров и профессиональных спортсменов возникает логичный вопрос, может ли прием экдистерона, особенно в больших дозировках, влиять на маркеры «стероидного профиля». Для исследования данного вопроса в стандартную процедуру допинг-контроля были добавлены переходы для определения экдистерона. Параметры его определения приведены в таблице 33. Дериватизация с МСТФА молекулы экдистерона приводит к образованию 7-ТМС производного с теоретически рассчитанной массой 984. В режиме полного сканирования на масс-спектре выделяются две массы - 894, соответствует потере ОТМС группы от первичного иона с массой 984, и фрагмент с массой 633. Ион 633 имеет большую интенсивность в спектре, чем 894, и фрагментируется с образованием интенсивных ионов-продуктов, чем и был обусловлен его выбор.

Таблица 33 – Параметры для определения экдистерона

Время удерживания, мин.	Ион-предшественник, Да	Ион-продукт, Да	Энергия соударений, эВ
19.1	633.3	363.2	13
	633.3	320.2	16

Из 10680 проанализированных проб выявили 532 случая приема экдистерона у мужчин и 246 у женщин, то есть около 7.3 % от общего числа проб. Используя

данные о распределении тестостерона и эпитестостерона для каждой популяции, выявили, что профили распределения случайной величины образцов, не содержащих запрещенных соединений, и профили распределения образцов, содержащих экидистерон идентичны (рисунки 48 и 49). Аналогичную картину наблюдали для остальных маркеров «стероидного профиля», вне зависимости от пола спортсмена. Ни один из критериев ВАДА или предложенных критериев не был нарушен, что с высокой долей вероятности позволяет предполагать, что прием экидистерона не влияет на «стероидный профиль» и может свободно применяться без риска попадания под спортивные санкции.



Рисунок 48 – Диаграмма распределения Т/Е для собранных в мужской популяции образцов, не содержащих запрещенные соединения

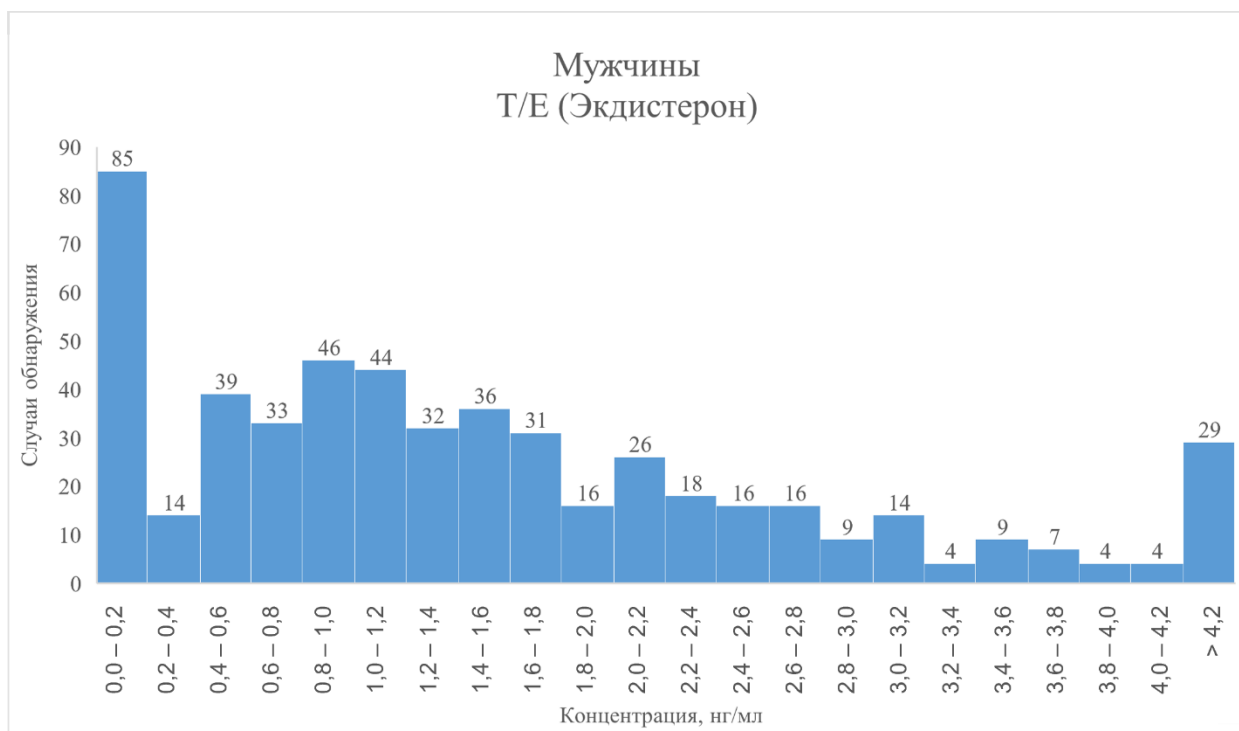


Рисунок 49 – Диаграмм распределения Т/Е для содержащих экдистерон пробах в мужской популяции

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана методика хроматографического разделения и определения эндогенных анаболических стероидов методом ГХ-МС/МС, позволяющая одновременно проводить количественное определение 8-ми маркеров «стероидного профиля» – тестостерона, эпитестостерона, форместана, 5 β -андростандиона (от 1 нг/мл), 5 α -андростан-3 α ,17 β -диола (от 2 нг/мл), 5 β -андростан-3 α ,17 β -диола (от 5 нг/мл), дегидроэпиандростерона (от 10 нг/мл) а эндогенных стероидов с более высокими содержаниями - на нижнем уровне эндогенных концентраций (андростерона и этиохоланолона – от 200 нг/мл). Предложена оптимальная матрица для проведения калибровки, а также способ ее приготовления. Методика определения эндогенных анаболических стероидов, отвечающая критериям ВАДА, внедрена в практику Национальной антидопинговой лаборатории (института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

2. Разработана методика установления природы происхождения 19-норандростерона с использованием метода ГХ-С-ИМС. В методике предложен оригинальный хроматографический метод разделения аналитов, позволяющий с высокой селективностью выделить 19-норандростерон, и провести его последующий анализ на системе ГХ-С-ИМС.

3. Рассмотрено влияние остарина и экдистерона на количественные изменения маркеров «стероидного профиля». Показано, что остарин в большей степени влияет на изменение маркеров «стероидного профиля» женской популяции, чем мужской. Применение экдистерона не оказывает существенного влияния на «стероидный профиль» популяций.

4. Проведен хемометрический анализ для выявления наиболее значимых маркеров деградации образцов мочи. Рассчитана значимость каждого отдельного параметра. Установлено, что деградация образцов мочи у женщин происходит чаще, чем в мужских.

5. Изучены аналитические характеристики и проведена валидация методики количественного определения маркеров «стероидного профиля». Методика обладает высокой селективностью, воспроизводимостью и низким уровнем стандартной неопределенности во всем диапазоне градуировки.

6. На основе анализа более 10000 биообразцов предложены новые критерии для выявления подозрительных проб для установления «стероидного профиля» методом ГХ-С-ИМС.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 2020 Anti-doping testing Figures, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf (дата обращения: 03.04.2022)
2. 2019 International Standard for Laboratories, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf (дата обращения: 03.04.2022)
3. Sobolevsky, T. Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine / T. Sobolevsky, G. Rodchenkov // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 128. – P. 121–127.
4. Becchi, M. Gas chromatography/combustion/isotope–ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport / M. Becchi, R. Aguilera, Y. Farizon [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 1994. – Vol. 8, N 4. – P. 304–308.
5. Piper, T. Investigations on changes in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids after pregnenolone administration / T. Piper, C. Schlug, U. Mareck [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2011. – Vol. 3, N 5. – P. 283–290.
6. Payne, A.H. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones / A.H. Payne, D.B. Hales // *Endocr. Rev.* – 2004. – Vol. 25, N 6. – P. 947–970.
7. Mareck, U. Detection of Dehydroepiandrosterone misuse by means of gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry / U. Mareck, H. Geyer, U. Flenker [et al.] // *Eur. J. Mass. Spectrom.* – 2007. – Vol. 13, N 6. – P. 419–426.
8. Van Renterghem, P. Development of a GC/C/IRMS method – confirmation of a novel steroid profiling approach in doping control / P. Van Renterghem M. Polet, L. Brooker [et al.] // *Steroids.* – 2012. – Vol. 77, N 11. – P. 1050–1060.

9. Aguilera, R. Detection of epitestosterone doping by isotope ratio mass spectrometry / R. Aguilera, C.K. Hatton, D.H. Catlin // *Clin. Chem.* – 2002. – Vol. 48, N 4. – P. 629–636.
10. Zhang, Y. Steroid isotopic standards for gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry (GCC-IRMS) / Y. Zhang, H.J. Tobias, T. Brenna // *Steroids.* – 2009. – Vol. 74. – № 3 – P. 369–378.
11. Putz, M. Development and validation of a multidimensional gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry-based test method for analyzing urinary steroids in doping controls / M. Putz, T. Piper, A. Casilli [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – Vol. 1030. – P. 105–114.
12. Schmitt, J. Amount dependent isotopic fractionation during compound-specific isotope analysis / J. Schmitt, B. Glaser, W. Zech // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 17, N 9. – P. 970–977.
13. Groot, P.A. Handbook of stable isotope analytical techniques / P.A. Groot – Bristol: Elsevier, 2004. – P. 857.
14. Saudan, C. Validation and performance comparison of two carbon isotope ratio methods to control the misuse of androgens in humans / C. Saudan, C. Emery, F. Marclay [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2009. – Vol. 877. – No 23. – P. 2321–2329.
15. Donike, M.L. Nachweis von exogenem Testosteron / M.L. Donike, K.R. Barwald, K. Klosterman [et al.] // *Sport: Leistung und Gesundheit.* – 1982. – P. 293–300.
16. Strahm, E. Steroid profiles of professional soccer players: an international comparative study / E. Strahm, P.E. Sottas, C. Schweizer [et al.] // *Br. J. Sport. Med.* – 2009. – Vol. 43, N. 14. – P. 1126–1130.
17. Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting, WADA Technical Document – TD2014EAAS – Режим доступа: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-td2014eaas-v1.0-endogenous-anabolic-androgenic-steroids-measurement-and-reporting-en.pdf> (дата обращения: 03.04.2022)
18. Saudan, C. Testosterone and doping control / C. Saudan, N. Baume, N. Robinson [et al.] // *Br. J. Sports. Med.* – 2006. – Vol. 40. – P. 21–24.

19. Hoberman, J.M. The History of Synthetic Testosterone / J.M. Hoberman, C.E. Yesalis // *Scientific American*. – 1995. – Vol. 02. – P. 76–81.
20. Reporting and evaluation Guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids, WADA Technical Document – TD2004EAAS – Режим доступа: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-TD2004-EAAS-Reporting-and-Evaluation-Guidance-for-Testosterone%2C-Epitestosterone%2C-T-E-Ratio-and-Other-Endogenous-Steroids.pdf> (дата обращения: 03.04.2022)
21. Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting, WADA Technical Document – TD2018EAAS – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018eaas_final_eng.pdf (дата обращения: 03.04.2022)
22. Linnet, K. Effect of the Biological Matrix on the Urinary Testosterone/Epitestosterone Ratio Measured by Gas Chromatography/Mass Spectrometry in Doping Analysis / K. Linnet // *Biol. Mass Spectrom.* – 1993. – Vol. 22. – P. 412–418.
23. Кочнова, Е.А. Определение профиля эндогенных стероидов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии: специальность специальность 02.00.02 «аналитическая химия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Кочнова Елизавета Александровна: ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – 2012. – 169 с. – Библиогр.: с. 149–162.
24. Nolteernsting, E. 1-(N,N-diisopropylamino)-n-alkanes: a new reference system for systematical identification of nitrogen containing substances by gas-chromatography and nitrogen specific or mass spectrometrical detection / E. Nolteernsting, G. Opfermann, M. Donike // *Recent Advances in Doping Analysis* – 1996. – Vol. 3 – P. 369–388.
25. Albeiroti, S. The influence of small doses of ethanol on the urinary testosterone to epitestosterone ratio in men and women / S. Albeiroti, B.D. Ahrens, T. Sobolevskii [et al.] // *Drug Test Anal.* – 2018 – Vol. 10, N 3. – P. 575–583.

26. Ayotte, C. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine / C. Ayotte, D. Goudreault, A. Charlebois // *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* – 1996. – Vol. 687, N 1. – P. 3–25.
27. Wood, C.L. Puberty: Normal physiology (brief overview) / C. L. Wood, L. C. Lane, T. Cheetham // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2019. – Vol. 33, N 3. – 101265.
28. Geyer, H. The matrix problem in calibration of the GC/MS for endogenous steroids. The search for an artificial urine / H. Geyer, U. Mareck-Engelke, E. Nolteernsting [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis. Sport* – 1995. – Vol. 2 – P. 199–209.
29. Schulze, J.J. Doping Test Results Dependent on Genotype of UGT2B17, the Major Enzyme for Testosterone Glucuronidation / J.J. Schulze, J. Lundmark, M. Garle [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 93, N 7. – P. 2500–2506.
30. Gallagher, C.J. The UGT2B17 gene deletion polymorphism and risk of prostate cancer. A case-control study in Caucasians / C.J. Gallagher, F.F. Kadlubar, J.E. Muscat [et al.] // *Cancer Detect. Prev.* – 2007. – Vol. 31, N 4. – P. 310–315.
31. Jakobsson, J. Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism / J. Jakobsson, L. Ekström, N. Inotsume [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91, N 2. – P. 687–693.
32. Swanson, C. The uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B15 D85Y and 2B17 deletion polymorphisms predict the glucuronidation pattern of androgens and fat mass in men / C. Swanson, D. Mellström, M. Lorentzon [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92, N 12. – P. 4878–4882.
33. Martín-Escudero, P. Impact of UGT2B17 gene deletion on the steroid profile of an athlete / P. Martín-Escudero, J. Muñoz-Guerra, N. Del Prado [et al.] // *Physiol Rep.* – 2015. – Vol. 3, N 12. – P. 1–7.
34. Schulze, J.J. Substantial advantage of a combined Bayesian and genotyping approach in testosterone doping tests / J.J. Schulze, J. Lundmark, M. Garle [et al.] // *Steroids.* – 2009. – Vol. 74, N 3. – P. 365–368.

35. Piper, T. Genotype-dependent metabolism of exogenous testosterone - new biomarkers result in prolonged detectability / T. Piper, W. Schänzer, M. Thevis // *Drug Test Anal.* – 2016. – Vol. 8, N 11–12. – P. 1163–1173.
36. Coll, S. Effect of glucocorticoid administration on the steroid profile / S. Coll, X. Matabosch, L. Garrosta [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2018. – Vol. 10, N 6. – P. 947–955.
37. Mazzarino, M. Drug-drug interaction and doping: Effect of non-prohibited drugs on the urinary excretion profile of methandienone / M. Mazzarino, F.L. Khevenhüller-Metsch, I. Fiacco [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2018. – Vol. 10, N 10. – P. 1554–1565.
38. Kotronoulas, A. Evaluation of markers out of the steroid profile for the screening of testosterone misuse. Part II: Intramuscular administration / A. Kotronoulas, À. Gomez-Gómez, A. Fabregat [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2018. – Vol. 10, N 5. – P. 849–859.
39. Kotronoulas, A. Evaluation of markers out of the steroid profile for the screening of testosterone misuse. Part I: Transdermal administration / A. Kotronoulas, À. Gomez-Gómez, A. Fabregat [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2018. – Vol. 10, N 5. – P. 821–831.
40. Schulze, J. Urinary steroid profile in relation to the menstrual cycle / J. Schulze, T. Suominen, H. Bergström [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2021. – Vol. 13, N 3. – P. 550–557.
41. Schiffer, J. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review / L. Schiffer, L. Barnard, E. S. Baranowski [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 194. – 105439.
42. Gomez-Gomez, A. Determination of steroid profile in hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry / A. Gomez-Gomez, O.J. Pozo // *J. Chromatogr. A* – 2020. – Vol. 1624. – 461179.

43. Stoll, A. Influence of Pain Killers on the Urinary Anabolic Steroid Profile / A. Stoll, M. Iannone, G. De Gregorio [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2020. – Vol. 44, N 8. – P. 871–879.
44. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2022 Prohibited List. International Standard. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list_final_en.pdf (дата обращения: 03.04.2022).
45. Stepan, R. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the determination of anabolic steroids and related compounds in nutritional supplements / R. Stepan, R. Cuhra, S. Barsova // *Food Add. Cont.: Part A.* – 2008. – Vol. 25. – № 5. – P. 557–565.
46. Baume, R. Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements / N. Baume, N. Mahler, M. Kamber [et al.] // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 2006. – Vol. 16. – P. 41–48.
47. De Cock, K.J.S. Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements / K.J.S. De Cock, F.T. Delbeke, P. Van Eenoo [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2001. – Vol. 25. – P. 843–852.
48. Geyer, H. Analysis of Non-Hormonal Nutritional Supplements for Anabolic-Androgenic Steroids – Results of an International Study / H. Geyer, M.K. Parr, U. Mareck [et al.] // *Int. J. Sports Med.* – 2004. – Vol. 25. – P. 124–129.
49. Falk, O. Effect of ethanol on the ratio between testosterone and epitestosterone in urine / O. Falk, E. Palonek, I. Björkhem // *Clinical Chemistry.* – 1988. – Vol. 34, N 7. – P. 1462–1464.
50. Karila, T. High doses of alcohol increase urinary testosterone-to-epitestosterone ratio in females / T. Karila, V. Kosunen, A. Leinonen [et al.] // *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* – 1996. – Vol. 687, N 1. – P. 109–116.
51. Mareck-Engelke, U. Influence of ethanol on steroid profile parameters / U. Mareck-Engelke, H. Geyer, U. Schindler [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis* – 1996. – Vol. 3 – P. 143–155.

52. Mareck, U. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis / U. Mareck, H. Geyer, G. Opfermann [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2008. – Vol. 43, N 7. – P. 877–889.
53. Geyer, H. Factors influencing the steroid profile / H. Geyer, W. Schänzer, U. Mareck-Engelke [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1996. – Vol. 3. – P. 95–113.
54. Mareck-Engelke, U. Stability of steroid profiles (6): The influence of oral contraceptives on steroid profiles / U. Mareck-Engelke, U. Flenker, W. Schänzer // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1997. – Vol. 4. – P. 139–157.
55. Geyer, H. Simple purification of urine samples for improved detection of anabolic and endogenous steroids / H. Geyer, U. Mareck-Engelke, W. Schänze [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1994. – P. 97–103.
56. Guddat, S. Identification of cyclodextrins by liquid chromatography–ESI-tandem mass spectrometry / S. Guddat, M. Thevis, U. Mareck [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 2005. – P. 419–422.
57. Chen, J. Quantitation of serum pregnanediol-3-glucuronide level in different endocrine statuses by LC-MS/MS / J. Chen, H. Hou, H. Chen [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2020. – 184 – 113171.
58. Mareck-Engelke, U. Interpretation of Female Steroid Profiles. / U. Mareck-Engelke, H. Geyer, W. Schänzer // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1998. – Vol. 5. – P. 51–70.
59. Donike, M. Excretion of ephedrine and endogenous steroids under conditions of controlled water intake and of water diuresis / M. Donike, S. Rauth // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1992. – P. 163–176.
60. The 2020 Monitoring Program, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada_2020_english_monitoring_program.pdf (дата обращения: 03.04.2022)
61. Grebenok, R.J. Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach / R.J. Grebenok, P.V. Ripa, J.H. Adler // *Lipids.* – 1991. – Vol. 26, N 8. – P. 666–668.

62. Ambrosio, G. Detection and quantitation of ecdysterone in human serum by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry / G. Ambrosio, J.F. Joseph, B. Wuest, [et al.] // *Steroids*. – 2020. – Vol. 157 – 108603.
63. Slama, K. Insect hormones-ecdysteroids: Their presence and actions in vertebrates / K. Slama, R. Lafont // *Eur. J. Entomol.* – 1995. – Vol. 92. – P. 355–377.
64. Burdette, W. Effect of ecdysone on the incorporation of C¹⁴-Leucine into hepatic protein in vitro / W. Burdette, R. Coda // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1963. – Vol. 112. – P. 216–217.
65. Parr, M.K. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents? / M.K. Parr, F. Botre, A. Nass [et al.] // *Biol. Sport.* – 2015. – Vol. 32, N 2. – P. 169–173.
66. Dinan, L. The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they? / L. Dinan // *Arch. insect Biochem. Physiol.* – 2009. – Vol. 72, N 3. – P. 126–141.
67. Haupt, O. Anabolic effect of ecdysterone results in hypertrophy of C2C12 myotubes by an estrogen receptor mediated pathway / O. Haupt, S. Tchoukouegno Ngueu, P. Diel [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis*. – 2012. – P. 221–225.
68. Greenwood, M. Effects of Methoxyisoflavone, Ecdysterone, and Sulfo-Polysaccharide Supplementation on Training Adaptations in Resistance-Trained Males / M. Greenwood, C.J. Rasmussen, C. Kerksick [et al.] // *J. Int. Soc. Sports Nutr.* – 2006. – Vol. 3, N 2. – P. 19–27.
69. Dinan, L. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals / L. Dinan, R. Lafont // *J. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 191, N 1. – P. 1–8.
70. Lafont, R. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update / R. Lafont, L. Dinan // *J. Insect Sci.* – 2003. – Vol. 3, N 7. – P. 1–30.
71. Courtheyn, D. Recent developments in the use and abuse of growth promoters / D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – Vol. 473, N 1–2. – P. 71–82.
72. Gorelick-Feldman, J. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells / J. Gorelick-Feldman, D. Maclean, N. Ilic [et al.] // *J Agric Food Chem.* – 2008. – Vol. 56, N 10. – P. 3532–3537.

73. Toth, N. 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat / N. Toth, A. Szabo, P. Kacsala [et al.] // *Phytomedicine*. – 2008. – Vol. 15, N 9. – P. 691–698.
74. Slama, K. Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quail / K. Slama, K. Koudela, J. Tenora [et al.] // *Experientia*. – 1996. – Vol. 52, N 7. – P. 702–706.
75. Slama, K. Insect hormones and bioanalogues: their effect on respiratory metabolism in *Dermestes vulpinus* L. (Coleoptera) / K. Slama, M. Kodkoua // *Biol Bull*. – 1975. – Vol. 148, N 2. – P. 320–332.
76. Zwetsloot, K.A. Phytoecdysteroids: a novel, non-androgenic alternative for muscle health and performance / K.A. Zwetsloot, A.R. Shanely, E.K. Merritt [et al.] // *J. Steroids Horm. Sci.* – 2013. – Vol. S12. – P. 10–12.
77. Bathori, M. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids - structure and effects on humans / M. Bathori, N. Toth, A. Hunyadi [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, N 1. – P. 75–91.
78. Okui, S. Stimulation of protein synthesis in mouse liver by insect-moulting steroids / S. Okui, T. Otaka, M. Uchiyama [et al.] // *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*. – 1968. – Vol. 16, N 2 – P. 384–387.
79. Arking, R. Effect of ecdysone on protein synthesis in the larval fat body of *Calliphora* / R. Arking, E. Shaaya // *J. Insect. Physiol.* – 1969. – Vol. 15, N 2. – P. 287–296.
80. Isenmann, E. Ecdysteroids as nonconventional anabolic agent: performance enhancement by ecdysterone supplementation in humans / E. Isenmann, G. Ambrosio, J.F. Joseph [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2019. – Vol. 93, N 7. – P. 1807–1816.
81. Seidlova-Wuttke, D. Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats / D. Seidlova-Wuttke, C. Ehrhardt, W. Wuttke // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 119, N 3-5. – P. 121–126.
82. Isenmann, E. Ecdysteroids as non-conventional anabolic agent: performance enhancement by ecdysterone supplementation in humans / E. Isenmann, G. Ambrosio, J.F. Joseph [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2019. – Vol. 93, N 7. – P.1807–1816.

83. Parr, M.K. Estrogen receptor beta is involved in skeletal muscle hypertrophy induced by the phytoecdysteroid ecdysterone / M.K. Parr, P. Zhao, O. Haupt [et al.] // *Mol Nutr Food Res.* – 2014. – Vol. 58, N 9. – P. 1861–1872.
84. Occhiato, E.G. Selective non-steroidal inhibitors of 5 alpha-reductase type 1 / E.G. Occhiato, A. Guarna, G. Danza [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 88, N 1. – P. 1-16.
85. Donike, M. Detection of dihydrotestosterone (DHT) doping: alterations in the steroid profile and reference ranges for DHT and its 5 alpha-metabolites / M. Donike, M. Ueki, Y. Kuroda [et al.] // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* – 1995. – Vol. 35, N 4. – P. 235–250.
86. Badawy, M.T. Androstenedione (a Natural Steroid and a Drug Supplement): A Comprehensive Review of Its Consumption, Metabolism, Health Effects, and Toxicity with Sex Differences/ M.T. Badawy, M. Sobeh, J. Xiao [et al.] // *Molecules.* – 2021– Vol. 26, N 20. – 6210
87. Levesque, J.-F. Criteria for the detection of androstenedione oral administration / J.-F. Levesque, C. Ayotte // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1999. – Vol. 7. – P. 169–179.
88. Bassindale, T. Disposition of androstenedione and testosterone following oral administration of androstenedione to healthy female volunteers; influence on the urinary T/E ratio / T. Bassindale, D.A. Cowan, S. Dale [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 2002. – Vol. 10. – P. 51–60.
89. Garle, M. Androstenedione: excretion studies from single and multiple dose experiments / M. Garle, E. Palonek // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1999. – Vol. 6. – P. 181–184.
90. Uralets, V.P. Over-the-Counter Anabolic Steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-Androsten-3b,17b-diol, and 19-Nor-4-androsten-3,17-dione: Excretion Studies in Men / V.P. Uralets, P.A. Gilette // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1999. – Vol. 6. – P. 147–169.

91. Franke, W.W. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government / W.W. Franke, B. Berendonk // *Clin. Chem.* – 1997. – Vol. 43, N 7. – P. 1262–1279.
92. Whitaker, D.L. Anabolic steroid misuse and male infertility: management and strategies to improve patient awareness / D.L. Whitaker, G. Geyer-Kim, E.D. Kim // *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* – 2021. – Vol. 16, N 3. – P. 109–122.
93. Ding, J.B. Anabolic-Androgenic Steroid Misuse: Mechanisms, Patterns of Misuse, User Typology, and Adverse Effects / J.B. Ding, M.Z. Ng, S.S. Huang [et al.] // *J. Sports Med. (Hindawi Publ. Corp.)*. – 2021. – Vol. 2021 – 7497346.
94. Frati, P. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) related deaths: autptic, histopathological and toxicological findings / P. Frati, F.P. Busardò, L. Cipolloni [et al.] // *Curr. Neuropharmacol.* – 2015. – Vol. 13, N 1 – P. 146–159.
95. Geyer, H. Probenecid as masking agent in dope control – inhibition of the urinary excretion of steroid glucuronides / H. Geyer, W. Schänzer, M. Donike // *Recent Advances in Doping Analysis.* – 1992. – P. 141–151.
96. Kicman, A.T. Adrenal and gonadal contributions to urinary excretion and plasma concentration of epitestosterone in men-effect of adrenal stimulation and implications for detection of testosterone abuse / A.T. Kicman, S.B. Coutts, D.A. Cowan [et al.] // *Clinical Endocrinology.* – 1999. – Vol. 50, N 5. – P. 661–668.
97. Kicman, A.T. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives / A.T. Kicman, D.B. Gower // *Ann. Clin. Biochem.* – 2003. – Vol. 40. – P. 321–356.
98. Van Renterghema, P. Validation of an extended method for the detection of the misuse of endogenous steroids in sports, including new hydroxylated metabolites / P. Van Renterghema, P. Van Eenoo, W. Van Thuyne [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2008. – Vol. 876, N 2. – P. 225–235.
99. Woldemariam, G.A. Immunoextraction-tandem mass spectrometry method for measuring intact human chorionic gonadotropin, free β -subunit, and β -subunit core fragment in urine / G.A. Woldemariam, A.W. Butch // *Clin. Chem.* – 2014. – Vol. 60, N 8. – P. 1089–1097.

100. Choi, S.M. Comparative safety evaluation of selective androgen receptor modulators and anabolic androgenic steroids / S.M. Choi, B.M. Lee // *Expert Opin. Drug Saf.* – 2015. – Vol. 14, N 11. – P. 1773–1785.

101. Kearbey, J. D. Pharmacokinetics of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator / J. D. Kearbey, D. Wu, W. Gao [et al.] // *Xenobiotica.* – 2004. – Vol. 34, N 3. – P. 273–280.

102. Dalton, J.T. Selective androgen receptor modulators for the prevention and treatment of muscle wasting associated with cancer / J.T. Dalton, R.P. Taylor, M.L. Mohler [et al.] // *Curr. Opin. Support Palliat Care.* – 2013. – Vol. 7, N 4. – P. 345–351.

103. Srinath, R. Enobosarm (GTx-024, S-22): a potential treatment for cachexia / R. Srinath, A. Dobs // *Future Oncol.* – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 187–194.

104. Bhasin, S. Drug Insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging / S. Bhasin, O.M. Calof, T.W. Storer [et al.] // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 2, N 3. – P. 146–159.

105. Cadilla, R. Selective androgen receptor modulators in drug discovery: medicinal chemistry and therapeutic potential / R. Cadilla, P. Turnbull // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6, N 3. – P. 245–270.

106. Chen, F. Development of selective androgen receptor modulators and their therapeutic applications / F. Chen, G.A. Rodan, A. Schmidt // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2002. – Vol. 8, N 3. – P. 162–168.

107. Gao, W. Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs) / W. Gao, J.T. Dalton // *Drug Discov. Today.* – 2007. – Vol. 12, N 5-6. – P. 241–248.

108. Mohler, M.L. Nonsteroidal selective androgen receptor modulators (SARMs): dissociating the anabolic and androgenic activities of the androgen receptor for therapeutic benefit / M.L. Mohler, C.E. Bohl, A. Jones [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52, N 12. – P. 3597–3617.

109. Zilbermint, M.F. Nonsteroidal selective androgen receptor modulator Ostarine in cancer cachexia / M.F. Zilbermint, A.S. Dobs // Future Oncol. – 2009. – Vol. 5, N 8. – P. 1211–1220.

110. 2012 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf> (дата обращения: 03.04.2022)

111. 2013 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2013_anti-doping_testing_figures_report_en.pdf (дата обращения: 03.04.2022)

112. 2014 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2014_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf (дата обращения: 03.04.2022)

113. 2015 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2015_wada_anti-doping_testing_figures_report_0.pdf (дата обращения: 03.04.2022)

114. 2016 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016_anti-doping_testing_figures.pdf (дата обращения: 03.04.2022)

115. 2017 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017_anti-doping_testing_figures_en_0.pdf (дата обращения: 3.04.2022)

116. 2018 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf (дата обращения: 03.04.2022)

117. 2019 Anti-doping Testing figures report, WADA Technical Document – Режим доступа: <https://www.wada->

ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf

(дата обращения: 03.04.2022)

118. World Anti-Doping Agency. Urine Sample Collection Guidelines – Режим доступа: [https://www.wada-](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isti_sample_collection_guidelines_en_final_2_feb_2021_0.pdf)

[ama.org/sites/default/files/resources/files/isti_sample_collection_guidelines_en_final_2_feb_2021_0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isti_sample_collection_guidelines_en_final_2_feb_2021_0.pdf) (дата обращения: 28.12.2020)

119. Tsivou, M. Stabilization of human urine doping control samples: II. Microbial degradation of steroids / M. Tsivou, D. Livadara, D.G. Georgakopoulos [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2009. – Vol. 388, N 1. – P. 146–154.

120. Tsivou, M. Stabilization of human urine doping control samples: III. Recombinant human erythropoietin / M. Tsivou, H.A. Dimopoulou, I.-P. Leontiou [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 411, N 5-6 – P. 448–452.

121. Tsivou, M. Stabilization of human urine doping control samples: A current opinion / M. Tsivou, D.G. Georgakopoulos, H.A. Dimopoulou [et al.] // *Anal. and Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401, N 2. – P. 553–561.

122. Tsivou, M. Doping control container for urine stabilization: a pilot study / M. Tsivou, E. Giannadaki, F. Hooghe, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9, N 5. – P. 699–712.

123. Chiang, Y.R. Microbial degradation of steroid sex hormones: implications for environmental and ecological studies / Y.R. Chiang, S. Ting-Shyang Wei, Po-Hsiang Wang [et al.] // *Microb. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 13, N 4. – P. 926–949.

124. Sobolevsky, T. Anti-doping analyses at the Sochi Olympic and Paralympic Games 2014 / T. Sobolevsky, G. Krotov, M. Dikunets [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2014. – Vol. 6, N 11–12. - P. 1087–1101.

125. Georgakopoulos, P. Detecting – the 2004 Athens Olympic Games / P. Georgakopoulos // *Drug Test. Anal.* – 2020. – Vol. 12, N 5. – P. 641–646.

126. Baltazar-Martins, G. Chronicle of an unintentional MDMA intoxication of a field hockey team to prevent its qualification for the Beijing 2008 Olympics: A case report / G. Baltazar-Martins, M. Del Mar Plata, J. Muñoz-Guerra [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2020. – Vol. 12, N 5. – P. 647–650.

127. Pereira, H.M.G. Doping control analysis at the Rio 2016 Olympic and Paralympic Games / H.M.G. Pereira, V.F. Sardela, M.C. Padilha [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9, N 11–12. – P. 1658–1672.

128. Bredehöft, M. Investigations of the microbial transformation of cortisol to prednisolone in urine samples / M. Bredehöft, R. Baginski, M-K. Parr, [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 129, N 1–2. – P. 54–60.

129. Thevis, M. Detection of manipulation in doping control urine sample collection: A multidisciplinary approach to determine identical urine samples / M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – Vol. 388, N 7. – P. 1539–1543.

130. Mazzarino, M. Urine stability and steroid profile: Towards a screening index of urine sample degradation for anti-doping purpose / M. Mazzarino, M.G. Abate, R. Alocci [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 683, N 2. – P. 221–226.

131. De Clercq, N. A validated analytical method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in livestock urine using ultra-high performance liquid chromatography coupled to orbitrap-high resolution mass spectrometry / N. De Clercq, V.B. Julie, S. Croubels [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1301. – P. 111–121.

132. Lippi, G. Controlling sources of preanalytical variability in doping samples: Challenges and solutions / G. Lippi, C. Mattiuzzi, G. Banfi // *Bioanalysis.* – 2013. – Vol. 5, N 12. – P. 1571–1582.

133. Aoki, K. DNA typing for personal identification of urine after long-term preservation for testing in doping control / K. Aoki, H. Tanaka, M. Ueki // *Drug Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9, N 8. – P. 1116–1123.

134. Pires, N.M.M. A Fluorescence Sensing Method with Reduced DNA Typing and Low-Cost Instrumentation for Detection of Sample Tampering Cases in Urinalysis / N.M.M. Pires, T. Dong, Z. Yang [et al.] // *Ann. Biomed. Eng.* – 2020. – Vol. 48, N 2. – P. 644–654.

135. Ayotte, C. Validity of urine samples: microbial degradation / C. Ayotte, A. Charlebois, S. Lapointe [et al.] // *Recent Advances in Doping Analysis*. – 1997. – Vol. 7. – P. 127-137.
136. Kuuranne, T. Confounding factors and genetic polymorphism in the evaluation of individual steroid profiling / T. Kuuranne, M. Saugy, N. Baume // *Br. J. Sports Med.* – 2014. – Vol. 48, N 10. – P. 848–855.
137. De Wilde, L. Steroid profiling in urine of intact glucuronidated and sulfated steroids using liquid chromatography-mass spectrometry / L. De Wilde, K. Roels, P. Van. Renterghem [et al.] // *J. of Chromtogr. A*. – 2020. – Vol. 1624. – 461231.
138. Martinez-Brito, D. Validation of steroid sulfates deconjugation for metabolic studies. Application to human urine samples / D. Martinez-Brito, M.L. Notarianni, M. Iannone [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2020. – Vol. 106. – 106938.
139. Naldi, A.P. Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry / A.P. Naldi, P.B Fayad, M. Prévost [et al.] // *Chem. Cent. J.* – 2016. – Vol. 10, N 1. – P. 1–17.
140. Cha, E. Sensitivity of GC-EI/MS, GC-EI/MS/MS, LC-ESI/MS/MS, LC-Ag+CIS/MS/MS, and GC-ESI/MS/MS for analysis of anabolic steroids in doping control / E. Cha, S. Kim, H.J. Kim, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7, N 11–12. – P. 1040–1049.
141. Andersen, D.W. Screening for anabolic steroids in urine of forensic cases using fully automated solid phase extraction and LC-MS-MS / D.W. Andersen, K. Linnet // *J. Anal. Toxicol.* – 2014. – Vol. 38, N 9. – P. 637–644.
142. Wozniak, B. LC-MS/MS fast analysis of androgenic steroids in urine / B. Wozniak, I. Matraszek-Zuchowska, J. Zmudzki // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 403, N 10. – P. 2965–2972.
143. Fabregat, A. Use of LC-MS/MS for the open detection of steroid metabolites conjugated with glucuronic acid / A. Fabregat, O. J Pozo, J. Marcos [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 85, N 10. – P. 5005–5014.

144. Badoud, F. Quantification of glucuronidated and sulfated steroids in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry / F. Badoud, E. Grata, J. Boccard [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400, N 2. – P. 503–516.
145. Matysik, S. Determination of steroid hormones in human plasma by GC-triple quadrupole MS / S. Matysik, G. Schmitz // *Steroids.* – 2015. – Vol. 99 N Pt B. – P. 151–154.
146. Forsdahl, G. Quantification of endogenous steroid sulfates and glucuronides in human urine after intramuscular administration of testosterone esters / G. Forsdahl, K. Zanitzer, D. Erceg [et al.] // *Steroids.* – 2020. – Vol. 157 – 108614.
147. McDonald, J.G. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases / J.G. McDonald, S. Matthew, R.J. Auchus // *Hormones and Cancer.* – 2011. – Vol. 2, N 6. – P. 324–332.
148. Gomez, C. A new sulphate metabolite as a long-term marker of metandienone misuse / C. Gomez, O.J. Pozo, L. Garrosta [et al.] // *Steroids.* – 2013. – Vol. 78. – P. 1245–1253.
149. Iannone, M. Development and application of analytical procedures for the GC–MS/MS analysis of the sulfates metabolites of anabolic androgenic steroids: The pivotal role of chemical hydrolysis / M. Iannone, F. Botre, D. Martinez-Brito [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2020. – Vol. 1155. – 122280.
150. Ayotte, C. Detecting the administration of endogenous anabolic androgenic steroids / C. Ayotte // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 195. – P. 77–98.
151. Tudela, E. Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry / E. Tudela, K. Deventer, L. Geldof [et al.] // *Drug Test Anal.* – 2015. – Vol. 7, N 2. – P. 95–108.
152. Deventer, K. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology / K. Deventer, O.J. Pozo, A.G Verstraete [et al.] // *Trends Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 55. – P. 1–13.

153. Alc'antara-Dur'an, J. Dilute-and-shoot coupled to nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for the determination of drugs of abuse and sport drugs in human urine / J. Alc'antara-Dur'an, D. Moreno-González, M. Beneito-Cambra [et al.] // *Talanta*. – 2018. – Vol. 182. – P. 218–224.

154. Kwok, W.H. Doping control analysis of 46 polar drugs in horse plasma and urine using a “dilute-and-shoot” ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach / W.H. Kwok, T. L S Choi, K. Y Kwok [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2016. – Vol. 1451. – P. 41–49.

155. Sniecinska-Cooper, A.M. Determination of urinary cortisol, cortisone and 6-sulfatoxymelatonin using dilute and shoot ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A.M. Sniecinska-Cooper, A. Jesang Shah, D. Dimitriou [et al.] // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed Life Sci.* – 2015. – Vol. 978–979. – P. 18–23.

156. Gosetti, F. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review / F. Gosetti, E. Mazzucco, M.C. Gennaro [et al.] // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed Life Sci.* – 2013. – Vol. 927. – P. 22–36.

157. Görgens, C. Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection high performance liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry / C. Görgens, S. Guddat, A. Thomas [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – Vol. 131. – P. 482–496.

158. Boccard, J. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling / J. Boccard, J.L. Veuthey, S. Rudaz // *J. Sep. Sci.* – 2010. – Vol. 33, N 3. – P. 290–304.

159. Olesti, E. From a single steroid to the steroidome: trends and analytical challenges / E. Olesti, J. Boccard, G. Visconti [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 206. – 105797.

160. Anizan, S. Targeted phase II metabolites profiling as new screening strategy to investigate natural steroid abuse in animal breeding / S. Anizan, D. Di Nardo, E. Bichon [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 700, N 1–2. – P. 105–113.
161. Boccard, J. A steroidomic approach for biomarkers discovery in doping control / J. Boccard, F. Badoud, E. Grata [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2011. – Vol. 213, N 1–3. – P. 85–94.
162. Maddox, S.W. Improved Identification of Isomeric Steroids Using the Paternò-Büchi Reaction with Ion Mobility-Mass Spectrometry / S. W. Maddox, S.S.H. Olsen, D.C. Velosa [et al.] // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2020. – Vol. 31, N 10. – P. 2086–2092.
163. Zhang, Q. Multifunctional isotopic standards based steroidomics strategy: exploration of cancer screening model / Q. Zhang, R. Liu, H. Xu [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – Vol. 1614. – 460723.
164. Wudy, S.A. The art of measuring steroids. Principles and practice of current hormonal steroid analysis / S.A. Wudy, G. Schuler, A. Sanchez-Guijo [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 179. – P. 88–103.
165. Ruth, A. Mass spectrometry: Future opportunities for profiling and imaging steroids and steroid metabolites / A. Ruth, N.Z.M. Homer // *Curr. Opinion Endocr. Metabol. Res.* – 2020. – Vol. 15. – P. 71–78.
166. Hansen, M. Determination of steroid hormones in blood by GC–MS/MS / M. Hansen, N.W. Jacobsen, F.K. Nielsen [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. – 400. – P. 3409–3417.
167. Lee, C. Selective LC-MRM/SIM-MS based profiling of adrenal steroids reveals metabolic signatures of 17 α -hydroxylase deficiency / C. Lee, J.H. Kim, S.J. Moon [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 198. – 105615.
168. Van Renterghem, P. Population based evaluation of a multi-parametric steroid profiling on administered endogenous steroids in single low dose / P. Van Renterghem, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke // *Steroids.* – 2010. – Vol. 75. – P. 1047–1057.

169. Luque-Cordoba, D. Fully automated method for quantitative determination of steroids in serum: An approach to evaluate steroidogenesis / D. Luque-Cordoba, F. Priego-Capote // *Talanta*. – 2021. – Vol. 224. – 121923.

170. Van Renterghem, P Validation of an ultra-sensitive detection method for steroid esters in plasma for doping analysis using positive chemical ionization GC-MS/MS / P. Van Renterghem, W. Viaene, W. Van Gansbeke [et al.] // *J. Chromatogr. B*. – 2020. – Vol. 1141. – 122026.

171. Olesti E. Steroid profile analysis by LC-HRMS in human seminal fluid / E. Olesti, A. Garcia, R. Rahban [et al.] // *J. Chromatogr. B*. – 2020. – Vol. 1136. – 121929.

172. Gomez-Gomez, A. Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry / A. Gomez-Gomez, J. Miranda, G. Feixas [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 197. – 105520.

173. Yuan, T.F. An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples / T.F. Yuan, J. Le, S.-T. Wang [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2020. – Vol. 61. – 580–586.

174. Poho, P. Analysis of steroids in urine by gas chromatography-capillary photoionization-tandem mass spectrometry / P. Poho, K. Scholz, N. Karkkainen [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2019. – Vol. 1598. – 175–182.

175. Ney, L.J. Simultaneous quantification of endocannabinoids, oleoylethanolamide and steroid hormones in human plasma and saliva / L.J. Ney, K.L. Felmingham, R. Bruno [et al.] // *J. Chromatogr. B*. – 2020. – Vol. 1152. – 122252.

176. Темердашев, А.З. Применение методов хромато-масс-спектрометрии в целях 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.

177. Подольский, И.И. Установление природы происхождения 19-норандростерона в моче методом изотопной хромато-масс-спектрометрии в целях допинг-контроля / И.И. Подольский, Т.Г. Соболевский, М.А. Дикунец // *Журн. аналит. химии*. – 2018. – Т. 73, №3. – С. 224–234.

178. Подольский, И.И. Применение методов статистического анализа данных для установления критериев деградации проб мочи в целях допингового контроля / И.И. Подольский, Е.С. Мочалова, А.З. Темердашев [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2021. – Т. 76. – №6. – С. 543–554.

179. Подольский, И.И. Хроматографическая оценка влияния остарина и экдистерона на стероидный профиль мужчин и женщин / И.И. Подольский, Е.С. Мочалова, А.З. Темердашев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. – Т. 20, № 4 – С. 445–453.