

На правах рукописи



Подольский Илья Игоревич

**Хроматомасс-спектрометрические методы определения «стероидного
профиля» спортсменов**

1.4.2 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Краснодар
2022

Работа выполнена в Национальной антидопинговой лаборатории (институте) МГУ им. М.В. Ломоносова и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Научный руководитель: **Темердашев Азамат Зауалевич**
доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Савельева Елена Игоревна** –
доктор химических наук, ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, зав. лабораторией аналитической токсикологии

Браун Аркадий Владимирович –
кандидат химических наук, ФГБУ «27 Научный центр Минобороны Российской Федерации», старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 7 июля 2022 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.2.320.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, ауд. 3030Л.

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

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

Общая характеристика работы

Актуальность работы. 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. Антидопинговые лаборатории определяют экзогенные стероиды и их метаболиты 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 сегодняшний день, не существует единой стандартизированной методики их определения, ВАДА регламентирует лишь требования, предъявляемые к применяющимся в лабораториях методикам, но не занимается созданием методического обеспечения. Представленные на сайте ВАДА единичные технические документы, содержащие описания процедур подготовки проб к анализу, являются частными разработками лабораторий, приведенными в качестве примера при определении отдельных показателей.

Известны различные подходы к качественному и количественному определению стероидных гормонов, совмещенных со скринингом ксенобиотиков как в варианте целевого, так и нецелевого скрининга, отвечающие требованиям высокой чувствительности анализа. Эволюционное развитие современного аналитического оборудования расширило возможности создания новых, более производительных и информативных подходов нецелевого скрининга с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения, особенно в сочетании с ионной подвижностью. С другой стороны, их развитие затруднено малой распространенностью подобного высокотехнологичного, дорогого и сложного в освоении оборудования, а его использование в рутинной практике довольно долгое время будет экономически нецелесообразно.

Постоянно растущие требования к точности и надежности представляемых результатов допинг-контроля, нереализованный полностью потенциал, применяющихся в рутинной практике коммерчески доступных приборов, делает актуальным создание новых, высокочувствительных, селективных методов анализа, которые позволят в один аналитический цикл решать не только вопросы качественного и количественного определения, но и оценивать возможность деградации исследуемого образца.

Диссертационное исследование выполнялось в рамках реализации проекта Госзадания Минобрнауки РФ № FZEN-2020-0022 с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

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

Для достижения поставленной цели решались 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;
- выявление и 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.

Хеометрическим 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, дугастерид, 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.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы обсуждены на: I Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2012 г.), XXI Симпозиуме по геохимии изотопов имени А.П. Виноградова (Москва, 2016 г.), VIII съезде ВМСО VII Всероссийской конференции «Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы» (Москва, 2017 г.), V Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2020 г.), MENDELEEV 2021, XII International Conference on Chemistry for Young Scientists. (Санкт-Петербург, 2021), VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2021).

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликованы 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в Web of Science и Scopus, а также 7 тезисах докладов в материалах научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 33 таблиц и 49 рисунков, состоит из введения, литературного обзора, 18 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы из 179 наименований.

Личный вклад автора состоял в выполнении экспериментальных и теоретических исследований по разработке хромато-масс-спектрометрических методик определения маркеров «стероидного профиля» спортсменов, обосновании и реализации методологии комплексного подхода целевого и нецелевого скрининга различных ксенобиотиков с использованием хроматографических методов, обработке данных, подготовке докладов и выступлениях на конференциях, практической апробации полученных результатов. Формулировка целей и задач исследования, интерпретация экспериментальных данных, систематизации результатов исследования и оформление публикаций выполнены совместно с научным руководителем.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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.

Реактивы и материалы. Для проведения экспериментальных исследований применяли стандартные образцы стероидных гормонов и других аналитов: 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), 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (99%, NMI, Австралия), форместан (98%, Toronto Research Chemical, Канада), дегидроэпиандростерон (99%, LGC Standards, Великобритания), 5 β -андростан-3 α ,17 β -дион (99%, Steraloids, США), d3-тестостерон (90%, NMI, Австралия), d3-эпитестостерон (94%, NMI, Австралия), d3-5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (98%, ArtMolecule, Франция), d5-эпиандростерон (90%, ArtMolecule, Франция), d5-андростерон глюкуронид (90%, ArtMolecule, Франция), метилтестостерон (99%, Toronto Research Chemical, Канада), карбокси финастерид (98%, Santa Cruz Biotechnology, США), пробенецид (99%, European Pharmacopeia, Франция), 6 β -гидрокси дугастерид (99%, Toronto Research Chemical, Канада), этил глюкуронид (98%, Toronto Research Chemical, Канада), мефрузид (99%, LGC Standards, Великобритания), ветапол «для хроматографии», (99.8%,

Merck, Германия), вода «для хроматографии» (Fisher Chemical, США), диэтиловый эфир, (99%, Fisher Chemical, США), ацетон (99.8%, Acros Organics, США), гептан (99%, Acros Organics, США), гексан (95%, Panreac США), ацетонитрил «для хроматографии» (99.9%, Merck, Германия), пиридин (99.9%, Sigma Aldrich, США), уксусный ангидрид (99%, Sigma Aldrich, США).

Дериватизацию проб проводили силилирующим агентом MSTFA в смеси с йодидом аммония и 1,4-дитио-DL-треитолом (ДТТ).

Научное оборудование. Исследования проводили с использованием приборного парка Национальной антидопинговой лаборатории МГУ им. М.В. Ломоносова и ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ», включающего: газовый хроматограф Thermo Trace-1310; газовый хромато-масс-спектрометр Thermo TSQ Quantum XLS с тройным квадрупольным масс-спектрометром; жидкостный хроматограф Dionex Ultimate-3000 с диодно-матричным детектором и коллектором фракций Dionex AFC-3000; автоматизированную систему измерения pH и плотности фирмы Mettler Toledo (США); плотномер DM 40; автоматическую систему промывки и подачи проб SC 30.

Интерпретацию масс-спектров проводили с использованием библиотек масс-спектров Nist'11, Nist'17, а также путем сопоставления параметров удерживания аналитов и стандартных веществ.

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

В обзоре литературы анализируется тенденция в области обнаружения и развития допинг-контроля анаболических стероидов. Основной акцент обзора уделен рассмотрению соединений, способных оказывать влияние на стероидный профиль. Приведены сведения о действующих популяционных границах содержания ряда стероидных гормонов в моче, возможных искажениях стероидного профиля, связанных с влиянием генотипа. Проведен анализ подходов, направленных на проведение стероидных исследований, установление факта деградации мочи. Обсуждены основные подходы определения стероидных гормонов в моче. Отмечена доминирующая роль масс-спектрометрии высокого разрешения для целей нецелевого скрининга, продемонстрирована распространенность методов тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения для проведения количественного определения отдельных групп соединений.

В экспериментальной части описаны объекты исследования, реактивы и материалы, основное и вспомогательное научное оборудование, методы и методики анализа. Приводятся результаты исследований, посвященные установлению природы происхождения 19-норандростерона в моче с использованием методов изотопной газовой

хромато-масс-спектрометрии с предварительным фракционированием, разработке и оптимизации методики определения стероидных гормонов в моче. Показана возможность уточнения популяционных границ содержания эндогенных стероидов в моче без увеличения числа ложноположительных результатов при прохождении допинг-контроля на примере более чем 10000 образцов. Приведены результаты хемометрического анализа полученных данных, оценено влияние остарина на стероидный профиль.

Хромато-масс-спектрометрическое определение «стероидного профиля» в моче

Для определения маркеров «стероидного профиля» в моче был выбран метод ГХ-МС/МС, поскольку удовлетворяет предъявляемым ВАДА к антидопинговым лабораториям требованиям по чувствительности, точности и воспроизводимости. Кроме того, в отличие от УВЭЖХ-МС/МС, данный метод менее подвержен матричным эффектам за счет большей эффективности разделения хроматографической системы и, как следствие, меньшему количеству коэлюирующихся соединений, а также отсутствию влияния состава подвижной фазы на эффективность ионизации и другие факторы, оказывающие влияние на выход ионизации. Для обеспечения экспрессности анализа метод также должен совместим с известной методикой определения 109 допинговых соединений, что позволит определять маркеры «стероидного профиля» и проводить скрининг в ходе одного анализа. Методом ГХ-МС/МС также оценивали качество проведения пробоподготовки (гидролиз, дериватизация) и степень микробиологической деградации мочи (5β -дион/Этио < 0.1).

Одной из самых важных задач исследования данной работы являлась разработка методики определения «стероидного профиля», учитывающего максимальное число факторов, влияющих на его точное определение.

С учетом специфики определяемых аналитов (высокие молекулярные массы дериватов и температуры их испарения) для проведения экспрессного хроматографического анализа мочи использовали колонку HP Ultra-1 (17 м×0.2 мм, 0.11 мкм) с 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 имело ТМС производное экистерона – 19.1 мин (включен в мониторинговый лист ВАДА в 2021 г.). 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 отвечали не только требованиям чувствительности определения, но и позволили увеличить межсервисный интервал, так как ионный источник и ионная оптика в этом случае менее подвержены загрязнению, обусловленным анализом силилированных производных

экстрактов мочи. На рис. 1 представлено изменение относительной площади внутреннего стандарта (метилтестостерона) к числу инъекций. Относительная площадь рассчитывали как среднее значение между 10 инъекциями.

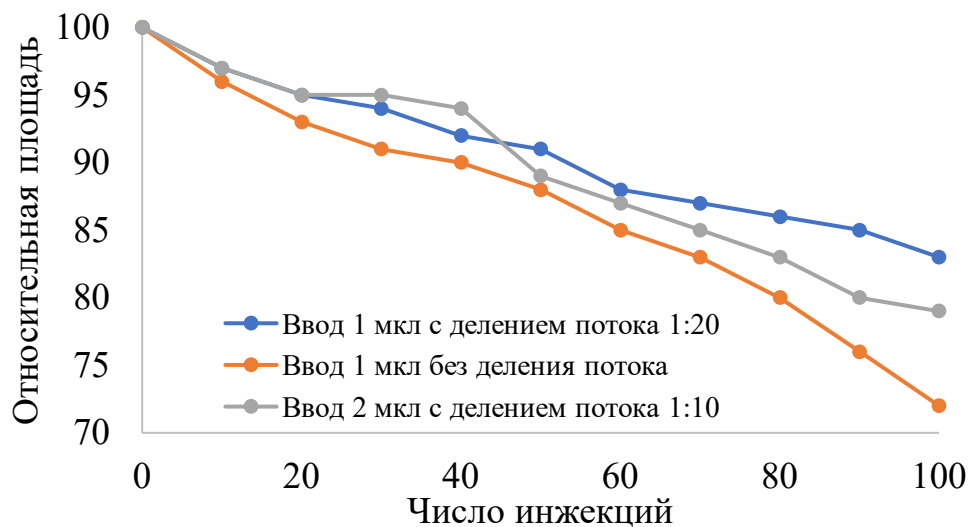


Рисунок 1 – Оценка влияния объема ввода и деления потока на изменение чувствительности при потоковом анализе

Основной особенностью тандемной масс-спектрометрии является режим мониторинга заданных реакций (МЗР), который имеет значительное 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 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 1.

Таблица 1 – 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 мТорр подбирали оптимальную энергию соударений, соответствующую исследуемым компонентам (рис. 2). Проведенный анализ условий детектирования позволил установить, что оптимальным значением является 1 мТорр, т.к. именно при этом давлении уровень вакуума сохраняется достаточно высоким, что позволяет избежать потерь в чувствительности, обеспечивая воспроизводимый высокий выход ионов-продуктов, формирующихся в процессе соударительной диссоциации.

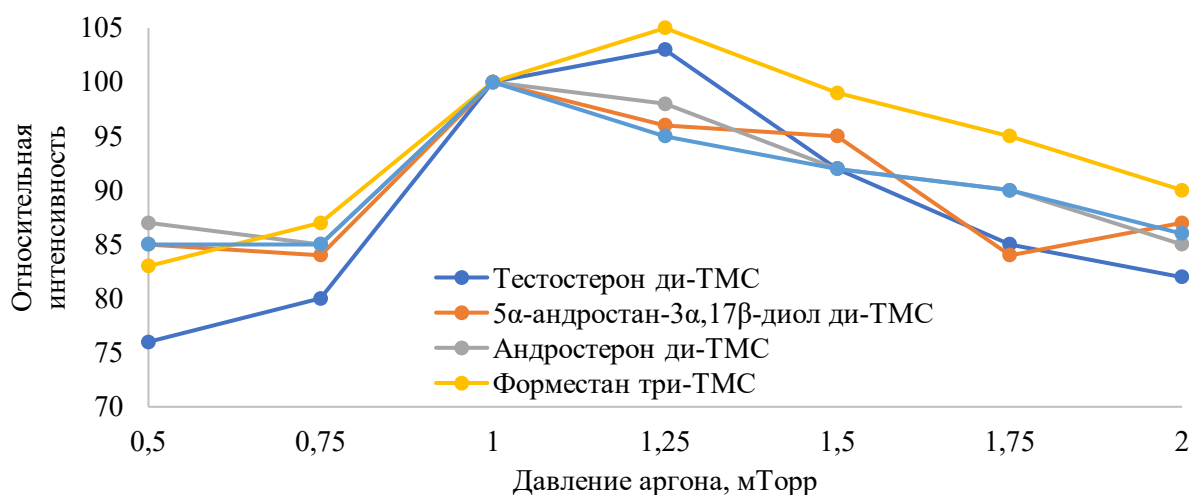


Рисунок 2 – Влияние давления аргона в ячейке соударений на интенсивность сигнала некоторых маркеров «стероидного профиля»

Масс-спектры электронной ионизации (ЭИ) тестостерона, являющегося одним из маркеров «стероидного профиля», а также полученные из иона-прекурсора масс-спектры приведены на рис. 3 и 4. Результаты проведенного исследования сведены в таблицу 2.

Переходы для дейтерированных стандартов выбирали по аналогии с их недейтерированными аналогами.

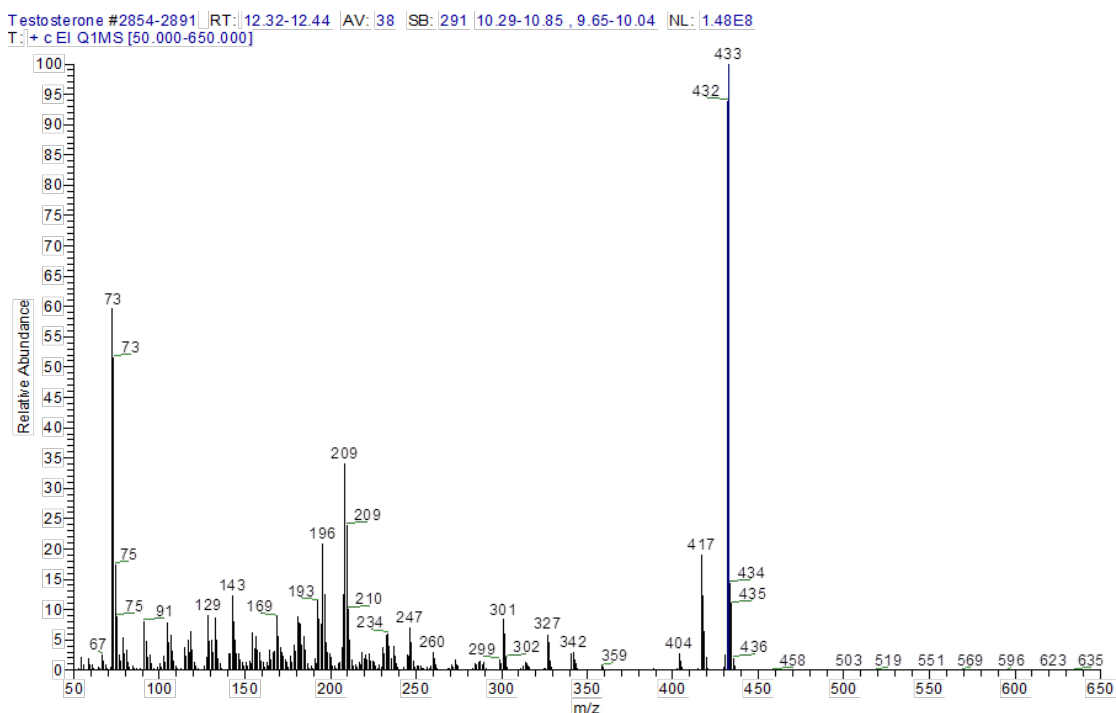


Рисунок 3 – Масс-спектр ЭИ ди-ТМС производного тестостерона по полному ионному току

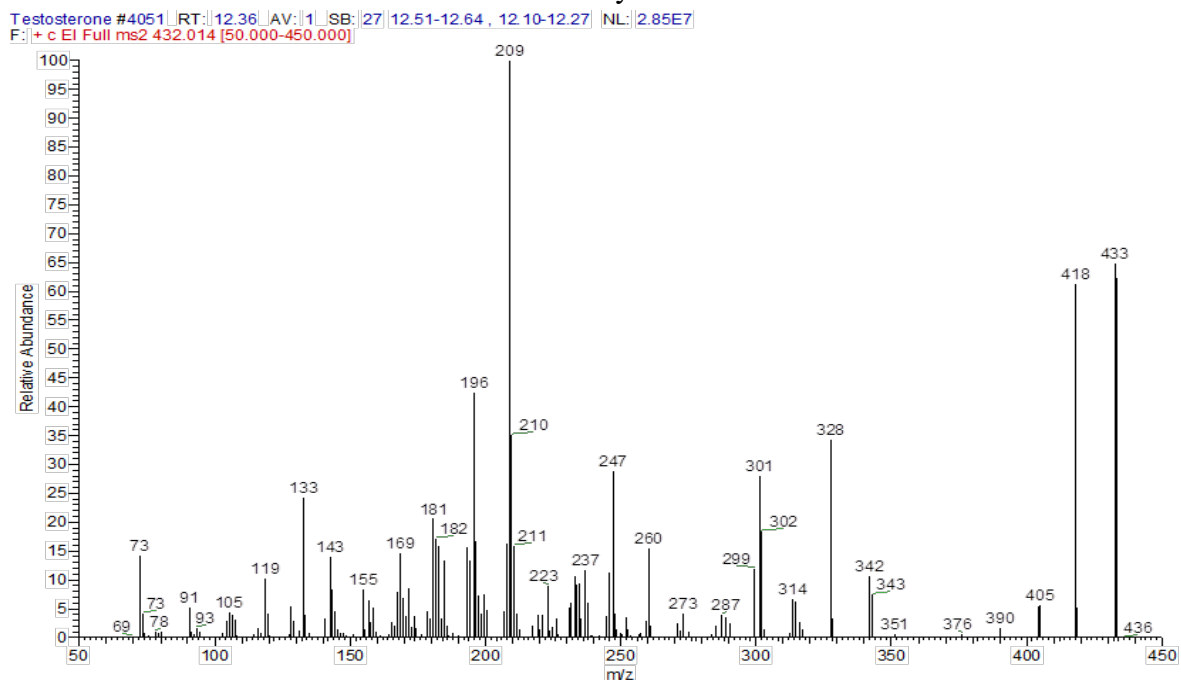


Рисунок 4 – Масс-спектр вторичных ионов, полученный из иона-прекурсора ди-ТМС производного тестостерона с массой 432 Да при энергии соударения 14 эВ

Таблица 2 – МЗР-переходы при ГХ-МС/МС (ЭИ) определении маркеров «стероидного профиля»

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	
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 -диол 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

Выбор матрицы для приготовления калибровочных растворов мочи

Приготовленные на матрице воды и метанола калибровочные растворы эндогенных стероидов имеют в большинстве случаев более высокие коэффициенты чувствительности, но при их использовании при проведении количественного определения маркеров «стероидного профиля» в моче появляются сложности из-за отсутствия таких матричных

эффектов, как подавление ионизации. Требуется подбор матрицы, которая максимально близка по составу на мочу, но при этом не содержала определяемых соединений. На данный момент эта проблема однозначно не решена и у каждой антидопинговой лаборатории есть свой подход к данной задаче.

Одним из таких подходов является схема по очистке мочи от стероидов в свободной форме экстракцией диэтиловым эфиром. На твердотельном нагревателе выпаривают остатки эфира, в полученную «свободную мочу» добавляют стероиды в известной концентрации. Однако, данный метод имеет ряд существенных недостатков. За счет того, что из мочи удалены стероиды только в нативном, а не конъюгированном виде, пробоподготовка такого образца проводится без гидролиза. В этом случае проба не проходит полного цикла пробоподготовки и поэтому результаты, полученные с помощью «свободной мочи», нельзя считать достоверными.

Во многих лабораториях используют детскую мочу. Известно, что детская моча не содержит стероидов, поэтому в нее можно искусственно добавить целевые соединения. Нами были использованы моча трехлетнего (МД1) и восьмилетнего (МД2) мальчика, а также 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 мочу МД2 не использовали. Исходя из этого, приготовление матрицы для калибровки проводили 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-х женщин и 2-х мужчин). После смешивания в мочу добавляли азид натрия 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 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 рис. 5.

Оценку точности и воспроизводимости результатов проводили сопоставлением данных холостого образца мочи с коммерчески доступным стандартом МХ005 (NMI,

Австралия), содержащим шесть основных стероидов, входящих в биологический паспорт. Градуировочную зависимость строили в концентрациях, приведенных в таблице 3.

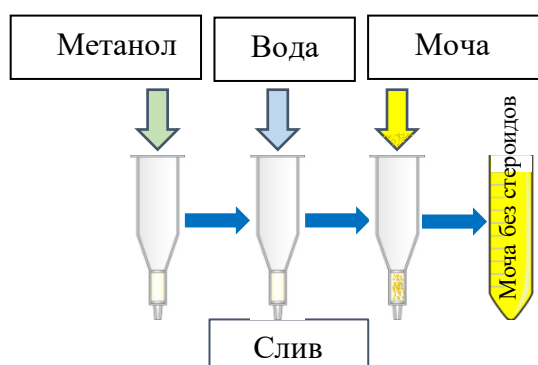


Рисунок 5 – Схема приготовления мочи, не содержащей стероидов

Таблица 3 – 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 4 – 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

Анализ данных таблицы 4 позволяет заключить, что самым близким к сертифицированному значению являются результаты, полученные калибровкой на матрице мочи, пропущенной через патрон твердофазной экстракции C₁₈. «Свободная моча» («СМ») также показала удовлетворительные результаты, но, учитывая описанные выше недостатки, уступает матрице 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.

Маркеры деградации мочи

Для поиска новых критериев деградации проб мочи проводили исследование с использованием 10680 образцов мочи (4262 женских и 6418 мужских). Объективная оценка процесса деградации образцов при отсутствии 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. Такими соединениями являются 5β -андростандион, тестостерон, андростерон и эпитестостерон, определение которых обязательно для описания «стероидного профиля» человека, а также форместан. Исходя из этого, сделать однозначный вывод о наличии корреляции между использованными показателями (вышеперечисленными соединениями) весьма затруднительно, однако можно предположить, что существует тренд, свидетельствующий о снижении концентраций 5α -диола и этиохоланолон в ходе деградации мочи. При детальном рассмотрении поддиапазона, соответствующего области, в которой лежит большая часть результатов анализа продеградировавших проб, выявить явные визуальные взаимосвязи не удалось, поэтому приняли 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 позволили бы оценить деградацию проб путем изучения процедуры деградации образцов мочи с сочетанием различных статистических параметров. Для выявления показателей, наиболее подверженных изменениям в процессе деградации, применили метод главных компонент (МГК). Факт деградации можно оценить с применением различных классификационных алгоритмов. Наиболее интересным представляется дискриминантный анализ, преимуществом которого является возможность «визуализации» эффективности разделения проб на группы посредством канонического анализа, который предусматривает 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.

На первоначальном этапе оценивали 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 применения показателей T , отношений T/E и

Андро/Т наблюдали бинормальное распределение. Для нормализации данных предприняли попытку 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 подвергался статистической обработке без предварительной нормализации.

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 5 α -андростан-3,17-дион; в 3 группу в мужской популяции вошло 1 соотношение 5 α -диол/Е, в женской – 5 α -диол/Е и Т/Е (таблица 5 и 6).

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 деградировавших проб; на 3 этапе строили модели, сочетающие в себе комбинацию как основных, так и остальных показателей.

Таблица 5 – 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
Этио	-0,84972	-0,11644	-0,22274	-0,18462
Т	-0,73621	-0,26605	-0,02506	0,339401
Е	-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
7 β -ОН-ДГЭА	-0,71109	0,203893	-0,0418	0,117745
Андро/Т	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 /Е	-0,16325	-0,22411	0,827473	-0,01981
рН	0,136145	-0,1268	0,348335	-0,44798
5 β -дион	-0,10406	-0,07351	0,356089	-0,46644
Т/Е	-0,0558	-0,62023	0,237106	0,570536

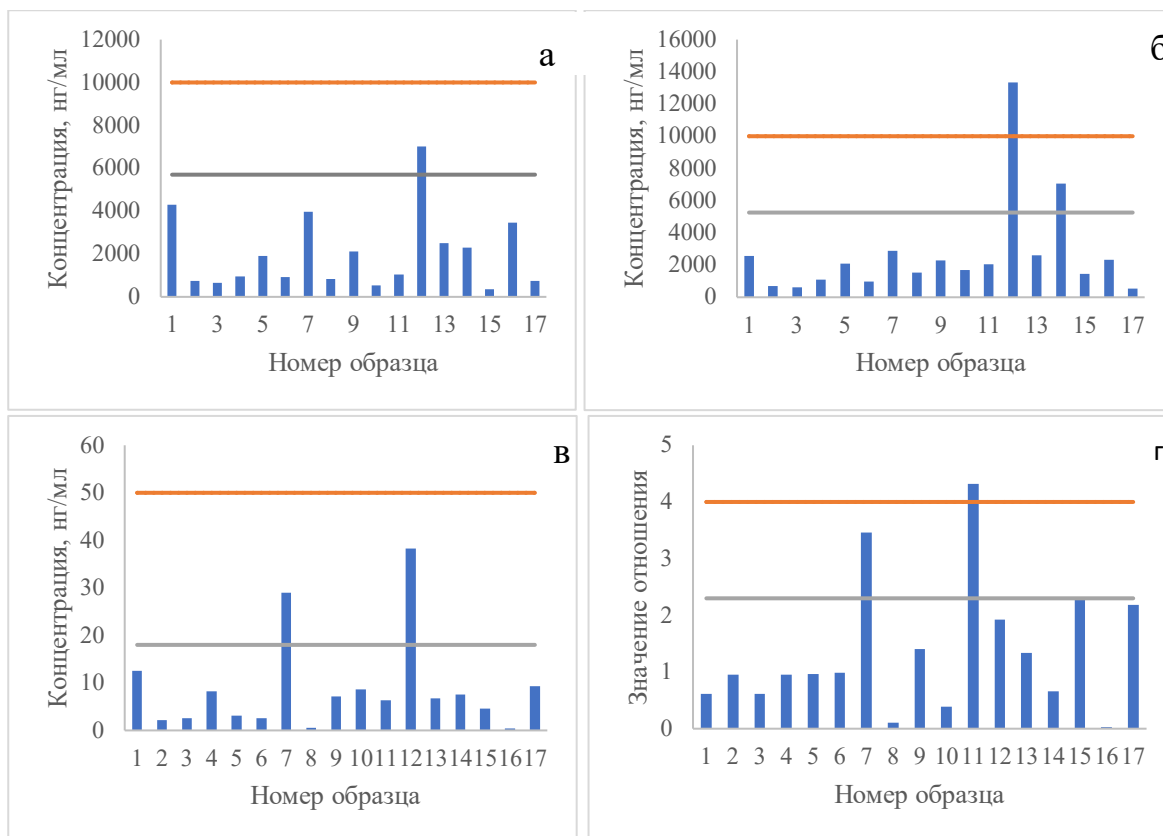
Таблица 6 – Корреляции исследуемых параметров с факторами для женщин

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
Т	0,77255	-0,30795	-0,06552	-0,11479
Е	0,66793	0,104432	0,466914	0,087107
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
7 β -ОН-ДГЭА	0,655278	0,32743	-0,05158	-0,09442
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

Влияние остарина на маркеры «стероидного профиля»

Влияние остарина на маркеры «стероидного профиля» исследовали на 30 образцах мочи (13 мужских и 17 женских). Для мужских образцов не прослеживались значимые изменения «стероидного профиля» относительно общей популяции, а в женской популяции (рисунки 6 и 7) в 52,9 % рассмотренных случаях превышен как минимум один из предложенных критериев.

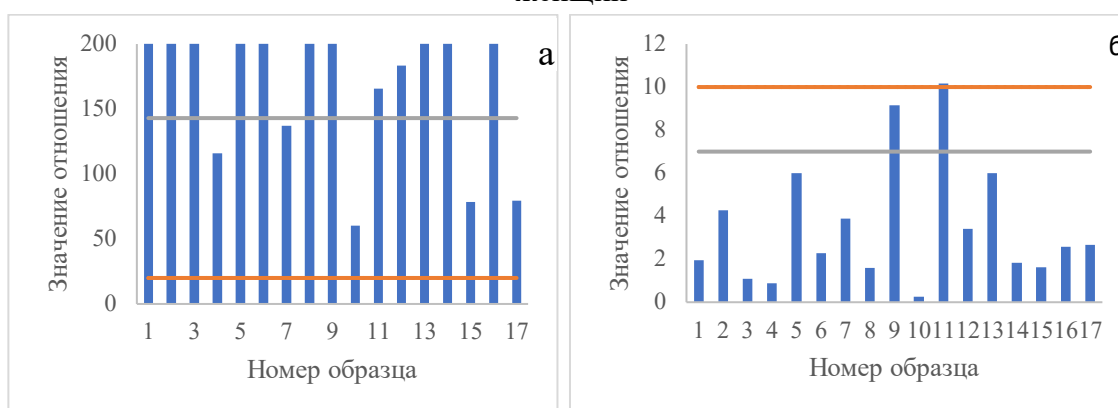
В таблицах 7 (женщины) и 8 (мужчины) приведены сравнения эффективности применения критериев ВАДА и предложенных критериев. В двух образцах мужской и девяти женской популяциях превышены предложенные критерии. Наиболее эффективным критерием для женской популяции является отношение андростерона к тестостерону (А/Т), его превышение наблюдали в 5 образцах.



— Допустимые пределы концентраций эндогенных стероидов и некоторых их отношений в соответствии с документами ВАДА

— Критерии, рассчитанные в работе

Рисунок 6 – Зависимости параметров «стероидного профиля» (а – андростерона, б – этиохолаanolона, в – тестостерона и г – Т/Е) от концентрации остарина в образцах мочи женщин



— Допустимые пределы концентраций эндогенных стероидов и некоторых их отношений в соответствии с документами ВАДА

— Критерии, рассчитанные в работе

Рисунок 7 – Зависимости параметров «стероидного профиля» (а – Андро/Т, б – 5 α -диол/Е) от концентрации остарина в образцах мочи женщин

Таблица 7 – Эффективность применения критериев ВАДА и предложенных критериев для косвенного определения остарина у женщин

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 8 – Эффективность применения критериев ВАДА и предложенных критериев для косвенного определения остарина у мужчин

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

Установление природы происхождения 19-норандростерона

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием стабильных изотопов оценивали возможность установления природы происхождения 19-норандростерона. Данный подход, как правило, используется для установления эндогенной или экзогенной природы происхождения стероидных гормонов. Для решения задачи установления природы происхождения 19-норандростерона этим методом требуется предварительное концентрирование аналита с использованием преапаративной ВЭЖХ.

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 по формуле:

$$V_{urine} = \frac{V_{FR} \times m}{C_{urine} \times V_{injection} \times k},$$

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).

В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (В), колонку термостатировали при 40 °С, постоянная скорость потока составляла 1 мл/мин. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 9. Хроматограммы с результатом фракционирования стандартного образца стероидов, содержащего все определяемые соединения и реального образца мочи, приведены на рис. 8.

Таблица 9 – 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

Для определения 19-норандростерона собирали фракцию 9.5–10.4 мин (рис. 8), а также фракции, содержащие андростерон и этиохоланолон (10.5–11.5 мин) и прегнандиол (12.4–13.4 мин).

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.

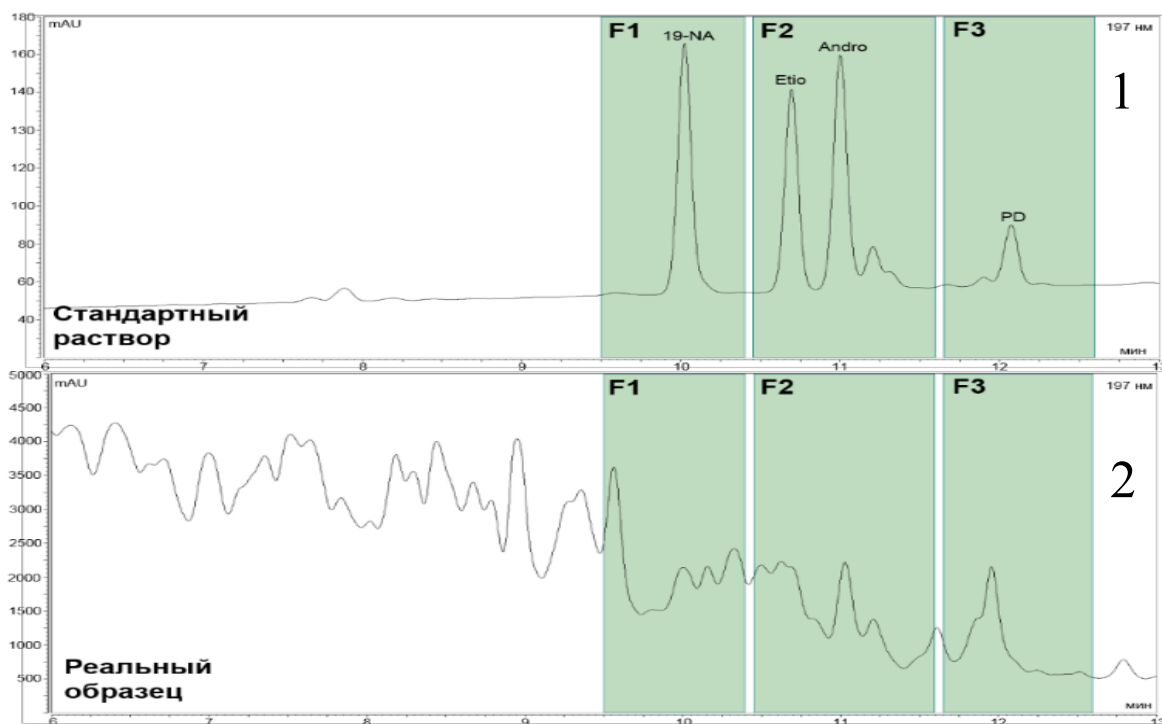


Рисунок 8 – Хроматограммы первичного ВЭЖХ-фракционирования стандартного раствора стероидов (1) и реального образца мочи (2)

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.

В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (В), колонку термостатировали при 40°C. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 10. Хроматограмма фракционирования стандартного образца ацетата 19-норандростерона и реального образца мочи приведена на рис. 9.

Для модификации хроматографического поведения 19-норандростерона в условиях ВЭЖХ и улучшения хроматографических характеристик стероидов с последующим ГХ-МС/ГХ-С-ИМС определением, 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 в твердотельном нагревателе в течение 120–140 мин, 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, 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 с.

Таблица 10 – 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

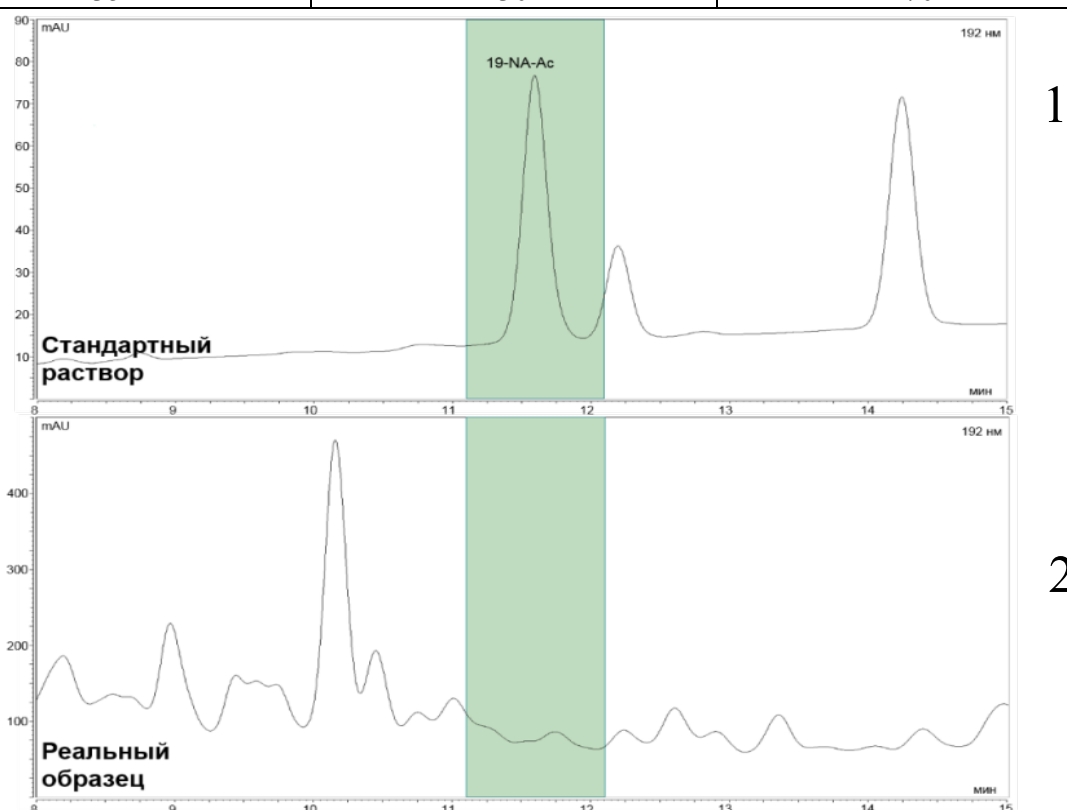


Рисунок 9 – Хроматограмма вторичного ВЭЖХ-фракционирования стандартного раствора 19-норандростерон ацетата (1) и реального образца мочи (2)

ВЫВОДЫ

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 экидистерона на количественные изменения маркеров «стероидного профиля». Показано, что остарин в большей степени влияет на изменение маркеров «стероидного профиля» женской популяции, чем мужской. Применение экидистерона 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Темердашев, А.З. Применение методов хромато-масс-спектрометрии в целях контроля спортивного питания и препаратов, реализуемых через интернет / А.З. Темердашев, А.А. Азарян, А.В. Лабутин, М.А. Дикунец, И.О. Зверева, И.И. Подольский, Г.Т. Беродзе, И.А. Балабаев // Журнал аналитической химии. – 2017. – Т. 72. – № 11. – С. 1032–1043.

2. 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 // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73. – № 3. – С. 224–234.

3. Подольский, И.И. Хроматографическая оценка влияния остарина и экидистерона 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.

4. 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 // Журнал аналитической химии. – 2021. – Т. 76. – № 6. – С. 543–554.

5. Temerdashev, A.Z. Analytics for steroid hormone profiling in body fluids / A.Z. Temerdashev, E.V. Dmitrieva, I.I. Podolskiy // Microchem. J. – 2021. – V. 168. – 106395.

6. Подольский, И.И. Определение метаболитов нандролона методом тандемной хромато масс-спектрометрии (тезисы докладов) / И.И. Подольский, Т.Г. Соболевский, Е.А. Кочнова, Г.М. Родченков // Материалы I Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием, г. Краснодар, 2012, с. 180.

7. Подольский, И.И. Установление природы происхождения 19-норандростерона в моче в целях допинг-контроля методом изотопной хромато-масс-спектрометрии / И.И. Подольский, М.А. Дикунец // Материалы XXI Симпозиума по геохимии изотопов имени А.П. Виноградова, г. Москва, 2016, с. 378.

8. Подольский, И.И. Определение “стероидного профиля” методом тандемной хромато масс-спектрометрии / И.И. Подольский, Д.В. Раков // Материалы VII Всероссийской конференции «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», г. Москва, 2017, с. 58.

9. Подольский, И.И. Хроматографическая оценка влияния остарина и экдистерона на стероидный профиль мужчин и женщин / И.И. Подольский, Е.С. Мочалова, М.О. Зорина, Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян // Материалы V Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием, г. Краснодар, 2020, с. 102.

10. Podolskiy, I.I. Influence of ostarine and ecdysterone usage on male and female steroid profile / I.I. Podolskiy, E.S. Mochalova, A.Z. Temerdashev // MENDELEEV 2021. Book of abstracts XII International Conference on Chemistry for Young Scientists, Saint Petersburg, 2021, p. 112.

11. Подольский, И.И. Идентификация новых метаболитов биметила в моче с использованием ВЭЖХ-МСВР / И.И. Подольский, М.В. Овчаров, Д.А. Бурмыкин, А.З. Темердашев // Материалы VI Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», г. Краснодар, 2021, с. 127.

12. Темердашев, А.З. Идентификация метаболитов дапрудустата с использованием ВЭЖХ-МСВР / А.З. Темердашев, М.О. Зорина, И.И. Подольский, Д.А. Бурмыкин // Материалы VI Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», г. Краснодар, 2021, с.134.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам НАДЛ МГУ им. М.В. Ломоносова (ранее ФГУП «Антидопинговый центр») за оказанную помощь, содействие и плодотворную совместную работу.

Подписано в печать 29.04.2022. Формат 60x84 1/16

Печать трафаретная. Бумага тип. № 1.

Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ №4854.1

350040 г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149.

Центр “Универсервис”, тел. 219-95-51