

УДК 544. 543

У.Б. Шорабекова<sup>1</sup>, \*К.А. Балгимбекова<sup>2</sup>, А.М. Шалдыбаева<sup>1</sup>, Т.Д. Талбаев<sup>2</sup><sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы<sup>2</sup>Антидопинговая лаборатория спортсменов, Казахстан, г. Алматы

\*E-mail: ulmes.0101@mail.ru

**Подтверждение метаболита метандиенона 17 $\beta$ -метил-5 $\beta$ -андрост-1-ен-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -диола в моче методом газовой хроматографии с тройным квадрупольным масс-селективным детектором (гх/мс/мс)**

В данной статье предложена схема пробоподготовки, состоящая из очистки биоматериала от органических и неорганических веществ, гидролиза с  $\beta$ -глюкуронидазой, экстракции н-пентаном, дериватизации. В работе использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 7890A с автосамплером 7693 и масс-селективным детектором Triple Quad 7000. Методом ГХ/МС/МС получили соответствующие хроматограммы 17 $\beta$ -метил-5 $\beta$ -андрост-1-ен-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -диола - эпиметендиола. На хроматограммах пробы видны четко выраженные пики с временем удерживания 11,29 мин. Данный метод позволяет подтвердить наличие эпиметендиола в моче содержанием 1-2 нг/мл.

**Ключевые слова:** анаболическое вещество, эпиметендиол, моча, газовая хроматография, допинг.

U.B.Shorabekova, K.A. Balgimbekova, A.M. Shaldybaeva, T.D. Talbaev

**Confirmation of 17 $\beta$ -methyl-5 $\beta$ -androst-1-ene-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -diol metabolite of methandienone in urine by triple quadrupole mass-selective detector gas chromatography (gc/ms/ms) methods**

This article shows the sample preparation used in the analysis, consisting of cleaning of the urine from organic and inorganic chemicals, hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase, extraction with n-pentane and derivatization. Following equipment was used during the performance of this work: a gas chromatograph Agilent Technologies 7890A GC System with 7693 Autosampler and mass selective detector Triple Quad 7000 GC/MS. GC/MS/MS chromatograms of epimetendiol obtained by this method were found to be appropriate. It is shown that the retention time and peak of epimetendiol is 11.29 minute. This method allows confirming epimetendiol's urinary concentration of 1-2 ng/ml.

**Keywords:** anabolic substances, epimetendiol, urine, gas chromatography, doping.

У.Б. Шорабекова, К.А. Балгимбекова, А.М. Шалдыбаева, Т.Д. Талбаев

**Үш квадрупольді масс-селективті детекторлы газды хроматография (гх/мс/мс) әдісімен зәрден метандиенонның 17 $\beta$ -метил-5 $\beta$ -андрост-1-ен-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -диол метаболитін растау**

Бұл мақалада зәрді органикалық және бейорганикалық заттардан тазарту,  $\beta$ -глюкуронидазамен гидролиздеу, н-пентанмен экстракциялау, дериватизациядан тұратын сынамалық дайындау схемасы келтірілген. Жұмыста газды хроматограф Agilent Technologies 7890A пен 7693 автосамплер және масс-селективті детектор Triple Quad 7000 қолданылды. ГХ/МС/МС әдісімен 17 $\beta$ -метил-5 $\beta$ -андрост-1-ен-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -диола - эпиметендиолға сәйкес хроматограммалар алынды. Эпиметендиолдың шығу уақыты 11,29 минутты құрайтындығы көрсетілген. Хроматограммаларда үлгінің ұсталу уақыты мен пиктары анық көрсетілген. Бұл әдіспен зәрдегі эпиметендиолды 1-2 нг/мл концентрацияда растауға болады.

**Түйін сөздер:** анаболикалық зат, эпиметендиол, зәр, газды хроматография, допинг.

**Введение**

Метандиенон (17 $\beta$ -гидрокси-17 $\alpha$ -метиландрост-1,4-диен-3-он) относится к группе анаболических стероидов, запрещенных к применению в спорте Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) [1]. Соединения данного

класса служат для увеличения мышечной массы, показателей силы и выносливости спортсменов и являются наиболее часто используемыми запрещенными препаратами в спорте.

В организме человека большинство стероидов в значительной мере метаболизируются, поэтому исходные соединения определяются в течение

короткого промежутка времени после приема. Следовательно, для успешного детектирования в большинстве случаев необходим анализ специфических метаболитов и маркеров, которые позволяют подтвердить прием стероидов в течение длительного срока после их употребления.

Метандиенон впервые синтезирован в 1955 году, затем было показано, что он обладает сильной

анаболической активностью. Впервые появился в продаже в 1958 году в США, в виде таблеток по 5 мг, под торговым названием «Дианабол» [2].

Основным метаболитом метандиенона является эпиметендиол. Химическое название эпиметендиола – 17b-метил-5b-андрост-1-ен-3a,17a-диол [3], химическая брутто формула –  $C_{21}H_{34}O_2$ , а структурная формула приведена на рисунке 1.

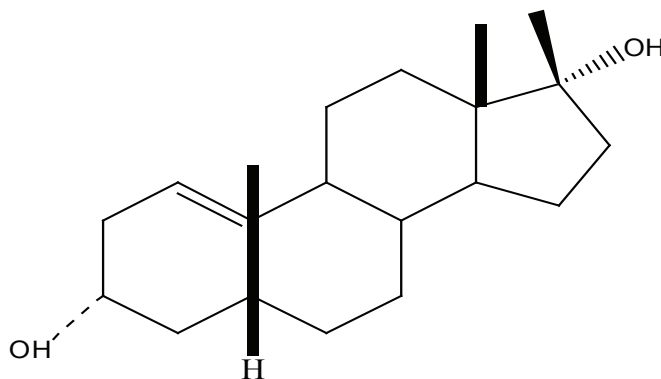


Рисунок 1 – Структурная формула эпиметендиола [4]

Наиболее широко используемым для обнаружения и подтверждения присутствия анаболических стероидов в моче является метод газовой хроматографии/масс спектрометрии, в котором стероиды анализируются в виде триметилсилилированных производных [2]. Однако, анализ следовых количеств данных соединений усложняется присутствием значительного фона эндогенных стероидов в матрице и как следствие высоким уровнем шума.

Эпиметендиол в биологических пробах может быть обнаружен в концентрациях от 10 нг/мл методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС). В соответствии с требованием ВАДА минимальный предел обнаружения эпиметендиола составляет 2 нг/мл [5]. Поэтому целью данной работы была разработка методики определения эпиметендиола в моче методом газовой хроматографии с тройным квадрупольным масс-селективным детектором (ГХ/МС/МС) на уровне концентрации 1-2 нг/мл.

### Экспериментальная часть

#### Оборудование

Для первичного анализа образцов мочи был использован газовый хроматограф Agilent 6890 N

с квадрупольным масс-спектрометром 5973 *inert MS*. Хроматограф оснащен колонкой HP-ULTRA 1, 0,11 мкм, длина ~ 17,5 м, внутренний диаметр 0,20 мм. Газ-носитель – гелий, с делением потока 1:15,8, скорость потока 0,5 мл/мин, температура инжектора 300°C; температура интерфейса 300°C; температурная программа термостата колонки: 186°C, 2,95°C/мин до 235°C, 44°C/мин до 310°C (2,2 мин). Масс-хроматограммы записывались в режиме полного сканирования в диапазоне 50-700 m/z и в режиме сканирования выбранных ионов (SIM) с ионизацией электронным ударом с энергией 70 эВ, температура ионного источника составляла 230°C.

Для подтверждения обнаруженного в моче эпиметендиола был использован газовый хроматограф с тройным квадрупольным масс-селективным детектором (ГХ/МС/МС) (Agilent). Параметры хроматографа: колонка HP-ULTRA 1, 0,11 мкм, длина ~ 21 м, внутренний диаметр 0,20 мм. Газ-носитель – гелий, с делением потока 1:15,8, скорость потока 1,74 мл/мин, температура инжектора 300°C; температура интерфейса 300°C; температурная программа термостата колонки: 140°C, 40°C/мин до 180°C, 3°C/мин до 240°C (2,20 мин), 27,7°C/мин до 310°C (3 мин). Масс-хроматограммы

записывались в режиме мониторинг множественных реакций (MRM) с ионизацией электронным ударом с энергией 70 эВ, температура ионного источника составляла 230°C.

#### *Реагенты, стандартные образцы и расходные материалы*

Этиловый спирт, динатрия гидрофосфат (х.ч.) и натрия дигидрофосфат (х.ч.) (Россия),  $\beta$ -глюкуронидаза от E.coli K12, Roche Diagnostics (Германия), деионизированная вода для приготовления растворов чистоты MilliQ, калия карбонат безводный (ч.) (Россия), калия бикарбонат (ч.), Riedel-de-Haën (Германия), н-пентан 99,7% (чистота для спектрофотометрии) Sigma-Aldrich (США), N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) Fluka (Швейцария), этантиол (97%) Aldrich (Германия), аммония йодид (99+%, A.C.S. reagent) Sigma-Aldrich (США), гелий 99,995% ООО «Айсблик» (Украина). Метаболит метандиенона: 17 $\beta$ -метил-5 $\beta$ -андрост-1-ене-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -диол, Cerilliant NMI (Австралия). Полисорб-10 (поперечно сшитый нейтральный полистирол-дивинилбензол), 0,1-0,25 мм, сорбент для твердо-фазной экстракции, фирма АНО «Синтез полимерных сорбентов», рН-индикаторные полоски Neutralit<sup>0</sup> рН 5,0-10, Merck KGaA (Германия).

#### *Биопробы*

Для проведения исследований были отобраны 10 образцов мочи не содержащих эпиметендиола. В исследуемые образцы мочи были введены стандартные растворы эпиметендиола в концентрациях 1, 2 и 4 нг/мл.

#### *Пробоподготовка проб для определения эпиметендиола*

К 2 мл мочи добавляли 10 мкл внутреннего стандарта 17 $\alpha$ -метилтестостерона (100 нг/мкл), 750 мкл фосфатного буфера (рН=6,8-7,0) и 25 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы. Гидролиз проводили в течение 60 минут при 50°C. После окончания гидролиза добавляли 300 мкл 20% раствора смеси калия карбоната и калия бикарбоната в соотношении 1:1 (рН=9,0-9,5). Продукты гидролиза экстрагировали 5 мл трет-бутилметилового эфира встряхиванием на шейкере в течение 5 мин и центрифугированием в течение 5 мин при обороте 2000 об./мин, затем отделяли эфирный слой и выпаривали досуха на ротаторном испарителе с вакуумом при температуре 50°C. К охлажденно-

му сухому остатку добавляли 100 мкл дериватирующего агента (MSTFA/аммония йодид/этантiol в соотношении 1000: 2:3 об/м/об). Затем образцы выдерживали при температуре 60°C в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и переносили в вials (Agilent Technologies, США, объем - 1,5 мл) с микровставками (Agilent Technologies, США, объем - 250 мкл) для газовой хроматографии [3,4].

#### **Результаты и их обсуждение**

Методика ГХ/МС/МС определения эпиметендиола включает нескольких стадий пробоподготовки, основными из них являются: очистка мочи и экстракция н-пентаном.

Для очистки мочи от органических и неорганических соединений использовался полистирольный сорбент «Полисорб-10». В пипетку Пастера длиной 150 мм помещали стеклянный шарик диаметром 2 мм и суспензию «Полисорб-10» до образования слоя сорбента высотой около 2 см. Сорбент активировали 2 мл этиловым спиртом и промывали 2 мл воды. Через пипетку Пастера пропускали 2 мл мочи, содержащую стандартные растворы эпиметендиола в концентрациях 1, 2, и 4 нг/мл и 10 мкл внутреннего стандарта 17 $\alpha$ -метилтестостерона (100 нг/мкл). Затем промывали 2 мл воды и элюировали 2 мл этанола. Элюат выпаривали на ротаторном испарителе с вакуумом Heidolph (Германия) при температуре 50°C.

Ферментативный гидролиз в анализе анаболических стероидов используется для расщипления конъюгатов и стероидов. Ферментами в этих реакциях служит  $\beta$ -глюкуронидаза. Известно, что значение рН для оптимального ферментативного гидролиза анаболических стероидов - 7,0. В образцы мочи добавляли 750 мкл 0,8 М фосфатного буфера с рН 7,0 и 25 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы от E.coli K12, перемешивали на вихревом шейкере GFL 3025 (Германия) и проводили гидролиз с использованием твердотельного термостата Grant (Германия) при температуре 50°C в течение 60 мин.

Для экстракции пробы охлаждали до комнатной температуры. Затем добавляли 300 мкл 20% раствора смеси калия карбоната и калия бикарбоната в соотношении 1:1 до рН=9,5 (в данной среде процесс экстракции протекает наиболее оптимально) и экстрагировали с 5 мл н-пентана при перемешивании в течение 5 минут. Полученную смесь центрифугировали Hermlez 513

(Германия) со скоростью 2000 об/мин в течение 5 мин и отделяли органический слой.

Процесс дериватизации в газовой хроматографии обеспечивает перевод нелетучих соединений в более летучие. Для получения летучих триметилсилильных производных (TMS-производных) использовали дериватирующий агент MSTFA. Отделенную органическую фазу после экстракции выпаривали на ротационном испарителе с вакуумом при температуре 50°C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл смеси MSTFA/аммония йодид/этантриол в соотношении 1000 : 2 : 3, об/м/об), дериватизировали при температуре 60°C в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и переносили в вials (Agilent Technologies, США, объем - 1,5 мл) с микровставками (Agilent Technologies, США, объем - 250 мкл) для газовой хроматографии.

Для определения эпиметендиола в образцах мочи были записаны хроматограммы эпиметендиолсодержащей и бланковой мочи методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии в режиме полного сканирования и в режиме детектирования выбранных ионов (SIM), характерные ионы ( $m/z$  358,00; 216,00; 448,00).

Хроматограммы эпиметендиолсодержащей и бланковой мочи приводятся на рисунке 2. Как видно из представленных рисунков, по сравнению с бланковой мочой, имеющей пики, обусловленные присутствием значительного фона

эндогенных стероидов в матрице, эпиметендиол имеет более интенсивные пики. Метод ГХ/МС не обладает высокой чувствительностью, о чем свидетельствует присутствие мешающих пиков в окне времени удерживания 5% от времени удерживания аналита с соотношением сигнал/шум более 3:1.

Для подтверждения обнаруженного в моче эпиметендиола был использован метод ГХ/МС/МС, в котором детектируются пары: «родительский-дочерний ион». В масс-анализатор из источника поступает смесь ионов, возможно от разных соединений, из которого первый квадруполь, настроенный в режим фильтрации, выбирает «родительские» ионы с  $m/z=358,5$  и  $216,1$  (таблица 1). Ионы с  $m/z=358,5$  и  $216,1$  поступают в гексапольную ячейку столкновений, где происходит фрагментация родительских ионов за счет соударений с нейтральными атомами гелия под воздействием дополнительной энергии сообщаемой гексаполем. В результате фрагментации «родительских» ионов образуются специфичные «дочерние» ионы с характеристическими значениями  $m/z$ .

Для подтверждения эпиметендиола можно использовать три параметра: характеристические значения  $m/z$ :  $216,1 > 201,2$ ;  $216,1 > 187,2$ ;  $358,3 > 301,0$ , время удерживания и соотношение ионов, которое остается стабильным при различных концентрациях.

**Таблица 1** – Параметры MRM-метода для анализа ГХ/МС/МС

Аналит	Родительские ионы ( $m/z$ )	Энергия столкновения для каждого иона (V)	Дочерние ионы ( $m/z$ )	Время накопления сигнала (мс)	Предел обнаружения (нг/мл)
Эпиметендиол	358,5	10	301	40	1 нг/мл
	216,1	15	201,2		
	216,1	15	187,2		

Для оценки селективности и специфичности выбранных характеристических ионов получены хроматограммы бланкового образца мочи и образца мочи, содержащей эпиметендиол с концентрацией 2 нг/мл (рисунки 3 и 4).

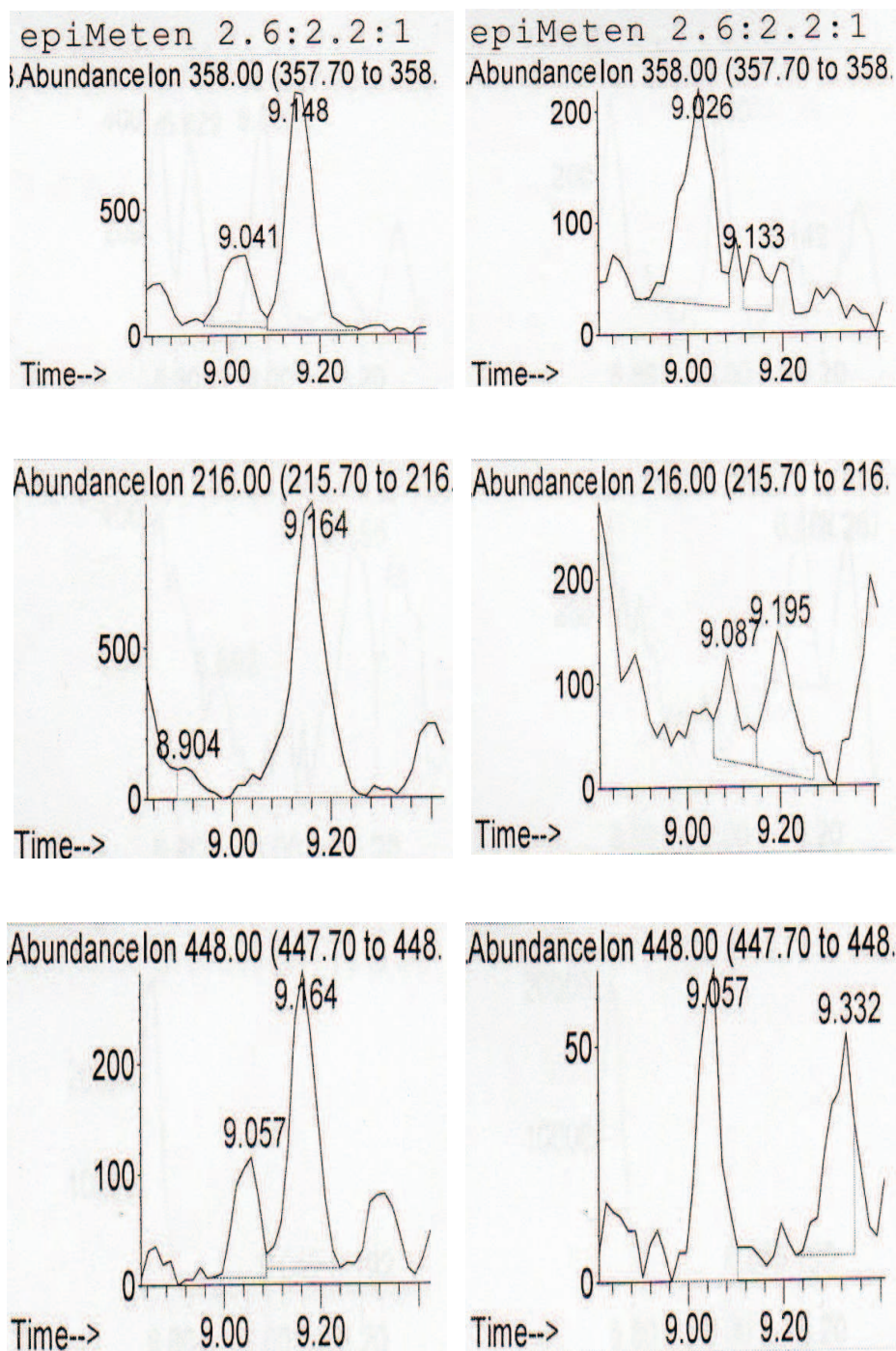
На рисунке 3а приведены хроматограммы стандартного вещества эпиметендиола (2 нг/мл) после дериватизации. На рисунке 3б приведены хроматограммы мочи с эпиметендиолом так же

с концентрацией 2 нг/мл. В отличие от ГХ/МС пики, обусловленные присутствием эндогенных стероидов в моче на данных хроматограммах отсутствуют. На хроматограмме образца эпиметендиолсодержащей мочи видны четко выраженные пики с временем удерживания 11,29 мин, отсутствующие на хроматограмме бланковой мочи (Рисунок 4). Соотношение сигнал:шум для пика эпиметендиола составляет 3:1.



Таким образом, нами было установлено, что метод ГХ/МС/МС при использовании усовершенствованной методики пробоподготовки, по-

зволяет подтвердить наличие эпиметендиола (метаболит метандиенона) в моче на уровне концентрации 1-2 нг/мл.



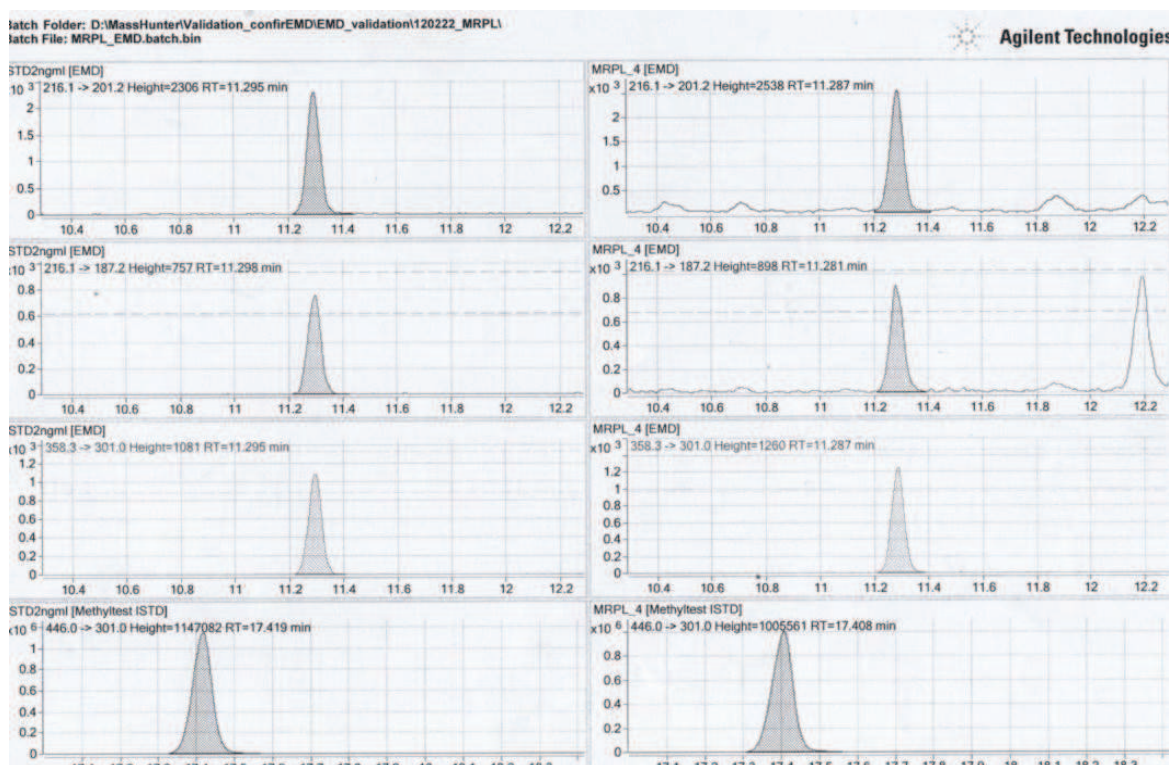
а

а) Образцы мочи с эпиметендиолом

б

б) Бланковая моча

**Рисунке 2** – Хроматограммы мочи с эпиметендиолом и без эпиметендиолом (ГХ/МС) для значений m/z 358,00; 216,00; 448,00

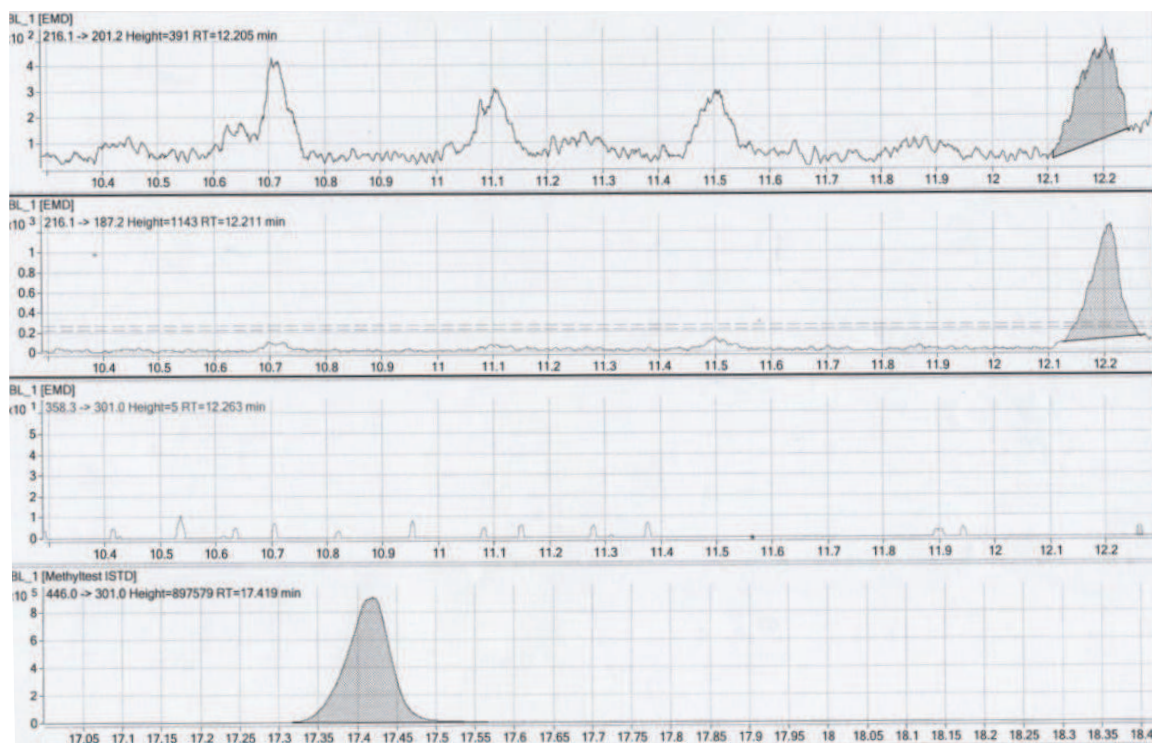


а

б

а) хроматограмма стандартного образца эпиметендиола;

б) хроматограмма образца мочи, содержащей эпиметендиол в концентрации 2 нг/мл;

**Рисунок 3** – Хроматограммы мочи с эпиметендиолом и стандартного образца эпиметендиола (ГХ/МС/МС)**Рисунок 4** – Хроматограмма образца мочи без эпиметендиола (ГХ/МС/МС)

## Заключение

Газовая хроматография с тройным квадрупольным масс-селективным детектором (ГХ/МС/МС) при использовании усовершенствованной методики пробоподготовки позволяет существенно улучшить селективность и чувствительность анализа эпиметендиола в моче по сравнению с методом ГХ/МС.

Для подтверждения анаболического стероида эпиметендиола в биологической пробе важное значение имеет процесс пробоподготовки, который должен обеспечивать очистку мочи от органических и неорганических соединений. Для этого в методику пробоподготовки мочи были введены стадии очистки мочи ее пропусканием через адсорбент «Полисорб-10» и экстракция эпиметендиола н-пентаном.

Для обеспечения требуемой чувствительности методики необходимо использовать метод ГХ/МС/МС. Оптимальными хроматографическими параметрами определения эпиметендиола были выбраны: температура инжектора 300 $^{\circ}$ C; температура интерфейса 300 $^{\circ}$ C; температурная программа термостата колонки: 140 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C/мин до 180 $^{\circ}$ C, 3 $^{\circ}$ C/мин до 240 $^{\circ}$ C (2,20 мин), 27,7 $^{\circ}$ C/мин до 310 $^{\circ}$ C (3 мин), масс-спектрометрическое детектирование в режиме мониторинг множественных реакций (MRM), детектирование пар ионов  $m/z$  216,1>201,2; 216,1>187,2; 358,3>301,0. Разработанная методика позволяет обнаружить данный метаболит метандиенона в моче на уровне концентрации 1-2 нг/мл.

Данная методика может быть рекомендована для использования в антидопинговых и исследовательских лабораториях.

## Литература

- 1 Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids // *Clinical Chemistry*. – 1996. – Vol.1020, № 3. – P. 1012-1013.
- 2 Schanzer W., Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites // *Analytical Chemica acta*. – 1993. – Vol. 275. – № 3. – P. 23-48.
- 3 Schanzer W., Delahout P., Geyer H., Machnik M., Horning S. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high-resolution mass-spectrometry // *Journal of chromatography B*. – 1996. – Vol. 687, № 4. – P.93-108.
- 4 Gotzmann A., Geyer H., Schanzer W. HPLC Clean-up for urine samples with disturbing background for confirmation of 17 $\beta$ -methyl-5 $\beta$ -androst-1-ene-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol (Epimetendiol) // *Recent advances in doping analysis*. – 1996. – Vol. 4. – P.239-244.
- 5 WADA Technical Document – TD2013MRPL Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substance.