

# ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ КЭФ-МС, ВЭЖХ-МС И ГХ-МС ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАММА-ОКСИБУТИРОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

## COMPARISON ANALYSIS OF METHODS (CE-MS, HPLC-MS AND GC-MS) FOR DETERMINATION OF $\gamma$ -HYDROXYBUTYRIC ACID IN HUMAN URINE

**Н.В. Архипенко<sup>1,2\*</sup>, С.А. Апполонова<sup>1</sup>, М.А. Дикунец<sup>1</sup>,  
Е.А. Симонов<sup>1,2</sup>, Г.М. Родченков<sup>1</sup>**  
**N.V. Arkhipenko<sup>1,2\*</sup>, S.A. Appolonova<sup>1</sup>, M.A. Dikunets<sup>1</sup>,  
E.A. Simonov<sup>1,2</sup>, G.M. Rodchenkov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГУП «Антидопинговый центр», Москва

<sup>2</sup> ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии

<sup>1</sup> Antidoping centre, Moscow

<sup>2</sup> I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Department of Toxicological Chemistry

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, КЭФ-МС, оксибутират.

KEY WORDS: Gc-MS, HPLC-MS, CE-MS, oxybutyrate.

**РЕЗЮМЕ:** Разработаны методики качественного обнаружения оксибутирата с использованием методов ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и КЭФ-МС на уровне 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,5 мкг/мл, соответственно.

Проведен сравнительный анализ методов ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и КЭФ-МС. На основании полученных данных, метод ГХ-МС предложен в качестве основного скринингового метода обнаружения оксибутирата в моче человека для целей допинг-контроля.

Разработанная методика позволяет достоверно идентифицировать оксибутират в моче человека, и может быть рекомендована в качестве скринингового и подтверждающего метода лабораториям, занимающимся допинг-контролем.

**ABSTRACT:** Analytical methods for qualitative determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) by means of CE-MS, HPLC-MS and GC-MS were developed. The detected concentrations for different techniques were 0.5  $\mu$ g/mL, 0.5  $\mu$ g/mL, and 0.1  $\mu$ g/mL, respectively.

Different techniques were compared and discussed. GC-MS determination of GHB was recommended as method of choice for screening analysis for doping control purposes.

### Введение

$\gamma$ -оксимасляная кислота (ГОМК, оксибутират, 4-гидроксипутириновая кислота) является естественным компонентом организма млекопитающих (Сиволап, Савченков, 2000; Костюченко, Дьяченко, 2002), самые высокие концентрации его в организме человека обнаружены в мозге эмбриона и гипоталамусе взрослых. Это вещество в относительно высоких концентрациях присутствует в биологических жидкостях, мускулатуре, сердце и почках живых лиц (Shead, Morley, 1981; Tunnicliff, 1992; Kavanagh et al., 2001). ГОМК является синтетическим аналогом природного метаболита,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, выделенной из ткани мозга, относится к классу стимуляторов центральной нервной системы, применяется в качестве фармацевтического препарата, как средство для неингаляционного наркоза, в офтальмологической практике у больных с первичной открытоугольной глаукомой, для лечения психопатических неврозов, профилактики гипоманиакальных и маниакальных состояний, в наркологии при лечении алкогольной и опиатной зависимости (Gallimberty et al., 1989; Gessa, 1990; Bernasconi et al., 1992; Gallimberty et al., 1992; Gallimberty et al., 1993; Addolorato et al., 1999; Сиволап, Савченков, 2000; Костюченко, Дьяченко, 2002).

Обладая седативным, ноотропным и выраженным антигипоксическим действием, ГОМК повышает устойчивость организма, в том числе тканей мозга,

\* Адрес для переписки:

Архипенко Н.В.

105005 Россия, г. Москва Елизаветинский пер., д.10.

ФГУП «Антидопинговый центр»

E-mail: Archipenko@dopingcontrol.ru

сердца, а также сетчатки глаза, к кислородной недостаточности, является гипнотиком метаболического действия (Лабори, 1970; Лабори, 1974). В больших дозах вызывает сон и состояние наркоза; усиливает действие анальгезирующих и наркотических средств; характеризуется противошоковым действием (Сиволап, Савченков, 2000; Костюченко, Дьяченко, 2002). В средних дозах он вызывает миорелаксацию и успокоение, которые создают отличные условия для естественного засыпания. Оксibuтират включен в "Перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации", в список III (Список психотропных веществ, оборот которых в Российской Федерации ограничен и в отношении которых допускается исключение некоторых мер контроля в соответствии с законодательством Российской Федерации и международными договорами Российской Федерации).

За последнее время всё чаще стали появляться случаи немедицинского использования оксibuтирата, например, посетителями ночных клубов, которые используют его для получения опьяняющих эффектов типа эйфории, успокоения и расслабления мускулов, водителями, использующими его для восстановления сил. Кроме того, также необходимо отметить применение данного препарата в спорте. Культуристы и тяжелоатлеты употребляют оксibuтират в качестве биоактивной пищевой добавки для увеличения уровня соматотропного гормона (СТГ), следствие – наращивание мышечной массы и уменьшение жировых отложений. Отмечено также увеличение физической выносливости на фоне приема данного препарата. Многие спортсмены используют его в дополнение к стероидным циклам. Применяется также в стрельбе и некоторых других видах спорта. В последние годы он стал популярен в качестве энергезирующего и восстанавливающего силы препарата. Использование спортсменами оксibuтирата в дозировках, многократно превышающих терапевтические дозы, может вызвать острую остановку дыхания и летальный исход. В связи с этим определение оксibuтирата – одна из проблем в допинговом контроле.

За последние пять лет стало появляться достаточно много публикаций, касающихся аналитического определения оксibuтирата в биологических жидкостях человека различными аналитическими методами, однако в системе допинг-контроля данная проблема до настоящего момента оставалась открытой.

Разрабатываемые методы определения оксibuтирата должны не только отличаться высокой чувствительностью и быть селективными, но и должны полностью удовлетворять всем требованиям, предъявляемым Всемирным Антидопинговым Агентством (ВАДА) к методам скрининга и подтверждения анализируемого вещества.

Оксibuтират, по классификации ВАДА, относится к классу стимуляторов. По техническому документу ВАДА данный класс соединений необходимо надежно обнаруживать на уровне 0,5 мкг/мл при установленных критериях идентификации запрещенных

допинговых препаратов (WADA Technical Document, 2003). При этом нами были учтены положения международного стандарта "GLP" и отечественных стандартов ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 и ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 (WADA Technical Document, 2004; ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002, 2002).

## Экспериментальная часть

### Материалы и методы.

В настоящей работе мы использовали 20% водный раствор оксibuтирата натрия в ампулах по 10 мл для внутривенного введения, производства рижского химфармзавода №6, который применялся в эксперименте *in vivo*; для разработки методов анализа оксibuтирата в биологических жидкостях человека использовали  $\gamma$ -гидроксibuтират натрия фирмы "Sigma-Aldrich, CO" (Германия), в качестве внутреннего стандарта использовали 3-гидрокси-2-фенилпропионовую кислоту (Tropic) фирмы "Sigma-Aldrich, CO" (Германия). Мочевину осаждали уреазой (6.000 ед.) фирмы "Sigma-Aldrich, CO" (Германия). Для создания в биопробе pH 9.0-10.0 использовали гидроксид калия ч.д.а., фирмы "Борис" (Москва). Для определения оксibuтирата с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (GC-MS) проводили его дериватизацию с использованием смеси N-метил-N-триметилсилил трифторацетамид (MSTFA) "Sigma-Aldrich, CO" (Германия) / иодистый аммоний ( $\text{NH}_4\text{I}$ ) "ХИММЕД", (Москва) / дитиотреитол (DTT) - "Helicon" (Москва). Экстракция проводилась ацетонитрилом "Merck", (Германия) с добавлением сульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), ч.д.а., фирмы "ХИММЕД", Москва). Элюенты для жидкостной хроматографии готовили из растворов 99,9% муравьиной кислоты ("Merck", Германия) и 99,8% метилового спирта ("Merck", Германия).

Для определения оксibuтировой кислоты в биопробах методом ВЭЖХ-МС использовался жидкостной хроматограф с масс-селективным детектором "Agilent 1100 Series LC-MSD trap" фирмы "Agilent Technologies" (США). Растворитель А – метанол (99,8%), растворитель В – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (pH = 3,0).

Элюирование проводилось в изократическом режиме (95% : 5% растворитель В / растворитель А, соответственно). Объем вводимой пробы – 5 мкл, подавался на колонку "Agilent Eclipse XDB-C18" фирмы "Agilent Technologies" (США) (150 см  $\times$  2,1 мм  $\times$  5 мкм), 300°C, ионизация электроспреем (скорость потока распыляющего газа – 8 л/мин), температура капилляра составила 325°C, при напряжении 3500 В.

Для определения оксibuтировой кислоты в биопробах методом ГХ-МС использовался газовый хроматограф фирмы "Agilent Technologies" (США) с масс-селективным детектором модели "6890 N" и "5973 inert".

Разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке HP-5MS (12,5 м  $\times$  0,2 мм  $\times$  0,11 мкм фирмы "Hewlett Packard" (США)). Скорость потока

– 2,1 мл/мин, стартовая температура 60°C, затем со скоростью 5°C/мин поднимали температуру до 100°C, с делением потока 20:1. Масс-спектры были получены электронной ионизацией в режиме полного ионного тока (ПИС).

Оксибутират методом КЭФ-МС определяли на приборе для капиллярного электрофореза фирмы "Agilent Technologies" (Agilent Capillary Electrophoresis System) с масс-селективным детектором модели "MSD ESI-ion trap SL" той же фирмы.

В работе использовался стандартный буфер для КЭФ-МС (10 мМ ацетат аммония), доведенный до рН 14 (ТЭА). Разделение проводилось на кварцевом капилляре Beckman (100 см × 50 мкм). Ввод пробы осуществлялся под давлением 0,5 psi/5 сек (1 psi = 6894,76 Па), приложенное напряжение – 25 кВ, результирующий ток при этих условиях составил 40 мкА.

#### **Приём препарата и сбор биологических проб мочи перед анализом.**

Три здоровых добровольца были проинформированы об условиях приема препарата и сдачи анализа. Бланковая моча (моча, заведомо не содержащая исследуемого препарата) была собрана перед пероральным приемом 10 мл 20%-го раствора оксибутирата натрия (2 г). Полученные образцы хранились в стеклянной посуде при температуре -30°C до начала проведения анализа.

#### **Подготовка биопроб мочи к инструментальному анализу.**

*Подготовка биопроб мочи к анализу методом ГХ-МС, без добавления уреазы.*

Аликвоту исследуемого образца мочи в размере 500 мкл отбирали из ёмкости одноразовым медицинским шприцем и переносили в пластиковую трубу на 2 мл. В пробу добавляли внутренний стандарт (тропик, [с] = 20 мкг/мл) в размере 100 мкл.

Для того, чтобы избежать образования бутиролактона, который образуется из  $\gamma$ -гидроксибутирата в кислой среде, к моче добавляли отмеренный 0,1 Н раствор NaOH в метаноле. Полученный рН мочи контролировали путем сравнения окраски смоченной полоски индикаторной бумаги со шкалой. При этом значение рН среды не должно выходить за пределы 13,0-14,0. К моче добавляли 1 мл ацетонитрила и 5 мг  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Экстракция проводилась в экстракторе в течение 3 мин. Смесь центрифугировали (20°C, 2500 об/мин, 5 мин) для получения контрастной поверхности раздела между фазами. При помощи автоматического дозатора 900 мкл верхнего слоя переносили в стеклянную пробирку со шлифом. Полученный экстракт упаривали до сухого остатка на роторном испарителе.

Образцы дериватизировали добавлением к сухому остатку микрошприцем 100 мкл смеси MSTFA/NH<sub>4</sub>J/DIT и оставляли на 20 минут в нагревателе при температуре 70°C. Затем смесь переносили в вials для ГХ-МС анализа на 100 мкл, 1 мкл полученного раствора вводился в систему ГХ-МС.

*Подготовка биопроб мочи к анализу методом ГХ-МС с добавлением уреазы.*

Аликвоту исследуемого образца мочи в размере 500 мкл отбирали из ёмкости одноразовым медицинским шприцем и переносили в пластиковую трубу на 2 мл. В пробу добавляли внутренний стандарт в размере 100 мкл.

Для осаждения мочевины к собранному элюенту добавляли уреазу (активность 6000 ЕД). Инкубирование проводилось при T = 37°C, 30 мин.

Последующие операции аналогичны, операциям, проводимым после создания рН среды по методике пробоподготовки мочи к ГХ-МС анализу без добавления уреазы, указанной выше.

*Подготовка биопроб мочи к анализу методом ВЭЖХ-МС.*

Пробоподготовка образцов для анализа методом ВЭЖХ-МС проводилась тем же способом, что и пробоподготовка для ГХ-МС без добавления уреазы, исключая стадию дериватизации. Сухой остаток растворяли в метаноле.

*Подготовка биопроб мочи к анализу методом КЭФ-МС.*

Аликвоту исследуемого образца мочи разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:4. Для предотвращения лактонизации  $\gamma$ -оксибутировой кислоты добавляли 0,1 н раствор натрия гидроксида. Полученный рН мочи контролировали путем сравнения окраски смоченной полоски индикаторной бумаги со шкалой. При этом значение рН среды не должно выходить за пределы 13,0-14,0.

## **Обсуждение и результаты**

Для обнаружения оксибутирата в моче человека методом ГХ-МС основным препятствующим фактором является мочевина. Поэтому, наряду с анализом масс-спектра оксибутирата, мы проанализировали масс-спектр мочевины и выяснили, что масс-спектры этих соединений имеют один и тот же базовый ион – m/z 147, а также ряд ионов с меньшей интенсивностью – m/z 204, 73.

Анализ оксибутирата методом ГХ/МС осуществлялся с использованием двух способов пробоподготовки для извлечения данного соединения из мочи человека:

1. без уреазы
2. с уреазой (для осаждения мочевины)

и двух способов детектирования:

1. режим сканирования в полном ионном токе
2. режим сканирования по выделенным ионам

Были получены масс-спектры оксибутирата и мочевины (мешающий агент).

Метод сканирования в режиме полного ионного тока без использования уреазы не позволяет нам получить чистый масс-спектр оксибутирата при этих условиях (рис. 1). Из рисунка 1 видно, что помимо ионов, характерных для оксибутирата (m/z 117, 143, 147, 204 и 233), в спектре присутствуют также ионы, характерные для мочевины (m/z 147, 189 и 204), следовательно метод не является селективным.

Одним из вариантов решения проблемы ухода от мешающего пика мочевины может быть переход

с режима сканирования по полному ионному току в режим сканирования по выбранным ионам (SIM).

После сравнительного анализа масс-спектров оксибутирата и мочевины, в качестве характерных ионов для оксибутирата были выбраны следующие ионы:  $m/z$  117, 143 и 233. На рисунке 2 представлены сравнительные хроматограммы пробы, заведомо не содержащей оксибутират, и трех проб с добавкой оксибутирата в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл.

Результаты работы показали, что с помощью представленного метода обнаружения оксибутирата в моче человека повышается чувствительность и надежность определения данного соединения. Этот способ анализа может использоваться в качестве скринингового для обнаружения оксибутирата в моче человека.

Другим вариантом решения проблемы ухода от мешающего пика мочевины может быть химический, а именно, использование уреазы на стадии подготовки образца к анализу.

Метод подготовки биопроб мочи с уреазой, так же как и режим сканирования по выбранным ионам, позволяет избавиться от мешающего пика мочевины (рис. 3, 4, 5) и, тем самым, повысить чувствительность, селективность и надежность метода обнаружения оксибутирата в моче человека. Предел детектирования оксибутирата составил 0,1 мкг/мл, что позволяет использовать данный метод в качестве метода, подтверждающего наличие оксибутирата в моче человека. Основным преимуществом данного метода, в отличие от метода без уреазы, является надежная идентификация, так как, в конечном итоге, имеем полный масс-спектр соединения (рис. 6).

Для анализа оксибутирата с помощью метода ВЭЖХ/МС использовали два способа детектирования:

- режим МС
- режим МС/МС

Масс спектры, полученные как в условиях отрицательной ионизации, так и в условиях положительной ионизации, не являются информативными. Для надежной идентификации оксибутирата в моче человека необходимо не менее 3 характеристических

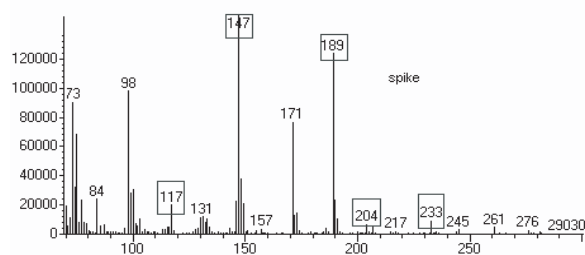


Рисунок 1. Масс-спектр оксибутирата, выделенного из мочи человека ( $[c] = 1$  мкг/мл)

масс в спектре.

Масс-спектры, полученные в режиме МС/МС, при котором выделенный ион ( $m/z = 103$ ) подвергается вторичной фрагментации, являются более информативными, чем масс-спектры, полученные в режиме полного сканирования, однако режим не удовлетворяет критериям ВАДА по пределу детектирования (ПД = 1 мкг/мл).

Метод КЭФ-МС/МС для обнаружения оксибутирата в моче человека, на наш взгляд, является самым перспективным. Пробоподготовка биологической жидкости минимальна, что уменьшает время и затраты на проведение анализа. Однако, как показали наши исследования, метод сильно зависит от электропроводности мочи. По этой причине, не смотря на легкую методику пробоподготовки и низкий уровень предела детектирования – 0,5 мкг/мл, нам пришлось отказаться от использования метода КЭФ-МС в рутинном скрининговом анализе для определения оксибутирата в моче человека.

На основании полученных данных проведенного сравнительного анализа методов ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и КЭФ-МС, метод ГХ-МС был предложен в качестве основного скринингового метода обнаружения оксибутирата в моче человека. Разработанная методика позволяет достоверно идентифицировать оксибутират в моче человека, и может быть рекомендована в качестве скринингового и подтверждающего метода лабораториям, занимающимся допинг-контролем.

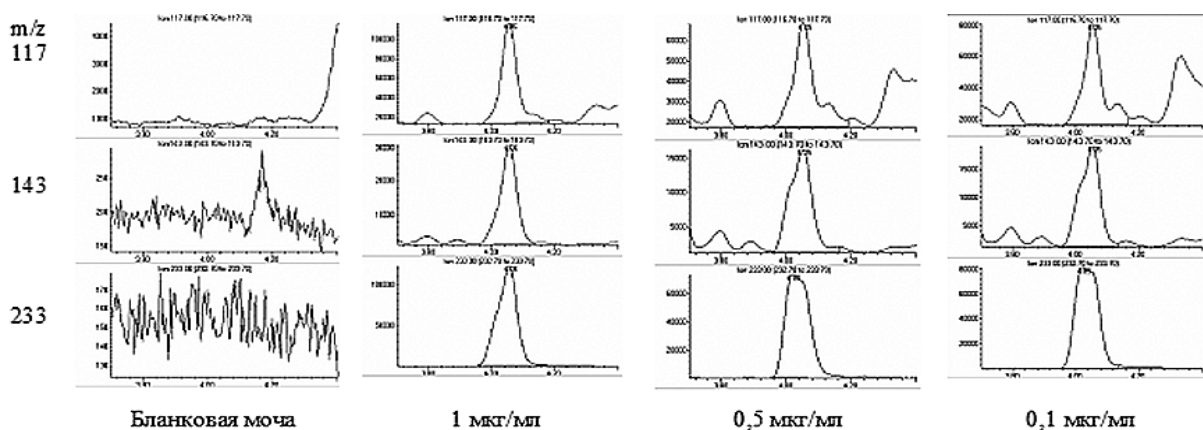


Рисунок 2. Хроматограммы по выделенным ионам ( $m/z$  117, 143 и 233), полученные при различных концентрация оксибутирата



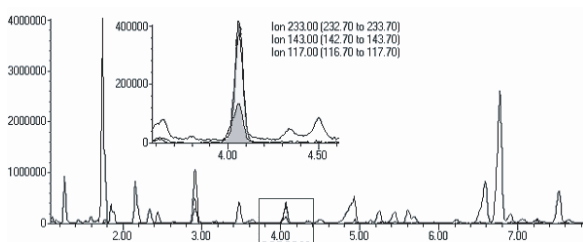


Рисунок 3. Хроматограмма образца с добавкой оксибутирата ( $[c] = 0,5$  мкг/мл), приготовленного с уреазой, представленная по выделенным характерным ионам оксибутирата ( $m/z$  117, 143, и 233)

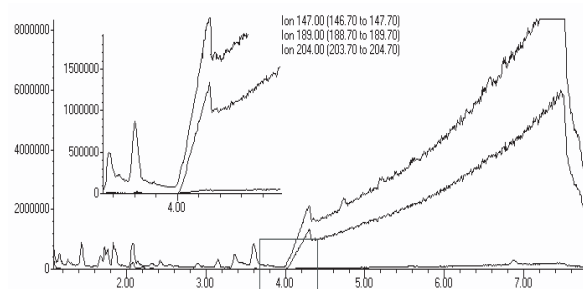


Рисунок 4. Хроматограмма образца, приготовленного без использования уреазы, прописанная по характеристическим массам мочевины ( $m/z$  147, 189 и 204).

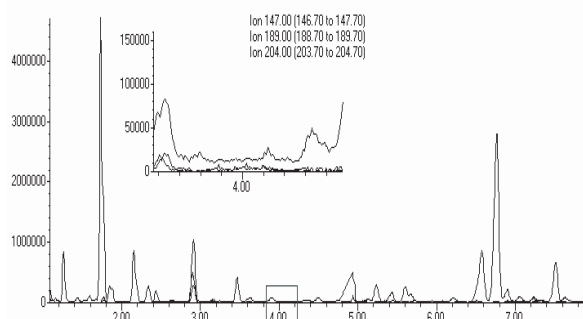


Рисунок 5. Хроматограмма образца, приготовленного с использованием уреазы, прописанная по характеристическим массам мочевины ( $m/z$  147, 189 и 204)

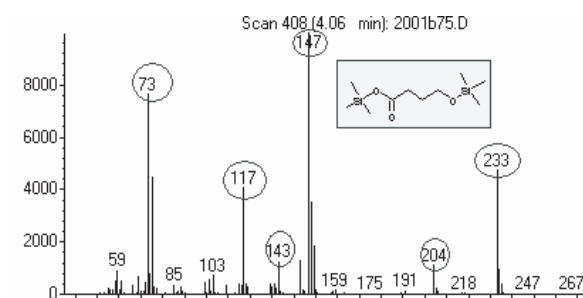


Рисунок 6. Масс-спектр оксибутирата ( $[c] = 0,5$  мкг/мл)

## Литература

- ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. Москва.2002.
- ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. Москва. 2002.
- Костюченко А. Л., Дьяченко П. К. 1998. Внутривенный наркоз и антинаркотики. СПб.: Деан.
- Лабори А. 1970. Регуляция обменных процессов. Теоретический, экспериментальный, фармакологический и терапевтический аспекты. М.: Медицина. 383 с.
- Лабори А. 1974. Метаболические и фармакологические основы нейрофизиологии. М.: Медицина. 168 с.
- Машковский М. Д. 2001. Лекарственные средства.
- Сиволап Ю. П., Савченков В.А. 2000. Фармакология в наркологии. М.: Медицина.
- Addolorato G., Balducci G., Capristo E. 1999. Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in the treatment of alcohol withdrawal syndrome: a randomized comparative study versus benzodiazepine. // Alcohol. Clon. Exp. Res. Vol.23. No.10. P.1596-1604.
- Bernasconi R., Lauber J., Marescaux C. 1992. Experimental absence seizures: potential role of gamma-hydroxybutyric acid and GABAB receptors. // J. Neural. Transm. Suppl. Vol.35. P.155-177.
- Gallimberty L., Canton G., Gentile N. 1989. Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyric acid for the treatment of alcohol withdrawal syndrome. // Lancet. Vol.2. P787-789.
- Gallimberty L., Canton G., Gentile N. 1992. Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyric acid for the treatment of alcohol dependence: a double blind study. // Alcohol. Clin. Exp. Res. Vol.16. P.673-676.
- Gallimberty L., Cibir M., Pagnin P. 1993. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome. // Neuropsychopharmacology. Vol.9. No.1. P.77-81.
- Gessa G. L. 1990. Guidelines for the drug therapy of alcoholism. // Recenti. Prog. Med. Vol.81. No.3. P.171-175.
- Kavanagh P. V., Kenny P., Feely J. 2001. The urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in man. // J. Pharm. Pharmacol. Vol.53. No.3. P.399-402.
- Shead O. C., Morley B. J. 1981. Ontogeny of gamma-hydroxybutyric acid. I. Regional concentration in developing rat. Monkey and human brain. // Dev. Brain. Rrs. Vol.1. P.579-589.
- Tunnichliff G. 1992. Significance of gamma-hydroxybutyric acid in the brain. // Gen. Pharmacol. Vol.23. P.1027-1034.
- WADA Technical Document – TD2003IDCR, v. 1.2, January 1, 2004
- WADA Technical Document – TD2003MRPL, v. 1.2, 2003.

