

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ СПОСОБОВ ДЕРИВАТИЗАЦИИ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ МЕТОДАМИ
ВЭЖХ-МС/МС**

**USE OF DERIVATIZATION PROCEDURES IN HPLC-MS/MS
DETERMINATION OF ANABOLIC STEROIDS**

П.А. Баранов*, С.А. Апполонова, Г.М. Родченков

P.A. Baranov*, S.A. Appolonova, G.M. Rodchenkov

ФГУП «Антидопинговый центр», Лаборатория конного допинга и новых методов анализа, Москва
Moscow Antidoping Center, Department of Horses doping and New Methods of Analysis, Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дериватизация, анаболические стероиды, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия

KEY WORDS: derivatization, anabolic steroids, high performance liquid chromatography, mass spectrometry

РЕЗЮМЕ: В настоящей работе представлена возможность применения ВЭЖХ-МС/МС-метода в условиях электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении для определения кето- и гидроксистероидов в моче человека на уровне 0,1–1,0 нг/мл. Для разработки ВЭЖХ-МС/МС-методов, позволяющих определять весь спектр анаболических стероидов, нами было отобрано для изучения 21 соединение, которые, в свою очередь, были разделены на шесть групп в соответствии с их химическим строением: наличие двойных связей, 3-кето- и/или 3(17)-гидроксигрупп, наличие заместителей при С-17. Были получены МС/МС-спектры и времена удерживания для каждого соединения (нативные стероиды, оксим- и пиколиноил-производные стероидов). Сравнительный анализ используемых методов дериватизации показал, что ВЭЖХ-МС/МС-определение кетостероидов в виде оксимных производных и гидроксистероидов в виде пиколиноиловых производных анаболических стероидов позволяет повысить предел детектирования в 10–15 раз по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС-методом нативных соединений.

ABSTRACT: The use of derivatization procedures with the formation of oxime and picolinoyl derivatives of anabolic steroids following HPLC-ESI-MS/MS analysis was proposed. The limit of detection for evaluated procedures was between 0.1–1.0 ng/ml of hu-

man urine. Twenty one anabolic agents were selected and divided into six groups depending on the presence or absence of double bonds, 3-keto and/or 3(17)-hydroxy groups and different substituents at C-17 position in sterane core for the purposes of complex HPLC-MS/MS analysis. The retention time and MS/MS spectra were obtained for each analyte (native steroids, oxime and picolinoyl derivatives). The comparison analysis of derivatization procedures showed that the use of HPLC-MS/MS methods for anabolic steroids in forms of oxime and picolinoyl derivatives provided 10–15 times higher ESI response in SRM mode when compared to those of underivatized molecules.

ВВЕДЕНИЕ

Анаболические стероиды (АС) внесены в список запрещенных веществ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) (Wada Prohibited List, 2010) и являются самым распространенным классом соединений, которыми злоупотребляют спортсмены для достижения высоких спортивных результатов (Wada Adverse Analytical Findings, 2008).

В течение последних лет в практику антидопингового и химико-токсикологического контроля прочно вошли методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектральными детекторами (ВЭЖХ-МС) новых видов (Lui et al., 2000; Guan et al., 2005; Guan, Burlingame, 2006; Blasco et al., 2009; McKinney, 2009). Для определения АС в биологических средах человека и животных применяют различные виды хромато-масс-спектрометрического оборудования. Однако наибо-

*Адрес для переписки: Баранов П.А.; ФГУП «Антидопинговый центр», Лаборатория конного допинга и новых методов анализа, 105005, Москва, Елизаветинский пер., д.10; e-mail: baranov@horsesdoping.ru

лее предпочтительным остается метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС) для определения АС (Ruth, 2001; McKinney, 2009). Наряду с классическими методами анализа особое внимание уделяется идентификации стероидных соединений на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) (Ma, Kim, 1997; Pozo et al., 2007; Yamashita et al., 2007; Pozo et al., 2008). Основным лимитирующим фактором применения ВЭЖХ-МС-анализа для определения АС является низкая степень их ионизации. Анаболические стероиды в своей структуре не содержат каких-либо групп с основными и кислотными свойствами, которые способствовали бы процессам ионизации, и обычно только наличие 3-кетогруппы, находящейся в конъюгации с двойной связью (4-ен-3-кетостероиды), позволяет проходить процессу протонирования. Основным недостатком ВЭЖХ-МС/МС-анализа АС является отсутствие центров протонирования и, как результат, проблемы с достижением необходимой чувствительности (Higashi et al., 2002; Guan et al., 2005). Таким образом, дериватизация стероидов может увеличить эффективность ионизации стероидов и тем самым повысить чувствительность и специфичность их определения. При использовании электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении стероиды модифицируют, вводя в их структуру либо фрагмент, несущий постоянный заряд, либо фрагмент, который легко ионизируется (Higashi et al., 2004; Thevis et al., 2005; Pozo et al., 2008). В данной работе нами для дериватизации кетостероидов был выбран гидроксилламин (Lui et al., 2000), а для гидроксистероидов был использован смешанно-ангидридный метод с получением соответствующих пиридин-карбоксилатных производных стероидов (Yamashita et al., 2007). Схема дериватизации кето- и гидроксистероидов представлена на рис. 1.

Таким образом, основной целью данной работы была разработка сверхчувствительных ВЭЖХ-МС/МС-методов определения анаболических стероидов в биологических жидкостях человека на основании анализа продуктов их дериватизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические реактивы

В работе использовали стандартные образцы (образцы-свидетели) тренболон; болдион; андростендион; 1-андростендион; болденон (1-дегидротестостерона); 1-тестостерона; андрост-1-ен-3 α -ол-17-она (метаболит 1-андростендиона); андростандион; дегидроэпиандростерона (ДГЭА); андрост-4-ен-3 α ,17 β -диола; андростерона; 5-андростен-3 β ,17 α -диола; метандиенон; 17 α -метилтестостерона; метил-1-тестостерона; эпиметендиол; местанолон; гестринон и тетрагидрогестринон фирмы «Steraliods» (США). Стандартные образцы тестостерона; дигидротестостерона (5 α -ДГТ) и d₃-тестостерона (внутренний стандарт) были получены от фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Содержание основного компонента во всех используемых в работе стандартных образцах-свидетелях было не ниже 99,0%.

В работе были использованы следующие химические реактивы: метанол фирмы «Merck», маркировка LiChrosolv (Германия); гидроксид натрия, гидроксид калия фирмы и дигидрофосфат калия моногидрат «Merck» (Германия); рекомбинантная форма β -глюкуронидазы *E. Coli* K12 фирмы «Roche Diagnostics» (Германия); гидроксилламония хлорид, сульфат аммония, триэтиламин (ТЭА) и тетрагидрофуран (ТГФ) фирмы «Panreac Quimica SA» (Испания); пиколиновая кислота и 4-(диметиламино)-пиридин (ДМАП) фирмы «Fluka» (Германия); 2-метил-6-нитробензойный ангидрид (2М-6НБА), терт-бутилметилловый эфир (ТБМЭ), мура-

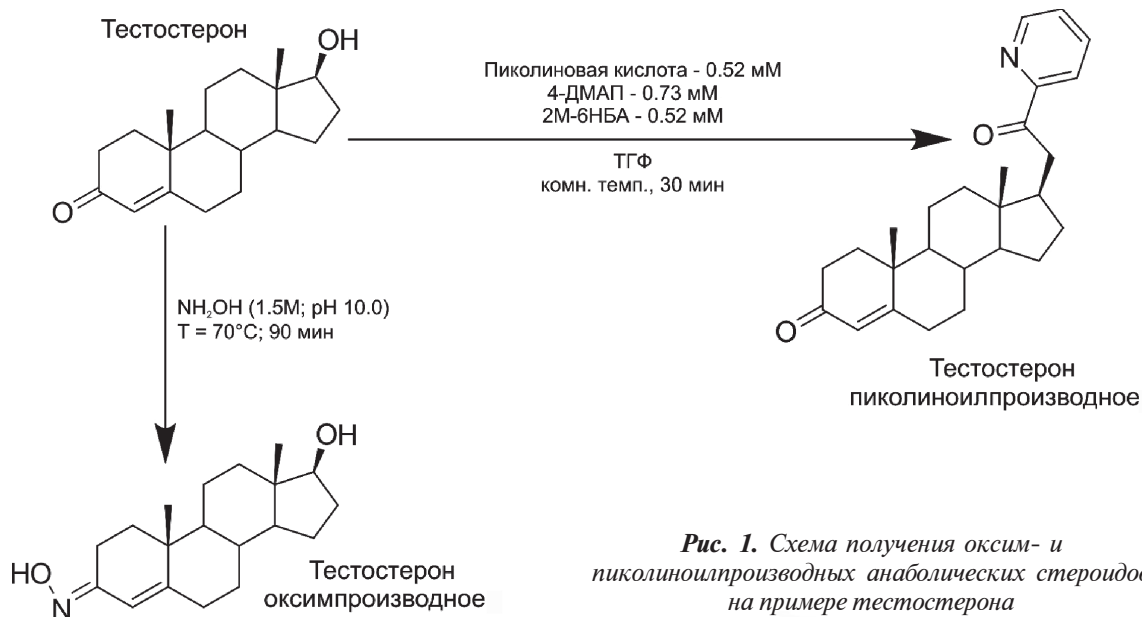


Рис. 1. Схема получения оксим- и пиколиноилпроизводных анаболических стероидов на примере тестостерона

виная кислота и ацетат аммония фирмы «Sigma-Aldrich» (США); карбонат калия и бикарбонат натрия фирмы «Химмед» (Россия).

Оборудование

Исследование проводили на хромато-масс-спектрометре с тройным квадрупольным анализатором TSQ Quantum Ultra AM фирмы «Thermo Finnigan» (США), оборудованном внешним источником ионов с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении, а также насосом высокого давления MS Pump Plus и автосамплером Surveyor Autosampler Plus.

Хроматографическое разделение проводили при постоянной температуре 30 °С на колонке Phenomenex Luna C18 (150 x 2 мм; размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å) фирмы «Phenomenex» (США). В качестве мобильной фазы использовали 0,05% раствор муравьиной кислоты (рН 3,0) (А) и 90% раствор метанола (В). Постоянная скорость потока составляла 200 мкл/мин. ВЭЖХ-МС анализ проводился в режиме градиентного элюирования: 0 мин — (В) 40%; 8 мин — (В) 90%; 9 мин — (В) 90%; 12 мин — (В) 40%; 18 мин — (В) 40%; общее время анализа составляло 18 мин.

При хромато-масс-спектрометрическом анализе ионизация осуществлялась электрораспылением при атмосферном давлении в режиме регистрации положительных ионов. Напряжение на капилляре — 4,0 кВ; температура капилляра — 245 °С; скорость потока осушающего газа (азот) — 0,45 л/мин; скорость потока газа (аргон) в камере соударения — 0,075 л/мин; температура в камере ионизации — 200 °С; давление на распылителе — 2,0 атм.

Детектирование определяемых веществ проводилось в режиме регистрации селективных реакций (SRM). Ширина пика для прекурсор-ионов и соответствующих характерных ионов на первом квадруполе (Q1) и третьем квадруполе (Q3) составляла 0,5 а.е.м. на половине высоты пика, время задержки — 5 мс. Обработка данных проводилась с применением программного обеспечения Xcalibur версии 2.0 фирмы «Thermo Finnigan» (США).

ВЭЖХ-МС/МС анализ стандартных растворов анаболических стероидов

Стандартные растворы каждого из анаболических стероидов (1 мг/мл) готовили растворением точной навески в точном объеме метанола. Рабочие растворы (в концентрации 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 1000 и 10000 нг/мл) получали разбавлением исходного раствора с помощью микрошприца (Hamilton, Австралия) и автоматического дозатора переменного объема модели 1179501A (Oxford Laboratories, Англия).

Каждый из рабочих растворов в концентрации 10 мкг/мл вводили в ВЭЖХ-МС-систему и получали масс-спектр в режиме регистрации полного ионного тока в диапазоне от m/z 50—600 при десяти различных значениях энергии коллизии (5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50 и 60 эВ). Масс-спектры продуктов дериватизации анаболических стероидов получали в аналогичных условиях после проведения процедур дериватизации, описанных ниже.

Процедура пробоподготовки мочи человека

К 1,0 мл мочи добавляли раствор внутреннего стандарта (d_3 -тестостерон; 5,0 нг в 1 мл мочи); 0,5 мл фосфатного буфера (0,2 М, рН 7) и 50 мкл рекомбинантной β -глюкуронидазы *E. Coli* K12. Полученную смесь аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 60 мин при температуре 50 °С. После инкубации смесь охлаждали до комнатной температуры и доводили уровень рН до 9,0, используя твердый буфер (смесь карбоната калия и бикарбоната натрия 1 : 2). Жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) проводили в течение 2 мин с добавлением 2,0 мл ТБМЭ и 5,0 г сульфата аммония в качестве высаливателя. После смеси центрифугировали в течение 5 мин при 2500 об/мин и отбирали органический слой. Отобранный органический слой упаривали в токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток перерастворяли в 100 мкл подвижной фазы и 20 мкл полученной смеси вводили в ВЭЖХ-МС систему.

Дериватизация

Органический слой, полученный после ЖЖЭ-экстракции, делили на две равные части (по 1,0 мл), каждую из которых упаривали в токе азота при комнатной температуре. Далее проводили процесс дериватизации с получением соответствующих оксим- или пиколиноилпроизводных.

Оксимные производные кетостероидов получали по методу Луи и соавт. К сухому остатку добавляли 300 мкл 1,5 М раствора гидросиламина (рН 10,0) и инкубировали в течение 30 мин при 70 °С. После инкубации к охлажденной до комнатной температуры смеси добавляли 5% раствор гидрокарбоната натрия и 2,0 мл ТБМЭ. Экстракцию проводили в течение 5 мин с добавлением 5,0 г сульфата аммония в качестве высаливателя. После экстракции смесь центрифугировали при 2500 об/мин в течение 5 мин, отбирали органический слой, который упаривали в токе азота при комнатной температуре до сухого остатка. Сухой остаток растворяли заново в 100 мкл подвижной фазы и 20 мкл полученной смеси вводили в ВЭЖХ-МС-систему.

Пиколиноиловые производные гидроксистероидов получали смешанным ангидридным методом. Для этого к сухому остатку, полученному после экстракции 2,0 мл ТБМЭ, добавляли 50 мкл ТГФ, 20 мкл ТЭА и 100 мкл дериватирующего раствора (0,52 мМ — пиколиновая кислота; 0,52 мМ — 2М-6НБА и 0,37 мМ — ДМАП), который готовили *ex tempore*. Смесь аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Экстракцию и последующие этапы пробоподготовки проводили аналогично процессам, описанным при получении оксимных производных кетостероидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые анаболические стероиды (21 соединение) были разделены на шесть групп в соответствии с их химическим строением: наличие двойных связей, 3-кето- и/или 3-гидроксигрупп, наличие заместителей при С-17 (рис. 2). Знания о фраг-

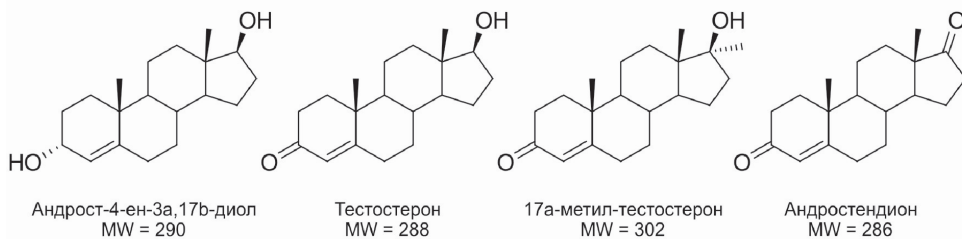
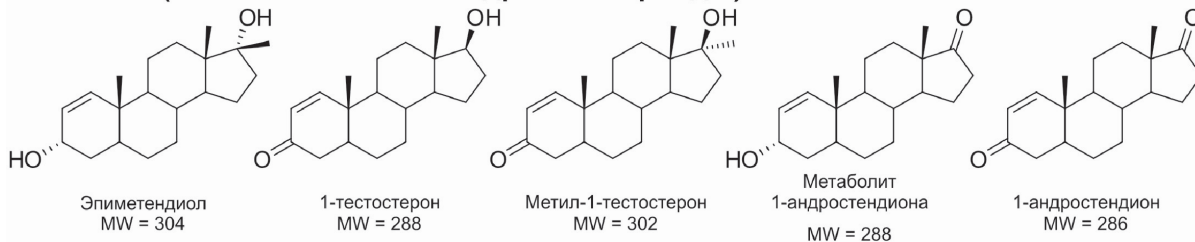
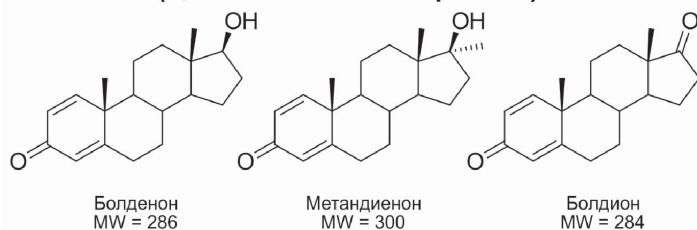
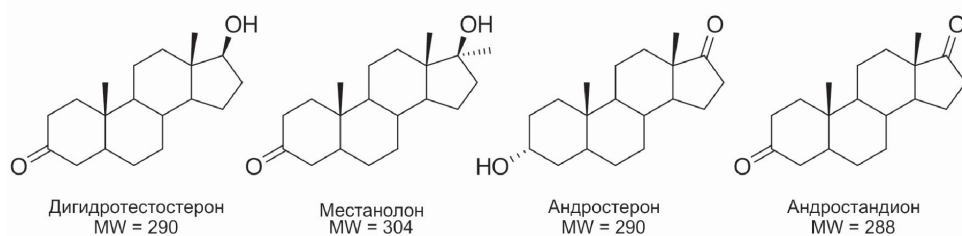
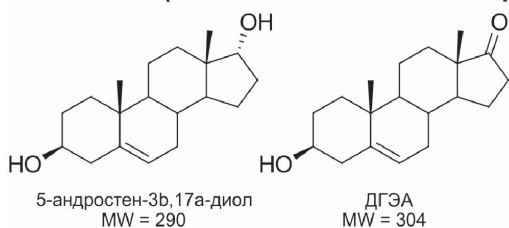
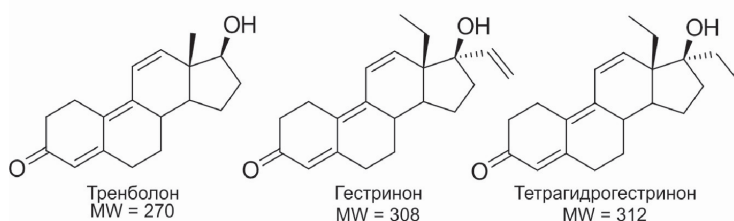
ГРУППА 1 (4-ен-3-кето и 4-ен-3-гидрокси стероиды)**ГРУППА 2 (1-ен-3-кето и 1-ен-3-гидрокси стероиды)****ГРУППА 3 (1,4-диен-3-кето стероиды)****ГРУППА 4 (андростан-3-кето и андростан-3-гидрокси стероиды)****ГРУППА 5 (5-ен-3-кето и 5-ен-3-гидрокси стероиды)****ГРУППА 6 (4,7,9-триен-3-кето стероиды)**

Рис. 2. Структура исследуемых анаболических стероидов (MW— молекулярная масса)

ментации стероидных молекул в условиях реакций диссоциации молекул, индуцированных соударениями, могут быть основным фактором при идентификации новых (неизвестных) анаболических стероидов и/или их метаболитов. Несмотря на то что анаболические стероиды имеют общий углеродный скелет, пути их фрагментации являются сложными и существенно отличаются в зависимости от положения двойных связей и наличия заместителей.

Нами было разработано три ВЭЖХ-МС/МС-метода определения АС в моче человека, первый метод — определение нативных стероидов, второй — оксимных производных кетостероидов и третий — пиколиноиловых производных гидроксистероидов. В условиях положительной ионизации при атмосферном давлении для всех изучаемых соединений, нативных и химически модифицированных, характерно образование интенсивных протонированных молекулярных ионов $[M+H]^+$. Во всех случаях тандемной масс-спектрометрии в качестве прекурсор-ионов были выбраны протонированные молекулярные ионы. При анализе путей фрагментации дочерние ионы, образованные вследствие потери одной или двух молекул воды, не учитывались нами для дальнейшего анализа, так как данные фрагменты не являются специфичными. Анализ МС/МС спектров нативных стероидов показал, что для большинства соединений количество дочерних ионов превышало 20—25 штук, что приводило к трудностям выбора характеристичных ионов для их последующего включения в МС/МС-анализ (рис. 3). Кроме того, для большинства нативных соединений в условиях электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении мы наблюдали низкий уровень ионизации.

С целью получения более специфичных масс-спектров и повышения уровня ионизации нами было разработано два ВЭЖХ-МС/МС-метода анализа анаболических стероидов в биологических жидкостях человека на основании анализа продуктов их дериватизации (оксимные и пиколиноиловые производные). В таблице 1 представлены времена удерживания, МС и МС/МС характеристичные ионы, а также пределы детектирования для нативных анаболических стероидов и продуктов их дериватизации.

Сравнительный анализ МС/МС-спектров нативных и оксимпроизводных кетостероидов выявил, что в случае 4-ен-3-кетоандростеновой структуры стероида его МС/МС-спектр содержит характеристичные ионы с высокой степенью относительной интенсивности (рис. 3А). Анализ путей фрагментации оксим- и пиколиноилпроизводных показал, что пути фрагментации оксимпроизводных схожи с путями фрагментации нативных соединений и, в случае отсутствия двойных связей в углеродном скелете аналита, МС/МС-спектр оксимпроизводных является не характеристичным. С другой стороны, фрагментация пиколинпроизводных приводит к образованию интенсивных характеристичных ионов (рис. 3Б).

Основной задачей исследования было изучение процессов фрагментации оксим- и пиколиноилпроизводных анаболических стероидов, поэтому в данной работе мы не рассматриваем пути фрагментации нативных соединений, которые достаточно хорошо освещены в литературе (Williams et al., 1999; Thevis et al., 2005; Pozo et al., 2007).

4-ен-3-кето и 4-ен-3-гидроксистероиды (группа 1)

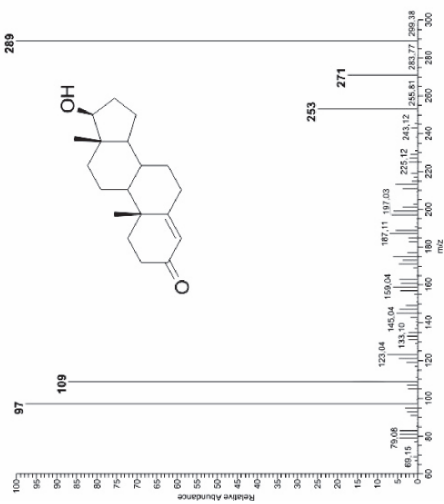
В 1-ю группу стероидов были включены: андрост-4-ен-3 α ,17 β -диол, тестостерон, 17 α -метил-тестостерон и андростендион. Дериватизация перечисленных соединений раствором гидроксилamina вела к образованию соответствующих оксимпроизводных тестостерона; 17 α -метил-тестостерона и андростендиона. МС/МС анализ внутри данной группы показал наличие сходных путей фрагментации. В условиях реакций диссоциации молекул, индуцированных соударениями при низких и средних энергиях коллизии, наиболее характерным процессом распада протонированных молекулярных ионов является разрыв кольца В и образование характеристичных ионов с m/z 112; m/z 124 и m/z 138. Увеличение энергии коллизии до 60 эВ приводит к формированию продуктов с m/z 78 и m/z 67. Таким образом, наличие в МС/МС спектре указанных выше ионов может быть формальным доказательством присутствия 4-ен-3-кетостероидной структуры у аналита.

Более специфичные пути фрагментации характерны для пиколиноилпроизводных, при этом наблюдался сдвиг их молекулярной массы в сторону увеличения на 105 Да. Среди представленных соединений данной группы пиколиноилпроизводные были получены только для тестостерона и андрост-4-ен-3 α ,17 β -диола. Фрагментация при низких и средних энергиях коллизии (10—20 эВ) приводила к образованию общих потерь масс в -123 Да и -123 Да-Н₂O и образованию соответствующих характеристичных ионов с m/z 271 $[M+H-C_6H_5NO_2]^+$ и m/z 253 $[M+H-C_6H_5NO_2-H_2O]^+$ для тестостерона и m/z 273 и m/z 255 для андрост-4-ен-3 α ,17 β -диола. При высоких значениях энергии коллизии (до 60 эВ) наблюдалось образование неспецифичных характеристичных ионов с m/z 78 $[C_5H_4N]^+$; m/z 106 $[C_6H_4NO]^+$ и m/z 124 $[C_6H_6NO_2]^+$.

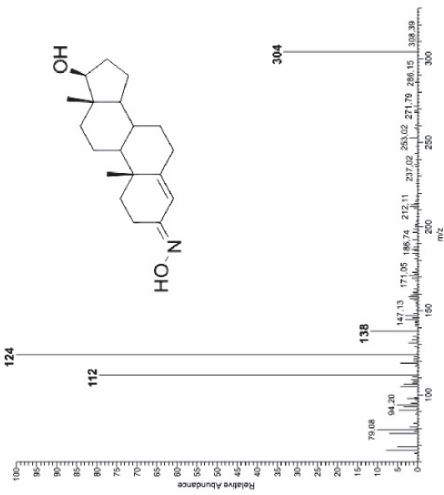
В анализе андрост-4-ен-3 α ,17 β -диола пиколината было идентифицировано два монопроизводных с идентичными путями фрагментации в условиях положительной электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении, при этом ди-производного обнаружено не было. 17- α -метил-тестостерон не образует пиколиноиловых производных при данных условиях, возможно из-за стерического затруднения при С-17.

При сравнительном анализе производных тестостерона интенсивность сигнала, для оксимпроизводного была в 4 раза выше, чем для пиколиноилпроизводного (рис. 5 и 6) и в 10 раз выше, чем для нативного.

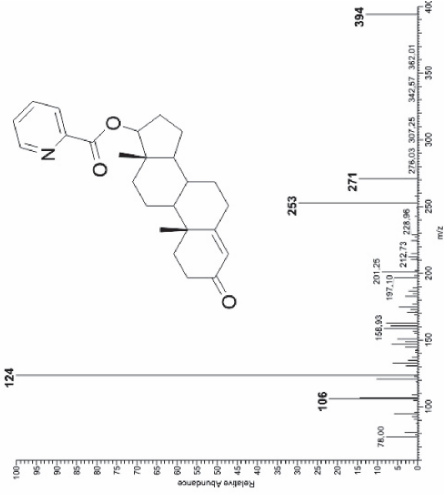
А. Тестостерон



Негативное соединение

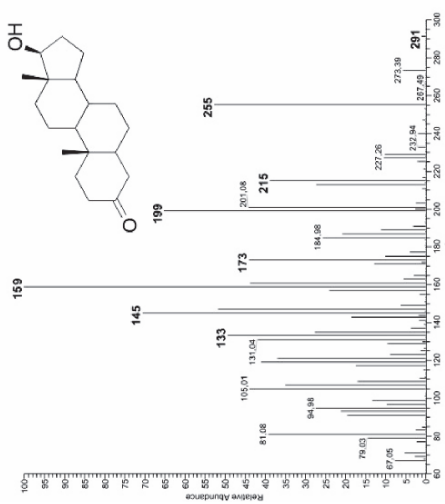


Оксимпроизводное

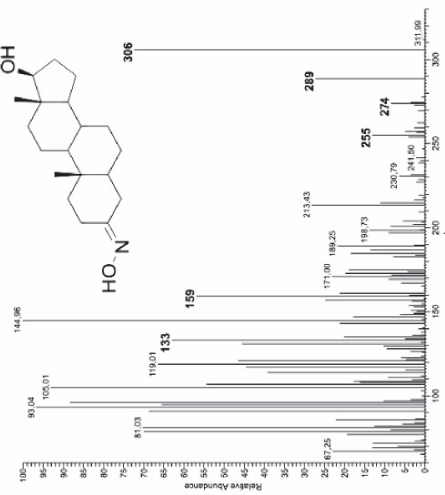


Пиколиноилпроизводное

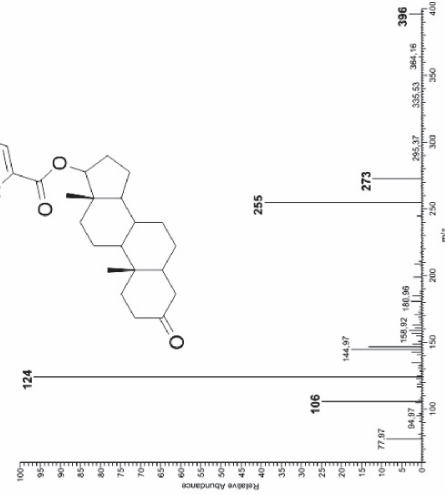
Б. Дигидротестостерон



Негативное соединение



Оксимпроизводное



Пиколиноилпроизводное

Рис. 3. МС/МС спектры анаболических стероидов и продуктов их дериватизации

Таблица 1. Оптимизированные МС/МС-условия определения нативных, оксим- и пиколинпроизводных анаболических стероидов

Группа	Соединение	MRPL (нг/мл)	Нативное соединение			Оксимпроизводное			Пиколинпроизводное																			
			РТ (мин)	Прекур- сор-ион (m/z)	Характеристич- ные ионы (m/z) (СЕ, эВ)	ПД (нг/мл)	РТ (мин)	Прекур- сор-ион (m/z)	Характеристич- ные ионы (m/z) (СЕ, эВ)	ПД (нг/мл)	РТ (мин)	Прекур- сор-ион (m/z)	Характеристич- ные ионы (m/z) (СЕ, эВ)	ПД (нг/мл)														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15														
Группа 1	Андрост-4-ен-3 α ,17 β -диол	10	10.1	291	274 (5) 256 (10) 105 (45) 91 (40)	> 10	Не образуется (нет кето-групп)	396	273 (10) 255 (15) 106 (25) 78 (45)	11.6	11.6	396	271 (15) 253 (25) 147 (25) 124 (15)	0.5														
				289	253 (15) 201 (15) 109 (25) 97 (25)	5			304						138 (35) 124 (25) 112 (25) 78 (50)	10.0	10.0	318	260 (25) 138 (40) 124 (35) 112 (35)	0.1	11.6	394	271 (15) 253 (25) 147 (25) 124 (15)	0.5				
				303	285 (10) 227 (20) 109 (30) 97 (30)	2			318						260 (25) 138 (40) 124 (35) 112 (35)	10.4	10.4	317	138 (35) 124 (35) 112 (35) 77 (45)	0.5	10.4	317	138 (35) 124 (35) 112 (35) 77 (45)	0.5	11.6	394	271 (15) 253 (25) 147 (25) 124 (15)	0.5
				287	269 (15) 211 (20) 109 (35) 97 (35)	10			317						138 (35) 124 (35) 112 (35) 77 (45)	9.7	9.7	317	138 (35) 124 (35) 112 (35) 77 (45)	0.5	9.7	317	138 (35) 124 (35) 112 (35) 77 (45)	0.5	11.6	394	271 (15) 253 (25) 147 (25) 124 (15)	0.5
Группа 2	Эпиметениол	10	9.7	305	270 (10) 228 (20) 213 (25) 202 (20)	10	Не образуется (нет кето-групп)	394	Не образуется (нет гидрокси-групп)	11.6	11.6	394	Не образуется (нет гидрокси-групп)	1														
				289	253 (15) 205 (15) 201 (15) 187 (20)	10									304	272 (25) 201 (25) 187 (25) 145 (35)	10.9	10.9	304	272 (25) 201 (25) 187 (25) 145 (35)	0.5	11.6	394	271 (15) 253 (15) 124 (15) 107 (35)	1			
				303	267 (15) 227 (20) 201 (20) 159 (25)	10									318	260 (20) 201 (25) 159 (35) 145 (35)	11.0	11.0	318	260 (20) 201 (25) 159 (35) 145 (35)	1	11.0	318	260 (20) 201 (25) 159 (35) 145 (35)	1			
				289	267 (15) 227 (20) 201 (20) 159 (25)	10									318	260 (20) 201 (25) 159 (35) 145 (35)	11.0	11.0	318	260 (20) 201 (25) 159 (35) 145 (35)	1	11.0	318	260 (20) 201 (25) 159 (35) 145 (35)	1			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Группа 2	Метаболит 1-андростендиона	10	9.1	289	271 (5) 213 (15) 197 (15) 145 (25)	10	10.9	304	253 (15) 218 (20) 141 (25) 157 (20)	0.5	12,8	394	124 (5) 271 (10) 253 (20) 106 (35)	> 10
		10	9.9	287	211 (10) 203 (20) 185 (20) 143 (20)	10	10.2	317 диоксим	285 (5) 218 (20) 134 (40) 77 (50)	1			Не образуется (нет гидроксигрупп)	
Группа 3	Болденон	10	9.2	287	269 (10) 121 (20) 135 (20) 77 (50)	2	8.4	302	285 (15) 136 (25) 120 (35) 106 (35)	0.5	10.6	392	269 (15) 149 (15) 135 (20) 121 (25)	1
		2	9.6	301	283 (10) 149 (20) 121 (20) 77 (50)	2	10.1	316	280 (20) 172 (25) 136 (30) 120 (35)	0.5			Не образуется (стерическое затруднение при C-17)	
		10	8.6	285	151 (15) 147 (15) 121 (15) 77 (40)	2	9.5	315 диоксим	281 (20) 264 (25) 136 (35) 120 (35)	0.5			Не образуется (нет гидроксигрупп)	
Группа 4	Дигидрогестерон	10	9.9	291	273 (15) 215 (15) 199 (25) 145 (25)	10	10.4	306	255 (25) 201 (20) 173 (30) 159 (35)	0.5	12.1	396	273 (15) 255 (20) 237 (20) 124 (15)	2
		10	8.0	305	229 (20) 213 (20) 187 (20) 159 (20)	10	10.8	320	269 (25) 229 (30) 213 (30) 173 (30)	1			Не образуется (стерическое затруднение при C-17)	
		10	9.9	291	273 (10) 215 (20) 199 (20) 145 (20)	10	11.0	306	273 (15) 255 (20) 215 (20) 147 (25)	0.5	13.3	396	237 (10) 124 (15) 255 (20) 106 (35)	> 10
	Андростерон	10	9.9	291	273 (10) 215 (20) 199 (20) 145 (20)	10	11.0	306	273 (15) 255 (20) 215 (20) 147 (25)	0.5	13.3	396	237 (10) 124 (15) 255 (20) 106 (35)	> 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Группа 4	Андростандион	10	9.9	289	253 (15) 215 (20) 199 (20) 145 (25)	> 10	10.3	318	286 (20) 268 (20) 145 (25) 133 (25)	1		Не образуется (нет гидроксигрупп)		
		10	10.3	291	273 (10) 255 (10) 173 (20) 145 (25)	> 10			Не образуется (нет кето-групп)		12.2	504 дипико- линоил	378 (10) 360 (15) 147 (20) 124 (15)	1
Группа 5	ДГЭА	10	10.4	289	271 (10) 213 (15) 145 (30) 128 (50)	10	10.6	304	286 (20) 271 (10) 197 (30) 157 (35)	0.5	11.2	394	271 (15) 253 (20) 186 (25) 124 (10)	1
		10	9.0	271	253 (20) 227 (20) 178 (40) 165 (50)	1	9.1	286	269 (15) 165 (50) 141 (50) 128 (50)	0.5	8.4	376	253 (15) 197 (20) 169 (35) 91 (45)	1
		10	9.6	309	262 (20) 241 (20) 178 (50) 165 (50)	1	9.8	324	278 (20) 260 (25) 181 (45) 167 (50)	0.1	Не образуется (стерическое затруднение при C-17)			
Группа 6	Тетрагидротестрион	10	10.9	313	266 (20) 241 (25) 239 (15) 159 (25)	1	11.0	328	264 (25) 239 (25) 226 (25) 165 (40)	0.1	Не образуется (стерическое затруднение при C-17)			

Примечание: MRPL — минимально допустимое значение концентрации в соответствии с требованиями ВАДА; RT — время удерживания; SE — энергия коллизии

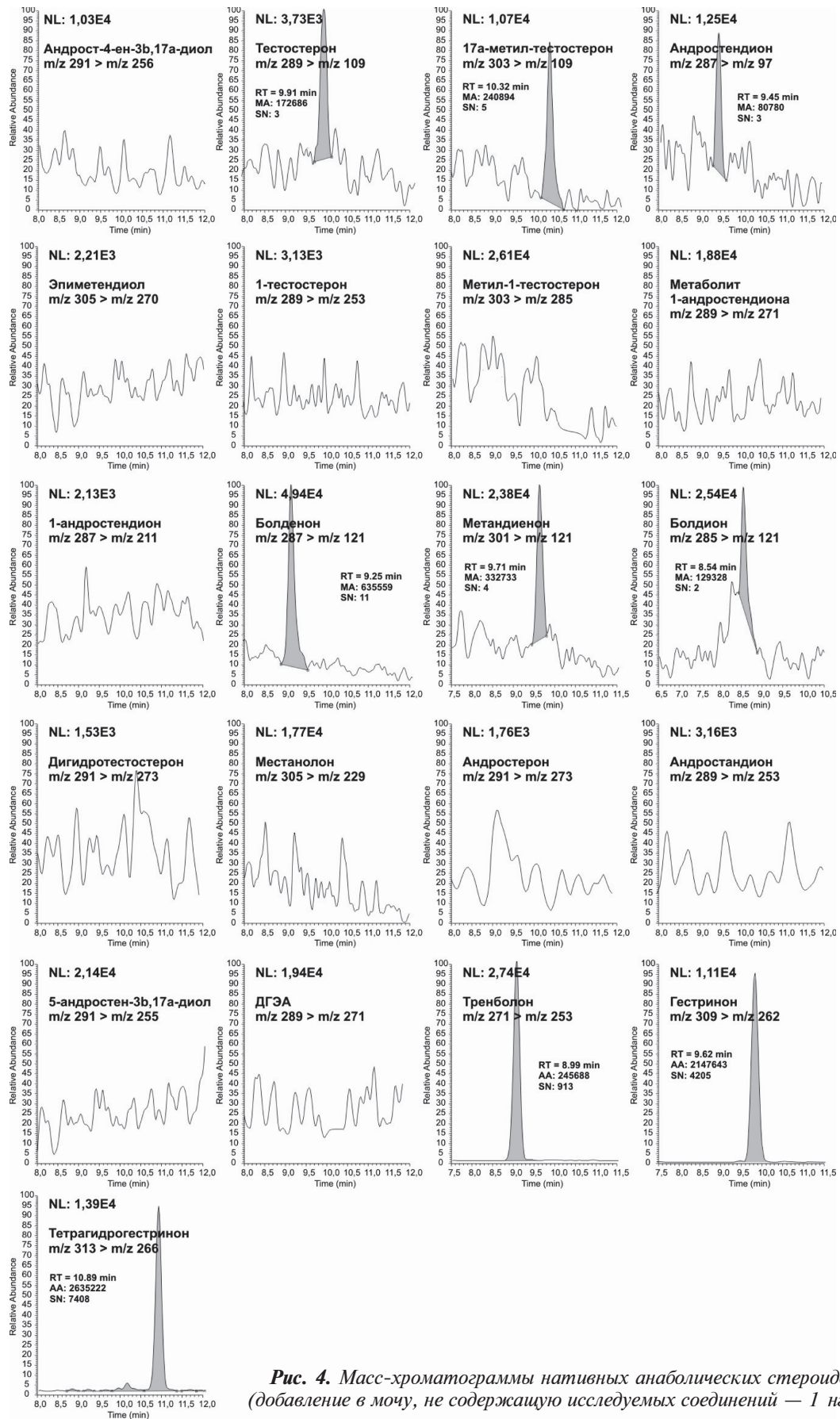


Рис. 4. Масс-хроматограммы нативных анаболических стероидов (добавление в мочу, не содержащую исследуемых соединений — 1 нг/мл)

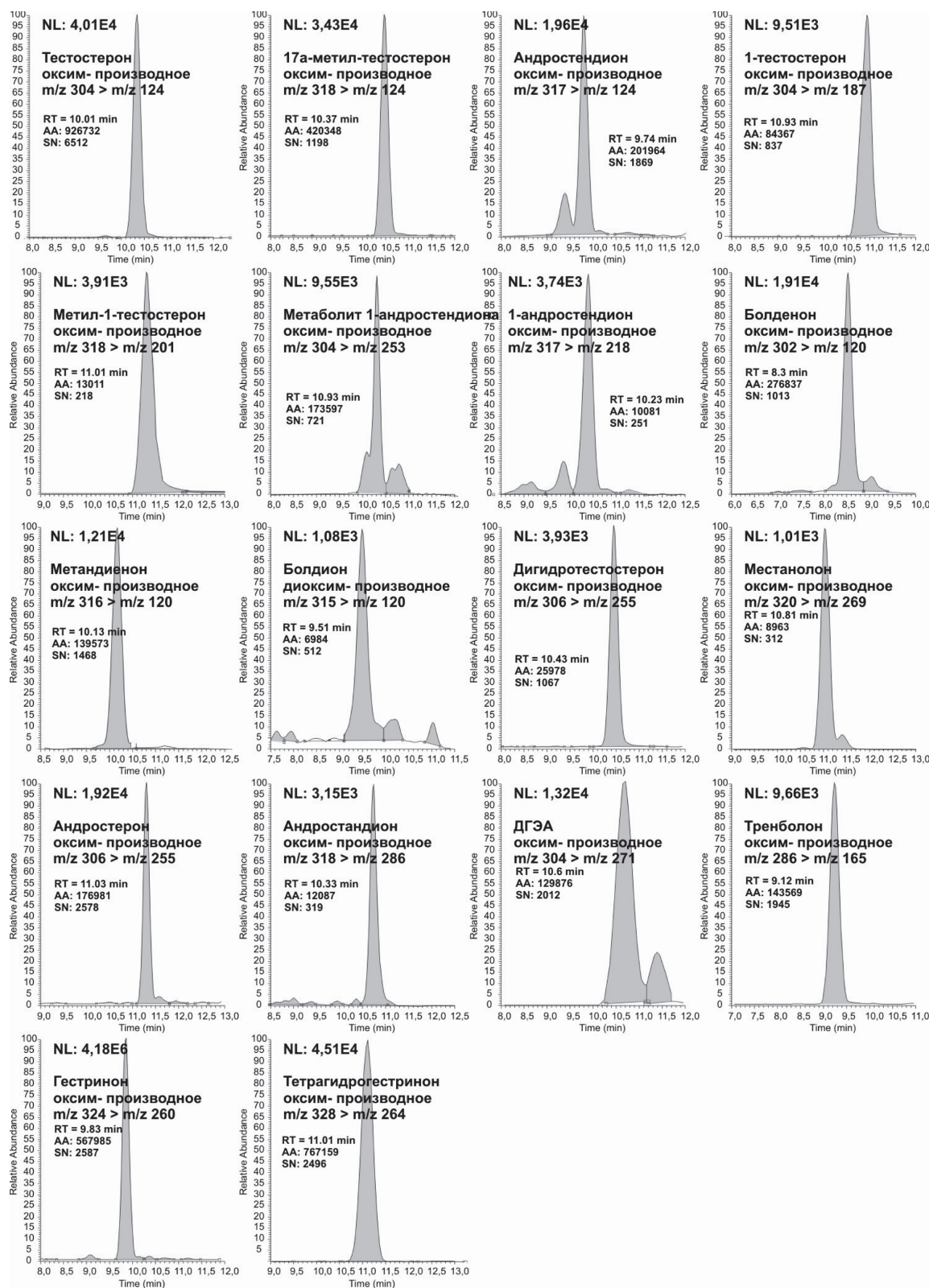


Рис. 5. Масс-хроматограммы оксимпроизводных анаболических стероидов (добавление в мочу, не содержащую исследуемых соединений — 1 нг/мл)

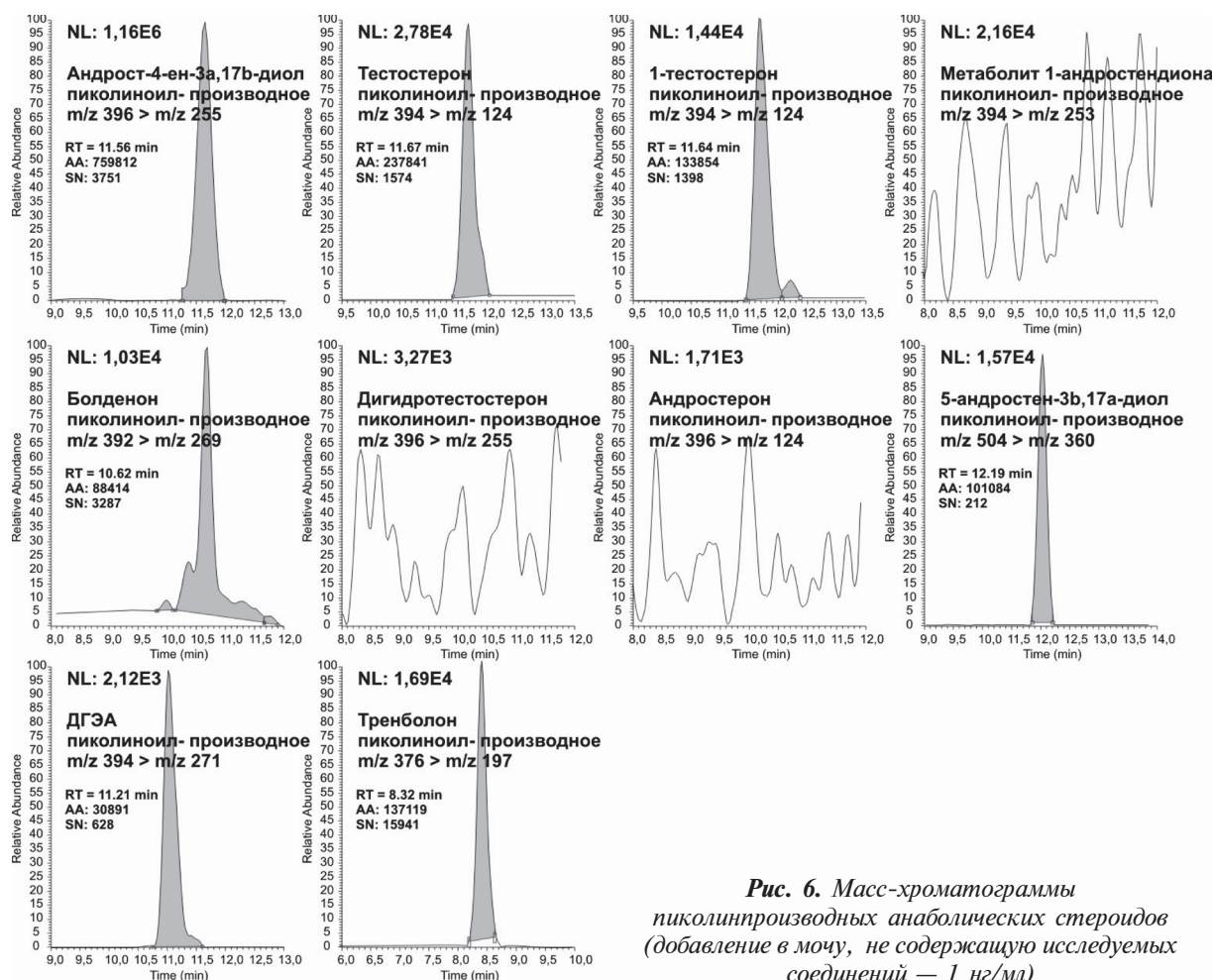


Рис. 6. Масс-хроматограммы пиколинпроизводных анаболических стероидов (добавление в мочу, не содержащую исследуемых соединений — 1 нг/мл)

1-ен-3-кето и 1-ен-3-гидроксистероиды (группа 2)

В представленную группу стероидов были включены эпиметендиол; 1-тестостерон; метил-1-тестостерон; метаболит 1-андростендиона и 1-андростендион. Для 1-тестостерона; метил-1-тестостерона и метаболита 1-андростендиона были получены соответствующие монооксимпроизводные, а для 1-андростендиона — диоксимпроизводное.

МС/МС-спектры, полученные при низких и средних энергиях коллизии, характеризовались потерей одной или двух (метаболит 1-андростендиона) молекул воды. Анализ МС/МС спектров монооксим-производных 1-тестостерона; метил-1-тестостерона и 1-андростендиона выявил наличие сходных путей фрагментации при изучении реакций диссоциации молекул стероидов индуцированных соударениями при высоких и средних значениях энергии коллизии. МС/МС спектры указанных соединений содержали общие потери в -187 Да, -173 Да, -159 Да, -145 Да и -117 Да. Потеря в -103 Да была специфична только для монооксимпроизводного 1-тестостерона.

Диссоциация протонированных молекулярных ионов оксим-производных приводила к образованию характеристичных ионов с m/z 201; m/z 159;

m/z 145 и m/z 131 — для 1-тестостерона и метил-1-тестостерона; а также характеристичных ионов с m/z 183 и m/z 173 — для 1-тестостерона и метил-1-тестостерона соответственно.

Для оксимпроизводных 1-андростендиона и метаболита 1-андростендиона наблюдались общие потери в -193 Да и -176 Да. Образование характеристичных ионов с m/z 285; m/z 245; m/z 218; m/z 141; m/z 131 и m/z 120 было характерно для 1-андростендиона, в то время как с m/z 218; m/z 141; m/z 128; m/z 115 и m/z 111 — для метаболита 1-андростендиона. Кроме того, для 1-андростендиона наблюдалась характеристичная потеря в -99 Да с образованием иона с m/z 218.

Таким образом, на основании данных о наличии специфичных потерь предположительно можно установить принадлежность исследуемого анализа к группе стероидов 1-ен-3-кетоандростановой структуры.

В процессе дериватизации анаболических стероидов пиколиноилпроизводные были получены только для 1-тестостерона и метаболита 1-андростендиона. При этом предел обнаружения пиколиноилпроизводного метаболита 1-андростендиона был более 10 нг/мл. В случае эпиметендиола образование оксим- и пиколиноилпроизводного не наблюдалось ни в одном из наших экспериментов.

Аналогично группе 4-ен-3-кетоандростановых стероидов при анализе путей фрагментации в условиях реакций диссоциации молекул, индуцированных соударениями при низких и средних энергиях коллизии для пиколинпроизводных данной группы наблюдались общие потери в -123 Да и -141 Да. Характеристичные ионы с m/z 271 и m/z 253 были наиболее интенсивными в условиях электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении при низких и средних значениях энергии коллизии и с m/z 106 и m/z 78 при высоких значениях энергии коллизии. Соотношение уровня сигнал/шум для 1-тестостерона был выше в случае пиколиноилпроизводного.

1,4-диен-3-кетостероиды (группа 3)

В группу 1,4-диен-3-кетостероидов были включены болденон, метандиенон и болдион. Образование оксимпроизводных наблюдалось для всех аналитов данной группы, а для болдиона был получен соответствующий диоксим. В МС/МС-спектрах характерна потеря одной или двух молекул воды (-18 Да и -36 Да). Наиболее интенсивными общими ионами являлись характеристичные ионы с m/z 120; m/z 136 и m/z 159. При диссоциации протонированных молекулярных ионов оксимпроизводных наблюдались общие потери в -60 Да и -144 Да и образование характеристичных ионов с m/z 242; m/z 158 — для болденона; m/z 255 и m/z 171 — для болдиона; m/z 256 и m/z 172 — для метандиенона.

Образование пиколиноилпроизводного наблюдалось только для болденона, при этом диссоциация протонированного молекулярного иона вела к образованию характеристичных ионов с m/z 269; m/z 149; m/z 135 и m/z 121. Соотношение сигнал/шум для пиколиноилпроизводного болденона было в 3 раза выше, чем для соответствующего оксимпроизводного (рис. 5 и 6).

андростан-3-кето и андростан-3-гидроксистероиды (группа 4)

Дигидротестостерон, местанолон, андростерон и андростандион были включены в 4-ю группу. Все представленные соединения образовывали соответствующие монооксимпроизводные, а андростандион — моно- и диоксимпроизводные. При увеличении энергии коллизии до 60 эВ для всех представленных оксимпроизводных наблюдались неспецифичные ионы с m/z 145; m/z 133 и m/z 118. Для местанолона и андростерона наблюдались общие потери в -51 Да и -91 Да, при этом интенсивность образованных ионов была выше для андростерона.

Для дигидротестостерона и андростерона были получены соответствующие пиколиноилпроизводные. В случае местанолона нам не удалось получить его пиколилатную форму. МС/МС-спектр пиколиноилпроизводного дигидротестостерона не содержал нейтральных потерь молекул воды. Наиболее интенсивными ионами были ионы с m/z 255; m/z 237; m/z 197; m/z 145 и m/z 124. Соотношение сигнал/шум для дигидротестостерона и андростандиона в обоих случаях было выше для соответствующих оксимпроизводных (рис. 5 и 6).

5-ен-3-кето и 5-ен-3-гидроксистероиды (группа 5)

Среди представленных соединений только для ДГЭА было получено соответствующее оксимпроизводное. В условиях реакций диссоциации молекул, индуцированных соударениями при низких и средних энергиях коллизии, наиболее характерным процессом распада протонированных молекулярных ионов являлась потеря молекул воды и образование характеристичных с m/z 286 и m/z 271. Увеличение энергии коллизии до 60 эВ приводило к образованию характеристичных интенсивных ионов с m/z 197; m/z 171; m/z 157 и m/z 131.

Анализ пиридин-карбоксилатных продуктов дериватизации выявил присутствие моно- и дипиколиноилпроизводных как для ДГЭА, так и для 5-андростен-3 β ,17 α -диола. В условиях реакций диссоциации молекул, индуцированных соударениями при низких и средних энергиях коллизии, наблюдались общие потери в -123 Да и -141 Да с образованием соответствующих характеристичных ионов с m/z 271 и m/z 253 для ДГЭА; и с m/z 378 и m/z 360 для 5-андростен-3 β ,17 α -диола. Увеличение энергии коллизии до 60 эВ приводило к образованию характеристичных интенсивных ионов с m/z 186; m/z 175; m/z 161 и m/z 131 — для ДГЭА и с m/z 255; m/z 159 и m/z 133 для 5-андростен-3 β ,17 α -диола. Соотношение уровня сигнал/шум для ДГЭА в случае оксимпроизводного было выше в полтора раза, чем для пиколиноилпроизводного (рис. 5 и 6).

4,7,9-триен-3-кетостероиды (группа 6)

Для всех исследуемых соединений группы 4,7,9-триен-3-кетостероидов были получены соответствующие оксимпроизводные. Фрагментация интенсивных протонированных молекулярных ионов в условиях реакции диссоциации при низких и средних значениях энергии коллизии вела к образованию общих неспецифичных потерь молекул воды (-18 Да и -36 Да) и неспецифичной потери в -64 Да. Увеличение энергии коллизии до 60 эВ приводило к образованию общих характеристичных ионов с m/z 181; m/z 167; m/z 155 и m/z 141.

Среди исследуемых соединений только для тренболон было получено соответствующее пиколиноилпроизводное. Анализ путей фрагментации выявил наличие характеристичной потери в -123 Да с образованием характеристичного иона с m/z 253. При высоких энергиях коллизии наблюдались ионы с m/z 197; m/z 169; m/z 155; m/z 141 и m/z 129. Соотношение уровня сигнал/шум для пиколиноилпроизводного тренболон было в 8 раз выше уровня соответствующего оксимпроизводного (рис. 5 и 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложен ВЭЖХ-МС/МС-подход к определению анаболических стероидов на основе продуктов их дериватизации. Из-за трудоемкого процесса пробоподготовки и присутствия до-

полнительных стадий дериватизации разработанный метод рекомендуется использовать в качестве подтверждающего метода результатов скринингового анализа, а также в исследованиях, направленных на изучение метаболизма и фармакокинетики стероидов и стероидоподобных структур. Разработанный подход позволяет проводить достоверную идентификацию исследуемых анаболических стероидов на ультранизком уровне концентраций в соответствии с требованиями ВАДА.

Из 21 исследуемого анаболического стероида лишь 9 аналитов могут быть анализированы в нативном виде в концентрации 1 нг/мл (рис. 4). Проведенный сравнительный анализ полученных дериватизированных продуктов анаболических стероидов выявил, что соединения с 3-кето-группой и/или 17-кето-группой образуют соответствующие моно- или диоксимпроизводные. Процесс образования пиколиноилпроизводных остается плохо изученным. Например, при анализе продуктов дериватизации эпиметендиола и андростерона не были выявлены пиколиноилпроизводные ни в одном из проведенных нами экспериментов. Однако на основании полученных нами данных можно заключить, что совместное присутствие заместителя при С-17 и кето-группы лимитирует процесс образования пиколиновых продуктов гидроксистероидов.

Наименьшая чувствительность метода наблюдалась в случае анализа нативного андростандиона, а также соединений, содержащих гидроксигруппу при С-3, в то время как для оксимпроизводных 4-ен-3-кетостероидов нам удалось добиться наибольшей чувствительности метода. Сравнительный анализ применяемых подходов показал, что чувствительность метода изменяется в ряду: группа 1 > группа 6 > группа 3 ~ группа 5 ~ группа 4 ~ группа 2 — для оксимпроизводных исследуемых стероидов, и в ряду группа 1 > группа 6 > группа 2 > группа 3 > группа 4- группа 5 — в ряду пиколинпроизводных (рис. 4—6). При этом наименьшая чувствительность наблюдалась в случае анализа оксимпроизводных андростан-3(17)-кетостероидов.

Сравнительный анализ используемых методов дериватизации показал, что получение оксим- и пиколиноилпроизводных позволяет повысить предел детектирования для дериватизированных продуктов в 10—15 раз по сравнению с нативными соединениями.

Разработанный подход планируется применить к анализу новых классов анаболических стероидов и стероидоподобных структур, а также учесть при проведении исследований метаболизма анаболических стероидов и их метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

- Blasco M., Carriquiriborde P., Marino D., Ronco A.E., Somoza G.M.* A quantitative HPLC-MS method for the simultaneous determination of testosterone, 11-ketotestosterone and 11-beta hydroxyandrostenedione in fish serum // *Journal of Chromatography B.* 2009, 877(14-15):1509—1515.
- Guan F., Uboh C. E., Soma L. R., Lio Y., Rudy J., Tobin T.* Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B.* 2005, 829(1-2):56—68.
- Guan S., Burlingame A. L.* High mass selectivity for top-down proteomics by application of SWIFT technology // *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006, 21(3):455—459.
- Higashi T., Takido N., Yamauchi A., Shimada K.* Electron-capturing derivatization of neutral steroids for increasing sensitivity in liquid chromatography/negative atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry // *Anal Sci.* 2002, 18:1301—1307.
- Lui S., Sjoval J., Griffiths W.J.* Analysis of oxosteroids by nano-electrospray mass spectrometry of their oximes // *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000, 14:390—400.
- Ma Y., Kim H.* Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry // *J Am Soc Mass Spectrom.* 1997, 8(9):1010—1020.
- McKinney A.R.* Modern techniques for the determination of anabolic—androgonic steroid doping in the horse // *Bioanalysis.* 2009, 1(4):785—803.
- Pozo O.J., Van Eenoo P., Deventer K., Grimalt S., Sanchez J.V., Hernandez F., Delbeke F.T.* Collision-induced dissociation of 3-keto anabolic steroids and related compounds after electrospray ionization. Considerations for structural elucidation // *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008, 22(24):4009—4024.
- Pozo O.J., Van Eenoo P., Deventer K., Delbeke F.T.* Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal Bioanal Chem.* 2007, 389(4):1209—1224.
- Ruth A.* Clinical Measurement of Steroid Metabolism // *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2001, 15(1):1—16.
- Thevis M., Bommerich U., Opfermann G., Schanzer W.* Characterization of chemically modified steroids for doping control purposes by electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J Mass Spectrom.* 2005, 40(4):494—502.
- WADA adverse analytical findings and atypical findings reported by accredited laboratories. WADA, 2008. 13 p.
- WADA prohibited list. International standard. Version 5.0, January 2010.
- Williams T.M., Kind A.J., Houghton E., Hill D.W.* Electrospray collision-induced dissociation of testosterone and testosterone hydroxy analogs // *J Mass Spectrom.* 1999, 34(3):206—16.
- Yamashita K., Okuyama M., Watanabe Y., Honma S., Kobayashi S., Numazawa M.* Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Steroids.* 2007, 72(11-12):819—827.