

УДК 547.9:796.071.2

Е. В. Мороз¹, О. В. Стасевич²¹СОАО «Ферейн»²Белорусский государственный технологический университет**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ ДЛЯ СПОРТСМЕНОВ**

В данной работе была осуществлена валидация методики качественного определения анаболических стероидов в биологически активных добавках для спортсменов методом газохроматографического анализа с масс-спектрометрическим детектированием. Экспериментальные исследования были проведены на базе учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» с использованием газового хроматографа Agilent 7890A с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь Agilent 7000. Для проведения анализа проводили предварительную пробоподготовку экстракцией данных веществ из образца и дальнейший перевод этих веществ в летучие триметилсилильные производные. Идентификацию запрещенных веществ в пробе осуществляли по времени удерживания и масс-спектрам данных производных соединений. Было проведено определение валидационных характеристик качественного выявления в биологически активной добавке «Isolife isotonic» пяти анаболических стероидов: 17- α -метилтестостерона, дегидроэпиандростерона, нандролона, метандиенона, тестостерона. В результате валидации данной методики по характеристикам: специфичность, предел обнаружения, степень экстракции, перенос пробы, робастность, было выявлено, что все параметры соответствовали критериям приемлемости. Следовательно, данная методика может быть применима для выявления исследуемых анаболических стероидов в биологически активных добавках для спортсменов и в спортивном питании.

Ключевые слова: анаболические стероиды, газовая хроматография, масс-детекция, валидация, биологически активная добавка, специфичность, предел обнаружения, степень экстракции, перенос пробы, робастность.

E. V. Moroz¹, O. V. Stasevich²¹OJSC “Ferein”²Belarusian State Technological University**VALIDATION OF THE ANABOLIC STEROIDS DETERMINATION METHOD IN BIOLOGICAL ACTIVE ADDITIVES FOR SPORTSMEN**

The validation of the method of qualitative determination of anabolic steroids in biological active additives for sportsmen by gas chromatography with mass-detection has been carried out in this work. The experimental researches have been carried out at the gas chromatograph Agilent 7890A and mass-spectrometer Agilent 7000 with triple quadrupole at health protection institution “National anti-doping laboratory”. The sample preparation has been done by the extraction of the analyzed compounds and their transformation into volatile trimethylsilyl derivatives. The identification of these received compounds has been carried out by their retention time and their mass-spectra. The determination of validation characteristics of qualitative determination of some anabolic steroids in a biological active additive for sportsmen “Isolife isotonic” has been carried out: 17- α -methyltestosterone, dihydroepiandrosterone, nandrolone, methandienone, testosterone. As a result of validation of this method it has been confirmed that such characteristics as selectivity, limit of detection, sample carrying, robustness are in the accordance with acceptable criteria. Consequently, this method could be used for finding out anabolic steroids in biological active additives and special food for sportsmen.

Key words: anabolic steroids, gas chromatography, mass-detection, validation, biological active additives, selectivity, limit of detection, sample carrying, robustness.

Введение. Анаболические стероиды (АС) относятся к запрещенным фармакологически активным веществам, которые имитируют действие мужского полового гормона тестостерона. Благодаря своим свойствам усиливать синтез белка, а тем самым ускорять все пластические процессы в организме, эти вещества могут быть

нелегально использованы для наращивания мышечной массы и в спорте в соревновательный период в качестве допинга. Более того, употребление анаболических стероидов имеет негативное побочное влияние на организм человека, поэтому контроль содержания данных веществ в спортивном питании и биологических жидкостях

спортсменов является актуальной задачей для Республики Беларусь. В настоящее время функционирует учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория», целью работы которого является проведение независимого объективного антидопингового лабораторного контроля с соблюдением антидопингового регламента, а также использованием современных методов, позволяющих идентифицировать запрещенные допинговые вещества в пробах биологических жидкостей и спортивном питании. Традиционно анаболические стероиды анализируют методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [1].

Одним из способов подтверждения гарантии получения правильных и производимых результатов является валидация метода испытаний.

Основная часть. Целью данной работы является валидация методики качественного определения анаболических стероидов в биологически активных добавках для спортсменов методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии.

Объектом исследования являлась биологически активная добавка (БАД) для спортсменов «Isolife isotonic» производства «БелИзоЛайф».

Предметом экспериментального исследования были выбраны тестостерон (1), нандролон (2), дегидроэпиандростерон (3), метандиенон (4), 17- α -метил-1-тестостерон (5) как наиболее представительные и чаще встречающиеся анаболики в фальсифицированном спортивном питании и биологически активных добавках (рис. 1).

Проведение экспериментальных исследований осуществлялось в учреждении здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория».

При проведении валидации методики были рассчитаны и проанализированы на соответствие критериям приемлемости пять параметров: специфичность, предел обнаружения, степень экстракции, перенос пробы, робастность. Анаболические стероиды анализировали методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. В ходе анализа использовали хроматограф газовый Agilent 7890A (Agilent Technologies,

США) с масс-детектором типа тройной квадруполь (Agilent 7000, Agilent Technologies, США) и устройством автоматического ввода жидких проб (Autosampler 7693, Agilent Technologies, США). В качестве неподвижной фазы служил диметилполисилоксан, нанесенный слоем толщиной 0,25 мкм на внутренние стенки хроматографической капиллярной колонки длиной 25 м с внутренним диаметром 0,25 мм. Для обработки результатов использовалась программа для работы с хромато-масс-спектрометром MassHunter GC/MS Acquisition. Подвижной фазой служил газ гелий. Параметры хроматографирования были следующими: температура испарителя – 270°C; температура линии переноса пробы – 300°C; режим ввода пробы в колонку – без деления потока; объем вводимой пробы – 1 мкл; скорость потока – 0,9 мл/мин. Температурный режим колонки: температура – 300°C, скорость изменения температуры – 8°C/мин, время поддержания достигнутой температуры – 4,25 мин. Параметры режима работы масс-спектрометрического детектора были следующими: условия ионизации – электронный удар с энергией ионизации 70 эВ; температура ионного объема – 230°C; время детектирования одного иона – 15 мс; отброс потока – до 8 мин.

В качестве газа для вторичной ионизации служил азот.

Пробоподготовка включала в себя жидкостную экстракцию и предколонную дериватизацию N-метил-N-(триметилсилил)-трифтороацетамидом (MSTFA) (Carl Roth).

В результате дериватизации получались бис-триметилсилил- (бис-ТМС-) производные, обладающие хорошей летучестью и термической стабильностью: бис-ТМС-тестостерон (1а), бис-ТМС-нандролон (2а), бис-ТМС-дегидроэпиандростерон (3а), бис-ТМС-метандиенон (4а), 17- α -метил-1-тестостерон (5а) с молекулярной массой 433,4; 419,4; 433,4; 445,4; 447,5 г/моль соответственно. В качестве внутреннего стандарта использовали бис-триметилсилил-производное 1-метил-5 α -андростан-3 α -ол-17-она (National measurement Institute) с молекулярной массой 447,5 г/моль.

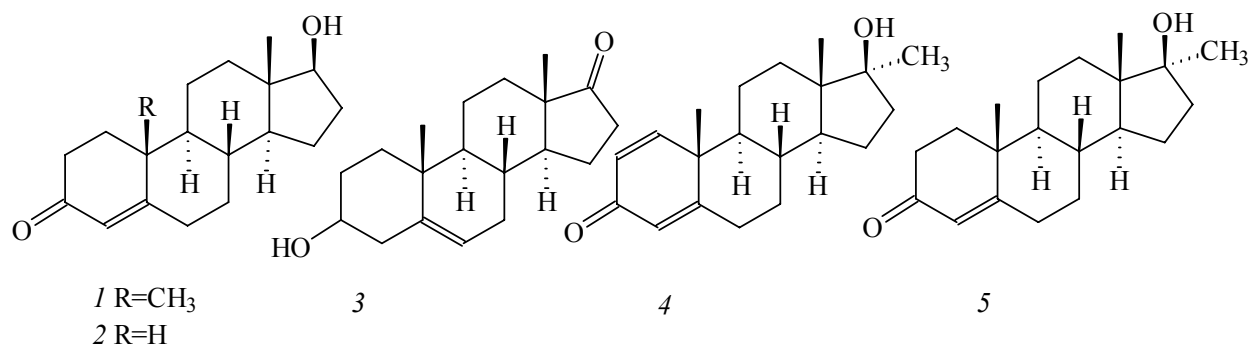


Рис. 1. Структурные формулы анализируемых анаболических стероидов:

1 – тестостерон; 2 – нандролон; 3 – дегидроэпиандростерон; 4 – метандиенон; 5 – 17- α -метил-1-тестостерон

Идентификацию бис-ТМС-производных анаболических стероидов осуществляли по временам удерживания и по масс-спектрам. Время удерживания и значение m/z для наиболее характерного молекулярного иона этих соединений $[M-H]^+$ представлены в табл. 1.

Таблица 1

Абсолютные времена удерживания и значение m/z для иона $[M-H]^+$ бис-ТМС-производных АС и внутреннего стандарта

Обозначение соединения	Время удерживания, мин	Значение m/z для иона $[M-H]^+$
1a	22,999	432,5
2a	22,015	419,4
3a	21,752	432,4
4a	22,999	444,4
5a	23,144	446,5
6a	21,662	446,5

В масс-спектрах веществ, содержащих ТМС-группу, наблюдался триплет пиков в области молекулярных ионов, обусловленных наличием у кремния изотопов ^{29}Si и ^{30}Si . Кроме того, для ТМС-производных было характерно отщепление частиц CH_3 и $(CH_3)_3Si$ (15 и 73 а.е.м. соответственно) от молекулярного иона [2]. Валидация методики по качественному определению анаболических стероидов в биологически активной добавке была проведена для всех исследуемых АС, но в данной статье будет представлена на примере тестостерона как наиболее характерного анаболика, встречающегося в фальсифицированных препаратах.

Специфичность валидируемой методики была оценена путем анализа участков хроматограмм стандартного раствора бис-ТМС-тесто-

стерона, внутреннего стандарта бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она и холостого раствора БАД, содержащего дериватизирующую смесь, с применением следующих критериев приемлемости: а) на хроматограммах стандартных растворов должны присутствовать пики определяемых соединений, при этом значение соотношения сигнал/шум должно составлять не менее 3 : 1; б) на хроматограмме холостого раствора должны отсутствовать пики.

Хроматограммы стандартных растворов бис-ТМС-тестостерона и бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она представлены на рис. 2. Критерии приемлемости для специфичности выполнялись: на хроматограммах стандартных растворов присутствовали пики определяемых соединений с временами удерживания для бис-ТМС-тестостерона 22,392 мин, а для бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она 21,662 мин, и на хроматограмме холостого раствора отсутствовали пики.

Также был оценен предел обнаружения. Для этого были приготовлены четыре раствора БАД с концентрациями бис-ТМС-тестостерона в них 5, 10, 30, 70 нг/мл и четыре раствора бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она с аналогичными концентрациями. Критерии приемлемости заключались в следующем: а) на хроматограммах растворов должны присутствовать пики определяемых соединений, при этом значение соотношения сигнал/шум должно составлять не менее 3 : 1; б) абсолютное время удерживания пика бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она должно отличаться от пика бис-ТМС-тестостерона соответствующей концентрации не более чем на 0,1 мин. Абсолютные времена удерживания соединений представлены в табл. 2.

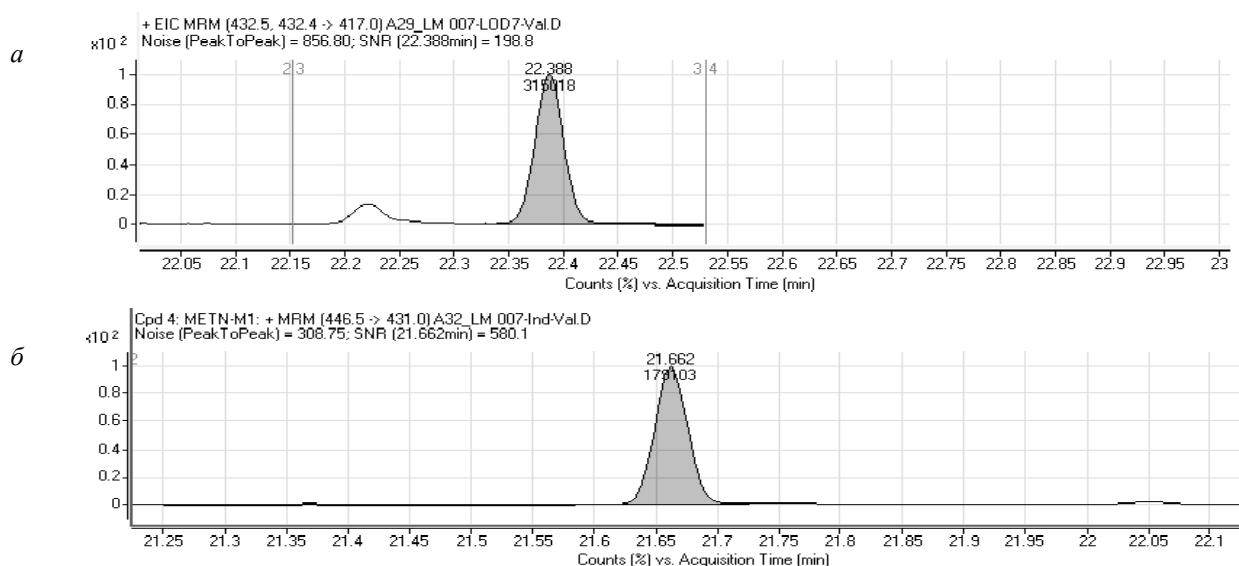


Рис. 2. Хроматограммы стандартных растворов бис-ТМС-тестостерона (а) и бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она (б)

Таблица 2
**Абсолютные времена удерживания
 бис-ТМС-тестостерона (1а)
 и бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она (6а)**

Концентрация, нг/мл	Время удерживания, мин	
	1а	6а
5	22,386	22,298
10	22,385	22,296
30	22,388	22,295
70	22,390	22,301

Как видно из табл. 2, критерии приемлемости для предела обнаружения выполнялись: абсолютные времена удерживания пиков бис-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она отличаются от пиков бис-ТМС-тестостерона соответствующей концентрации не более чем на 0,1 мин.

Для оценки степени экстракции анализировали три экстракта из БАД с содержанием стандарта тестостерона, а также три раствора БАД с содержанием тестостерона до экстракции. Степень экстракции стероидов из биологически активной добавки в соответствии с критерием приемлемости должна составлять не менее 20%. Степень экстракции рассчитывали как соотношение среднего значения площади пика определяемого на хроматограмме соединения, добавленного в раствор до экстрагирования, к площади пика определяемого соединения, добавленного в раствор после экстрагирования.

Степень экстракции составила 72,1%, что соответствовало критерию приемлемости.

Также было доказано, что отсутствует перенос пробы иглой шприца автосэмплера при выполнении последовательных хроматографических анализов из предыдущих опытов. Для этого проводили анализ нескольких проб с использованием шести холостых растворов и шести растворов со стандартом тестостерона поочередно. Данный критерий приемлемости выполнялся. Робастность валидируемой методики оценивалась путем анализа результатов испытаний, выполненных двумя различными операторами, а также экстракцией анализируемого соединения различными объемами растворителей (3,0; 3,5 см³). Оценку результатов для исследования робастности проводили аналогично как для предела обнаружения. Критерии приемлемости для параметра робастность также выполнялись.

Заключение. Таким образом, была осуществлена валидация методики качественного определения анаболических стероидов в БАД «Isolife isotonic» газохроматографическим методом анализа, которая показала, что все критерии приемлемости выполняются по таким валидационным характеристикам, как специфичность, предел обнаружения, степень экстракции, перенос пробы, робастность, и методика может быть использована для обнаружения этих соединений в БАД.

Литература

1. Aniński P. Hair analysis of anabolic steroids in connection with doping-control results from horse sample // *Journal of Mass Spectrometry*. 2008. No. 43. P. 1001–1008.
2. Соколова Л. С., Ефремов А. А. Применение хромато-масс-спектрометрии в исследовании гормонов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2012. Т. 12, № 6. С. 1033–1041.

References

1. Aniński P. Hair analysis of anabolic steroids in connection with doping-control results from horse sample. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, no. 43, pp. 1001–1008.
2. Sokolova L. S., Efremov A. A. The appliance of chromat-mass-spectrometry in the research of hormones. *Sorbcionnye i chromatographicheskie processy* [Sorbntional and chromatographic processes], 2012, vol. 12, no. 6, pp. 1033–1041 (In Russian).

Информация об авторах

Мороз Екатерина Викторовна – инженер по стандартизации и сертификации. СОАО «Ферейн» (220014, г. Минск, пер. С. Ковалевской, 52а, Республика Беларусь). E-mail: katti_frost@mail.ru

Стасевич Ольга Викторовна – кандидат химических наук, доцент кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: stasevich@belstu.by

Information about the authors

Moroz Ekaterina Victorovna – engineer of standardization and certification. OJSC “Ferein” (52a, S. Kovalevskoi lane, 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: katti_frost@mail.ru

Stasevich Ol'ga Victorovna – PhD (Chemistry), Assistant Professor, Department of Physical-Chemical Methods of Products Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: stasevich@belstu.by

Поступила 19.02.2016