

УДК 543.544.5.068.7

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ AICAR В МОЧЕ МЕТОДОМ УЛЬТРАВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ–ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2019 г. Е. В. Дмитриева<sup>а</sup>, \*, А. З. Темердашев<sup>а</sup>, А. А. Азарян<sup>а</sup>, Э. М. Гашимова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Кубанский государственный университет  
350040 Россия, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

\*e-mail: catherine\_dmitrieva@outlook.com

Поступила в редакцию 25.04.2018 г.

После доработки 01.10.2018 г.

Принята к публикации 06.03.2019 г.

Предложена методика определения AICAR (5-аминоимдазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид, акадезин), являющегося агонистом АМФ-активируемой протеинкиназы и запрещенного Всемирным антидопинговым агентством в 2009 г., в моче, которая включает очистку проб от матричных компонентов твердофазной экстракцией и определение аналита методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с нагреваемым источником ионизации электрораспылением. Из-за эндогенной природы AICAR для его определения и оценки матричных эффектов применяли метод стандартных добавок. Предел обнаружения составил 5 нг/мл, градуировочные зависимости линейны в диапазоне 50–5000 нг/мл. Предложенная методика апробирована на реальных образцах.

**Ключевые слова:** AICAR, акадезин, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, тандемное масс-спектрометрическое детектирование, твердофазная экстракция, моча, допинг-контроль.

**DOI:** 10.1134/S0044450219090044

Малоподвижный образ жизни приводит к увеличению риска появления различных хронических заболеваний (сердечно-сосудистых, ожирения и диабета второго типа) [1]. Физическая активность, напротив, способствует предотвращению этих заболеваний. Некоторые болезни, включая заболевания позвоночника, метаболические и сердечно-сосудистые расстройства, приводят к невозможности регулярных занятий спортом [2]. В подобных случаях огромный интерес представляет разработка пероральных препаратов, способных имитировать благоприятные эффекты от занятий спортом [3].

Примером подобных препаратов является AICAR (схема 1), который часто называют “упражнениями в таблетке”. Этот препарат является синтетическим аналогом аденозинмонофосфата (АМФ), активирующего АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК). Последняя играет важную роль в клеточном энергетическом метаболизме [4], вследствие чего получила название “энергетического сенсора” или “регулятора метаболизма” [5]. Так, в скелетной мышечной ткани активация АМФК приводит к увеличенному поглощению глюкозы, повышенной чувствитель-

ности к инсулину и окислению жирных кислот; в печени – к усилению окисления жирных кислот и уменьшению образования глюкозы [6–8]. Установлено, что введение AICAR приводит к увеличению выносливости крыс с малоподвижным образом жизни даже без физических упражнений [3]. Все это делает AICAR объектом повышенного внимания спортсменов и, как следствие, привело к запрету Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) [9].

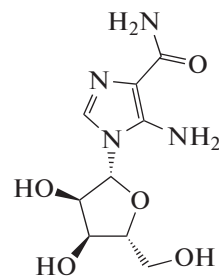


Схема 1. Структурная формула AICAR.

Принимая во внимание эндогенную природу AICAR и, следовательно, его значительное содержание в моче, требуется разработка методик

**Таблица 1.** Программа детектирования AICAR в режиме мониторинга выбранных реакций

Ион-предшественник, $m/z$	Ион-продукт, $m/z$	Энергия соударений, эВ	Интенсивность иона-продукта, %	$t_R$ , мин	Напряжение на экстрагирующей линзе, В
259.1	110.1	24	100	0.75	48
	127.1	11	83 ± 5		

определения высоких концентраций данного аналита [10]. Методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии было проанализировано 499 образцов мочи спортсменов, средняя концентрация эндогенного AICAR в моче человека составила  $2186 \pm 1655$  нг/мл, причем гендерная принадлежность не влияет на содержание данного соединения [11]. Недостаточное разбавление образца мочи [10, 11] может привести к значительному матричному эффекту, а в случае отсутствия предколонки – к быстрому износу аналитической колонки. В связи с этим для определения данного аналита в биологических жидкостях применяли подход “разбавил и вколол” с использованием обращенно-фазовой [12, 13] и гидрофильной (HILIC) [14] хроматографии. Ввиду высокой полярности AICAR слабо удерживается в обращенно-фазовой ВЭЖХ по сравнению с HILIC, но в то же время обращенно-фазовые сорбенты шире распространены в допинг-контроле. Из-за потенциальных матричных эффектов, возникающих при использовании процедуры “разбавил и вколол”, для корректной оценки содержания AICAR рекомендуют использовать изотопно-меченный внутренний стандарт [15].

Для получения более “чистых” проб возможно применение твердофазной экстракции (ТФЭ) или фракционирования на жидкостном хроматографе. Так, ВЭЖХ использовали для очистки образцов мочи с последующим определением 3-триметилсилильных производных AICAR методом изотопной газовой хромато-масс-спектрометрии с предварительным сжиганием [16, 17]. Несмотря на то, что данная процедура очистки проб мочи эффективна, ее недостатками являются длительность и трудоемкость.

Цель настоящей работы – разработка экспрессного и эффективного способа очистки проб мочи от матричных компонентов для последующего определения AICAR методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ–МС/МС).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и реагенты.** Использовали стандартный образец AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) (Shanghai

Soyoung Biotech. Inc., Китай), ацетонитрил для ВЭЖХ–МС (Biosolve, Израиль), муравьиную кислоту (98%) (Acros Organics). Воду 18.2 МΩ получали с помощью системы Milli-Q. Для проведения ТФЭ использовали патроны Sep-Pak Amino-propyl (NH<sub>2</sub>) Plus Short Cartridge, масса сорбента 360 мг (Waters, Milford, Massachusetts, USA).

**Приборы и оборудование.** Использовали систему УВЭЖХ–МС/МС, включающую тройной квадрупольный масс-спектрометр Thermo TSQ Access Max (San-Jose, USA) с нагреваемым источником ионизации электрораспылением и жидкостный хроматограф Dionex Ultimate-3000, состоящий из дегазатора, бинарного градиентного насоса, автоматического дозатора, термостата и колонки Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм).

**Условия определения.** Подвижная фаза состояла из 0.1%-ной муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1%-ной муравьиной кислоты в метаноле (элюент В), элюировали в изократическом режиме при соотношении элюентов А и В (95 : 5, по объему). Расход подвижной фазы составил 0.45 мл/мин, температура термостата 40°C. Общая продолжительность анализа 6 мин. Объем вводимой пробы 10 мкл. До и после ввода пробы иглу автоматического дозатора промывали смесью ацетонитрил–изопропанол–вода (50 : 30 : 20, по объему).

Ионизацию аналита проводили с использованием нагреваемого источника ионизации электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов со следующими значениями параметров: температура испарителя 400°C, температура трансферного капилляра 320°C, напряжение на источнике ионизации 4 кВ, расход газа распылителя (азот) 60 усл. ед., расход вспомогательного газа (азот) 10 усл. ед.

Аналит определяли в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM) посредством диссоциации иона-предшественника, индуцируемой соударением, (газ-мишень аргон, давление 1.5 мторр) и детектирования ионов-продуктов. Согласно рекомендациям [15] для надежного определения аналита необходимо детектировать как минимум два перехода ион-предшественник–ион-продукт (табл. 1).

**Приготовление стандартных растворов.** Стандартный раствор AICAR с концентрацией

200 мкг/мл готовили растворением навески вещества в воде, градуировочные растворы получали разбавлением стандартного раствора ацетонитрилом. Растворы контроля качества готовили независимо от градуировочных растворов. Полученные растворы хранили при 4°C не более месяца.

**Подготовка проб к анализу.** Перед ТФЭ проводили десятикратное разбавление образца мочи (200 мкл) ацетонитрилом. Патроны для ТФЭ кондиционировали 2 мл ацетонитрила и вводили образец со скоростью 0.5 мл/мин. Далее патрон промывали ацетонитрилом для удаления мешающих компонентов матрицы, сушили его в токе азота и элюировали аналит 1 мл воды. Элюат анализировали методом УВЭЖХ–МС/МС.

**Построение градуировочных зависимостей.** Для установления степени извлечения AICAR с патрона для ТФЭ готовили водные модельные растворы с концентрациями 5, 12.5, 25, 37.5, 50, 125, 250, 375, 500, 1000, 2500, 5000 нг/мл путем десятикратного разбавления градуировочных растворов.

Из-за отсутствия изотопно-меченного внутреннего стандарта применяли метод стандартных добавок: аликвоту (200 мкл) мочи разбавляли в 10 раз ацетонитрилом, содержащим 100 мкл градуировочного раствора AICAR и проводили процедуру ТФЭ. Растворы контроля качества низкой (125 нг/мл), средней (500 нг/мл) и высокой (2500 нг/мл) концентрации готовили в тех же условиях и анализировали 3 раза в течение одного дня. Кроме того, для оценки матричных эффектов и предела обнаружения в аналогичных условиях получали градуировочные зависимости, используя образцы воды вместо мочи.

Все градуировочные зависимости строили 6 раз с использованием разных образцов мочи, полученных от добровольцев (мужчин и женщин).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения удовлетворительного удержания аналита изучали колонки с октадецильной и фенил-гексилной неподвижной фазами (обе колонки Phenomenex Kinetex, 100 × 2.1 мм, 1.7 мкм, с соответствующими предколонками). Полярный AICAR слабо удерживался на обеих колонках. Для разработки методики выбрана более распространенная колонка с октадецильной фазой. В качестве подвижной фазы изучали системы 0.1%-ная муравьиная кислота в ацетонитриле–0.1%-ная муравьиная кислота в воде и 0.1%-ная муравьиная кислота в метаноле–0.1%-ная муравьиная кислота в воде. При применении последней системы AICAR лучше удерживался на сорбенте. Поскольку метод ТФЭ позво-

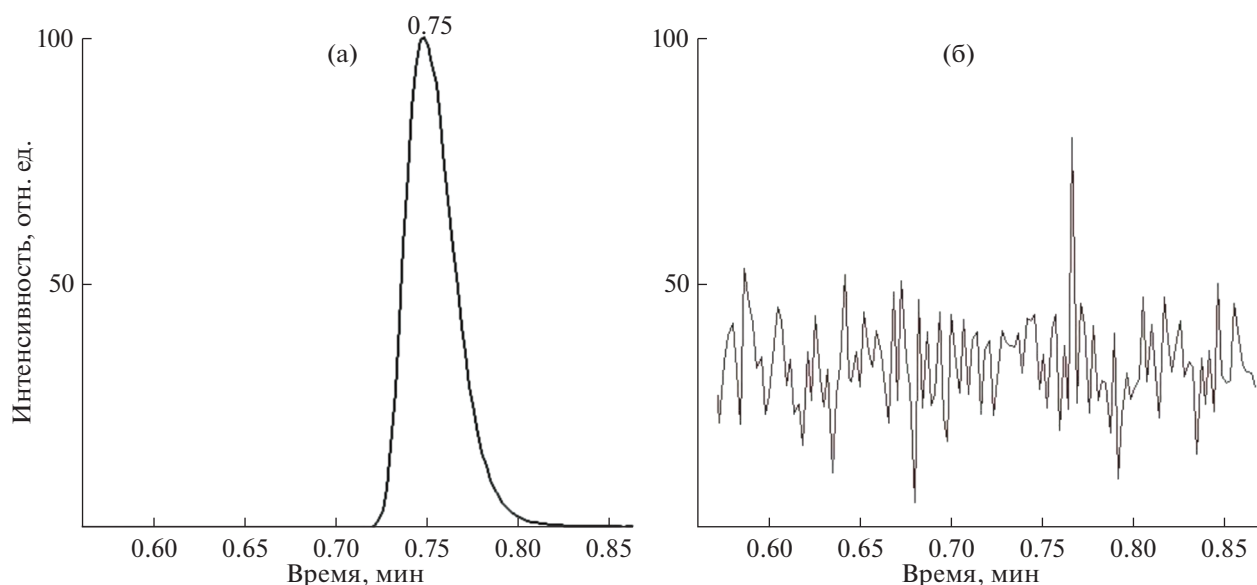
лил получить пробы, лишенные большинства матричных компонентов, слабое удерживание аналита на колонке было приемлемым.

При оптимизации процедуры очистки образцов мочи от матричных компонентов исследовали несколько типов сорбентов для ТФЭ: Biotage Isolute SCX (100 мг, 1 мл, Biotage, Charlotte, USA), Biotage Isolute HAX (100 мг, 1 мл, Biotage, Charlotte, USA), Oasis HLB (60 мг, 3 мл, Waters, Milford, USA) и Sep-Pak Aminopropyl (NH<sub>2</sub>) Plus Short Cartridge (360 мг, Waters, Milford, Massachusetts, USA), используя процедуры экстракции, рекомендуемые производителями (данные не представлены). Наилучшие результаты были получены с использованием сорбента с аминопропильными группами. В оптимальных условиях, описанных ранее, степень извлечения аналита с патрона составила 81 (±12)%. Загрузка большего объема образца с его меньшим разбавлением приводила к проскоку аналита.

Предел обнаружения находили экспериментально путем анализа водных градуировочных растворов, прошедших стадию ТФЭ. При концентрации AICAR 5 нг/мл соотношение сигнал/шум составило 3 : 1. Предел определения также оценивали по градуировочным зависимостям, при концентрации 50 нг/мл погрешность определения аналита составила менее 15%. Градуировочные зависимости линейны в диапазоне концентраций 50–5000 нг/мл, коэффициент корреляции составил 0.999. Селективность методики устанавливали сравнением времен удерживания, а также по интенсивностям образующихся ионов-продуктов при масс-спектрометрическом детектировании в режиме мониторинга заданных реакций в стандартном образце и образце мочи после ТФЭ. Перекрестное загрязнение оценивали путем анализа холостой пробы (воды) после раствора контроля качества с высокой концентрацией (2500 нг/мл) (рис. 1).

Матричные эффекты оценивали сопоставлением откликов аналита на разных уровнях концентраций, полученных при ТФЭ с использованием воды и образцов мочи с добавкой аналита. Их рассчитывали как отношение аналитического сигнала аналита в образце мочи (после пересчета с учетом содержания эндогенного AICAR) к аналитическому сигналу аналита, полученному в модельном растворе, и выражали в процентах. Матричные эффекты составили 89–102%, что указывает на незначительное влияние матричных компонентов на результаты количественного анализа.

Воспроизводимость (относительное стандартное отклонение) и правильность контролировали путем анализа растворов контроля качества низ-



**Рис. 1.** Оценка перекрестного загрязнения: (а) – раствор контроля качества высокой концентрации (2500 нг/мл), (б) – холостой раствор.

кой (125 нг/мл), средней (500 нг/мл) и высокой (2500 нг/мл) концентраций (табл. 2). Результат признавали удовлетворительным, если погрешность составляла менее 15% [18].

Таким образом, использование ТФЭ позволяет эффективно очищать образцы мочи от матричных компонентов и определять АІСАР в широком диапазоне концентраций с высокими точностью и надежностью.

Исследования проводили в рамках выполнения проекта № 4.2612.2017/ПЧ Минобрнауки РФ и при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-33-20009 мол а вед, с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Ку-

банского госуниверситета, уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loef B., de Hollander E.L., Boot C.R.L., Proper K.I. Physical activity of workers with and without chronic diseases // *Prev. Med. Rep.* 2016. V. 3. P. 30.
2. Li S., Laher I. Exercise pills: At the starting line // *Trends Pharmacol. Sci.* 2015. V. 36. № 12. P. 906.
3. Narkar V.A., Downes M., Yu R.T., Emblar E., Wang Y.X., Banayo E., Mihaylova M.M., Nelson M.C., Zou Y., Juguilon H., Kang H., Shaw R.J., Evans R.M. AMPK and PPAR $\delta$  agonists are exercise mimetics // *Cell.* 2008. V. 134. № 3. P. 405.
4. Towler M.C., Hardie D.G. AMP-Activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling // *Circ. Res.* 2007. V. 100. № 3. P. 328.
5. Pokrywka A., Cholbinski P., Kaliszewski P., Kowalczyk K., Konczak D., Zembron-Lacny A. Metabolic modulators of the exercise response: doping control analysis of an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (GW501516) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) // *J. Physiol. Pharmacol.* 2014. V. 65. № 4. P. 469.
6. Musi N., Goodyear L.J. Targeting the AMP-activated protein kinase for the treatment of type 2 diabetes // *Curr. Drug Targets Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 2002. V. 2. № 2. P. 119.
7. Viollet B., Mounier R., Leclerc J., Yazigi A., Foretz M., Andreelli F. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders // *Diabetes Metab.* 2007. V. 33. № 6. P. 395.

**Таблица 2.** Результаты оценки правильности и воспроизводимости методики определения АІСАР ( $n = 18$ )

Введено, нг/мл	В один день		В разные дни	
	отн. погрешность, %	$s_r$	отн. погрешность, %	$s_r$
125	4.2	0.10	7.5	0.14
500	2.3	0.06	3.4	0.13
2500	1.4	0.05	-3.1	0.09

8. *Hardie D.G., Ross F.A., Hawley S.A.* AMPK – a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 13. № 4. P. 251.
9. World Anti-Doping Agency (2018). The World Anti-Doping Code. The 2018 Prohibited List. International Standard. [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited\\_list\\_2018\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf) (2018) (04.04.2018).
10. *Guddat S., Solymos E., Orlovius A., Thomas A., Sigmund G., Geyer H., Thevis M., Schänzer W.* High-throughput screening for various classes of doping agents using a new ‘dilute-and-shoot’ liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach // *Drug Test. Anal.* 2011. V. 3. № 11–12. P. 836.
11. *Thomas A., Beuck S., Eickhoff J.C., Guddat S., Krug O., Kamber M., Schänzer W., Thevis M.* Quantification of urinary AICAR concentrations as a matter of doping controls // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. № 8. P. 2899.
12. *Kwok W.H., Choi T.L.S., Kwok K.Y., Chan G.H.M., Wong J.K.Y., Wan T.S.M.* Doping control analysis of 46 polar drugs in horse plasma and urine using a ‘dilute-and-shoot’ ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1451. P. 41.
13. *Wong J.K.Y., Kwok W.H., Chan G.H.M., Choi T.L.S., Ho E.N.M., Jaubert M., Bailly-Chouriberry L., Bonnaire Y., Cawley A., Ming Williams H., Keledjian J., Brooks L., Chambers A., Lin Y., Wan T.S.M.* Doping control study of AICAR in post-race urine and plasma samples from horses // *Drug Test. Anal.* 2017. V. 9. № 9. P. 1363.
14. *Görgens C., Guddat S., Orlovius A.K., Sigmund G., Thomas A., Thevis M., Schänzer W.* “Dilute-and-inject” multi-target screening assay for highly polar doping agents using hydrophilic interaction liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry for sports drug testing // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 18. P. 5365.
15. WADA Technical Document – TD2015IDCR, [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr\\_-\\_eng.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf) (2018) (04.04.2018).
16. *Buisson C., Frelat C., Mongongu C., Martinat N., Audran M.* Implementation of AICAR analysis by GC-C-IRMS for anti-doping purposes // *Drug Test. Anal.* 2017. V. 9. № 11–12. P. 1704.
17. *Piper T., Thomas A., Baume N., Sobolevsky T., Saugy M., Rodchenkov G., Schänzer W., Thevis M.* Determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of endogenous urinary 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1 $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014. V. 28. № 11. P. 1194.
18. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, USA. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf> (2018) (27.09.2018).