

УДК 543.51,543.544.5.068.7,543.544.3

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОМЕРОВ В ДОПИНГОВОМ КОНТРОЛЕ

© 2019 г. Е. Н. Обухова^а, *, А. К. Буряк^б

^аАнтидопинговый центр

105005 Россия, Москва, Елизаветинский переулок, 10/1

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук
119071 Россия, Москва, Ленинский просп., 31/4

*e-mail: enobukhova@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.04.2018 г.

После доработки 13.06.2018 г.

Принята к публикации 26.02.2019 г.

Изомерные соединения характеризуются, с одной стороны, близостью основных физико-химических характеристик, в том числе масс-, ЯМР- и ИК-спектров, а с другой, — существенными различиями важных для человека свойств, например реакционной способности, токсичности. Для исследования и определения изомеров применяют практически все известные физико-химические методы анализа, самым эффективным из которых в настоящее время является хромато-масс-спектрометрия (ХМС). Масс-спектрометрическая идентификация включает библиотечный поиск, построение структуры молекулы на основании закономерностей фрагментации различных классов органических веществ и использование специальных методов ионизации, позволяющих получать информацию о структуре молекул. Хроматографическое разделение позволяет идентифицировать изомерные соединения с идентичными масс-спектрами. Информация о наличии конкретных изомеров в их сложных смесях необходима для принятия серьезных арбитражных решений в криминалистике, токсикологии, допинговом анализе. В настоящем обзоре рассмотрены примеры использования ХМС для изомер-специфического анализа в антидопинговом контроле.

Ключевые слова: антидопинговый контроль, изомеры, жидкостная хроматография, газовая хроматография, масс-спектрометрия.

DOI: 10.1134/S004445021909007X

Антидопинговое тестирование официально введено в 1966 г. на чемпионате мира по футболу и в 1968 г. на Олимпийских играх в Мексике. Поводом для этого стала гибель спортсменов на Олимпийских Играх в Риме в 1960 г. и на гонке Тур де Франс в 1967 г. от передозировки амфетамина и тартрата никотина соответственно. В 1966 г. при участии Международной федерации футбола был создан список из семи групп запрещенных препаратов. В настоящее время список запрещенных соединений Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) включает 12 классов запрещенных соединений и 3 категории запрещенных к использованию методов [1]: часть из них контролируется только в соревновательный период, для некоторых введены предельно допустимые значения, другие контролируются в любое время подготовки и выступлений спортсмена, при этом санкции наступают при обнаружении любых концентраций. В конном спорте необходимо контролировать вещества, которые не только улучшают спортивные показатели, но могут так-

же ухудшить состояние животного. Фактически это означает, что допинговый контроль состояния лошадей не имеет ограничений по целевым соединениям. Например, список запрещенных и контролируемых препаратов по версии Международной федерации конного спорта включает 1187 соединений [2], тогда как список запрещенных препаратов ВАДА — 306 наименований.

Для антидопингового анализа используют хромато-масс-спектрометрические, иммунохимические методы и анализ параметров крови. Исторически методы газовой хроматографии—масс-спектрометрии (ГХ—МС) были первыми ХМС-методами антидопингового контроля. В настоящее время универсальным методом для анализа большинства запрещенных препаратов стала высокоэффективная жидкостная хроматография—масс-спектрометрия (ВЭЖХ—МС).

Антидопинговый анализ имеет ряд особенностей. Для анализа используют мочу и кровь спортсмена. В первичной тестовой процедуре (первичном скрининге) определяют одну или не-

Таблица 1. Минимальные значения критериев для подтверждения идентичности соединений методами хромато-масс-спектрометрии в антидопинговом анализе

Критерий	Значение
Хроматографические критерии (по сравнению со СО)	
Время удерживания, мин	$\pm 1\%$ или ± 0.1 мин (что больше)
Относительное время удерживания, мин	$\pm 1\%$; для изотопно-меченных стандартов – $\pm 0.5\%$
Масс-спектрометрические критерии	
Отношение массы к заряду определяемого соединения, Да	± 0.5 по сравнению со СО
Соотношение сигнал/шум определяемых ионов	3/1
Минимальное количество диагностических ионов (для сканирующих методов МС)	3
Минимальное количество селективных ионных переходов (для тандемной МС)	2
Допустимые отклонения относительной интенсивности диагностических ионов/ионных переходов по сравнению с СО	$\pm 5\text{--}20\%$ в зависимости от относительной интенсивности ионов в СО

сколько групп веществ, в случае положительного результата проводят подтверждающий анализ с учетом особенностей определяемого соединения. Результаты анализа должны быть предоставлены в течение 10 дней после получения образцов, во время спортивных соревнований – в течение 24–48 ч [3]. Обязательным условием антидопингового анализа является использование стандартных образцов (СО) определяемых соединений, что существенно упрощает идентификацию. В качестве СО используют синтетические аналоги, пробы мочи и крови, содержащие запрещенные соединения, для количественного анализа применяют изотопно-меченные аналоги. Согласно статистике ВАДА [4, 5] ежегодно анализируется 200–270 тыс. образцов биологических жидкостей спортсменов, 1–2% этого количества проходит повторный анализ, в 70% случаев прием допинга подтверждается. От результатов анализа зависит судьба спортсмена, поэтому ВАДА контролирует качество работы аккредитованных лабораторий, устанавливает предел детектирования (ПД) различных групп соединений и критерии идентификации, обеспечивающие однозначное определение и подтверждение допинга (табл. 1) [6].

В антидопинговом анализе изомерные соединения определяют, чтобы подтвердить или опровергнуть намеренный прием допинга. Изомерными могут быть исходные соединения и метаболиты. Метаболизм большинства запрещенных препаратов в организме человека проходит в две стадии: сначала исходные соединения превращаются в более полярные (гидрокси-, окси-, карбонильные производные), затем образуются сульфаты и конъюгаты с остатком глюкуроновой кислоты (глюкурониды). Долгоживущие и образующиеся в большом количестве метаболиты, в том числе многочисленные структурные и стереоизомеры,

особенно важны в антидопинговом анализе, так как используются для подтверждения приема допинга.

В обзоре рассмотрены способы определения аналитически важных изомеров в различных объектах методами ГХ–МС и ВЭЖХ–МС. Рассмотрены требования, предъявляемые к этим методам в допинговом контроле, их возможности и ограничения. Приведены примеры идентификации изомеров запрещенных соединений в сложных биологических пробах, лекарственных препаратах и продуктах питания. Обсуждается определение запрещенных соединений белковой природы и новейших допинговых препаратов.

АНАЛИЗ ПРОБ МОЧИ И КРОВИ

Анаболические стероиды. Самым популярным видом допинга на протяжении всей истории антидопингового контроля были и остаются анаболические стероиды (АС), которые используют для увеличения мышечной массы и восстановления после физических нагрузок [7]. Самый известный АС – тестостерон (Т), эндогенный мужской половой гормон, широко используемый в медицине для лечения расстройств мужской половой функции. Именно Т стал первым стероидным допингом, а его структура – основой для синтеза многочисленных аналогов [8]. Аккредитованные ВАДА лаборатории обязаны определять АС в моче спортсменов на уровне не ниже 2–5 нг/мл [9]. Определение стероидов осложняется низкой полярностью и летучестью этих соединений, а также широким диапазоном их концентраций в моче: от 0.5–40 нг/мл для Т до 8000 нг/мл для андростерона, дегидроэпиандростерона и этиохоланолона [10].

В организме человека АС интенсивно метаболизируют, и лишь малое их количество выводится с мочой в неизменном виде [11]. Метаболизм АС проходит в две стадии: на первой стадии из исходной молекулы образуются более полярные и реакционноспособные производные (схема 1), на второй стадии происходит

конъюгация с эндогенными молекулами с образованием легко растворимых в воде сульфатов и глюкуронидов [12]. Из мочи выделяют свободную фракцию АС и глюкурониды, сульфаты составляют около 5% от общего количества АС и, как правило, не определяются в рутинном антидопинговом анализе.

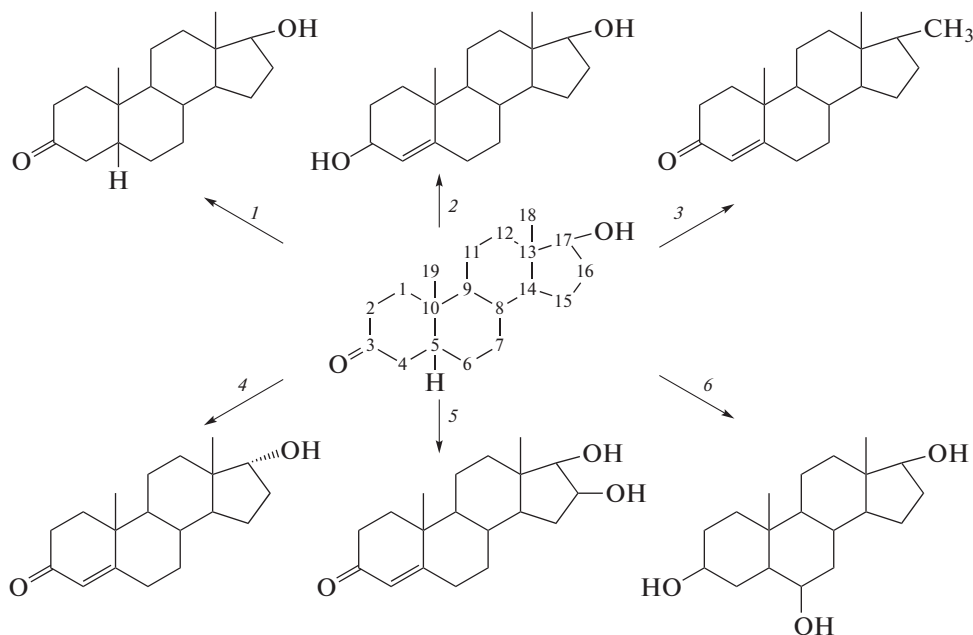


Схема 1. Направления превращений первой стадии метаболизма стероидов на примере тестостерона: 1 – восстановление двойной связи в положении С4 с образованием 5 α /5 β -изомеров, 2 – образование α / β -гидроксоизомеров при восстановлении кетогрупп, 3 – окисление гидроксильных групп в карбонильные, 4 – эпимеризация гидроксогрупп (через сульфаты), 5 – гидроксильрование, 6 – комбинация последовательных превращений.

Методы ГХ–МС применяют для определения АС с 1980-х гг. Пробоподготовка для этого анализа включает несколько стадий: ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой, жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) метил-*трет*-бутиловым эфиром и дериватизацию N-метил-N-(триметилсил)трифторацетамидом (МСТФА). В результате получают летучие производные, в которых атом водорода гидроксильных групп замещен на N-трифторацетил-O-триметилсилильную группу (схема 2) [13]. Для разделения многочисленных

структурных и стереоизомеров стероидов и их метаболитов используют газохроматографические колонки с неполярными алкил-силоксановыми фазами. Анаболические стероиды детектируют в режимах сканирования по полному ионному току или мониторинга выделенных ионов (МВИ) [14]. В методах подтверждения используют более селективный и чувствительный режим мониторинга выбранных реакций (МВР) с характерными ионными переходами для каждого соединения.

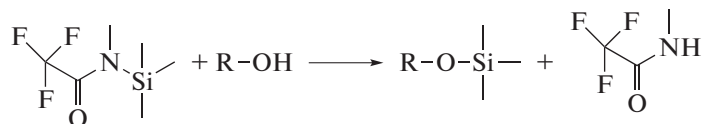


Схема 2. Реакция гидроксильной группы с N-метил-N-(триметилсил)трифторацетамидом (кроме гидроксогруппы в реакцию вступают группы R–COOH, R=NH, R–NH₂, R–SH).

Метаболизм АС активно изучают по нескольким причинам: некоторые экзо- и эндогенные

стероиды имеют общие метаболиты, их можно использовать для мониторинга приема допинга;

определение долгоживущих метаболитов увеличивает временное окно детектирования запрещенных соединений; определение метаболитов помогает установить время приема допинга. Например, 17 α -метил-5 α -андростан-3 α ,17 β -диол образуется при метаболизме препаратов метилтестостерон и оксиметалон [15, 16], а его стереоизомер 17 α -метил-5 β -андростан-3 α ,17 β -диол — продукт метаболизма 17 α -метилтестостерона, метандиенона и метандриола [17, 18]. Допинг стероидами с 17 β -гидрокси-17 α -метил-конфигурацией помогает выявить идентификация их 17 α -гидрокси-17 β -метилэпимеров [19].

Одним из важных показателей в антидопинговом контроле является соотношение концентраций Т и его неактивного эпимера эпитестостерона (ЭТ). Прием экзогенного Т не влияет на количество эндогенного ЭТ, и высокое значение соотношения Т/ЭТ указывает на использование допинга. Маркер с пороговым значением 6.0 был введен в 1982 г. Однако затем обнаружили, что диапазон природных значений соотношения Т/ЭТ составляет от 0.04 [20] до >6 [21]. В связи с этим в 2004 г. ВАДА установило пороговое значение на уровне 4.0, и данное значение используется по настоящее время.

Чтобы исключить ложноположительный результат из-за естественного высокого уровня Т, в дополнение к величине Т/ЭТ определяют дигидроэпиандростерон (предшественник Т) и четыре изомерных метаболита Т: 5 α -эпиандростан-3 α ,17 α -диол (**5 α**), 5 β -эпиандростан-3 α ,17 α -диол (**5 β**), этиохоланолон (3 α -гидрокси-5 β -андростан-17-он, **Этио**), андростерон (3 α -гидрокси-5 α -андростан-17-он, **А**). В отличие от абсолютных концентраций стероидов, соотношения Т/ЭТ, 5 α /5 β , А/Этио, андростерон/Т, 5 α /Этио устойчивы к циркадным ритмам и изменениям физиологических условий, например, в период высокоинтенсивных тренировок спортсменов. Определение концентраций 9–15 эндогенных АС, включая Т, его метаболиты и предшественники, называется стероидным профилем. Стероидный профиль определяют 5–10 раз в год, его данные статистически обрабатывают и используют для характеристики индивидуальных особенностей метаболизма спортсмена, его гормонального фона. Этот анализ выполняют описанным выше методом ГХ–МС и фиксируют изменения концентраций АС, связанные с употреблением допинга или проблемами со здоровьем, например гормональными нарушениями или онкологическими заболеваниями [22]. Предложен метод двумерной ГХ–МС для антидопингового определения стероидного профиля [23]. Высокая эффективность разделения и наглядная визуализация результатов позволила быстро выявлять ненормальные образцы. Авторы сравнили эффективность детектирования АС при сканировании по полному

ионному току в режимах ионизации электрораспылением (**ИЭР**) и химической ионизации метаном и аммиаком в качестве газов-реагентов. Простые для расшифровки спектры с интенсивным молекулярным ионом получены при химической ионизации аммиаком.

В настоящее время определение стероидного профиля используют в качестве первичного скрининга проб мочи. Подтверждают прием эндогенных стероидов синтетического происхождения методом ГХ–изотопной масс-спектрометрии (**ГХ–ИМС**), измеряя соотношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ метаболитов Т [24]. Фармацевтический Т производится из растительного сырья, количество изотопа ^{13}C в нем отличается от природного Т, который продуцируется в организме из холестерина. При приеме экзогенного Т или его прогормонов возрастает количество метаболитов с измененным соотношением $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Метод ГХ–ИМС позволяет определять эти отклонения: анализируют набор стероидов, аналогичный стероидному профилю, а в качестве эндогенных соединений сравнения используют 11-гидроксиандростерон и 11-гидроксиэтиохоланолон, биосинтез которых не связан напрямую с прогормонами Т. Данный метод незаменим для определения синтетических АС в моче, несмотря на высокую стоимость анализа, сложность пробоподготовки и валидации [25]. Пробоподготовка для анализа методом ГХ–ИМС включает следующие стадии: выделение и очистку стероидов из мочи твердофазной экстракцией (**ТФЭ**) и **ЖЖЭ**, ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой, **ЖЖЭ** деконъюгированных стероидов, фракционирование методом **ВЭЖХ** и ацетилирование выделенных стероидов. Разделение проводят на газовом хроматографе, который через пиролизную приставку соединен с изотопным масс-спектрометром. В приставке все аналиты сгорают до углерода и воды, и масс-спектрометр измеряет соотношение изотопов углерода в пиках выделенных соединений. Чувствительность определения эндогенных АС составляет 5–10 нг/мл при объеме пробы мочи 20 мл [26].

С появлением данных об эндогенной природе некоторых синтетических стероидов, диапазон соединений, определяемых методом ГХ–ИМС, расширился. Выяснилось, что кишечные бактерии человека продуцируют ферменты, модифицирующие эндогенные стероиды в запрещенный стероид болденон, а при хранении образцов мочи в результате деметилирования стероидов образуется норандростерон. Оба соединения признаны эндогенными и включены в стероидный профиль [27, 28]. В качестве дополнительного маркера приема болденона предложен его сульфированный эпимер эпиболденон сульфат [29].

Определение изотопного соотношения возможно только после выделения пиков индивиду-

альных соединений, что достигается трудоемкой пробоподготовкой и в том числе фракционированием с помощью ВЭЖХ. В качестве альтернативы фракционированию методом ВЭЖХ предложен метод двумерной ГХ [30]. Дополнительное хроматографическое разделение позволяет выделять пики Т, ЭТ, диолов ($5\alpha/5\beta$), А и эндогенного стандарта прегнандиола и напрямую вводить их в пиролизную приставку, соединенную с ИМС. Пробоподготовка образцов мочи для данного метода включала: ТФЭ и ЖЖЭ, ферментативный гидролиз, повторную ЖЖЭ и ацетилирование. Для хроматографического разделения использовали колонки TR-1 MS (60 м × 0.25 мм, неподвижная фаза средней полярности, 6% цианопропилфенил полисилоксан) и HP-17 (60 м × 0.25 мм, неполярная неподвижная фаза, 50% фенил-50% метилполисилоксан). Продолжительность пробоподготовки значительно сократилась, однако продолжительность анализа составила 90 мин, что в 3–4 раза больше, чем в стандартных методиках ГХ–ИМС.

Соотношения АС в стероидном профиле помогают выявить не только прием АС, но и случаи манипуляции с образцами мочи спортсменов. В 2004 г. во время соревнований в семи образцах мочи, отобранных у велосипедистов, были обнаружены близкие значения соотношения отношений Т/ЭТ. Такое совпадение маловероятно и вызвало подозрение в подмене образцов. Были определены стероидные профили, в том числе методом ГХ–ИМС, однако полученные данные не позволили установить уникальность образцов. Лишь сравнение выделенной из мочи ДНК показало, что три образца из семи принадлежат одному человеку [31]. В 2007 г. в ходе соревнований по тяжелой атлетике также были выявлены подмены образцов мочи [32]. На этот раз данные стероидного профиля каждого из образцов сравнивали с базой данных, содержащей 14224 профиля стероидов спортсменов. Результаты анализа показали, что три образца имеют очень сходные соотношения Т/ЭТ, А/Этио, А/Т, $5\alpha/5\beta$ и могут принадлежать одному человеку. Три идентичные хроматограммы были получены при анализе этих образцов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 272 нм. Анализ методом ГХ с термоионным детектором показал одинаковые количества метаболита метамизола (анальгина) в этих пробах. Однозначное подтверждение подмены трех проб было получено при ДНК-дактилоскопии образцов мочи. Таким образом, данные стероидного профиля можно использовать для индивидуализации допинговых проб, однако однозначно установить принадлежность образца можно только генетическим анализом.

В последние десятилетия все более широкое распространение получают методы ВЭЖХ–МС для определения АС: они не требуют дериватиза-

ции и позволяют определять метаболиты напрямую. Для анализа этим методом стероиды выделяют методами ТФЭ или ЖЖЭ и определяют на колонках С18. В первых работах по определению конъюгатов Т, ЭТ и их изомерных метаболитов было показано, что хроматографическое разделение этих соединений зависит от ионной силы, рН и полярности подвижной фазы и достигается изократическим и градиентным элюированием [33]. Первое количественное определение конъюгатов Т и ЭТ методом ВЭЖХ с детектированием тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС) было проведено после ТФЭ на микроколоне в режиме МВР. Диапазон определяемых концентраций составил 20–500 нг/мл для глюкуронидов и 3–55 нг/мл для сульфатов [34].

В работе [35] соотношение Т/ЭТ определяли с использованием ВЭЖХ и времяпролетного масс-спектрометра (ВПМС). После ЖЖЭ образцов мочи и ферментативного гидролиза конъюгатов кетогруппы стероидов дериватизировали реактивом Girard P. Образующиеся гидразоны эффективно ионизируются и дают более информативные спектры фрагментации по сравнению с исходными Т и ЭТ. Стероиды детектировали в режиме положительной ИЭР с МВР. Предел детектирования составил 2 и 0.5 нг/мл, предел количественного определения (ПКО) – 4.0 и 1.0 нг/мл для Т и ЭТ соответственно. Продолжительность анализа по сравнению с методом ГХ–МС сократилась, однако продолжительность прободготовки практически не изменилась. При дериватизации образуются два изомера Т, предположительно, в результате *цис-транс*-изомерии. Изомеры хроматографически разделяются, и для правильного расчета соотношения Т/ЭТ авторы учитывали площади двух пиков. Изомерные производные ЭТ на хроматограммах отсутствовали, причинами этого, по мнению авторов, могут быть стерические затруднения, препятствующие их образованию, или невозможность хроматографического разделения в условиях эксперимента.

В работе [36] описано количественное определение конъюгатов Т, ЭТ, дегидроэпиандростерона, Этио и А методом ВЭЖХ с ВПМС. Аналиты выделяли и концентрировали ТФЭ, изомерные пары конъюгатов Т/ЭТ, Этио/А разделяли на колонке (150 × 2.1 мм) Acquity VEN C18 (диаметр частиц сорбента 1.7 мкм) в режиме градиентного элюирования (продолжительность разделения 25 мин). Детектировали в режиме отрицательной ионизации с параллельным сканированием по полному ионному току после фрагментации с низкой и высокой энергиями. Предел детектирования аналитов составил 1–5 нг/мл, ПКО – 2–500 нг/мл. Результаты коррелировали с данными метода ГХ–МС и соответствовали требованиям ВАДА. Сканирование по полному ионному току открывает возможности для расширения числа

определяемых соединений, так как чувствительность детектирования не зависит от количества аналитов, в отличие от режимов МВИ и МВР.

Метод ВЭЖХ–МС/МС использовали для скрининга и подтверждения 55 АС в плазме крови лошадей для антидопингового контроля в конном спорте [37]. Аналиты экстрагировали ЖЖЭ и разделяли на колонке (50×2.1 мм) С18 (диаметр частиц сорбента 1.9 мкм). Используя различные хроматографические градиенты продолжительностью 5 мин, авторы проводили экспрессный скрининг с последующим подтверждением обнаруженных соединений. Аналиты детектировали в режиме МВР с одним характеристичным переходом для скрининга и тремя – для подтверждающего метода. Эпимерные пары (Т/ЭТ, болденон/эпиболденон, нандролон/эпинандролон) с идентичными масс-спектрами фрагментации разделяли хроматографически, структурные изомеры с характеристичными фрагментными ионами – масс-спектрометрически. При этом 17 β -эпимеры элюировались раньше 17 α -аналогов. Авторы связывают это с ориентацией 17-гидроксила относительно плоскости молекулы. 17 β -гидроксил находится над плоскостью, а 17 α -гидроксил – под плоскостью молекулы, как и 3-карбонильная группа. Две полярные группы 17 α -эпимеров находятся на одной стороне, противоположная сторона молекулы оказывается “неполярной” и сильнее взаимодействует с неподвижной фазой С18, что обуславливает большие времена удерживания 17 α -эпимеров. Удерживание АС коррелировало с их липофильностью: по сравнению с Т время удерживания уменьшалось при введении гидроксильных, карбонильных групп и двойных связей в положениях 6 и 9, дополнительные метильные группы увеличивали удерживание. Предел детектирования АС составил от 50 до 2000 пг/мл.

Количество АС, которые могут использоваться в качестве допинга, растет каждый год, поэтому процедуры определения соединений этого класса должны быть максимально чувствительными и эффективными. Чаще всего в антидопинговых лабораториях для этой цели используют методы ГХ–МС/МС с электронной ионизацией (ЭИ) и ВЭЖХ–МС/МС с ИЭР. Возможность определения АС методом ГХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения (МСВР) через интерфейс ИЭР была изучена в работе [38]. Выходное отверстие хроматографической колонки ($17 \text{ м} \times 0.2$ мм) Ultra-1 GC находится перед входным отверстием масс-спектрометра, подвижная газовая фаза смешивается с подаваемым 0.1%-ным раствором муравьиной кислоты в метаноле, что обеспечивает ионизацию АС. В качестве модельных соединений изучены 12 АС различной структуры, предел детектирования составил 0.5–10 нг/мл. Авторы сравнили эффективность определения АС методом ГХ–МСВР и рутинного

метода ГХ–МС/МС с ЭИ. Разработанный метод ГХ–МСВР оказался более чувствительным для трех соединений, пределы детектирования других девяти аналитов аналогичны или ниже, чем при анализе рутинным методом. Метод ГХ–МСВР с ИЭР использовали для определения 79 АС в моче. Высокая эффективность разделения на газовой хроматографической колонке позволила детектировать множество изомерных АС, в том числе 3-, 16- и 4-гироксистеранозолол, 6- и 4-гидроксиандростендиол, 19-норандростерон и 19-этиохоланолон. Достигнуто полное разделение эпимеров тренболон, оксандролон, 3-гидрокситиболон, зеранол, изомерных боластерона и калустерона. Хотя описанный прибор коммерчески недоступен, сочетание мягкой ионизации и высокой эффективности разделения открывает новые перспективы в определении АС.

Бета-агонисты. Бета-адреномиметики (бета-агонисты, БА) стимулируют β -адренергические рецепторы и имеют широкий спектр биологического действия: усиление и учащение сокращений сердца, липолиз триглицеридов, повышение тонуса кровеносных сосудов, расширение бронхов, повышение силы мышечного сокращения, увеличение содержания глюкозы в крови. В медицине их применяют для лечения бронхиальной астмы и купирования приступов удушья. Спортсмены могут использовать БА для кратковременного повышения выносливости. Согласно требованиям ВАДА минимальная определяемая концентрация БА в пробах составляет 20 нг/мл. Разрешается прием препаратов сальметерол, формотерол и салбутамол в терапевтических целях путем ингаляции, при этом максимальная концентрация салбутамола в моче не должна превышать 1000 нг/мл, формотерола – 40 нг/мл.

В структуре БА присутствуют хиральные атомы углерода; лекарственные препараты БА выпускаются в виде рацемических смесей. Было установлено, что после ингаляции БА выводятся из организма в основном в неизменном виде. При оральном приеме, напротив, в моче определяются значительные количества метаболитов, причем энантимеры БА метаболизируют с разной скоростью. В работе [39] предложен метод, позволяющий дифференцировать запрещенный оральный и разрешенный ингаляционный прием салбутамола. Для количественного определения S(+)- и R(-)-салбутамола использовали метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Аналиты разделяли на колонке (250×4.0 мм) Chirex 3022 с хиральной неподвижной фазой, подвижная фаза – гексан–дихлорметан–метанол–трифторуксусная кислота (250 : 218 : 31 : 1, по объему), разделение проводили в изократическом режиме. Метод позволяет полностью разделить энантимеры салбутамола и детектировать их на уровне 10 нг/мл. В соответствии с требованиями антидо-

пингового контроля структуру соединений подтверждали методом ГХ–МС: собранные фракции энантиомеров дериватизировали метилбороновой кислотой и анализировали в режиме ЭИ [40]. Общий сальбутамол в моче (сумма свободных и конъюгированных энантиомеров) определяли иммунологическим методом. Были проанализированы пробы спортсменов, принимавших различные дозы сальбутамола орально и в виде ингаляции. Результаты с помощью дискриминантного анализа классифицировали по способу приема препарата, полученная функция включала концентрации свободного сальбутамола и отношение между его энантиомерами. Кроме того, установлены пороговые значения, чтобы исключить ложноположительные результаты. Авторы отметили, что результат теста могут исказить препараты, снижающие интенсивность сульфирования БА, и прием левалбутерола (R(-)-энантиомер сальбутамола).

Высокая концентрация БА в моче может быть следствием индивидуальных особенностей метаболизма спортсмена, когда ингаляция даже терапевтической дозы вызывает превышение допустимой концентрации препарата в моче. Основным направлением метаболизма сальбутамола является образование сульфатов. В работе [41] изучено влияние полиморфизма гена сульфотрансферазы на метаболизм сальбутамола и вероятность того, что фармакогенетические различия являются причиной повышенной концентрации сальбутамола в моче. В ходе эксперимента концентрации энантиомеров в плазме крови определяли методом ВЭЖХ–МС/МС с использованием гибридного масс-спектрометра LTQ Orbitrap. Энантиомеры сальбутамола экстрагировали ТФЭ и разделяли на колонке (250 × 4.6 мм) ASTEC Chirobiotic T с хиральной неподвижной фазой в изократическом режиме с подвижной фазой метанол–уксусная кислота–аммиак (1000 : 5 : 1, по объему). Предел детектирования составил 8 пг/мл, ПКО – 20 пг/мл. Установлено, что замена одного нуклеотида в последовательности гена не влияет на фармакокинетику энантиомеров сальбутамола.

Стимуляторы. Синтетические стимуляторы являются производными адреналина и имеют похожий фармакологический эффект: они вызывают возбуждение, эйфорию, повышенную моторную активность. Стимуляторы опасны для здоровья, однако могут применяться спортсменами для повышения психической и, в меньшей степени, физической активности. В сферу антидопингового анализа эти вещества введены в 1970-х гг. При разработке методов определения стимуляторов учитывают несколько факторов: они слабо метаболизируют в организме человека, значительные их количества выводятся в неизменной форме, молекулы стимуляторов содержат атом азота и

легко ионизируются в условиях ИЭР, предел детектирования стимуляторов относительно высок и составляет 100 нг/мл. Часто эти соединения определяют методом “dilute and shoot”: пробу мочи разводят водой и без дополнительной подготовки вводят в хромато-масс-спектрометр. Такой подход ускоряет анализ, снижает его стоимость и может использоваться для первичного скрининга. Однако матричные компоненты мочи загрязняют систему, может потребоваться дополнительное обслуживание источника ионизации и более частая замена хроматографической колонки.

Самую долгую историю терапевтического применения имеют стимуляторы группы эфедринов. В природе они встречаются в лекарственных травах (эфедра, *Ma Huang* или *Ephedra sinica*). Активными компонентами этих растений являются пять оптически активных соединений: эфедрин (Э) и псевдоэфедрин (ПЭ), норэфедрин (НЭ) и норпсевдоэфедрин (НПЭ, катин), а также метилэфедрин (МП). Из-за распространенного терапевтического использования эфедринов их контроль в спорте затруднен: ПЭ и НЭ разрешены к использованию, а три других соединения входят в запрещенный список. Санкции за использование эфедринов наступают при превышении предельно допустимых концентраций в моче 5 мкг/мл для НПЭ и 10 мкг/мл для Э и МЭ. В антидопинговом анализе эфедрины количественно определяют методами ГХ–МС после ЖЖЭ и ВЭЖХ–МС с прямым вводом пробы.

Для определения методом ГХ–МС эфедрины, как и стероиды, дериватизируют МСТФА и N-метилбистрифторацетамидом (МБТФА). При этом в реакцию вступает не только гидроксильная, но и аминная группы, образуется несколько O- и N-производных, что снижает воспроизводимость пробоподготовки. Авторы работы [42] разработали метод ГХ–МС-определения эфедринов с последовательной дериватизацией, который позволяет получить одно производное для каждого аналита. Эфедрины экстрагировали диэтиловым эфиром, упаривали, добавляли смесь МСТФА и триметилсилилимидазола для образования O-триметилсилильных производных, а затем МБТФА для образования N-трифторацетильных производных. Аналиты разделяли на капиллярной колонке с дифенил-диметилполисилоксановой неподвижной фазой и детектировали в режиме ЭИ со сканированием по полному ионному току. Разработанная методика позволяет количественно определять Э и МЭ в диапазоне 5–30 мкг/мл, ПЭ и НЭ в диапазоне 10–50 мкг/мл и НПЭ в диапазоне 3–20 мкг/мл.

Прямое определение Э, НЭ, ПЭ, НПЭ и МЭ в моче методом ВЭЖХ–МС/МС описано в работе [43]. Пробу мочи разводили в 10 раз водой и анализировали без дополнительной пробоподготов-

ки. Чтобы повысить удерживание полярных молекул эфедринов, авторы использовали водные подвижные фазы с низким содержанием органического растворителя и трифторуксусную кислоту (ТФА) как ион-парный реагент. Аналиты разделяли на хроматографической колонке Zorbax RX C8 в изократическом режиме с подвижной фазой вода–ацетонитрил–муравьиная кислота–ТФА (98 : 2 : 0.1 : 0.01, по объему), продолжительность анализа 16 мин. Для детектирования использовали ИЭР в режиме МВР. Предел количественного определения составил 2.5 мкг/мл для НЭ и НПЭ и 5 мкг/мл для Э, НЭ и МЭ.

Еще одна широко применяемая группа стимуляторов – амфетамины. Структурный изомер амфетамина β-метилфенетиламин (БМФА) идентифицирован в работе [44]. Это соединение имеет незначительные отличия в структуре по сравнению с амфетамином и не входит в список запрещенных законом соединений. Тем не менее, его прием как соединения с допинговой активностью влечет санкции ВАДА. Анализ мочи спортсменов, которые принимали спортивное питание с этим соединением, показывает присутствие амфетамина при рутинном скрининге методом ВЭЖХ–МС, так как оба соединения имеют сходные спектры фрагментации. Авторы разработали метод подтверждения, включающий двухступенчатую ЖЖЭ, хроматографическое разделение на колонке C18 в изократическом режиме и детектирование в режиме МВР. Предел детектирования амфетамина и БМФА составил 10 нг/мл. Используя разные варианты пробоподготовки (гидролиз соляной кислотой при 105°C, без гидролиза, прямой ввод), авторы показали, что БМФА выводится из организма в конъюгированном и свободном виде. Кислотный гидролиз разрушает метаболиты II фазы метаболизма (сульфаты и глюкуроныды), увеличивая количество свободного БМФА и чувствительность его определения. Этот эффект авторы наблюдали в одной из четырех положительных проб мочи спортсменов, что свидетельствует об индивидуальной вариабельности метаболизма БМФА.

В качестве альтернативы запрещенным психостимуляторам в 2000-х гг. на нелегальном фармацевтическом рынке появились аналоги катинона, компонента листьев *Cathis edulis*. В настоящее время известно более 80 синтетических катинонов. Методика определения II катинонов в плазме крови лошадей предложена в работе [45]. В числе определяемых соединений – 4 пары структурных изомеров, полностью разделить их удалось только на колонке для хроматографии с гидрофильным взаимодействием (50 мм × 2.1 мм) Ascendis Express (размер частиц сорбента 2.7 мкм) в изократическом режиме элюирования смесью 5 мМ формиат аммония–ацетонитрил (5 : 95, по объему), продолжительность разделения 14 мин.

Детектирование проводили на тандемном масс-спектрометре с ИЭР в режиме МВИ. Предел детектирования аналитов составил 0.02–0.5 нг/мл, ПКО – 0.2–1.0 нг/мл. В работе [46] изучены 22 синтетических катинона, 6 групп структурных изомеров успешно разделены на колонке Roshell 120 EC-C18 в градиентном режиме элюирования в течение 12 мин. Аналиты извлекали методом ТФЭ и детектировали методом МС/МС с ИЭР в режиме МВИ.

Экспрессная скрининговая методика предложена для детектирования 63 стимуляторов, в том числе изомерных [47]. Пробу мочи разбавляли водой в пять раз и анализировали на колонке (100 × 2.1 мм) Acquity VEN C18 (размер частиц сорбента 1.7 мкм), продолжительность анализа 5 мин. Аналиты детектировали на тройном квадрупольном масс-спектрометре в режиме МВР с использованием одного или двух ионных переходов для каждого соединения. В условиях быстрого градиента все определяемые соединения элюировались в течение 2 мин, сходные спектры фрагментации не позволили масс-спектрометрически разделить изомерные группы: Э/ПЭ, НЭ/НПЭ; рацемическую смесь D- и L-изомеров метамфетамина; фенпрометамин, туаминогептан и метилгексанамин; мефетермин, диметиламфетамин и этиламфетамин; фентермин, *n*-метиламфетамин и ортетамин. Для каждой изомерной группы была разработана методика ВЭЖХ–МС/МС с хроматографическим градиентом продолжительностью 10–20 мин и дополнительными ионными переходами. В качестве альтернативного метода анализа авторы использовали ГХ–МС с ИЭ. В этом случае соединения извлекали из 5 мл мочи ЖЖЭ, упаривали и анализировали сразу или после дериватизации с МБТФА на капиллярной колонке с 5%-ным фенилметилсиликоном (12 м × 0.2 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0.33 мкм). Для разделения диастереомерных пар производных Э использовали медленный температурный градиент с изократической ступенью в начале. Разработанный метод не является селективным к оптическим изомерам и не используется для разделения энантиомеров амфетамина и метамфетамина. Для их детектирования необходима диастереомерная дериватизация, например, с L-N-трифторацетил-1-пролилхлоридом [48].

Другие соединения. Противовоспалительные препараты широко используют для лечения и восстановления спортсменов. В конном спорте их часто применяют как допинг для маскирования клинических признаков воспаления и снижения болевого порога у лошадей. В связи с этим необходимы аналитические методы определения времени введения препаратов и их концентраций, чтобы отличить допинговое использование от терапевтического. Предложена методика количественного определения энантиомеров аль-

гетика прапрофена в плазме крови и моче лошадей [49]. Препарат извлекали из плазмы крови ЖЖЭ, из мочи – ТФЭ. Энантиомеры разделяли на колонке (250 × 2.0 мм) ChirexTM 3005 с хиральной неподвижной фазой на основе (R)-1-нафтилглицина и амида 3,5-динитробензойной кислоты в режиме изократического элюирования смесью метанол–вода–муравьиная кислота (95 : 5 : 0.1, по объему), продолжительность разделения 13 мин. Аналиты детектировали тандемным масс-спектрометром с ИЭР в режиме МВИ.

Глюкокортикоиды (ГК), как и АС, имеют длительную историю допингового использования в качестве противовоспалительных препаратов. Им также приписывают эргогенный эффект: быстрое восстановление после травм, повышение устойчивости к интенсивным тренировкам, положительное влияние на здоровье. Подобное действие ГК не подтверждено достоверными исследованиями, тем не менее, систематическое их использование в соревновательный период запрещено ВАДА. Разрешается применять ГК в терапевтических целях локально, т.е. любым путем, кроме орального, внутривенного, внутримышечного и ректального.

При обнаружении ГК, как и БА, антидопинговые лаборатории должны различать разрешенный (чаще всего ингаляционный) и запрещенный способы применения. С этой целью разработана методика количественного ВЭЖХ–МС/МС-определения будезонида и его метаболитов в моче [50]. Идентифицированы 16 метаболитов будезонида, 9 из которых были структурными изомерами, а четыре имели стереоизомеры. Аналиты выделяли из мочи ЖЖЭ в виде глюкуронидов и в свободной форме после ферментативного гидролиза. Разделение выполняли на колонке (100 × 2.1 мм) Acquity VEN C18 (размер частиц сорбента 1.7 мкм) в режиме градиентного элюирования, продолжительность разделения 14.5 мин. Аналиты детектировали на тройном квадрупольном масс-спектрометре с ИЭР в режиме МВИ, ПКО составил 0.03–1.3 нг/мл. Методику использовали для определения метаболитов в моче волонтеров, принимавших будезонид орально и в виде ингаляций. Авторы сравнили профили выведения метаболитов в образцах мочи и предложили использовать концентрацию 6β-гидроксибудезонида выше 20 нг/мл в качестве маркера запрещенного орального приема препарата.

Аналогичный подход применяли для определения 9 ГК [51]. После ЖЖЭ аналиты разделяли на колонке (100 × 3 мм) Nucleosil C18 (размер частиц сорбента 5 мкм) в градиентном режиме и детектировали в ионной ловушке с ИЭР в режиме МВИ. Продолжительность анализа 20 мин. Стереоизомеры бетаметазон и дексаметазон разделены в изократическом режиме элюирования и

идентифицированы по разнице в интенсивностях пиков ионов в масс-спектрах фрагментации.

Мульти-скрининги. Чтобы справляться с ежегодно увеличивающимся потоком проб и своевременно предоставлять результаты анализов антидопинговые лаборатории разрабатывают высокопроизводительные скрининговые методы. В одной пробе одновременно можно детектировать более 100 запрещенных соединений различных классов. Подобная емкость анализа достигается различными способами: упрощение и автоматизация пробоподготовки; ВЭЖХ на субмикронных колонках с размером частиц менее 2 мкм и применение хроматографических насосов, выдерживающих давление до 1000 бар (при этом ширина хроматографического пика достигает нескольких секунд); быстрые хроматографические градиенты с общим временем анализа до 10 мин; детектирование с высокой скоростью сканирования; быстрое переключение полярности в источнике масс-спектрометра для анализа соединений разной природы. Скрининговые методики не нацелены на полное разделение изомерных аналитов, для этого проводят подтверждающий анализ с использованием подходящего градиента и масс-спектрометрическое подтверждение структуры детектированного соединения. Ниже рассмотрены примеры скринингов, включающих изомерные соединения различных классов.

Разработана методика ВЭЖХ–МС/МС-определения 130 запрещенных диуретиков, стимуляторов и наркотиков [52]. Пробы мочи анализировали прямым вводом после разбавления водой в два раза. Аналиты разделяли в градиентном режиме на колонке (50 × 2.1 мм) VEN C18 (размер частиц сорбента 1.7 мкм), продолжительность анализа 7.5 мин. В качестве подвижных фаз использовали 10 мМ раствор ацетата аммония и метанол, расход элюента 400 мкл/мин, температура колонки 60°C. Соединения детектировали в режиме МВР с двумя характеристическими фрагментными ионами для каждого иона-предшественника; для определения диуретиков переключали полярности с положительной на отрицательную. Для поддержания работоспособности системы после каждой партии анализов ионный источник очищали от солей и осадка, колонку промывали метанолом. Хроматографически полностью разделены три производных амфетамина (мефентермин, диметиламфетамин и N-этиламфетамин), имеющих близкие спектры фрагментации. Масс-спектрометрически дифференцировали наркотики морфин и гидроморфон, оксиморфон и нороксикодон и стимуляторы метилэфедрин и 3,4-метилendioксиамфетамин (МДА), норпентидин и метилфенидат. Не разделенные хроматографически соединения (стимуляторы катин и фенилпропаноламин, Э и ПЭ, метамфетамин и фенпрометамин) подтверждали методами с изократиче-

ским или модифицированным градиентным элюированием.

Количество аналитов, которые можно детектировать с требуемой чувствительностью на квадрупольных масс-спектрометрах, ограничено временем цикла сканирования анализатора. Большое количество соединений уменьшает время сканирования каждого иона и соответственно чувствительность определения. Анализ в режиме сканирования по полному ионному току позволяет детектировать неограниченное количество соединений в заданном диапазоне, однако в отсутствие фрагментных ионов возникает проблема идентификации. Дополнительную аналитическую характеристику — точную массу соединения с погрешностью определения до 5 млн^{-1} — можно получить методом МСВР. Измерение точной массы с использованием орбитальных и время-пролетных масс-спектрометров все шире используют для рутинных скринингов в антидопинговом контроле. Оба прибора могут работать в режиме сканирования по полному ионному току и детектировать практически все ионизованные компоненты пробы. Такой способ детектирования делает анализ ретроспективным: для выявления новых допинговых агентов вместо повторного анализа можно проанализировать уже полученные масс-спектрометрические данные на предмет присутствия в них точных масс интересующих соединений. Однако для детектирования изомеров необходимо полностью разделить интересующие соединения или проводить дополнительный масс-спектрометрический анализ в режиме МВИ или МВР.

Методика ВЭЖХ с ВПМС предложена для определения 103 запрещенных соединений, включая диуретики, стимуляторы, бета-блокаторы, наркотики и анти-эстрогены [53]. Из-за значительных терапевтических концентраций для соединений этих классов установлены относительно высокие пределы детектирования аналитов: от 20 (анти-эстрогены) до 200 нг/мл (диуретики), что позволило упростить пробоподготовку и исключить этапы очистки и концентрирования. Авторы разбавляли пробу мочи в два раза дистиллированной водой и анализировали на колонке ($100 \times 2.1 \text{ мм}$) С18 (диаметр частиц сорбента 1.7 мкм). Продолжительность анализа 9 мин. Каждый образец анализировали два раза: в режиме положительной и отрицательной ИЭР. Аналиты идентифицировали по времени удерживания и точной массе диагностического иона (точность масс $2\text{--}5 \text{ млн}^{-1}$). Компоненты матрицы подавляли ионизацию аналитов, тем не менее, пределы детектирования были в несколько раз ниже установленных ВАДА значений. Авторы отмечают, что новая методика сокращает продолжительность анализа в 1.5 раза по сравнению со стан-

дартными методами ВЭЖХ–МС и ГХ–МС для определения различных групп аналитов. Масс-спектрометрическое разделение в режиме полного сканирования не предусмотрено, хроматографически были разделены только стимуляторы метилэфедрин и МДА. Соэлюировались изомерные метамфетамин и фенпрометамин, металозон и индапамид (диуретики); стимуляторы катин и фенилпропаноламин, Э и ПЭ. В дальнейшем авторы разработали [54] подтверждающий анализ всех 103 соединений. Чтобы повысить чувствительность и селективность метода, определяемые соединения выделяли и концентрировали из мочи методом ТФЭ: основные и нейтральные соединения экстрагировали с помощью сильнокислотного катионообменника, кислые соединения — сильноосновного анионообменника. Каждое соединение детектировали в режиме МС/МС по трем характеристичным фрагментам. Для подтверждения идентичности соединения использовали метод с экспрессным хроматографическим разделением в течение 7 мин, колонка ($50 \times 2.1 \text{ мм}$) ВЕН С18 (размер частиц сорбента 1.7 мкм) и точностью детектирования масс $5\text{--}10 \text{ млн}^{-1}$. Изомерные соединения, соэлюировавшиеся с колонки, разделяли масс-спектрометрически по характеристичным фрагментным ионам. Изомерные пары катин/фенилпропаноламин и Э/ПЭ определяли количественно в изократическом режиме с подвижной фазой вода—ацетонитрил (95 : 5%, по объему), продолжительность разделения 6 мин.

Методика определения 325 соединений в плазме крови лошадей с использованием орбитального масс-спектрометра LTQ Orbitrap Velos предложена в работе [55]. Аналиты выделяли методом ТФЭ, разделяли на колонке ($10 \text{ см} \times 2.1 \text{ мм}$) Acquity UHPLC WEN С18 (размер частиц 1.7 мкм) и детектировали в режиме сканирования по полному ионному току с разрешением масс 60000 и точностью масс 3 млн^{-1} . Точность масс поддерживалась послеколоночным введением вещества сравнения в течение всего анализа. Среди определяемых соединений присутствовали 48 структурных и стереоизомеров АС, ГК, БА, анальгетиков и бета-блокаторов. Хроматографически не были разделены только три пары изомерных ГК: структурные изомеры флупреднизолон/изофлупредон и стереоизомеры дексаметазон/бетаметазон и флуоцинонид/дифлоразон. Предел детектирования аналитов составил $1\text{--}10 \text{ нг/мл}$.

АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Допинговые средства могут попасть в организм спортсмена с пищевыми добавками, загрязненными продуктами питания и лекарственными средствами, состав которых указан неполностью. В этом случае антидопинговые лаборатории вы-

являют источник допинга, чтобы доказать неумышленный прием допинга и смягчить наказание спортсменов.

Новые допинговые соединения часто получают в нелегальных лабораториях путем модификации или перегруппировки заместителей хорошо известных запрещенных препаратов. Такие специально созданные, биологически активные соединения, не контролируемые законом, называются “дизайнерскими”. Пищевые биологически активные добавки (БАД) могут содержать подобные соединения, именно они обеспечивают “непревзойденный результат”: быстрый рост мышечной массы, потерю веса или увеличение тренировочной нагрузки. Механизм действия новых препаратов часто неизвестен, что создает серьезную угрозу здоровью спортсменов. Состав, чистота, эффективность и безопасность БАД контролируется законом не так строго, как в производстве лекарств. Неудивительно, что присутствие дизайнерских соединений в БАД раскрывается только при анализе в антидопинговых лабораториях. В 2001–2002 гг. в ходе исследования 634 пищевых добавок из 13 стран мира в 15% негормональных препаратов идентифицировали АС, в том числе дизайнерские [56]. Список запрещенных препаратов открыт и постоянно пополняется новыми допинговыми соединениями на основании сходства их структуры и/или действия с уже внесенными в список соединениями. Идентифицированные дизайнерские соединения включают в рутинные скрининговые процедуры, что часто приводит к положительным результатам анализа и санкциям против спортсменов, которые принимали БАД [57].

Анализ неизвестных допинговых соединений с измененной структурой методами рутинных скринингов затруднен: в таких методах часто используют масс-спектрометрическое детектирование уже известных исходных и фрагментных ионов. Вещества с отличающейся молекулярной массой и фрагментацией выявляют методами ВЭЖХ–МС и ГХ–МС в условиях сканирования характеристичных фрагментных ионов и нейтральных потерь. Например, для стероидов характерны ионы с m/z 129, 130, 143, 169, 194, 206, а также элиминирование массы 103. Ион с m/z 129 указывает на присутствие гидроксила в положениях 3 или 17 стероидного кольца, фрагменты с m/z 130 и 143 часто наблюдаются у стероидов с метильной группой в положении 17, ион с m/z 169 – у стероидов с кетогруппой в положении 17. Ионы с m/z 194 и 206 служат индикаторами ненасыщенного 3-кетостероидного кольца. Нейтральную потерю массы 103 наблюдали в присутствии гидроксильных метильных групп. Подобный подход использовали в работе [58] для анализа пищевой добавки “Orastan-A”. Содержимое капсул анализировали несколькими методами. Мето-

дом ГХ–МС обнаружили изомерные пары стероидных соединений, идентифицированные как изомерные спирты, их соответствующие ацетаты и тетрагидропиранильные эфиры. Методом МСВР установили идентичный элементный состав изомеров, а сравнение спектров фрагментации с уже известными стероидами позволило предположить их структуру. Данные ЯМР и ВЭЖХ с УФ-детектированием подтвердили, что изомеры являются 17 β -гидроксиандростано[3,2-с]- и -[2,3-d]изоксалолами. Эти соединения впервые синтезированы в 1960-х гг. и не одобрены для терапевтического использования.

Особое внимание к составу и чистоте должно уделяться препаратам нетрадиционной медицины. Экстракт мускусной железы оленя используют в традиционной китайской медицине для стимуляции сердечно-сосудистой системы, в гормональной терапии и как противовоспалительное средство. В его состав входят многочисленные стероидные компоненты, которые могут повлиять на результаты антидопингового анализа. Пять атлетов, принимавших мускусный экстракт для восстановления после солнечного удара, были дисквалифицированы по результатам определения стероидного профиля [59]. Стандартными методами ГХ–МС и изотопной МС, описанными выше, в моче спортсменов обнаружены экзогенные стероиды. В ходе анализа мускусного экстракта, предоставленного врачом спортсменов, идентифицировали 17 АС, включая 9 соединений из запрещенного списка ВАДА и изомерные 5 α /5 β -андростан-3 α ,17 α -диола, 5 α /5 β -андростан-3 α ,17 β -диола и 5 α -андростан-3 β ,17 α -диола.

Разработана ВЭЖХ–МС/МС-методика для количественного определения метилэфедрина и изомерных эфедринов (Э/ПЭ, НЭ/НПЭ) в пищевых добавках [60]. Эфедрины экстрагировали из таблеток, масел и жидкостей методом ЖЖЭ. Аналиты полностью разделены на колонке (150 × 4.6 мм) Zorbax Eclipse Plus C18 (размер частиц сорбента 3.5 мкм) в режиме изократического элюирования смесью 0.01 М раствор формиата аммония–ацетонитрил (94 : 6, по объему) в течение 26 мин. Для детектирования в режиме МВИ использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр с источником ИЭР.

В последние 10 лет неоднократно появлялись сообщения о положительных пробах элитных спортсменов, вызванных приемом мясных продуктов, загрязненных кленбутеролом. Кленбутерол используют при астме и болезнях легких человека, его введение сельскохозяйственным животным запрещено. Незаконное использование в спорте и сельском хозяйстве связано с анаболическим действием кленбутерола, выражающемся в увеличении мышечной массы и снижении количества жировой ткани. Все имеющиеся на рынке

препараты кленбутерола содержат рацемическую смесь R-(–) и S-(+)–кленбутерола, причем последний является биологически активным изомером. В мясе животных из-за особенностей фармакокинетики происходит неравномерное накопление энантиомеров. Соотношение энантиомеров в моче человека после приема препарата не меняется и совпадает с соотношением в лекарственном средстве. Чтобы отличить кленбутерол, ненамеренно употребленный с мясом, от умышленного принятого лекарственного препарата предложено использовать соотношение энантиомеров в моче [61]. Изомеры кленбутерола количественно определяли методами сверхкритической флюидной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии (СФХ–МС/МС), ВЭЖХ–МС/МС и ВЭЖХ–ВПМС. Полное хроматографическое разделение энантиомеров достигнуто на колонках с неподвижной фазой на основе белка ванкомицина (150 × 4.6 мм) Astec chirobiotic V2 (размер частиц сорбента 5 мкм). Анализ методом СФХ–МС/МС занимает в 1.5 раза меньше времени, чем ВЭЖХ–МС/МС. Определено соотношение энантиомеров в фармацевтических препаратах, образцах мяса, пробах мочи волонтеров и спортсменов, подвергшихся санкциям за прием кленбутерола. Результаты подтвердили, что соотношение изомеров в моче человека отражает их соотношение в принятом мясе или препарате. Однако соотношение изомеров в мясных продуктах сильно варьируется и зависит от времени и длительности использования кленбутерола при откорме. Таким образом, однозначно определить источник кленбутерола, выявленного в моче спортсмена, на данный момент невозможно.

Стоит отметить, что определение соотношения энантиомеров можно использовать для обнаружения эфедринов в случаях, когда спортсмен заявляет о неумышленном приеме в составе растительных лекарственных средств или продуктов питания. Экстракты эфедринсодержащих растений содержат изомеры (Э/ПЭ, НЭ/НПЭ) в виде чистых энантиомеров, в ходе химического синтеза возможно образование смесей энантиомеров. Соотношение энантиомеров в моче можно использовать для выявления источника принятых эфедринов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОМЕРНЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

В последнее десятилетие в качестве допинга все чаще используют соединения пептидной природы. Практически на любую биологическую функцию в организме человека, связанную со спортивными показателями, можно повлиять пептидными гормонами, а детектирование их приема трудоемко и дорого. Условно пептидные соединения в антидопинговом анализе делят на

две группы: малые пептиды с молекулярной массой менее 2 кДа и большие пептиды с массой более 2 кДа. Малые пептиды синтезируют из аминокислот методом твердофазного синтеза, их примерами являются рилизинг пептиды гормона роста (стимуляторы секреции гормона роста), дерморфины (опиоидные агонисты), вазопрессин и его аналоги (диуретики). К большим пептидам относят рекомбинантные гормоны, они минимально отличаются или полностью идентичны эндогенным соединениям. Примерами больших пептидов являются инсулин и его аналоги (5.8–6 кДа, анаболическое действие), гормон роста (20–22 кДа, увеличение мышечной массы и силы), эритропоэтин и его аналоги (35 кДа, стимуляция эритропоэза, повышение выносливости). Все пептидные соединения быстро метаболизируются и выводятся из организма, временное окно их детектирования составляет от нескольких часов в крови до 2–3 дней в моче. Малые пептиды определяют методами ВЭЖХ–МС/МС с ИЭР. Рекомбинантные препараты определяют в основном иммунохимическими методами с использованием специфических антител. Для определения инсулинов, эритропоэтина, и некоторых других гормонов разработаны способы иммуноаффинного извлечения и ВЭЖХ–МС-определения, как правило, с использованием МСВР. Рассмотрим несколько примеров определения пептидного допинга, целевыми соединениями в которых выступают изомерные вещества.

Представителями малых пептидов с допинговой активностью являются дерморфины, сильнодействующие агонисты опиоидных рецепторов. Дерморфины выделены из кожи южноамериканских лягушек семейства *Phyllomedusa*, они состоят из семи аминокислотных остатков и действуют как мощные анальгетики при подкожном или внутривенном введении. Дерморфины в сотни раз эффективнее морфина, но не вызывают привыкания и зависимости. В настоящее время известно более ста синтетических аналогов, содержащих от 4 до 7 аминокислотных остатка. Уже сообщалось о незаконном использовании дерморфинов для обезболивания в конном спорте. В структуре природных дерморфинов присутствуют D-аргинин и амидированная C-концевая аминокислота, синтетические аналоги могут содержать дополнительные синтетические аминокислоты. Эти характерные особенности защищают пептид от протеолитической деградации, увеличивают его биодоступность, а также используются в антидопинговом контроле для детектирования дерморфинов в биопробах.

Метод ВЭЖХ–МС/МС с предварительной ТФЭ на картриджах с катионообменным сорбентом смешанного типа разработан для определения 17 дерморфинов в плазме крови и моче лошадей [62]. Пептиды разделяли на капиллярной ко-

лонке (10 см × 530 мкм) C18 Proteocol G203 (размер пор сорбента 200 Å) градиентным элюированием в течение 7.5 мин. Детектирование осуществляли в режиме ИЭР с МВР, предел детектирования пептидов составил 5–25 пг/мл. Если изучаемые пептиды не содержат искусственных аминокислот и имеют карбоксилированный С-конец, то велика вероятность присутствия в протеоме их эндогенных аналогов. Чтобы исключить ложноположительный результат, определяемые соединения проверяют по протеомным базам данных. В данной работе три пептида из исследованных имели эндогенные аналоги с идентичным составом. Однако синтетические пептиды содержали D-аргинин и хроматографически полностью отделялись от эндогенных стереоизомеров, содержащих L-аргинин. На основании времен удерживания и характерных фрагментных ионов были также разделены амидированные и карбоксилированные формы изомерных тетрапептидов, отличающихся наличием β-аланина или саркозина (структурные изомеры). Карбоксилированные пептиды элюировались на 0.1 мин позже, чем амидированные. Пептиды, в которых ОН-группа С-концевой аминокислоты заменена на NH₂-группу, отличаются по молекулярной массе на 1 Да. В режиме ИЭР эти соединения образуют многозарядные ионы, и различия в m/z их родительских ионов минимизируются. Такие пептиды идентифицируют по у-ионам, содержащим С-концевую аминокислоту, и небольшим различиям во временах удерживания.

Примером ВЭЖХ–МС определения рекомбинантных гормонов является определение инсулина и его аналогов в моче и крови человека. Как и в случае малых пептидов, синтетические аналоги инсулина модифицируют для повышения биодоступности (быстродействующие инсулины) и времени циркуляции в крови (инсулины длительного действия). Инсулин увеличивает количество гликогена в мышцах и ингибирует катаболизм белков, он незаконно используется в бодибилдинге, однако его эффективность для повышения спортивных результатов не подтверждена. С 1999 г. инсулин и его аналоги включены в запрещенный список. Физиологические концентрации инсулина в крови и моче человека составляют 0.2–3.2 нг/мл и 0.1–0.5 нг/мл соответственно. Иммунохимическими методами можно детектировать такие малые количества, но невозможно получить информацию о структуре и идентифицировать различные виды инсулинов. Для антидопингового контроля был разработан метод выделения инсулина и его аналогов на иммуноаффинной колонке [63] и с помощью магнитных частиц с антителами к инсулину [64] в последующим ВЭЖХ–МС/МС-определением с ИЭР в режиме МВР. Для разделения использовали микроколону (50 × 1 мм) Zorbax 300SB-C18 (размер частиц сор-

бента 3.5 мкм). Продолжительность анализа 23 мин. Синтетические аналоги инсулина отличаются заменой нескольких аминокислотных остатков, а инсулин лизпро является изомером природного гормона, в котором два соседних аминокислотных остатка лизина и пролина поменяны местами. Близкие физико-химические свойства инсулинов затрудняют их хроматографическое разделение, поэтому идентифицировать их по времени удерживания нецелесообразно. Однако отличия в структуре позволяют различать их масс-спектрометрически по массам исходных и фрагментных ионов. Инсулин и лизпро идентифицируют по двум характеристичным фрагментам с m/z 226 (ион (y₃-y₁) инсулина) и m/z 217 (ион y₂ лизпро), образующихся при фрагментации С-конца молекулы.

Масс-спектрометрия высокого разрешения с анализатором ионной подвижности позволяет дополнительно разделять ионы на основе их размеров и формы в нейтральном газе под действием слабого электрического поля. Данный прибор использовали для определения инсулина и семи его аналогов в плазме крови после иммуноаффинного выделения [65]. Ионы синтетических аналогов, включая изомерный лизпро и дейтерированный внутренний стандарт, имели воспроизводимые и отличные от природного инсулина времена дрейфа (от 3.02 до 3.55 мс). Это подтверждает возможность использования данной характеристики для идентификации. Для хроматографического разделения использовали нано-хроматограф и две концентрирующие колонки: (20 × 0.18 мм) Symmetry C18 (размер частиц сорбента 5 мкм) и (20 × 0.1 мм) Easy column (размер частиц сорбента 5 мкм). Продолжительность разделения 11 мин. Аналиты имели одинаковые времена удерживания, однако детектирование времен дрейфа и m/z исходных и фрагментных ионов обеспечило высокую специфичность анализа.

* * *

Представленные примеры подтверждают значение методик, основанных на разделении и идентификации изомеров, в допинговом анализе. Во многих случаях решение аналитической проблемы возможно только на основе информации о содержании конкретных изомеров в анализируемых пробах. Поскольку все аналитические методики, включая скрининговые, обеспечены стандартами, нет необходимости в использовании расчетных величин удерживания для идентификации отдельных изомеров. Вместе с тем, для исследования новых, “дизайнерских” допинговых препаратов комплексный подход, включающий хроматографические расчеты и различные масс-спектрометрические подходы к идентификации, в будущем станет обязательным. Можно утвер-

ждать, что роль методик, основанных на разделении и идентификации изомеров, будет только возрастать, особенно при определении оптических изомеров. Это связано с развитием и совершенствованием медицинских подходов к оценке влияния индивидуальных оптических изомеров, а не только их рацемических смесей на состояние спортсменов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prohibited List. January 2018. <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents> (10.04.2018).
2. 2018 Equine Prohibited Substances List. <http://inside.fei.org/content/anti-doping-rules> (10.04.2018).
3. *International Standard for Laboratories V9.0*. <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl> (10.04.2018).
4. Anti-doping Rule Violations (ADRVs) Report. 2015. <https://www.wada-ama.org/en/resources/general-anti-doping-information/anti-doping-rule-violations-adrvs-report> (10.04.2018).
5. Dvorak J., Saugy M., Pitsiladis Y.P. Challenges and threats to implementing the fight against doping in sport // *Br. J. Sports Med.* 2014. V. 48. № 10. P. 807.
6. *Technical Document on the Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes*. <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015idcr> (10.04.2018).
7. WADA. (2015). Anti-Doping Testing Figures. Montreal, Canada: Anti-Doping Agency solely. <http://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/anti-doping-testing-figures>. (10.04.2018).
8. Kicman A.T. Pharmacology of anabolic steroids // *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 154. № 3. P. 502.
9. Technical Document For Minimum Required Performance Levels. WADA TD2018MRPL. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018mrpl_v1_finaleng.pdf. (10.04.2018).
10. Van Renterghem P., Van Eenoo P., Geyer H., Schänzer W., Delbeke F.T. Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes // *Steroids*. 2011. V. 75. № 2. P. 154.
11. Schänzer W., Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and the use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites // *Anal. Chim. Acta.* 1993. V. 275. № 1–2. P. 23.
12. Parr M.K., Schänzer W. Detection of the misuse of steroids in doping control // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 121. № 3–5. P. 528.
13. Donike M., Zimmermann J. Preparation of trimethylsilyl, triethylsilyl and tert-butyl dimethylsilyl enol ethers from ketosteroids for investigations by gas-chromatography and mass-spectrometry // *J. Chromatogr.* 1980. V. 202. P. 483.
14. Massé R., Ayotte C., Dugal R. Studies on anabolic steroids. I. Integrated methodological approach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine // *J. Chromatogr.* 1989. V. 489. № 1. P. 23.
15. Bi H.G., Massé R., Just G. Studies on anabolic steroids. 10. Synthesis and identification of acidic urinary metabolites of oxymetholone in a human // *Steroids*. 1992. V. 57. № 9. P. 453.
16. Stanley S.M., Smith L., Rodgers J.P. Biotransformation of 17-alkylsteroids in the equine: gas chromatographic-mass spectral identification of ten intermediate metabolites of methyltestosterone // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997. V. 690. № 1–2. P. 55.
17. Masse R., Bi H.G., Ayotte C., Du P., Gélinas H., Dugal H. Studies on anabolic steroids. V. Sequential reduction of methandienone and structurally related steroid A-ring substituents in humans: gas chromatographic-mass spectrometric study of the corresponding urinary metabolites // *J. Chromatogr.* 1991. V. 562. № 1–2. P. 323.
18. Yamada M., Aramaki S., Kurosawa M., Saito K., Nakazawa H. Detection of urinary metabolites common to structurally related 17 α -alkyl anabolic steroids in horses and application to doping tests in racehorses: methandienone, methandriol, and oxymetholone // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. № 5. P. 87.
19. Bi H.G., Massé R. Studies on anabolic steroids—12. Epimerization and degradation of anabolic 17 beta-sulfate-17 alpha-methyl steroids in human: qualitative and quantitative GC/MS analysis // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992. V. 42. № 5. P. 533.
20. Donike M., Mareck-Engelke U., Rauth S. Statistical evaluation of longitudinal studies, part 2: the usefulness of subject based reference ranges / *Proceedings of the 12th Cologne Workshop On Dope Analysis*. Köln (Germany): Sport und Buch Strausse Edition Sport, 1995. P. 157.
21. Ofterbro H. Evaluating an abnormal urinary steroid profile // *Lancet*. 1992. V. 339. № 8798. P. 941.
22. Mareck U., Geyer H., Opfermann G., Thevis M., Schänzer W. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 7. P. 877.
23. Zhang Y., Tobias H.J., Auchus R.J., Brenna T.J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography fast quadrupole mass spectrometry (GC \times GC-qMS) for urinary steroid profiling. mass spectral characteristics with chemical ionization // *Drug Test. Anal.* 2011. V. 3. P. 857.
24. Piper T., Thevis M. Applications of isotope ratio mass spectrometry in sports drug testing accounting for isotope fractionation in analysis of biological samples // *Methods Enzymol.* 2017. V. 596. P. 403.
25. Piper T., Emery C., Saugy M. Recent developments in the use of isotope ratio mass spectrometry in sports drug testing // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. № 2. P. 433.
26. Piper T., Mareck U., Geyer H., Flenker U., Thevis M., Platen P., Schänzer W. Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. № 4. P. 2161.

27. *Hebestreit M., Flenker U., Fuscholler G., Geyer H., Gunter U., Mareck U., Piper T., Thevis M., Ayotte C., Schänzer W.* Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry // *Analyst*. 2006. V. 131. № 9. P. 1021.
28. *Piper T., Geyer H., Gougoulidis V., Flenker U., Schänzer W.* Determination of (13)C/(12)C ratios of urinary excreted boldenone and its main metabolite 5beta-androst-1-en-17beta-ol-3-one // *Drug Test. Anal.* 2010. V. 2. № 5. P. 217.
29. *Gómez C., Pozo O.J., Geyer H., Marcos J., Thevis M., Schänzer W., Segura J., Ventura R.* New potential markers for the detection of boldenone misuse // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 132. № 3–5. P. 239.
30. *Casilli A., Piper T., de Oliveira F.A., Padilha M.C., Pereira H.M., Thevis M., de Aquino Neto F.R.* Optimization of an online heartcutting multidimensional gas chromatography clean-up step for isotopic ratio mass spectrometry and simultaneous quadrupole mass spectrometry measurements of endogenous anabolic steroid in urine // *Drug Test. Anal.* 2016. V. 8. № 11–12. P. 1204.
31. *Robinson N., Castella V., Saudan C., Sottas P.-E., Schweizer C., Dimo-Simonin N., Mangin P., Saugy M.* Elevated and similar urinary testosterone/epitestosterone ratio in all samples of a competition testing: Suspicion of a manipulation // *Forensic Sci. Int.* 2006. V. 163. № 1–2. P. 148.
32. *Thevis M., Geyer H., Mareck U., Sigmund G., Henke J., Henke L., Schänzer W.* Detection of manipulation in doping control urine sample collection: a multidisciplinary approach to determine identical urine samples // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 388. № 7. P. 1539.
33. *Bean K.A., Henion J.D.* Direct determination of anabolic steroid conjugates in human urine by combined high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997. V. 690. № 1–2. P. 65.
34. *Bowers L.D., Sanaullah M.* Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1996. V. 687. № 1. P. 61.
35. *Danaceau J.P., Scott Morrison M., Slawson M.H.* Quantitative confirmation of testosterone and epitestosterone in human urine by LC/Q-ToF mass spectrometry for doping control // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 7. P. 993.
36. *Badoud F., Grata E., Boccard J., Guillarme D., Veuthey J.L., Rudaz S., Saugy M.* Quantification of glucuronidated and sulfated steroids in human urine by ultra high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 400. № 2. P. 503.
37. *Guan F., Uboh C.E., Soma L.R., You Y., Liu Y., Li X.* High-throughput UHPLC-MS/MS method for the detection, quantification and identification of fifty-five anabolic and androgenic steroids in equine plasma // *J. Mass Spectrom.* 2010. V. 45. № 11. P. 1270.
38. *Cha E., Jeong E.S., Cha S., Lee J.* Coupling of gas chromatography and electrospray ionization high resolution mass spectrometry for the analysis of anabolic steroids as trimethylsilyl derivatives in human urine // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 964. P. 123.
39. *Berges R., Segura J., Ventura R., Fitch K.D., Morton A.R., Farre M., Mas M., de la Torre X.* Discrimination of prohibited oral use of salbutamol from authorized inhaled asthma treatment // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. № 9. P. 1365.
40. *Polettini A., Montagna M., Segura J., de la Torre X.* Determination of b2-agonists in hair by gas chromatography/mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 1996. V. 31. № 1. P. 47.
41. *Jacobson G.A., Yee K.C., Wood-Baker R., Walters E.H.* SULT 1A3 single-nucleotide polymorphism and the single dose pharmacokinetics of inhaled salbutamol enantiomers: Are some athletes at risk of higher urine levels? // *Drug Test. Anal.* 2015. V. 7. № 2. P. 109.
42. *Spyridaki M.H.E., Tsitsimpikou C.J., Siskos P.A., Georgakopoulos C.G.* Determination of ephedrines in urine by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2001. V. 758. № 2. P. 311.
43. *Deventer K., Pozo O.J., Van Eenoo P., Delbeke F.T.* Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of ephedrines in urine // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2009. V. 877. № 4. P. 369.
44. *Chołbiński P., Wicka M., Kowalczyk K., Jarek A., Kaliszewski P., Pokrywka A., Bulska E., Kwiatkowska D.* Detection of beta-methylphenethylamine, a novel doping substance, by means of UPLC/MS/MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 15. P. 3681.
45. *Li X., Uboh C.E., Soma L.R.* Sensitive hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for rapid detection, quantification and confirmation of cathinone-derived designer drugs for doping control in equine plasma // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014. V. 28. № 2. P. 217.
46. *Glicksberg L., Bryand K., Kerrigan S.* Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2016. V. 1035. P. 91.
47. *Monfort N., Martínez L., Bergés R., Segura J., Ventura R.* Screening method for stimulants in urine by UHPLC-MS/MS: identification of isomeric compounds // *Drug Test. Anal.* 2015. V. 7. № 9. P. 819.
48. *Wang S.M., Wang T.C., Giang Y.S.* Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic-isotope dilution mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2005. V. 816. № 1–2. P. 131.
49. *Yu J., Han K.S., Lee G., Paik M.J., Kim K.R.* Enantiomeric composition analysis of pranoprofen in equine plasma and urine by chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry in selected reaction monitoring mode // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010. V. 878. № 31. P. 3249.
50. *Matabosch X., Pozo O.J., Pérez-Mañá C., Farré M., Marcos J., Segura J., Ventura R.* Discrimination of prohibited oral use from authorized inhaled treatment of

- budesonide in sports // *Ther. Drug Monit.* 2013. V. 35. № 1. P. 118.
51. *Deventer K., Delbeke F.T.* Validation of a screening method for corticosteroids in doping analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. V. 17. № 18. P. 2107.
52. *Thörngren J.-O., Östervall F., Garle M.* A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC–MS/MS // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 7. P. 980.
53. *Badouda F., Grataa E., Perrenouda L., Avoisa L., Saugya M., Rudazb S., Veutheyb J.-L.* Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. I. Screening analysis // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 20. P. 4423.
54. *Badoud F., Grata E., Perrenoud L., Saugy M., Rudaz S., Veuthey J.L.* Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 25. P. 4109.
55. *Ho E.N.M., Kwok W.H., Wong A.S.Y., Wan T.S.M.* High resolution accurate mass screening of prohibited substances in equine plasma using liquid chromatography–orbitrap mass spectrometry // *Drug Test. Anal.* 2012. V. 5. № 7. P. 509.
56. *Geyer H., Parr M.K., Koehler K., Mareck U., Schänzer W., Thevis M.* Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 7. P. 892.
57. *Maughan R.J.* Contamination of dietary supplements and positive drug tests in sport // *J. Sports Sci.* 2005. V. 23. № 9. P. 883.
58. *Parr M.K., Gütschow M., Daniels J., Opfermann G., Thevis M., Schänzer W.* Identification of steroid isoxazole isomers marketed as designer supplement // *Steroids.* 2009. V. 74. № 3. P. 322.
59. *Thevis M., Schänzer W., Geyer H., Thieme D., Grosse J., Rautenberg C., Flenker U., Beuck S., Thomas A., Holand R., Dvorak J.* Traditional Chinese medicine and sports drug testing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts // *Br. J. Sports Med.* 2013. V. 47. № 2. P. 109.
60. *Zhanga J., Zhangb Y., Wang Y.* Validated quantification method for five ephedrine in dietary supplements using LC–MS/MS: Application to 503 cases // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2016. V. 1039. P. 1.
61. *Parr M.K., Blokland M.H., Liebetrau F., Schmidt A.H., Meijer T., Stanic M., Kwiatkowska D., Waraksa E., Sterk S.S.* Distinction of clenbuterol intake from drug or contaminated food of animal origin in a controlled administration trial – the potential of enantiomeric separation for doping control analysis // *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess.* 2017. V. 34. № 4. P. 525.
62. *Steel R., Timms M., Levina V., Vine J.* A high throughput screen for 17 Dermorphin peptides in equine and human urine and equine plasma // *Drug Test. Anal.* 2014. V. 6. № 9. P. 909.
63. *Thevis M., Thomas A., Delahaut P., Bosseloir A., Schänzer W.* Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 6. P. 1897.
64. *Hess C., Thomas A., Thevis M., Stratmann B., Quester W., Tschöepe D., Madea B., Musshoff F.* Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography–mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 404. № 6–7. P. 1813.
65. *Thomas A., Schänzer W., Thevis M.* Determination of human insulin and its analogues in human blood using liquid chromatography coupled to ion mobility mass spectrometry (LC–IM–MS) // *Drug Test Anal.* 2014. V. 6. № 11–12. P. 1125.