Обнаружение метастерона и его метаболита в моче методом газовой хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ГХ-МСВР)

Д.В. Былина[1]®, С.В. Гринь[2], А.А. Ткачук[1], Я.И. Кручек[1].

[1] Лаборатория антидопингового контроля Национального антидопингового центра Украины, 04112, Киев, ул. Танковая 8, denis.bylina@gmail.com

[2] Институт высоких технологий Киевского Национального университета им. Тараса Шевченко, 03187, Киев, пр. Академика Глушкова, 4г

Поступила: 4 ноября 2011 г / Подписана к печати: 2 февраля 2012 г.

Хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет существенно повысить селективность и чувствительность определения метаболитов анаболических стероидов в моче в сравнении с аналогичными системами с масс-детекторами низкого разрешения. Методом газовой хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ГХ-МСВР) исследованы пробы мочи волонтера после разового приема препарата Methyl Masterdrol. Изучены особенности выведения данного препарата, установлено, что использование ГХ-МСВР позволяет значительно увеличить время обнаружения метастерона после приёма препарата с 80 часов до 270 при идентификации по неметаболизированному препарату, и с 100 до 310 часов при идентификации по метаболиту.

D.V. BYLINA, S.V. GRYN, A.A. TKACHUK, Ya.I. KRUCHEK *DETECTION OF THE METHASTERONE AND ITS METHABOLITE IN HUMAN URINE BY THE GAS CROMATHOGRAPHY/ HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY (HRMS) METHOD.- Method of gas chromatography combined with high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) was applied for detection of methasterone (17β-Hydroxy-2α,17α-dimethyl-5α-androstane-3-one) and its metabolite in the urine of volunteer after single dose administration of Methyl Masterdrol drug. The peculiarities of the methasterone excretion were studied. An application of GC-HRMS allowed considerably (in compare with low-resolution GC-MS analysis) increase the time (from 80 to 270 hours in case of identification of non-metabolized methasterone and from 100 to 310 hours in case of methabolite) after the methasterone administration, when it can be detected in human urine.*

Ключевые слова: анаболические стероиды, газовая хроматография, масс-спектрометрия высокого разрешения, метастерон, допинг-анализ.

Keywords: anabolic steroids, gas chromatography, high resolution mass-spectrometry, methasterone, doping-analysis.

Метастерон (17β-гидрокси-2α,17α-диметил-5α-андростан-3-он, рис. 1, ***I***) относится к группе анаболических стероидов, запрещённых к применению в спорте Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) [1]. Соединения данного класса служат для увеличения мышечной массы, силы и выносливости спортсменов и являются наиболее часто используемыми запрещенными препаратами в спорте.

В организме человека большинство стероидов в значительной мере метаболизируются [2, 3], поэтому исходные соединения определяются в течение короткого промежутка времени после приема. Следовательно, для успешного детектирования в большинстве случаев необходим анализ специфических метаболитов и маркеров, которые позволяют подтвердить прием стероидов в течение длительного срока после их употребления.

Наиболее широко используемым для обнаружения и подтверждения присутствия анаболических стероидов в моче является метод ГХ-МС, в котором стероиды анализируются в виде триметилсилилированных производных [4]. Однако анализ следовых количеств данных соединений усложняется присутствием значительного фона эндогенных стероидов в матрице. Использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет существенно улучшить селективность и чувствительность анализа. На основании рекомендаций ВАДА [5] газовая или высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения ГХ(ВЭЖХ)-МСВР, а также тандемная хромато-масс-спектрометрия (ГХ(ВЭЖХ)-$МС^n$) широко используются для процедур подтверждения присутствия запрещенных препаратов в пробах спортсменов [6-8].

Метастерон впервые синтезирован в 1956 году Рингольдом [9], затем было показано, что он

© Д.В. Былина, С.В. Гринь, А.А. Ткачук, Я.И. Кручек

обладает сильной анаболической активностью со слабой андрогенной составляющей [10]. В медицинской и ветеринарной практике метастерон не применялся. Коммерчески доступный препарат появился в 2005 году в составе биодобавки „Superdrol", в этом же году он был включен в список запрещенных препаратов ВАДА. С этого момента начинается разработка методик обнаружения препарата и исследование его метаболизма.

Родченковым с сотрудниками [11] была проанализирована проба мочи волонтера после приема метастерона. Методом ГХ-МС в пробе идентифицирован метаболит - 2α,17α-диметил-5α-андростан-3α(β),17β-диол (вероятнее всего 3α-изомер, рис.1, ***II***) и неметаболизированная форма (рис.1, ***I***).

Использование метода ГХ-МСВР для определения экзогенных анаболических стероидов позволяет существенно снизить пределы их обнаружения в сравнении с классическим методом ГХ-МС, а также минимизировать мешающее влияние матрицы [6].

Авторами работы [12] подробно изучен метаболизм метастерона *in vitro* с использованием свежезамороженных гепатоцитов человеческой печени. Известно, что микросомальные и S9 фракции из гомогенатов печени могут использоваться для осуществления фазы I и II метаболизма 17α-метилированных стероидов. Данный метод позволяет наиболее полно определить метаболический профиль, практически нивелируя влияние матрицы. В экстракте было идентифицировано 8 метаболитов (рис. 1). Для установления их структуры авторами были синтезированы модельные соединения, которые исследовались методами ГХ-МС и ЯМР.

Согласно полученным масс-хроматографическим данным, основными метаболитами являются 2α,17α-диметил-5α-андростан-3β,17β-диол (***II***), 2α,17α-диметил-5α-андростан-2α,3β,17β-триол (***III***), 2α,17α-диметил-5α-андростан-2α,3β,16β,17β-тетрол (***VI***), кроме того, значительное количество метастерона выводится в неметаболизированном виде (***I***). Авторам удалось идентифицировать все вышеописанные метаболиты и в пробе волонтера, употреблявшего метастерон. Однако замечено, что обнаружение метаболитов в моче существенно усложняется, благодаря сильному мешающему влиянию эндогенных стероидов, присутствующих в матрице.

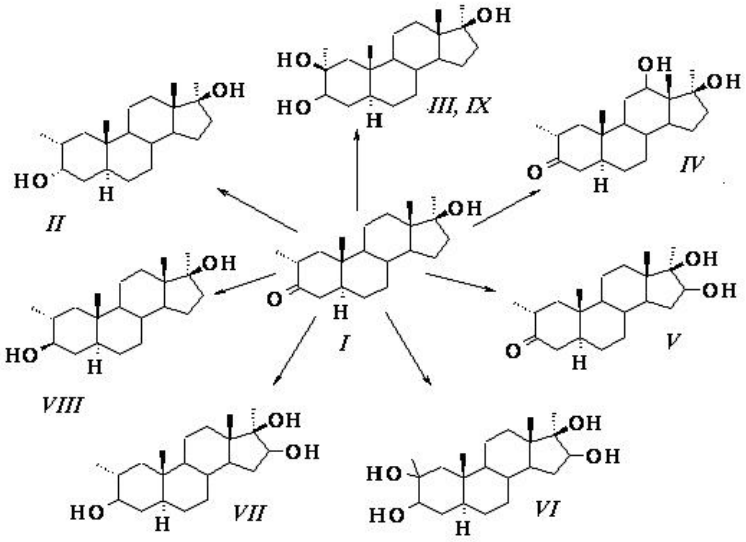

Рис. 1. Метаболизм метастерона (метаболит ***IX*** – изомер ***III*** с неидентифицированной структурой) [12].

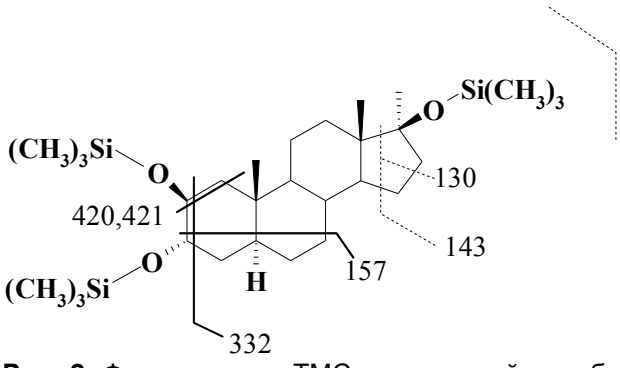

Рис. 2. Фрагментация ТМС-производной метаболита ***III*** [12]

Также авторами [12] были исследованы основные пути фрагментации триметилсилилированных производных метастерона и его метаболитов, которые приведены на схеме (рис. 2). В масс-спектрах данных соединений присутствуют молекулярный ион, а также фрагменты, соответствующие последовательному отщеплению фрагментов HO-TMS и групп CH_3. Для метастерона и его метаболитов, как и для других 17α-метилированных стероидов, характерно наличие специфичных фрагментов разрыва D-кольца стероидного ядра – 143 m/z и 130 m/z, а при добавлении гидроксильной группы в 16 положении – 218 и 231 m/z. Авторами [8] разработана скринин-

© Д.В. Былина, С.В. Гринь, А.А. Ткачук, Я.И. Кручек

говая методика ГХ-МС/МС (детектор с тройным квадруполем) для 6 групп запрещенных ВАДА препаратов, включая анаболические стероиды. Метастерон определялся только в виде неметаболизированной формы, для анализа использовались два перехода “родительский – дочерний ион” (SRM): 462→143, 462→141. В работе [7] описана скрининговая методика ряда стероидов методом ВЭЖХ-МСВР, где анализировался только индивидуальный метастерон. Целью нашей работы была разработка скрининговой методики обнаружения метастерона методом ГХ-МСВР в моче волонтера при разовом приеме таблетки Methyl Masterdrol, а также изучение скорости выведения препарата из организма

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование.

Для предварительного анализ проб использовался газовый хроматограф Focus GC с квадрупольным масс-спектрометром DSQ II (Thermo Finnigan). Хроматограф был оснащён колонкой RX-1ms, 0.25 мкм, 15 м, внутренний диаметр 0.22 мм. Газ-носитель – гелий, с делением потока 1:20, скорость потока 0,6 мл/мин, температура инжектора 280°C; температура трансферлайна 250°C; температурная программа термостата колонки: 186°C, 2 °C/мин до 236°C, 20°C/мин до 300°C (5 мин). Масс-хроматограммы записывались в режиме полного сканирования в диапазоне 70-650 m/z и в режиме сканирования выбранных ионов (SIM) с ионизацией электронным ударом с энергией 70 эВ, температура ионного источника составляла 250 °C.

Для исследования процессов выведения метастерона использовался газовый хроматограф Trace GC Ultra, соединенный с магнитосекторным масс-спектрометром высокого разрешения DFS (Thermo Finnigan). Параметры хроматографа: колонка DB 5-ms, 0.11 мкм, 30 м, внутренний диаметр 0.22 мм. Газ-носитель – гелий, с делением потока 1:20, скорость потока - 0,8 мл/мин; температура инжектора 280°C; температура трансферлайна 250°C; температурная программа термостата колонки: 120°C (1 мин), 50°C/мин до 177°C (1 мин, 5°C /мин до 250°C (5 мин) 10°C /мин до 320°C (1 мин). Масс-хроматограммы записывались в режиме MID (сканирование выбранных ионов с точной массой) с электростатическим сканированием.

Для внутренней калибровки использовался перфторфенантрен (FC5311). Энергия электронного удара 70 эВ, ток катода 1 мА, ширина окна сканирования 0.2 amu, значение разрешения масс-спектрометра составляло 10000 (10% высоты пика для иона 367.9867 m/z при ускоряющем потенциале 5000 В).

Реактивы и материалы

N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (MSTFA) (MACHEREY-NAGEL (Германия)), β-глюкуронидаза E.Coli K12 (Roshe (Германия)), трет-бутилметиловый эфир, K_2CO_3, дитиоэритритол (DTE), метанол (Acros (Бельгия)), Na_2SO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4 – Merck (Германия), NH_4I – Fluka (Италия). В качестве внутреннего стандарта использовался 17α-метилтестостерон производства LGC Standards (Германия).

Биопробы

Образцы содержащей аналиты мочи были получены после контролируемого приема здоровым волонтером (с его письменного согласия) одной таблетки препарата «Methyl Masterdrol» производителя Legal-Gear (США) с содержанием субстанции 10 мг. Пробы отбирались через определённые интервалы времени и сохранялись замороженными при температуре -20°C

Пробоподготовка

К 3.000 мл мочи волонтера добавляли 50,0 мкл метанольного раствора внутреннего стандарта – 17α-метилтестостерона (1 мкг/мл), 1000 мкл фосфатного буфера (pH=6.0-6.5) и 30.0 мкл β-глюкуронидазы. Гидролиз проводили в течение 90 минут при 50°C. После окончания гидролиза добавляли 1000 мкл раствора K_2CO_3, (10% масс), затем, после охлаждения раствора до комнатной температуры – 0.050 г Na_2SO_4. Продукты гидролиза экстрагировали 5.000 мл трет-бутилметилового эфира, с последующим встряхиванием на шейкере (2 мин), и центрифугированием (5 мин при 3000 об./мин) Водную фракцию вымораживали при температуре -20°C, затем отделяли эфирный слой и выпаривали досуха в токе азота при 40°C. К охлажденному сухому остатку добавляли 50.0 мкл дериватизирующего агента (MSTFA/DTE/NH_4I (1000:4:2; V:m:m)), и выдерживали образцы 50 минут при 70°C. Охлаждённые до комнатной температуры образцы переносили в виалы со вставками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для первичного определения состава метаболитов метастерона были записаны масс-хроматограммы метастерон-содержащей и холостой пробы мочи волонтера на приборе низкого разрешения (DSQ II) в режиме полного сканирования и в режиме селективного ионного детектирования (SIM). Для идентификации в режиме полного сканирования использовались пробы, забранные через 20-30 часов после приема препарата. Все исследуемые соединения детектировались в виде полностью триметилсилилированных производных.

На основании сравнения экспериментальных масс-спектров с литературными [11, 12], в моче удалось обнаружить два метаболита: 2α,17α-диметил-5α-андростан-3α,17β-диол (рис. 1, ***II***), 2α,17α-диметил-5α-андростан-2α,3α,17β-триол (рис. 2, ***III***), а также неметаболизированный метастерон ***I***. Метастерон и исследуемые метаболиты фрагментируются согласно схеме, приведенной на рис. 2. Для всех аналитов наиболее интенсивен фрагмент с m/z=143, образующийся при раз-

рыве D-кольца андростанового ядра. Данный ион является характеристичным для 17α-метилированных анаболических стероидов. Также общими для всех исследуемых веществ являются ионы с m/z=130 (результат разрыва связей C_{13}-C_{17} и C_{14}-C_{15} кольца D) и с m/z=332, образующийся в результате расщепления связей C_1-C_2 и C_3-C_4 кольца A. Остальные характеристические ионы, наблюдаемые в масс-спектре, являются результатом последовательного отщепления фрагментов HO-TMS и CH_3-групп. Основные ионы аналитов приведены в таблице 1. Для метаболита ***III*** специфическим является ион с m/z=420, обусловленный наличием OH-группы в положении 3. Масс-хроматограммы мочи после приёма препарата, полученные методом ГХ-МС в режиме сканирования выбранных ионов (SIM) через 30 ч после приема Methyl Masterdrol) приведены на рис. 3.

Для изучения методом ГХ-МСВР выведения метастерона из организма был выбран метаболит ***II***, а также индивидуальный метастерон. Масс-спектр метаболита ***III*** имеет менее интенсивные пики с высокими значениями m/z (в том числе и пик молекулярного иона), поэтому для анализа выведения он не использовался.

Таблица 1. Характеристичные ионы ТМС-производных метастерона и его метаболитов.

Аналит	$[M^{\cdot}]^+$	$-CH_3$	-HOTMS	$-CH_3$, HOTMS
Метастерон	462	447	372	359
Метаболит ***II***	464	449	374	357
Метаболит ***III***	552	537	462	447

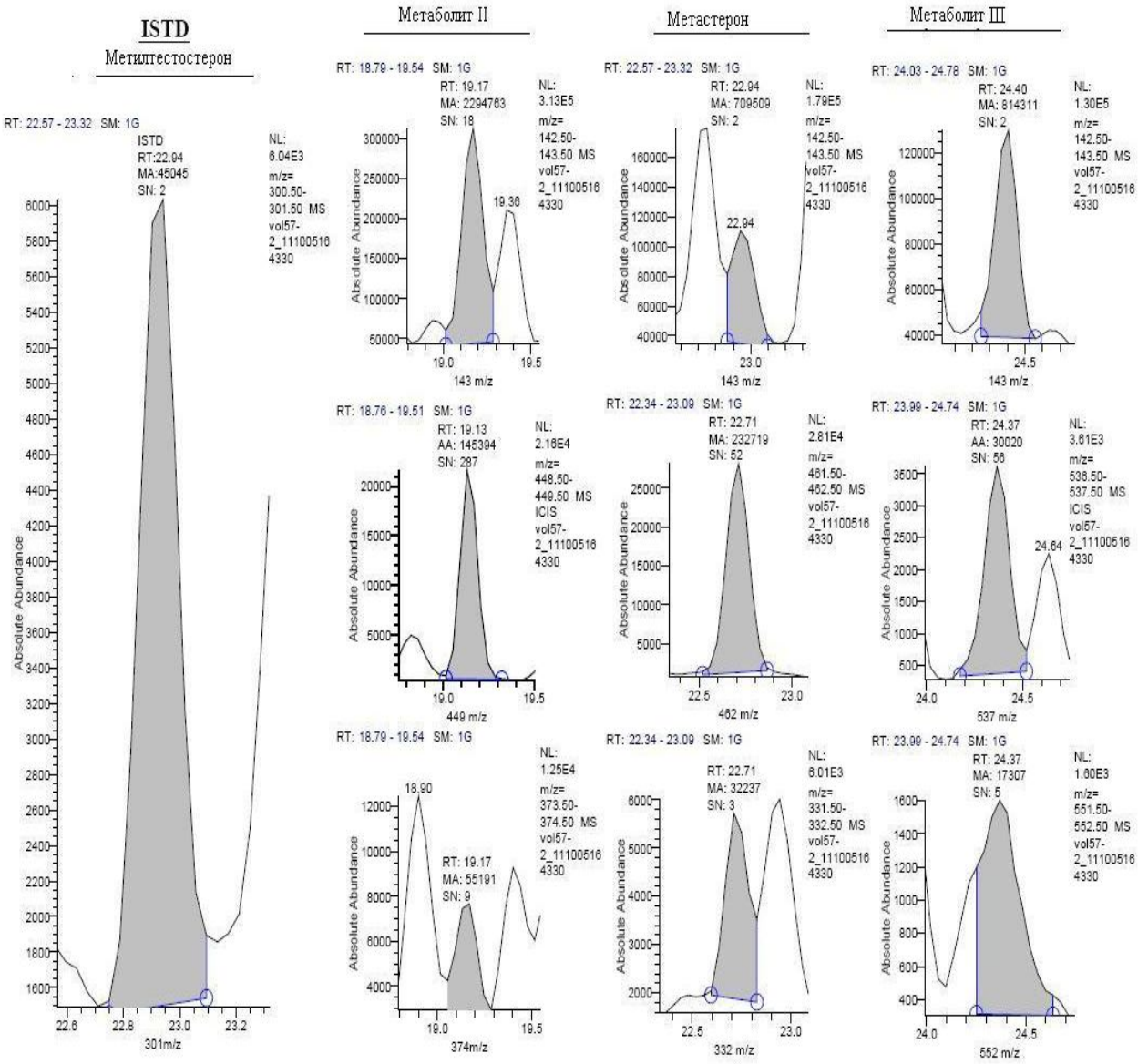

Рис. 3 Масс-хроматограммы (ГХ-МС) экстракта мочи, через 30 ч после приема Methyl Masterdrol

© Д.В. Былина, С.В. Гринь, А.А. Ткачук, Я.И. Кручек

Параметры MID-метода (режим Lock mode) для анализа ГХ-МСВР приведены в таблице 2. Ионы “lock” и “cali” принадлежат внутреннему калибровочному соединению (FC5311). Ион с m/z 143 не сканировался, ввиду ограничений по диапазону сканирования масс, присущих MID-методу: минимальное и максимальное значение m/z в сегменте могут отличаться друг от друга не более чем на 50 %. Кроме того, данный ион может образовываться в результате фрагментации ряда эндогенных стероидов, и потому не является высокоспецифичным для метастерона и его метаболитов.

Масс-хроматограммы холостой пробы и пробы мочи волонтера после приёма препарата приводятся на рис. 4 и 5. Для оценки селективности и специфичности выбранных характеристичных ионов получены хроматограммы бланковых образцов мочи: моча волонтера до приема препарата, а также 21 образца мочи волонтеров, не принимавших препарат. Метод обладает приемлемой селективностью, о чем свидетельствует отсутствие на всех масс-хроматограммах мешающих пиков в окне времени удерживания 5 % от RT аналитов с соотношением сигнал/шум более 3:1.

Таким образом, для идентификации вышеописанных аналитов было использовано три параметра: характеристичные значения m/z, времена удерживания и соотношения интенсивностей выбранных ионов, которое остается стабильным при различных концентрациях аналитов.

Таблица 2. Параметры MID-метода для анализа ГХ-МСВР

Параметр	Значение
Width first lock, amu	0.2
Sweep peak width	3
Offset, μV	20
Measure/lock ratio	1
Magnetic delay	40
Electric delay	6
Segment 1): m/z Methabolite ***II***	449.3266;374.2999; 359.2675 316.9819 (Lock) 454.9723 (Cali)
Segment 2): m/z Methasterone ***I***	462.3344; 463.3383; 332.2529 446.3036 366.9787 (Lock) 454.9723 (Cali)

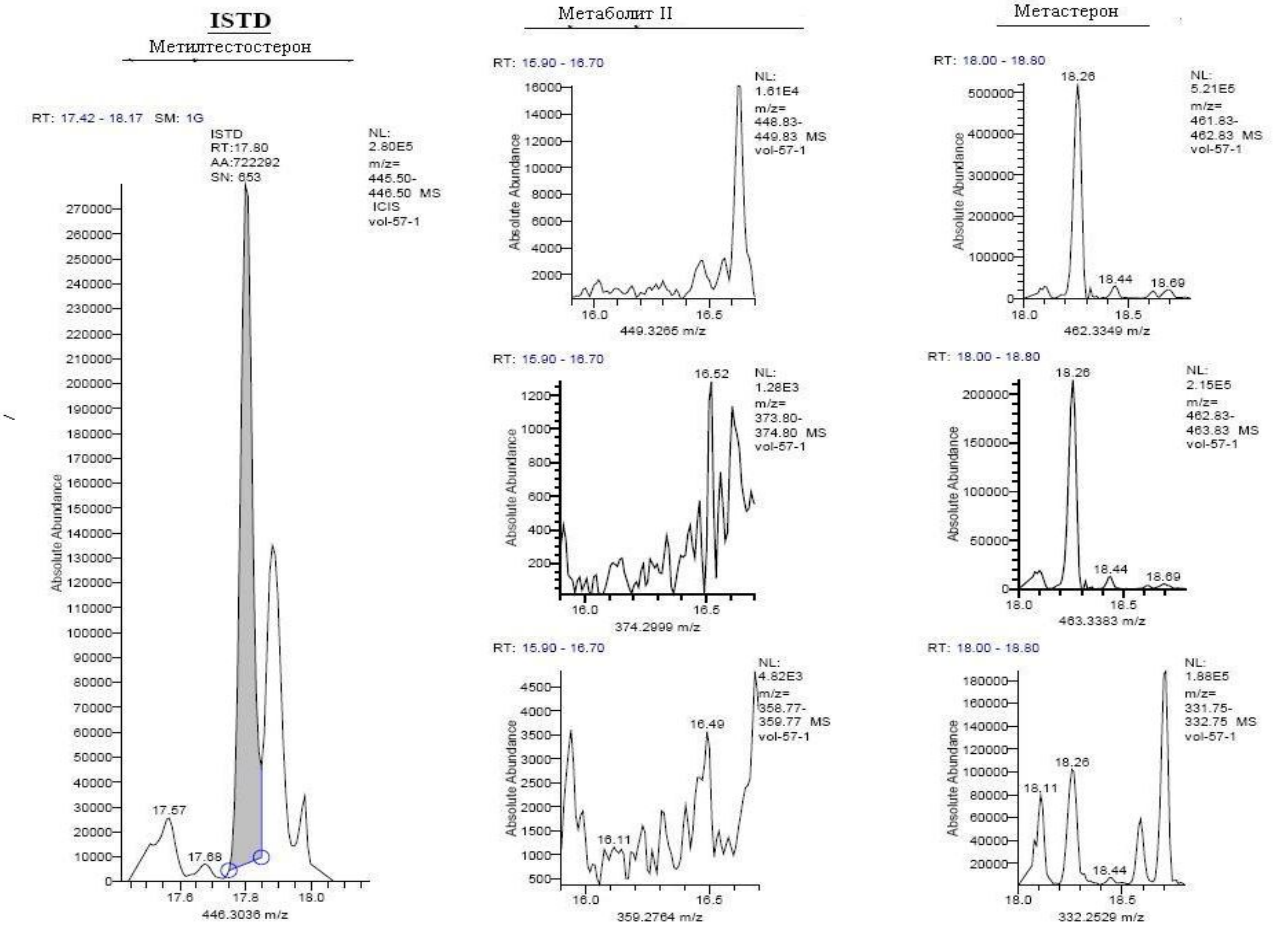

Рис.4 Масс-хроматограммы (ГХ-МСВР) бланковой мочи волонтера

© Д.В. Былина, С.В. Гринь, А.А. Ткачук, Я.И. Кручек

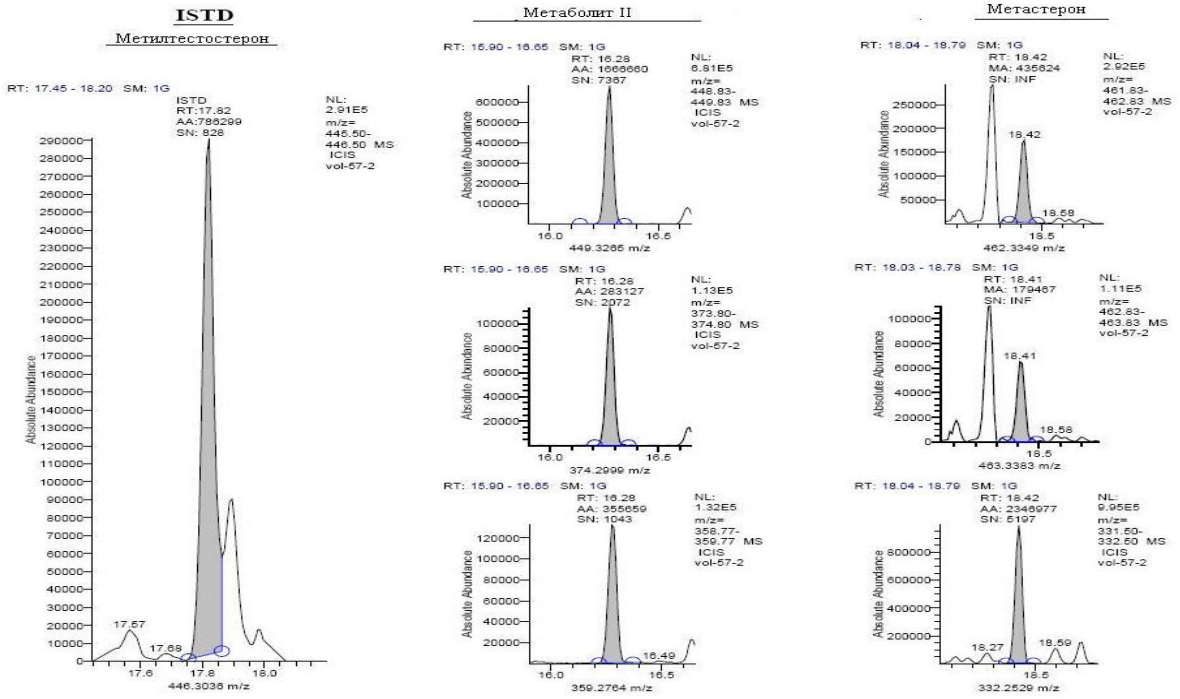

Рис. 5 Масс-хроматограммы (ГХ-МСВР) образца мочи волонтера после приема Methyl Masterdrol (30 ч.)

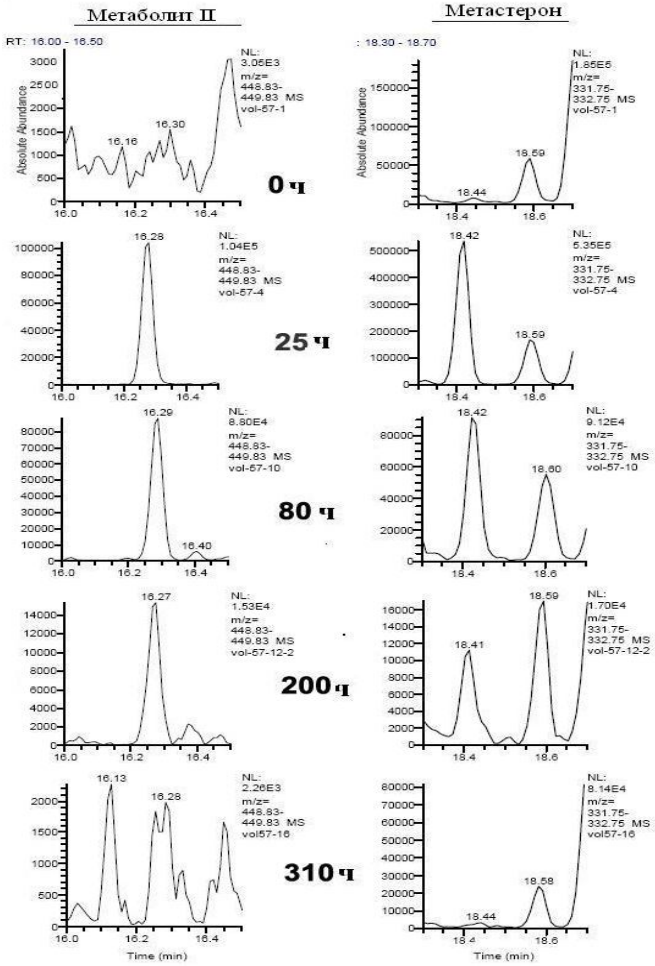

Рис. 6. Масс-хроматограммы образцов мочи, полученных на разных сроках выведения метастерона

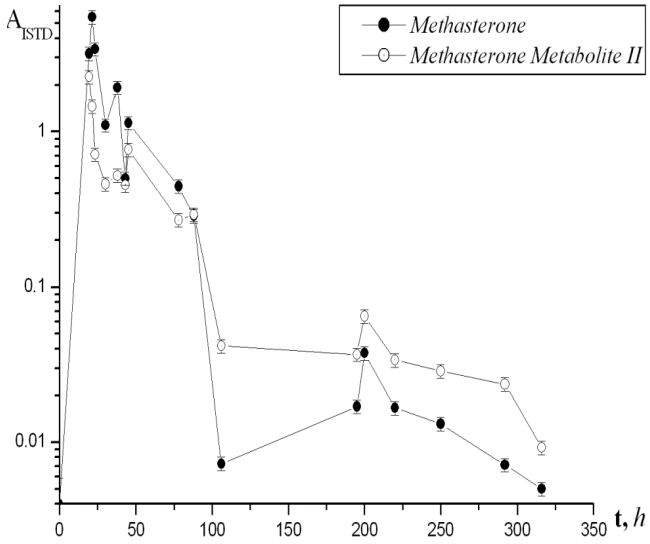

Рис. 7. Зависимости относительной концентрации метастерона ***I*** и его метаболита ***II*** от времени (логарифмическая шкала)

На хроматограммах пробы после приёма препарата видны четко выраженные пики с RT=16.29 мин (метаболит ***II***) и RT = 18.40 мин (метастерон), отсутствующие на хроматограмме бланковой мочи.

Для определения времени, в течение которого возможна надежная идентификация метастерона в моче, необходимо исследовать особенности кинетики его выведения из организма. Для этой цели были проанализированы масс-хроматограммы проб, полученных на разных сроках выведения (приведены на рис. 6).

© Д.В. Былина, С.В. Гринь, А.А. Ткачук, Я.И. Кручек

На основе данных ГХ-МСВР (в виде масс-фрагментограмм ионов с 449.3266 m/z (***II***) и 332.2529 m/z (***I***)) были построены кривые выведения, которые приведены на рис. 7.

Они представляют собой зависимость отношения площадей хроматографических пиков аналита к внутреннему стандарту от времени. Зависимости для остальных ионов аналита носят такой же характер. Максимальный уровень ***II*** и ***I*** в моче достигается между 20 и 30 ч. после приема препарата, далее их интенсивности резко снижаются (100 ч.), затем медленно падают вплоть до исчезновения отклика аналитов (соотношение сигнал/шум меньше 3).

Следует заметить, что на начальных стадиях процесса соотношение метастерон/метаболит несколько сдвинуто в сторону повышенного содержания метастерона, в то время как на поздних стадиях выведения возможно идентифицировать только метаболит ***II***. Его концентрация остаётся значительной на протяжении 10-12 суток после приёма препарата. Недоступность стандартных соединений метастерона и его метаболитов не позволила получить кривые выведения в виде концентрационных зависимостей.

Таким образом, нами было установлено, что методом ГХ-МСВР определение 2α,17α-диметил-5α-андростан-3α,17β-диола (метаболита ***II*** метастерона) в моче возможно в течение ~310 часов, а неметаболизированного вещества в течение ~270 часов после приема препарата. Анализ традиционным методом ГХ-МС позволил детектировать 2α,17α-диметил-5α-андростан-3α,17β-диол в течение ~100 часов, чистый метастерон ~80 часов.

Достаточно долгое время выведения метастерона вполне закономерно и является следствием наличия метильной группы в 17-α положении, существенно замедляющей его расщепление клетками печени [8].

ВЫВОДЫ

Нами предложен инструментальный метод определения метастерона и его производных в моче. Методом ГХ-МСВР проанализирован процесс выведения метастерона и его метаболита из организма.

Установлено, что на начальных стадиях 2α,17α-диметил-5α-андростан-3α,17β-диол и исходное вещество выводятся в приблизительно равных количественных соотношениях, в то время как на поздних стадиях (после 100 часов) преобладает метаболит. Показано, что использование данной методики позволяет существенно увеличить время обнаружения данного вещества после приёма препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. The World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping code. The 2012 Prohibited List. http://list.wada-ama.org

2. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clin. Chem.1996, 42(7), 1001–1020.

3. Van Eenoo P., Delbeke F. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control – new steroids and new insight. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2006, 101(4-5), 161–178.

4. Ayotee C., Goudreault D., Charlebois A. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine . J. of Chromatography B. 1996, 687(1), 3–25.

5. Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry. WADA Technical Documents, TD2010IDCR, 2010, http://www.wada-ama.org

6. Schänzer W., Delahaut P., Geyer H., Machnik M., Horning S. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas-chromatography-high-resolution mass spectrometry. J. of Chromatography B. 1996, 687(1), 93–108.

7. Virus E., Sobolevsky T., Rodchenkov G. Introduction of HPLC/Orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control. J. Mass. Spectrom. 2008. 43, 949–957.

8. Van Eenoo P., Van Gansbeke W., De Brabanter N., Deventer K., Delbeke F. A fast, comrehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry .J. of Chromatography A. 2011, 1218(21), 3306–3316.

9. Ringold H., Rosenkranz G. Steroids. LXXXIII. Synthesis of 2-Methyl and 2,2-Dimethyl Hormone Analogs. J. of Organic Chemistry. 1956, 21, 1333–1335

10. Ringold H., Batres O., Halpern O., Necoechea E. Steroids. CV.1 2-Methyl and 2-Hydroxymethylene-androstane Derivatives. J.of the American Chemical Society. 1959, 81(2), 427–432.

11. Rodchenkov G., Sobolevsky T., Sizoi V. New designer anabolic steroids from internet. Recent Advances in doping analysis. Sport und Buch Strauss, Köln, Germany. 2006, 14, 141–150.

12. Gauthier J., Goudreault D., Poirier D., Ayotte C., Identification of drostanolone and 17-methyldrostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes. Steroids. 2009, 74(3), 306–314.

© Д.В. Былина, С.В. Гринь, А.А. Ткачук, Я.И. Кручек