

ISSN 1561-8331 (Print)  
 ISSN 2524-2342 (Online)  
 УДК 543.054  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-4-302-311>

Поступила в редакцию 17.03.2023  
 Received 17.03.2023

С. М. Лещев<sup>1</sup>, Ю. Г. Походня<sup>2</sup>, О. Н. Чеховская<sup>2</sup>, А. А. Агабалаев<sup>3</sup>, М. Ф. Заяц<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь  
<sup>2</sup>Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, Минский р-н, Беларусь  
<sup>3</sup>Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении, Минск, Беларусь

## ЭКСТРАКЦИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

**Аннотация.** При 20 °С изучена экстракция ряда анаболических стероидов (тестостерон; эпитестостерон; эпиметендиол; 17 $\alpha$ -метилтестостерон; 19-норэтиохоланолон; 18-норметенол; 19-норандростерон; 3 $\alpha$ -гидрокси-2 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-17-он; 9 $\alpha$ -фтор-17,17-диметил-18-норандростан-4,13-диен-11 $\beta$ -ол-3-он; 1 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он; 1 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -диол; эпоксандролон; метастерон; оксандролон; форместан; 16 $\beta$ -гидроксифуразабол) органическими растворителями из воды и водно-солевых растворов. На основании полученных экспериментальных данных рассчитаны константы распределения анаболических стероидов (АС), которые были использованы для оптимизации стандартной методики пробоподготовки в процессе определения анаболических андрогенных стероидов (ААС) и их метаболитов в моче спортсменов. Установлено, что наиболее селективным экстрагентом из водных и водно-солевых растворов является гексан, извлекающий большинство ААС. Для повышения степени экстракции плохо извлекаемых гексаном ААС целесообразно применять высаливание сульфатом натрия или аммония и использовать более активные органические экстрагенты – хлористый метилен или диэтиловый эфир. Разработана экстракционная методика пробоподготовки мочи спортсменов для последующего определения в ней анаболических стероидов и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Предложенная методика характеризуется стандартным отклонением 10–15 % и пределом обнаружения около 10 нг/мл мочи.

**Ключевые слова:** анаболические стероиды, метаболиты, моча, экстракция, константы распределения, газовая хромато-масс-спектрометрия

**Для цитирования.** Экстракция анаболических стероидов органическими растворителями из водных растворов / С. М. Лещев [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2023. – Т. 59, № 4. – С. 302–311. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-4-302-311>

S. M. Leschev<sup>1</sup>, Yu. G. Pakhadnia<sup>2</sup>, O. N. Tchekhovskaya<sup>2</sup>, A. A. Ahabalayeu<sup>3</sup>, M. F. Zayats<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State University, Minsk, Belarus  
<sup>2</sup>National Anti-Doping Laboratory, Liasny, Minsk region, Belarus  
<sup>3</sup>Center for Examinations and Tests in Health Service, Minsk, Belarus

## ORGANIC SOLVENT EXTRACTION OF ANABOLIC STEROIDS FROM AQUEOUS SOLUTIONS

**Abstract.** The extraction of anabolic steroids (testosterone; epitestosterone; epimethenediol; 17 $\alpha$ -methyltestosterone; 19-norethiocholanolone; 18-normethenol; 19-norandrosterone; 3 $\alpha$ -hydroxy-2 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-17-one; 9 $\alpha$ -fluoro-17,17-dimethyl-18-norandrostane-4,13-dien-11 $\beta$ -ol-3-one; 1 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one; 1 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol; epioxandrolone; methasterone; oxandrolone; formestane; 16 $\beta$ -hydroxyfurazabol) with organic solvents from water and aqueous salt solutions was studied at 20 °C. Based on the experimental data obtained, the partition ratios of anabolic steroids (AS) were calculated, which were used to optimize the standard sample preparation procedure in the process of determining anabolic androgenic steroids (AAS) and their metabolites in the urine of athletes. It was found that the most selective extractant from aqueous and aqueous salt solutions is hexane, which extracts the majority of AAS. To increase the recovery of AAS, poorly extracted by hexane, it is advisable to use salting out with sodium or ammonium sulfate and use more active organic extractants – methylene chloride or diethyl ether. An extraction sample preparation technique has been developed for the subsequent determination of anabolic steroids and their metabolites in athletes' urine by gas chromatography with mass spectrometric detection method. The proposed method is characterized by a standard deviation of 10 – 15 % and a detection limit of about 10 ng/ml of urine.

**Keywords:** anabolic steroids, metabolites, urine, extraction, partition ratios, gas chromatography-mass spectrometry

**For citation.** Leschev S. M., Pakhadnia Yu. G., Tchekhovskaya O. N., Ahabalayeu A. A., Zayats M. F. Organic solvent extraction of anabolic steroids from aqueous solutions. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2023, vol. 59, no. 4, pp. 302–311 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-3-302-311>

**Введение.** Повышение спортивных результатов спортсменов за счет употребления запрещенных препаратов является глобальной проблемой современного мира [1–6]. Из-за большого числа запрещенных веществ разработаны серии скрининговых процедур, направленных на обнаружение широкого круга веществ и их метаболитов с близкими физико-химическими свойствами [1]. Из всех классов соединений, запрещенных к применению, ААС занимают первое место по частоте употребления спортсменами [1].

Для выявления экзогенных АС достаточно проведения их качественного определения. В случае ААС, которые могут присутствовать в организме в качестве эндогенных, выполняется количественное определение данных соединений с дальнейшим определением изотопной структуры для подтверждения их экзогенного либо эндогенного происхождения [1]. В настоящее время в анализе ААС широко используется хромато-масс-спектрометрия, в том числе метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» (ГХ-МС-МС), работающий в режиме мониторинга множественных реакций (Multiple reaction monitoring, далее MRM) [7–14].

На аналитическом этапе допинг-контроля определяют не только исходные анаболические агенты, входящие в состав препаратов в качестве действующего вещества, но и их метаболиты [14–19]. Основным объектом исследования антидопинговых лабораторий является моча. Большинство ААС полностью метаболизируются в человеческом организме, и только небольшое количество исходного препарата в неизменном виде выводится с мочой [14–20]. Стоит отметить, что, несмотря на высокую чувствительность и селективность методов, применяемых для определения ААС в пробах спортсменов, результаты анализа во многом зависят от эффективности предварительной пробоподготовки [7, 14–19, 21, 22].

Выведение большинства ААС и их метаболитов с мочой происходит после конъюгирования стероида с глюкуроновой кислотой или сульфатом с образованием нелетучих полярных соединений. Ввиду того что определение анаболических стероидов обычно осуществляется методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС), конъюгаты стероидов должны подвергаться гидролизу перед анализом [14, 19, 23]. Для данной цели широко используется фермент глюкуронидаза из *E. coli*. Ферментативный гидролиз выполняют при pH от 6,3 до 6,5 (в среде фосфатного буфера) и температуре 56 °С.

Присутствие гидроксильных и кетогрупп в ААС и их метаболитах приводит к трудностям при их ГХ-МС определении, что связано главным образом с их недостаточным хроматографическим разрешением и термодеструкцией ААС в инжекторе, поэтому ААС перед ГХ-МС анализом обычно дериватизируют реакцией с N-метил-N(триметилсилил)трифторацетамидом (MSTFA) [7, 19, 21, 22].

Гидроксильные функциональные группы количественно реагируют с MSTFA, образуя стабильные триметилсилильные (ТМС) эфиры. Достоинство этого реагента заключается в том, что он одновременно служит растворителем и может непосредственно вводиться в инжектор газового хроматографа.

Сегодня MSTFA является самым распространенным реагентом при допинг-контроле для определения АС. Для образования ТМС-производных АС с кетогруппами посредством реакции с их енольными формами применяют триметилсилилиодид (ТМСИ) в качестве катализатора. При этом использование иодида аммония ( $\text{NH}_4\text{I}$ ) одновременно с MSTFA позволяет получать ТМСИ непосредственно в реакционной смеси. Для повышения выхода реакции также рекомендуется добавлять восстановитель, например дитиотреитол (DTT), что сводит к минимуму образование йода в среде указанного выше реагента [21].

Одним из важных этапов пробоподготовки наряду с гидролизом конъюгатов и дериватизацией является жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) анализируемых соединений из мочи (основной тип матрицы, используемой для анализа) [19, 21]. Моча представляет собой достаточно сложную по составу матрицу, в которой могут присутствовать низкомолекулярные продукты метаболизма аминокислот и сахаров (амины, мочевины, карбоновые кислоты, соли карбоновых кислот и др.), небольшие количества пептидов, стероидов, пигмента уробилина, окрашивающего мочу в желтый цвет. Жидкостную экстракцию используют для удаления мешающих компонентов

матрицы и перевода определяемых веществ в неводную среду, в которой возможна реакция получения ТМС-производных данных веществ [19, 21]. При этом экстракция ААС в настоящее время недостаточно хорошо изучена, поэтому выбор экстракционной системы для пробоподготовки часто осуществляется эмпирически.

Исходя из вышеуказанного цель данной работы – определение константы распределения ряда ААС, основной характеристики экстракционных процессов, в системах гексан–вода и водно-солевые растворы, диэтиловый эфир–вода, хлористый метилен–вода и на основе полученных данных подбор оптимальных условий экстракции АС из воды и мочи спортсменов при проведении допинг-анализа.

**Экспериментальная часть. Реактивы.** Использовали стандартные образцы следующих веществ (рисунок): тестостерон (USP Reference Standard, 46923, США),  $\geq 98,0$  %; эпитестостерон (USP Reference Standard, 1646031, США),  $\geq 98,0$  %; эпиметендиол (National measurement Institute, Австралия), 97,0 %; 17 $\alpha$ -метилтестостерон (Sigma-Aldrich, США),  $\geq 98,0$  %; 19-норэтиохоланолон (National measurement Institute, Австралия), 99,8 %; 17,17-диметил-18-нор-5 $\beta$ -андростан-1,13-диен-3 $\alpha$ -ол (National measurement Institute, Австралия),  $\geq 98,0$  %; 19-норандростерон (LGC GmbH, Германия), 99,6 %; 2 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он (National measurement Institute, Австралия),  $\geq 98,0$  %; 9 $\alpha$ -фтор-17,17-диметил-18-норандростан-4,13-диен-11 $\beta$ -ол-3-он (National measurement Institute, Австралия), 99,6 %; 1 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он (National measurement Institute, Австралия),  $\geq 98,0$  %; 1 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -диол (TRC, Канада),  $\geq 98,0$  %; 17-эпиоксандролон (National measurement Institute, Австралия), 99,3 %; метастерон (National measurement Institute, Австралия), 97,6 %; оксандролон (Dr.Ehrenstorfer GmbH, Германия), 99,0 %; форместан (Sigma-Aldrich, США),  $\geq 98,0$  %; 16 $\beta$ -гидроксифуразабол (National measurement Institute, Австралия),  $\geq 98,0$  %.

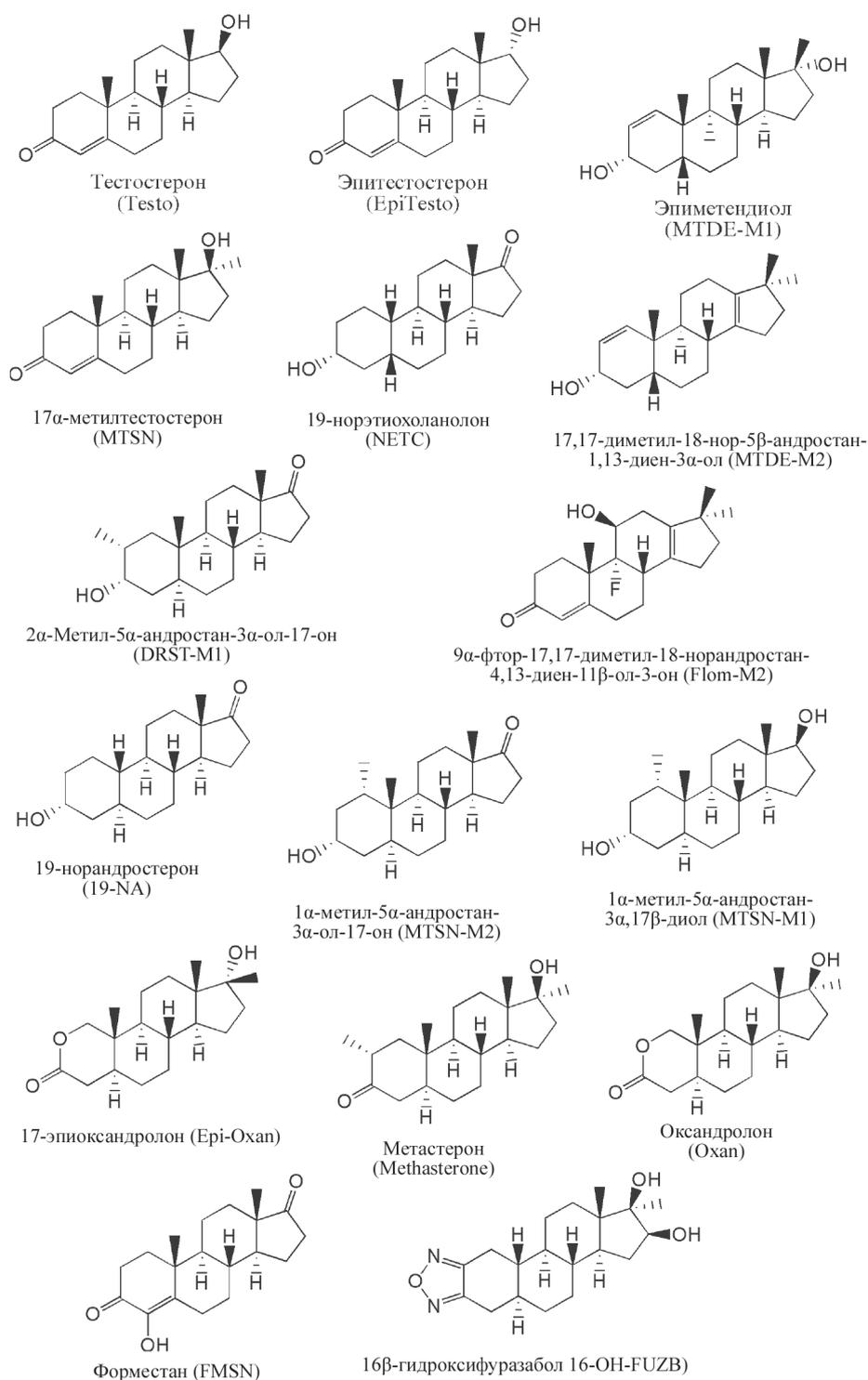
Использовали растворители: гексан (х. ч., ЭКОС-1, Россия),  $\geq 99,9$  %; метанол для ВЭЖХ/МС (Fisher Chemicals, США),  $\geq 99,9$  %; ацетонитрил для ВЭЖХ/МС (Fisher Chemicals, США),  $\geq 99,9$  %; диэтиловый эфир (ч. д. а., ЛенРеактив, Россия),  $\geq 98,0$  %; метилтретбутиловый эфир (ч. д. а., ЭКОС-1, Россия),  $\geq 99,0$  %; хлористый метилен (х. ч., ЭКОС-1, Россия),  $\geq 99,8$  %. Деионизированную воду получали с помощью системы подготовки воды Direct-Q 3 UV System (Millipore, США). В качестве газа – носителя для ГХ использовали гелий (НИИ КМ, Россия), 99,9999 %, в качестве газа столкновения – азот (Крион, Беларусь), 99,999 %, а также  $\beta$ -глюкуронидазу из *E. coli* K12 (BGALS-RO Roche, Cat. No. 03 707 601 001, Швейцария); N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид для ГХ-derivатизации (LiChropur, Германия),  $\geq 98,5$  %.

**Аппаратура.** ГХ-МС-МС-анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 7890 (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 7000 (Agilent Technologies, США) и устройством автоматического ввода жидких проб Autosampler 7693 (Agilent Technologies, США). Разделение веществ осуществляли на капиллярной колонке длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с нанесенной неподвижной фазой VF-1-MS толщиной 0,25 мкм (Agilent, США).

**Условия хроматографического разделения и детектирования.** В испаритель вводили 1 мкл образца в режиме без деления потока. Температуру испарителя поддерживали постоянной на уровне 280 °С, поток газа-носителя также был постоянным (1,2 мл/мин). Вещества разделяли в режиме градиентного поднятия температуры термостата колонки: 140 °С (0 мин) – 290 °С (16,7 мин) – 310 °С (20,7 мин) – 310 °С (21,7 мин). Температуру линии передачи масс-детектора поддерживали на уровне 310 °С. Ионизацию осуществляли электронным ударом (70 эВ) при температуре источника 230 °С. Данные получали в режиме MRM для положительно заряженных ионов с 10-й минуты после ввода пробы. Время детектирования одного иона составляло 20 мс.

Качественный и количественный анализ проводили с использованием внутреннего стандарта – метилтестостерона (MTSN).

Программное обеспечение MassHunter GC/MS Acquisition (версия B.06.00.1116) использовали для управления прибором; для обработки данных программное обеспечение MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis (версия B.05.00), редактор таблиц – Microsoft Office Excel 2007 (версия 12.0.4518.1014).



Структурные формулы изученных соединений и их обозначения  
Structural formulas of the studied compounds and their designations

*Определение констант распределения.* Константы распределения стероидов в исследованных экстракционных системах определяли при температуре  $20 \pm 1$  °C при равновесной концентрации стероидов в органической фазе от 10 до 350 нг/мл. Для экстракционных систем диэтиловый эфир–вода и хлористый метилен–вода проводили предварительное взаимное насыщение фаз. Для систем гексан–вода и гексан–водно-солевые растворы взаимное насыщение фаз не осу-

Таблица 1. Константы распределения ( $P$ ) анаболических стероидов в системе гексан–вода и степени извлечения ( $R$ ) стероидов гексаном из воды при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз

Table 1. Distribution constants ( $P$ ) of anabolic steroids in the hexane–water system and the recovery ( $R$ ) of steroids by hexane from water with a single extraction and an equal ratio of phase volumes

Соединение	$P$	$R$ , %
17,17-диметил-18-нор-5 $\beta$ -андростан-1,13-диен-3 $\alpha$ -ол	> 200	> 99
Эпиметендиол	20	95
19-норандростерон	9,2	90
19-норэтиохоланолон	7,6	88
2 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он	26	96
9 $\alpha$ -фтор-17,17-диметил-18-норандростан-4,13-диен-11 $\beta$ -ол-3-он	17	94
1 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ -ол-17-он	33	97
Эпитестостерон	5,1	84
1 $\alpha$ -метил-5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -диол	17	94
Тестостерон	3,3	77
17-эпиоксандролон	4,5	82
Метастерон	50	98
Оксандролон	0,96	49
Форместан	7,8	89
16 $\beta$ -гидроксифуразабол	8,2	89
17 $\alpha$ -метилтестостерон (внутренний стандарт)	5,0	83

ществлялось. Экстракцию проводили путем перемешивания на ротационном миксере при скорости вращения 25 об/мин в течение 10 мин.

Константы распределения анализируемых соединений рассчитаны в редакторе Microsoft Office Excel, исходя из относительных площадей (с учетом внутреннего стандарта бис-ТМС-17- $\alpha$ -метилтестостерона) соответствующих пиков, полученных на хроматограммах. Среди характеристических MRM-переходов для конкретного вещества выбирали наиболее интенсивный пик.

Константы распределения ААС в экстракционных системах органический растворитель–вода и гексан–водные растворы солей рассчитывали по убыли концентрации стероида из органической фазы по уравнению

$$P = \frac{C_{\text{орг}}}{C_{\text{водн}}} = \frac{C_{\text{орг}}}{C_{\text{орг}}^{\text{исх}} - C_{\text{орг}}} \cdot \frac{V_{\text{водн}}}{V_{\text{орг}}}, \quad (1)$$

где  $C_{\text{орг}}$ ,  $C_{\text{водн}}$  – равновесные концентрации распределяемого вещества в органической и водной фазах соответственно;  $C_{\text{орг}}^{\text{исх}}$  – исходная концентрация распределяемого вещества в органической фазе;  $V_{\text{водн}}$ ,  $V_{\text{орг}}$  – объемы водной и органической фаз соответственно, выбираемые таким образом, чтобы убыль концентрации вещества в органическом растворе была не менее 30 %.

Перед хроматографическим определением концентраций ААС в гексановых растворах их подвергали дериватизации с получением ТМС-производных в идентичных условиях. Для этого исходные и равновесные растворы стероидов в органическом растворителе, а также органические экстракты из равновесных водных растворов объемом 50 мкл выпаривали досуха в токе азота при температуре 40 °С. Затем к сухому остатку в пробирках автоматической пипеткой добавляли по 50 мкл раствора внутреннего стандарта (MTSN) в метаноле с концентрацией 100 нг/мл и снова выпаривали досуха в токе азота при температуре 40 °С. К сухому остатку в пробирках автоматической пипеткой добавляли 50 мкл раствора для дериватизации (MSTFA : NH<sub>4</sub>I : DTT = 2000 : 4 : 3, мкл/мг/мкл) и перемешивали полученный раствор с использованием шейкера. Затем пробирки плотно закрывали крышкой и нагревали в блочном термостате при 70 °С в течение

20 мин. После этого пробирки охлаждали до комнатной температуры и переносили растворы автоматической пипеткой в стеклянные виалы с конусными вставками.

Раствор для дериватизации готовили растворением 5,0 мг  $\text{NH}_4\text{I}$  и 3,8 мг DTT в 250 мкл MSTFA с последующим разбавлением полученного раствора в 10 раз MSTFA. Относительные стандартные отклонения рассчитанных констант распределения  $P$  не превышали 30 % и составляли в среднем 15 %.

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 приведены полученные значения констант распределения 16 исследованных стероидов в экстракционной системе гексан–вода, а также рассчитанные по константам распределения степени извлечения ААС гексаном при соотношении объемов фаз гексан–вода, равном 1 : 1.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что почти все изученные стероиды – умеренно гидрофобные вещества, величины их констант распределения в системе гексан–вода больше единицы и составляют от 3 до 50, а в случае 17,17-диметил-18-нор-5 $\beta$ -андростан-1,13-диен-3 $\alpha$ -ола (18-норметенола, MTDE-M2) константа больше 200. Гидрофобность ААС связана с наличием в структуре их молекул гидрофобного циклопентанпергидрофенантренового фрагмента и углеводородных радикалов.

Благодаря гидрофобности извлечение стероидов из воды и водных растворов, к которым относятся биологические жидкости, представляется довольно простой задачей. Об этом свидетельствуют рассчитанные по константам распределения высокие степени извлечения ААС гексаном из воды при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз. Степени извлечения превышают 77 % (для тестостерона) и составляют в среднем 90 %. Исключением является оксандролон, имеющий константу 0,96 и извлекающийся гексаном из равного объема воды при однократной экстракции на 49 %. Для повышения полноты экстракционного извлечения оксандролон из воды, наименее гидрофобного из изученных ААС, целесообразно повысить его константу распределения, что легко достигается применением эффекта высаливания или при использовании более активных растворителей.

Константы распределения наименее гидрофобных из изученных ААС тестостерона и оксандролон между гексаном и водными растворами сульфата натрия, сульфата аммония и карбонат калия, а также рассчитанные по константам распределения степени извлечения ААС гексаном, при соотношении объемов фаз гексан–водная фаза, равном 1 : 1, приведены в табл. 2. Видно, что уже при относительно невысокой концентрации высаливателей (0,5–1,0 моль/л), благодаря значительному росту констант распределения ААС обеспечивается высокая степень извлечения данных веществ гексаном ( $R > 85\%$ ).

**Таблица 2. Константы распределения ( $P$ ) тестостерона и оксандролон в системах гексан–водные растворы неорганических солей и степени извлечения ( $R$ ) ААС гексаном из водной фазы при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз**

**Table 2. Distribution constants ( $P$ ) of testosterone and oxandrolone in systems hexane–aqueous solutions of inorganic salts and the recovery ( $R$ ) of AAS by hexane from the aqueous phase with a single extraction and an equal ratio of phase volumes**

Соль	Концентрация соли, моль/л	Тестостерон		Оксандролон	
		$P$	$R, \%$	$P$	$R, \%$
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0,5	24	96	7	88
	1	> 120	> 99	47	98
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5	15	94	4	80
	1	68	99	18	95

Для повышения степени извлечения оксандролон и эпиоксандролон не следует применять такой сильный высаливатель, как карбонат калия. При его растворении в водных растворах создается сильно щелочная среда, что может приводить к гидролизу молекул данных стероидов по лактонной группе, что и наблюдалось в ходе проведения эксперимента. Замена гексана на более активные растворители – диэтиловый эфир и хлористый метилен также позволяет значительно

повысить константы распределения ААС, а следовательно, и степени их извлечения из водных растворов (табл. 3).

Таблица 3. Константы распределения ( $P$ ) тестостерона и оксандролон в системах диэтиловый эфир–вода, хлористый метилен–вода и степени извлечения ( $R$ ) ААС органическим растворителем из водной фазы при однократной экстракции и равном соотношении объемов фаз

Table 3. Distribution constants ( $P$ ) of testosterone and oxandrolone in systems diethyl ether–water, methylene chloride–water and the recovery ( $R$ ) of AAS by an organic solvent from the aqueous phase with a single extraction and an equal ratio of phase volumes

Экстракционная система	Тестостерон		Оксандролон	
	$P$	$R, \%$	$P$	$R, \%$
Диэтиловый эфир–вода	33	97	12,1	92
Хлористый метилен–вода	42	98	23	96

Полученные данные по распределению ААС в исследованных экстракционных системах свидетельствуют о возможности эффективного извлечения большинства изученных стероидов из воды и водных матриц гексаном. В случае наименее гидрофобных ААС для повышения степени их извлечения можно эффективно использовать эффект высаливания, а также применять более активные растворители, такие как диэтиловый эфир и хлористый метилен.

*Определение анаболических стероидов и их метаболитов в моче спортсменов.* На основании полученных констант распределения разработана методика пробоподготовки для определения ААС и их метаболитов в моче спортсменов.

Данная методика включает в себя отбор аликвоты мочи, добавление фосфатного буферного раствора с  $\text{pH } 6,5 \pm 0,1$ , гидролиз метаболитов при действии фермента  $\beta$ -глюкуронидазы из *E. coli* при температуре  $56^\circ\text{C}$  в течение 70 мин. Затем к раствору добавляют сульфат натрия, тщательно перемешивают и извлекают ААС гексаном. В случае менее гидрофобных АС, таких как оксандролон, для повышения степени извлечения можно использовать более активные органические экстрагенты – хлористый метилен или диэтиловый эфир. При этом экстрагируются ААС и гидрофобные компоненты матрицы, а гидрофильные примеси отделяются. Степень извлечения исследуемых стероидов из водного раствора в соответствии с величинами констант распределения в данных условиях превышает 95 %. Водную фазу отделяют после центрифугирования и замораживания жидким азотом, а органический экстракт выпаривают досуха в токе азота. Дальнейший этап заключается в проведении реакции дериватизации с получением ТМС-производных стероидов. Затем полученный раствор анализируют методом ГХ-МС-МС.

Следует отметить, что использование гексана и высаливания более предпочтительно по сравнению с экстракцией целевых компонентов эфиром и хлористым метиленом без применения высаливания. Это обусловлено наибольшей селективностью гексана и минимальной экстракцией матричных компонентов мочи, которые могут отрицательно влиять на получаемые результаты.

Предложенная методика апробирована на образцах мочи, содержащих изученные ААС и их метаболиты, позволила однозначно идентифицировать исследуемые аналиты, отличается стандартным отклонением 10–15 % и пределом обнаружения ААС и их метаболитов около 10 нг/мл мочи.

**Заключение.** Установлено, что большинство исследованных анаболических стероидов эффективно экстрагируется из водных сред, в том числе мочи, гексаном. Для повышения степени извлечения ААС, особенно менее гидрофобных, таких как оксандролон, целесообразно применять высаливание сульфатом натрия или аммония и использовать более активные органические экстрагенты – хлористый метилен или диэтиловый эфир.

На основе полученных данных разработана усовершенствованная методика пробоподготовки для определения ААС и их метаболитов в моче спортсменов, основанная на гидролизе метаболитов при действии фермента  $\beta$ -глюкуронидазы из *E. coli*, экстракционном извлечении анаболических стероидов из анализируемого образца мочи гексаном в присутствии сульфата натрия, выпаривании органического экстракта досуха и силилировании перед анализом методом

ГХ-МС-МС. Апробацыя разрабтаннай метадзікі на абразцах мочы, змяшчаючых ізаляваныя ААС, паказала магчымасць яе прымянення на аналітычным этапе допынг-кантроля на змяшчэнне анаболічных стэроідаў і іх метабалітаў. Метадзіка характэрызуецца стандартным адхіленнем 10–15 % і прэделам абнаружэння АС і іх метабалітаў каля 10 нг/мл мочы.

### Спісок іспользаваных істочнікаў

1. Рожкова, Е. И. Анаболічныя стэроіды як допынгі ў спорце / Е. И. Рожкова, Р. З. Сейфулла // Казан. мед. журн. – 2009. – Т. 90, № 4. – С. 601–604.
2. Грундын, П. Анаболічныя стэроіды / П. Грундын, М. Бахманн. – М.: Спорт, 1994. – 92 с.
3. Фармакалогія спорту / Н. А. Горчакава [і др.]; пад агул. рэд. С. А. Олейніка, Л. М. Гуніной, Р. Д. Сейфуллы. – К.: Олімп. літ., 2010. – 640 с.
4. Kuhn, C. M. Anabolic steroids / C. M. Kuhn // *Recent Progress in Hormone Research*. – 2002. – Vol. 57, № 1. – P. 411–434. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.411>
5. Kicman, A. T. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives / A. T. Kicman, D. B. Gower // *Ann. Clin. Biochem.* – 2003. – Vol. 40, № 4. – P. 321–356. <https://doi.org/10.1258/000456303766476977>
6. Bahrke, M. S. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise / M. S. Bahrke, C. E. Yesalis // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.05.006>
7. Determination of reference intervals for urinary steroid profiling using a newly validated GC-MS/MS method / W. de Jong [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med. (CCLM)*. – 2018. – Vol 56, iss. 1. – P. 103–112. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1072>
8. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) / N. Krone [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 121, Iss. 3–5. – P. 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.04.010>
9. Doping control analysis of anabolic steroids in equine urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry / A. S. Y. Wong [et al.] // *Drug Test. Analysis.* – 2017. – Vol. 9, № 9. – P. 1320–1327. <https://doi.org/10.1002/dta.2090>
10. Determination of nandrolone metabolites in human urine: comparison between liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry / F. Buiarelli [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24, № 13. – P. 1881–1894. <https://doi.org/10.1002/rcm.4583>
11. Determination of four anabolic steroid metabolites by gas chromatography/mass spectrometry with negative ion chemical ionization and tandem mass spectrometry / M. H. Choi [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 1998. – Vol. 12, № 22. – P. 1749–1755. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0231\(19981130\)12:22<1749::aid-rcm395>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0231(19981130)12:22<1749::aid-rcm395>3.0.co;2-s)
12. A Method for Determination of One Hundred Endogenous Steroids in Human Serum by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / M. Hill [et al.] // *Physiol. Res.* – 2019. – Vol. 68. – P. 179–207. <https://doi.org/10.33549/physiol-res.934124>
13. Shackleton, C. GC/MS in Recent Years Has Defined the Normal and Clinically Disordered Steroidome: Will It Soon Be Surpassed by LC/Tandem MS in This Role? / C. Shackleton, O. J. Pozo, J. Marcos // *Journal of the Endocrine Society.* – 2018. – Vol. 2, iss. 8. – P. 974–996. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00135>
14. Hydrolysis of conjugated steroids by the combined use of beta-glucuronidase preparations from helix pomatia and ampullaria: determination of urinary cortisol and its metabolites / H. Shibasaki [et al.] // *Steroids.* – 2001. – Vol. 66, iss. 11. – P. 795–801. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(01\)00118-0](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(01)00118-0)
15. Catlin, D. H. Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine / D. H. Catlin, B. D. Ahrens, Y. Kucherova // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2002. – Vol. 16, iss. 13. – P. 1273–1275. <https://doi.org/10.1002/rcm.722>
16. Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine / D. H. Catlin [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2004. – Vol. 18, № 12. – P. 1245–1249. <https://doi.org/10.1002/rcm.1495>
17. Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine / M. H. Sekera [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2005. – Vol. 19, iss. 6. – P. 781–784. <https://doi.org/10.1002/rcm.1858>
18. Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer steroids in human urine / A. G. Fragkaki [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 115, iss. 1–2. – P. 44–61. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.02.016>
19. New Insights into the Metabolism of Methyltestosterone and Metandienone: Detection of Novel A-Ring Reduced Metabolites / S. Loke [et al.] // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26, iss. 5. – P. 1354. <https://doi.org/10.3390/molecules26051354>
20. Schänzer, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids / W. Schänzer // *Clin. Chem.* – 1996. – Vol. 42, № 7. – P. 1001–1020. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.7.1001>
21. Segura, J. Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents / J. Segura, R. Ventura, C. Jurabo // *J. Chromatogr. B.* – 1998. – Vol. 713, iss. 1. – P. 61–90. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(98\)00089-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00089-9)
22. McDonald, J. G. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases / J. G. McDonald, S. Matthew, R. J. Auchus // *Horm. Cancer.* – 2011. – Vol. 2, № 6. – P. 324–332. <https://doi.org/10.1007/s12672-011-0099-x>
23. Graf, V. Hydrolysis of steroid glucuronides with  $\beta$ -glucuronidase preparations from bovine liver, Helix pomatia and E. coli / V. Graf, E. Furuya, O. Nishikaze // *Clin. Chem.* – 1977. – Vol. 23, iss. 3. – P. 532–535. <https://doi.org/10.1093/clinchem/23.3.532>

## References

1. Rozhkova E. I., Seyfulla R. Z., Ordzhonikidze G. Z., Panyushkin V. V., Kuznetsov Yu. M. *Anabolic steroids as doping in sports. Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan medical journal*, 2009, vol. 90, no. 4, pp. 601–604 (in Russian).
2. Grunding P., Bachmann M. *Anabolic steroids*. Moscow: Sport Publ., 1994. 92 p. (in Russian).
3. Gorchakova N. A., Gudivok Ya. S., Gunina L. M. [et al.]. *Pharmacology of sports*; Ed. by S. A. Oleinik, L. M. Gunina, R. D. Seifulli. Kiev, Olimpiiskaya literature Publ., 2010. 640 p. (in Russian).
4. Kuhn C. M. Anabolic steroids. *Recent Progress in Hormone Research*, 2002, vol. 57, no. 1, pp. 411–434. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.411>
5. Kicman A. T., Gower D. B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2003, vol. 40, no. 4, pp. 321–356. <https://doi.org/10.1258/000456303766476977>
6. Bahrke M. S., Yesalis C. E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Current Opinion in Pharmacology*, 2004, vol. 4, pp. 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.05.006>
7. de Jong W., Buitenwerf E., Pranger A., Riphagen I., Wolffenbuttel B., Kerstens M., Kema I. Determination of reference intervals for urinary steroid profiling using a newly validated GC-MS/MS method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2018, vol. 56, iss. 1, pp. 103–112. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1072>
8. Krone N., Hughes B. A., Lavery G. G., Stewart P. M., Arlt W., Shackleton C. H. L. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, vol. 121, iss. 3–5, pp. 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.04.010>
9. Wong A. S. Y., Leung G. N. W., Leung D. K. K., Wan T. S. M. Doping control analysis of anabolic steroids in equine urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 2017, vol. 9, iss. 9, pp. 1320–1327. <https://doi.org/10.1002/dta.2090>
10. Buiarelli F., Giannetti L., Jasionowska R., Cruciani C., Neri B. Determination of nandrolone metabolites in human urine: comparison between liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, vol. 24, no. 13, pp. 1881–1894. <https://doi.org/10.1002/rcm.4583>
11. Choi M. H., Chung B. C., Kim M., Choi J., Kim Y. Determination of four anabolic steroid metabolites by gas chromatography/mass spectrometry with negative ion chemical ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, vol. 12, no. 2, pp. 1749–1755. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0231\(19981130\)12:22<1749::aid-rcm395>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0231(19981130)12:22<1749::aid-rcm395>3.0.co;2-s)
12. Hill M., Hána V. Jr., Velíková M., Pařízek A., Kolátorová L., Vítků J., et al. A Method for Determination of One Hundred Endogenous Steroids in Human Serum by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Physiological Research*, 2019, vol. 68, pp. 179–207. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934124>
13. Shackleton C., Pozo O. J., Marcos J. GC/MS in Recent Years Has Defined the Normal and Clinically Disordered Steroidome: Will It Soon Be Surpassed by LC/Tandem MS in This Role. *Journal of the Endocrine Society*, 2018, vol. 2, iss. 8, pp. 974–996. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00135>
14. Shibasaki H., Tanabe C., Furuta T., Kasuya Y. Hydrolysis of conjugated steroids by the combined use of beta-glucuronidase preparations from helix pomatia and ampullaria: determination of urinary cortisol and its metabolites. *Steroids*, 2001, vol. 66, no. 11, pp. 795–801. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(01\)00118-0](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(01)00118-0)
15. Catlin D. H., Ahrens B. D., Kucherova Y. Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, vol. 16, iss. 13, pp. 1273–1275. <https://doi.org/10.1002/rcm.722>
16. Catlin D. H., Sekera M. H., Ahrens B. D., Starcevic B., Chang Y.-C., Hatton C. K. Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, vol. 18, no. 12, pp. 1245–1249. <https://doi.org/10.1002/rcm.1495>
17. Sekera M. H., Ahrens B. D., Chang Y.-C., Starcevic B., Georgakopoulos C., Catlin D. H. Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, vol. 19, iss. 6, pp. 781–784. <https://doi.org/10.1002/rcm.1858>
18. Fragkaki A. G., Angelis Y. S., Tsantili-Kakoulidou A., Koupparis M., Georgakopoulos C. Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer steroids in human urine. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, vol. 115, iss. 1–2, pp. 44–61. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.02.016>
19. Loke S., Liu L., Wenzel M., Scheffler H., Iannone M., de la Torre X., et al. New Insights into the Metabolism of Methyltestosterone and Metandienone: Detection of Novel A-Ring Reduced Metabolites. *Molecules*, 2021, vol. 26, iss. 5, pp. 1354. <https://doi.org/10.3390/molecules26051354>
20. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry*, 1996, vol. 42, no. 7, pp. 1001–1020. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.7.1001>
21. Segura J., Ventura R., Jurabo C. Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B*, 1998, vol. 713, iss. 1, pp. 61–90. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(98\)00089-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00089-9)
22. McDonald J. G., Matthew S., Auchus R. J. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. *Hormones and Cancer*, 2011, vol. 2, no. 6, pp. 324–332. <https://doi.org/10.1007/s12672-011-0099-x>
23. Graef V., Furuya E., Nishikaze O. Hydrolysis of steroid glucuronides with beta-glucuronidase preparations from bovine liver, *Helix pomatia*, and *E. coli*. *Clinical Chemistry*, 1977, vol. 23, no. 3, pp. 53–535. <https://doi.org/10.1093/clinchem/23.3.532>

**Информация об авторах**

*Лещев Сергей Михайлович* – доктор химических наук, профессор. Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: leschev.sergey54@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5378-1718>

*Походня Юрий Георгиевич* – кандидат биологических наук, директор. Национальная антидопинговая лаборатория (аг. Лесной, 31, 223040, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: director@antidoping.by, <https://orcid.org/0000-0002-7972-7784>

*Чеховская Ольга Николаевна* – ведущий химик. Национальная антидопинговая лаборатория (аг. Лесной, 31, 223040, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: testing@antidoping.by, <https://orcid.org/0000-0002-8293-5840>

*Агабалаев Александр Андреевич* – кандидат химических наук, заместитель заведующего лабораторией. Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении (пр-т Дзержинского, 83/15, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexandrmailbox@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3201-3511>

*Заяц Михаил Федорович* – доктор химических наук, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mikhail\_zayats@tut.by, <https://orcid.org/0000-0002-8400-6359>

**Information about the authors**

*Leschev Sergey M.* – D. Sc. (Chemistry), Professor. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leschev.sergey54@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5378-1718>

*Pakhadnia Yury G.* – Ph. D. (Biology), Director. National Anti-Doping Laboratory (31, Liasny, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: director@antidoping.by, <https://orcid.org/0000-0002-7972-7784>

*Tshekhovskaya N. Olga* – Leading Chemist. National Anti-Doping Laboratory (31, Liasny, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: testing@antidoping.by, <https://orcid.org/0000-0002-8293-5840>

*Ahabalayeu Aliaksandr A.* – Ph. D. (Chemistry). Deputy Head of the Laboratory. Center for Examinations and Tests in Health Service (83/15, Dzerzhinsky Ave., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexandrmailbox@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3201-3511>

*Zayats Mikhail F.* – D. Sc. (Chemistry), Head of the Department. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mikhail\_zayats@tut.by, <https://orcid.org/0000-0002-8400-6359>