

На правах рукописи



Вирюс Эдуард Даниэлевич

**РАЗВИТИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ КАК МЕТОДА СКРИНИНГА
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЛОЖНЫХ ПО
СОСТАВУ СМЕСЯХ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва, 2020

Официальные оппоненты:

Бродский Ефим Соломонович, старший научный сотрудник, доктор химических наук, заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН)

Заикин Владимир Георгиевич, профессор, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории спектральных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН (ИНХС РАН).

Родин Игорь Александрович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, заместитель декана по научно-инновационной работе химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (МГУ).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН)

Защита состоится « » 2020 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.109.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции Институте геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук (ГЕОХИ РАН) по адресу: 119991, Москва, ул. Косыгина 19.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГЕОХИ РАН и на сайте Института:
http://www.geokhi.ru/Thesis/2020/Докторские/Диссертация_Вирус_ЭД.pdf

Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <https://vak.minobrnauki.gov.ru/>

Автореферат разослан « » 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Елена Александровна Захарченко

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВТЖХ-МСВР/ОЛ	Высокотемпературная жидкостная хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой
ВТЖХ-МСВР/ОЛ(ФХИАД)	Высокотемпературная жидкостная хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой, используемые в сочетании с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МСВР(ХИАД)	Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении
ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)	Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой, используемые в сочетании с химической ионизацией при атмосферном давлении
ВЭЖХ-МСВР/ОЛ	Высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой
ВЭЖХ-МС/МС	Высокоэффективная жидкостная тандемная хроматомасс-спектрометрия
ГХ	Газовая хроматография
ГХ/МС	Газовая хроматомасс-спектрометрия
ГХ/МСВР	Газовая хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения
ГХ/МС/МС	Газовая тандемная хроматомасс-спектрометрия
ИЭР	Ионизация электрораспылением
МСВР	Масс-спектрометрия высокого разрешения
МС/МС	Тандемная масс-спектрометрия
МСВР/ОЛ	Масс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой
ОЛ	Орбитальная ионная ловушка
ТФЭ	Твердофазная экстракция
УЭЖХ-МСВР/ОЛ	Ультраэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой

ФАВ	Физиологически активные вещества
ФХИАД	Фотохимическая ионизация при атмосферном давлении
ХИАД	Химическая ионизация при атмосферном давлении
ХИИЭР	Химическая ионизация, индуцированная электрораспылением
m/z	Отношение массы к заряду

Общая характеристика работы

Актуальность

Основными проблемами современного многокомпонентного анализа медико-биологических объектов являются растущие требования к быстрому обнаружению физиологически активных веществ (ФАВ), непрерывное расширение круга определяемых ФАВ, разнообразие их физико-химических свойств и сложность химического состава анализируемых смесей с высоким содержанием мешающих компонентов, концентрация которых на несколько порядков выше, чем концентрация определяемых соединений. Для решения этих проблем в настоящее время осуществляют предварительный анализ, основанный на скрининге методами хромато-масс-спектрометрии.

Сегодня одним из основных хромато-масс-спектрометрических методов многокомпонентного скрининга ФАВ в медико-биологических объектах является газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ-МС) в сочетании с дериватизацией, нацеленной на охват широкого спектра соединений. Однако стадия дериватизации не способствует повышению экспрессности анализа и снижению временных затрат на разработку новых методик скрининга. Вместе с тем, с каждым годом растет число термолabileльных и труднодериватируемых соединений, требующих разработки новых способов дериватизации и новых процедур скрининга.

Для решения этой проблемы был предложен подход к скринингу ФАВ, основанный на применении метода высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии с тремя квадруполями (ВЭЖХ-МС/МС). В отличие от ГХ-МС скрининг с применением метода ВЭЖХ-МС/МС исключает стадию дериватизации, то есть определяемые вещества не подвергаются химической модификации с получением соответствующих летучих производных. Однако, несмотря на достоинства метода ВЭЖХ-МС/МС (высокая чувствительность и селективность), его применение всегда связано с детальным изучением МС/МС спектров, выбором селективных переходов и трудоемкими стадиями оптимизации условий диссоциации, индуцированной соударениями. Кроме того, чрезмерное увеличение числа детектируемых соединений неизбежно приводит к уменьшению длительности регистрации селективных переходов, приводящей к снижению чувствительности определения. Таким образом, существующая методология обнаружения ФАВ, реализуемая методами ГХ-МС, ГХ-МС/МС, ГХ/МСВР и ВЭЖХ-МС/МС, не отвечает в полной мере современным требованиям многокомпонентного скрининга методами хромато-масс-спектрометрии.

Поэтому, актуальным является поиск альтернативного хромато-масс-спектрометрического метода скрининга ФАВ, позволяющего преодолеть ограничения, связанные с применением методов ГХ-МС, ГХ-МС/МС, ГХ-МСВР и ВЭЖХ-МС/МС. Альтернативная методология многокомпонентного анализа медико-биологических объектов на основе хромато-масс-спектрометрического скрининга должна удовлетворять следующим требованиям:

- Разработка и выполнение методик обнаружения биорегуляторов в сложных по составу смесях не должны быть связаны с большими временными затратами, а сами методики определения должны исключать стадию дериватизации;
- Селективность и пределы обнаружения ФАВ, достигаемые в рамках новой и «традиционной» методологии скрининга должны быть сопоставимы;
- Методология должна быть универсальной и охватывать широкий спектр ФАВ;
- Предлагаемая методология не должна ассоциироваться с трудоемким изучением масс-спектров и выбором селективных переходов;

- Расширение круга определяемых ФАВ в рамках этой методологии не должно приводить к существенным временным затратам, связанным с их обнаружением;
- Быстрая интерпретация результатов скрининга должна быть неотъемлемой особенностью данной методологии;
- Выбор подтверждающего метода анализа не должен быть случайным, а его выполнение экспрессным.

Учитывая вышеперечисленные требования к альтернативной методологии скрининга и ограничения ГХ-МС, ГХ-МС/МС, ГХ-МСВР и ВЭЖХ-МС/МС, заслуживает внимание метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), применяемой в режиме полного сканирования. Выбор данного метода обусловлен тем, что открывается возможность ускорения процесса разработки методик анализа и их выполнение благодаря точному измерению m/z и, следовательно, установлению элементного состава диагностического иона, принадлежащего ФАВ или его метаболиту. В данном случае нет необходимости в выборе селективных переходов для достижения специфичности обнаружения ФАВ. В настоящее время в масс-спектрометрии есть три подхода к достижению высокого разрешения. С точки зрения разрешающей способности масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса является абсолютным рекордсменом на протяжении многих лет. Если говорить о скорости сканирования, то здесь безусловным лидером является времяпролетная масс-спектрометрия с ортогональным вводом. С другой стороны, масс-спектрометрия высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой (МСВР/ОЛ), предложенная Макаровым в 2002-м году, гармонично сочетает в себе достоинства этих двух методов. Вместе с тем, быстрый анализ биологических объектов сложного состава методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ не является тривиальной задачей. Основным препятствием к быстрому скринингу ФАВ в сложных по составу смесях данным методом является свойственный ОЛ матричный эффект. Все вышесказанное определило цель и задачи настоящей работы.

Цель работы. Развитие принципиально новых решений в жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения для быстрого обнаружения физиологически активных веществ в сложных по составу смесях. Разработка на этой основе новой методологии хромато-масс-спектрометрического скрининга физиологически активных веществ в биологических жидкостях.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка новой методологии хромато-масс-спектрометрического обнаружения широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях на основе ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с использованием ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР;
2. Определение роли матричного эффекта в быстром обнаружении ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в условиях полного сканирования;
3. Расширение возможностей ВЭЖХ-МСВР/ОЛ для быстрого обнаружения ФАВ в сложных по составу смесях путем снижения матричного эффекта за счет селективного протонирования с использованием ФХИАД и ХИАД;
4. Создание метода снижения матричного эффекта, обеспечивающего быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования путем подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием химической ионизации, индуцированной электрораспылением (ХИИЭР);
5. Разработка и апробация способа скрининга ФАВ медико-биологических образцах методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИАД и ФХИАД на основе точного измерения m/z в режиме полного сканирования;

6. Разработка и апробация способа скрининга широкого спектра ФАВ в медико-биологических объектах методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР на основе точного измерения m/z в режиме полного сканирования;
7. Обоснование выбора пути достижения комплементарности предлагаемой методологии скрининга с референсными методами анализа.

Научная новизна

К началу данной работы метод ВЭЖХ-МСВР/ОЛ как метод скрининга ФАВ в литературе не рассматривался.

1. Разработана новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга ФАВ на основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР, обеспечивающего быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях с использованием точно измеренного m/z путем снижения матричных эффектов за счет селективного протонирования и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Обоснованы пути достижения комплементарности разработанной методологии скрининга с референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции дериватизации и использования твердофазной экстракции на магнитных частицах;

2. Определена причина и роль матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке, препятствующего обнаружению ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР (ОЛ) в режиме полного сканирования.

3. Установлено, что быстрое обнаружение ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования достигается снижением матричного эффекта путем селективного протонирования молекул ФАВ с использованием ФХИАД и ХИАД;

4. Установлено, что быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования достигается снижением матричного эффекта путем подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием ХИИЭР;

5. Создан способ обнаружения стероидов и N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования с использованием ХИАД, основанный на селективной ионизации определяемых соединений;

6. Разработан способ обнаружения стероидов в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.1 – 2 нг/мл методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования с использованием ФХИАД, основанный на селективном протонировании молекул определяемых соединений;

7. Разработан способ быстрого обнаружения стероидов, бензотио디아зинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида в биологических жидкостях с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл методом УЭЖХ-МС/ОЛ в сочетании с ХИИЭР в режиме полного сканирования, основанный на подавлении ионизации мешающих компонентов матрицы.

Практическая значимость

- Разработанная в диссертационной работе методология, нацеленная на обнаружение ФАВ в сложных по составу биологических объектах методом ВЭЖХ-МСВР в сочетании с ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР за счет снижения влияния матричного эффекта, применима для экспрессного определения широкого спектра биоорганических соединений без стадии

дериватизации при проведении метаболомных и медико-биологических исследований, эколого-аналитического скрининга, санитарного контроля продуктов питания, судебно-медицинской, криминалистической, токсикологической и клинической экспертиз.

- Универсальность методологии, достигнутая точным измерением m/z в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР с использованием ХИАД, ФХИАД, ХИИЭР в режиме полного сканирования, обеспечивает ретроспективность поиска широкого спектра метаболитов ФАВ в метаболомных исследованиях и решает проблему консервации биологического материала в метаболомных исследованиях. Значительно снижаются временные затраты на расширение спектра определяемых метаболитов ФАВ.

- Разработанные способы обнаружения стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов и производных бензамида на уровне 0.05 – 250 нг/мл методом ВЭЖХ-МСВР в сочетании с ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР успешно прошли апробацию в ходе проведения профессионального тестирования, организованного Всемирным антидопинговым агентством в 2009-2012 гг. и получили высокую оценку медицинской комиссии Международного Олимпийского Комитета.

Положения, выносимые на защиту:

- Новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга ФАВ на основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР, обеспечивающая быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях с использованием точно измеренного m/z протонированных и фрагментных ионов путем снижения влияния матричных эффектов за счет селективного протонирования определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы;
- Обоснование причины и роли матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке, препятствующего обнаружению ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования с использованием точно измеренного m/z .
- Методы снижения матричного эффекта (до 5 %), обеспечивающие быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ на основе селективного протонирования ФАВ и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием ХИАД, ФХИАД и ХИИЭР.
- Способ скрининга стероидов и N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл, основанный на применении метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИАД, обеспечивающей снижение матричного эффекта за счет селективной ионизации определяемых соединений.
- Способ скрининга стероидов в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного сканирования с пределом обнаружения 0.5 – 2 нг/мл, основанный на применении метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ФХИАД, обеспечивающей снижение матричных эффектов за счет селективного протонирования молекул определяемых соединений
- Способ скрининга стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида (120 соединений) в моче с использованием точного измерения m/z (на уровне 2 ppm) в режиме полного

сканирования с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл, основанный на применении метода УЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР, обеспечивающей снижение матричных эффектов за счет подавления ионизации мешающих компонентов матрицы.

- Подходы достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции дериватизации и способа снижения подавления ионизации компонентами матрицы для ВЭЖХ-МС/МС на основе твердофазной экстракции с магнитными частицами.

Апробация работы

Результаты исследований были представлены на следующих научных конференциях: II Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2007), Всероссийский симпозиум «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия» (Москва, Россия, 2008), III Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2009), III Всероссийская конференция «Аналитика России» с международным участием (Краснодар, Россия, 2009), 27th Cologne Workshop on Dope Analysis (Кёльн, Германия, 2009), Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии, хроматография и нанотехнологии» (Самара, Россия, 2009), Съезд аналитиков России (Клязьма, Россия, 2010), Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2010), 28th Cologne Workshop on Dope Analysis (Кёльн, Германия, 2010), 27th LC/MS Montreux Symposium (Монтрё, Швейцария, 2010), 34th International Symposium on Capillary Chromatography and 7th GC×GC Symposium (Рива дел Гарда, Италия, 2010), IV Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2011), IX Международная масс-спектрометрическая конференция по нефтехимии, экологии и пищевой химии «ПЕТРОМАСС-2011» (Москва, Россия, 2011), XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Волгоград, Россия, 2011), 29th Cologne Workshop on Dope Analysis (Кёльн, Германия, 2011), 30th Cologne Workshop on Dope Analysis (Кёльн, Германия, 2012), VI Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2015), I Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, Россия, 2015), II-я конференция «Создание единой системы межведомственного взаимодействия экспертных лабораторий правоохранительных органов, химико-токсикологических лабораторий и лабораторий бюро судебно-медицинской экспертизы в сфере выявления новых наркотических средств» (Москва, Россия, 2017), VII Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2017), Съезд аналитиков России (Москва, Россия, 2017).

Вклад автора

Вклад автора в работы состоит в постановке задач, обсуждении, обобщении и оформлении полученных результатов исследований и их интерпретации, непосредственном выполнении всего объема экспериментальной работы.

Публикации результатов исследований

По материалам диссертации опубликованы 21 статья в журналах, в том числе 12 статей в журналах, индексируемых в Международных базах данных, 9 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, а также получено 3 патента. Результаты работы представлены в более чем 20 тезисах докладов на отечественных и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, пяти глав с обсуждением полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 267 страницах, содержит 45 рисунков и 23 таблицы.

Основное содержание работы

В *Первой главе* описаны особенности методологии скрининга ФАВ в сложных по составу смесях на примере медико-биологических объектов и обсуждена стратегия их обнаружения. Большое внимание уделено рассмотрению и систематизации работ, посвященных обнаружению биорегуляторов методами ГХ и ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией. Проанализированы возможности и ограничения ОЛ и намечены подходы к скринингу широкого спектра ФАВ в биологических объектах сложного состава методом МСВР.

Во *Второй главе* перечислены реагенты и аппаратура, которые применялись в ходе выполнения работы. В исследованиях использовали следующее хромато-масс-спектрометрическое оборудование:

Жидкостный хроматограф модели Surveyor (Thermo Scientific, США), с системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева хроматографической колонки, дегазатором, соединенным с масс-спектрометрическим детектором модели Orbitrap (Thermo Scientific, Германия) с внешними источниками для ХИАД и ФХИАД. Для сбора и обработки данных применяли программное обеспечение Xcalibur версии 2.1 (Thermo Scientific, США).

Жидкостный хроматограф модели Accela (Thermo Scientific, США) с системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева хроматографической колонки, дегазатором, соединенным с масс-спектрометрическим детектором модели Orbitrap (Thermo Scientific, Германия) с внешними источниками для ИЭР. Для сбора и обработки данных применяли программное обеспечение Xcalibur версии 2.1 (Thermo Scientific, США).

Газовый хроматограф модели Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Италия), с tandemным масс-спектрометром типа «ионной ловушки» модели PolarisQ (Thermo Scientific, США), оснащенный системой обработки данных Xcalibur версии 2.2 (Thermo Scientific, США).

Газовый хроматограф модели Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Италия), с магнитно-секторным масс-спектрометром модели DFS (Thermo Scientific, США), оснащенный системой обработки данных Xcalibur версии 2.2 (Thermo Scientific, США).

Жидкостный хроматограф модели Accela (Thermo Scientific, США), оснащенный системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева хроматографической колонки, дегазатором, и соединенный с tandemным масс-спектрометром типа «тройной квадруполь» модели TSQ Vantage (Thermo Scientific, США) с внешним источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком. Для сбора и обработки данных применяли программное обеспечение Xcalibur версии 2.2 (Thermo Scientific, США).

В работе использовали следующие хроматографические колонки: Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 100 мм, диаметр зерна 1.7 мкм) фирмы Waters; Hypercarb (100 × 1 мм, диаметр зерна 3 мкм) фирмы Thermoscientific; Acquity BEH C18 column (50 × 2.1 мм, диаметр зерна 1.7 мкм) фирмы Waters; Onyx Monolytic C18 (100×3 мм) фирмы Phenomenex; капиллярная колонка DB-1MS длиной 25 м с внутренним диаметром 0.32 мм и толщиной слоя неподвижной фазы 0.25 мкм фирмы J&W Scientific; капиллярная колонка Trace-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной слоя неподвижной фазы 0.1 мкм фирмы Thermoscientific

В *Третьей главе* определена причина и роль матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной

ионной ловушке, препятствующего обнаружению ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР (ОЛ) в режиме полного сканирования. Под матричным эффектом подразумевается отрицательное влияние компонентов анализируемой матрицы на предел обнаружения детектируемых соединений.

Представлены экспериментальные методы выявления матричного эффекта, характерного для ВЭЖХ/МС(ОЛ). Первый метод заключается в анализе модельных смесей и конечных экстрактов, содержащих идентичные количества определяемых ФАВ, двумя независимыми хромато-масс-спектрометрическими методами на основе ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/ОЛ с использованием одинаковых источников ионов. Второй метод выявления матричного эффекта заключается в анализе вышеуказанных смесей с применением ВЭЖХ-МС/ОЛ в сочетании с линейной ионной ловушкой. Показаны ограничения ВЭЖХ-МС/ОЛ с ИЭР, связанный с матричным эффектом, характерным для ОЛ.

Результаты оценки матричного эффекта при совместном применении методов ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР/ОЛ приведены на рис. 1

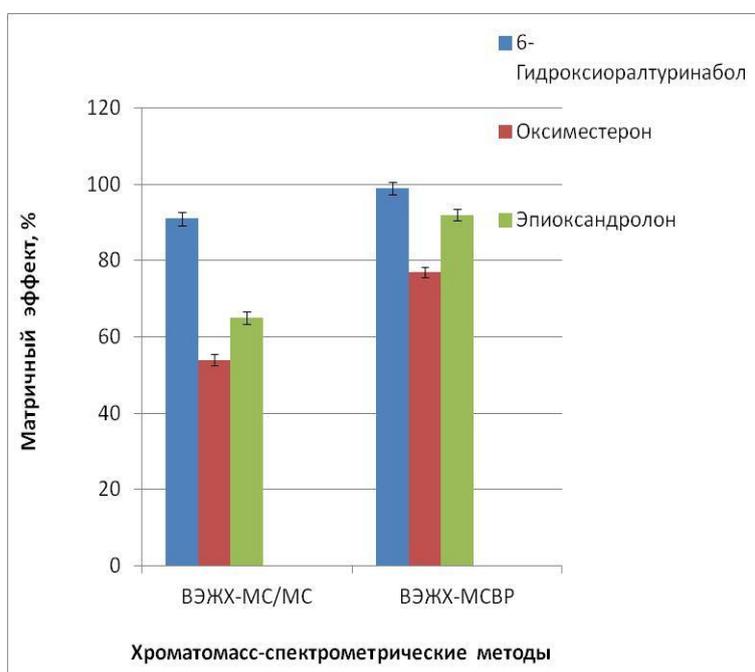


Рисунок 1 Матричный эффект в условиях ИЭР, (n=3, P=0.95)

Из рис. 1 видно, что при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС значение матричного эффекта более 50% в зависимости от соединения. В данном случае мы имеем дело с матричным эффектом, связанным с подавлением ионизации компонентами матрицы. С другой стороны, при использовании метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ИЭР мы также наблюдаем матричный эффект, но в данном случае он на 15-40% превосходит эффект, наблюдаемый при применении метода ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией. Наблюдаемый матричный эффект при применении метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ИЭР нельзя объяснить одним подавлением ионизации компонентами матрицы, так как в обоих методах использовали идентичный источник ионов и идентичные условия хроматографического разделения. Можно предположить, что в отличие от ВЭЖХ-МС/МС падение отклика может вызвано емкостью С-ловушки (она не может удерживать более 5×10^6 зарядов), используемой для фокусировки пакетов ионов, непрерывно направляемых в ОЛ. В нашем случае, преимущественное заполнение С-ловушки ионами мешающих компонентов матрицы приводит к уменьшению времени накопления всех ионов и к снижению скорости заполнения С-ловушки ионами определяемых соединений. Другими словами, с уменьшением времени накопления ионов только незначительное количество ионов

определяемых соединений попадает в С-ловушку. Следует отметить, что С-ловушка является интегральной и неотъемлемой частью орбитальной ионной ловушки. Использование гибридного хромато-масс-спектрометра, представляющего собой орбитальную ионную ловушку, сопряженную с линейной ионной ловушкой, дает нам возможность проверить эту гипотезу. Для этого было достаточно выполнить анализы вышеупомянутого экстракта, в режиме полного сканирования и селективного детектирования ионов. Другими словами, линейная ионная ловушка использовалась для изолирования отдельных ионов, направляемых в ОЛ. Таким образом, изменение диапазона сканирования линейной ионной ловушки моделирует процесс детектирования методом ВЭЖХ-МС/МС и создает условия, препятствующие накоплению ионов мешающих компонентов в С-ловушке. На рис. 2 представлены результаты влияния различных режимов сканирования на наблюдаемый матричный эффект.

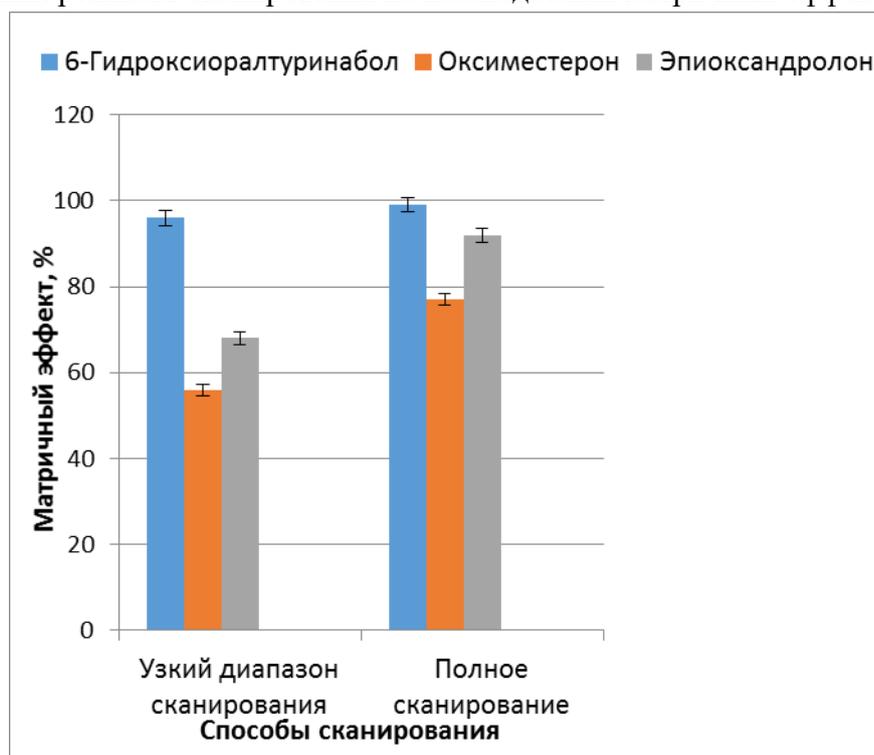


Рисунок 2 Применение сочетания орбитальной ионной ловушки с линейной ловушкой для оценки матричных эффектов в условиях ИЭР, (n=3, P=0.95).

Из рис. 2 видно, что матричный эффект, наблюдаемый при сопряжении линейной ионной ловушки с орбитальной в режиме изоляции отдельных ионов (узкий диапазон сканирования), не отличается более, чем на 10 % от матричного эффекта, наблюдаемого в случае применения метода ВЭЖХ-МС/МС. Аномальное повышение матричного эффекта происходит при переходе от режима селективного детектирования ионов к режиму полного сканирования. Сопоставление матричных эффектов, наблюдаемых при разных режимах сканирования, позволяет оценить вклад каждого из них. Иначе говоря, в данном случае мы имеем дело с матричным эффектом, характерным для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ и мы можем использовать линейную ионную ловушку в сопряжении с ОЛ для ее выявления и оценки. Таким образом, обоснована причина и роль, а также необходимость снижения матричного эффекта, препятствующего обнаружению широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ. К сожалению, варьирование условий хроматографического разделения в условиях ИЭР не привели к существенному снижению матричного эффекта для изученных модельных соединений за исключением метаболита Орал Туринабола (6β-гидрокси-4-хлородегидрометилтестостерон). Полученные в результате варьирования условий

хроматографического разделения масс-хроматограммы экстракта из мочи, содержащей метаболит Орал Туринабола, представлены на рис. 3.

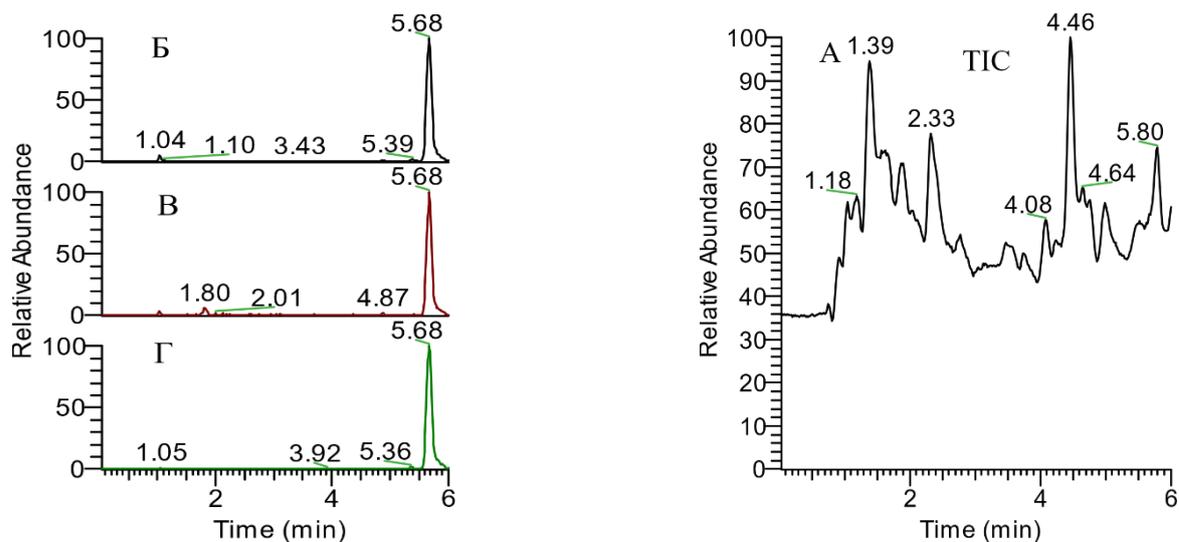


Рисунок 3 Масс-хроматограммы пробы мочи, содержащей метаболит Орал Туринабола: А – масс-хроматограмма по полному ионному току, Б – масс-хроматограмма для $m/z=351.1723$, В – масс-хроматограмма для $m/z=352.1756$, Г - масс-хроматограмма для $m/z=353.1693$

Хотя предлагаемый подход позволил снизить матричный эффект при обнаружении орал туринабола, его применение связано с большими временными затратами. Поэтому на данном этапе актуальным оставался поиск альтернативных методов снижения матричного эффекта.

Четвертая глава посвящена расширению возможностей метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ за счет создания подхода снижения матричного эффекта, обеспечивающего быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в режиме полного сканирования с использованием точного измерения m/z путем селективной ионизации определяемых соединений с использованием ХИАД.

В главе приведены и обсуждены результаты разработки подхода снижения матричного эффекта (от 10 до 20 раз меньше, чем в условиях ИЭР) для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ путем селективной ионизации определяемых соединений с использованием ХИАД. Представлены результаты изучения возможности определения следовых количеств стероидов и N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов в моче, а также результаты апробации разработанных способов определения вышеуказанных ФАВ с применением предлагаемого подхода. Показана возможность селективного определения вышеуказанных ФАВ в экстрактах из мочи на основе одной масс-хроматограммы для точно измеренной величины m/z иона $[M+H]^+$ или $[M+H-nH_2O]^+$. Продемонстрирована возможность обнаружения оксандролона и его метаболита в моче добровольца через две недели после прекращения приема препарата. В главе также приводятся результаты сравнения разработанного способа определения экзместана и его метаболита в моче, основанного на предложенном подходе, и способа, основанного на применении ВЭЖХ-МС/МС.

Изучение матричного эффекта в условиях химической ионизации при атмосферном давлении. Поскольку при использовании ХИАД, в отличие от электрораспылительной ионизации, отсутствует конкуренция между аналитами за приобретение заряда, было сделано предположение, что матричный эффект, обусловленный подавлением ионизации компонентами

матрицы, может быть минимизирован при анализе сложных по составу биологических экстрактов. Таким образом, комбинируя ХИАД с условиями хроматографического разделения, исследовали матричный эффект. На рис. 4 представлены результаты такого исследования при использовании различных программ градиентного элюирования в условиях ХИАД.

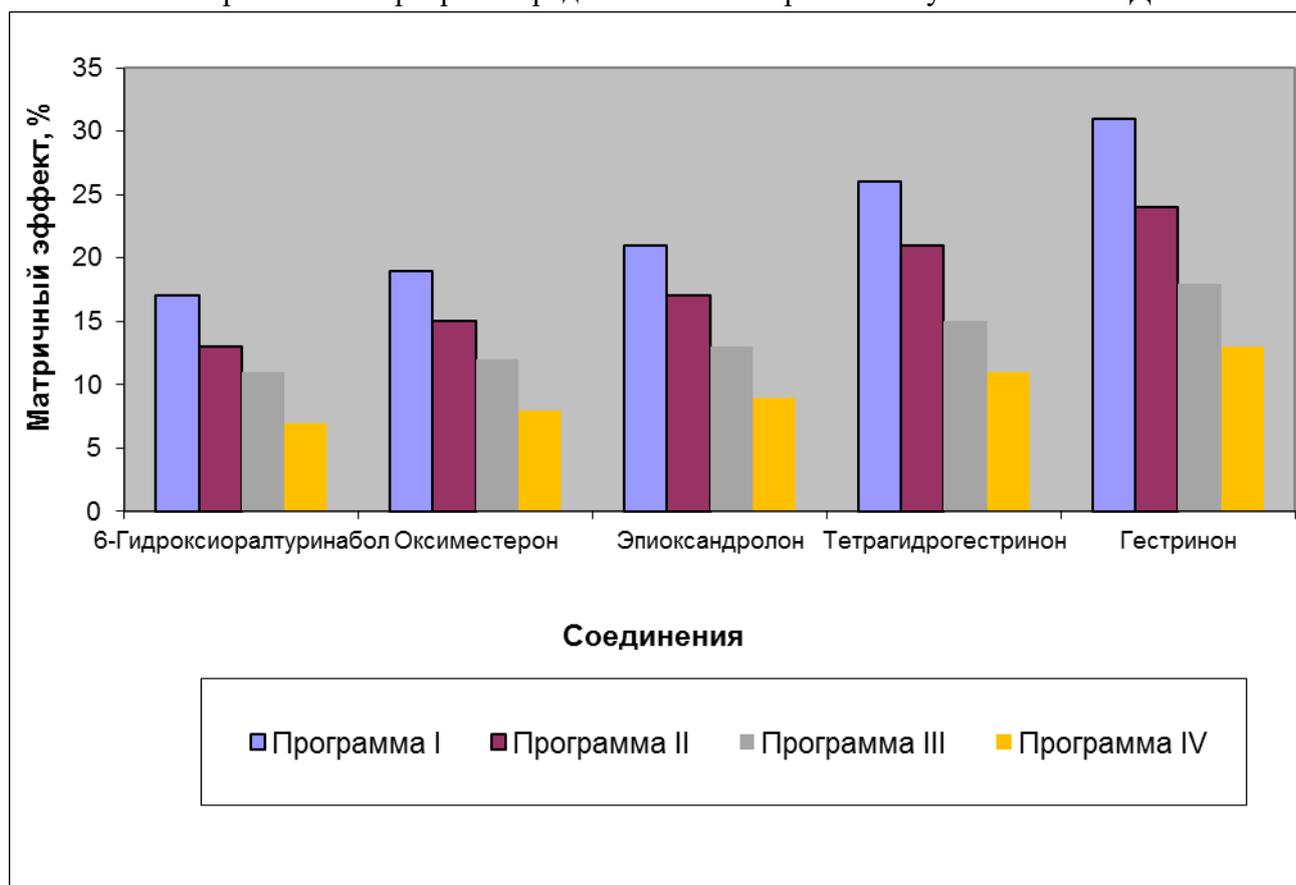


Рисунок 4 Наблюдаемые матричные эффекты при использовании метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с различными программами градиентного элюирования в условиях ХИАД, (n=3, P=0.95)

Из рис. 4 видно, что в условиях ХИАД значение матричного эффекта без выбора оптимальной программы градиентного элюирования составляет от 17% до 32% в зависимости от соединения. В свою очередь, оптимизация программы градиентного элюирования привела к дальнейшему уменьшению матричного эффекта в 2-3 раза. Для установления матричного эффекта, обусловленного ограниченной емкостью С-ловушки, было выполнено сканирование в узком и широком диапазоне масс. Задавая «окно» для сканирования в узком диапазоне масс, руководствовались величинами m/z протонированных молекул модельных соединений. На рис. 5 представлены результаты исследования матричного эффекта при различных режимах сканирования в условиях ХИАД с использованием оптимальной программы градиентного элюирования.

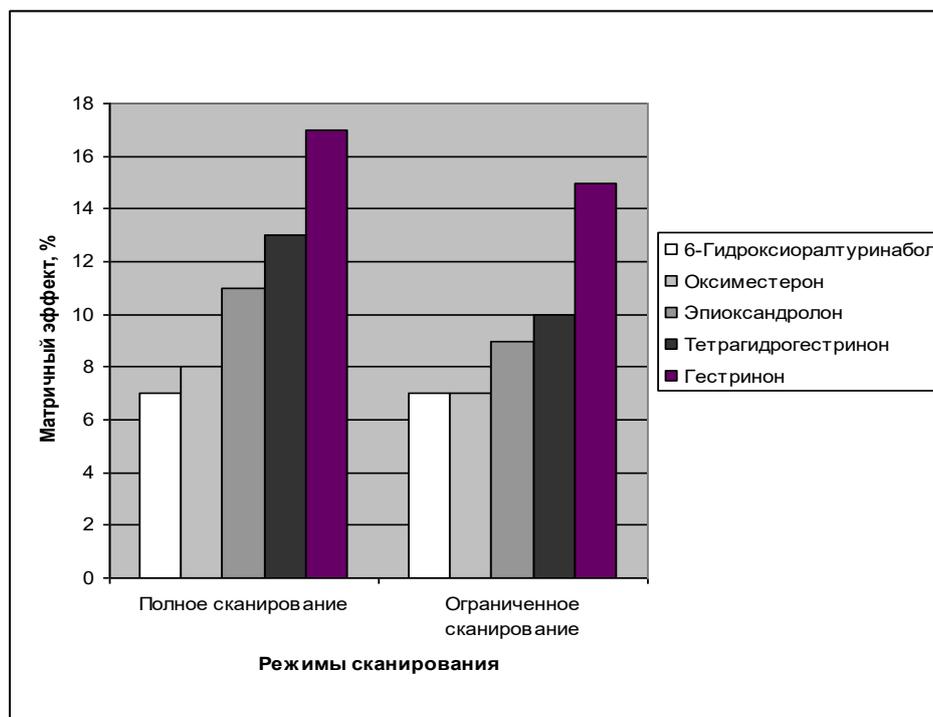


Рисунок 5 Матричный эффект в условиях ХИАД с оптимальными условиями хроматографического разделения, (n=3, P=0.95)

Из рис. 5 видно, что изменение режима сканирования не сказалось на наблюдаемом матричном эффекте. Это свидетельствует о том, что благодаря сочетанию ХИАД с выбором оптимальной программы градиентного элюирования удалось избежать «перегрузки» С-ловушки. Из этого следует, что селективность ионизации определяемых соединений в сочетании с эффективностью разделения могут быть применены для минимизации матричного эффекта, обусловленного ограниченной емкостью орбитальной ионной ловушки. Таким образом, созданы предпосылки для изучения возможности применения ВЭЖХ-МСВР с ХИАД для анализа сложных по составу экстрактов из биологических образцов.

Определение экземестана и его метаболита 17-дигидроэкземестана в моче методом ВЭЖХ-МС/МС в условиях ИЭР и методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в условиях ХИАД

Для изучения возможности быстрого обнаружения ФАВ в сложных по составу реальных биологических образцах предлагаемым подходом в сравнении с референсным методом анализа были выполнены анализы мочи добровольца, содержащей экземестан и его гидроксильный метаболит, методами ВЭЖХ-МСВР(ХИАД) в режиме полного сканирования в с ВЭЖХ-МС/МС (ИЭР). Полученные пределы обнаружения представлены в табл. 1.

Таблица 1 Пределы обнаружения (ПО, нг/мл) экземестана и 17β-дигидроэкземестана при использовании методов ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-МС/МС, (n=3, P=0.95).

Соединение	Метод	ПО
Экземестан	ВЭЖХ-МСВР	2.5
	ВЭЖХ-МС/МС	1
17β-дигидроэкземестан	ВЭЖХ-МСВР	2.5
	ВЭЖХ-МС/МС	1

Предел обнаружения веществ, достигаемые методами ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) и ВЭЖХ-МС/МС, сопоставимы друг с другом.

Определение оксандролонa и его метаболита в моче методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД) после прекращения его приема

Для изучения эффективности разработанного подхода в обнаружении ФАВ в сложных по составу реальных биологических образцах также анализировали мочу добровольца, прекратившего принимать препарат оксандролон. Особенностью оксандролонa (17α -метил-2-окса-5 α -андростан-3-он-17 β -ол) является его быстрое выведение из организма, осложняющее его обнаружение в биологических образцах. Масс-хроматограммы экстрактов из мочи добровольца, полученные методом ВЭЖХ-МС/ОЛ с ХИАД, представлены на рис.6.

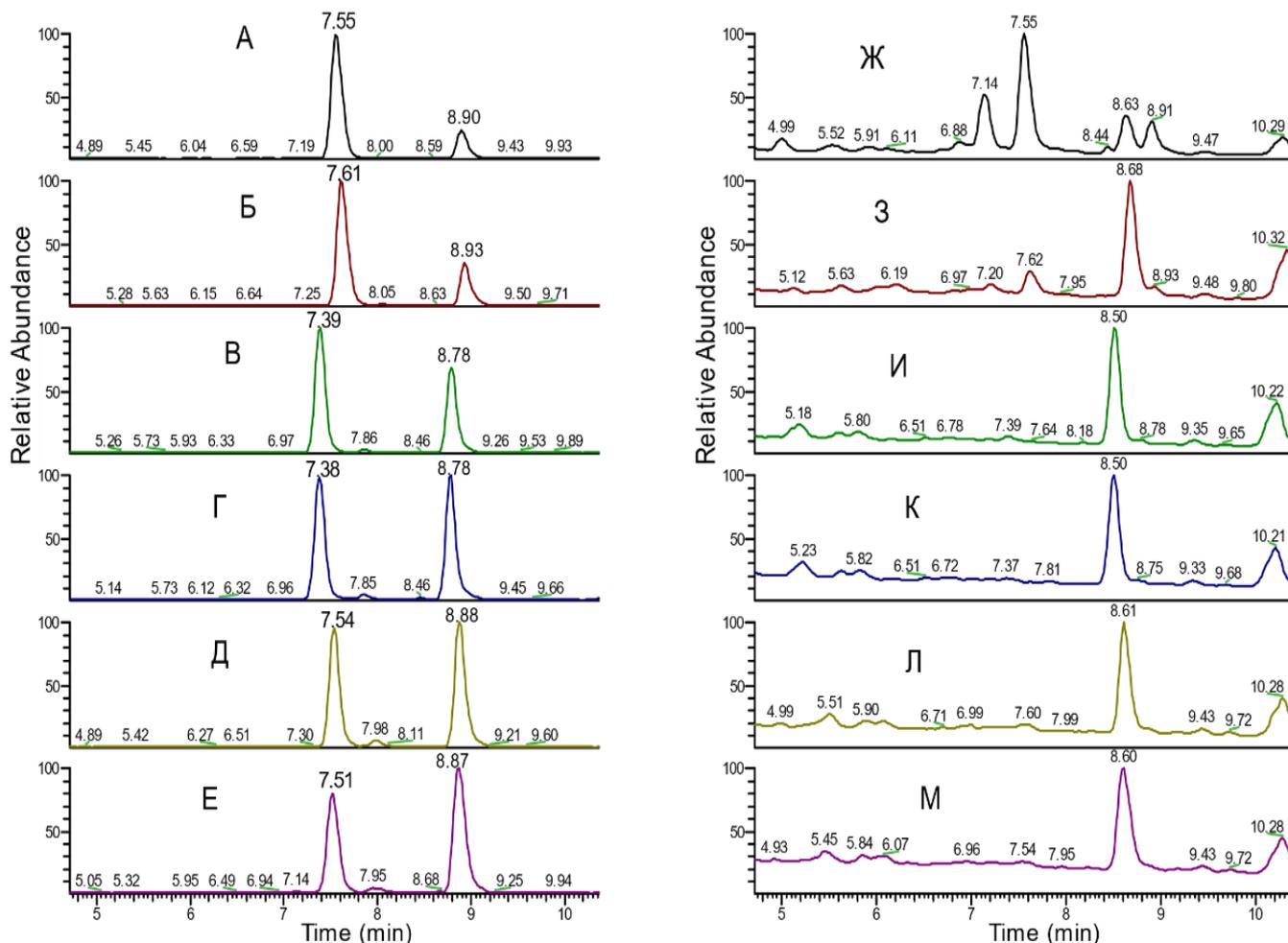


Рисунок 6 Масс-хроматограммы экстракта из пробы мочи добровольца, полученной методом ВЭЖХ/МС-ОЛ в сочетании с ХИАД для m/z 307.2268.: А – отобранной в день прекращения приема, Б, В, Г, Д, Е – спустя 4, 6, 8, 10 и 14 дней соответственно после прекращения приема Ж, З, И, К, Л, М – масс-хроматограммы по суммарному ионному току для экстрактов; А, Б, В, Г, Д и Е, соответственно.

Как видно из масс-хроматограмм по точно измеренным m/z (рис. 6), несмотря на то, что через 14 дней после прекращения приема препарата, величина сигнала ионного тока и, соответственно, концентрация оксандролонa уменьшилась в 300 раз, его легко удается обнаружить в моче без всяких интерференций, которые хорошо заметны на масс-хроматограмме полного ионного тока. Согласно нашим оценкам концентрация оксандролонa и эпиоксандролонa в моче добровольца, отобранной спустя 14 дней после прекращения приема, не превышала 330 пг/мл. Таким образом, благодаря точному измерению m/z на уровне 3 ppm, разрешению и минимизации матричного эффекта, достигнутого благодаря сочетанию

ВЭЖХ/МС-ОЛ с ХИАД, добились высокоселективного определения оксандролона и его основного метаболита в анализируемой матрице сложного состава.

Скрининг ФАВ в моче методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ(ХИАД)

На данном этапе задача исследования заключалась в изучении возможности быстрого скрининга стероидов и (β -гидроксифенилэтил)аминов (всего 29 соединений) в моче методом ВЭЖХ/МС-ОЛ. При этом для решения задач быстрого скрининга очень важно было основываться на одной масс-хроматограмме, построенной для точно измеренного m/z характеристичного иона.

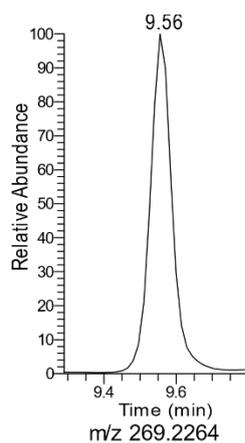
В условиях ХИАД в масс-спектрах анаболических стероидов и (β -гидроксифенилэтил)аминов наблюдались пики, принадлежащие ионам $[M+H]^+$ или $[M+H-nH_2O]^+$. На рис. 7 представлены масс-хроматограммы по m/z характеристичных ионов метаболитов ряд ФАВ (концентрация каждого компонента составляет здесь 0.1 нг/мл). «Окно», заданное для построения масс-хроматограмм, не превышало 3 ppm. Как видно, из рис. 7 при такой точности измерения m/z достигается высокая селективность и низкий предел обнаружения. Достигнутый предел обнаружения составляет 0.05 – 0.1 нг/мл, что свидетельствует об успешной минимизации матричных эффектов в условиях ХИАД. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что при скрининге методом ВЭЖХ-МС/ОЛ(ХИАД) можно ограничиться одной масс-хроматограммой для точно измеренной величины m/z иона $[M+H]^+$ или $[M+H-nH_2O]^+$ без ущерба для селективности обнаружения. Для подтверждения этого тезиса была проведена валидация и апробация разработанного способа скрининга на основе предлагаемого подхода.

Валидация скрининга ФАВ методом ВЭЖХ/МС-ОЛ (ХИАД)

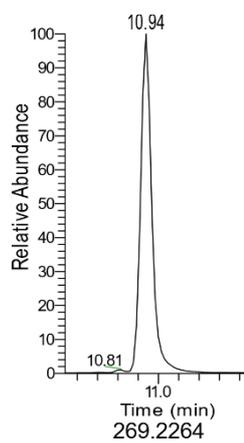
Валидация предложенного подхода предусматривала использование реальных образцов мочи от 10 добровольцев, не принимающих ФАВ. Валидация подхода включала в себя оценку степени извлечения, специфичности и селективности определения, установление предела обнаружения и проверку повторяемости и прецизионности выполняемых анализов. Степень извлечения для исследуемых биорегуляторов и их метаболитов была выше, чем 70 %. Метод успешно прошел испытание на селективность и специфичность. Отсутствовало мешающее влияние потенциально интерферирующих компонентов, включая кортикостероиды и диуретики. Ни у одного потенциально интерферирующего компонента не совпадало время удерживания с определяемыми соединениями. Для всех исследуемых соединений предел детектирования был лучше, чем 100 пг/мл. Внутриведенная повторяемость ($n=6$) менялась в зависимости от соединения в пределах 17-21 %, а междневная повторяемость в пределах 18-25%.

Для апробации предлагаемого способа скрининга был выполнен анализ мочи добровольца, содержащей эпиметендиол (метаболит метандиенона), который был обнаружен ранее методом ГХ-МСВР. Масс-хроматограммы положительной пробы, полученные с применением предложенного автором подхода, представлены на рис. 8.

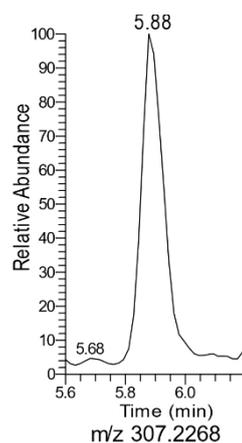
17 β -метил-5 β -андрост-1-ен-3 α ,17 α -диол



18нор-17,17-диметил-5 β -андростан-1,13-диен-3 α -ол



17 α -гидрокси-17 β -метил-2-окса-5 α -андростан-3-он



1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-он

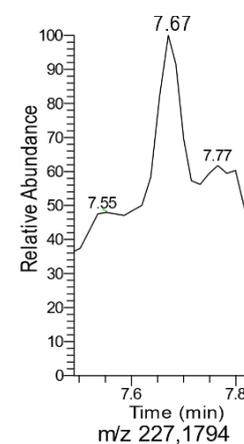
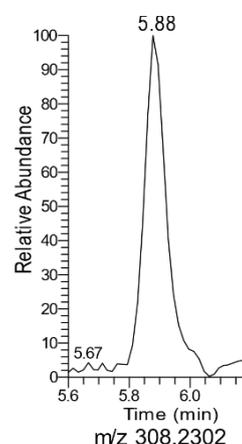
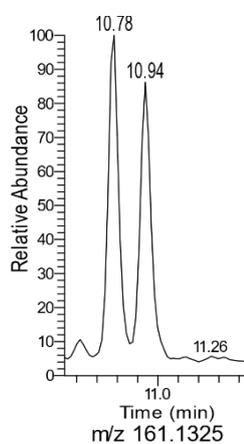
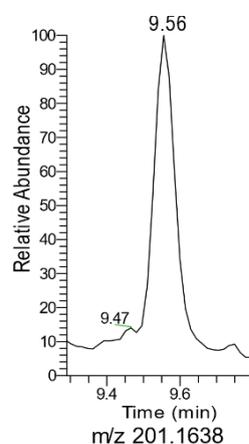
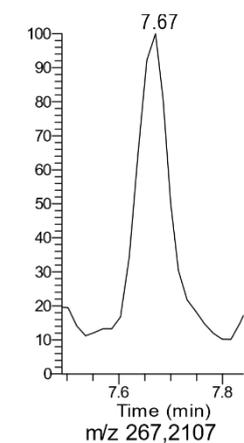
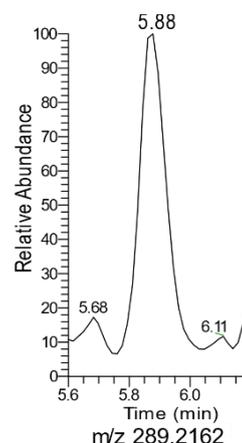
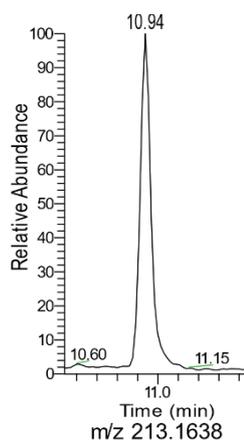
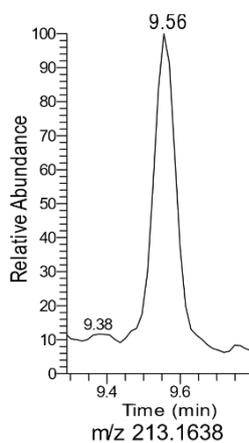
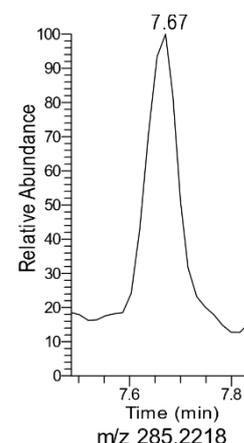


Рисунок 7 Масс-хроматограммы мочи добровольцев, полученные в ходе валидации процедуры с применением метода ВЭЖХ/МС-ОЛ(ХИАД) и построенные по m/z характеристичных ионов метаболитов ФАВ, (0.1 нг/мл).

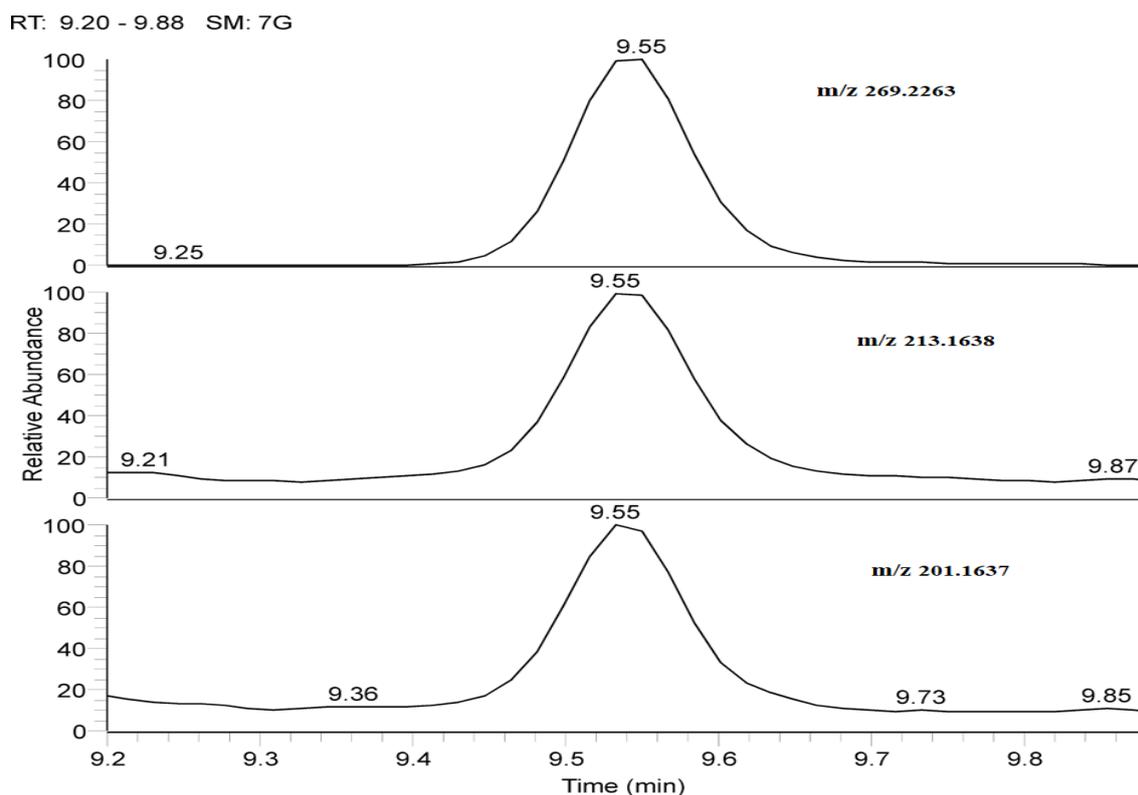


Рисунок 8 Масс-хроматограммы мочи, содержащей эпиметендиол, для m/z 269.2263, 213.1638 и 201.1637 (ВЭЖХ/МС-ОЛ (ХИАД)).

Из рис. 8 видно, что времена удерживания определяемого препарата в моче добровольца и в холостой пробе, куда был добавлен эпиметендиол (рис. 7), идентичны. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИАД), работающей в режиме полного сканирования, может быть использован для анализа реальных биологических объектов без дополнительной очистки экстрактов.

Пятая глава посвящена принципиально новому решению в жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, обеспечивающему быстрое обнаружение ФАВ в сложных по составу смесях за счет снижения матричного эффекта путем селективного протонирования молекул определяемых соединений с использованием ФХИАД.

В главе приведены и обсуждены результаты разработки подхода снижения матричного эффекта (до 5%) для ВЭЖХ-МСВР/ОЛ путем селективного протонирования определяемых соединений с использованием ФХИАД. Предложен, валидирован и апробирован способ обнаружения стероидов в моче методом высокотемпературной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВТЖХ-МСВР/ОЛ) в условиях ФХИАД. Показана возможность селективного обнаружения стероидов в экстрактах из мочи на основе одной масс-хроматограммы для точно измеренной величины m/z иона $[M+H]^+$ или $[M+H-nH_2O]^+$. Сопоставлена степень выявления стероидов в экстрактах из мочи, полученная методами ВТЖХ-МСВР/ОЛ(ФХИАД), ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР.

Матричный эффект при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД (без использования добавок)

Результаты, полученные при сочетании орбитальной ионной ловушкой с ХИАД, показали, что данный способ ионизации способствует не только минимизации матричного эффекта, связанного с подавлением ионизации компонентами матрицы, но и с эффектом, ассоциированным с ограниченной емкостью С-ловушки. Аналогичных результатов правомерно было ожидать от менее изученной фотохимической ионизации при атмосферном давлении

(ФХИАД). По аналогии с ХИАД элюент здесь также испаряется в нагреваемом распылителе и отсутствует конкуренция между компонентами матрицы за «приобретение заряда». Однако в отличие от ХИАД процесс ионизации осуществляется, как правило, с помощью криптоновой ультрафиолетовой лампы, испускающей фотоны с энергией 10 и 10.6 эВ. Соединения, которые напрямую могут ионизироваться фотонами, должны иметь энергию ионизации ниже 10 или 10.6 эВ. Вода и метанол, например, имеющие энергию ионизации выше 10.6 эВ, в таких условиях (при отсутствии примесей) не ионизируются. Существует два подхода к реализации ФХИАД: а) без использования добавок и б) с использованием добавок. В первом случае первая реакция протекает с образованием молекулярного иона, полученного в результате фотоионизации аналита, имеющего энергию ионизации ниже энергии фотонов. В данном случае в присутствии протонного растворителя (воды, метанола, и т.д.) молекулярный ион аналита отрывает атом водорода у растворителя с образованием протонированной молекулы. Во втором варианте в качестве добавок используют соединения, имеющие энергию ионизации ниже энергии фотонов. В этом случае молекулярный ион или протонированная молекула растворителя вступают в реакцию с нейтральными молекулами аналитов. Стремясь минимизировать матричный эффект, связанный с подавлением ионизации, и избежать «перегрузки» С-ловушки «мешающими ионами», изучали оба подхода при применении ФХИАД.

На рис. 9 представлены результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД без использования добавок.

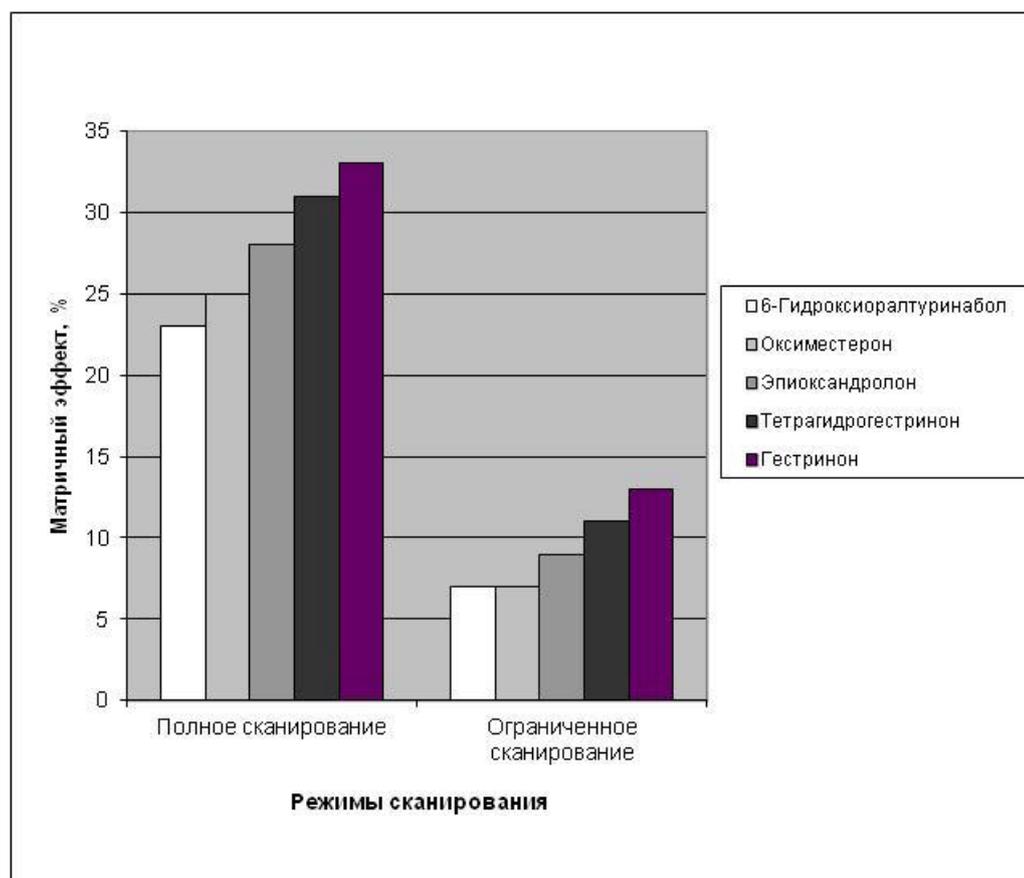


Рисунок 9 Матричный эффект при использовании метода ВЭЖХ-МСВР в условиях ФХИАД без использования добавок, (n=3, P=0.95). Оба эксперимента проводили при идентичных условиях ионизации и разделения.

Рис. 9 демонстрирует матричный эффект, связанный с ограниченной емкостью С-ловушки. Более высокое значение матричного эффекта в условиях ФХИАД (без использования добавок) можно объяснить только более высокой эффективностью ионизации мешающих компонентов матрицы в данных условиях. Различие матричных эффектов нельзя объяснить подавлением ионизации компонентами матрицы, так как при сканировании в узком диапазоне масс общее значение матричного эффекта не превышает 12%. Дело в том, что уменьшение диапазона сканирования не должно сказываться на подавлении ионизации компонентами матрицы. Хотя значения матричного эффекта, связанного с емкостью С-ловушки, в условиях ФХИАД без использования добавок в 2-3 раза меньше, чем при электрораспылительной ионизации, остается актуальным поиск подходов к их дальнейшему снижению. Очевидно, что для дальнейшей минимизации матричного эффекта, вызванного «перегрузкой» С-ловушки необходимо добиться селективности ионизации, используя добавки в условиях ФХИАД.

Исследование матричного эффекта при сочетании ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД (с использованием добавок)

Для снижения матричного эффекта, ассоциированного с емкостью С-ловушки, изучали также возможность использования добавок в условиях ФХИАД. Использование добавок способствовало повышению селективности ионизации определяемых соединений и позволило избежать «перегрузки» С-ловушки. Для гомогенного распределения добавки, участвующей в ион-молекулярных реакциях с аналитами, ее смешивали с подвижной фазой до начала хроматографического разделения смеси. Негомогенное распределение добавки в источнике ионов может проявляться в повышенном уровне химического шума на хроматограмме. Вместе с тем, несмотря на свою привлекательность, данный подход накладывает ограничения, связанные с выбором неподвижных фаз. Поэтому, учитывая, что проблема разделения некоторых анаболических стероидов методом ВЭЖХ-МС не решена в общем виде, в работе была применена высокотемпературная хроматография с использованием пористого графитизированного углерода в качестве неподвижной фазы. На рис. 10 представлены результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД с использованием изопропанола, этанола, ацетона и тетрагидрофурана.

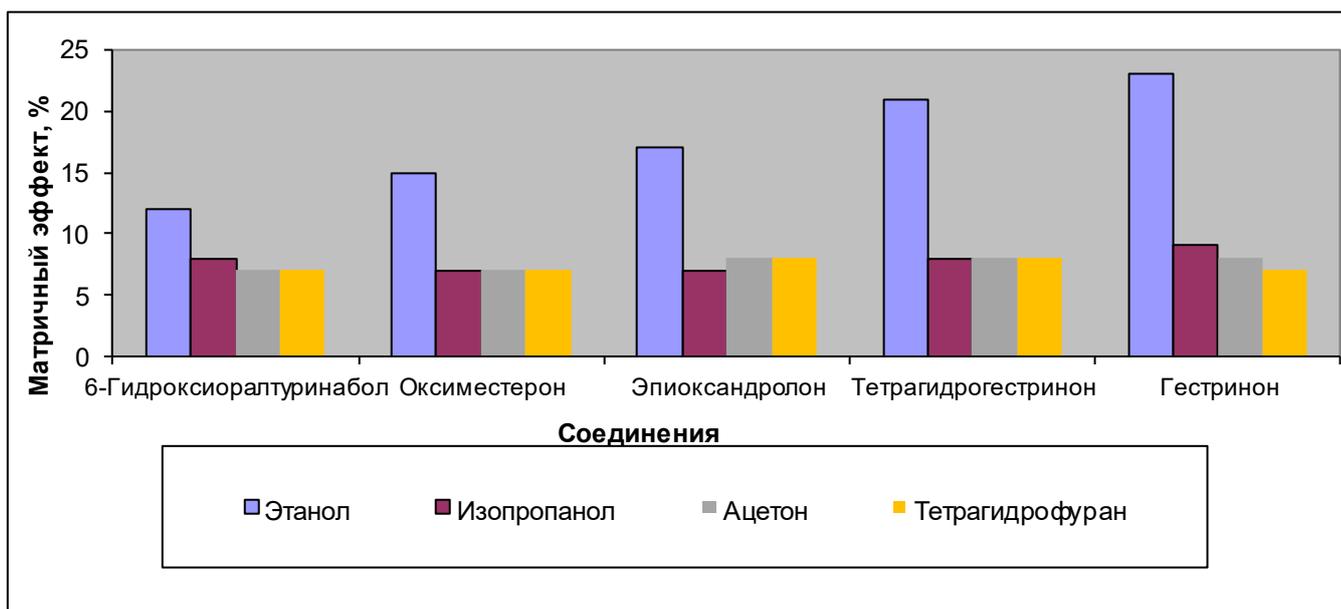


Рисунок 10 Результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД с использованием изопропанола, этанола, ацетона и тетрагидрофурана, (n=3, P=0.95).

Из рис. 10 видно, что значительный матричный эффект (от 12 до 23 % в зависимости от соединения) наблюдается только при использовании этанола в качестве добавки. В остальных случаях значение матричного эффекта не превышает 10%. Важно отметить, что наиболее низкие значения матричного эффекта достигаются, когда используются соединения с относительно высоким сродством к протону. У изопропанола, ацетона и тетрагидрофурана оно составляет 793 кДж/моль, 812 кДж/моль и 822 кДж/моль соответственно, в то время как для этанола оно составляет 776 кДж/моль. Таким образом, относительно высокое значение матричного эффекта при использовании этанола в качестве добавки можно объяснить более высокой эффективностью ионизации мешающих компонентов матрицы, вызывающих «перегрузку» С-ловушки, в данных условиях.

Для проверки этой гипотезы было выполнено сканирование в широком и узком диапазоне масс при использовании этанола в качестве добавки. На рис. 11 представлены результаты исследования матричного эффекта в условиях ФХИАД с использованием различных добавок при применении узкого и широкого диапазона сканирования масс при использовании этанола в качестве добавки.

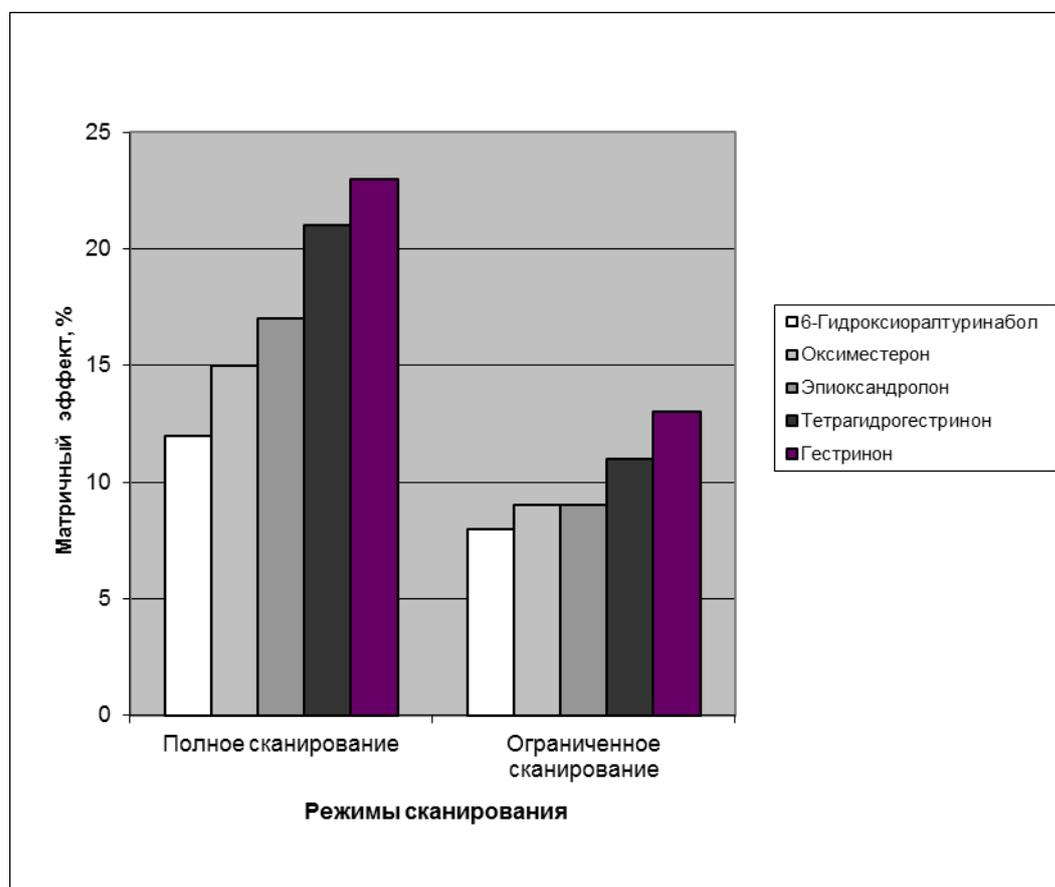


Рисунок 11 Матричные эффекты при применении метода ВЭЖХ-МСВР с различными режимами сканирования в условиях ФХИАД с использованием этанола в качестве добавки, (n=3, P=0.95)

Из рис. 11 видно, что значение матричного эффекта в условиях ФХИАД не превышает 13% при уменьшении диапазона сканирования. Поэтому наблюдаемый матричный эффект при широком диапазоне сканирования можно объяснить «перегрузкой» С-ловушки. Она вызвана тем, что сродство к протону ионов мешающих компонентов матрицы выше, чем у этанола. Селективно удерживая отдельные ионы, мы препятствуем проникновению в С-ловушку ионов

мешающих компонентов. С другой стороны, уменьшение диапазона сканирования не отвечает требованиям, предъявляемым в работе к методу скрининга ФАВ. При изучении эффективности подхода, основанного на применении ФХИАД, оценивали степень выявления 57 стероидов в образцах мочи. В качестве добавок в подвижную фазу использовали этанол, изопропанол, ацетон и тетрагидрофуран. Степень выявления ФАВ представляла собой отношение числа проб, в которых был обнаружен искомый биорегулятор, к 10 анализированным пробам, содержащим данный биорегулятор. Наиболее эффективной добавкой для обнаружения стероидов в пробах мочи оказался изопропанол, который была выбран в валидированном способе скрининга 57 стероидов в моче. Отличительной особенностью масс-спектров стероидов, полученных в данных условиях, является образование протонированных молекул и фрагментных ионов $[M+H-H_2O]^+$ и $[M+H-2H_2O]^+$. В дальнейшем эти ионы были использованы в качестве диагностических.

Валидация и апробация способа скрининга стероидов в моче методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД

Валидация и апробация разработанного способа скрининга 57 стероидов в моче методом ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД включали в себя оценку специфичности и эффекта подавления ионизации матрицей, установление предела обнаружения и степени извлечения, а также определение повторяемости проводимых анализов. В ходе оценки специфичности проверялось наличие мешающих компонентов при скрининге исследуемых соединений в 10 холостых пробах мочи добровольцев, не употребляющих какие либо препараты. Для оценки предела обнаружения в 10 проб мочи добавляли смесь стероидов таким образом, чтобы концентрация каждого биорегулятора составляла 0.1, 0.2, 0.5, 1 и 2 нг/мл, соответственно. Предел обнаружения определяли, как наименьшую концентрацию биорегулятора (или его метаболита), который детектировали с отношением сигнала к шуму выше, чем 3/1. Поскольку процедура скрининга предполагает четкую дифференциацию между истинно отрицательной и истинно положительной пробой, вышеуказанное условие должно было выполняться для 10 различных проб. При валидации предложенного способа скрининга дополнительно были выполнены эксперименты по оценке степени извлечения стероидов из мочи с использованием 5 холостых проб мочи. Для этого в конечные экстракты из холостых проб и непосредственно в холостые пробы добавляли смеси определяемых стероидов. Поскольку, в конечном счете, предлагаемый способ нацелен на проведение качественного анализа, исследование повторяемости полученных результатов ограничивалось оценкой разброса относительного времени удерживания аналитов в течение 10 дней и разбросом отношения площадей хроматографических пиков аналитов к площади пика внутреннего стандарта (метилтестостерон) между несколькими днями (3 дня). Для этого использовали 3 пробы мочи, в которых концентрация аналитов составляла 2 нг/мл. Для иллюстрации селективности определения на рис. 12 приведены масс-хроматограммы мочи, в которых присутствуют пики обнаруженных стероидов. Из рис.12 видно, что на масс-хроматограммах для точно измеренных m/z отсутствуют какие-либо интерференции. Использование графитизированного углерода в качестве неподвижной фазы позволило добиться высокой стабильности времен удерживания (они не отклонялись более чем на 0.05 минут в ходе валидации). Благодаря этому, для идентификации пиков, принадлежащих анаболическим стероидам, предложенным способом, достаточно знать время удерживания и точное значение m/z одного диагностического иона определяемого стероида. При исследовании специфичности, основанной на анализе 10 холостых проб мочи, ни в одном случае не наблюдали присутствие мешающих компонентов.

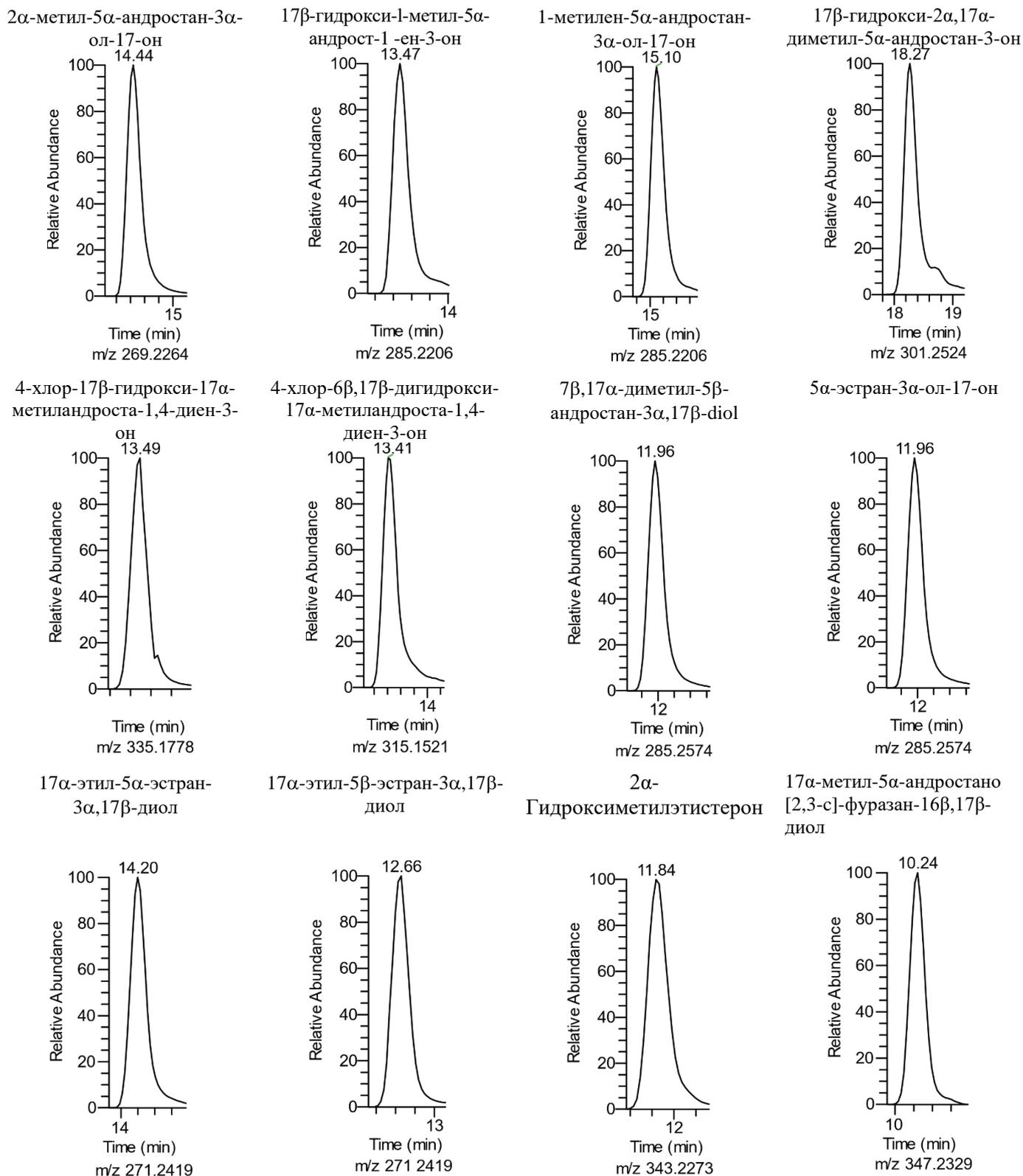


Рисунок 12 Масс-хроматограммы мочи, свидетельствующие об отсутствии интерференций при определении низких концентраций стероидов (2 нг/мл).

На рис. 13 представлены круговые диаграммы распределения точности измерения масс, матричного эффекта, формулы диагностического иона и предела обнаружения по 57 определяемым стероидам.

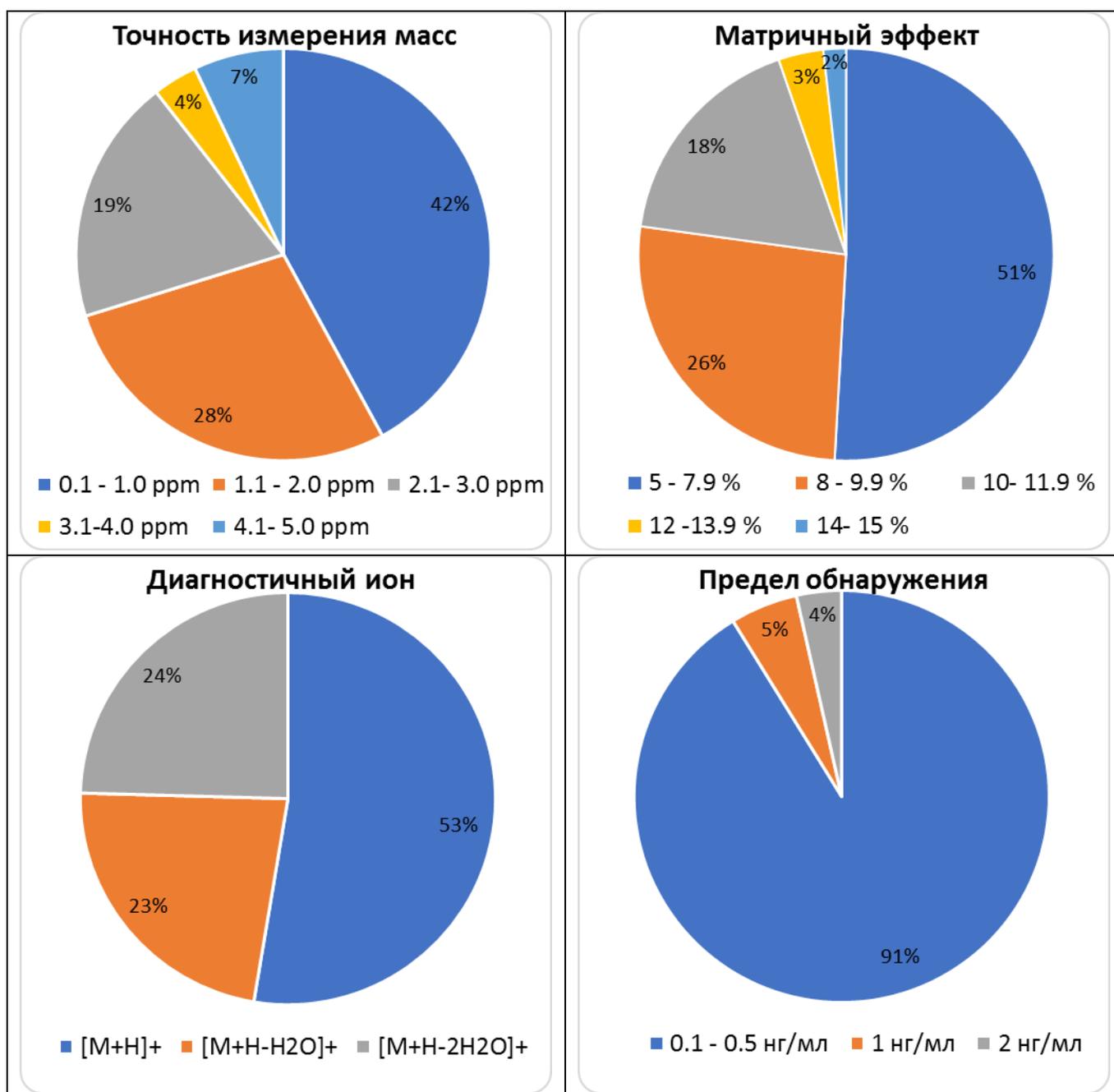


Рисунок 13 Круговые диаграммы распределения точности измерения масс, матричного эффекта, формулы диагностического иона и предела обнаружения по 57 определяемым стероидам

Из рис. 13 видно, что матричный эффект находился в интервале 5-15 %, что в несколько раз ниже, чем при электрораспылительной ионизации. Таким образом, с использованием ФХИАД удалось свести к минимуму матричный эффект. Для 91 % изученных соединений предел обнаружения находился в интервале 0.1-0.5 нг/мл. Только для 5 α -эстран-3 α -ол-17-она и 5 β -эстран-3 α -ол-17-она предел обнаружения составил 2 нг/мл. В ходе валидации точность измерений масс не была хуже, чем 5 ppm. Для всех соединений в масс-спектрах наблюдали интенсивные пики, принадлежащие протонированным молекулам или фрагментным ионам [M+H-H₂O]⁺ и [M+H-2H₂O]⁺. В 53% случаях в масс-спектрах наблюдали интенсивные пики, принадлежащие протонированным молекулам. Показано, что жидкостно-жидкостная экстракция может быть использована в сочетании с предлагаемым способом скрининга. Из 57 изученных аналитов для 55 степень извлечения была выше, чем 70 %. Для всех определяемых

соединений относительные времена удерживания были стабильны во времени. Относительное стандартное отклонение времен удерживания всех без исключения аналитов было меньше, чем 0.3 %. В свою очередь относительное стандартное отклонение отношения площадей пиков к площади пика внутреннего стандарта изменялось от 0.7 % до 14.5 % в зависимости от компонента. Для валидации предложенного способа скрининга был выполнен анализ мочи добровольца, принимающего тренболон. Здоровый мужчина, 47 лет принимал два раза в день 12.5 мг (полкапсулы) препарата Parabolan (ацетат тренболана), производимого British Dragon (Таиланд). Протокол исследований предполагал прием одной капсулы в день в течение 5 дней и отбор пробы мочи через две недели после окончания приема препарата. На рис. 14 приведены масс-хроматограммы мочи через две недели после окончания приема препарата.

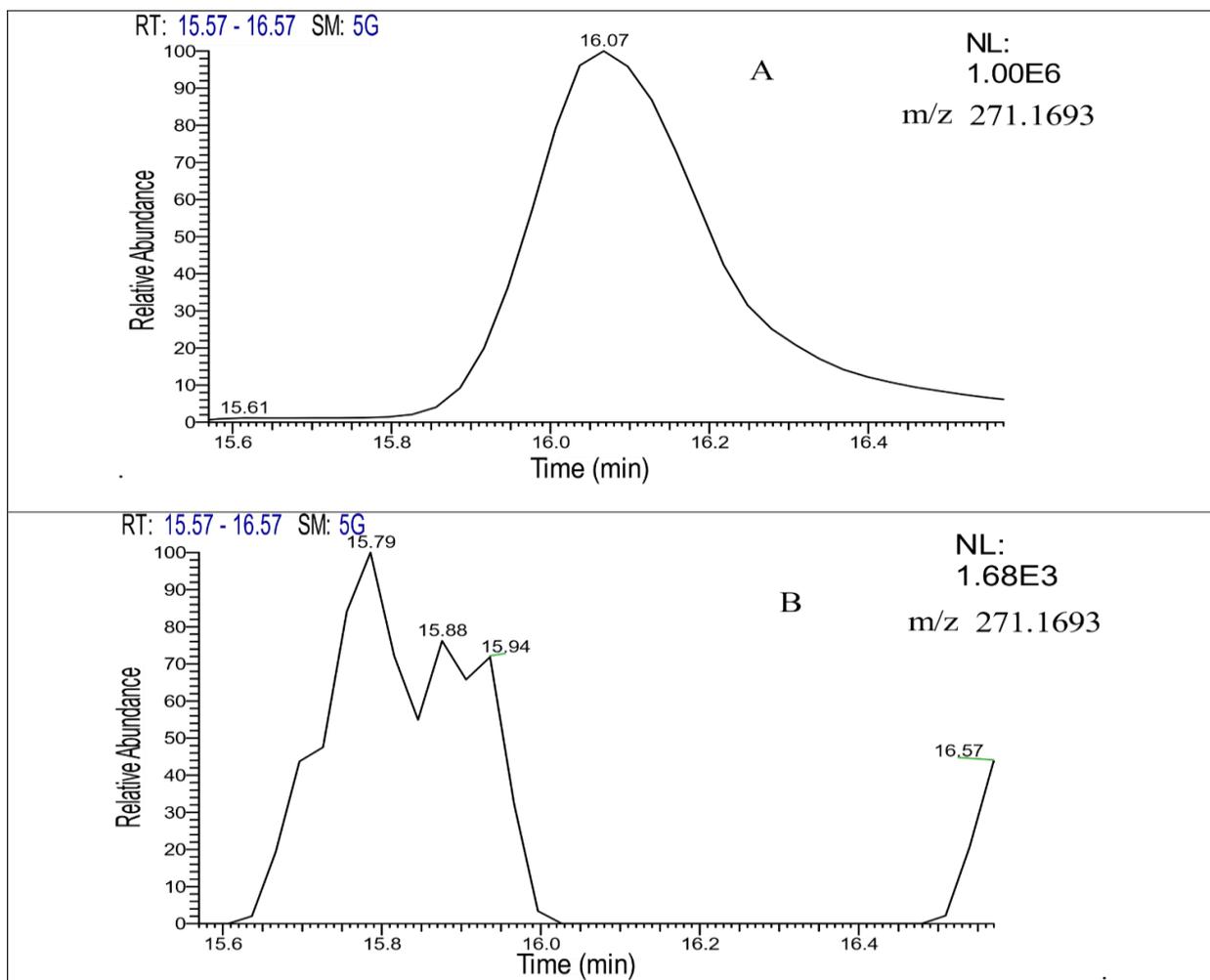


Рисунок 14 Масс-хроматограмма мочи добровольца (А), принимающего тренболон и масс-хроматограмма добровольца, не принимающего препарат (В) для m/z 271.1693.

Как видно из рис. 14А, на масс-хроматограмме присутствует пик с временем удерживания (16.07 мин.), соответствующим времени удерживания эпитренболону. На рис. 14В представлена масс-хроматограмма холостой пробы, зарегистрированная после анализа положительной пробы.

Как видно из рис. 14В, на масс-хроматограмме отсутствуют пики interfering компонентов и перекрестное загрязнение пробы, что дополнительно свидетельствует о пригодности ВТЖХ-МС/ОЛ(ФХИАД) для скрининга стероидов в моче.

Далее, сопоставляли эффективность обнаружения анаболических стероидов в экстрактах мочи, методами ВТЖХ-МСВР/ОЛ(ФХИАД), ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР. Для этого были выбраны 10 стероидов. Все выбранные соединения являются «проблемными» стероидами. У шести из них (оксандролон, эпоксандролон, тренболон, эпитренболон, гестринон, тетрагидрогестринон) низкий выход реакции дериватизации, у остальных (метаболиты метилтестостерона) трудности детектирования связаны с интерферирующими компонентами матрицы. Используемые для сравнения методы ГХ-МС/МС, ГХ-МСВР были ранее валидированы и применялись в аналитической практике. Для выполнения данного исследования приготовили 10 модельных смесей «проблемных» стероидов в моче. Концентрация каждого стероида в каждом растворе составляла 0.5 нг/мл. В табл. 2 результаты анализа 10 проб представлены как отношение числа проб, признанных положительными данным методом, к общему числу анализированных проб.

Таблица 2 Эффективность обнаружения методами газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии, газовой хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения и высокоэффективной жидкостной хроматографией/орбитальной ионной ловушкой.

Определяемое соединение	Эффективность обнаружения исследуемых стероидов различными методами		
	ГХ-МС/МС	ГХ-МС/МСВР	ВТЖХ-МС/ОЛ(ФХИАД)
5β-андрост-1-ен-17β-ол-3-он	9/10	10/10	10/10
17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α-диол	7/10	10/10	10/10
1-метилен-5α-андростан-3α-ол-17-он	10/10	10/10	10/10
17α-гидроксиэстра-4,9,11-триен-3-он	1/10	5/10	10/10
17α-метил-5β-андростан-3α,17β-диол	10/10	10/10	10/10
4-хлороандрост-4-ен-3α-17-он	10/10	10/10	10/10
17α-гидрокси-17β-метил-2-окса-5α-андростан-3-он	10/10	10/10	10/10
17β-гидрокси-17α-метил-2-окса-5α-андростан-3-он	10/10	10/10	10/10
4,17β-дигидрокси-17α-метиландрост-4-ен-3-он	8/10	10/10	10/10
17α-метил-5α-андростано-[3,2-с]-пирозол-3',17β-диол	10/10	10/10	10/10

Как видно из табл. 2, все «труднодериватируемые» стероиды были успешно обнаружены методом ВТЖХ-МС/ОЛ-ФХИАД в отличие от ГХ-МС/МС и ГХ-МСВР. Это дополнительно свидетельствует о целесообразности предложенного способа для скрининга анаболических стероидов. Сочетание ВТЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД способствовало значительному снижению матричного эффекта (для 51% исследованных стероидов он не превышал 8%), достигнутому благодаря совместному использованию изопропанола и графитизированного углерода в качестве подвижной фазы и неподвижной фазы, соответственно. Результатом применения данного подхода стал предложенный способ скрининга 57 стероидов на уровне 0.1 – 2 нг/мл., исключая стадию дериватизации.

Шестая глава посвящена расширению возможностей метода ВЭЖХ-МСВР/ОЛ за счет снижения матричного эффекта путем подавления ионизации мешающих компонентов матрицы

с использованием ХИИЭР, что обеспечило быстрое обнаружение широкого спектра ФАВ в сложных по составу смесях в режиме полного сканирования с использованием точного измерения m/z .

Показано, что в условиях ХИИЭР в масс-спектрах стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов, производные бензамида присутствуют пики, принадлежащие ионам $[M+H]^+$ или $[M+H-nH_2O]^+$. Представлен валидированный способ, основанный на сочетании УЭЖХ-МС/ОЛ с ХИИЭР, для быстрого обнаружения в экстрактах из мочи стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида (всего 120 соединений) с пределом обнаружения, лежащим в интервале 0.2 – 250 нг/мл. Определение проводится на основе одного точно измеренного m/z $[M+H]^+$ или $[M+H-nH_2O]^+$.

Исследование матричного эффекта при сочетании ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ХИИЭР

ХИИЭР представляет собой метод ионизации, в котором заряженные частицы, полученные в ходе электрораспыления, участвуют в ионно-молекулярных реакциях, протекающих в газовой фазе с образованием протонированных молекул. Важным достоинством данного метода является возможность подавить ионизацию мешающих компонентов анализируемой смеси. Поэтому изучение влияния условий ХИИЭР на матричный эффект, ассоциированный с емкостью С-ловушки, было, главным образом, направлено на решение проблемы ее «перегрузки» при анализе сложных по составу смесей. Для этого использовали электролиты, имеющие различное сродство к протону в газовой фазе. При этом учитывали совместимость этих электролитов с условиями разделения ультраэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Поэтому в качестве электролитов использовали муравьиную кислоту, уксусную кислоту и гидроксид аммония. На рис. 15 представлены результаты оценки матричного эффекта при сканировании в узком и широком диапазоне масс в условиях ионизации электрораспылением с добавлением в подвижную фазу муравьиной кислоты, уксусной кислоты и гидроксида аммония.

Как видно из рис. 15, при переходе от широкого диапазона сканирования к узкому величина матричного эффекта для всех веществ меньше всего изменялось при добавлении гидроксида аммония в подвижную фазу. Другими словами, высокое сродство к протону гидроксида аммония в газовой фазе способствует уменьшению «перегрузки» С-ловушки, так как в этих условиях в ней могут оказаться только ионы соединений, обладающих бóльшим сродством к протону в газовой фазе, чем у гидроксида аммония. Таким образом, благодаря ионно-молекулярным реакциям, протекающим в газовой фазе можно уменьшить «популяцию» целевых ионов в С-ловушке от 5 до 10 раз в зависимости от определяемого соединения и повысить чувствительность ионной ловушки в целом при анализе сложных по составу смесей. То есть предложенный подход с добавлением гидроксида аммония в подвижную фазу обеспечил предпосылки для скрининга широкого круга ФАВ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИЭР.

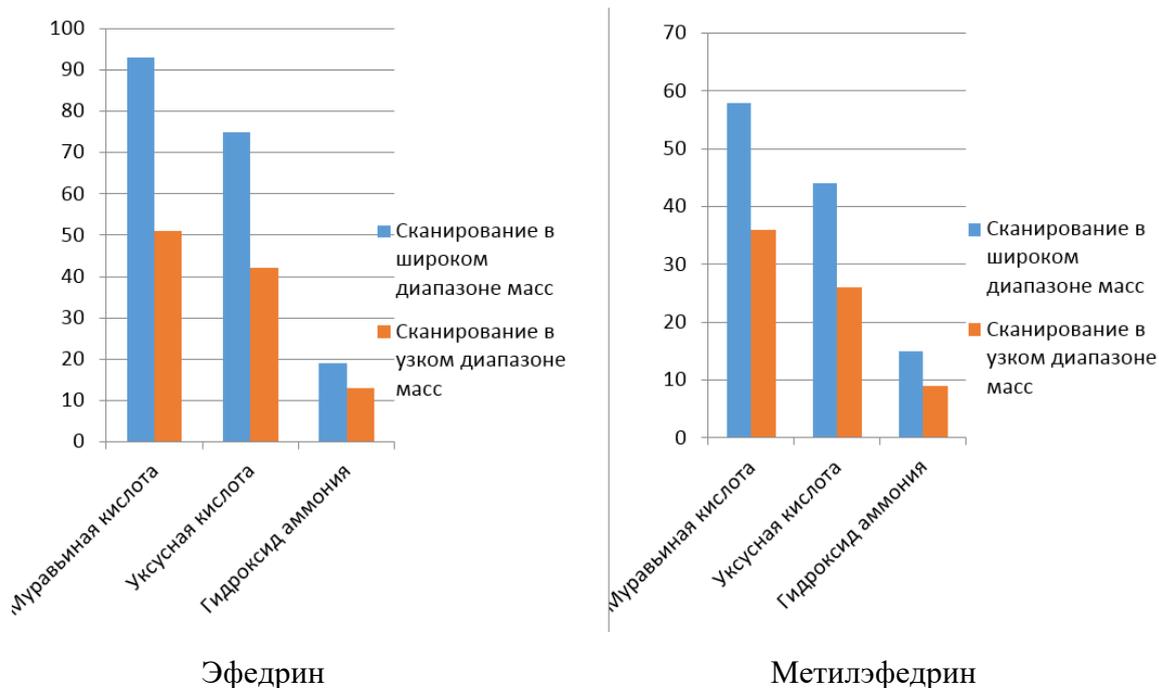


Рисунок 15 Оценка матричного эффекта при сканировании в узком и широком диапазоне масс в условиях ХИЭР с добавлением муравьиной кислоты, уксусной кислоты и гидроксида аммония в подвижную фазу, (n=3, P=0.95).

Скрининг ФАВ методом УЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР

В основе разработанного способа лежит ослабление эффекта разфазировки движения ионов в ОЛ за счет подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Это обеспечивается использованием в УЭЖХ летучего основания, являющимся одновременно модификатором подвижной фазы и газом-реагентом для ХИИЭР.

На рис. 16 представлена масс-хроматограмма холостой пробы мочи для m/z основного пика каждого масс-спектра, полученного при добавлении в подвижную фазу гидроксида аммония (А) и муравьиной кислоты (В).

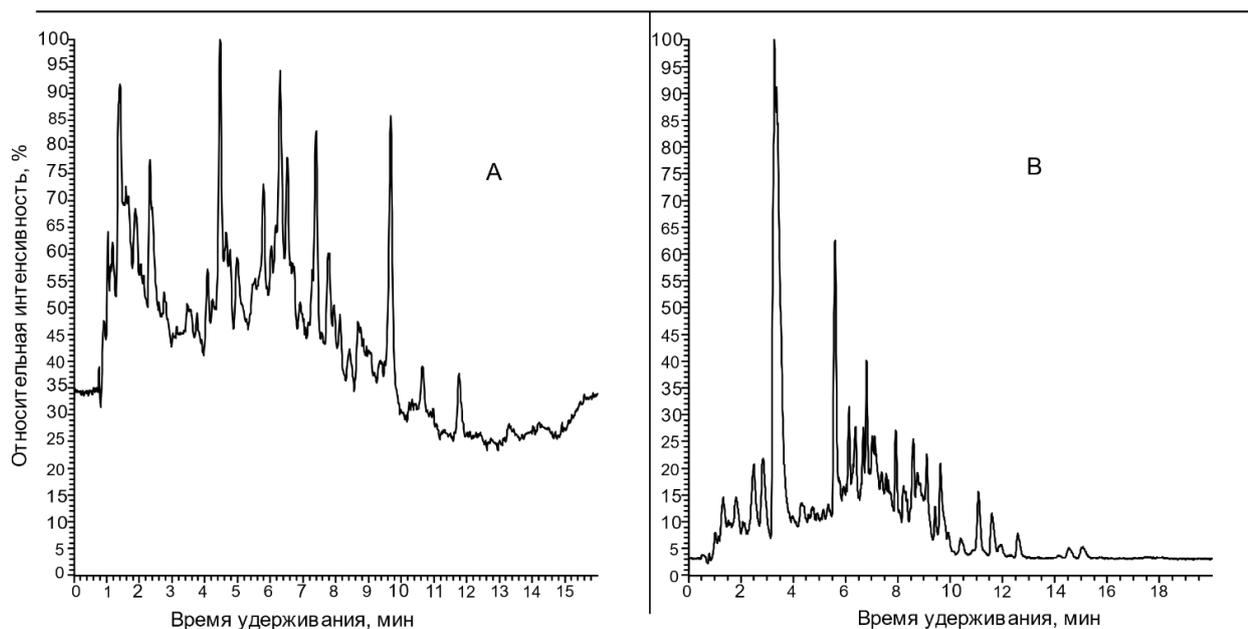
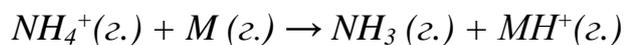


Рисунок 16 Масс-хроматограмма холостой пробы мочи для m/z основного пика каждого масс-спектра, полученного при добавлении в подвижную фазу муравьиной кислоты (А) и гидроксида аммония (В) в условиях ХИИЭР

Из рис. 16 видно, что при добавлении гидроксида аммония в подвижную фазу отклик интерферирующих компонентов значительно снизился. Это очень важный факт, так как в этом случае орбитальная ионная ловушка заполняется главным образом ионами определяемых соединений, а не ионами интерферирующих компонентов. Таким образом, снижение предела обнаружения определяемых соединений достигается преимущественно за счет резкого снижения отклика мешающих компонентов. В этом случае ионно-молекулярная реакция с участием аналитов и ионов аммония происходит предположительно согласно следующей схеме:



Вышеприведенная схема нашла отражение в масс-спектрах стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов, производные бензамида, где присутствовали преимущественно пики, принадлежащие протонированным молекулам и фрагментным ионам $[M+H-nH_2O]^+$. Таким образом, минимизация матричного эффекта, достигнутая в условиях ХИИЭР, создала предпосылки для разработки быстрого способа скрининга стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов, производные бензамида в моче методом ВЭЖХ-МСВР/ОЛ. Матричный эффект, точность измерения масс и предел обнаружения, полученные методом ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР) при скрининге соединений вышеперечисленных классов, запрещенных в спорте ФАВ, приведены в табл. 3.

Таблица 3 Матричный эффект, точность измерения масс и предел обнаружения, полученные методом ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР) при скрининге стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов, производные бензамида в моче

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	T _{уд} , мин	Точность изм. масс, ppm	Матричн. эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α,17α-диол (эпиметендиол)	[M+H-2H ₂ O] ⁺	269.2262	9.84	1.5	9	85	<0.2
3'-гидроксистеранозолол	[M+H] ⁺	345.2533	6.88	2.0	35	90	<0.2
16'-гидроксистеранозолол	[M+H] ⁺	345.2533	7.64	1.1	39	93	<0.2
Тренболон	[M+H] ⁺	271.1692	7.02	0.4	52	87	<1
Эпитренболон	[M+H] ⁺	271.1692	7.24	1.4	34	93	<1
9α-фтор-18-нор-17,17-диметил-4,13-диен-11β-ол-3-он (метаболит флюоксиместерона)	[M+H] ⁺	319.2068	8.52	0.3	36	97	<1
Гестринон	[M+H] ⁺	309.1849	7.52	0.6	29	98	<1
Тетрагидрогестринон	[M+H] ⁺	313.2162	8.27	0.6	20	89	<1
Оксандролон	[M+H] ⁺	307.2267	7.27	1.3	17	99	<1
Эпиоксандролон	[M+H] ⁺	307.2267	8.12	1.3	14	87	<1
Орал Туринабол	[M+H] ⁺	335.1777	8.04	0.3	13	94	<1
Эпиоралтуринабол	[M+H] ⁺	335.1777	8.54	0.6	17	91	<1
6-гидроксиоралтуринабол	[M+H] ⁺	351.1721	6.63	1.4	47	51	<1

Таблица 3 (продолжение)

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричн. эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Кленбутерол	[M+H] ⁺	277.0869	6.52	0.4	37	76	0.4
Простанозол	[M+H] ⁺	315.2436	8.18	1.6	24	91	<1
6β-гидроксиметандиенон (метаболит Метандиенон_)	[M+H- H ₂ O] ⁺	299.2011	5.87	1.0	41	97	<1
2α- гидроксиметилэтилэтистерон (метаболит Даназола)	[M+H] ⁺	343.2273	7.23	0.9	13	94	<1
Даназол	[M+H] ⁺	338.2120	8.61	2.9	42	95	<1
α-Болденон	[M+H] ⁺	287.2011	7.17	1.4	56	100	5
Болденон	[M+H] ⁺	287.2011	7.64	1.7	51	97	5
Метилдиенолон	[M+H] ⁺	287.2011	7.36	0.3	33	99	<1
Болдион	[M+H] ⁺	285.1855	6.79	1.7	23	87	5
Ралоксифен	[M+H] ⁺	474.1739	8.22	1.7	32	94	<5
3-Гидрокси-4-метокси тамоксифен	[M+H] ⁺	418.2382	9.61	1.2	15	91	<5
Аминоглутетимид	[M+H] ⁺	233.1285	2.91	0.1	6	75	<5
Анастрозол	[M+H] ⁺	294.1719	5.33	2.0	33	99	<5
Экземестан	[M+H] ⁺	297.1849	7.40	0.7	10	84	<5
Дигидроэкземестан	[M+H] ⁺	299.2004	7.75	0.7	6	95	<5
Флювестран	[M+H] ⁺	607.3244	9.42	0.3	7	88	<5
Салметерол	[M+H] ⁺	416.2793	9.76	0.9	58	100	<10
Фенотерол	[M+H] ⁺	304.1549	2.90	1.0	16	88	<10
Формотерол	[M+H] ⁺	345.1808	5.56	1.1	35	79	<10
Банбутерол	[M+H] ⁺	368.2185	6.91	1.1	62	57	<10
Ацебуталол	[M+H] ⁺	337.2127	6.18	2.1	47	25	<50
Алпренолол	[M+H] ⁺	250.1807	8.35	2.8	43	86	<50
Атенолол	[M+H] ⁺	267.1709	2.22	1.9	50	13	50
Бетаксоллол	[M+H] ⁺	308.2226	8.24	2.6	55	82	<50
Бисопролол	[M+H] ⁺	326.2331	7.71	1.8	45	85	<50
Бунолол	[M+H] ⁺	292.1913	6.85	1.8	47	80	<50
Буфетолол	[M+H] ⁺	324.2175	5.15	1.5	41	100	50

Таблица 3 (продолжение)

Детектируемое соединение	Диagn. Ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричн. эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Карведилол	[M+H] ⁺	407.1971	7.60	1.2	45	97	<50
Целипролол	[M+H] ⁺	380.2549	6.82	1.0	42	20	<50
Лабетолол	[M+H] ⁺	329.1860	6.23	0.1	52	91	<50
Метипранолол	[M+H] ⁺	310.2018	7.86	2.2	49	71	<50
Метопролол	[M+H] ⁺	268.1907	6.65	0.4	39	56	<50
Надолол	[M+H] ⁺	310.2013	5.53	0.6	58	22	<50
Оксспренолол	[M+H] ⁺	266.1750	7.38	0.3	33	81	<50
Пропранолол	[M+H] ⁺	260.1645	8.16	0.4	46	99	<50
Соталол	[M+H] ⁺	273.1267	1.59	0.7	52	22	50
Талинолол	[M+H] ⁺	364.2595	7.96	0.3	70	76	<50
Тимолол	[M+H] ⁺	317.1647	7.11	2.2	40	56	<50
Эсмолол	[M+H] ⁺	296.1856	6.88	0.3	55	50	<50
дезацетил- гидрокси дефлазакорт	[M+H] ⁺	416.2068	2.73	0.5	24	94	10
Беклометазон	[M+H] ⁺	409.1782	7.01	1.2	33	65	<5
Бетаметазон	[M+H] ⁺	393.2072	6.88	0.2	10	76	<5
Будезонид	[M+H] ⁺	431.2434	7.99	2.3	26	92	<5
Циклезонид	[M+H] ⁺	541.3165	11.04	0.5	30	94	<5
Клобезазол пропионат	[M+H] ⁺	467.2001	8.22	1.3	11	95	<5
Дефлазакорт	[M+H] ⁺	442.2230	7.39	1.8	8	88	<5
21- Дезацетилдефлаз акорт	[M+H] ⁺	400.2124	6.55	1.5	24	94	<5

Таблица 3 (продолжение)

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричн. эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Дезонид	[M+H] ⁺	417.2272	7.19	0.9	49	88	<5
Дезоксиметазон	[M+H] ⁺	377.2128	7.32	1.3	30	94	<5
Дексаметазон	[M+H] ⁺	393.2077	6.88	1.2	45	98	<5
Флуметазон	[M+H] ⁺	411.1978	6.75	0.5	35	98	<5
Флунизолид	[M+H] ⁺	435.2177	7.13	0.4	37	97	<5
Флукортолон	[M+H] ⁺	377.2123	7.16	0.3	18	90	<5
Метилпреднизолон	[M+H] ⁺	375.2171	7.01	0.8	35	82	<5
Триамцинолон	[M+H] ⁺	395.1870	5.12	1.5	28	78	<5
Триамцинолон Ацетонид	[M+H] ⁺	435.2177	6.98	0.1	10	45	<5
Преднизолон	[M+H] ⁺	361.2009	6.34	0.3	25	64	<5
Преднизон	[M+H] ⁺	359.1858	5.93	1.1	19	88	<5
Ацетазоламид	[M+H] ⁺	222.9954	0.58	0.4	12	96	250
Амилорид	[M+H] ⁺	230.0552	1.60	0.4	9	79	125
Хлортиазид	[M+H] ⁺	295.9561	0.62	0.3	5	94	250
Хлорталидон	[M+H] ⁺	339.0201	2.96	1.2	65	89	<25
Этакриновая кислота	[M+H] ⁺	303.0185	5.15	1.6	7	87	250
Гидрохлортиазид	[M+H] ⁺	297.9717	0.95	1.0	53	94	125
Индапамид	[M+H] ⁺	366.0679	5.21	0.8	31	81	<25
Триамтерен	[M+H] ⁺	254.1149	3.59	0.4	24	87	<25
Алтиазид	[M+H] ⁺	383.9901	2.71	2.3	47	90	<25
Бензтиазид	[M+H] ⁺	431.9913	6.06	1.1	54	79	125
Циклотиазид	[M+H] ⁺	390.0344	5.50	0.2	36	89	250
Клопамид	[M+H] ⁺	346.0992	4.30	1.1	54	83	<25

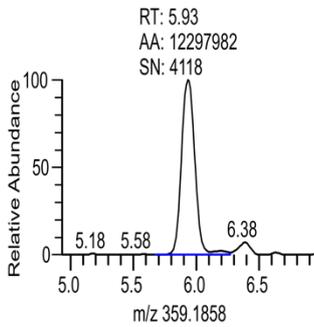
Таблица 3 (продолжение)

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричн. эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Торасемид	[M+H] ⁺	349.1329	4.84	0.6	17	70	<25
Пробенецид	[M+H] ⁺	286.1108	3.50	1.0	13	79	125
Адрафинил	[M+H] ⁺	290.0845	4.54	0.3	85	23	50
Фампрофазон	[M+H] ⁺	378.2545	9.38	1.6	75	44	50
Мефентермин	[M+H] ⁺	164.1439	6.75	4.2	57	30	<50
Модафинил	[M+H] ⁺	274.0896	5.67	0.4	64	20	100
Норфенфлурамин	[M+H] ⁺	204.1000	7.52	2.9	42	32	<50
6β-Гидроксибромантан	[M+H] ⁺	322.0801	8.69	0.3	69	31	100
Этилефрин	[M+H] ⁺	182.1176	6.21	2.2	7	30	<50
Метоксифенамин	[M+H] ⁺	180.1383	6.21	1.6	10	35	<50
Метилэфедрин	[M+H] ⁺	180.1383	6.21	0.5	15	30	50
Пропилгекседрин	[M+H] ⁺	156.1747	8.11	1.9	12	33	<50
Селегилин	[M+H] ⁺	188.1433	7.74	1.1	15	48	<50
N-Дидезметил-сIBUTРАМИН	[M+H] ⁺	252.1519	10.10	2.0	17	38	100
Сиднокарб	[M+H] ⁺	323.1503	7.23	0.9	29	34	50
p-гидрокси мезокарб	[M+H] ⁺	339.1457	6.16	1.5	16	44	<50
Пролинтан	[M+H] ⁺	218.1903	9.34	0.9	12	61	<50
1,3-Диметилпентиламин	[M+H] ⁺	116.1434	6.29	1.7	14	18	<50
Туаминогептан	[M+H] ⁺	116.1434	6.80	1.7	20	11	<50
Фенбутразат	[M+H] ⁺	368.2226	9.21	2.4	25	90	<50

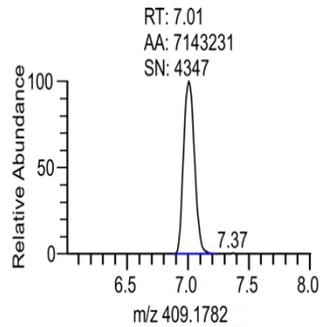
Таблица 3 (продолжение)

Детектируемое соединение	Диагн. ион	m/z диагн. ион, Да	Туд, мин	Точность изм. масс, ppm	Матричный эффект, %	Степень извл., %	ПО, нг/мл
Оксилофрин	[M+H] ⁺	182.1181	1.32	3.8	18	5	<50
3,3-Дифенилпропиламин	[M+H] ⁺	212.1435	8.31	0.9	12	66	<50
Изометгептен	[M+H] ⁺	142.1588	6.88	0.1	12	35	<50
4-гидроксиафетамин	[M+H] ⁺	152.1070	2.91	1.9	11	6	50
Катин	[M+H] ⁺	152.1070	1.3	2.2	14	7	100
Никетамин	[M+H] ⁺	179.1170	2.20	5.0	9	75	<50
Ортетамин	[M+H] ⁺	150.1283	6.55	4.6	8	36	<50
Клобензорекс	[M+H] ⁺	260.1206	9.06	1.9	10	98	<50
Фенкамин	[M+H] ⁺	385.2352	8.27	1.3	23	58	<50
Пентилентетразол	[M+H] ⁺	139.0970	1.32	5.0	15	63	<50
N-дезметилселегилин (метаболит Селегилина)	[M+H] ⁺	174.1270	7.10	4.0	19	81	<50
Псевдоэфедрин	[M+H] ⁺	166.1232	4.27	4.8	20	11	50
Эфедрин	[M+H] ⁺	166.1232	3.89	4.8	19	8	50
Фоледрин	[M+H] ⁺	166.1220	2.19	3.0	12	10	100
Бупренорфин	[M+H-H ₂ O] ⁺	450.3008	11.37	2.2	15	34	1

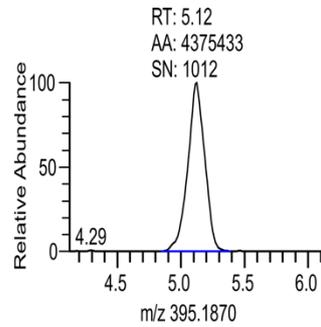
Из таблицы 3 видно, что важной особенностью масс-спектров стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида, полученных в условиях ХИИЭР, является присутствие пиков, принадлежащих [M+H]⁺ и фрагментным ионам [M+H-nH₂O]⁺. Учитывая, что точность измерений масс лучше, чем 5 ppm (см. таблицу 3), при скрининге ФАВ ограничили построением одной масс-хроматограммы для иона [M+H]⁺ определяемого соединения или для m/z его фрагментного иона [M+H-nH₂O]⁺. Величина матричного эффекта, рассчитанная для 120 ФАВ, изменялась от 4 % до 85 % в зависимости от определяемого соединения. Полученные результаты можно объяснить различием в сродстве к протону в газовой фазе. Пределы обнаружения составляли 0.2 – 250 нг/мл для исследованных соединений. Беря в расчет агрессивность подвижной фазы, содержащей гидроксид аммония, хроматографическое разделение компонентов было выполнено с использованием колонки Acquity UPLC VEN C18 1.7 μм, 2.1 × 50 мм. На рис. 17 в качестве примера представлена масс-хроматограмма мочи для m/z ионов, содержащая ФАВ, представляющих интерес для спортивной медицины.



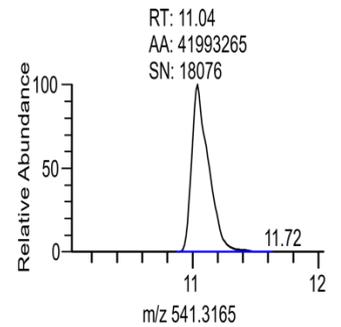
Преднизон



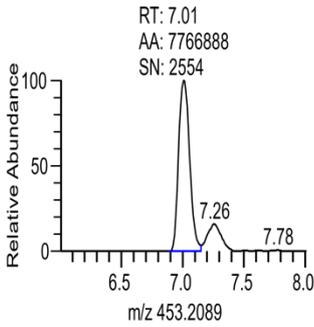
Беклометазон



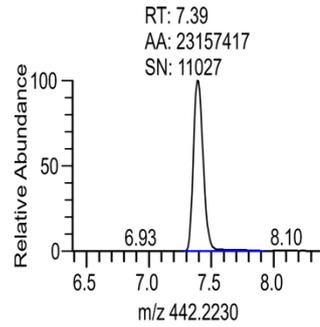
Триамцинолон



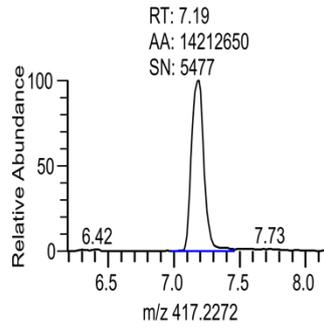
Циклезонид



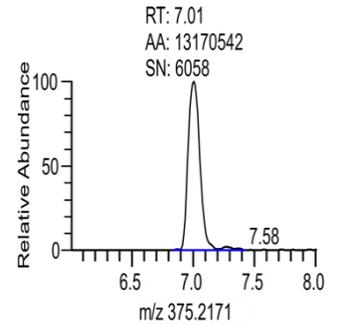
Флюцинолон ацетонид



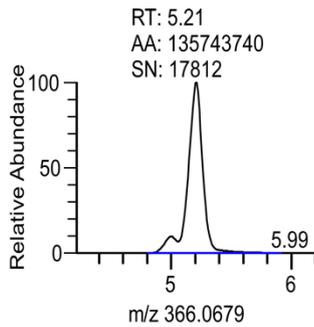
Дефлазаkort



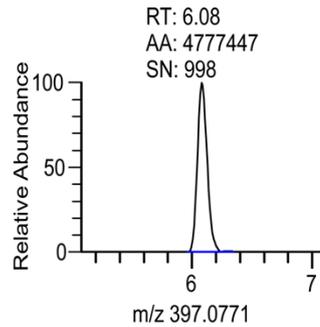
Дезонид



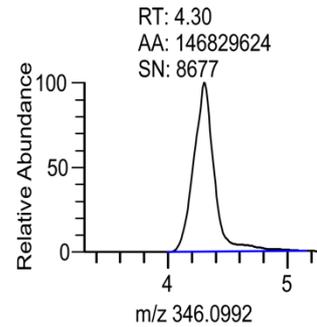
Метилпреднизолон



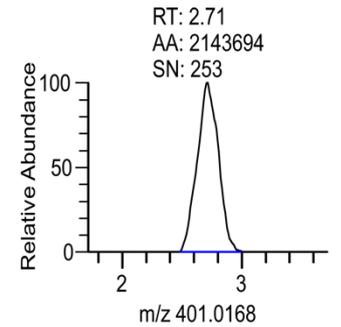
Индапамид



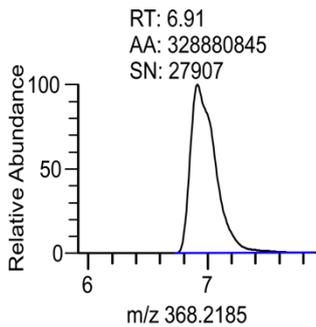
Циклопентиазид



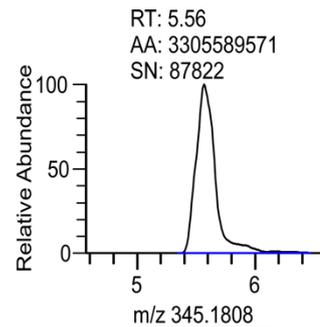
Клопамид



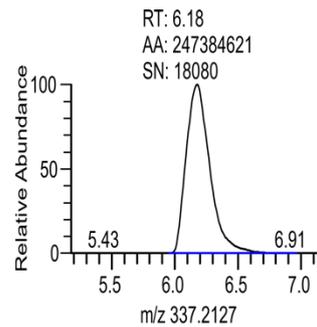
Алтиазид



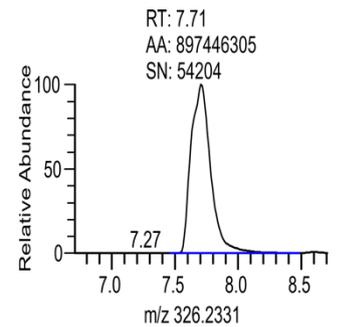
Бамбутерол



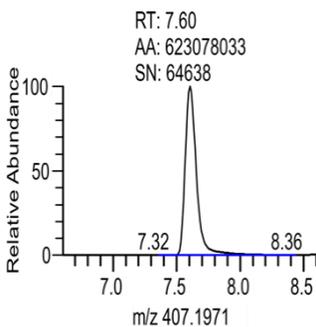
Формотерол



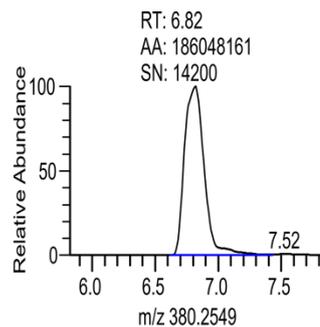
Ацетобутолол



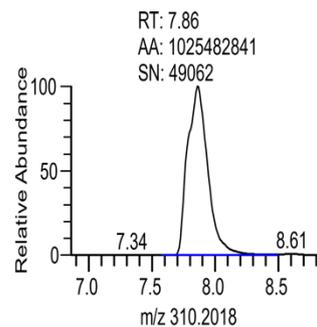
Бисопролол



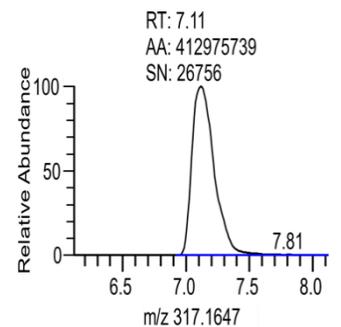
Карведиол



Целипролол



Метипранолол



Тимолол

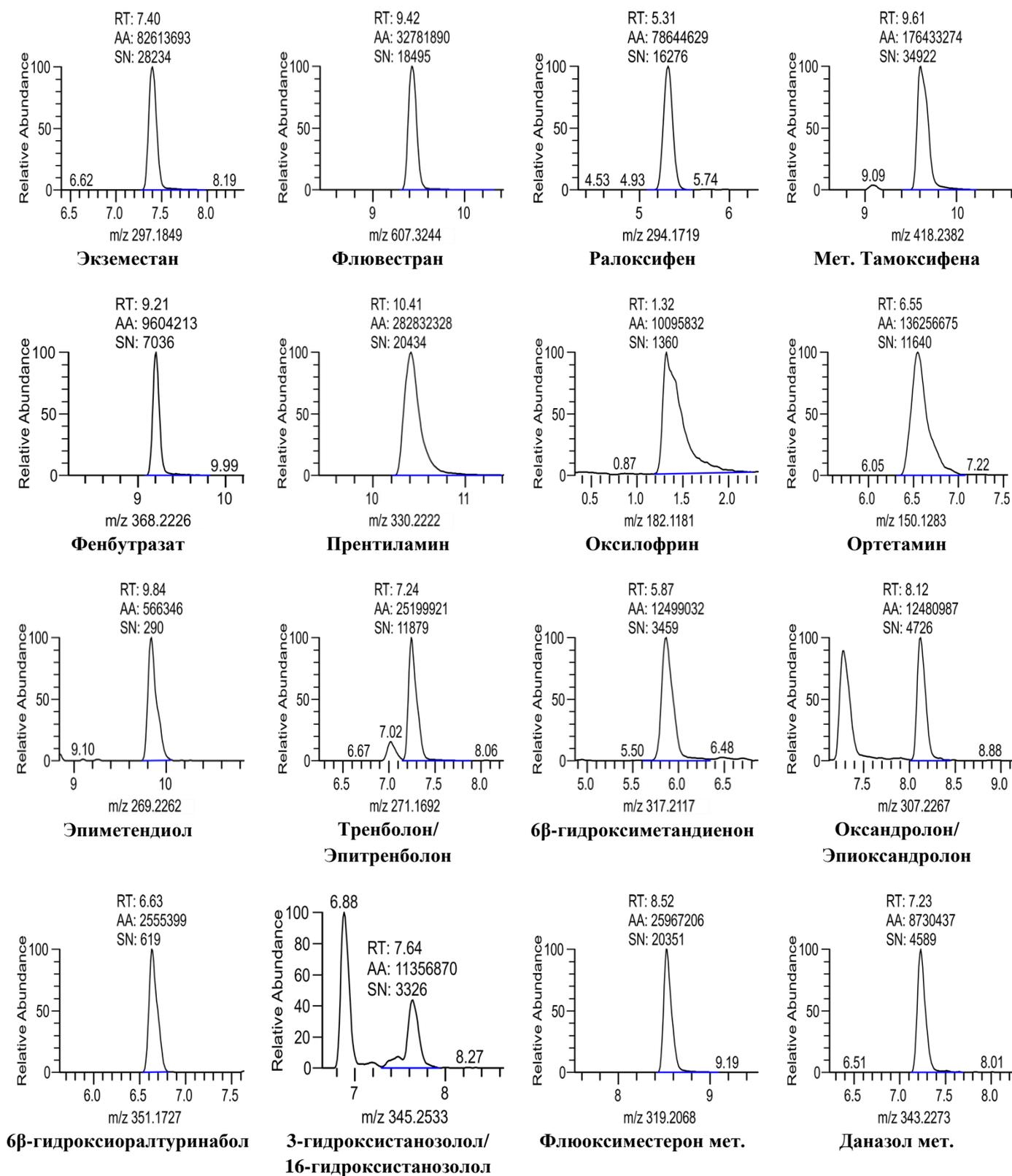


Рисунок 17 Масс-хроматограммы мочи по m/z ионов $[M+H]^+$ и $[M+H-nH_2O]^+$ биорегуляторов, представляющих интерес для спортивной медицины, полученные методом ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР)

Из рис. 17 видно, что во всех случаях наблюдалась высокая селективность детектирования, благодаря которой можно ограничиться построением одной масс-хроматограммы для m/z одной протонированной молекулы определяемого соединения или для

m/z одного фрагментного иона $[M+H-nH_2O]^+$ при скрининге ФАВ. Кроме того, из рис. 17 видно, что добавление гидроксида аммония не приводит к ухудшению формы хроматографических пиков при использовании вышеупомянутой колонки. Более того, с использованием данной колонки были выполнены с высокой воспроизводимостью более 1000 анализов без потери хроматографической эффективности. Среднее относительное стандартное отклонение относительных времен удерживания составляло 0.27 %, хроматографические пики оставались симметричными. Выбранные хроматографические условия позволили разделить ряд проблемных стероидов и их метаболитов с идентичными m/z . К примеру, успешно были разделены 3'-гидроксистеранозолол/16 β -гидроксистеранозолол и тренболон/эпитренболон.

Изучение пригодности предложенного способа скрининга стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил- β -гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β -гидроксифенилэтил)аминов, производные бензамида (всего 120 соединений) также предполагало его валидацию в соответствии рекомендациями Eurochem. В соответствии с данными требованиями необходимо было дополнительно к проведенным исследованиям оценить разброс времен удерживания определяемых соединений и специфичность определения. При анализе 10 холостых проб мочи ни в одном случае не наблюдалось совпадение времен удерживания интерферирующих компонентов и определяемых биорегуляторов и их метаболитов. В ходе валидации время удерживания не отклонялось более, чем на 0.05 минут, а точность измерений масс была не хуже, чем 5 ppm. Относительное стандартное отклонение времен удерживания в течение валидации (6 дней) всех без исключения аналитов было меньше, чем 0.4 %. Кроме того, относительное стандартное отклонение отношения площадей пиков к площади пика внутреннего стандарта для 91 аналита было меньше, чем 10%. Более того, для 64% соединений пределы обнаружения были в 10 раз ниже установленных требований к пределам обнаружения.

На заключительной стадии проводимого исследования была выполнена апробация разработанного способа скрининга. Для этого были выполнены анализы трех реально положительных проб добровольцев. Присутствие биорегуляторов в моче добровольцев было предварительно установлено с применением метода ГХ-МСВР. На рис. 18 приведены масс-хроматограммы этих проб, полученные с применением метода ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР).

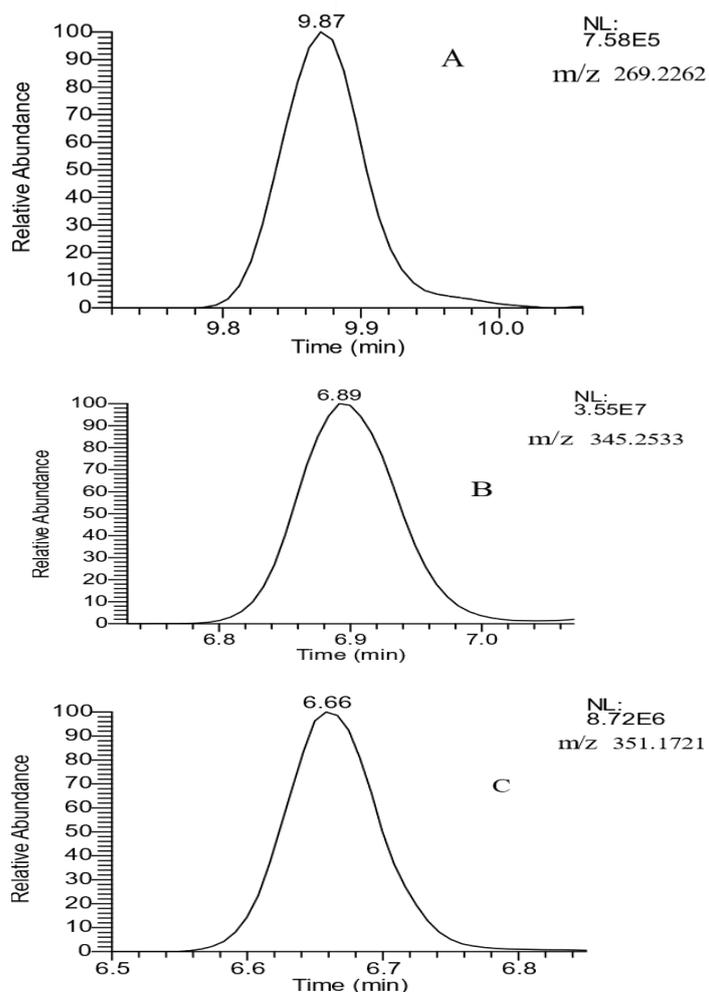


Рисунок 18 Масс-хроматограммы проб, содержащих метаболит эпиметендиола (А), станозолола (В), оралтуринабола (С); получены методом ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР).

Как видно из рисунков, во всех пробах были обнаружены метаболиты запрещенных биорегуляторов. Важно отметить, что в масс-хроматограммах проб мочи абсолютные времена удерживания метаболитов отклонялись не более чем на 0.03 минуты. Это свидетельствует о высокой эффективности метода ВЭЖХ-МС/ОЛ (ХИИЭР) при решения практических аналитических задач. Универсальность предложенного подхода позволяет легко добавить в список определяемых веществ новые соединения без изменений хроматографических и масс-спектрометрических условий. Этим он резко отличается от сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, где при каждом добавлении нового соединения необходимо детально изучить МС/МС спектры и выбрать селективный переход. Более того, детектирование в режиме полного сканирования в сочетании с точным измерением масс при сверхвысоком разрешении может стать мощным инструментом для ретроспективного анализа проб.

Таким образом, в результате выполненных исследований предложено использовать УЭЖХ-МСВР/ОЛ в сочетании с ХИИЭР как эффективный способ скрининга широкого круга ФАВ: стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил)аминов, производных бензамида в моче с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл.

В седьмой главе сформулирована новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга широкого спектра ФАВ на основе сочетания ВЭЖХ-МСВР/ОЛ с ФХИАД, ХИАД и ХИИЭР. Методология обеспечивает быстрое их обнаружение в сложных по составу смесях с использованием точно измеренного m/z протонированных и фрагментных ионов путем снижения влияния матричного эффекта за счет селективного протонирования определяемых соединений и подавления ионизации мешающих компонентов матрицы. Обоснован выбор пути достижения комплементарности новой методологии с референсными методами анализа.

Схема анализа с использованием данной методологии представлена на рис 19.

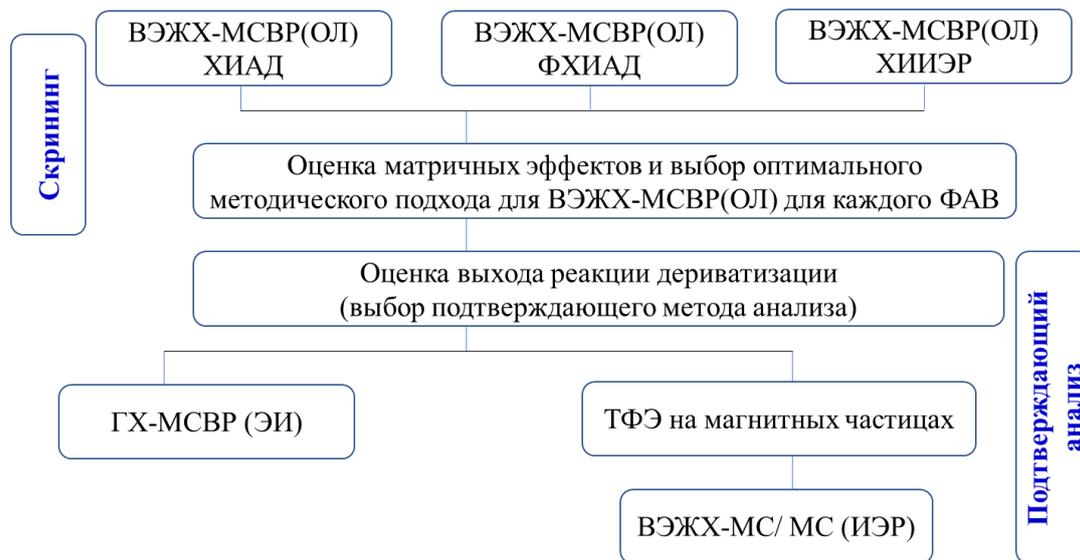


Рисунок 19 Схема анализа медико-биологических объектов на основе новой хромато-масс-спектрометрической методологии скрининга

Из рисунка видно, что за этапом скрининга следует подтверждающий анализ с использованием таких референсных методов, как ГХ-МСВР и ВЭЖХ-МС/МС. Одним из путей достижения комплементарности предлагаемой методологии скрининга с существующими референсными методами является оценка выхода реакции дериватизации и применение ТФЭ на магнитных частицах для снижения матричных эффектов, наблюдаемых при использовании ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией

Выявление «труднодериватируемых» ФАВ для референсного метода ГХ-МС

Превентивное выявление «труднодериватируемых» ФАВ, реагирующих с силилирующими агентами с низким выходом, дает возможность заранее выбрать оптимальный метод анализа и существенно сократить временные и материальные затраты на разработку процедуры скрининга с применением ГХ/МС. С этой целью для расчета выхода реакции силилирования использовали следующую формулу, предполагая, что побочные продукты реакции для выбранных реагентов не образуются:

$$W = \frac{S_{der}}{S_{der} + kS_{nat}} \times 100\%$$

где, W – выход реакции дериватизации;

S_{der} – площадь хроматографического пика производного соединения;

S_{nat} – площадь хроматографического пика недериватизированного соединения;

k – отношение коэффициентов чувствительности производного и недериватизированного соединения.

Результаты расчета отношения коэффициентов чувствительности производного и недериватизированного соединения приведены в табл. 4.

Таблица 4 Значения и стандартные отклонения (SD) отношения коэффициентов чувствительности производного и недериватизированного соединения (k)

Соединение	k	SD
17 β -гидрокси-17-метил-4-андростен-3-он	8.69	0.62
17 α -метил-17 β -гидроксиандроста-1,4-диен-3-он	2.85	0.14
17 β -гидрокси-17 α -метил-2-оха-5 α -андростан-3-он	21.6	1.4
4-Хлор-17 α -метил-17 β -гидроксиандроста-1,4-диен-3-он	26.6	3.2

Значения выхода реакции дериватизации исследуемых соединений, рассчитанные для различных условий дериватизации, представлены на рис. 20.

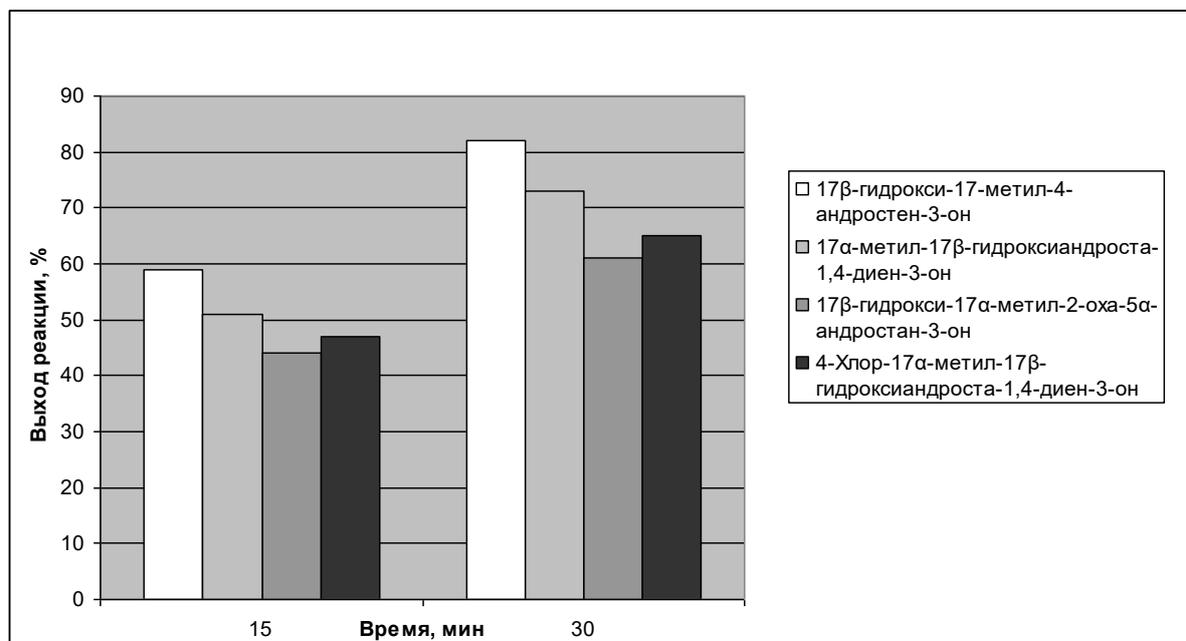


Рисунок 20 Выходы реакции силилирования рассчитанные для 17 β -гидрокси-17-метил-4-андростен-3-она (Метилтестостерон), 17 α -метил-17 β -гидроксиандроста-1,4-диен-3-она (Метандиенон), 17 β -гидрокси-17 α -метил-2-оха-5 α -андростан-3-она (Оксандролон) и 4-Хлор-17 α -метил-17 β -гидроксиандроста-1,4-диен-3-она (Орал Туринабол); реакцию дериватизации проводили в течение 15 и 30 мин.

Полученные результаты полностью согласуются с литературными данными о труднодериватируемых стероидах. Это свидетельствует о надежности предложенного подхода для выявления «труднодериватируемых» ФАВ и обоснование выбора ГХ-МС в качестве референсного метода анализа.

Твердофазная экстракция на магнитных частицах как подход к снижению эффекта подавления ионизации матрицей для референсного метода ВЭЖХ-МС/МС

Комплементарность предлагаемой методологии скрининга с референсным методом ВЭЖХ-МС/МС достигалась применением ТФЭ на магнитных частицах, используемой для снижения матричного эффекта в условиях электрораспылительной ионизации.

Магнитные свойства микрочастиц позволяют упростить отбор экстракта после элюирования и исключить стадию упаривания. Кроме того, возможность варьировать объем суспензии позволяет легко управлять степенью извлечения определяемых соединений и «емкостью сорбента». В качестве модельных соединений в настоящем исследовании использовали селективные модуляторы андрогенных рецепторов и агонисты дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом. Выбор этих соединений был обусловлен их термолабильностью и низкой эффективностью ионизации в условиях фотохимической ионизации при атмосферном давлении. Для проведения магнитной сепарации использовали ферромагнитные микрочастицы с поверхностью, модифицированной группами C₁₈ Dynabeads RPC18, 12.5 мг/мл, размер частиц 1 мкм (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). На рис. 21 приведена схема процедуры извлечения исследуемых веществ из мочи человека при использовании твердофазной экстракции на магнитных частицах.

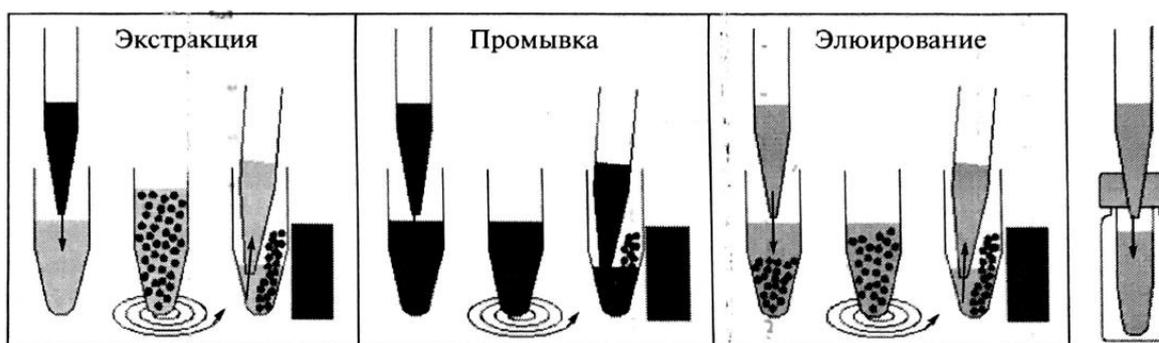


Рисунок 21 Схема процедуры извлечения исследуемых веществ из мочи человека с использованием магнитной сепарации.

Таблица 5 Степень извлечения и подавления ионизации матрицей при экстракции селективных модуляторов андрогенных рецепторов и агонистов дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом из мочи человека с использованием магнитной сепарации: ($P=0.95$, $n=5$, ω – степень подавления ионизации компонентами матрицы, γ – степень извлечения)

Соединение	ω , %	γ , %
S-4	1	97
S-24	2	98
L-165.041	4	95
LGD2226	1	98
GW0742	2	97
GW501516	5	96

В табл. 5 приведены аналитические характеристики твердофазной экстракции на магнитных частицах. Как видно из табл. 5 для всех определяемых соединений наблюдали низкое подавление ионизации матрицей. Это свидетельствует об устранении мешающего

влияния интерферирующих компонентов матрицы, подавляющих ионизацию определяемых соединений. Предложенный подход может стать альтернативой жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракциям в сочетании с подтверждающими методами анализа. Таким образом, был предложен подход достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсным методом ВЭЖХ-МС/МС на основе снижения подавления ионизации компонентами матрицы с использованием твердофазной экстракции с магнитными частицами.

Выводы

1. Разработана новая методология хромато-масс-спектрометрического скрининга широкого спектра физиологически активных веществ, обеспечивающая их быстрое определение на основе точного измерения m/z протонированных молекул и фрагментных ионов на уровне 2 ppm в сложных по составу смесях. В основе лежат предложенные решения снижения матричного эффекта при использовании метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования в сочетании как с химической ионизацией, индуцированной электрораспылением, так и химической и фотохимической ионизацией при атмосферном давлении.
2. Обоснован выбор пути достижения комплементарности новой методологии скрининга с референсными методами анализа на основе оценки выхода реакции дериватизации и способа снижения подавления ионизации компонентами матрицы для высокоэффективной жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с использованием твердофазной экстракции с магнитными частицами.
3. Установлена причина и роль матричного эффекта, обусловленного преимущественным накоплением ионов мешающих компонентов матрицы в орбитальной ионной ловушке, препятствующего обнаружению физиологически активных веществ в сложных по составу смесях методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой в режиме полного сканирования.
4. Созданы подходы значительного снижения матричных эффектов (до 5-12%), основанные как на селективной ионизации физиологически активных веществ с использованием химической и фотохимической ионизации при атмосферном давлении, так и на подавлении ионизации мешающих компонентов матрицы с использованием химической ионизации, индуцированной электрораспылением, при определении физиологически активных веществ с высоким сродством к протону.
5. С использованием предложенных подходов снижения матричных эффектов разработаны и апробированы три быстрых способа скрининга (длительность анализа не более 30 минут) физиологически активных веществ в моче на основе измерения m/z на уровне 2 ppm в режиме полного сканирования:
 - а. - термостабильных стероидов и N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов с пределом обнаружения 0.05 – 0.1 нг/мл при использовании химической ионизации при атмосферном давлении
 - б. - стероидов с пределом обнаружения 0.5 – 2 нг/мл при использовании фотохимической ионизации при атмосферном давлении.
 - с. - стероидов, бензотиодиазинов, N-алкил-β-гидрокси-арилоксипропиламинов, катехоламинов, фенилалкиламинов, (β-гидроксифенилэтил) аминов, производных бензамида с пределом обнаружения 0.2 – 250 нг/мл при использовании химической ионизации, индуцированной электрораспылением.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. **Virus E.D.**, Sobolevsky T.G, Rodchenkov G.M. Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control // *J Mass Spectrom.* – 2008. - 43(7). – P. 949-57.
2. **Virus E.D.**, Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M. 'Wrong-way-round ionization' and screening for doping substances in human urine by high-performance liquid chromatography/orbitrap mass spectrometry // *J Mass Spectrom.* – 2012. - 47(3). – P. 381-391.
3. **Virus E.D.**, Luzyanin B.P., Ivanov A.V., Kubatiev. High-performance liquid chromatography on a porous graphitized carbon column coupled to an orbitrap mass spectrometer with atmospheric pressure photoionization for screening exogenous steroids in human urine // *Rapid communications in Mass Spectrometry.* – 2015. - 29(19). – P. 1779-1788.
4. **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Определение ультрамалых количеств β -гидрокси-4-хлордегидрометилтестостерона в моче методом ВЭЖХ/Масс-спектрометрии с орбитальной ионной ловушкой в условиях электрораспылительной ионизации // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* – 2008. - 74 (7). - С. 17-21.
5. **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с фотоионизацией при атмосферном давлении для детектирования ультрамалых количеств анаболических стероидов // *Масс-спектрометрия.* – 2007. - 4 (4). - С. 275-282.
6. **Вирюс Э.Д.**, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Обнаружение оксандролонa и его метаболита в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ловушкой с химической ионизацией при атмосферном давлении после прекращения его приема // *Журнал Аналитической Химии.* – 2009. - 64(1). – С. 31-35 / **Viryus E.D**, Sobolevskii T.G., Rodchenkov G.M. Detection of oxandrolone and its metabolite in urine by high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization and orbitrap detection after ceasing drug administration. *Journal of Analytical Chemistry*, 2009; 64(1): 31–35. <https://doi.org/10.1134/S1061934809010079>.
7. Семенистая Е.Н., **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения для определения сульфатов и глюкуронидов эндогенных стероидов в биожидкостях // *Журнал Физической Химии.* – 2009. – 83 (4). – С. 625-632 / Semenistaya E.N., **Virus E.D.**, Rodchenkov G. M. Determination of sulfates and glucuronides of endogenic steroids in biofluids by high-performance liquid chromatography/orbitrap mass spectrometry. *Russian Journal of Physical Chemistry*, 2009; 83(4): 530–536. <https://doi.org/10.1134/S0036024409040037>.
8. Семенистая Е.Н., **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Изучение фрагментации глюкуронида тестостерона и сульфата тестостерона при индуцированной соударениями диссоциации в источнике ионов и в ионной ловушке методами масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемной масс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия.* – 2008. - 5 (2). - С. 103-110.
9. **Вирюс Э.Д.**, В.Ф. Сизой, М.А. Дикунец, Г.М. Родченков Определение ультрамалых количеств 3'-гидроксистераноэнолола методом газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии // *Судебно-медицинская экспертиза.* – 2007. - 50(1). – С.27-31.

10. **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Высококочувствительное и специфичное определение 17 α -метил-5 β -андростан-3 α ,17 β -диол методом газовой хроматографии/тройной масс-спектрометрии // Журнал Физической Химии. – 2007. - 81(3). - С. 493–498. / **Viryus E.D.**, Rodchenkov G. M. Highly sensitive, specific determination of 17 α -methyl-5 β -androstane-3 α ,17 β -diol by gas chromatography coupled to triple mass spectrometry. *Russian Journal of Physical Chemistry*, 2007; 81(3): 415–420. <https://doi.org/10.1134/S0036024407030211>
11. Семенистая Е. Н., Дикунец М. А., **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Определение экземестана и 17-гидроэкеместана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и масс-спектрометрией высокого разрешения // Журнал Аналитической Химии. – 2010. - 65(5). – С. 498–506. / Semenistaya E.N., Dikunets M.A., **Viryus E.D.**, Rodchenkov G.M. Determination of exemestane and 17-hydroxyexemestane by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 2010; 65(5): 498–506. <https://doi.org/10.1134/S1061934810050114>.
12. Дикунец М. А., **Вирюс Э.Д.**, Семенистая Е.Н., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Масс-спектрометрия допинговых препаратов нового поколения: агонисты дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом // Журнал Аналитической Химии. – 2010. - 65(13). – С. 1411–1419. / Dikunets M.A., **Virus E.D.**, Semenistaya E.N., Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M. Mass spectrometry of doping preparations of a new generation: Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Journal of Analytical Chemistry*, 2010; 65(13). 1411–1419. <https://doi.org/10.1134/S1061934810130162>.
13. Sobolevsky T, Dikunets M, Sukhanova I, **Virus E.**, Rodchenkov G. Detection of PPAR δ agonists GW1516 and GW0742 and their metabolites in human urine. // *Drug Test Anal.* – 2012. - 4(10). – P.754–760.
14. Самохин А.С., Ревельский А.И., **Вирюс Э.Д.**, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М., Чепелянский Д.А., Ревельский А.И. Новый подход к определению степени дериватизации и его применение для изучения реакции силилирования нанограммовых/микрограммовых количеств метилтестостерона // Журнал Аналитической Химии. – 2011. - 66(12). – С. 1186–1189. / Samokhin A.S., Revel'skii A.I., **Viryus E.D.**, Sobolevskii T.G., Rodchenkov G.M., Chepelyanskii D.A., Revel'skii I.A. *Journal of Analytical Chemistry*, 2011; 66(12), 1186–1189. <https://doi.org/10.1134/S1061934811120082>
15. Самохин А.С., Перевозчикова Д.В., Ревельский А.И., **Вирюс Э.Д.**, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М., Ревельский И.А. Улучшенный подход к определению степени дериватизации и его применение для изучения реакции силилирования ряда анаболических стероидов // Масс-спектрометрия. - 2013. - 10 (1). - С. 25–30. / Samokhin A.S., Perevozchikova D.V., Revelsky A. I., **Virus E.D.**, Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M., Revelsky I.A. *Journal of Analytical Chemistry*, 2013; 68(13), 1195–1199. <https://doi.org/10.1134/S1061934813140104>.
16. Суханова И.И., Дикунец М.А., **Вирюс Э.Д.**, Родченков Г.М. Магнитная сепарация как новый метод для экстракции низкомолекулярных соединений из биологических жидкостей // Журнал Аналитической Химии. - 2011. – 66(9). - С. 807–814. / Sukhanova I.I., Dikunets M.A., **Viryus E.D.**, Rodchenkov G.M. *Journal of Analytical Chemistry*, 2011; 66(9), 807–814. <https://doi.org/10.1134/S1061934811090164>
17. Суханова И.И., Дикунец М.А., **Вирюс Э.Д.**, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Магнитная сепарация как альтернативный способ экстракции допинговых препаратов

- новых классов из мочи человека // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2012. – 12(2). - С. 283-294.
18. Суханова И., Дикунец М., Родченков Г., Соболевский Т., **Вирус Э.Д.** Нанотехнологии в допинговом контроле: перспективы применения магнитной сепарации для пробоподготовки // Аналитика. - 2012. – 2(1). - С. 18-23.
19. **Вирус Э.Д.**, Дикунец М., Соболевский Т., Родченков Г. Многокомпонентный скрининг допинговых препаратов методами жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии // Аналитика. - 2012. – 3(2). - С. 28-37.
20. **Вирус Э.Д.**, Иванов А.В., Лузянин Б.П., Пальцын А.А. Масс-спектрометрия в биологии и в медицине XXI века // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2013. - № 4. - С. 68-75.
21. **Вирус Э.Д.**, Иванов А.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Хроматомасс-спектрометрия запрещенных в спорте физиологически активных веществ: скрининг широкого круга соединений и их метаболитов // Масс-спектрометрия. - 2017. – 14(3). - С. 149-175.
22. Патент РФ 2473079. Способ обнаружения комплекса ксенобиотиков в биологической жидкости при допинговом контроле и устройство для его осуществления / **Вирус Э.Д.**, Родченков Г.М., Соболевский Т.Г.; Заявл. 16.08.2011, Оpubл. 20.01.2013. Бюл. № 2
23. Патент РФ 2483309. Способ обнаружения экзогенных стероидов в биологической жидкости человека / **Вирус Э.Д.**, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М.; Заявл. 05.03.2012, Оpubл. 27.05.2013. Бюл. № 15
24. Патент РФ 2478207. Способ ретроспективного обнаружения ксенобиотиков при допинговом контроле спортсменов **Вирус Э.Д.**, Соболевский Т.Г., Родченков Г.М.; Заявл. 16.08.2011, Оpubл. 27.03.2013. Бюл. № 9.