

УДК 543.5

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА НАНДРОЛОНА В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ/МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

П. Г. ШАГОЙКО¹⁾, А. А. АГАБАЛАЕВ¹⁾, О. Н. ЧЕХОВСКАЯ¹⁾,
Ю. Г. ПОХОДНЯ¹⁾, С. А. БЕЛЯЕВ¹⁾, С. М. ЛЕЩЕВ²⁾

¹⁾Национальная антидопинговая лаборатория,
агргородок Лесной, 31, 223040, Минский район, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Нандролон – андрогенный анаболический стероид, применение которого в спорте запрещено Всемирным антидопинговым агентством. В Национальной антидопинговой лаборатории разработан метод количественного определения в моче человека основного метаболита нандролон – 19-норандростерона – с использованием газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 7000. Проводили пробоподготовку образцов мочи с помощью ферментативного гидролиза, жидкость-жидкостную экстракцию пентаном с последующей дериватизацией MSTFA. В качестве внутреннего стандарта применялся D4-19-норандростерон. Общее время одного анализа составило 16 мин, нижний предел количественного определения – 1 нг/мл. Калибровочные образцы получены при смешении мочи, заведомо не содержащей определяемый аналит, с 19-норандростероном в диапазоне концентраций 1–30 нг/мл, коэффициент детерминации R^2 был больше 0,99. Метод проверен на соответствие валидационным критериям по параметрам селективности, линейности,

Образец цитирования:

Шагойко ПГ, Агабалаев АА, Чеховская ОН, Походня ЮГ, Беляев СА, Лещев СМ. Количественное определение основного метаболита нандролон в моче человека методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия.* 2019; 1:78–85.

<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2019-1-78-85>

For citation:

Shahoika PG, Ahabalaye AA, Tchekhovskaya ON, Pakhadnia YG, Beliaev SA, Leschev SM. Quantitative determination of major nandrolone metabolite in human urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry.* 2019;1:78–85. Russian.

<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2019-1-78-85>

Авторы:

Павел Георгиевич Шагойко – химик отдела антидопинговых испытаний.

Александр Андреевич Агабалаев – кандидат химических наук; ведущий химик отдела антидопинговых испытаний.

Ольга Николаевна Чеховская – химик отдела антидопинговых испытаний.

Юрий Георгиевич Походня – кандидат биологических наук, доцент; начальник отдела антидопинговых испытаний.

Сергей Александрович Беляев – директор.

Сергей Михайлович Лещев – доктор химических наук, профессор; профессор кафедры аналитической химии химического факультета.

Authors:

Pavel G. Shahoika, chemist at the anti-doping testing department.

pavel11sg@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0002-0087-4942>

Aliaksandr A. Ahabalaye, PhD (chemistry); leading chemist at the anti-doping testing department.

aa@antidoping.by

<http://orcid.org/0000-0003-3201-3511>

Olga N. Tchekhovskaya, chemist at the anti-doping testing department.

grinko@antidoping.by

<http://orcid.org/0000-0002-8293-5840>

Yury G. Pakhadnia, PhD (biology), docent; head of the anti-doping testing department.

pohodnia@list.ru

<http://orcid.org/0000-0002-7972-7784>

Sergey A. Beliaev, director.

beliaev@antidoping.by

<http://orcid.org/0000-0002-4412-713X>

Sergey M. Leschev, doctor of science (chemistry), full professor; professor at the department of analytical chemistry, faculty of chemistry.

leschev.sergey54@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0001-5378-1718>

повторяемости и правильности, степени влияния матрицы, стабильности анализируемых образцов и робастности. Кроме того, оценена неопределенность полученных результатов. Таким образом, предложенная методика позволяет проводить количественное определение порогового соединения 19-норандростерона и соответствует требованиям технических документов Всемирного антидопингового агентства.

Ключевые слова: 19-норандростерон; нандролон; газовая хроматография; масс-спектрометрия; допинг-контроль; андрогенный анаболический стероид; количественное определение.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF MAJOR NANDROLONE METABOLITE IN HUMAN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

*P. G. SHAHOIKA^a, A. A. AHABALAYEU^a, O. N. TCHEKHOVSKAYA^a,
Y. G. PAKHADNIA^a, S. A. BELIAEV^a, S. M. LESCHEV^b*

^aNational Anti-Doping Laboratory, 31 Liasny, Minsk region 223040, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: P. G. Shahoika (pavel11sg@gmail.com)

Nandrolone is an anabolic androgenic steroid. The use of this substance is prohibited by World Anti-Doping Agency (WADA). In National Anti-Doping Laboratory, we have developed method for quantitative determination of major nandrolone metabolite – 19-norandrosterone in human urine by GC/MS technique (Agilent 7000). Proposed method includes sample preparation of urine samples with enzymatic hydrolysis, liquid-liquid extraction followed by derivatization step with MSTFA. Deuterated 19-norandrosterone has been used as internal standard. Total run time comprised 16 min. Lower limit of quantitation accounted for 1 ng/mL. Spiked urine samples were prepared by mixing blank urine with standard solutions of 19-norandrosterone in range 1–30 ng/mL, correlation coefficient larger than 0.99. Method was verified to following validation parameters: selectivity, linearity, repeatability, accuracy, matrix effect, stability and robustness. Furthermore, measurement uncertainty was estimated. Thus, proposed method is able to detect threshold 19-norandrosterone in human urine and carry out its quantitation conforming WADA requirements.

Key words: 19-norandrosterone; nandrolone; gas chromatography; mass spectrometry; doping-control; androgenic anabolic steroid; quantitative determination.

Введение

Нандролон (19-нортестостерон) является синтетическим анаболическим стероидом, который имеет структуру, схожую с тестостероном, однако в отличие от последнего обладает более сильным анаболическим эффектом и умеренным андрогенным благодаря тому, что в его структуре отсутствует метильная группа в положении 19 (рис. 1). Первоначально 19-нортестостерон был синтезирован в 1950 г. [1]. Ввиду выраженных анаболических свойств, способствующих увеличению мышечной массы, а также силы и выносливости, нандролон широко использовался среди спортсменов для достижения более высоких результатов. Установлено, что после приема препаратов нандролона первоначальный стероид практически полностью метаболизируется и выводится с мочой в виде глюкуронида либо сульфата. Основными метаболитами фазы I при этом являются 19-норандростерон (19NA), 19-норэтиохоланолон и 19-норэпиандростерон [2]. Учитывая побочные эффекты анаболика, его токсичность, а также этические аспекты употребления, в 2010 г. Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) препарат был внесен в запрещенный список. Так как в организме данный стероид практически полностью метаболизируется, факт злоупотребления нандролоном устанавливают по присутствию в моче его основного метаболита – 19NA. В соответствии с требованиями технических документов ВАДА антидопинговые лаборатории должны определять содержание 19NA в диапазоне от 1 до не менее 15 нг/мл в моче при испытаниях, включающих один калибровочный образец с концентрацией 19NA 15 нг/мл [3; 4].

Нандролон – наиболее часто детектируемый андрогенный анаболический стероид (ААС), он стабильно занимает второе место в группе после станозолола по числу положительных допинг-проб. Согласно данным ВАДА, в 2017 г. на долю ААС приходилось 44 % (1813 положительных проб) всех неблагоприятных результатов анализа, в том числе 205 положительных проб по 19NA. Приведенные данные демонстрируют высокий процент использования спортсменами в качестве допинга нандролона. Поэтому вопрос выявления его метаболита в моче остается довольно актуальным [5].

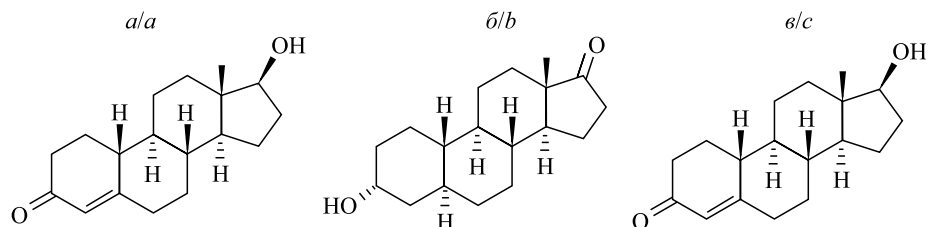


Рис. 1. Структурные формулы нандролона (а), 19-норандростерона (б) и тестостерона (в)

Fig. 1. Chemical structures of nandrolone (a), 19-norandrosterone (b) and testosterone (c)

Проблеме определения 19NA в моче человека посвящен ряд работ, в которых используется как газовая, так и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ(ЖХ)-МС) [6–8]. Общая особенность многих описанных в литературе методов – применение в процессе подготовки проб стадии твердофазной экстракции. Однако данный способ пробоподготовки является более сложным, дорогостоящим, а иногда и более длительным. Часто применяют многократную экстракцию органическими растворителями в целях извлечения больших количеств вещества, что также усложняет и увеличивает процедуру пробоподготовки.

С учетом того что технический документ ВАДА предписывает проводить испытания, включающие один калибровочный образец с концентрацией 19NA 15 нг/мл [4], цель настоящей работы – разработка методики количественного определения и расчет правильности и повторяемости при испытаниях с использованием одного калибровочного образца с концентрацией 19NA 15 нг/мл.

Материалы и методы

Стандартные образцы: 19-норандростерон, d₄-19-норандростерон (D4-19NA) производства *National Measurement Institute* (США).

Вещества и реактивы: ацетон «ч. д. а.» (Россия), вода деионизированная MilliQ (тип 1), гелий газообразный очищенный марки «А», азот (чистота не менее 99,9 %); фермент β-глюкуронидаза из *E. coli* (*Roche Diagnostics*, Германия); натрия дигидрофосфат (чистота больше 99,5 %) (*Sigma-Aldrich*, Германия), калия гидрокарбонат (чистота больше 99 %) (*Fluka*, Германия); динатрия гидрофосфат (чистота больше 98 %) (*Sigma-Aldrich*, Германия), калия карбонат (чистота больше 99 %) (*Sigma-Aldrich*, Германия), метанол (чистота больше 99,8 %) (*Fisher Scientific*, Германия), пентан (чистота не меньше 99 %) (*Fisher Scientific*, Германия), дитиотреитол (чистота больше 99 %) (*Sigma-Aldrich*, Германия), аммония иодид (*Sigma-Aldrich*, Германия); сульфат натрия (чистота не меньше 99 %) (*Sigma-Aldrich*, Германия), МСТФА (N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамид, чистота не меньше 97 %) (*Carl Roth*, Германия).

Стандартные растворы анализируемых соединений готовились путем растворения стандартного образца (19NA и D4-19NA) в необходимом количестве метанола (1 мг/мл); последовательным разбавлением метанолом готовились рабочие растворы 19NA с концентрациями 3000; 2500; 2000; 1500; 1300; 1000; 700; 500; 400; 200; 180; 140; 100; 80; 50 нг/мл и рабочий раствор D4-19NA (внутренний стандарт) с концентрацией 1000 нг/мл. Все образцы хранились при –20 °С.

Биологический материал. Образцы мочи, используемые для валидационных испытаний, собраны у добровольцев разного возраста и пола, не принимавших медицинские препараты и проинструктированных о недопустимости употребления каких-либо биологически активных добавок или стероидов, которые могли бы повлиять на метаболизм и стероидный профиль. Пробы хранились в полипропиленовых пробирках при –20 °С.

Калибровочные образцы готовились путем смешения холостой мочи, заведомо не содержащей определяемое соединение, с рабочими растворами 19NA соответствующей концентрации. Например, для приготовления раствора мочи с концентрацией 19NA 15 нг/мл было взято 2,94 мл мочи, к которой последовательно прибавили 30 мкл рабочего раствора 19NA с концентрацией 1500 нг/мл и 30 мкл раствора внутреннего стандарта D4-19NA с концентрацией 1000 нг/мл.

Пробоподготовка. К аликвоте мочи объемом 2,97 мл добавляли 30 мкл раствора внутреннего стандарта D4-19NA с концентрацией 1000 нг/мл, 1 мл фосфатного буферного раствора (рН 6,3), 30 мкл фермента β-глюкуронидазы. Далее образец тщательно перемешивали и оставляли на водяной бане при 56 °С в течение 70 мин. После гидролиза раствор охлаждали, добавляли 1 г Na₂SO₄, 1 мл карбонатного буферного раствора (рН 9,5) и 5 мл пентана. Экстракцию проводили на ротационном миксере в течение 10 мин. После центрифугирования органический слой отделяли и высушивали досуха при 40 °С в токе азота. К сухому остатку добавляли 30 мкл смеси МСТФА аммония иодида и дитиотреитола (2000 : 4 : 3) (объем/масса/масса) и дериватизировали при 70 °С в течение 20 мин. Далее дериватизированные экстракты переносили в виалы для анализа ГХ-МС/МС.

Оборудование и условия. Инструментальный анализ проводился на газовом хроматографе Agilent 7890 (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» Agilent 7000 (Agilent Technologies, США) и газовом хроматографе TRACE 1310 (Thermo Fisher Scientific, США) с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» TSQ 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Газохроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке Ultra-1 (Agilent) длиной 17 м и с внутренним диаметром 0,20 мм, в качестве неподвижной фазы применяли 100 % диметилполисилоксан толщиной 0,11 мкм. Температурный режим представлен в табл. 1.

Таблица 1

Температурный режим колонки

Table 1

Column temperature mode

№ п/п	Скорость изменения температуры, °С/мин	Температура, °С	Время поддержания достигнутой температуры, мин
1	–	179	0
2	4	220	0
3	20	310	1

Режим ввода пробы (2 мкл) – с делением потока 1 : 20. Температура испарителя и линии переноса пробы 300 °С. Скорость потока гелия (газ-носитель) поддерживалась на уровне 1,65 мл/мин. Температура ионного объема установлена на 250 °С с энергией ионизации 70 эВ и газом вторичной ионизации азотом. Детектирование ионов проводилось в режиме мониторинга множественных реакций (MRM mode). Перечень ионов представлен в табл. 2. Управление системой ГХ-МС/МС и обработка результатов осуществлялись с использованием программного обеспечения *MassHunter*.

Таблица 2

Режим детектирования ионов

Table 2

Ion detection mode

Определяемое вещество	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия вторичной ионизации, эВ
бис-ТМС-d ₄ -19-норандростерон (внутренний стандарт)	409,3	229,2	15
бис-ТМС-19-норандростерон	405,3	225,2	15
	405,3	315,3	10

Общее время анализа одного закола составило 16 мин. Время удерживания 19NA и D4-19NA – 8,82 и 8,80 мин соответственно. Количественное определение проводилось по соотношению площадей целевого анализа и внутреннего стандарта.

Валидация метода. Нижний предел количественного определения (НПКО). В рамках данной работы был определен НПКО с использованием семи образцов мочи с концентрациями стандартного образца 19NA 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 1,8; 2,0 и 5,0 нг/мл.

Селективность оценена по отношению к мешающим пикам в образцах, приготовленных из алиquot мочи шести добровольцев.

Линейность калибровочной кривой проверена в диапазоне концентраций 1–30 нг/мл, рассчитан коэффициент корреляции.

Повторяемость и правильность определялись на четырех уровнях концентрации: 1; 2; 10 и 15 нг/мл. При этом повторяемость оценивалась по коэффициенту вариации, правильность – как отношение полученных значений концентраций 19NA к предписанным (в процентах). Рассчитана **неопределенность** результатов на тех же уровнях концентрации: 1; 2; 10 и 15 нг/мл. Для этого в течение трех дней тремя химиками были приготовлены по 10 растворов на каждом уровне концентрации (всего 120 растворов). Оценены **степень экстракции** целевого вещества в ходе подготовки пробы, **влияние матрицы**, **стабильность анализируемых образцов**, **робастность**.

Проведены испытания серий образцов мочи, содержащих 19NA в концентрациях 2,5; 9,0 и 15,0 нг/мл (по 10 образцов в серии), с использованием одного калибровочного образца, рассчитаны правильность и повторяемость полученных данных.

Результаты и их обсуждение

В качестве возможного экстрагента для жидкость-жидкостной экстракции 19NA из мочи рассматривались метилтретбутиловый эфир, дихлорметан и пентан. В процессе разработки методики было установлено, что наибольшей селективностью из перечисленных растворителей обладает пентан (данные не представлены). Далее для системы пентан – насыщенный раствор сульфата натрия была оценена константа распределения и степень экстракции 19NA. Оказалось, что среднее значение константы распределения превышает 20, следовательно, степень экстракции 19NA из насыщенного раствора сульфата натрия в пентан с учетом соотношения фаз 1 : 1 составляет более 95 %, что вполне достаточно для целей анализа.

Для определения НПКО было приготовлено семь образцов мочи с концентрациями 19NA в них 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 1,8; 2,0 и 5,0 нг/мл. Пробоподготовка была проведена, как описано выше. Образцы проанализированы в условиях повторяемости. НПКО рассчитан по формуле

$$\text{НПКО} = 10 \frac{s_0}{a},$$

где a – тангенс угла наклона прямой вида $y = b + ax$, найденной по методу наименьших квадратов; s_0 – стандартное отклонение экспериментально найденных значений от значений, определенных по модели указанной прямой:

$$s_0 = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} - \left(\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n} \right)^2 \left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right)^{-1}}{n-2}},$$

здесь n – количество проведенных измерений; x_i – предписанное значение i -й концентрации 19NA в моче, нг/мл; y_i – экспериментально найденное значение отношения площади пика 19NA по переходу 405,3 → 225,2 к площади пика D4-19NA того же образца для i -й концентрации 19NA в моче.

Рассчитанное значение НПКО составило 1,0 нг/мл.

Для того чтобы подтвердить селективность метода, было приготовлено шесть растворов, заведомо не содержащих 19NA, и раствор 19NA с концентрацией 1 нг/мл. На хроматограммах испытуемых растворов, не содержащих 19NA, на участке $\pm 0,1$ мин от времени удерживания должны отсутствовать пики со значениями площади мешающего пика по отношению к площади пика для раствора 19NA с концентрацией 1 нг/мл более 25 %. На полученных хроматограммах холостых растворов площади мешающих пиков не превысили 3 % (рис. 2).

Для проверки линейности приготовлено 10 растворов с диапазоном концентраций 1–30 нг/мл. Уравнение регрессии $Y = 0,1236C_{19NA}$. Свободный член прямой определен как незначимый по критерию Стьюдента. Коэффициент детерминации R^2 при этом составил 0,993.

Повторяемость оценивалась путем расчета коэффициента вариации CV для концентраций 1; 2; 10 и 15 нг/мл, для каждой из которых было приготовлено по 10 растворов.

Выражение комбинированной стандартной неопределенности $u_c(c)$, соответствующей значению c концентрации 19NA в моче, имеет вид

$$u_c(c) = \sqrt{s_w^2 + u^2(B)},$$

где s_w – стандартное отклонение, определенное при анализе образцов:

$$s_w = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n \sum_{l=1}^t (c_{i,l,k} - \bar{c}_i)^2}{n(t-1)}},$$

здесь n – количество полученных значений для i -й концентрации; t – число задействованных химиков; $\bar{c}_{i,l,k}$ – значение концентрации i -го уровня для данного повтора k , полученное оператором l ; \bar{c}_i – среднее значение для i -й концентрации;

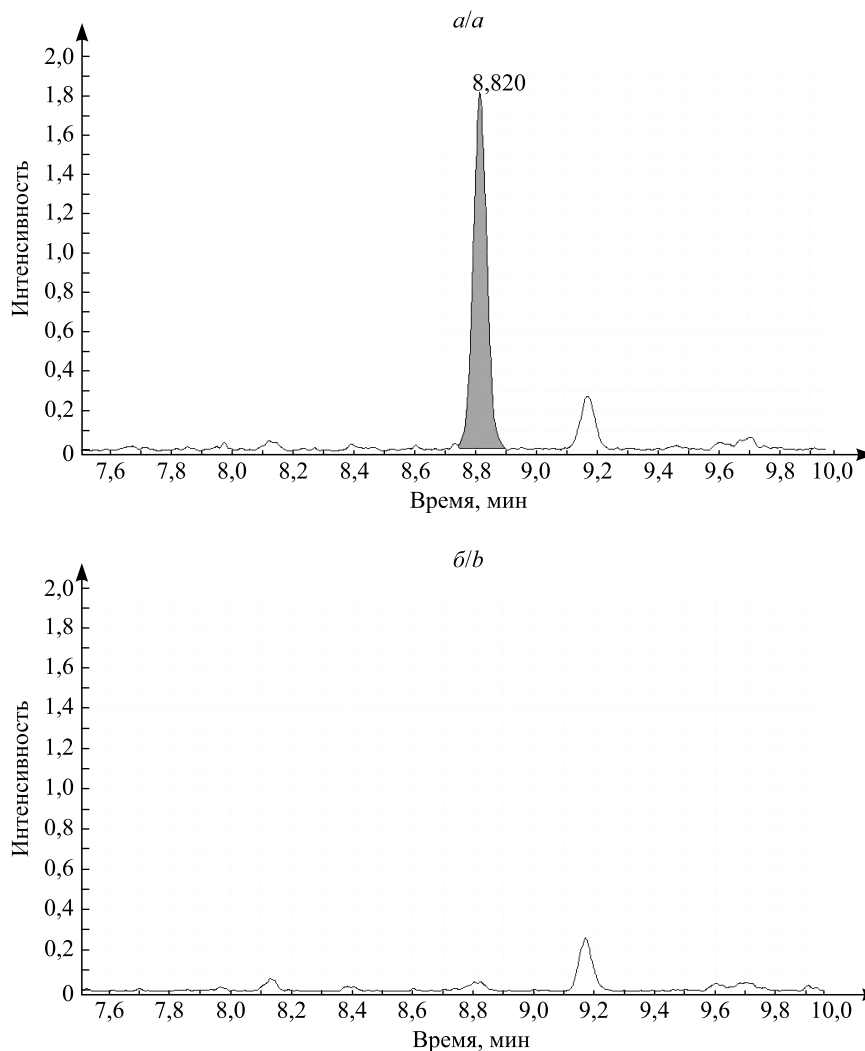


Рис. 2. Типичные хроматограммы образца мочи с концентрацией 19NA 1 нг/мл (а) и холостого образца (б)
Fig. 2. Typical chromatograms of urine samples with 19NA concentration of 1 ng/mL (a) and blank urine sample (b)

$u(B)$ – неопределенность смещения:

$$u(B) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u_{ref}^2 + \left(\frac{S_{bias}}{\sqrt{n}}\right)^2},$$

здесь RMS_{bias}^2 – средняя сумма квадратов отклонений от истинного значения:

$$RMS_{bias}^2 = \frac{\sum (bias_k)^2}{n},$$

$bias_k$ – отклонение k -го результата измерения c_k от предписанного значения c_0 , n – объем объединенной выборки для каждого значения концентрации 19NA в моче; u_{ref}^2 – стандартная неопределенность предписанной концентрации 19NA в растворах; $\frac{S_{bias}}{\sqrt{n}}$ – стандартное отклонение среднего значения $bias$.

При нахождении величины u_{ref}^2 использовался подход, отражающий все этапы приготовления растворов для исследования неопределенности (разбавление и аликвотирование). Общий вид данной модели:

$$C = f(m, V),$$

где C – конечная концентрация 19NA в образцах мочи; m – масса стандартного образца; V – объем растворителя (метанол, вода).

Рассчитанные значения повторяемости, правильности и неопределенности для концентрации 19NA на уровне 1; 2; 10 и 15 нг/мл приведены в табл. 3.

Таблица 3

**Полученные данные по повторяемости, правильности
и неопределенности метода при использовании калибровочной кривой**

Table 3

**Repeatability, trueness and uncertainty
of the method obtained with calibration curve**

Концентрация 19NA, нг/мл	Повторяемость CV, %	Правильность, %	Неопределенность, %
1	2,8	2,8	5,7
2	2,1	2,2	7,8
10	2,5	1,6	6,7
15	3,0	4,9	9,3

Степень экстракции составила 97,0 % при CV = 7,1 %. Эффект матрицы не превысил 2 %.

Стабильность анализируемых образцов – 4 сут хранения в лотке автосамплера и 9 сут хранения в холодильнике (от +2 до +8 °С).

Робастность методики установлена относительно разных специалистов, проводящих испытания, и хромато-масс-спектрометров.

Для серий образцов мочи, содержащих 19NA в концентрациях 2,5; 9,0 и 15,0 нг/мл (по 10 образцов в серии), выполнены испытания с использованием одного калибровочного образца (табл. 4).

Таблица 4

**Полученные данные по повторяемости
и правильности метода при использовании
одного калибровочного образца**

Table 4

**Repeatability and trueness of the method
obtained with one calibration point**

Концентрация 19NA, нг/мл	Повторяемость CV, %	Правильность, %
2,5	4,2	16,4
9,0	3,5	11,9
15,0	2,2	7,8

Как следует из табл. 3 и 4, при использовании одного калибровочного образца в соответствии с [4] и повторяемость, и правильность хуже, чем при использовании калибровочной кривой (применялись 10 калибровочных образцов с концентрацией 19NA в диапазоне 1–30 нг/мл). Тем не менее показанная точность полуколичественного определения позволяет принять решение о превышении пороговых концентраций 19NA и необходимости дополнительных исследований образца согласно техническому документу ВАДА [4].

Заключение

Методика количественного определения 19NA в антидопинговой лаборатории разработана впервые. Она включает простую и экспрессную пробоподготовку с использованием одностадийной жидкость-жидкостной экстракции и чувствительный, селективный анализ на газовом хроматографе с масс-детектором типа «тройной квадруполь». Оценены селективность, линейность, правильность, повторяемость, эффект матрицы, степень экстракции, робастность методики. НПКО для 19NA составил 1 нг/мл, неопределенность полученных результатов – менее 10 %.

Таким образом, разработанный метод оказался пригодным для определения концентрации основного метаболита нандролон – 19-норандростерона – в соответствии с требованиями технического документа ВАДА и может использоваться в лабораториях для рутинного мониторинга нелегального применения анаболических стероидов.

Библиографические ссылки

1. Bizec BLe, Monteau F, Gaudin I. Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [Internet]. 1999 February 19 [cited 2018 August 28];723:157–172. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080643>.
2. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1996 July [cited 2018 October 24]; 42(7):1001–1020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674183>.
3. WADA Technical Document – TD2018MRPL. *Technical Document for minimum required performance levels* [Internet]. 2018 January 1 [cited 2018 March 19]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2018mrpl-0>.
4. WADA Technical Document – TD2017NA. *Technical Document for the harmonization of analysis and reporting of 19-Norsteroids related to nandrolone* [Internet]. 2017 September 1 [cited 2018 March 30]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2017na>.
5. 2017 Anti-Doping Testing Figures [Internet]. 2018 July 13 [cited 2018 November 14]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/anti-doping-testing-figures-report>.
6. Dehennin L, Bonnaire Y, Plou Ph. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences of Applications* [Internet]. 1999 January [cited 2018 February 5];721:301–307. Available from: <http://www.biomedsearch.com/nih/Urinary-excretion-19-norandrosterone-endogenous/10052703.html>.
7. Buiarelli Fr, Giannetti L, Jasionowska R. Determination of nandrolone metabolites in human urine: comparison between liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010;24:1881–1894. DOI: 10.1002/rcm.4583.
8. Strahm E, Baume N, Mangin P, Saugy M, Ayotte C, Saudan C. Profiling of 19-norandrosterone sulfate and glucuronide in human urine: Implications in athlete's drug testing. *Steroids*. 2009;74:359–364. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.11.005.

References

1. Bizec BLe, Monteau F, Gaudin I. Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [Internet]. 1999 February 19 [cited 2018 August 28];723:157–172. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080643>.
2. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1996 July [cited 2018 October 24]; 42(7):1001–1020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674183>.
3. WADA Technical Document – TD2018MRPL. *Technical Document for minimum required performance levels* [Internet]. 2018 January 1 [cited 2018 March 19]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2018mrpl-0>.
4. WADA Technical Document – TD2017NA. *Technical Document for the harmonization of analysis and reporting of 19-Norsteroids related to nandrolone* [Internet]. 2017 September 1 [cited 2018 March 30]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2017na>.
5. 2017 Anti-Doping Testing Figures [Internet]. 2018 July 13 [cited 2018 November 14]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/anti-doping-testing-figures-report>.
6. Dehennin L, Bonnaire Y, Plou Ph. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences of Applications* [Internet]. 1999 January [cited 2018 February 5];721:301–307. Available from: <http://www.biomedsearch.com/nih/Urinary-excretion-19-norandrosterone-endogenous/10052703.html>.
7. Buiarelli Fr, Giannetti L, Jasionowska R. Determination of nandrolone metabolites in human urine: comparison between liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010;24:1881–1894. DOI: 10.1002/rcm.4583.
8. Strahm E, Baume N, Mangin P, Saugy M, Ayotte C, Saudan C. Profiling of 19-norandrosterone sulfate and glucuronide in human urine: Implications in athlete's drug testing. *Steroids*. 2009;74:359–364. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.11.005.

Статья поступила в редколлегию 18.12.2018.
Received by editorial board 18.12.2018.