

ЭКСТРАКЦИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ
ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИМИ СМЕСЯМИ
ИЗ ГЕКСАНОВЫХ РАСТВОРОВС. М. ЛЕЩЁВ¹⁾, Ю. Г. ПОХОДНЯ²⁾, А. А. АГАБАЛАЕВ³⁾, М. Ф. ЗАЯЦ¹⁾¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь²⁾Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, 31, 223040, Минский район, Беларусь³⁾Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении, пер. Товарищеский, 2а, 220037, г. Минск, Беларусь

При температуре (20 ± 1) °С изучена экстракция ряда анаболических стероидов (1,4-андростадиен-3,17-дион; 17 α -метилтестостерон; 19-норэтиохоланолон; 4-гидрокситестостерон; 4-андростен-3,17-дион; 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол; дегидроэпиандростерон; калустерон; клостебол; метандиенон; метилдиенолон; нандролон; тестостерон; эпитестостерон; тиболон; 19-норандростендион; 1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-он) водно-органическими смесями из гексановых растворов. На основании полученных экспериментальных данных рассчитаны константы распределения анаболических стероидов, которые были использованы для оптимизации стандартной методики пробоподготовки в процессе определения исследуемых соединений в биологически активных добавках к пище и специализированном спортивном питании. Найдено, что наиболее эффективными и селективными экстрагентами из углеводородных растворов являются водно-ацетонитрильные смеси, содержащие от 10 до 20 об. % воды. Разработана экстракционная методика пробоподготовки биологически активных добавок к пище для последующего газохроматографического определения в них анаболических стероидов с использованием масс-спектрометрического детектора типа «тройной квадруполь». Для предложенной методики относительное стандартное отклонение составляет 10–15 %, предел обнаружения – около 10 мкг/кг биологически активных добавок к пище, что позволяет надежно выявлять в них примеси запрещенных анаболических стероидов.

Ключевые слова: анаболические стероиды; биологически активные добавки к пище; экстракция; константы распределения; газовая хромато-масс-спектрометрия.

Образец цитирования:

Лещёв СМ, Походня ЮГ, Агабалаев АА, Заяц МФ. Экстракция анаболических стероидов водно-органическими смесями из гексановых растворов. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия.* 2022;1:31–42. <https://doi.org/10.33581/2520-257X-2022-1-31-42>

For citation:

Leschev SM, Pakhadnia YG, Ahabalayeu AA, Zayats MF. Extraction of anabolic steroids with aqueous-organic mixtures from hexanic solutions. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry.* 2022;1:31–42. Russian. <https://doi.org/10.33581/2520-257X-2022-1-31-42>

Авторы:

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

Юрий Георгиевич Походня – кандидат биологических наук, доцент; директор.

Александр Андреевич Агабалаев – кандидат химических наук; заместитель заведующего лабораторией фармакопейного и фармацевтического анализа.

Михаил Фёдорович Заяц – доктор химических наук, доцент; заведующий кафедрой аналитической химии химического факультета.

Authors:

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>

Yury G. Pakhadnia, PhD (biology), docent; director.
pohodnia@list.ru

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

Aliaksandr A. Ahabalayeu, PhD (chemistry); deputy head of the laboratory of pharmacopoeial and pharmaceutical analysis.
alexandmailbox@inbox.ru

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

Mikhail F. Zayats, doctor of science (chemistry), docent; head of the department of analytical chemistry, faculty of chemistry.
mikhail_zayats@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-8400-6359>

EXTRACTION OF ANABOLIC STEROIDS WITH AQUEOUS-ORGANIC MIXTURES FROM HEXANIC SOLUTIONS

S. M. LESCHEV^a, Y. G. PAKHADNIA^b, A. A. AHABALAYEU^c, M. F. ZAYATS^a

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

^bNational Anti-Doping Laboratory, 31 Liasny, Minsk Region 223040, Belarus

^cCenter for Examinations and Tests in Health Service, 2a Tavaryski Lane, Minsk 220037, Belarus

Corresponding author: M. F. Zayats (mikhail_zayats@tut.by)

The extraction of anabolic steroids (1,4-androstadiene-3,17-dione; 17 α -methyltestosterone; 19-norethiocholanolone; 4-hydroxytestosterone; 4-androstene-3,17-dione; 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol; dehydroepiandrosterone; calusterone; clostebol; methandienone; methylidienolone; nandrolone; testosterone; epitestosterone; tibolone; 19-norandrostenedione; 1-methylene-5 α -androstane-3 α -ol-17-one) by aqueous-organic mixtures from hexane solutions was studied at the temperature (20 \pm 1) °C. Based on the experimental data obtained, the partition ratios of anabolic steroids were calculated, which were used to optimise the standard sample preparation procedure in the process of determining the compounds under study in biologically active dietary supplements and specialised sports nutrition. It was found that the most effective and selective extractants from hydrocarbon solutions are water-acetonitrile mixtures containing from 10 to 20 % by volume of water. An extraction technique has been developed for sample preparation of biologically active dietary supplements for subsequent gas chromatographic determination of anabolic steroids in them using a triple quadrupole mass spectrometric detector. The proposed method is characterised by a standard deviation of 10–15 % and a detection limit about 10 μ g/kg of biologically active dietary supplements, which makes it possible to reliably determine impurities of prohibited anabolic steroids in them.

Keywords: anabolic steroids; biologically active dietary supplements; extraction; partition ratios; gas chromatography-mass spectrometry.

Введение

В последние годы в процессе подготовки спортсменов к соревнованиям значительно возросло использование биологически активных добавок к пище (БАД) и специализированного спортивного питания. Известны случаи ежедневного потребления спортсменами 20–25 различных видов БАДов [1]. Однако было обнаружено, что многие добавки содержат не указанные на этикетках запрещенные вещества, прежде всего анаболические стероиды (АС), вызывающие положительный результат при тестировании спортсмена на применение допинга [2].

Согласно правилам Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) спортсмен несет ответственность за все вещества, обнаруженные в его биологических жидкостях, вне зависимости от природы этих веществ и пути их попадания в организм. В связи с этим для обеспечения спортсменов качественными добавками, не содержащими веществ, запрещенных ВАДА, необходимо контролировать БАДы, поступающие на рынок [3].

В настоящее время наиболее распространенным методом скрининга при допинг-контроле является газовая хроматография в сочетании с детектированием на тройном квадрупольном масс-анализаторе (ГХ-МС/МС).

Наличие в молекулах АС полярных гидроксо- и кетогрупп приводит к затруднениям при газохроматографическом определении АС из-за их недостаточной летучести и недостаточной термической стабильности в условиях ГХ-анализа, а также сорбции на хроматографической колонке [4]. Данную проблему обычно решают путем дериватизации АС с использованием N-метил-N-(триметилсилил)трифтороацетамида (МСТФА) и при этом получают менее полярные и более летучие и термически устойчивые триметилсилильные (ТМС) производные.

МСТФА количественно реагирует с гидроксогруппами, связанными с первичными и вторичными атомами углерода в АС. Если к МСТФА добавить иодид аммония, то получается триметилсилилиодид, который позволяет проводить силилирование по стерически труднодоступной ОН-группе, связанной с третичным атомом углерода. Триметилсилилиодид катализирует енолизацию АС, содержащих кетогруппы, и ускоряет образование ТМС-производных. В этом случае к МСТФА добавляют также такие восстановители, как этантиол и дитиотреитол, для предотвращения образования молекулярного иода [4].

В большинстве случаев процедура анализа БАДа включает экстракцию, очистку экстрактов, дериватизацию и последующее определение ТМС-производных АС при помощи ГХ-МС/МС [5].

В то же время при разработке универсальной методики определения стероидов, запрещенных для использования в БАДах, приходится сталкиваться с рядом трудностей, которые возникают из-за различия в составе встречающихся форм БАДов (экстракты, сухие и жидкие концентраты, капсулы, таблетки, порошки и т. д.). Матричные компоненты в них представлены как гидрофобными (жиры, липиды и др.), так и гидрофильными (сахариды, белки и т. д.) веществами, попадающими в хроматографируемый раствор и затрудняющими определение АС.

Предложенная в работе [6] методика пробоподготовки БАДов, выпускаемых в твердой форме, для выявления в них АС основана на извлечении аналитов из БАДов метанолом, упаривании метанола досуха, переводе аналитов в пентан и их извлечении 95 % метанолом. Затем метанольную фазу выпаривают досуха, аналиты силилируют и определяют методом ГХ-МС.

С помощью данной методики в работах [5; 7–11] был успешно проведен анализ БАДов на содержание АС. В статьях [5; 10; 11] отмечено, что добавление смеси 1-N,N-диизопропиламино-*n*-алканов перед дериватизацией позволяет увеличить площади пиков анализируемых соединений на хроматограммах. В других статьях описаны несколько схожих вариантов проведения анализа БАДов на содержание АС [6–10; 12–15].

Согласно работам [5; 12] описанные методики пробоподготовки БАДов не позволяют получить достоверные результаты в 11–30 % случаев из-за сильного влияния матрицы, отсутствия на хроматограммах пика, соответствующего внутреннему стандарту, невозможности полного выпаривания некоторых экстрактов или плохой дериватизации аналитов. В настоящее время матричные эффекты нельзя предсказать на основе состава добавки, указанного на этикетке.

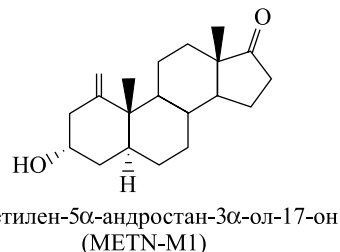
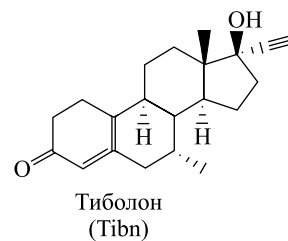
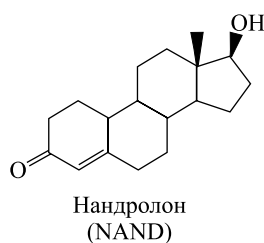
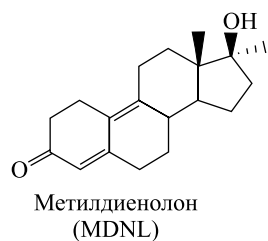
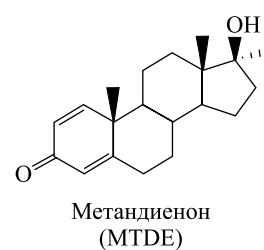
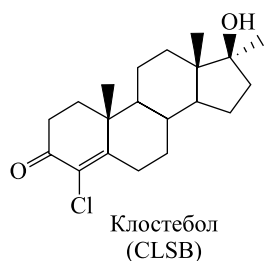
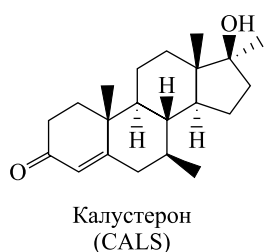
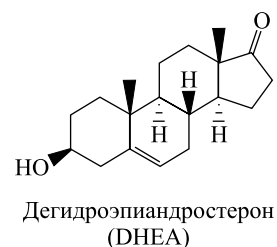
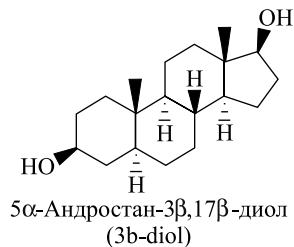
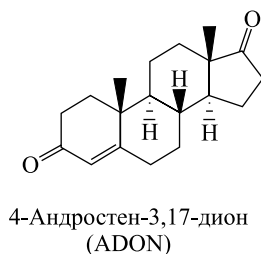
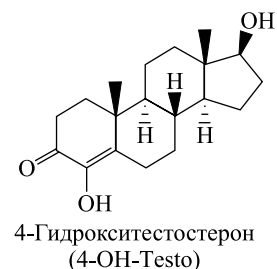
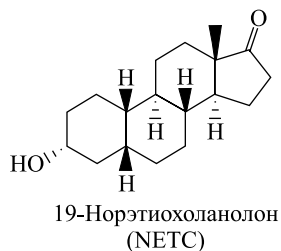
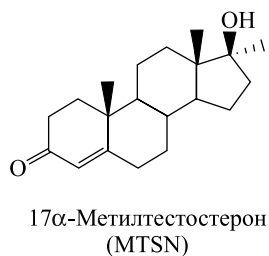
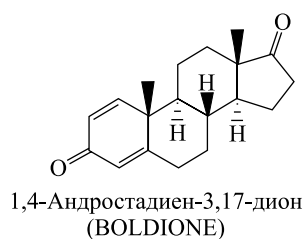
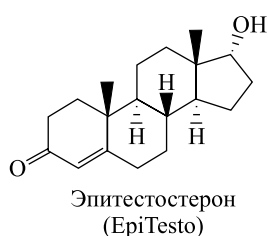
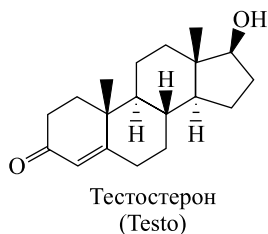
Таким образом, описанные в литературе методики пробоподготовки БАДов для определения в них АС трудоемки и не всегда позволяют получить достоверные результаты из-за сильного влияния матрицы. Более того, все используемые в настоящее время методики являются эмпирическими и не имеют научного обоснования в связи с отсутствием данных по экстракции АС. Определение констант распределения АС в различных экстракционных системах дает возможность предложить оптимизированный, более эффективный вариант пробоподготовки БАДов, который позволит сократить трудозатраты и расход материалов.

Цель данной работы – установить закономерности экстракции ряда АС (1,4-андростадиен-3,17-дион; 17 α -метилтестостерон; 19-норэтиохоланолон; 4-гидрокситестостерон; 4-андростен-3,17-дион; 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол; дегидроэпиандростерон; калустерон; клостебол; метандиенон; метилдиенолон; нандролон; тестостерон; эпитестостерон; тиболон; 19-норандростендион; 1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-он) водно-органическими смесями из гексановых растворов и на основании полученных данных разработать усовершенствованную методику пробоподготовки БАДов для определения в них АС методом ГХ-МС/МС.

Экспериментальная часть

Реактивы. Использовали стандартные образцы следующих веществ (см. рисунок): 1,4-андростадиен-3,17-дион (98,0 %; *National Measurement Institute*, Австралия); 17 α -метилтестостерон ($\geq 98,0$ %; *Sigma-Aldrich*, США); 19-норэтиохоланолон (99,8 %; *National Measurement Institute*); 4-гидрокситестостерон (96,2 %; *National Measurement Institute*); 4-андростен-3,17-дион ($\geq 98,0$ %; *Sigma-Aldrich*); 5 α -андростан-3 β ,17 β -диол (99,1 %; *National Measurement Institute*); дегидроэпиандростерон (99,2 %; *National Measurement Institute*); калустерон (98,4 %; *National Measurement Institute*); клостебол (99,5 %; *Dr. Ehrenstorfer GmbH*, Германия); метандиенон (*Cerilliant*, США) концентрацией 1,0 мг/мл в 1,2-диметоксиэтаноле; метилдиенолон (99,5 %; *National Measurement Institute*); нандролон (*Cerilliant*) концентрацией 1,0 мг/мл в ацетонитриле; тестостерон ($\geq 98,0$ %; *USP Reference Standard*, США); эпитестостерон ($\geq 98,0$ %; *USP Reference Standard*); тиболон (99,6 %; *EDQM*, Франция); 19-норандростендион (99,5 %; *National Measurement Institute*); 1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-он (97,4 %; *National Measurement Institute*); гексан «х. ч.» («Экос-1», Россия); метанол для высокоэффективной жидкостной хроматографии ($\geq 99,9$ %; *Fisher Chemicals*, США); ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии ($\geq 99,9$ %; *Fisher Chemicals*). Деионизированную воду получали с помощью системы подготовки воды Direct-Q3 UV System (*Millipore*, США). В качестве газа-носителя для газовой хроматографии использовали гелий (99,9999 %; «НИИ КМ», Россия). В качестве газа столкновения применяли азот (99,999 %; «Крион», Беларусь).

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



Структурные формулы АС и их обозначения
 Structural formulas of the anabolic steroids and their designations

Условия хроматографического разделения и детектирования. В испаритель вводили 1 мкл образца в режиме без деления потока. Температуру испарителя поддерживали постоянной на уровне 280 °С.

Поток газа-носителя сохраняли постоянным при 1,5 мл/мин. Вещества разделяли в режиме градиентного поднятия температуры термостата колонки: 140 °С (0 мин) – 200 °С (16,7 мин) – 310 °С (20,7 мин). Температуру линии передачи масс-детектора поддерживали на уровне 310 °С. Ионизацию осуществляли электронным ударом (70 эВ) при температуре источника 230 °С. Данные получали в режиме мониторинга множественных реакций (*multiple reaction monitoring*, MRM) для положительно заряженных ионов с 10-й минуты после ввода пробы. Время детектирования одного иона составляло 20 мс.

Качественный и количественный анализ проводился с использованием внутреннего стандарта *бис*-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она (METN-M1).

Время удерживания определяемых соединений относительно *бис*-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она, переходы родительских ионов в дочерние, а также энергия вторичной ионизации ТМС-производных исследованных стероидов приведены в табл. 1. Для управления прибором использовали программное обеспечение *MassHunter GC/MS Acquisition* версии В.06.00.1116, для обработки данных – программное обеспечение *MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis* версии В.04.00, *MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis* версии В.05.00, редактор таблиц *Microsoft Office Excel 2007* версии 12.0.4518.1014.

Таблица 1

Условия ГХ-МС/МС обнаружения и определения АС

Table 1

GC-MS/MS conditions for detection and determination of anabolic steroids

Относительное время удерживания	Определяемое вещество	Родительский ион	Дочерний ион	Энергия вторичной ионизации, эВ
0,95	<i>бис</i> -ТМС-19-норэтиохоланолон	405,5	225,2	15
		405,5	315,3	15
		405,5	167,0	15
1,0	<i>бис</i> -ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-он	446,5	341,5	15
		446,5	195,0	15
		446,5	431,0	15
1,01	<i>бис</i> -ТМС-дегидроэпиандростерон	432,4	327,3	20
		432,4	237,3	20
		432,4	181,3	20
1,01	<i>бис</i> -ТМС-19-норандростендион	416,5	401,5	10
		416,5	311,2	10
		416,5	246,3	10
1,02	<i>бис</i> -ТМС-5 α -андростан-3 β ,17 β -диол	421,4	255,1	15
		421,4	213,2	35
		421,4	173,1	15
1,02	<i>бис</i> -ТМС-нандролон	418,4	194,1	20
		418,4	182,1	20
		418,4	287,2	20
1,03	<i>бис</i> -ТМС-1,4-андростадиен-3,17-дион	428,4	206,2	15
		428,4	323,1	15
		428,4	413,2	15
1,04	<i>бис</i> -ТМС-4-андростен-3,17-дион	430,4	209,1	15
		430,4	234,2	20
		430,4	415,3	20

Окончание табл. 1
Ending table 1

Относительное время удерживания	Определяемое вещество	Родительский ион	Дочерний ион	Энергия вторичной ионизации, эВ
1,05	<i>бис</i> -ТМС-тестостерон	432,5	209,0	10
		432,5	327,3	5
		432,5	417,0	10
1,05	<i>бис</i> -ТМС-эпитестостерон	432,5	209,0	10
		432,5	327,3	5
		432,5	417,0	10
1,07	<i>бис</i> -ТМС-тиболон	456,4	441,3	20
		456,4	247,2	20
		456,4	351,3	20
1,08	<i>бис</i> -ТМС-метандиенон	444,4	206,3	20
		444,4	191,2	20
		444,4	339,3	20
1,09	<i>бис</i> -ТМС-метилдиенолон	430,4	285,2	20
		430,4	325,4	20
		430,4	246,2	20
1,09	<i>бис</i> -ТМС-17 α -метилтестостерон	446,5	301,4	10
		446,5	356,3	10
		446,5	314,2	10
1,10	<i>бис</i> -ТМС-калустерон	460,4	355,1	20
		460,4	315,0	20
		460,4	445,4	20
1,14	<i>трис</i> -ТМС-4-гидрокситестостерон	520,6	505,4	20
		520,6	431,3	20
		520,6	224,9	20
1,17	<i>бис</i> -ТМС-кlostебол	466,4	431,4	25
		466,4	355,3	15
		466,4	451,1	15

Определение констант распределения

Константы распределения стероидов в исследованных экстракционных системах определяли при равновесной концентрации стероидов в гексановых растворах от 10 до 333 нг/мл при температуре (20 ± 1) °С. Для всех экстракционных систем, за исключением системы гексан – вода, проводилось предварительное взаимное насыщение фаз. Экстракцию осуществляли путем перемешивания на ротационном миксере при скорости вращения 35 об/мин в течение 20 мин.

Константы распределения анализируемых соединений были рассчитаны в редакторе таблиц *Microsoft Office Excel 2007* исходя из относительных площадей (относительно внутреннего стандарта *бис*-ТМС-1-метилен-5 α -андростан-3 α -ол-17-она) соответствующих пиков, полученных на хроматограммах. Среди характеристических MRM-переходов для конкретного вещества выбирался тот MRM-переход, для которого хроматографический пик был наибольшим.

Константы распределения АС (*P*) в экстракционных системах гексан – водно-метанольные смеси и гексан – водно-ацетонитрильные смеси рассчитывали по убыли концентрации стероида из гексановой фазы при соотношении объемов гексановой и водно-органической фаз, равном от 1 : 5 (вода, 20 % вод-

ные растворы метанола или ацетонитрила) до 10 : 1 (80–100 % растворы метанола или ацетонитрила), по уравнению

$$P = \frac{C_{\text{гекс}}}{C_{\text{пол}}} = \frac{C_{\text{гекс}}}{C_{\text{гекс}}^{\text{исх}} - C_{\text{гекс}}} \frac{V_{\text{пол}}}{V_{\text{гекс}}},$$

где $C_{\text{гекс}}$, $C_{\text{пол}}$ – равновесные концентрации распределяемого вещества в гексановой и водно-органической фазах соответственно; $C_{\text{гекс}}^{\text{исх}}$ – исходная концентрация распределяемого вещества в гексановой фазе; $V_{\text{пол}}$, $V_{\text{гекс}}$ – объемы водно-органической и гексановой фаз соответственно, выбираемые таким образом, чтобы убыль концентрации вещества в гексановом растворе была не менее 30 %.

Перед хроматографическим определением концентраций стероидов в гексановых растворах АС подвергали дериватизации с получением ТМС-производных в идентичных условиях.

Для этого исходные и равновесные гексановые растворы стероидов, а также гексановые реэкстракты из равновесных водных растворов выпаривали досуха в токе азота при температуре 40–50 °С. Затем к сухому остатку в пробирках автоматической пипеткой добавляли по 50 мкл раствора внутреннего стандарта (METN-M1) в метаноле с концентрацией 200 нг/мл и снова выпаривали досуха в токе азота при температуре 50 °С. К сухому остатку в пробирках автоматической пипеткой добавляли 50 мкл раствора для дериватизации (МСТФА : аммония иодид : дитиотреитол = 2000 мкл : 4 мг : 3 мкл) и перемешивали полученный раствор с использованием шейкера. Затем пробирки плотно закрывали крышкой и нагревали в блочном термостате при 70 °С в течение 20 мин. После этого пробирки охлаждали до комнатной температуры и переносили растворы автоматической пипеткой в стеклянные вials с конусными вставками.

Раствор для дериватизации готовили путем растворения 5,0 мг аммония иодида и 3,8 мг дитиотреитола в 250 мкл МСТФА и последующего разбавления полученного раствора в 10 раз МСТФА.

Относительные стандартные отклонения рассчитанных констант распределения АС не превышали 30 % и составляли в среднем 15 %.

Результаты и их обсуждение

В табл. 2 и 3 приведены полученные значения констант распределения 16 исследованных АС в экстракционных системах гексан – водно-метанольные смеси и гексан – водно-ацетонитрильные смеси.

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что все изученные стероиды являются умеренно гидрофобными веществами и величины логарифмов их констант распределения ($\lg P$) в системе гексан – вода больше нуля и имеют максимальные значения.

Гидрофобность АС связана с наличием в структуре их молекул гидрофобного циклопентанпергидрофенантренового фрагмента и углеводородных радикалов.

Замена воды в системе гексан – вода на полярные органические растворители приводит к падению величин $\lg P$ АС на 1,3–2,6 ед.

Следует заметить, что величины $\lg P$ всех рассмотренных в данной работе АС меньше 0 в системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси и гексан – водно-метанольные смеси с объемным содержанием органического растворителя более 40 %. Следовательно, наблюдается «инверсия» эффекта экстрагируемости АС. Данный эффект характерен для гидрофобных соединений и в основном обусловлен значительным снижением величины сольвофобного эффекта полярной фазы (I_{CH_2}) и инкрементов неполярных и малополярных групп при замене воды на полярные органические растворители и водно-органические смеси [16; 17].

Инкременты полярных групп, как правило, заметно растут (уменьшаются по модулю).

Таким образом, значения инкрементов полярных и неполярных групп сильно нивелируются [16; 17], что приводит к уменьшению наблюдаемого размаха величин $\lg P$ изученных веществ: с 0,9 для системы гексан – вода до 0,6 для системы гексан – ацетонитрил и до 0,4 для системы гексан – метанол (см. табл. 2 и 3).

При этом заслуживает внимания то, что степень нивелирования в первом приближении является функцией I_{CH_2} [16; 17].

Следует отметить, что в системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси и гексан – водно-метанольные смеси величины $\lg P$ гидрофобных АС (см. табл. 2 и 3) сильно уменьшаются с ростом концентрации органического компонента в полярной фазе от 0 до 80 об. %. Данное явление характерно для гидрофобных веществ и вызвано значительным снижением величины сольвофобного эффекта полярной фазы при замене воды на водно-органические смеси и полярные органические растворители [16; 17].

Если говорить об области концентраций органического растворителя в водно-органических смесях от 80 до 100 об. %, то данные, приведенные в табл. 2 и 3, показывают, что для изученных соединений наблюдаются отчетливо выраженные минимумы констант распределения АС при концентрации ацетонитрила или метанола 80–95 об. %.

Логарифмы констант распределения АС
в экстракционных системах гексан – водно-метанольные смеси

Table 2

Logarithms of the distribution constants of the anabolic steroids
in the extraction systems hexane – water-methanol mixtures

Полярная фаза	I_{CH_2}	Обозначение АС															
		NETC	DHEA	NADON	3b-diol	NAND	BOLDIONE	ADON	Tibn	MTDE	MDNL	MTSN	CALS	4-OH-Testo	CLSB	EpiTesto	Testo
Вода	0,63	0,66	0,86	0,61	0,62	0,18	0,23	0,76	1,04	0,20	0,15	0,70	0,80	0,76	0,74	0,40	0,43
20 % MeOH	0,54	0,49	0,56	0,18	0,20	-0,32	-0,09	0,49	1,00	-0,10	-0,15	0,43	0,91	0,43	0,54	0,30	0,00
30 % MeOH	0,49	0,08	0,18	-0,12	-0,29	-0,70	-0,43	0,11	0,41	-0,43	-0,59	-0,01	0,38	-0,05	0,04	-0,09	-0,43
40 % MeOH	0,41	-0,42	-0,30	-0,44	-0,74	-1,07	-0,82	-0,28	-0,37	-0,92	-0,96	-0,35	-0,02	-0,41	-0,27	-0,31	-0,62
50 % MeOH	0,37	-0,64	-0,44	-0,62	-1,11	-1,37	-1,10	-0,43	-0,46	-1,27	-1,24	-0,62	-0,34	-0,60	-0,70	-0,89	-1,12
60 % MeOH	0,33	-1,05	-1,02	-1,03	-1,70	-1,77	-1,42	-0,80	-0,80	-1,64	-1,59	-1,10	-0,89	-1,15	-1,21	-1,25	-1,46
70 % MeOH	0,30	-1,39	-1,46	-1,40	-2,14	-2,11	-1,82	-1,13	-1,21	-2,02	-1,96	-1,54	-1,40	-1,62	-1,68	-1,51	-1,62
80 % MeOH	0,24	-1,47	-1,54	-1,54	-2,15	-2,17	-1,89	-1,24	-1,54	-2,11	-2,05	-1,68	-1,57	-1,72	-1,85	-1,74	-1,80
90 % MeOH	0,18	-1,51	-1,60	-1,60	-2,14	-2,10	-1,89	-1,37	-1,64	-2,09	-2,00	-1,72	-1,68	-1,77	-1,92	-1,77	-1,80
95 % MeOH	0,14	-1,41	-1,54	-1,49	-2,00	-1,92	-1,74	-1,32	-1,66	-1,92	-1,85	-1,66	-1,64	-1,72	-1,82	-1,54	-1,66
100 % MeOH	0,10	-0,89	-1,02	-1,02	-1,24	-1,20	-1,16	-0,89	-1,08	-1,18	-1,14	-1,07	-1,07	-1,12	-1,19	-0,85	-0,89

Логарифмы констант распределения АС
в экстракционных системах гексан – водно-ацетонитрильные смеси

Table 3

Logarithms of the distribution constants of the anabolic steroids
in the extraction systems hexane – water-acetonitrile mixtures

Полярная фаза	I_{CH_2}	Обозначение АС															
		NETC	DHEA	NADON	3b-diol	NAND	BOLDIONE	ADON	Tibn	MTDE	MDNL	MTSN	CALS	4-OH-Testo	CLSB	EpiTesto	Testo
20 % AcN	0,48	0,28	0,32	0,00	-0,11	-0,54	-0,34	0,28	0,69	-0,33	-0,39	0,18	0,52	0,15	0,28	0,08	-0,22
30 % AcN	0,41	-0,12	-0,12	-0,38	-0,59	-0,89	-0,72	-0,14	0,15	-0,74	-0,70	-0,24	0,04	-0,28	-0,22	-0,38	-0,59
40 % AcN	0,34	-0,52	-0,48	-0,62	-0,82	-1,11	-1,03	-0,46	-0,55	-1,07	-1,00	-0,55	-0,28	-0,62	-0,64	-0,54	-0,82
50 % AcN	0,29	-0,82	-0,92	-1,02	-1,25	-1,48	-1,42	-0,80	-0,92	-1,46	-1,39	-0,92	-0,72	-1,03	-1,03	-0,96	-1,14
60 % AcN	0,26	-1,13	-1,27	-1,35	-1,59	-1,80	-1,70	-1,15	-1,24	-1,74	-1,64	-1,30	-1,11	-1,40	-1,49	-1,22	-1,44
70 % AcN	0,23	-1,26	-1,46	-1,49	-1,72	-1,89	-1,82	-1,30	-1,38	-1,82	-1,74	-1,44	-1,36	-1,52	-1,68	-1,46	-1,60
80 % AcN	0,22	-1,37	-1,59	-1,70	-1,82	-2,01	-2,00	-1,46	-1,55	-1,92	-1,85	-1,51	-1,43	-1,70	-1,77	-1,74	-1,77
90 % AcN	0,19	-1,57	-1,70	-1,82	-1,89	-2,09	-2,17	-1,62	-2,07	-2,17	-2,05	-1,77	-1,66	-1,92	-2,00	-1,77	-1,80
95 % AcN	0,17	-1,48	-1,66	-1,77	-1,72	-1,96	-2,03	-1,60	-1,80	-1,92	-1,89	-1,59	-1,54	-1,77	-1,96	-1,74	-1,82
100 % AcN	0,13	-1,18	-1,41	-1,59	-1,40	-1,64	-1,80	-1,46	-1,59	-1,51	-1,46	-1,28	-1,24	-1,48	-1,66	-1,33	-1,48

Данное явление характерно также для органических веществ небольшой молекулярной массы, в структуру молекул которых, наряду с углеводородными заместителями, входят сильнополярные функциональные группы [16; 17]. Его причиной является значительно более сильное падение инкрементов полярных групп по сравнению с ростом инкрементов неполярных групп распределяемого вещества при небольших добавках воды к ацетонитрилу или метанолу, а также по сравнению с резким уменьшением взаимной растворимости гексана и полярного органического растворителя, в первую очередь метанола.

Так, с ростом концентрации метанола в полярной фазе от 90 до 100 об. % увеличивается концентрация метанола в гексане, а значит, и сольватация гидроксильных и кетонных групп АС метанолом, содержащимся в гексановой фазе. Этим объясняется снижение экстрагируемости АС полярной фазой с ростом содержания метанола в данной области концентраций.

Минимальные значения IgP большинства анализируемых АС оказались ниже при использовании водно-ацетонитрильных смесей, чем при применении водно-метанольных смесей (см. табл. 2 и 3). Растворимость ацетонитрила в гексане ниже, чем растворимость метанола, и мало зависит от содержания ацетонитрила в диапазоне концентраций 30–100 % в водно-ацетонитрильной смеси [18]. Для большинства рассмотренных стероидов это приводит к снижению значений констант распределения АС и увеличению экстрагируемости анализируемых АС для системы гексан – 90 % ацетонитрил по сравнению с системой гексан – 90 % метанол.

Увеличение значений констант распределения АС при концентрации ацетонитрила в смеси более 90 об. % объясняется снижением сольватационного эффекта в связи с очень малым содержанием в полярной фазе воды, характеризующейся гораздо более сильной сольватирующей способностью, чем ацетонитрил.

Стоит отметить, что ацетонитрил является более селективным экстрагентом, чем метанол, из-за отсутствия возможности образования водородных связей и худшей способности к экстракции белков и полярных соединений, которые могут содержаться в сложных матрицах (например, БАДах). На основании этого можно заключить, что для извлечения большинства исследуемых АС из гексановых растворов наиболее эффективными и одновременно селективными экстрагентами являются водно-ацетонитрильные смеси, содержащие от 10 до 20 об. % воды.

Определение анаболических стероидов в БАДах

На основании полученных констант распределения АС была разработана методика пробоподготовки БАДов и специализированного спортивного питания для определения в них АС.

Данная методика включает в себя гомогенизацию образца БАДа в воде и извлечение АС, содержащегося в образце, гексаном, при этом АС и гидрофобные компоненты матрицы экстрагируются, а гидрофильные примеси отделяются. Затем из гексанового раствора анаболические стероиды экстрагируют 90 % водным раствором ацетонитрила и одновременно отделяют сильно гидрофобные компоненты матрицы. Степень извлечения АС из гексанового раствора в соответствии с величинами констант распределения составляет 93,7–98,3 %. В результате остается очищенный водно-ацетонитрильный экстракт, который после удаления воды и ацетонитрила силилируют и хроматографируют.

Предложенная методика была апробирована на образцах БАДов, содержащих изученные АС, и позволила однозначно идентифицировать искомые АС. Для данной методики относительное стандартное отклонение составляет 10–15 %, предел обнаружения – около 10 мкг/кг БАДов, что дает возможность надежно определять в них примеси запрещенных АС.

Заключение

Установлено, что большинство исследованных АС эффективно экстрагируются из гексановых растворов водно-ацетонитрильными смесями, содержащими от 10 до 20 об. % воды, что было использовано для разработки оптимизированной методики пробоподготовки, основанной на экстракционном извлечении АС из водной суспензии анализируемого образца БАДа гексаном с последующей их реэкстракцией водно-ацетонитрильной смесью.

Апробация разработанной методики на образцах БАДов, содержащих изученные АС, показала возможность ее применения для контроля БАДов на содержание запрещенных АС.

Для предложенной методики относительное стандартное отклонение составляет 10–15 %, предел обнаружения – около 10 мкг/кг БАДов, что позволяет надежно определять в них примеси запрещенных АС.

Библиографические ссылки

1. Geyer H, Parr MK, Koehler K, Mareck U, Schänzer W, Thevis M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of Mass Spectrometry*. 2008;43(7):892–902. DOI: 10.1002/jms.1452.
2. Pipe A, Ayotte C. Nutritional supplements and doping. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2002;12(4):245–249. DOI: 10.1097/00042752-200207000-00008.
3. Maughan RJ, Greenhaff PL, Hespel P. Dietary supplements for athletes: emerging trends and recurring themes. *Journal of Sports Sciences*. 2011;29(supplement 1):57–66. DOI: 10.1080/02640414.2011.587446.
4. Segura J, Ventura R, Jurabo C. Derivatization procedures for gas chromatographic – mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998;713(1):61–90. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00089-9.
5. Parr MK, Geyer H, Reinhart U, Schänzer W. Analytical strategies for the detection of non-labelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements. *Food Additives & Contaminants*. 2004;21(7):632–640. DOI: 10.1080/02652030410001701602.
6. Geyer H, Mareck-Engelke U, Reinhart U, Thevis M, Schänzer W. The analysis of nutrition supplements for anabolic-androgenic steroids. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2000;8:23–32.
7. Geyer H, Parr MK, Mareck U, Reinhart U, Shrader Y, Schänzer W. Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids – results of an international study. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(2):124–129. DOI: 10.1055/s-2004-819955.
8. Baume N, Mahler N, Kamber M, Mangin P, Saugy M. Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2006;16(1):41–48. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2005.00442.x.
9. Parr MK, Geyer H, Hoffmann B, Köhler K, Mareck U, Schänzer W. High amounts of 17-methylated anabolic-androgenic steroids in effervescent tablets on the dietary supplement market. *Biomedical Chromatography*. 2007;21(2):164–168. DOI: 10.1002/bmc.728.
10. Geyer H, Gülker A, Mareck U, Parr MK, Schänzer W. Some good news from the field of nutritional supplements. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2004;12:91–97.
11. Lamor M, Vajjala I, Vajjala G. The quantification of prohormones in nutritional supplements. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2004;12:497–500.
12. Van Thuyne W, Delbeke FT. Nutritional supplements and doping: the Ghent experience. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2003;11:57–66.
13. Martello S, Felli M, Chiarotti M. Survey of nutritional supplements for selected illegal anabolic steroids and ephedrine using LC-MS/MS and GC-MS methods, respectively. *Food Additives & Contaminants*. 2007;24(3):258–265. DOI: 10.1080/02652030601013729.
14. Van Thuyne W, Delbeke FT. Validation of a GC-MS screening method for anabolizing agents in solid nutritional supplements. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(3):155–159. DOI: 10.1002/bmc.303.
15. Van Thuyne W, Delbeke FT. Validation of a GC-MS screening method for anabolizing agents in aqueous nutritional supplements. *Journal of Chromatographic Science*. 2005;43(1):2–6. DOI: 10.1093/chromsci/43.1.2.
16. Заяц МФ. Новые подходы в применении экстракции при определении микроколичеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды хроматографическими методами. Минск: БГУ; 2019. 355 с.
17. Leschev SM. Regularities of extraction in systems on the basis of polar organic solvents and use of such systems for separation of important hydrophobic substances. In: Marcus Y, SenGupta AK, editors. *Ion Exchange and Solvent Extraction. Volume 15*. New York: CRC Press; 2002. p. 295–330.
18. Лещев СМ, Мельситова ИВ. Факторы, влияющие на взаимную растворимость алифатических углеводородов и полярных органических растворителей, а также их смесей с водой. *Журнал прикладной химии*. 1993;66(3):562–566.

References

1. Geyer H, Parr MK, Koehler K, Mareck U, Schänzer W, Thevis M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of Mass Spectrometry*. 2008;43(7):892–902. DOI: 10.1002/jms.1452.
2. Pipe A, Ayotte C. Nutritional supplements and doping. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2002;12(4):245–249. DOI: 10.1097/00042752-200207000-00008.
3. Maughan RJ, Greenhaff PL, Hespel P. Dietary supplements for athletes: emerging trends and recurring themes. *Journal of Sports Sciences*. 2011;29(supplement 1):57–66. DOI: 10.1080/02640414.2011.587446.
4. Segura J, Ventura R, Jurabo C. Derivatization procedures for gas chromatographic – mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998;713(1):61–90. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00089-9.
5. Parr MK, Geyer H, Reinhart U, Schänzer W. Analytical strategies for the detection of non-labelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements. *Food Additives & Contaminants*. 2004;21(7):632–640. DOI: 10.1080/02652030410001701602.
6. Geyer H, Mareck-Engelke U, Reinhart U, Thevis M, Schänzer W. The analysis of nutrition supplements for anabolic-androgenic steroids. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2000;8:23–32.
7. Geyer H, Parr MK, Mareck U, Reinhart U, Shrader Y, Schänzer W. Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids – results of an international study. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(2):124–129. DOI: 10.1055/s-2004-819955.
8. Baume N, Mahler N, Kamber M, Mangin P, Saugy M. Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2006;16(1):41–48. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2005.00442.x.
9. Parr MK, Geyer H, Hoffmann B, Köhler K, Mareck U, Schänzer W. High amounts of 17-methylated anabolic-androgenic steroids in effervescent tablets on the dietary supplement market. *Biomedical Chromatography*. 2007;21(2):164–168. DOI: 10.1002/bmc.728.

10. Geyer H, Gülker A, Mareck U, Parr MK, Schänzer W. Some good news from the field of nutritional supplements. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2004;12:91–97.
11. Lamor M, Vajjala I, Vajjala G. The quantification of prohormones in nutritional supplements. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2004;12:497–500.
12. Van Thuyne W, Delbeke FT. Nutritional supplements and doping: the Ghent experience. *Recent Advances in Doping Analysis*. 2003;11:57–66.
13. Martello S, Felli M, Chiarotti M. Survey of nutritional supplements for selected illegal anabolic steroids and ephedrine using LC-MS/MS and GC-MS methods, respectively. *Food Additives & Contaminants*. 2007;24(3):258–265. DOI: 10.1080/02652030601013729.
14. Van Thuyne W, Delbeke FT. Validation of a GC-MS screening method for anabolizing agents in solid nutritional supplements. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(3):155–159. DOI: 10.1002/bmc.303.
15. Van Thuyne W, Delbeke FT. Validation of a GC-MS screening method for anabolizing agents in aqueous nutritional supplements. *Journal of Chromatographic Science*. 2005;43(1):2–6. DOI: 10.1093/chromsci/43.1.2.
16. Zayats MF. *Novye podkhody v primenenii ekstraktsii pri opredelenii mikrokolichestv pestitsidov v sel'skokhozyaistvennoi produktsii i ob'ektakh okruzhayushchei sredy khromatograficheskimi metodami* [New approaches in the application of extraction in the determination of microquantities of pesticides in agricultural products and environmental objects by chromatographic methods]. Minsk: Belarusian State University; 2019. 355 p. Russian.
17. Leschev SM. Regularities of extraction in systems on the basis of polar organic solvents and use of such systems for separation of important hydrophobic substances. In: Marcus Y, SenGupta AK, editors. *Ion Exchange and Solvent Extraction. Volume 15*. New York: CRC Press; 2002. p. 295–330.
18. Leshchev SM, Melsitova IV. Factors affecting the reciprocal solubility of aliphatic-hydrocarbons and polar organic-solvents and their aqueous mixtures. *Zhurnal prikladnoi khimii*. 1993;66(3):562–566. Russian.

Получена 20.12.2021 / исправлена 12.01.2022 / принята 13.01.2022.
Received 20.12.2021 / revised 12.01.2022 / accepted 13.01.2022.