

Использование твердофазной экстракции для определения используемых в спорте лекарственных средств в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС

*Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян, Э.М. Гашимова

Кубанский государственный университет,
Российская Федерация, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149

*Адрес для переписки: Екатерина Владимировна Дмитриева, E-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com

Поступила в редакцию 5 июля 2018 г., после исправления – 6 августа 2018 г.

Предложена методика определения в моче некоторых селективных модуляторов андрогенных рецепторов, а именно андарина (S-4, GTX-007), остарина (S-22, GTX-024, МК-2866) и лигандрола (LGD-4033, VK-5211), а также фитостероида лаксогенина и ибутаморена (МК-677), непептидного секрета гормона роста, большинство из которых запрещены к употреблению спортсменами Всемирным антидопинговым агентством по причине их анаболического действия. Для очистки и концентрирования аналитов была исследована возможность применения твердофазной экстракции с использованием патронов Varian Bond Elut C8 (100 мг, 1 мл), Biotage Isolute C18 (EC) (100 мг, 1 мл) и Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл). С целью достижения оптимального разделения аналитов использовали обращенно-фазовый вариант ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тройного квадрупольного масс-спектрометра в качестве детектора в режиме регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов. Пределы обнаружения аналитов находятся в диапазоне 0.1–0.5 нг/мл, пределы определения составляют 0.5–2.5 нг/мл. Градуировочные кривые линейны в широком диапазоне концентраций. Проведена оценка матричных эффектов на результаты определения аналитов и показано, что они не оказывают мешающего влияния на результаты определения. Методика была апробирована на реальных образцах мочи после однократного перорального употребления 15 мг действующего вещества. Спустя 12 часов во всех образцах мочи были обнаружены определяемые аналиты, их концентрации лежали в линейном диапазоне градуировочных зависимостей, что свидетельствует о возможности использования предложенной методики для определения исследуемых аналитов в моче человека.

Ключевые слова: УВЭЖХ-МС/МС, САРМ, лаксогенин, ибутаморен, твердофазная экстракция, допинг-контроль.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 3, pp. 236-244

DOI: 10.15826/analitika.2018.22.3.008

Application of solid-phase extraction for the quantification of several abused drugs in sports in human urine using UHPLC-MS/MS method

*E.V. Dmitrieva, A.Z. Temerdashev, A.A. Azaryan, E.M. Gashimova

Kuban State University, Stavropolskaya st., 149, Krasnodar, 350040, Russian Federation

*Corresponding author: Ekaterina V. Dmitrieva, E-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com

Submitted 05 July 2018, received in revised form 06 August 2018

A procedure for the determination of several selective androgen receptor modulators in human urine, namely, Andarine (S-4, GTX-007), Ostarine (S-22, GTX-024, MK-2866) and Ligandrol (LGD-4033, VK-5211), as well as a phytosteroid Laxogenin and Ibutamoren (MK-677), related to non-peptide growth hormone secretagogues, has been developed. Most of these are prohibited by the World Anti-Doping Agency due to their anabolic effects. With the aim of the analytes purification and concentration, a procedure for solid-phase extraction with the use of Varian Bond Elut C8 (100 mg, 1 mL), Biotage Isolute C18 (EC) (100 mg,

1 mL) and Waters Oasis HLB (30 mg, 1 mL) cartridges was applied. To achieve good resolution of the analytes, reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled with the triple quadrupole mass spectrometer as a detector in positive and negative ion detection modes was used. The limits of detection were in the range of 0.1–0.5 ng/mL, limits of quantification were between 0.25–0.5 ng/mL. Calibration curves were examined to be linear in the wide range of concentrations. Matrix effects were also evaluated and were found not to influence the results of the analytes quantification. The proposed method was applied for the analysis of real samples after single 15 mg oral administration of the analytes. All the analytes were positively detected in the human urine samples in 12h, thus, proving the applicability of the procedure for the analytes quantification in the urine.

Key words: UHPLC-MS/MS, SARM, Laxogenin, lbutamoren, solid-phase extraction, doping control.

ВВЕДЕНИЕ

Селективные модуляторы андрогенных рецепторов (**САРМы**) относятся к наиболее перспективным, но, в то же время, наименее изученным соединениям с анаболической активностью. Развитие данного класса соединений потенциально позволит преодолеть такие ограничения традиционных анаболических стероидов, как низкая пероральная биодоступность, неудовлетворительные фармакокинетические профили, а также целый ряд других серьезных побочных эффектов [1-3].

Первыми представителями САРМов стали производные арил-пропионамида (S-4, S-22) [4] и хинолина (LGD-2226) [5-7], описанные в 1998 году. В дальнейшем были получены и охарактеризованы и другие классы САРМов, такие как производные тетрагидрохинолина (S-40503) [8], гидантоина (BMS-564929) [9], пирролидина-бензонитрила (LGD-4033) [10], тропанола (AC-262536, ACP-105) [11] и других [12-16]. Активные поиски и изучение новых представителей данных классов соединений, обладающих подобной активностью, продолжают и в настоящее время. Столь высокий интерес к ним объясняется в первую очередь тем, что они обладают сходным с анаболическими стероидами эффектом, но, в тоже время, менее опасны с точки зрения развития негативных последствий их применения. Подобные свойства, малая изученность и распространенность послужили причиной злоупотребления ими со стороны спортсменов, что привело к их запрету Всемирным антидопинговым агентством (**ВАДА**) в 2008 году [17].

Кроме того, иногда под видом САРМов реализуют препараты, в действительности относящиеся к другим классам, в частности, лаксогенин – фитостероид с недоказанной эффективностью [18, 19], или ибутаморен – непептидный секретаргог гормона роста [20, 21], также запрещенный в спорте. Несмотря на то, что большинство из данных препаратов не прошли клинические испытания, они уже несколько лет доступны на черном рынке, что обуславливает необходимость разработки методик их определения.

Для андарина, остарина [22-24], лигандрола [25] и ибутаморена [26] ранее были разработаны методики определения, включающие стадию ферментативного гидролиза с последующей жидкость-жидкостной экстракцией для определения

соединений в нативной форме, а также их метаболитов. Существенным недостатком данного способа пробоподготовки является его длительность и трудоемкость.

Процедура твердофазной экстракции (**ТФЭ**) с использованием патронов HLB и C18 была использована для определения производных арил-пропионамида в лошадиной моче [22] и с использованием сорбента PAD-1 в моче человека [27,28]. Для других представителей САРМов применение ТФЭ описано не было.

Для определения лаксогенина была использована процедура «разбавил и вкол» [29]. Основным недостатком данной процедуры является получение «грязных» проб, содержащих значительное количество матричных компонентов, оказывающих влияние на результаты количественного анализа, учесть которые в полной мере можно только с применением изотопно-меченного внутреннего стандарта. Кроме того, чувствительность определения аналитов при ее использовании снижается по причине отсутствия стадии концентрирования.

В настоящее время существует потребность в разработке способов одновременного определения соединений различных классов, поэтому целью данной работы являлась разработка чувствительной и надежной методики определения некоторых селективных модуляторов андрогенных рецепторов и препаратов, реализуемых под видом САРМов, в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

Стандартные образцы андарина ((2S)-3-(4-ацетамидо-фенокси)-2-гидрокси-2-метил-N-[4-нитро-3-трифторметилфенил]пропионамид), ибутаморена (2-амино-2-метил-N-[(2R)-1-(1-метилсульфонилспиро[2H-индол-3,4'-пиперидин]-1'-ил)-1-оксо-3-фенилметоксипропан-2-ил]пропионамид), лаксогенина ((25R)-3β-гидрокси-5α-спиростан-6-он), лигандрола (4-((R)-[2-((R)-2,2,2-трифтор-1-гидроксиэтил]пирролидин-1-ил]2-(трифторметил)бензонитрил), остарина ((2S)-3-(4-цианофенокси)-N-[4-циано-3-(трифторметил)фенил]-2-гидрокси-2-метилпропионамид) (рис. 1) были приобретены у Shanghai Soyoung Biotech. Inc. (Китай), фипронил (5-амино-[2,6-дихлор-4-(трифторметил)фенил]-4-[(1R,S)-(трифторметил)сульфинил]-1H-пирозол-3-карбонитрил) и 17α-метилтестостерон (17α-ме-

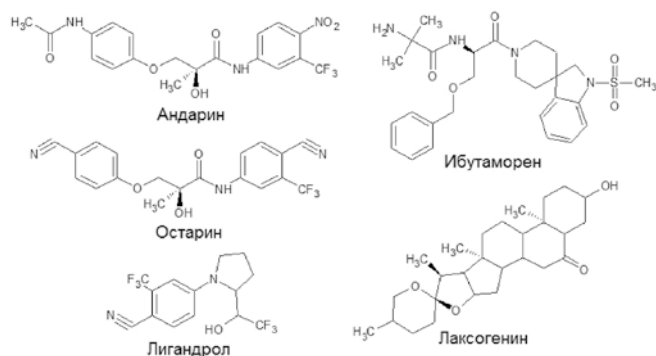


Рис. 1. Структуры определяемых аналитов

Fig. 1. Structures of target analytes

тиландростен-4-ол-17β-он-3) были из НПК «Блок» и Sigma Aldrich соответственно. Использовали ацетонитрил и метанол квалификации «для ВЭЖХ-МС» (Biosolve, Израиль), муравьиную кислоту (Acros Organics, 98 %) и 18.2 MΩ воду, полученную при помощи системы Milli-Q.

Для проведения твердофазной экстракции использовали патроны Varian Bond Elut C8 (100 мг, 1 мл), Biotage Isolute C18 (EC) (100 мг, 1 мл) и Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл).

Исходные растворы аналитов концентрацией 1 мг/мл готовили растворением навески вещества в ацетонитриле и хранили при температуре -20 °С. Рабочие растворы, полученные разбавлением исходных растворов водой, хранили при температуре 4 °С.

При построении градуировочных кривых использовали образцы мочи, полученные от добровольцев (мужчин и женщин в возрасте от 20 до 45 лет). Пробы хранили при температуре -20 °С после консервации азидом натрия. Образцы, полученные от добровольцев после употребления исследуемых соединений, находились в аналогичных условиях. Добровольцы заранее были проинформированы о деталях эксперимента, после чего каждым добровольцем было подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Приборы и оборудование

Твердофазную экстракцию проводили с использованием 12-позиционного вакуумного манифолда. Для разделения и детектирования аналитов использовали систему, состоящую из жидкостного хроматографа Ultimate 3000 с колонкой Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) и тройного квадрупольного масс-спектрометра Thermo TSQ Quantum Access Max с источником нагреваемой электро-распылительной ионизации в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов.

Оптимизация методики

В качестве биологической матрицы для анализа была выбрана моча, поскольку процедура ее получения является неинвазивной и ее использование обеспечивает более широкое окно для об-

наружения ксенобиотиков. Кроме того, содержания неизменных соединений и метаболитов, как правило, выше в моче [30].

Исходя их структурных формул определяемых соединений, использовали следующие патроны для твердофазной экстракции: Varian Bond Elut C8 (100 мг, 1 мл), Biotage Isolute C18 (EC) (100 мг, 1 мл) и Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл). Кондиционирование патрона проводили с последовательным использованием метанола и деионизованной воды.

Оптимизацию объема загрузки анализируемых образцов мочи проводили в отдельных экспериментах путем добавки смеси аналитов в бланковые образцы мочи и определением объема до проскока.

Промывку патрона осуществляли с использованием смеси метанола в воде в различных соотношениях для достижения наилучшей очистки проб от матричных компонентов без потерь аналитов. После промывки сушили патрон в токе азота, элюирование аналитов проводили метанолом.

Далее проводили упаривание элюата в токе азота и перерастворение остатка в смеси метанол: деионизованная вода (1 : 1, по объему). Элюат затем подвергался анализу.

Разделение и детектирование аналитов проводили с использованием условий, оптимизированных ранее [29]. Так, в качестве подвижной фазы применяли 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в метаноле (элюент В) в режиме градиентного элюирования (табл. 1) с параметрами масс-спектрометра, приведенными в табл. 2. Объем вводимой пробы составил 10 мкл, скорость потока подвижной фазы была 0.45 мл/мин при температуре термостата 40 °С. Детектирование проводили в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM) при регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов (табл. 2, 3).

Для проведения количественных измерений готовили серию градуировочных растворов в холостых пробах мочи с содержанием аналитов 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 и 50 нг/мл. Кроме того, для получения корректных результатов количественных измерений перед проведением ТФЭ в пробы мочи

Таблица 1

Условия градиентного элюирования при скорости потока 0.45 мл/мин

Table 1
Gradient elution conditions at the flow rate of 0.45 mL/min

Время, мин	Элюент А, % об.	Элюент В, % об.
0	95	5
1.0	95	5
1.7	40	60
3.5	40	60
6.5	10	90
9.0	10	90
9.0	95	5
10.5	95	5

Таблица 2

Параметры масс-спектрометрического детектирования с источником нагреваемой электрораспылительной ионизации

Table 2

Parameters of mass-spectrometric detection with heated electrospray ionization

Параметр	Значение	
	Положительный	Отрицательный
Режим регистрации ионов		
Температура испарителя, °С	400	
Температура трансферного капилляра, °С	320	
Напряжение на источнике ионизации, В	4000	- 3000
Расход газа-распылителя, усл. ед.	60	
Расход вспомогательного газа, усл. ед.	10	
Давление газа-мишени в ячейке соударений, мторр	1.5	

Таблица 3

Условия детектирования аналитов в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM)

Table 3

Conditions of mass-spectrometric detection in multiple reaction monitoring (MRM)-mode

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	t_R , мин	Напряжение на экстрагирующей линзе, В
Андарин	442.1	108.1	32	3.16	101
		148.0	29		
		190.0	23		
Ибутаморен	529.2	235.0	22	2.61	77
		263.0	15		
		267.0	19		
Лаксогенин	445.3	145.0	36	6.56	65
		191.0	19		
		283.0	18		
Лигандрол	339.1	199.0	28	4.16	88
		220.0	27		
		240.0	24		
Остарин	388.0	118.0	40	3.45	-46
		185.0	40		
		268.9	21		
Метилтестостерон	303.3	79.2	32	4.66	55
		97.2	30		
		109.2	29		
Фипронил	434.8	183.0	40	4.85	-45
		250.0	28		
		329.9	19		

вносили внутренние стандарты. Фипронил применяли для всех аналитов, кроме лаксогенина, имеющего стероидную структуру. Для него в качестве внутреннего стандарта использовали метилтестостерон. Содержание внутренних стандартов во всех образцах было фиксировано и составило 5 нг/мл.

Градуировочные растворы подвергали процедуре твердофазной экстракции с использованием различных патронов. Для каждого из патронов было построено по три градуировочные кривые, все точки которых были получены в результате двух параллельных определений. Для оценки матричных помех в тех же условиях анализировали градуировочные растворы, приготовленные путем внесения аналитов не в мочу, а в деионизованную воду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оптимизации условий твердофазной экстракции было установлено, что проскок определяемых веществ не наблюдается при загрузке образцов вплоть до объема 3 мл на всех исследуемых патронах при содержании аналитов в образцах не более 100 нг/мл. Для промывки всех патронов в качестве оптимальной была выбрана смесь метанол: вода (5 : 95, по объему). При использовании растворов, содержащих больше 5 % об. метанола, наблюдался проскок аналитов при промывке.

В табл. 4 представлены результаты эксперимента по оптимизации объема, необходимого для элюирования аналитов. Как видно из результатов,

Таблица 4

Степень извлечения аналитов с патронов для ТФЭ при концентрации аналитов 10 нг/мл

Table 4

Recoveries from SPE cartridges at the analytes concentration of 10 ng/mL

Патрон	Аналит	Степень извлечения (%) при указанных объемах элюента (n = 6)		
		0.5 мл	1.0 мл	1.5 мл
С8	Андарин	97 ± 6	98 ± 7	98 ± 7
	Ибутаморен	99 ± 10	100 ± 10	100 ± 10
	Лаксогенин	111 ± 12	111 ± 12	111 ± 12
	Лигандрол	106 ± 9	106 ± 9	106 ± 9
	Остарин	107 ± 9	107 ± 10	107 ± 10
С18	Андарин	94 ± 9	96 ± 9	96 ± 9
	Ибутаморен	109 ± 12	112 ± 14	113 ± 15
	Лаксогенин	112 ± 12	115 ± 16	115 ± 16
	Лигандрол	108 ± 11	108 ± 11	108 ± 11
	Остарин	102 ± 9	105 ± 10	106 ± 10
HLB	Андарин	105 ± 6	106 ± 7	107 ± 7
	Ибутаморен	104 ± 15	114 ± 16	114 ± 16
	Лаксогенин	115 ± 16	115 ± 16	115 ± 16
	Лигандрол	112 ± 14	112 ± 14	112 ± 14
	Остарин	109 ± 11	111 ± 12	111 ± 12

Таблица 5

Аналитические характеристики методики

Table 5

Analytical characteristics of the procedure

Патрон	Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2	Матричные эффекты, %
С8	Андарин	0.5	1	1–50	0.999	89 ± 10
	Ибутаморен	0.5	1	1–50	0.999	104 ± 6
	Лаксогенин	0.25	1	1–50	0.996	108 ± 8
	Лигандрол	0.5	2.5	2.5–50	0.999	105 ± 7
	Остарин	0.1	0.5	0.5–25	0.998	92 ± 8
С18	Андарин	0.5	1	1–50	0.999	90 ± 10
	Ибутаморен	0.5	1	1–50	0.998	109 ± 8
	Лаксогенин	0.5	1	1–50	0.997	112 ± 12
	Лигандрол	0.5	2.5	2.5–50	0.999	110 ± 11
	Остарин	0.1	0.5	0.5–25	0.998	94 ± 8
HLB	Андарин	0.5	2.5	2.5–50	0.999	95 ± 6
	Ибутаморен	0.25	0.5	0.5–50	0.999	105 ± 7
	Лаксогенин	0.25	1	1–50	0.997	113 ± 12
	Лигандрол	0.5	2.5	2.5–50	0.999	101 ± 6
	Остарин	0.1	0.5	0.5–25	0.998	94 ± 7

0.5 мл метанола достаточно для количественного извлечения целевых соединений с патронов.

Во время хроматомасс-спектрометрического анализа отсутствовали пики компонентов, мешающие определению целевых аналитов. Это свидетельствует о том, что выбранные условия отвечают требованиям селективности и компоненты матрицы мочи не оказывают мешающего влияния при поведении анализа.

Предел обнаружения находили как минимальное обнаруживаемое содержание аналита (при соотношении сигнал : шум = 3 : 1) в моче. Предел определения соответствует минимальному содержанию

аналита, определяемому с погрешностью менее 15 %. Пределы обнаружения и определения наряду с линейным диапазоном устанавливали путем анализа градуировочных растворов. Матричные эффекты оценивали сопоставлением аналитических сигналов, полученных в модельных растворах и в образцах мочи, и рассчитывали по формуле $ME (\%) = (A/B) \cdot 100$, где A – площадь пика аналита в матричном растворе, B – площадь пика аналита в модельном растворе [31, 32]. Полученные результаты показаны в табл. 5. Из представленных результатов видно, что использование патрона Oasis HLB является наиболее оптимальным, хотя приме-

Таблица 6

Валидационные характеристики методики при использовании патрона Oasis HLB ($n = 18$)

Table 6

Validation characteristics of the procedure with the use of Oasis HLB cartridge ($n = 18$)

Аналит	Введе- но, нг/ мл	В один день			В разные дни		
		Найдено, нг/мл	Правиль- ность, %	Воспроизво- димость, %	Найдено, нг/мл	Правиль- ность, %	Воспроизво- димость, %
Андарин	5	5.2 ± 0.6	2.9	9.3	5.3 ± 0.2	6.0	14.1
	10	9.9 ± 0.4	-0.8	3.5	10 ± 1	1.2	12.1
	25	25 ± 1	1.5	2.7	26 ± 3	2.5	14.2
Ибутаморен	2.5	2.5 ± 0.1	-1.6	3.8	2.4 ± 0.3	-4.6	14.4
	10	9.8 ± 0.3	-1.5	3.0	10 ± 1	-2.5	12.9
	25	25 ± 1	1.0	2.5	25 ± 3	0.7	14.3
Лаксогенин	2.5	2.5 ± 0.4	2.0	14.3	2.4 ± 0.2	-4.9	9.7
	10	10.2 ± 0.8	1.8	7.9	10 ± 1	0.1	10.3
	25	24 ± 1	-3.7	4.7	24 ± 2	-4.3	9.0
Лигандрол	5	5.1 ± 0.3	1.8	6.8	5.2 ± 0.4	3.1	8.7
	10	9.9 ± 0.3	-1.1	3.1	10 ± 1	0.0	14.8
	25	25 ± 1	0.9	3.0	25 ± 3	1.5	14.7
Остарин	1	0.89 ± 0.09	-8.9	12.6	1.14 ± 0.09	9.5	14.2
	5	5.2 ± 0.2	5.0	4.6	5.5 ± 0.2	4.5	11.3
	10	10.4 ± 0.1	4.4	1.4	10.7 ± 0.7	8.1	7.7

нение остальных патронов также привело к удовлетворительным результатам. Полученные результаты могут быть связаны с близким, гидрофобным, механизмом удерживания аналитов при использовании исследуемых патронов.

Для оценки правильности и воспроизводимости результатов анализа готовили тестовые растворы с содержанием аналитов, соответствующим нижней, средней и верхней областям линейного диапазона концентраций. Анализ растворов прово-

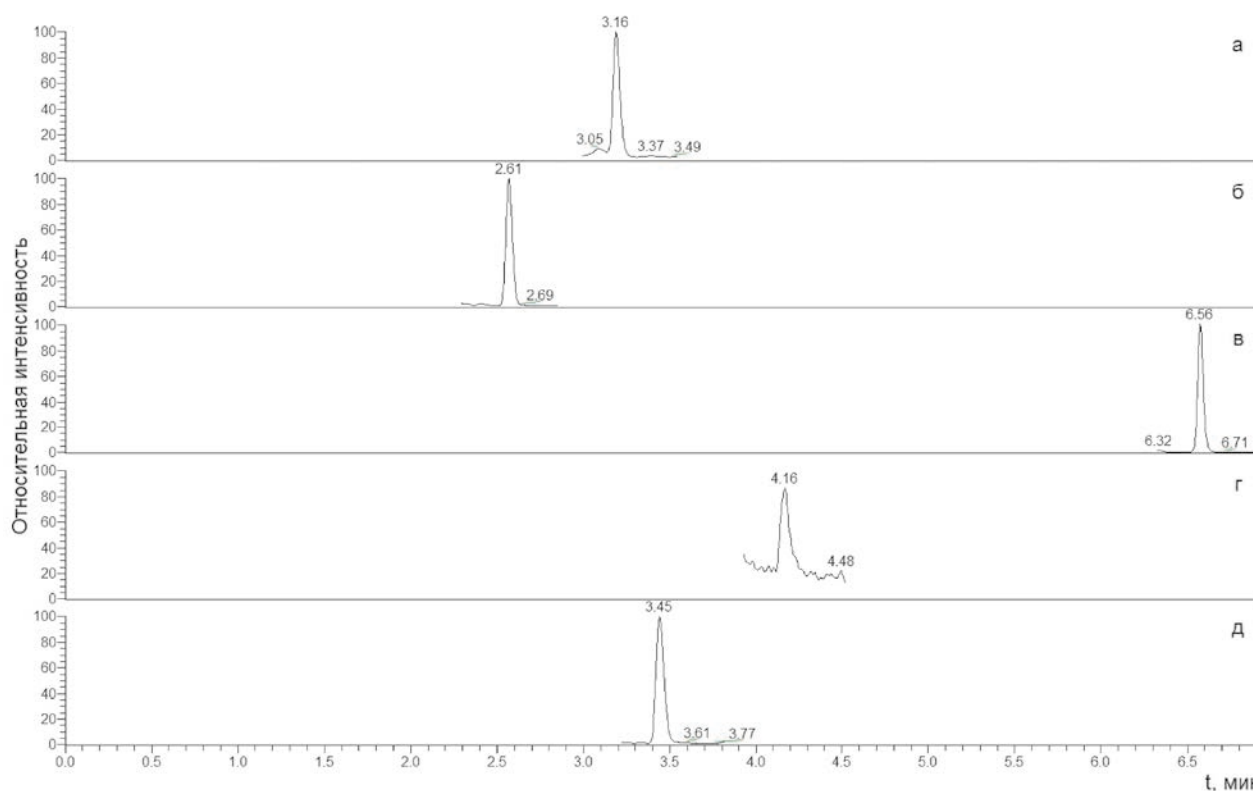


Рис. 2. Хроматограммы проб мочи после однократного перорального употребления 15 мг действующего вещества: а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – остарин

Fig. 2. Chromatograms of real samples after single 15 mg oral administration of the drug: a – Andarine; b – lbutamoren; c – Laxogenin; d – Ligandrol; e – Ostarine

дили в течение одного дня и в различные дни [33]. Полученные результаты при использовании в методике патрона Oasis HLB представлены в табл. 6.

С использованием предложенной методики были проанализированы образцы мочи, полученные от добровольцев спустя 12 часов после употребления 15 мг действующего вещества. При проведении анализа было установлено, что содержания андарина, остарина, лигандрола и лаксогена в моче добровольцев находятся в линейном диапазоне градуировочных зависимостей, в то время как для образца, содержащего ибутаморен, потребовалось 20-кратное разбавление для попадания в линейный диапазон (рис. 2).

Благодарности

Исследования проводились в рамках выполнения проекта № 4.2612.2017/ПЧ Минобрнауки РФ и финансовой поддержке РФФИ (проект 16-43-230404 p_a), с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета (уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008).

Acknowledgements

The studies were carried out within the framework of the project No. 4.2612.2017 / PCh of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation and the financial support of the RFBR, project No. 16-43-230404 p_a, using the scientific equipment of the Central Ecological and Analytical Center of the Kuban State University, the unique identifier RFMEFI59317X0008.

ЛИТЕРАТУРА

- Narayanan R., Coss C.C., Dalton J.T. Development of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018. V. 465. P. 134-142.
- A selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception / J. Chen [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005. V. 312. P. 546-553.
- Segal S., Narayanan R., Dalton J.T. Therapeutic potential of the SARMs: revisiting the androgen receptor for drug discovery // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2006. V. 15. P. 377-387.
- Discovery of Nonsteroidal Androgens / J.T. Dalton [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. P. 1-4.
- Discovery of a Potent, Orally Active, Nonsteroidal Androgen Receptor Agonist: 4-Ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-6-(trifluoromethyl)-8-pyridono[5,6-g]-quinoline (LG121071) / L.G. Hamann [et al.] // *J. Med. Chem.* 1999. V. 42. P. 210-212.
- New nonsteroidal androgen receptor modulators based on 4-(trifluoromethyl)-2(1H)-pyrrolidino[3,2-g] quinolinone / J.P. Edwards [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. V. 8. P. 745-750.
- Negro-Vilar A., Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): A Novel Approach to Androgen Therapy for the New Millennium // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. V. 84. P. 3459-3462.
- Bone Anabolic Effects of S-40503, a Novel Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulator (SARM), in Rat Mod-

- els of Osteoporosis / K. Hanada [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* 2003. V. 26. P. 1563-1569.
- Synthesis and SAR of novel hydantoin derivatives as selective androgen receptor modulators / X. Zhang [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. V. 16. P. 5763-5766.
- Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010–2013 / O. Krug [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2014. V. 70. P. 1303-1311.
- Zhang X., Sui Z., Deciphering the selective androgen receptor modulators paradigm // *Expert Opin Drug Discov.* 2013. V. 8. P. 191-218.
- Selective androgen receptor modulators for the prevention and treatment of muscle wasting associated with cancer / J.T. Dalton [et al.] // *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 2013. V. 7. P. 345-351.
- Design, Synthesis, and Preclinical Characterization of the Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) RAD140 / C.P. Miller [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* 2010. V. 2. P. 124-129.
- Synthesis of potent, substituted carbazoles as selective androgen receptor modulators (SARMs) / C.P. Miller [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 7516-7520.
- A novel selective androgen receptor modulator, NEP28, is efficacious in muscle and brain without serious side effects on prostate / K. Akita [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* 2013. V. 720. P. 107-114.
- Discovery of the Selective Androgen Receptor Modulator MK-0773 Using a Rational Development Strategy Based on Differential Transcriptional Requirements for Androgenic Anabolism Versus Reproductive Physiology / A. Schmidt [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 17054-17064.
- World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard. [Электронный ресурс]: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf (дата обращения 05.07.2018).
- A convenient procedure for the synthesis of 3b-hydroxy-6-oxo-5a-steroids. Application to the synthesis of laxogenin / M.A. Iglesias-Arteaga [et al.] // *J. Braz. Chem. Soc.* 2005. V. 16.
- Bajguz A., Tretyn A., The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants // *Phytochemistry.* 2003. V. 62. P. 1027-1046.
- MK-0677 (ibutamoren mesylate) for the treatment of patients recovering from hip fracture: A multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIb study / A. Adunsky [et al.] // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2011. V. 53. P. 183-189.
- Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Matuszewski B.K., Determination of a novel growth hormone secretagogue (MK-677) in human plasma at picogram levels by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997. V. 693. P. 131-137.
- Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes: Equine urinary metabolites of SARMs / A. Hansson [et al.] // *Drug. Test. Anal.* 2015. V. 7. P. 673-683.
- SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report / E. Grata [et al.] // *Forensic. Sci. Int.* 2011. V. 213. P. 104-108.
- Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample: Detection of S-4 (Andarine) in a doping control sample / A.T. Cawley [et al.] // *Drug. Test. Anal.* 2016. V. 8. P. 256-261.
- Cox H.D., Eichner D., Detection of LGD-4033 and its metabolites in athlete urine samples // *Drug. Test. Anal.* 2017. V. 9. P. 127-134.

26. Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G. Urinary metabolism of ibutamoren, a small molecule growth hormone secretagogue // *Recent Advances in Doping Control*. 2013. P. 182-186.

27. Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens / M. Thevis [et al.] // *Drug. Test. Anal.* 2010. V. 2. P. 589-598.

28. Thevis M., Kamber M., Schänzer W., Screening for metabolically stable aryl-propionamide derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes // *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 20. P. 870-876.

29. Применение УВЭЖХ-МС/МС для определения в моче некоторых анаболических агентов и ноотропов / Е.В. Дмитриева [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2018. Т. 22. С. 28-34.

30. Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods / V. Viette [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011. V. 49. P. 1091-1103.

31. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry / H. Truffelli [et al.] // *Mass. Spectrom. Rev.* 2011. V. 30. P. 491-509.

32. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 3019-3030.

33. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, USA. [Электронный ресурс]: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance-compliance/regulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (дата обращения 05.07.2018).

REFERENCES

- Narayanan R., Coss C.C., Dalton J.T. [Development of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs)]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2018, vol. 465, pp. 134-142. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.013.
- Chen J., Hwang D.J., Bohl C.E., Miller D.D., Dalton J.T. [A selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, vol. 312, no. 2, pp. 546-553. doi: 10.1124/jpet.104.075424.
- Segal S., Narayanan R., Dalton J.T. [Therapeutic potential of the SARMs: revisiting the androgen receptor for drug discovery]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2006, vol. 15, no. 4, pp. 377-387. doi: 10.1517/13543784.15.4.377.
- Dalton J.T., Mukherjee A., Zhu Z., Kirkovsky L., Miller D.D. [Discovery of nonsteroidal androgens]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, vol. 244, no. 1, pp. 1-4. doi: 10.1006/bbrc.1998.8209.
- Hamann L.G., Mani N.S., Davis R.L., Wang X.N., Marschke K.B., Jones T.K. [Discovery of a potent, orally active, nonsteroidal androgen receptor agonist: 4-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-6-(trifluoromethyl)-8-pyridono[5,6-g]-quinoline (LG121071)]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999, vol. 42, no. 3, pp. 210-212. doi: 10.1021/jm9806648.
- Edwards J.P., West S.J., Pooley C.L.F. [New nonsteroidal androgen receptor modulators based on 4-(trifluoromethyl)-2(1H)-pyrrolidino[3,2-g]quinolinone]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998, vol. 8, pp. 745-750.
- Negro-Vilar A. [Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999, vol. 84, no. 10, pp. 3459-3462. doi: 10.1210/jcem.84.10.6122.
- Hanada K., Furuya K., Yamamoto N., Nejishima H., Ichikawa K., Nakamura T., Miyakawa M., Amano S., Sumita Y., Oguro N. [Bone anabolic effects of S-40503, a novel nonsteroidal selective androgen receptor modulator (SARM), in rat models of osteoporosis]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2003, vol. 26, no. 11, pp. 1563-1569.
- Zhang X., Allan G.F., Sbriscia T., Linton O., Lundeen S.G., Sui Z. [Synthesis and SAR of novel hydantoin derivatives as selective androgen receptor modulators]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, vol. 16, no. 22, pp. 5763-5766. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.08.084.
- Krug O., Thomas A., Walpurgis K., Piper T., Sigmund G., Schänzer W., Laussmann T., Thevis M. [Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010-2013]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2014, vol. 70, no. 11, pp. 1303-1311. doi: 10.1007/s00228-014-1743-5.
- Zhang X., Sui Z. [Deciphering the selective androgen receptor modulators paradigm]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 191-218. doi: 10.1517/17460441.2013.741582.
- Dalton J.T., Taylor R.P., Mohler M.L., Steiner M.S. [Selective androgen receptor modulators for the prevention and treatment of muscle wasting associated with cancer]. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 2013, vol. 7, no. 4, pp. 345-351. doi: 10.1097/SPC.0000000000000015.
- Miller C.P., Shomali M., Lyttle C.R., O'Dea L.S., Herendeen H., Gallacher K., Paquin D., Compton D.R., Sahoo B., Kerrigan S.A., Burge M.S., Nickels M., Green J.L., Katzenellenbogen J.A., Tchesnokov A., Hattersley G. [Design, synthesis, and preclinical characterization of the selective androgen receptor modulator (SARM) RAD140]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2010, vol. 2, no. 2, pp. 124-129. doi: 10.1021/ml1002508.
- Miller C.P., Bhaket P., Muthukaman N., Lyttle C.R., Shomali M., Gallacher K., Slocum C., Hattersley G. [Synthesis of potent, substituted carbazoles as selective androgen receptor modulators (SARMs)]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, vol. 20, no. 24, pp. 7516-7520. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.09.140.
- Akita K., Harada K., Ichihara J., Takata N., Takahashi Y., Saito K. [A novel selective androgen receptor modulator, NEP28, is efficacious in muscle and brain without serious side effects on prostate]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, vol. 720, no. 1-3, pp. 107-114. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.042.
- Schmidt A., Kimmel D.B., Bai C., Scafonas A., Rutledge S., Vogel R.L., McElwee-Witmer S., Chen F., Nantermet P.V., Kasparcova V., Leu C.T., Zhang H.Z., Duggan M.E., Gentile M.A., Hodor P., Pennypacker B., Masarachia P., Opas E.E., Adamski S.A., Cusick T.E., Wang J., Mitchell H.J., Kim Y., Prueksaranont T., Perkins J.J., Meissner R.S., Hartman G.D., Freedman L.P., Harada S., Ray W.J. [Discovery of the selective androgen receptor modulator MK-0773 using a rational development strategy based on differential transcriptional requirements for androgenic anabolism versus reproductive physiology]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, no. 22, pp. 17054-17064. doi: 10.1074/jbc.M109.099002.
- World Anti-Doping Agency. *The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard*. Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf (Accessed 5 July 2018).
- Iglesias-Arteaga M.A., Simuta-Lopez E.M., Xochihua-Moreno S., Viñas-Bravo O., Smith S.M., Reyes S.M., Sandoval-Ramírez J. [A convenient procedure for the synthesis of 3b-hydroxy-6-oxo-5a-steroids. Application to the synthesis of laxogenin]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, vol. 16, no. 3. doi: 10.1590/S0103-50532005000300011.

19. Bajguz A., Tretyn A. [The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants]. *Phytochemistry*, 2003, vol. 62, pp. 1027-1046.
20. Adunsky A., Chandler J., Heyden N., Lutkiewicz J., Scott B.B., Berd Y., Liu N., Papanicolaou D.A. [MK-0677 (ibutamoren mesylate) for the treatment of patients recovering from hip fracture: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIb study]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2011, vol. 53, no. 2, pp. 183-189. doi: 10.1016/j.archger.2010.10.004.
21. Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Matuszewski B.K. [Determination of a novel growth hormone secretagogue (MK-677) in human plasma at picogram levels by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, vol. 693, no. 1, pp. 131-137.
22. Hansson A., Knych H., Stanley S., Thevis M., Bondesson U., Hedeland M. [Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes]. *Drug Testing Analysis*, 2015, vol. 7, no. 8, pp. 673-683. doi: 10.1002/dta.1768.
23. Grata E., Perrenoud L., Saugy M., Baume N. [SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: a case report]. *Forensic Science International*, 2011, vol. 213, no. 1-3, pp. 104-108. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.07.014.
24. Starcevic B., Ahrents B.D., Butch A.W. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample. *Drug Testing Analysis*, 2013, vol. 5, no. 5, pp. 377-379. doi: 10.1002/dta.1466.
25. Cox H.D., Eichner D. [Detection of LGD-4033 and its metabolites in athlete urine samples]. *Drug Testing and Analysis*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 127-134. doi: 10.1002/dta.1986.
26. Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G. [Urinary metabolism of ibutamoren, a small molecule growth hormone secretagogue]. *Recent advances in Doping Control*, 2013, pp. 182-186.
27. Thevis M., Gerace E., Thomas A., Beuck S., Geyer H., Schlörer N., Kearbey J.D., Dalton J.T., Schänzer W. [Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens]. *Drug Testing Analysis*, 2010, vol. 2, no. 11-12, pp. 589-598. doi: 10.1002/dta.211.
28. Thevis M., Kamber M., Schänzer W. [Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, vol. 20, no. 5, pp. 870-876. doi: 10.1002/rcm.2389.
29. Dmitrieva E.V., Temerdashev A.Z., Azaryan A.A., Gashimova E.M. [UHPLC-MS/MS method application for the determination of several anabolic agents and nootropics in the urine]. *Analytics and Control*, 2018, vol. 22, no. 1, pp. 28-34. doi: <http://dx.doi.org/10.15826/analitika.2018.22.1.005> (in Russian).
30. Viette V., Fathi M., Rudaz S., Hochstrasser D., Veuthey J.L. [Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, vol. 49, no. 7, pp. 1091-1103. doi: 10.1515/CCLM.2011.182.
31. Trufelli H., Palma P., Famigliini G., Cappiello A. [An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011, vol. 30, no. 3, pp. 491-509. doi: 10.1002/mas.20298.
32. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. [Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS]. *Analytical Chemistry*, 2003, vol. 75, no. 13, pp. 3019-3030.
- 33 FDA. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, USA. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (Accessed 5 July 2018).