

АНТИДОПИНГОВЫЙ АНАЛИЗ НА XXII ОЛИМПИЙСКИХ И XI ПАРАЛИМПИЙСКИХ ЗИМНИХ ИГРАХ 2014 ГОДА В СОЧИ

Т.Соболевский, к.х.н., Г.Кротов, к.б.н., М.Дикунец, к.х.н., М.Никитина, к.б.н., Е.Мочалова, Г.Родченков, к.х.н., ФГУП "Антидопинговый центр"
sobolevsky@dopingtest.ru

Антидопинговый анализ – обязательная процедура, сопровождающая современные спортивные состязания. На играх 2014 года в Сочи антидопинговый анализ проводился в Олимпийской антидопинговой лаборатории, расположенной на строго охраняемой территории Олимпийского Парка. Лаборатория, спроектированная и оснащенная в соответствии с международными стандартами, была аккредитована Всемирным антидопинговым агентством для проведения анализов во время игр. Четырехэтажное здание лаборатории вместило в себя самое передовое аналитическое и биохимическое оборудование и стало центром научного сотрудничества для 50 российских специалистов и 25 международных экспертов из 14 стран. В ходе игр проведен анализ 2537 проб мочи и 687 проб крови. Получено беспрецедентное число положительных результатов на содержание запрещенных веществ, обнаружены псевдоэфедрин, метилгексанамин, эритропоэтин, триметазидин, дигидрохлорметилтестостерон, клостебол, а также дизайнерский стимулятор N-этил-1-фенилбутан-2-амин.

После двух лет подготовки и многочисленных инспекций со стороны Международного Олимпийского комитета (МОК) и Всемирного антидопингового агентства (ВАДА), Олимпийская антидопинговая лаборатория в Сочи продемонстрировала полное соответствие требованиям Международного стандарта качества ISO 17025 [1] и Международного стандарта для лабораторий ВАДА (ISL) [2]. Результатом проведенной работы стало получение аккредитации ВАДА на право проведения антидопингового анализа в Сочи в период с 27 января по 15 апреля 2014 года.

Первый этаж здания лаборатории предназначался для приема, регистрации и хранения биопроб, при этом сотрудники служб допинг-контроля привозили пробы на первый

этаж здания через отдельный вход для передачи персоналу лаборатории. Пробы хранили в холодильных и морозильных камерах, оснащенных беспроводной системой температурного контроля, учета открываний и закрытий и системой аварийного оповещения, установленной компанией Testo AG (Ленцкирх, Германия). Наряду с этим была смонтирована холодильная комната для заморозки и хранения проб в крупных транспортных контейнерах до их отгрузки в Лозанну для 10-летнего хранения по окончании Олимпийских (ОИ) и Паралимпийских (ПИ) игр. На первом этаже лаборатории проводили аликвотирование проб мочи и крови, а затем передавали их через специальный лифт для анализа в отделы, расположенные выше.

Второй этаж лаборатории занимал Отдел хромато-масс-спектрометрических методов анализа ("small molecules"). Аналитические приборы производства компаний Thermo Fisher Scientific (Сан-Хосе, США; Бремен, Германия) были представлены в следующем комплекте: четыре газовых хромато-масс-спектрометра (ГХ-МС/МС) Trace 1310/TSQ Quantum XLS Ultra для стероидного анализа, пять жидкостных хромато-масс-спектрометров (СВЭЖХ-МС/МС) Dionex Ultimate 3000/TSQ Vantage для прямого анализа мочи с предварительным разбавлением и анализа мочи после ферментативного гидролиза, два газовых хромато-масс-спектрометра (ГХ-МС) Trace 1310/ISQ (один для определения глицерина, другой – для контроля пробоподготовки для анализа методом масс-спектрометрии изотопных отношений, два полупрепаративных жидкостных хроматографа Dionex Ultimate 3000 для пробоподготовки для анализа методом газовой хроматографии/сжигания/изотопной масс-спектрометрии (ГХ-С-ИМС) и одна система для ГХ-С-ИМС анализа: газовый хроматограф – камера сжигания – масс-спектрометр (carbon isotope ratio mass spectrometry, GC-C-IRMS) – Trace 1310/GC Isolink/ConFlo IV/Delta V Plus.

На третьем этаже лаборатории располагался Отдел пептидного допинга и анализа крови, в том числе инсулинов ("large molecules"). Оборудование включало следующие приборы: система СВЭЖХ-МС/МС Dionex Ultimate 3000/TSQ Quantiva для определения рилизинг-пептидов и факторов гормона роста и система с нанопотоковым жидкостным хроматографом Dionex Ultimate 3000 Nano RSLC/Q Exactive для определения инсулинов. Оборудование для нехроматографических методов анализа состояло из иммунохимического анализатора Cobas E411 компании Roche Diagnostics GmbH (Маннхайм, Германия) для определения хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), двух гематологических анализаторов Sysmex XT-2000i (Кобэ, Япония), проточного цитометра Navios производства Beckman Coulter (Ирландия) для установления факта переливания крови, автоматического иммуноферментного анализатора Personal Lab производства Adaltis (Рим, Италия) для определения активаторов рецепторов эритропоэтина.

Четвертый этаж лаборатории не предназначался для проведения анализов. Здесь рас-

полагались переговорные комнаты, кабинеты административного персонала, специалистов по контролю качества работы лаборатории, независимых наблюдателей, представителей ВАДА, МОК и сервисных инженеров, обеспечивавших бесперебойную работу оборудования.

ВЕЩЕСТВА И МЕТОДЫ

Референсные материалы

Все стандартные образцы приобретены при содействии польского отделения компании LGC Standards. Крупный консолидированный заказ на поставку стандартных образцов включал разных производителей: National Measurement Institute (NMI, Сидней, Австралия), Toronto Research Chemicals Inc. (TRC, Торонто, Канада), Cerilliant (Раунд-Рок, США), Европейскую, Британскую и Американскую Фармакопею, Cayman Chemical Inc. (Анн Арбор, США) и Steraloids (Ньюпорт, Род Айленд, США).

Для идентификации ряда соединений или важных метаболитов, недоступных в виде синтетических сертифицированных стандартов, использовали собственный лабораторный банк референсной мочи.

Лабораторная система управления информацией (ЛИМС)

Для сбора, обработки и хранения информации использовалась лабораторная система ЛИМС, разработанная во ФГУП "АДЦ". Система работала на основе базы данных MySQL с интерфейсом, написанным на языке PHP, функционирующей на компьютере с установленной операционной системой Ubuntu Server. Конфигурация системы предусматривала доступ к ней через браузер с любого ПК в лаборатории после ввода логина и пароля. Каждый пользователь имел собственное уникальное имя пользователя с соответствующим объемом прав и функционала. Любые действия пользователя регистрировались и хранились в базе данных для отслеживания и контроля.

Методология и оборудование

Измерение pH и удельной плотности. Измерение pH и удельной плотности проб мочи проводили при помощи двух систем LiQC, состоящих из денситометра DE40, устройства для смены проб SC30 и прибора для измерения pH производства компании Mettler Toledo (Грайфензее, Швейцария). Измерение

pH и удельной плотности каждой пробы (6 мл) проводили однократно. Результаты измерений экспортировали в ЛИМС. Из-за низкой скорости измерения (около 3 мин на пробу) показатели удельной плотности мочи были недоступны до распределения аликвот для анализа.

Процедура А – ГХ-МС/МС. Подготовку проб мочи проводили в соответствии с общепринятыми процедурами [3] с незначительными изменениями: к 3 мл мочи добавляли 1 мл фосфатного буферного раствора (0,8 М; pH 6,3), содержащего 30 мкл β-глюкуронидазы и 150 нг метилтестостерона, а также 50 мкл смеси внутренних стандартов (d₅-андростерон глюкуронид, d₅-эпиандростерон, d₃-тестостерон, d₃-эпитестостерон, d₃-5α-андростан-3α,17β-диол). После проведения ферментативного гидролиза (1 ч, 55°C) добавляли 1 мл карбонатного буферного раствора (3 М, pH 10), далее проводили жидкостно-жидкостную экстракцию 5 мл диэтилового эфира с добавлением Na₂SO₄. После упаривания органического слоя при температуре 70°C к сухому остатку добавляли 50 мкл свежеприготовленного раствора для дериватизации (МСТФА/NH₄I/дитиотритол, 1000 : 2 : 1,5 об.%), реакционную смесь выдерживали при температуре 70°C в течение 20 мин, затем ее охлаждали и переносили в виалу с интегрированной силанизированной вставкой для проведения ГХ-МС/МС анализа.

Проба для контроля качества представляла собой приготовленную в лабораторных условиях бланковую мочу, в которую были добавлены коммерчески доступные стандартные образцы на минимально требуемом пределе обнаружения [4] или ниже. Количественное определение эндогенных стероидов (стероидный профиль) проводили с использованием калибровки по одной точке. Концентрация стероидов в образце контроля качества была следующей: андростерон и этиохоланолон 2500 нг/мл, тестостерон 50 нг/мл, эпитестостерон 10 нг/мл, 5α-андростан-3α,17β-диол 50 нг/мл, 5β-андростан-3α,17β-диол 200 нг/мл, дегидроэпиандростерон 100 нг/мл, 5α-дигидротестостерон 10 нг/мл, 7β-гидроксидегидроэпиандростерон 100 нг/мл, прегнандиол 900 нг/мл, 5α-андрост-16-ен-3α-ол 500 нг/мл, 11β-гидроксиандростерон 1000 нг/мл, 11β-гидроксиэтиохоланолон

250 нг/мл, 5β-андростан-3,17-дион 20 нг/мл и форместан 50 нг/мл.

Разделения ТМС-производных методом ГХ-МС/МС проводили на колонке HP Ultra-1 17 м × 0,2 мм × 0,11 мкм (Agilent, США). Режим программирования температуры: начальная температура колонки 178°C, нагрев до 234°C со скоростью 4°C/мин, затем до 310°C – 20°C/мин, изотерма 4,2 мин. Температура интерфейса – 300°C, температура инжектора – 250°C, скорость потока газа-носителя (гелий 99,9999%) – 0,6 мл/мин, объем вводимой реакционной смеси 1 мкл, деление потока 1 : 20. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в условиях электронной ионизации с регистрацией выбранных селективных реакций. Давление газа для соударений составляло 1 мТорр (аргон 99,9995%). Время одного анализа 22 мин, в сутки анализировали 60 проб, скрининговый анализ проводили на трех приборах, четвертый использовали для проведения подтверждающих анализов.

Процедура В – СВЭЖХ-МС/МС. Подготовку проб мочи к анализу проводили в соответствии с методикой [5] с небольшими изменениями: к 3 мл мочи добавляли 1 мл фосфатного буферного раствора (0,8 М, pH 6,3), содержащего 30 мкл β-глюкуронидазы и 150 нг метилтестостерона. Смесь инкубировали на водяной бане в течение 1 ч при температуре 55°C. После ферментативного гидролиза образец подщелачивали 1 мл карбонатного буферного раствора (3 М, pH 10), добавляли Na₂SO₄ и проводили жидкостно-жидкостную экстракцию 5 мл диэтилового эфира в течение 20 мин. После упаривания органического слоя при температуре 70°C сухой остаток растворяли в 50 мкл метанола и 50 мкл воды, полученный экстракт переносили в виалу. С каждой партией проб мочи проводили пробоподготовку и анализ образцов контроля качества (положительный и отрицательный).

Для разделения соединений использовали колонку Acquity UPLC VEN C18 2,1 × 100 мм, размер частиц 1,7 мкм (Waters, Ирландия) с предколонкой VEN C18 20 × 2,1 мм. Для понижения общего рабочего давления системы использовали термостатирование колонки (60°C). Объем пробы – 5 мкл. Скорость потока – 0,35 мл/мин. Для хроматографического разделения веществ использовали следующую программу гради-

ентного элюирования: 0–0,50 мин – 70% (А), 0,5–7,50 мин – 5% (А), 7,51–10 мин – 70% (А), где (А) – 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, (В) – 0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 10 мин. Анализ методом СВЭЖХ-МС/МС проводили в условиях электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком (HESI) в режиме регистрации выбранных селективных реакций с регистрацией отрицательных или положительных ионов, то есть каждая проба анализировалась дважды. Давление газа для соударений составляло 1 мТорр (аргон 99,9995%). Температура фокусирующего капилляра составляла 370°C, температура в камере ионизации 300°C, напряжение на капилляре в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов 4 и 3 кВ соответственно.

Процедура С – СВЭЖХ-МС/МС (прямой анализ мочи). Применяли методику прямого анализа мочи с предварительным разбавлением [6, 7]. Подготовку проб мочи проводили следующим образом: к 0,2 мл мочи добавляли 0,8 мл подвижной фазы, содержащей воду/метанол (объемное содержание 97/3) с 0,1% раствора муравьиной кислоты и внутренние стандарты мефрузид и бупранолол. После перемешивания пробы центрифугировали со скоростью 14 000 об/мин и около 0,8 мл смеси перенесли в стеклянную виалу для анализа. Каждая партия проб включала образцы контроля качества (положительный и отрицательный), включая калибровку для определения концентраций глюкуронида и сульфата этанола.

Хроматографическое разделение проводили с применением хроматографических колонок и растворителей, которые использовали в процедуре В, только программа градиентного элюирования начиналась с 95% (А) и объем вводимой пробы составлял 10 мкл. Масс-спектрометрические условия аналогичны условиям процедуры В. Для детектирования разных классов соединений использовали различные методы: диуретики определяли в основном регистрацией отрицательных ионов в условиях электрораспылительной ионизации, стимуляторы и наркотические вещества – регистрацией положительных ионов в условиях электрораспылительной ионизации,

и бета-блокаторы – регистрацией положительных ионов в условиях электрораспылительной ионизации. Таким образом, каждую пробу вводили как минимум дважды.

Процедура D – ГХ-МС разбавленной мочи. Подготовку проб мочи проводили следующим образом: к 10 мкл предварительно разбавленной мочи (оставшейся после процедуры С) добавляли 30 мкл раствора (А) внутреннего стандарта (¹³C₆-глюкоза, 20 нг/мкл) и 0,45 мл раствора 2,3 М соляной кислоты. После 20 мин выдерживания при температуре 110°C в плотно закрытых пробирках пробы центрифугировали и охлаждали до комнатной температуры. Кислоту упаривали почти досуха при пониженном давлении и температуре 75°C, далее добавляли 30 мкл раствора (В) внутреннего стандарта (d₅-глицерин, 8 нг/мкл) и упаривали досуха при тех же условиях. К сухому остатку добавляли 50 мкл МСТФА/NH₄I/дифитотреитол, реакционную смесь выдерживали при температуре 70°C в течение 30 мин, затем ее охлаждали и переносили в виалу с интегрированной силанизированной вставкой для проведения ГХ-МС анализа. Количественное определение глицерина проводили с применением калибратора по одной точке.

Для разделения веществ использовали колонку HP-Ultra 1, 17 м × 0,2 мм × 0,11 мкм (Agilent J&W, Пало Альто, США). Режим программирования температуры: начальная температура колонки 100°C, изотерма 1 мин, нагрев до 250°C со скоростью 15°C/мин, затем до 300°C – 40°C/мин, изотерма 1 мин. Температура интерфейса – 300°C, температура инжектора – 250°C, скорость потока газа-носителя (гелий 99,9999%) – 0,6 мл/мин, объем вводимой реакционной смеси 1 мкл, деление потока 1 : 20. Масс-спектрометр работал в режиме полного сканирования. Один цикл анализа в 13,2 мин позволял анализировать до 80 проб в день. Для удвоения производительности процедуры проводили смешивание аликвот двух проб. В случае возникновения подозрений производился отдельный повторный анализ этой пары проб.

Процедура E – ГХ-С-ИМС. Подготовку проб мочи проводили в соответствии с [8]. В зависимости от концентрации метаболитов стероидов объем аликвоты образца мочи варьировали

от 10 до 40 мл. При подготовке проб использовали двухфазную очистку методом жидкостной хроматографии, при этом все стероиды анализировали в виде эфиров уксусной кислоты. Помимо основных метаболитов тестостерона определяли изотопные соотношения атомов углерода для молекул 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол и 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол в связи с тем, что данные вещества считаются наиболее чувствительными маркерами применения экзогенного тестостерона [9].

Процедура F - определение эритропоэтина в крови и моче. Обязательную аналитическую процедуру определения рекомбинантного эритропоэтина (ЭПО) проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии лаурилсаркозината натрия (SAR-PAGE) [10, 11], но с небольшими изменениями. После иммуноаффинной очистки ЭПО, выделенного из мочи, сыворотки или плазмы, проводили электрофоретическое разделение полученного материала с помощью 10% предварительно залитых Bis-Tris гелей компании Bio-Rad (Геркулес, Калифорния, США). Далее проводили вестерн-блоттинг с последующей хемилюминесцентной детекцией.

Подтверждающий анализ для определения ЭПО в моче проводили методом изоэлектрического фокусирования [12] наряду с методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) или лаурилсаркозината натрия (SAR-PAGE) с последующим вестерн-блоттингом новой аликвоты пробы, прошедшей иммуноаффинную очистку. Процедуру подтверждающего анализа для определения ЭПО в сыворотке или плазме крови проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) или лаурилсаркозината натрия (SAR-PAGE) [13]. Для иммуноаффинной очистки применяли два подхода: с использованием набора для очистки ЭПО от компании MAIA Diagnostics (Уппсала, Швеция) и набора для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) от компании StemCell Technologies (Ванкувер, Канада). Для подготовки проб сыворотки и плазмы крови применяли только набор для очистки ЭПО MAIA, тогда как для проб мочи использовали оба подхода.

Электрофоретическую подвижность ЭПО в пробах соотносили с таковой для стандартов

и фармацевтических препаратов: стандарт ЭПО, стандарт мочевого ЭПО, ЕРО-Fc, NESP, Дуперо и MIRCERA.

Процедура G - ХГЧ. Определение концентрации хорионического гонадотропина (ХГЧ) проводили с помощью двухэтапного сэндвич-иммуноанализа на приборе Cobas E411 компании Roche Diagnostics GmbH (Базель, Швейцария). С помощью набора "HCG+ β " определяли концентрацию бета субъединицы ХГЧ в пробах мочи мужчин. В случае превышения порогового значения 5 мМЕ/мл проводили подтверждающий анализ, оценивая концентрацию интактной молекулы ХГЧ с помощью набора "HCG STAT". В качестве внешних контрольных образцов использовали LipoCheck компаний Bio-Rad (Ирвин, Калифорния, США) и Randox компаний Randox (Энтрим, Великобритания).

Процедура H - пептидные препараты с низкой молекулярной массой. Для обнаружения низкомолекулярных пептидов (GHRP) проводили следующую процедуру: 1 мл пробы мочи, в которой pH предварительно доводили до значений 6,0–6,5, подвергали твердофазной экстракции на слабых катионо-обменных картриджах Oasis WCX (Waters, Милфорд, США). Элюат упаривали в вакуумном центрифужном выпаривателе Genevac miVac (Эрезинг, Германия) при температуре 45°C до конечного объема 10–30 мкл и перерастворяли в 50 мкл 2%-ной уксусной кислоты. Для анализа использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф Dionex 3000 RS (Thermo Scientific, Гемеринг, Германия), соединенный с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Scientific, США). Ионизацию детектируемых соединений проводили с использованием электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком в режиме детектирования положительно заряженных ионов. Для повышения чувствительности и селективности анализа применяли режим мониторинга селективных реакций. Для хроматографического разделения компонентов использовали колонку Zorbax 300 SB-C18, 1 \times 50 мм, с размером частиц 3,5 мкм (Agilent, Санта Клара, США) с предколонкой Stable Bond Guard, 1 \times 17 мм, с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижных фаз использовали

0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитриле (В) со скоростью потока 0,35 мл/мин. Градиентное элюирование проводили от 5% В линейно до 95% в течение 7 мин, общее время анализа – 12 мин.

Процедура К – инсулины и прочие пептидные препараты с промежуточной молекулярной массой. Подготовку проб мочи проводили в соответствии с работой [15]. Для снижения адсорбции определяемых соединений при хранении рабочих растворов стандартных веществ и в процессе пробоподготовки использовали пластиковые пробирки с низкой связывающей активностью LoBind (Eppendorf, Германия).

Анализ проводили с применением масс-спектрометра высокого разрешения Q Exactive (Thermo Scientific, Бремен, Германия) с жидкостным нанопотоковым хроматографом Dionex Ultimate 3000 Nano RSLC (Гермеринг, Германия). Ионный источник Nanospray Flex Ion со стальными эмиттерами использовали для положительной ионизации определяемых соединений. Один скан состоял из двух аналитических сегментов: сканирование по полному ионному току в диапазоне масс 350–1500 с разрешением 70 000 и мониторинг выделенных многозарядных ионов аналитов (ширина изоляции ионов 4 Да, разрешение 35 000) с последующим сканированием фрагментных ионов (tSIM – ddMS2).

Предколонку Acclaim PepMap 100 C18, 75 мкм × 2 см, размер частиц 3 мкм производства компании Thermo Fisher Scientific (Амстердам, Нидерланды) использовали для предварительного концентрирования проб, хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке Zorbax 300 SB-C18, 75 мкм × 150 мм, размер частиц 3,5 мкм производства компании Agilent (Санта Клара, США). В качестве подвижных фаз использовали 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитриле (В) со скоростью потока 0,35 нл/мин. Градиентное элюирование от 5 до 95% в фазе В проводили в течение 20 мин, общее время анализа составило 38 мин.

Процедура L – активатор рецепторов эритропоэтина длительного действия (CERA). Определение MIRCERA в сыворотке крови проводили с помощью набора MIRCERA ELISA про-

изводства компании MicroCoat (Пенцберг, Германия) согласно рекомендациям производителя на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal Lab производства Adaltis (Рим, Италия). В случае обнаружения в пробе CERA выше 50 пкг/мл проводили подтверждающий анализ с помощью процедуры F.

Процедура M – переносчики кислорода на основе гемоглобина (HBOCs). Процедуру предварительного скрининга проб крови на наличие свободного гемоглобина проводили на спектрофотометре WPA Biowave II производства компании Biochrom (Кэмбридж, Великобритания) при длине волны 405 нм. Пробы, у которых оптическая плотность была выше 0,35 оптических единиц, подлежали дальнейшему электрофоретическому анализу.

Подтверждающий анализ выполняли с использованием агарозного геля Hydragel Hemoglobin производства компании Sebia (Седекс, Франция) по методу Ф.Лань и соавторов [16] с небольшими изменениями. Отрицательную контрольную сыворотку HUMAN SERUM компании SIGMA-ALDRICH (Миссури, США) использовали в качестве отрицательной контрольной пробы, тогда как положительной контрольной пробой был препарат Геленпол, введенный в плазму крови до конечной концентрации 3 г/л.

Процедура N – трансфузия. Определение трансфузии гомологичной крови проводили в пробах цельной крови, устанавливая фенотип эритроцитов методом проточной цитометрии по минорным антигенам C, c, E, Jk(a), Jk(b), Fy(a), Fy(b), S, N с помощью соответствующих первичных антител от компании Antitoxin GmbH (Бамменталь, Германия). В качестве вторичных антител использовали F(ab')₂ козьих антител против человеческого IgM или IgG компании Beckman Coulter (Марсель, Франция), меченые FITC. Анализ проводили на проточном цитометре NAVIOS компании Beckman Coulter. В случае обнаружения в пробе смешанной популяции эритроцитов как минимум по двум минорным антигенам проводили подтверждающий анализ новой аликвоты пробы крови.

Процедура O – анализ крови для биологического паспорта спортсмена (ABP). Анализ

проб цельной крови для программы биологического паспорта спортсмена (АВР) проводили в соответствии с требованиями ВАДА [19] на гематологическом анализаторе Sysmex XT-2000i (Кобэ, Япония). Каждой партии проб предшествовал анализ трех уровней внутренних контрольных образцов E-check компании Sysmex Europe GmbH (Нордерштедт, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Персонал лаборатории

В связи с большим объемом работы и коротким циклом обработки проб в период Олимпийских и Паралимпийских игр на предприятии было открыто 12 временных вакансий, а также приняты студенты, обладающие необходимой квалификацией и прошедшие соответствующую подготовку. Постоянный кадровый состав лаборатории был представлен

в Сочи 28 химиками-аналитиками и лаборантами. Отметим, что подготовкой проб к процедурам А, В, С и D занимались лаборанты, тогда как химики-аналитики управляли масс-спектрометрическими системами и изучали полученные данные. В то же время, все подтверждающие анализы выполняли исключительно химики-аналитики, включая также процедуры пробоподготовки. Приглашенные международные специалисты принимали участие в основном в просмотре полученных результатов и первичной оценке аналитических данных. Рабочий график лаборатории включал 2 смены: утреннюю (06:00 – 16:00) и вечернюю (14:00 – 00:00), за исключением отдела регистрации и приема биопроб, сотрудники которого работали круглосуточно. Такая схема работы соответствовала графику доставки проб в лабораторию.

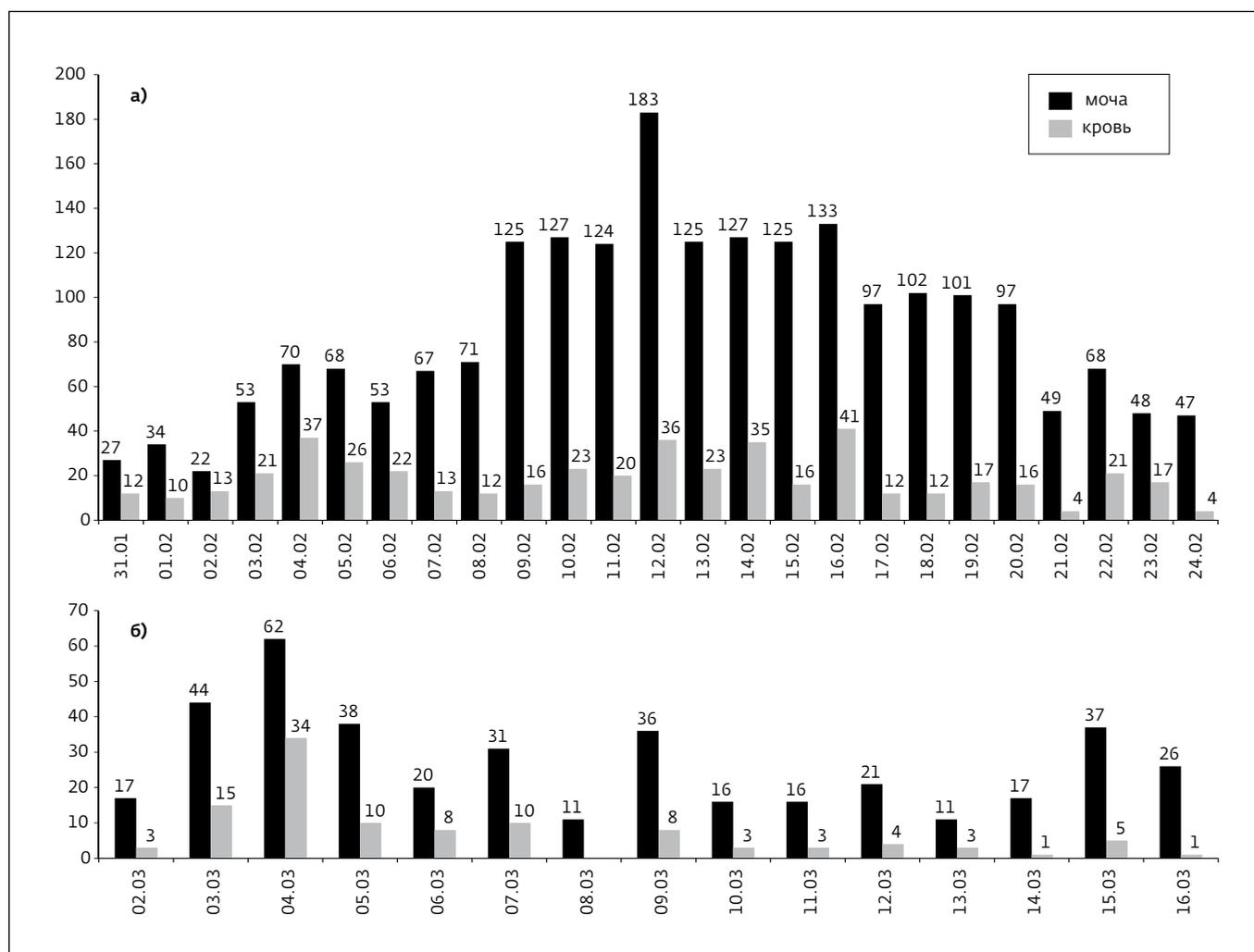


Рис.1. График доставки образцов мочи и крови в лабораторию в течение ОИ (а) и ПИ (б)

Доставка и прием проб, отчетность по пробам

Согласно договоренности с Организационным комитетом ОИ пробы в лабораторию должны были доставлять два раза в сутки – с 23:00 до 01:00 и с 14:00 – 16:00, однако на практике эти интервалы были длиннее. Поэтому было принято решение начинать процедуры пробоподготовки проб для основных аналитических процедур два раза в сутки либо на момент, когда для анализа было доступно хотя бы 20 проб.

Число ежедневно доставляемых проб до начала и в период проведения ОИ сильно различалось, достигнув пика в 183 пробы мочи в середине ОИ (рис.1а), что не соответствовало Плану распределения проб по видам анализа (TDP). Такой порядок доставки проб неизбежно привел к задержкам в предоставлении отчетов с результатами анализов в систему АДАМС, когда среднее время обработки данных составляло 33 ч (для отрицательных результатов), 43 ч (ЭПО) и 60 ч (инсулины) с момента приема проб. Число проб в ходе Паралимпийских игр оставалось с небольшими колебаниями в пределах запланированного в Плане распределения проб (рис.1б). Отметим, что все пробы, доставленные в преддверии и в течение ОИ, рассматривались как пробы для предсоревновательного или соревновательного контроля, и это означало, что эти пробы должны быть проанализированы по полному перечню процедур. С другой стороны, по соглашению с Международным паралимпийским комитетом некоторые пробы, отобранные в преддверии или в течение ПИ, рассматривали как пробы для внесоревновательного контроля и анализировали по соответствующему регламенту.

Для регистрации проб и присвоения флаконам внутрिलाбораторных номеров использовали штриховые коды. Объем мочи во флаконах А и В оценивали гравиметрически – взвешиванием каждого невскрытого флакона на лабораторных весах марки MWP-600 от компании CAS (Сеул, Южная Корея), соединенных с персональным компьютером, передающим данные в ЛИМС (пустой флакон Berlinger для мочи весил 200 г). В среднем, от приема проб до распределения аликвот проходило 3 ч.

Отчеты о проведенных анализах в систему АДАМС готовили с помощью системы ЛИМС, обеспечивавшей создание csv-файлов со всей

необходимой информацией, включая стероидные профили мочи. Во всех случаях превышения концентрации этилглюкуронида в моче по отношению к условному порогу (10 мкг/мл) в системе автоматически добавлялся комментарий о том, что стероидный профиль мог измениться в связи с присутствием метаболитов этанола. В тех случаях, когда запрашивалось проведение ГХ-С-ИМС-анализа, отчеты по окончании основных аналитических процедур помечались в системе как "частично представленные" с дополнительным комментарием, что анализ ГХ-С-ИМС находится на стадии исполнения. Лаборатория не принимала пробы, содержимое которых частично вытекло или сопроводительные документы были оформлены не правильно. Такие пробы отмечали в АДАМС как "непроанализированные" – в соответствии с рекомендациями Т.Богосьяна (независимый наблюдатель, ВАДА).

Аналитические методы и анализ проб

Большая часть аналитических методов, использованных в антидопинговой лаборатории в Сочи, ранее разработаны в антидопинговой лаборатории Москвы и затем перенесены в Сочи. Некоторые методики утверждены непосредственно перед началом игр, а именно:

- флуориметрическая детекция протеолитической активности в моче на основе протеолитического гидролиза меченого казеина;
- электрофоретическое определение экзогенных протеаз в моче;
- определение пептидных веществ с низкой молекулярной массой (гормон роста, секретагоги и десмопрессин) в моче с использованием системы СВЭЖХ-МС/МС;
- определение в моче инсулинов и прочих пептидных допинговых веществ с промежуточной молекулярной массой с использованием нано-ВЭЖХ Orbitrap MS;
- определение лютеинизирующего гормона в моче методом иммуноферментного анализа на анализаторе Cobas E411;
- определение ХГЧ методом иммуноферментного анализа на анализаторе Cobas E411;
- определение β -субъединицы ХГЧ методом иммуноферментного анализа на анализаторе Cobas E411.

Пептидные препараты, используемые в методиках 3 и 4, а также в процедурах К

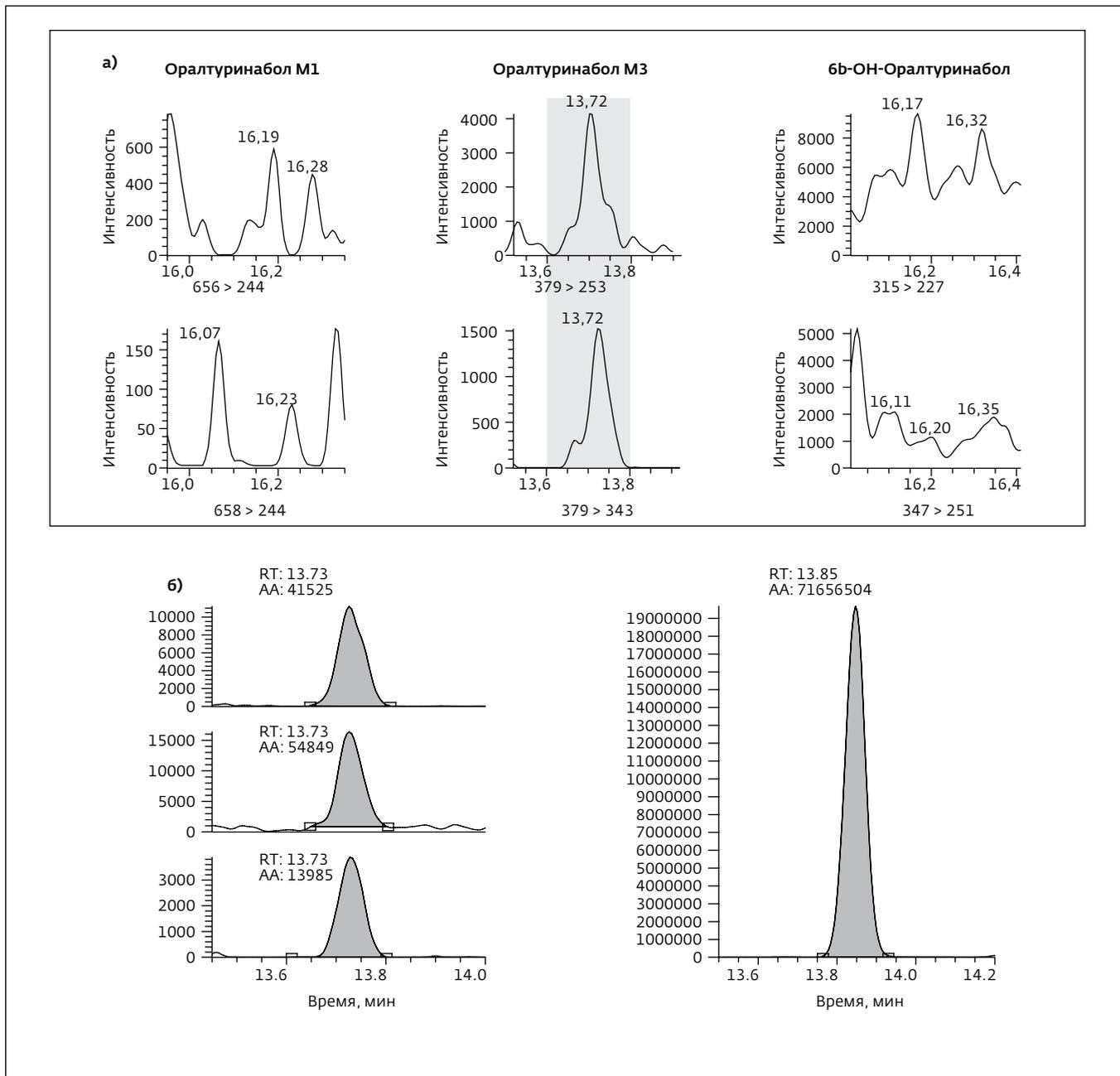


Рис.2. Положительная проба на содержание дегидрохлорметилтестостерона: фрагмент скрининговой распечатки (а) и результат подтверждающего анализа (б)

(инсулины и прочие пептидные препараты с промежуточной молекулярной массой) и L (активатор рецепторов эритропоэтина длительного действия (CERA), названы в соответствии с терминологией, предложенной проф. М.Тевисом и соавторами [20]. Все лабораторные процедуры были всесторонне проработаны с учетом всех применимых требований ВАДА, в том числе таких как чувствительность определения [4] и номенклатура хими-

ческих соединений, подлежащих анализу [21]. Процедура А предусматривала определение нескольких долгоживущих метаболитов стероидов, например, метаболитов метандиенона [22], оксандролона [23], флуоксиместерона [24], дигидрохлорметилтестостерона [25], а также оксиметолон, дезоксиметилтестостерона и метастерона [26]. Кроме того, процедура А прошла валидацию для приведения в соответствие с положениями новых техниче-

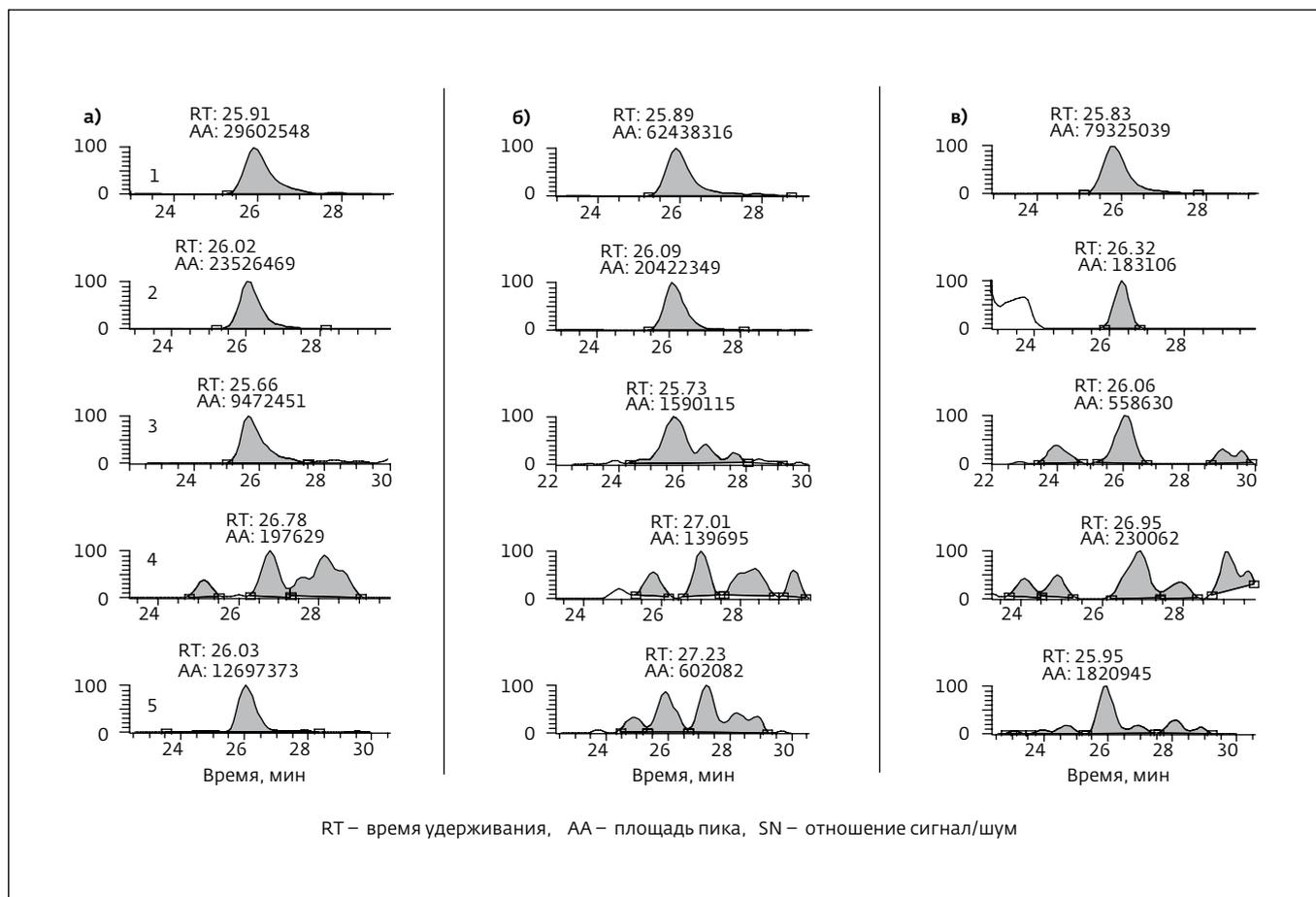


Рис.3. Данные скринингового анализа: (а) положительный и (б) отрицательный контроли качества, (в) вероятно положительная проба: 1 – бычий инсулин (ISTD), 1147,52905⁺; 2 – человеческий инсулин/лизпро-инсулин, 1162,53805⁺; 3 – инсулин гларгин, 1213,57505⁺; 4 – метаболит инсулин гларгина, 1130,75505⁺; 5 – инсулин глулизин/инсулин аспарт, 1165,73205⁺

ских документов ВАДА по эндогенным анаболическим андрогенным стероидам TD2014 EAAS [27], согласно которым с 1 января 2014 года представление отчетов по стероидному профилю в систему АДАМС является обязательным. Благодаря исследованиям метаболизма новых препаратов с потенциальной допинговой активностью, проведенным в антидопинговом центре Москвы, процедура В позволяет обнаруживать множество синтетических каннабиноидов [28–31], селективных модуляторов андрогенных рецепторов (SARMs) [32, 33] и прочие вещества, такие как непептидный секретогормон роста МК677 [34]. Процедура С, представляющая собой прямой анализ мочи с предварительным разбавлением и последующим введением в систему СВЭЖХ-МС/МС, включала в себя определение нескольких метаболитов фазы II, которые стали полезными

для обнаружения некоторых стимуляторов и бета-блокаторов [35], что подтверждено в ходе анализа экскреции исследуемых проб мочи. В основе процедуры D лежал метод, предложенный проф. М.Тэвисом и коллегами [36], с внесением небольших изменений в такие величины как концентрация кислоты и инкубационный период. Отметим, что в ходе исследований для подтверждения процедуры было установлено, что мочевины, в естественных условиях присутствующая в моче, может вступать в реакцию с глюкозой, высвобожденной из гидроксиэтилкрахмала в ходе кислотного гидролиза с выделением глюкозида мочевины и гликозиламина (данные не представлены). То же самое применимо к диагностически значимым мономерам гидроксиэтилкрахмала, например, дигидроксиэтилглюкозы и тригидроксиэтилглюкозы. Несмотря на то что обра-

Таблица 1. Положительные результаты, полученные в ходе ОИ и ПИ

Обнаруженные субстанции	Число случаев	Вид
Олимпийские игры		
Катин (выше порога) Метолазон Дарбэпоэтин Флюоксиместерон	4	dbEQAS
Фенотерол	2	TUE
Будезонид (16 α -гидроксипреднизолон)	10	TUE
Преднизолон	2	TUE
Метилфенидат	1	TUE
Аналог инсулина (Apidra)	1	TUE
Псевдоэфедрин (выше порога)	1	AAF
Метилгексанамин	4	AAF
Дегидрохлорметилтестостерон	1	AAF
Триметазидин	1	AAF
N-этил-1-фенилбутан-2-амин	1	AAF
Паралимпийские игры		
Канренон	4	TUE
Гидрохлортиазид	1	TUE
Будезонид (16 α -гидроксипреднизолон)	2	TUE
Ацетазоламид	2	TUE
Хорионический гонадотропин	2	ATF
Клостебол	1	AAF

зование глюкозида мочевины уже рассматривалось в научной литературе [37], механизмы реакции, лежащие в основе образования гликозиламина, до сих пор не ясны. Однако последнее вещество было распознано и подтверждено относительно коммерчески доступного аутентичного материала (Т.Соболевский, неопубликованные данные исследований). Значение полученных данных для антидопингового контроля состоит в том, что триметилсилилированные производные глюкозы, гидроксиэтилглюкозы, аминоглюкозы и гидроксиэтиламиноглюкозы должны отслеживаться одновременно, потому что в противном случае присутствие гидроксиэтилкрахмала в пробе может остаться незамеченным. Согласно TDP, в ходе ОИ не планировалось проведение целевого анализа ГХ-С-ИМС. Наряду с

этим, техническая документация TD2014 EAAS [27] предусматривает проведение анализа ГХ-С-ИМС всякий раз, когда в стероидном профиле спортсмена в системе АДАМС регистрируется аномальный результат. В контексте ОИ это положение означало бы, что анализ проб на приборе ГХ-С-ИМС не выполнялся бы вовсе. Было решено, что лаборатория предоставит проф. К.Айотт, исполняющей функции координатора по вопросам паспорта спортсмена в МОК, список проб с полным стероидным профилем, в котором содержание тестостерона в два раза выше, чем эпитестостерона. Выгрузка этих данных из нашей базы была легко осуществима по пользовательскому запросу. После тщательного изучения стероидных профилей этих спортсменов лаборатория получала указания по проведению ГХ-С-ИМС анализа для

Таблица 2. Число образцов согласно плану TDP (план отбора проб) и отобранных во время проведения Олимпийских и Паралимпийских игр

Моча			Кровь		
Вид анализа	Реально	План	Вид анализа	Реально	План
Олимпийские игры					
Стандартные операционные процедуры	2134	1910	Гормон роста	0	332
ЭПО	946	604	CERA	324	332
Инсулин	70	97	ABP	62	80
GHRP	908	0	HBOCs	92	92
ГХ-С-ИМС	74	0	Трансфузия	64	92
Паралимпийские игры					
Стандартные операционные процедуры	403	355	Гормон роста	0	60
ЭПО	166	125	CERA	76	100
Инсулин	0	0	ABP	44	40
GHRP	168	0	HBOCs	45	100
ГХ-С-ИМС	13	10	Трансфузия	1	0

выбранных проб. Отметим, что в одной из проб коэффициент соотношения тестостерона к эпитестостерону составил 33, при концентрации первого и второго 52 и 1,4 нг/мл соответственно. К всеобщему удивлению, анализ ГХ-С-ИМС показал отрицательный результат касательно происхождения тестостерона и его метаболитов. Наряду с этим известно [38, 39], что препараты тестостерона со значениями $\delta^{13}\text{C}$ по данным, полученным по эндогенным стероидам мочи, могут быть доступны на "черном" рынке. Поэтому было бы целесообразно измерить изотопное соотношение водорода и дейтерия в стероидах мочи для однозначного подтверждения наличия или отсутствия допинга в пробах [40, 41].

Как видно из табл. 1, полученные в ходе игр аналитические результаты в основном касались разрешенных к терапевтическому применению запрещенных соединений (TUE). Это, например, кортикостероиды и диуретики, которые разрешены для применения отдель-

ным спортсменам по медицинским показаниям. Ряд двойных слепых проб для проверки контроля качества (dbEQAS) были доставлены с другими образцами в лабораторию. Интересно отметить, что один из положительных результатов (adverse analytical findings, AAF) состоял в обнаружении триметазида [42], который включен в Запрещенный список непосредственно перед играми в 2014 году [21].

Наиболее сложным оказалось подтверждение присутствия дегидрохлорметилтестостерона (оралтуринабол) из-за низкой концентрации его долгоживущего метаболита (около 0,05 нг/мл). Фрагмент скрининговой распечатки представлен на рис.2а. Для подтверждения были взяты три аликвоты этой мочи (3 мл каждая) и после экстракции н-пентаном органические экстракты объединяли и упаривали в одной стеклянной пробирке перед дериватизацией. Полученный сигнал (рис.2б, слева) оказался достаточно интенсивным для того, чтобы рассчитанные критерии иденти-

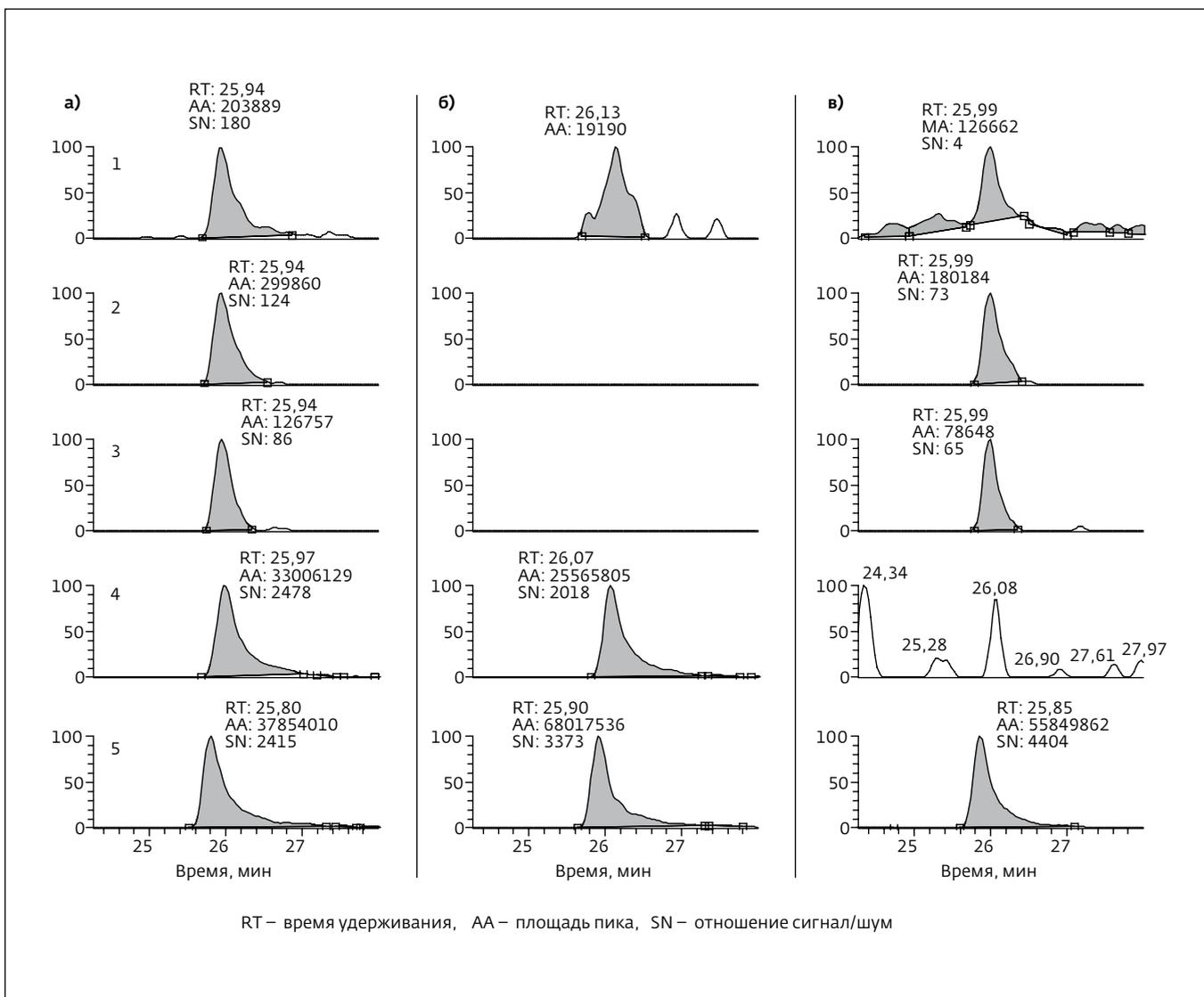


Рис.4. Данные, полученные при подтверждении: (а) положительный и (б) отрицательный контроли качества, (в) образец. 1 – инсулин глулизин, 346,1609 (μg); 2 – инсулин глулизин, 328,1503 ($\mu\text{g}-\text{H}_2\text{O}$); 3 – инсулин глулизин, 227,1026 ($\mu\text{g}-\text{H}_2\text{O}$); 4 – инсулин человека, 1162,53805 $^+$; 5 – бычий инсулин (ISTD), 1147,52905 $^+$.

фикации сошлись с критериями референсной мочи.

Другой интересный случай связан с определением инсулина. После проведения скрининговой процедуры (рис.3) предположили, что образец содержит инсулин глулизин или аспарт, о чем свидетельствовало присутствие иона с m/z 1165,72 $^{5+}$ (средняя масса). Для подтверждения этого вывода и выяснения структуры инсулина проведена подтверждающая процедура. Инсулин глулизин (Apidra) однозначно идентифицирован в режиме SIM и MS2 по характерным однозарядным фрагментам (рис.4). Резкое подавление эндогенного инсу-

лина в образце также служило косвенным признаком использования инсулина или недостаточной продукции эндогенного инсулина.

В ходе ПИ идентифицирован образец мочи, в котором концентрация β -ХГЧ составила 6,3 мМЕ/мл, в то время как концентрация интактного ХГЧ была на уровне 0,5 мМЕ/мл. О полученном атипичном результате анализа (АТФ) сообщили в МПК с рекомендацией клинического расследования причин такого результата. При последующей проверке этого спортсмена концентрации β -ХГЧ и интактного ХГЧ составили 9,8 и 1,1 мМЕ/мл соответственно.

Из табл.2, в которой представлены итоговые данные, видно, что общее число отобранных во время проведения Олимпийских и Паралимпийских зимних игр образцов биожидкости отличается от плана TDP. МОК затребовал провести дополнительные анализы на ЭПО. Пептидные препараты с низкой молекулярной массой (GHRP) были проанализированы примерно в половине образцов, в то время как анализ на гормон роста исключен из тестирования.

Технические сложности

Из-за различия аппаратного оборудования антидопинговых лабораторий Москвы и Сочи потребовалось провести изменения ранее оптимизированных параметров в некоторых методах. Так, например, обнаружена разница в производительности газового хроматографа Trace 1310 (Сочи) и Trace GC Ultra (Москва) в результате нелинейного сдвига времен удерживания поздно элюирующихся соединений, многие из которых являются коммерчески недоступными метаболитами стероидов. Таким образом, трансляция процедуры А заняла больше времени, чем ожидалось, кроме того, потребовался повторный анализ образцов мочи из лабораторной референсной коллекции. Кроме того, процедура В в Москве изначально валидирована с использованием системы СВЭЖХ-МС/МС, состоящей из масс-спектрометра TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific) и хроматографа Acquity UPLC (Waters). В лаборатории Сочи для проведения этой процедуры использовали масс-спектрометры TSQ Vantage в сочетании с хроматографом Dionex Ultimate 3000. TSQ Vantage – высокочувствительный и селективный прибор, однако имеет относительно медленную электронику, и использование одного метода с переключением полярности для синхронного определения соединений в положительной и отрицательной полярности оказалось невозможно из-за значительных потерь в скорости сканирования. В результате процедура В в Сочи была разделена на две части с регистрацией только положительных или отрицательных ионов, что привело к увеличению времени анализа (и снижению пропускной способности образцов) в два раза. Это было критично, поскольку на момент принятия решения о том, сколько систем СВЭЖХ-МС/МС

нужно для успешного функционирования лаборатории, такой технической проблемы не предвидели. В случае процедуры С для определения диуретиков сочетание положительной и отрицательной полярности в пределах одного запуска было приемлемо из-за очень ограниченного числа соединений, определяемых в режиме регистрации положительных ионов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

2537 образцов мочи и 587 образцов крови, собранных на XXII Зимних Олимпийских и XI Паралимпийских играх в Сочи с 31 января по 16 марта 2014 года, были проанализированы в антидопинговой лаборатории. Общее число анализов превысило план, особенно для ЭПО, в то время как анализы на гормон роста были отменены оргкомитетом непосредственно перед играми. Впервые в истории Олимпийских и Паралимпийских игр образцы мочи протестированы на содержание GHRP. Использование современных приборов в сочетании с тщательно разработанными аналитическими процедурами позволило выявить несколько положительных случаев, в том числе долгоживущий метаболит дегидрохлорметилтестостерона и дизайнерский стимулятор N-этил-1-фенилбутан-2-амин.

После Олимпийских игр все пробы мочи и крови были запечатаны и упакованы в специальные транспортные ящики, вмещающие 48 флаконов Berlinger мочи или 96 пробирок с кровью, и отправлены для длительного хранения в депозитории МОК в Лозанне.

ЛИТЕРАТУРА

1. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Available at: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=39883 [13 September 2014].
2. World Anti-Doping Agency. International Standard for Laboratories (ISL). International Standard. Available at: https://wada-mainprod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf [13 September 2014].
3. Parr M.K., Schänzer W. Detection of the misuse of steroids in doping control. *Journal of Steroid Biochemistry*. – 2010, 121, p. 528.
4. World Anti-Doping Agency. Technical Docu-

- ment for Minimum Required Performance Levels. Available at: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD-2013MRPL-Minimum-Required-Performance-Levels-v1-2012-EN.pdf> [13 September 2014].
5. **Mazzarino M., Botrè F.** A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids. – *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20, p. 3465.
 6. **Thörngren J.O., Ostervall F., Garle M.** A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS. – *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, 43, p. 980.
 7. **Guddat S., Solymos E., Orlovius A., Thomas A., Sigmund G., Geyer H., Thevis M., Schänzer W.** High-throughput screening for various classes of doping agents using a new 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach. – *Drug testing and analysis*, 2011, 3, p. 836.
 8. **Sobolevskii T., Prasolov I., Rodchenkov G.** Carbon isotope mass spectrometry in doping control. – *Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 65, p. 825.
 9. **VanRenterghem P., Polet M., Brooker L., VanGansbeke W., VanEeno P.** Development of a GC/C/IRMS method – confirmation of a novel steroid profiling approach in doping control. – *Steroids* 2012, 7, p. 1050.
 10. **Reichel C., Abzieher F., Geisendorfer T.** SARCO-SYL-PAGE: A new method for the detection of MIR-CERA- and EPO-doping in blood. – *Drug testing and analysis*, 2009, 1, p. 494.
 11. **Reichel C.** SARCO-SYL-PAGE: A new electrophoretic method for the separation and immunological detection of PEGylated proteins. – *Methods in Molecular Biology*, 2012, 869, p. 65.
 12. **Lasne F., Martin L., Crepin N., de Ceaurriz J.** Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: Differentiation of natural and administered recombinant hormones. – *Analytical Biochemistry*, 2002, 311, p. 119.
 13. World Anti-Doping Agency. Technical Document for harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins and analogues by electrophoretic techniques. Available at: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2013EPO-Harmonization-Analysis-of-Recombinant-Erythropoietins-EN.pdf> [15 September 2014].
 14. **Thomas A., Höppner S., Geyer H., Schänzer W., Petrou M., Kwiatkowska D., Pokrywka A., Thevis M.** Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401, p. 507.
 15. **Thomas A., Schänzer W., Delahaut P., Thevis M.** Immunoaffinity purification of peptide hormones prior to liquid chromatography-mass spectrometry in doping controls. – *Methods*, 2012, 56, p. 230.
 16. **Lasne F., Crepin N., Ashenden M., Audran M., de Ceaurriz J.** Detection of hemoglobin-based oxygen carriers in human serum for doping analysis: Screening by electrophoresis. – *Clinical Chemistry*, 2004, 50, p. 410.
 17. **Nelson M., Ashenden M., Langshaw M., Popp H.** Detection of homologous blood transfusion by flow cytometry: A deterrent against blood doping. – *Haematologica*, 2002, 87, p. 881.
 18. **Giraud S., Robinson N., Mangin P., Saugy M.** Scientific and forensic standards for homologous blood transfusion anti-doping analyses. – *Forensic Science International*, 2008, 179, p. 23.
 19. World Anti-Doping Agency. Technical Document for blood analytical requirements. Available at: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-ABP-Operating-Guidelines_v4.0-EN.pdf [14 September 2014].
 20. **Thevis M., Thomas A., Schänzer W.** Detecting peptidic drugs and drug candidates in sports doping: Current status and future directions. *Expert Review of Proteomics*, 2014. DOI: 10.1586/14789450.14782014.14965159.
 21. World Anti-Doping Agency. The 2014 Prohibited List. International Standard. Available at: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-prohibited-list-2014-EN.pdf> [14 September 2014].
 22. **Schänzer W., Geyer H., Fuschöller G., Halatcheva N., Kohler M., Parr M.K., Guddat S., Thomas A., Thevis M.** Mass spectrometric identification and characterization of a new long-term metabolite of methandienone in human urine. – *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20, p. 2252.
 23. **Guddat S., Fußhöller G., Beuck S., Thomas A., Geyer H., Rydevik A., Bondesson U., Hedeland M., Lagojda A., Schänzer W., Thevis M.** Synthesis, characterization, and detection of new oxandro-

- lone metabolites as long-term markers in sports drug testing // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, p. 8285.
24. **Parr M.K., Fusshöller G., Gütschow M., Hess C., Schänzer W.** GC-MS(/MS) investigations on long-term metabolites of 17-methyl steroids, in *Recent Advances in Doping Analysis*, (Eds: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck). SPORTVERLAG Strauss: Köln, 2010, p. 64-73.
25. **Sobolevsky T., Rodchenkov G.** Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine. - *Journal of Steroid Biochemistry*, 2012, 128, p. 121.
26. **Sobolevsky T., Rodchenkov G.** Mass spectrometric description of novel oxymetholone and desoxymethyltestosterone metabolites identified in human urine and their importance for doping control // *Drug testing and analysis*, 2012, 4, p. 682.
27. World Anti-Doping Agency. Technical Document for endogenous anabolic androgenic steroids. Available at: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014-EAAS-Endogenous-Anabolic-Androgenic-Steroids-Measurement-and-Reporting-EN.pdf> [13 September 2014].
28. **Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G.** Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine // *Forensic Science International*, 2010, 200, p. 141.
29. **Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G.** Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids // *Drug testing and analysis*, 2012, 4, p. 745.
30. **Sobolevsky T., Prasolov I., Dikunets M., Rodchenkov G.** In vitro metabolic studies of AM2233 and JWH-210, novel synthetic cannabinoids, in *Recent Advances in Doping Analysis*, (Eds: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck). SPORTVERLAG Strauss: Köln, 2012, p. 158-162.
31. **Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G.** Newcomers to the synthetic cannabinoid family: Adamantyl-substituted indole carboxamides APICA and its fluorinated analog, in *Recent Advances in Doping Analysis*, (Eds: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck). SPORTVERLAG Strauss: Köln, 2013, p. 125.
32. **Thevis M., Piper T., Beuck S., Geyer H., Schänzer W.** Expanding sports drug testing assays: Mass spectrometric characterization of the selective androgen receptor modulator drug candidates RAD140 and ACP-105 // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27, p. 1173.
33. **Sobolevsky T., Dikunets M., Rodchenkov G.** In vitro and in vivo metabolism of RAD140, a novel non-steroidal SARM, in *Recent Advances in Doping Analysis*, (Eds: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck). SPORTVERLAG Strauss: Köln, 2013, p. 121-124.
34. **Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G.** Urinary metabolism of ibutamoren, a small molecule growth hormone secretagogue, in *Recent Advances in Doping Analysis*, (Eds: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck). SPORTVERLAG Strauss: Köln, 2013, p. 182-186.
35. **Sobolevsky T., Savelieva N., Semenistaya E., Rodchenkov G.** Importance of phase II metabolites for the detection of beta-blockers by direct urine analysis, in *Recent Advances in Doping Analysis*, (Eds: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck). SPORTVERLAG Strauss: Köln, 2012, p. 120-123.
36. **Thevis M., Opfermann G., Schänzer W.** Detection of the plasma volume expander hydroxyethyl starch in human urine. - *Journal of Chromatography B*, 2000, 744, p. 345.
37. **Cerbulis J., Pfeiffer P., Farrell H.** Reaction of lactose with urea // *Carbohydrate Research*, 1978, 65, p. 311.
38. **Forsdahl G., Östreicher C., Koller M., Gmeiner G.** Carbon isotope ratio determination and investigation of seized testosterone preparations // *Drug testing and analysis*, 2011, 3, p. 814.
39. **Brooker L., Cawley A., Drury J., Edey C., Hasick N., Goebel C.** Stable carbon isotope ratio profiling of illicit testosterone preparations - domestic and international seizures // *Drug testing and analysis*, 2014. DOI: 10.1002/dta.1533.
40. **Piper T., Thevis M., Flenker U., Schänzer W.** Determination of the deuterium/hydrogen ratio of endogenous urinary steroids for doping control purposes // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009, 23, p. 1917.
41. **Piper T., Emery C., Thomas A., Saugy M., Thevis M.** Combination of carbon isotope ratio with hydrogen isotope ratio determinations in sports drug testing // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, p. 5455.
42. **Sigmund G., Koch A., Orlovius A.K., Guddat S., Thomas A., Schänzer W., Thevis M.** Doping control analysis of trimetazidine and characterization of major metabolites using mass spectrometric approaches // *Drug testing and analysis*, 2014. DOI: 10.1002/dta.1680.