



Міністерство юстиції України

Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф.
М. С. Бокаріуса»

Київський науково-дослідний інститут судових експертиз

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ АНАБОЛІЧНИХ СТЕРОЇДІВ

НАПИС

Про державну реєстрацію методики проведення
судових експертиз

Зареєстровано в Міністерстві юстиції України

07 03 2024 р.

Реєстраційний код 8.13.19

Харків - 2024



Міністерство юстиції України

**Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф.
М. С. Бокаріуса»**

Київський науково-дослідний інститут судових експертиз

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ АНАБОЛІЧНИХ СТЕРОЇДІВ

Харків - 2024

УДК 343.98

ББК 22

М

Рекомендовано до впровадження рішенням Вченої ради Національного наукового центру «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса» (протокол № 2 від 19.02.2024 р.).

Автори:

Сич І.В. – завідувач лабораторії ФХБВД ННЦ «ІСЕ ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса»

Руднєва К.Є. – завідувачка сектору ФХД ЛФХБВД ННЦ «ІСЕ ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса»

Сич І.А. – доц. кафедри медичної хімії Національного фармацевтичного університету

Бевз Н.Ю. – доц. кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету

Посільський О.О. – зав. відділу ЛКД Київського НДІСЕ

Січкач С.М. – ст. наук. співроб. відділу МРВ ЛКД Київського НДІСЕ

Методика дослідження анаболічних стероїдів / І.В. Сич, К.Є. Руднєва, І.А. Сич та ін., Харків: ННЦ «ІСЕ ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса», КНДІСЕ, НФаУ, 2022. 38 с.

Застосування методики поширюється на криміналістичне дослідження анаболічних стероїдів, а також лікарських засобів, що містять контрольовані речовини, які внесені до «Переліку сильнодіючих та отруйних лікарських засобів».

Впровадження методики дозволить проводити ідентифікацію та кількісний вміст анаболічних стероїдів під час проведення судових експертиз та експертних досліджень.

© ННЦ «ІСЕ ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса»,
Київський НДІСЕ, 2024

© Сич І.В., Руднєва К.Є., Сич І.А. та ін., 2024.

ЗМІСТ

	С.
Вступ.....	4
1 Предмет експертного дослідження.....	6
2 Основні завдання експертного дослідження.....	6
3 Орієнтовний перелік вирішуваних питань.....	6
4 Об'єкти експертного дослідження.....	7
5 Суб'єкти експертного дослідження.....	7
6 Методи досліджень.....	7
7 Алгоритм послідовності дії експертів під час проведення дослідження анаболічних стероїдів.....	7
7.1 Візуальний огляд.....	7
7.2 Підготовка проб.....	8
7.3 Якісні реакції.....	9
7.4 Дослідження методом газової хроматографії з маселективним детектуванням.....	14
7.5 Тонкошарова хроматографія.....	16
7.6 Газова хроматографія.....	20
7.7 Якісний та кількісний аналіз методом рідинної хроматографії з УФ або мас-спектрометричним детектуванням.....	21
7.8 УФ-спектрофотометрія.....	24
7.9 Кількісне визначення анаболічних стероїдів.....	28
7.10 Дослідження методом ІЧ-спектроскопії.....	31
ВИСНОВКИ.....	34
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	35

ВСТУП

Анаболічні стероїди (далі - АС) як сучасні лікарські засоби були відкриті німецькими вченими у 30-х роках ХХ століття. Перше згадування про застосування такого анаболічного стероїду як тестостерон пропіонат можна знайти ще у 40-х роках у спортивному американському журналі *Strength and Health*.

Із часом інтерес до АС у науковому співтоваристві зріс і в 50-х роках Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (США) після проведення відповідних досліджень у різних країнах схвалило застосування метандростенолону (Dianabol). Після того застосування анаболічних стероїдів для досягнення високих спортивних показників відбувалося дуже швидко.

Зазвичай лікарські препарати цієї групи застосовують у медичній практиці для активації анаболічних процесів у разі виснаження під час післяопераційного періоду, при інфаркті міокарда, остеопорозі, затримці росту у дітей. Сьогодні надано достатньо інформації про те, що тривалий прийом анаболічних стероїдів у великих дозах викликає ефекти, схожі на алкогольні або наркотичні, а також дратівливість, агресивність, ейфорію. Скасування прийому препаратів нерідко викликає депресію, що призводить до суїцидних спроб. Слід зазначити й інші побічні ефекти АС, серед яких онкологічні захворювання, зниження згортання крові, розвиток захворювань серця та серцево-судинної системи. Незаперечний їхній патологічний вплив на зміни в печінці, підвищення травматизму через невідповідність зростання м'язів і зв'язок, маскулінізацію жінок та ін. У деяких джерелах літератури можна знайти інформацію про летальні наслідки у спортсменів, які зловживають анаболічними стероїдами. Виходячи з гострої токсичності АС в 1976 р. Міжнародний Олімпійський комітет (МОК) включив АС, як і всі фармакологічно близькі сполуки, до списку речовин, що підлягають допінг-контролю.

У даний час у всьому світі проблема використання анаболічних стероїдів для

досягнення високих спортивних результатів залишається дуже актуальною. Захоплення видами спорту, пов'язаними з нарощуванням м'язової маси (бодібілдинг, силовий екстрим та ін.), а також розширення інформаційних каналів (у т.ч. в мережі «Інтернет»), призводить до підвищення інтересу до анаболічних стероїдів, появи спеціальних тренувальних програм, їхнього широкого використання, що у свою чергу провокує різні форми зловживань.

У ситуації, що склалася, стала очевидною необхідність посилення контролю за поширенням анаболічних стероїдів і введення заходів, що знижують масштаби їх зловживання.

Дослідження, що проведено, належить до галузі криміналістичної експертизи матеріалів, речовин та виробів, а саме, до експертизи сильнодіючих та отруйних речовин, оскільки деякі з АС відносяться саме до переліку сильнодіючих лікарських засобів за міжнародними непатентованими або загальноприйнятими назвами, затвердженого наказом МОЗ України від 17.08.2007 №490 «Про затвердження Переліків отруйних та сильнодіючих лікарських засобів», або можуть бути об'єктами експертиз, призначених за постановами (ухвалами) в рамках експертних спеціальностей: 8.6 «Дослідження наркотичних засобів, психотропних речовин, їх аналогів та прекурсорів» 8.11 «Дослідження речовин хімічних виробництв та спеціальних хімічних речовин». Визначення та виявлення підконтрольних АС або не зареєстрованих на території України АС в об'єктах судової експертизи є одним з основних завдань, що вирішуються експертами спеціалізованих експертних установ МЮ, Управління МВС, Управління СБУ.

Таким чином, відповідно до законодавства України, завдання експерта-хіміка зводиться до проведення досліджень препаратів (сумішей), щодо виявлення підконтрольних анаболічних стероїдів, без визначення їх кількісного змісту.

Мета дослідження — розробити методику екстракції з наданих на дослідження об'єктів та ідентифікації анаболічних стероїдів під час проведення судових експертиз та експертних досліджень.

1 ПРЕДМЕТ ЕКСПЕРТНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Предметом експертного дослідження є фактичні дані та обставини, що встановлюються на підставі використання спеціальних знань експертів з судової експертизи сильнодіючих та отруйних речовин та мають значення для вирішення справ різних категорій щодо експертного дослідження анаболічних стероїдів.

2 ОСНОВНІ ЗАВДАННЯ ЕКСПЕРТНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Основними завданнями експертизи є: встановлення та ідентифікація анаболічних стероїдів, наданих на дослідження.

3 ОРІЄНТОВНИЙ ПЕРЕЛІК ВИРІШУВАНИХ ПИТАНЬ

Виходячи із змісту експертних завдань та аналізу експертної практики, можна сформулювати такий орієнтовний перелік вирішуваних питань щодо судової експертизи анаболічних стероїдів:

Чи є на предметі носії (зазначається, на якому саме) сліди сильнодіючих чи отруйних речовин?

Чи є даний засіб сильнодіючою чи отруйною речовиною і яким (якою) саме?

Чи мають дані сильнодіючі чи отруйні речовини спільну родову (групову) належність?

Чи мають дані сильнодіючі чи отруйні речовини спільне джерело походження за якісним та відносним кількісним складом?

Перелік зазначених питань не є вичерпним, він може доповнюватись, залежно від різних чинників в межах предмету експертного дослідження.

4 ОБ'ЄКТИ ЕКСПЕРТНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами експертного дослідження є анаболічні стероїди.

5 СУБ'ЄКТИ ЕКСПЕРТНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Суб'єктами дослідження є фахівці, які мають кваліфікацію судового експерта за спеціальністю 8.13 «Дослідження сильнодіючих та отруйних речовин».

6 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Методи дослідження – загальнонаукові, окремі спеціальні: органолептичні, фізичні, хімічні, інструментальні.

7 АЛГОРИТМ ПОСЛІДОВНОСТІ ДІЇ ЕКСПЕРТІВ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ АНАБОЛІЧНИХ СТЕРОЇДІВ

7.1 ВІЗУАЛЬНИЙ ОГЛЯД

Лікарські форми анаболічних стероїдів, що використовуються в медицині та

ветеринарії, можуть бути: масляні розчини, водні суспензії, порошки, таблетки, або капсули. В даний час з'являється все більше напівпідпільних виробників, що випускають анаболічні стероїди в «нетрадиційних» формах, таких як порошкоподібні субстанції, різні форми біологічно активних добавок та ін. Виробництво лікарських форм з анаболічними стероїдами здійснюється головним чином у країнах Південно-Східної Азії, основні виробники ветеринарних препаратів з анаболічними стероїдами перебувають у Австралії або Мексиці. Внаслідок напівпідпільного характеру багатьох виробництв анаболічних стероїдів вони не мають стандартизованої упаковки, що містить міжнародну непатентовану назву та вказівку групи препарату.

Тим не менш, існує велика кількість препаратів, що набули широкого розповсюдження, з відомими торговими назвами, лікарською формою та упаковкою.

7.2 ПІДГОТОВКА ПРОБ

Стероїди використовуються у різних формах лікарських препаратів, включаючи таблетки, водні та масляні ін'єкційні розчини, креми, капсули тощо. У більшості випадків підготовка проби не є складним завданням і полягає у виділенні діючої речовини та відділенні супутніх речовин. Основні проблеми підготовки проби пов'язані з кількісним виділенням стероїдів з одно-або багатокomпонентних препаратів.

Підготовка проби при аналізі лікарської форми залежить від властивостей активної речовини, виду лікарської форми та методу аналізу.

Найважливішою характеристикою активної речовини, що впливає вибір методу підготовки проби, є його розчинність. Якщо розглядати фізико-хімічні властивості анаболічних стероїдів, можна відзначити, що всі представники цього класу характеризуються поганою розчинністю у воді та гарною розчинністю у

таких органічних розчинниках як хлороформ та метанол. Важливою обставиною є також більша розчинність анаболічних стероїдів у метанолі, ніж у аліфатичних вуглеводнях. Цей факт дозволяє екстрагувати їх з масляних розчинів метанолом після розведення масляного препарату гексаном або петролейним ефіром.

7.3 ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ

Якісні реакції застосовуються для первинної ідентифікації анаболічних стероїдів. Описані у літературі для анаболічних стероїдів реагенти спрямовані головним чином виявлення стероїдного циклу. При використанні їх для ідентифікації субстанцій та лікарських форм необхідно враховувати, що наявністю стероїдного циклу характеризується досить велика група речовин, серед яких знаходяться не тільки анаболічні стероїди, а й кортикостероїди, глюкокортикоїди, холестерол тощо, при цьому точно визначити належність речовини до груп саме анаболічних стероїдів виходячи з якісних реакцій неможливо. Крім того, реакції на наявність стероїдного циклу мають низьку специфічність і супутні речовини, що містяться в лікарських формах, можуть спотворювати результати аналізу. В даному випадку попереднє виділення діючої речовини підвищує інформативність визначення. З зазначених причин якісні реакції не можуть використовуватися як єдиний метод ідентифікації - необхідне підтвердження результату хроматографічними методами.

Концентрована сульфатна кислота є загальним внутрішньогруповим специфічним реактивом виявлення наявності стероїдного циклу. Специфіка реакції низька, реагент дає пофарбовані реакції також з естрогенами, кортикостероїдами, глюкокортикоїдами, холестерином.

Тести проводяться в пробірках безбарвного скла або білих фарфорових тиглях, що дозволяють оцінити зміну кольору. Для проведення тесту використовують близько 1 мг субстанції або сухого залишку після виділення

діючої речовини. Забарвлення отриманих розчинів наведено в таблицях Г1 та Г2.

Також для виявлення стероїдного циклу можна використовувати тест Ліберман-Бурхарда:

1 мл екстракту або 1 мг сухої речовини розчиняється в 0,5 мл оцтового ангідриду і охолоджується на льоду. Після перемішування розчину з 0,5 мл хлороформу піпеткою акуратно додається 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Після поділу шарів формування червоно-коричневого кільця є індикатором присутності сполук, що мають стероїдний цикл.

Таблиця Г.1 – Забарвлення та флюоресценція, що утворюються при реакції деяких анаболічних стероїдів із сульфатною кислотою

Сполука	Колір	Флюоресценція при 350 нм	Колір та флюоресценція після розведення
Норетандролон	Помаранчево-рожевий	Жовто-зелена	-
Норетістерон	Червоно-коричневий	Жовто-зелена	Жовтий розчин з коричнево-жовтим осадом
Андростерон	Жовтий	-	Біла флюоресценція
Оксиметолон	помаранчевий	-	-
Флуоксіместерон	Жвотий	Зелена	Флуоресценція зменшується
Естріол	-	Жовто-зелена	Флуоресценція зменшується (помаранчева при денному світлі)
Тестостерон	Зелений	Зелена	-
Естрадіол	Жовтий	Зелена	зелена флюоресценція (помаранчева за денного світла)
Етинілестрадіол (в суміші етанолу та сульфатної кислоти 1:1)	Багряно-червоний	Зелено-жовта	колір змінюється до червоно-червоного
Естрадіолу бензоат	Жовто-зелений	Синя	колір змінюється до світло-жовтогарячого
Метенолона ацетат и метенолона энантат (в смеси этанола и серной кислоты 1:1)	Після нагрівання на водяній бані протягом 30 хв розчин набуває червоно-коричневого забарвлення.		

Як реагент використовують 30–50% сульфатну кислоту, з подальшим нагріванням хроматографічної пластинки до 100 °С протягом 5 хвилин.

Таблиця Г.2 – Забарвлення, що утворюється при реакції деяких анаболічних стероїдів з реагентом нафтол-сірчана кислота

Сполука	Колір з гарячим реагентом	Колір після розведення
Норетандролон	помаранчевий, зелений (дихроїзм)	Червоно-помаранчевий
Норетістерон	Помаранчевий	Помаранчево-коричневий
Флуоксіместерон	Зелено-жовтий	Жовтий
Естріол	зелений, жовтий (дихроїзм)	помаранчевий
Тестостерон	зелений, коричневий (дихроїзм)	зелений, коричневий (дихроїзм)
Естрадіол	Сине-зелений, жовтий (дихроїзм)	Помаранчевий
Етинілестрадіол	Коричнево-червоний	Рожевий
Оксіметолон	Коричневий	Рожево-помаранчевий
Андростерон	Помаранчевий	Помаранчевий

Деякі якісні реакції попередньої ідентифікації анаболічних стероїдів:

1) Естріол.

Розчинити 10 мг естріолу на 100 мл етанолу (95%) при нагріванні. Випарити 1 мл отриманого розчину на водяній бані насухо, додати 5 мл розчину натрію п-фенілсульфонату в розведеній ортофосфорній кислоті (1:50), нагрівати до 150 °С протягом 10 хв і охолодити. Суміш набуває пурпурно-червоного забарвлення.

2) Дростанолон пропіонат.

а) Розчинити 20 мг дростанолону пропіонату в 1 мл 95% етанолу, додати 1 мл лужного розчину гідроксиламіну. Витримати 10 хв і додати 1 мл розчину хлористоводневої кислоти в етанолі та 1 мл розчину хлориду заліза (III). Розчин набуває темно-червоного забарвлення.

Для приготування лужного розчину гідроксиламіну змішати рівні обсяги розчинів гідроксиламіну хлориду в метанолі (7:100) та натрію гідроксиду в метанолі (3:25) і профільтрувати. Розчин використовується свіжоприготованим.

Для приготування розчину хлористоводневої кислоти в етанолі 236 мл концентрованої хлористоводневої кислоти довести етанолом до 100 мл.

Для приготування розчину хлориду заліза розчинити 9 г заліза (III) хлориду гексагідрату у 100 мл води.

в) До 10 мг дростанолону пропіонату додати 10 мл свіжоприготовленого

розчину ваніліну в сульфатній кислоті протягом 5 хв. Розчин набуває пурпурно-червоного забарвлення.

3) Метилтестостерон, діюча речовина та екстракт таблеток у хлороформі.

Розчинити 1 мг метилтестостерону в 2 мл розчину ксангідролу в крижаній оцтовій кислоті (1 в 200 мл), додати 0,2 мл сульфатної кислоти і нагрівати на водяній бані протягом 20 хв. Після охолодження додати 6 мл води і 5 мл хлороформу, струсити, хлороформний шар набуває зеленого кольору. При додаванні до шару хлороформу 5 мл розведеної сульфатної кислоти (4:5) колір розчину не змінюється.

4) Оксіметолон.

Розчинити 2 мг оксіметолону в 1 мл 95% етанолу та додати 1 краплю розчину хлориду заліза (III). Розчин набуває пурпурового забарвлення. Для приготування розчину хлориду заліза розчиняють 9 г заліза (III) гексагідрату хлориду в 100 мл води.

5) Етинілестрадіол і таблетки, що містять етинілестрадіол.

До 0,1 мг етинілестрадіолу або навішенню розтертих таблеток, еквівалентних 0,1 мг етинілестрадіолу, додати 0,5 мл 0.1 М водного розчину гідроксиду натрію і 5 мл води. Витримати 5 хв, профільтрувати, підкислити фільтрат 0,15 мл сульфатної кислоти, додати 3 мл діетилового ефіру, струсити. Після поділу шарів відібрати органічний шар і випарувати насухо. Залишок нагріти на водяній бані протягом 5 хв з 0,2 мл крижаної оцтової та 2 мл ортофосфорної кислоти. Отримана суміш має червоний колір із інтенсивною помаранчевою флуоресценцією.

6) Станозолол та таблетки, що містять станозолол.

До 2 мг станозололу або наважки розтертих таблеток, еквівалентної 2 мг станозололу додати 5 мл бензолу, довести до кипіння і випарувати насухо в потоці повітря. Додати 3 мл розчину п-диметиламінобензальдегіду, отримана суміш має жовтий колір, який виявляє жовту флуоресценцію при опроміненні довгохвильовим ультрафіолетовим світлом.

Для приготування розчину п-диметиламінобензальдегіду розчинити 125 мг п-диметиламінобензальдегіду в охолодженій суміші 65 мл сульфатної кислоти та

35 мл води, додати 0,05 мл 3% розчину заліза (III) хлориду. Термін придатності до 7 днів.

7) Естрадіолу бензоат та естрадіолу гемігідрат.

До 1 мг естрадіолу додати 0,5 мл свіжоприготованого реагенту, що містить 50 мг амонію молібдату в 10 мл сульфатній кислоті. Отриманий синій розчин має інтенсивну зелену флуоресценцію при опроміненні УФ світлом із довжиною хвилі 365 нм. При додаванні 1 мл сульфатної кислоті і 9 мл води колір стає червоним із жовтуватою флуоресценцією.

8) Естрадіолу ципіонат масляний розчин для ін'єкцій.

Аліквоту масляного розчину, еквівалентну 5 мг естрадіолу ципіонату, перенести до центрифужної пробірки зі скляною кришкою, додати 30 мл етилового спирту. Струшувати 5 хв, потім центрифугувати до поділу шарів. Відібрати шар спирту, упарити насухо на водяній бані, додати 5 мл водного розчину калію гідроксиду (1:10) та нагріти на водяній бані 15 хв. Змішати 50 мг сульфанілової кислоті з 2 мл 3 М хлористоводневої кислоті, нагріти, потім охолодити на льоду і додати повільно при перемішуванні 0,3 мл водного розчину натрію нітриту (1:10). Додати приготовлений розчин до підготовленого екстракту естрадіолу ципіонату – розчин набуває червоного забарвлення.

9) Тестостерону енантат, тестостерону пропіонат олійний розчин для ін'єкцій.

До аліквоти масляного розчину, еквівалентної 0,05 г діючої речовини, додати 8 мл петролейного ефіру та екстрагувати трьома порціями по 10 мл розведеної оцтової кислоті (7:10). Об'єднаний екстракти промити 10 мл петролейного ефіру. Потім до 0,1 мл екстракту додати 0,5 мл розведеної сульфатної кислоті (7:10) та нагріти на водяній бані 5 хв. Після охолодження додати 0,1% розчин хлориду заліза (III) у 3% оцтовій кислоті, розчин набуває зеленого забарвлення, що переходить у коричневе.

7.4 ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З МАССЕЛЕКТИВНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

Технологія ГХ/МС визнана «золотим стандартом» у галузі ідентифікації хімічних речовин у простих та складних сумішах.

Крім того, технологія здатна розпізнавати речовини на слідовому рівні, який недосяжний за допомогою інших технологій. Завдання аналізу полягає в тому, щоб визначити, скільки компонентів присутнє в тій чи іншій пробі (воді, ґрунті, повітрі, біологічній рідині), дізнатися які це компоненти (ідентифікувати їх) і дізнатися, скільки кожної сполуки міститься в суміші. Таке завдання може виконати лише прилад із поєднанням хроматографії з мас-спектрометрією. Газова хроматографія якнайкраще підходить для поєднання з іонним детектором мас-спектрометра, оскільки в колонці хроматографа сполука вже знаходяться в газовій фазі. Сьогодні цей метод використовується практично всіма експертно-криміналістичними лабораторіями. Дослідження виконуються з використанням квадрупольних мас-аналізаторів в умовах електронної іонізації в режимі селективного детектування іонів. Оскільки лише невеликі кількості анаболічних стероїдів виводяться з організму у незмінному вигляді, стадія гідролізу має виняткове значення для визначення анаболічних стероїдів.

Хроматомас-спектрометрія – один з основних методів, що використовуються для виявлення наявності стероїдів та встановлення їх структури.

Аналіз проводиться з використанням газового хроматографа "Shimadzu GCMS QP2020" з мас-спектрометричним детектором (або їх аналоги):

- колонка HP-5 0.25 mm*30m*0,25um 19091S-433 або аналогічна;
- газ носій – гелій 1 мл/хв;
- температура випарника 280 °С;
- тип введення - з розподілом потоку (split 1: 40);
- температура перехідної зони 280 °С;

- початкова температура колонки 180 °С, далі градієнт температури швидкістю 10 °С/хв до 300 °С, витримка за кінцевої температури 20 хв; Об'єм проби, що вводиться - 1 мкл.

Нижче наведено можливі варіанти термостатування, що використовуються при визначенні анаболічних стероїдів:

Режим 1

Початкова температура колонки 180 °С, далі градієнт температури зі швидкістю 10 °С/хв до 300 °С, затримка 50 хв.

Режим 2

Початкова температура колонки 190 °С, затримка 3 хв. далі градієнт температури зі швидкістю 5 °С/хв до 300 °С, затримка 50 хв.

Режим 3

Початкова температура колонки 190 °С, далі градієнт температури зі швидкістю 2 °С/хв до 235 °С, далі зі швидкістю 12 °С/хв до 300 °С, затримка 20 хв.

Режим 4

Початкова температура колонки 190 °С, далі градієнт температури зі швидкістю 2 °С/хв до 235 °С, далі зі швидкістю 30 °С/хв до 300 °С, затримка 20 хв.

Таблиця Г.3 – Орієнтовний час утримання анаболічних стероїдів в наведених умовах

	Найменування	1	2	3	4
1	Дростанолону пропіонат	11.92	20.05	26.78	25.38
2	Метандієнон	11.17	18.43	25.24	24.43
3	Тестостерон	10.72	17.62	24.12	23.74
4	Тестостерону пропіонат	12.30	20.74	27.32	25.80
5	Тестостерону ізокапроат	14.82	24.57	30.29	25.88
6	Тестостерону деканоат	22.69	33.03	38.50	36.59
7	Тестостерону фенілпропіонат	23.74	34.14	39.63	37.4
9	Нандролону деканоат	21.3	31.75	37.14	35.23
10	Нандролону лаурат	29.97	37.59	42.91	40.83
11	Нандролону фенілпропіонат	22.28	32.55	38.05	36.14

Продовження таблиці Г.3

12	Нандролону гексилоксіфенілпропіонат	59.65	72.86	75.5	73.5
13	Метілтестостерон	10.93	17.98	24.67	24.11
14	Оксандролон	11.58	19.36	26.02	24.9
15	Станозолол	14.65	24.5	30.14	28.88

7.5 ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Стероїдні сполуки найрізноманітніших типів відносяться до тих органічних речовин, для яких тонкошарова хроматографія є найбільш придатною. Відмінності у структурі, зміни заступників, конформації окремих елементів молекули зазвичай чітко виявляються у відмінностях хроматографічний рухливості.

Для покращення одержуваних результатів рекомендується:

1. Усі операції, включаючи підготовку проби, нанесення на пластинку, поділ проводити у прохолодному місці, захищеному від впливу прямих сонячних променів.

2. Використовуйте чисті розчинники.

3. Хроматограму аналізувати одразу після обробки.

Нижче наведені рекомендовані для дослідження навішування та аліквоти. У разі недостатньої чіткості хроматографічного плями або виявлення ознак навантаження системи, навішування речовини підбирається індивідуально, залежно від результатів.

1) Пігулки, капсули чи порошки.

200 мг речовини розтертих таблеток або капсул екстрагувати 5 мл метанолу протягом 20 хв при інтенсивному струшуванні. Для більшої повноти екстракції пробу витримати 10 хв в ультразвуковій ванні. Профільтрувати через паперовий фільтр, залишок на фільтрі промити ще 2 мл метанолу. Отриманий розчин в об'ємі декількох мікролітрів нанести на пластину для тонкошарової хроматографії.

2) Суспензії.

Збовтати суспензію для рівномірного розподілу частинок, відібрати 200 мкл і розбавити 5 мл метанолу при інтенсивному струшуванні. Для більшої повноти екстракції пробу витримати 10 хв у ультразвуковій ванні. Профільтрувати через паперовий фільтр залишок на фільтрі промити ще 2 мл метанолу. Отриманий розчин в об'ємі декількох мікролітрів нанести на пластину для тонкошарової хроматографії.

3) Олійні розчини.

До аліквоти розчину олійного для ін'єкцій, еквівалентної 0,1 г препарату, додати 10 мл гексану, насиченого метанолом, екстрагувати трьома порціями по 15 мл метанолу, насиченого гексаном. Відібрати метанольний (нижній) шар, профільтрувати екстракт через фільтр, промитий метанолом. Отриманий розчин в об'ємі декількох мікролітрів нанести на пластину для тонкошарової хроматографії.

Для отримання насичених розчинників струшувати в ділильній лійці суміш рівних кількостей гексану і метанолу (по 50 мл), витримати до розшарування фаз. Нижній шар є метанолом, насиченим гексаном, а верхній – гексаном, насиченим метанолом.

Приготування стандарту.

Готують 0,1% розчин стандартної речовини відповідного анаболічного стероїду у метанолі.

Також як стандарт можливе використання зразків із завідомо відомим якісним і кількісним складом з колекцій наркотичних засобів, психотропних і сильнодіючих речовин, що формуються в експертно-криміналістичних підрозділах України.

Для аналізу анаболічних стероїдів рекомендується використовувати пластини зі скляною, алюмінієвою або полімерною підкладкою, покриті шаром силікагелю з УФ-індикатором (наприклад, Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ).

Системи, що рекомендуються для поділу:

TR = Метиленхлорид: ефір: метанол: вода (77:15:8:1,2).

TQ=Дихлоретан: метанол: вода (95:5:0,2).

Хлороформ:метанол (95:5)

Прояв хроматограм:

Після хроматографування пластини висушити насухо при температурі 60 °С, обприскувати 30% розчином сульфатної кислоти в метанолі і витримати при температурі 60 °С протягом 30 хв. до прояву кольорових плям.

Інтерпретація результатів.

Ідентифікація анаболічних стероїдів проводиться порівнянням R_f та забарвлення плям на хроматограмі випробуваного препарату з R_f та забарвленням плям стандарту.

Як орієнтир можна використовувати дані по тонкошаровій хроматографії, наведені в додатку, а також експериментальні дані, отримані при розробці даної методики. Однак, необхідно зазначити, що R_f і забарвлення плям залежить від кількості речовини, кількості реактиву, температури в приміщенні і речовин, адсорбованих на шарі сорбенту, тому для більш надійної ідентифікації необхідно порівнювати R_f і забарвлення плям на хроматограмі випробуваного препарату з R_f і забарвленням плям стандарту.

Таблиця Г.4 – R_f та колір плям анаболічних стероїдів після прояву 10%-м розчином сульфатної кислоти в метанолі, отримані при поділі на Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ у наведених системах

Найменування	Хлф: метанол (95:5)	TP	TQ	Забарвлення плям
Тестостерону пропіонат	0.85	0.58	0.74	синє-коричневий
Тестостерону фенілпропіонат	0.85	0.58	0.74	синє-коричневий
Тестостерону ізокапроат	0.85	0.58	0.74	синє-коричневий
Тестостерону деканоат	0.85	0.58	0.74	синє-коричневий
Тестостерон	0.41	0.36	0.74	синє-коричневий
Метилтестостерон	0.68	0.4	0.65	рожево-помаранчевий
Дростанолону пропіонат	0.83	0.64	0.74	сіро-фіолетовий
Нандролону лаурат	0.89	0.66	0.77	помаранчевий

Продовження таблиці Г.4

Нандролону деканоат	0.82	0.6	0.77	помаранчевий
Нандролону фенілпропіонат	0.79	0.59	0.77	помаранчевий
Нандролону гексилоксифенілпропіонат	0.83	0.64	0.77	помаранчевий
Станозолол	0.21	0.21	0.54	рожевий
Метандростенолон	0.53	0.37	0.64	жовто-сірий

Таблиця Г.5 – Реагенти проявники, що застосовуються для виявлення анаболічних стероїдів

	Реагент	Приготування	
1	Розчин сульфатної кислоти у воді 50% (об.)	-	Після обприскування пластина нагрівається за температури 70 до 110 °С
2	Розчин сульфатної кислоти в метанолі 30% (об.)	-	Після обприскування пластина нагрівається за температури 70 до 110 °С
3	Розчин сульфатної кислоти в етанолі 30% (об.)	-	Після обприскування пластина нагрівається за температури 70 до 110 °С
4.	Ванілін – розчин сірчаної кислоти в етанолі (свіжоприготовлений)	Додати 75 мл сірчаної кислоти до 25 мл охолодженого етанолу. Після охолодження суміші розчинити у ній 1 г ваніліну.	Після обприскування нагрівати 5 хв до 100 °С

Продовження таблиці Г.5

5	П-толуенсульфонова кислота (20% розчин в абсолютному етанолі)	-	Після обприскування нагріти 10-15 хв за 100 °С. Стероїди виявляються у вигляді флуоресціюючих плям
6	Анісовий альдегід – сірчана кислота	5 мл анісового альдегіду та 1 мл концентрованої сірчаної кислоти у 50 мл крижаної оцтової кислоти	Після обприскування нагріти 10-15 хв за 120 °С. Стероїди виявляються у вигляді плям різного кольору (можлива флуоресценція)
7	Фосфорна кислота (20-70% розчин у воді чи етанолі)	-	Після обприскування нагріти 10-30 хв за 90-120 °С. Стероїди виявляються у вигляді плям різного кольору (можлива флуоресценція)
8	Фосфорномолібденова кислота	5-10% в етанол або 5% в суміші етанол-вода 1:1.	Після обприскування нагріти 1-10 хв при 100-110 °С. Стероїди проявляються у вигляді блакитних плям на жовтому тлі

7.6 ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Для детектування та кількісного визначення стероїдних сполук в основному застосовуються полум'яно-іонізаційні детектори (ПІД).

Для визначення якісного та кількісного вмісту анаболічних стероїдів як стандарт використовуються аналітичні зразки заводського виробництва або зразки із свідомо відомим якісним та кількісним складом з колекцій наркотичних засобів, психотропних та сильнодіючих речовин, що формуються в експертно-криміналістичних лабораторіях України.

Підготовка проб – аналогічна методиці підготовки проб для хроматомас-спектрометричного дослідження.

Приготування стандарту.

Для отримання хроматографічних даних, придатних для якісного та кількісного аналізу, слід використовувати розчини з концентрацією від 0,1 мг/мл до 1 мг/мл.

Для приготування стандарту з концентрацією 1 мг/мл близько 100 мг (точна наважка) відповідного стандарту помістити в колбу на 100 мл і довести до мітки відповідним розчинником.

Для отримання стандарту з концентрацією 0,1 мг/мл 10 мл розчину з концентрацією 1 мг/мл помістити у мірну колбу на 100 мл та довести до мітки відповідним розчинником.

При цьому якісний склад суміші визначається порівнянню часів утримувань компонентів досліджуваного об'єкта і компонентів модельної суміші, раніше хроматографованої на даному приладі.

Рекомендовані варіанти термостатування та часи утримання деяких анаболічних стероїдів наведено у пункті 4.

7.7 ЯКІСНИЙ ТА КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДОМ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З УФ АБО МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

Підготовка проб.

У методиці наведено рекомендовані умови пробопідготовки. Якщо хроматографічний пік препарату малий і непридатний для якісного та кількісного аналізу, необхідно повторити визначення, взявши більшу кількість речовини, у разі перевантаження системи (дуже великий пік) навішування необхідно зменшити та повторити аналіз.

1) Пігулки, капсули чи порошки.

Близько 1 г (точна наважка) досліджуваної речовини помістити в мірну колбу на 100 мл і додати 70 мл метанолу. Пробу екстрагувати протягом 20 хв. при інтенсивному струшуванні. Для більшої повноти екстракції пробу витримати 10 хв. у ультразвуковій ванні. Додати метанол у колбу до мітки. Після перемішування екстракт профільтрувати через паперовий фільтр, відкинувши перші 10 мл фільтрату. Аналізувати одержаний розчин.

2) Суспензії.

Збовтати суспензію для рівномірного розподілу частинок, помістити 1 мл суспензії у мірну колбу на 100 мл і додати 70 мл метанолу. Пробу екстрагувати протягом 20 хв при інтенсивному струшуванні. Для більшої повноти екстракції пробу витримати 10 хв у ультразвуковій ванні. Додати метанол у колбу до мітки. Після перемішування екстракт профільтрувати через паперовий фільтр, відкинувши перші 10 мл фільтрату. Аналізувати одержаний розчин.

3) Олійні розчини.

1 мл олійного розчину для ін'єкцій екстрагувати трьома порціями метанолу по 20 мл. Об'єднаний екстракти упарити насухо і розчинити в 100 мл метанолу. Аналізувати одержаний розчин.

Приготування стандарту.

Для приготування стандартного розчину використовується той же розчинник, що й при дослідженні речовини, що аналізується. Так, якщо проба аналізується у вигляді метанольного розчину, як розчинник для приготування стандарту вибирається метанол, якщо у вигляді розчину в хлороформі – хлороформ.

Для отримання хроматографічних даних, придатних для якісного та кількісного аналізу, слід використовувати розчини з концентрацією від 0,1 мг/мл до 1 мг/мл.

Також як стандарт можливе використання зразків із завідомо відомим якісним і кількісним складом з колекцій наркотичних засобів, психотропних і

сильнодіючих речовин, що формуються в експертно-криміналістичних лабораторії України.

Для якісного та кількісного аналізу анаболічних стероїдів методом рідинної хроматографії з УФ або (і) мас-спектрометричним детектуванням, використовується рідинний хроматограф з діодною матрицею або мас-спектрометричним детектором.

Колонка Zorbax SB-C18 4.6cm * 50mm * 5um (або аналогічна). Температура стовпчика 30 °С.

Об'єм проби 10 мкл.

Рухлива фаза А – буфер 5мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ рН=3 з HCOOH . В – ацетонітрил.

Швидкість потоку 0,7 мл/хв

Гرادієнт:

Час	А	В
0	70	30
20	5	95
35	5	95

Час аналізу 40 хв.

УФ детектор – діодна матриця

Довжина хвиль: 200 нм

245 нм

285 нм

Таблиця Г.6 – Орієнтовні часи утримання стероїдів у наведених умовах і рекомендована довжина хвилі УФ для кількісного визначення

	Найменування	Час утримання	Довжина хвилі
1	Дростанолону пропіонат	19.91	285
2	Тестостерон	8.1	245
3	Тестостерону пропіонат	16.7	245

Продовження таблиці Г.6

4	Тестостерону ізокапроат	21.35	245
5	Тестостерону деканоат	28.9	245
6	Тестостерону фенілпропіонат	19.9	245
7	Метандростенолон	8.4	245
8	Нандролону деканоат	27.9	245
9	Нандролону лаурат	34.8	245
10	Нандролону фенілпропіонат	19.16	245
11	Нандролону гексил оксіфенілпропіонат	25.02	245
12	Метилтестостерон	9.22	245
13	Оксандролон	6.91	245
14	Станозолол	9.96	245

7.8 УФ - СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ

Метод УФ спектроскопії є простим та експресним методом кількісного визначення речовин і проводиться тільки після якісного виявлення в пробі визначається речовини одним з ідентифікаційних методів аналізу (тонкошарова хроматографія, ІЧ спектроскопія, хроматомас-спектрометрія та ін.).

Перевагами методу УФ-спектроскопії при кількісному визначенні речовин є:

- висока точність і відтворюваність результатів (відносна похибка виміру вбирається у 3-5 % отн.);
- Можливість дослідження водних розчинів речовин;
- Відсутність впливу на результати вимірювання різних наповнювачів, що часто зустрічаються в суміші з наркотичними засобами (цукорів, крохмалю, соди та ін);
- Експресність аналізу;
- відсутність необхідності використання дорогих та рідкісних реактивів.

Кількісне визначення методом УФ спектрофотометрії проводять двома способами:

- за методикою з використанням градуювальної кривої (абсолютне калібрування);
- за методикою з використанням довідкових даних молярного коефіцієнта світлопоглинання.

Таблиця Г.7 – Максимуми смуг поглинання анаболічних стероїдів кількісного визначення.

	Найменування	Максимуми поглинання, нм
1	Тестостерон	240
2	Тестостерону пропіонат	240
3	Тестостерону ізокапроат	240
4	Тестостерону деканоат	240
5	Тестостерону фенілпропіонат	240
6	Нандролону деканоат	240
7	Нандролону лаурат	240
8	Нандролону фенілпропіонат	240
9	Нандролону гексилоксіфенілпропіонат	240
10	Метилтестостерон	241
11	Станозолол	230

Методика з використанням градуювального графіка.

Для побудови градуювального графіка готують стандартні розчини, розчиняючи точні навішування чистих речовин 10-20 мг в 100 мл 0,1 н хлористоводневої кислоти (8,3 мл $\text{HCl}_{\text{конц.}}$ + 991,7 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$, якщо % вміст кислоти в реагенті дорівнює 37 і питомий вага реагенту дорівнює 1,19 г/мл). Розчинення наважок чистих речовин зручно проводити, поміщаючи отримані розчини ультразвукову ванну на 15 хв. З отриманих таким чином стандартних розчинів

готують шляхом розведення щонайменше 3 розчинів з різними концентраціями в інтервалі від 10 – 20 мкг/мл. Потім будують градувальний графік залежності оптичної щільності в максимум поглинання (A) від концентрації (C , мг/мл) кожної речовини. Фотометрування розчинів проводять у кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм щодо 0,1 н НСІ.

З метою визначення вмісту анаболічних стероїдів у досліджуваному зразку (таблетці, речовині з капсули) наважку 40-50 мг речовини з капсули або подрібненої таблетки розчиняють у 100 мл 0,1 н хлористоводневої кислоти. Розчинення речовини з капсули або подрібненої таблетки найзручніше проводити, поміщаючи розчини в ультразвукову ванну на 15 хв. Якщо кількість анаболічних стероїдів визначається масляному розчині, то пробопідготовка інша. Згідно з літературними даними присутність олії не заважає кількісному визначенню анаболічних стероїдів у масляному розчині. Пробопідготовку проводять наступним чином: 0,25 мл розчину з досліджуваної ампули, флакона переносять у колбу на 25 мл, додають кілька крапель хлороформу, доводять метанолом до мітки, відбирають 1 мл отриманого розчину, переносять у колбу на 25 мл, додають 3 мл хлороформу, доводять метанолом до мітки, аналогічно готують серію стандартних розчинів. Значення оптичної щільності вимірюють щодо холостого розчину (15% розчин хлороформу в метанолі).

УФ спектри отриманих розчинів реєструють у тих самих умовах, що і УФ спектри стандартних зразків. Потім, визначивши значення оптичної щільності для зразків у максимумі поглинання, знаходять концентрацію ($C_{гр}$) у розчині по калібрувальної кривої і розраховують вміст кожної речовини за формулою:

$$Q = \frac{C_{гр} * V * 100\%}{g},$$

де Q - вміст речовини, що визначається, мас. %;

$C_{гр}$ - концентрація речовини в розчині, знайдена за градувальним графіком, мг/мл;

V - обсяг дистильованої води, в якому була розчинена навішування зразок, мл;

g - наважка досліджуваного зразка, мг.

Розрахунок вмісту речовини за значенням молярного коефіцієнта світлопоглинання.

Цей метод застосовується тільки в тих випадках, коли речовина, що поглинає, в розчині за цих умов суворо підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера (закон справедливий для дуже розбавлених розчинів). Концентрацію речовини визначають за формулою:

$$C = A / (\epsilon * l),$$

де A – оптична щільність випробуваного розчину;

ϵ - молярний коефіцієнт поглинання;

l – товщина поглинаючого шару, що дорівнює 10 мм;

Концентрація c визначається г/100 мл.

З цього рівняння видно, що, вимірявши оптичну щільність випробуваного розчину, можна знайти вміст у ньому визначається компонента, якщо відома величина молярного коефіцієнта поглинання.

Молярні коефіцієнти поглинання залежить від довжини хвилі. Величину ϵ можна знайти у довідкових даних (у довіднику Кларк вона позначається, як $A_1^{1\%}$ - оптична щільність в абсорбції, отримана (при певній довжині хвилі) для 1% розчину в кюветі з довжиною шару поглинання 1 см).

Підставляємо всі відомі значення формулу і визначаємо значення c , тобто. стільки грам діючої речовини міститься у 100 мл розчину.

Готують розчин, розчиняючи точну наважку досліджуваної речовини з капсули або подрібненої таблетки (навішення 10-15 мг) в 100 мл 0,1 н

хлористоводневої кислоти (розчинення наважок досліджуваних речовин зручно проводити, поміщаючи отримані розчини в ультразвукову ванну на 15 хв.) і визначають його оптичну щільність (A), причому це визначення проводять у тих же умовах, в яких було отримано значення величини ϵ (враховується рН середовища, довжина хвилі, приблизно той самий процентний вміст діючої речовини, довжина оптичного шляху кювети).

Потім за формулою визначають концентрацію речовини, вона буде виражена в г/100 мл (якщо брали значення молярного коефіцієнта поглинання з довідника Кларк) і після цього за формулою знаходять зміст речовини, що визначається, мас. % (Q).

Наведені методики передбачають проведення кількісного аналізу анаболічних стероїдів не менше, ніж у трьох паралельних вимірах. Відносна похибка вимірювань методом УФ спектрометрії вбирається у 5 отн. %.

7.9 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АНАБОЛІЧНИХ СТЕРОЇДІВ

Субстанція нандролону деканоату:

Розчинити 10 мг випробуваної субстанції у 100 мл абсолютного етанолу, розбавити 5 мл до 50 абсолютним етанолом. Виміряти оптичну густину при 240 нм. Розрахувати кількість, приймаючи питомий показник поглинання $E_{1\text{cm}}^{1\%} 407$

Субстанція нандролону фенілпропіонат:

Розчинити 10 мг випробуваної субстанції у 100 мл абсолютного етанолу, розбавити 5 мл до 50 абсолютним етанолом. Виміряти оптичну густину при 240 нм. Розрахувати кількість, приймаючи питомий показник поглинання $E_{1\text{cm}}^{1\%} 430$

Нандролон деканоат, нандролону фенілпропіонат розчин для ін'єкцій масляний:

Розчин ізоніазиду. Розчинити 500 мг ізоніазиду в 250 мл метанолу, додати 0,63 мл хлористоводневої кислоти та довести метанолом до 500 мл.

Приготування стандарту. Перенести близько 25 мг стандарту нандролону деканоату або нандролону фенілпропіонату (точна наважка) у мірну колбу на 100 мл, розчинити в хлороформі та довести хлороформом до мітки.

Приготування випробуваного розчину. Перенести в мірну колбу аліквоту масляного розчину для ін'єкцій, еквівалентну 50 мг діючої речовини, мірну колбу на 200 мл, додати хлороформу до мітки і перемішати. Перенести 5 мл отриманого розчину у мірну колбу на 50 мл і довести хлороформом до мітки.

Перенести по 5 мл стандартного випробуваного розчину і хлороформу (для приготування розчину порівняння) в окремі мірні колби на 10 мл, довести до мітки розчином ізоніазиду і перемішати. Витримати 1 годину при періодичному перемішуванні. Визначити оптичну густина при 380 нм, використовуючи приготований розчин порівняння.

$$\text{Кількість} = (C \setminus V)(A_u / A_s) \text{мг}$$

C концентрація мкг/мл у стандартному розчині

A_u оптична щільність досліджуваного розчину

A_s оптична щільність стандарту

Станозолол таблетки:

Приготування стандартів.

Розчинити необхідну кількість стандарту станозололу у спирті для одержання розчину з концентрацією 80 мкг/мл. Перенести 5 мл розчину на мірну колбу на 10 мл і довести спиртом до мітки для приготування нейтрального розчину. Перенести 5 мл вихідного розчину в іншу мірну колбу на 10 мл і довести до мітки підкисленим спиртом (1,5 мл хлористоводневої кислоти в 100 мл спирту) і перемішати для приготування стандартного підкисленого розчину. Концентрація станозололу у стандартах 40 мкг/мл.

Розчин проби.

Наважку попередньо подрібнених пігулок, еквівалентну 4 мг станозолола, помістити в мірну колбу на 50 мл, додати 25 мл спирту та нагрівати на водяній бані при постійному перемішуванні протягом 15 хв. Охолодити, довести спиртом до мітки, перемішати та профільтрувати через паперовий фільтр середньої пористості,

відкидаючи перші 10 мл фільтрату. Перенести 5 мл фільтрату на мірну колбу на 10 мл і довести спиртом до мітки для приготування нейтрального розчину. Перенести 5 мл вихідного розчину в іншу мірну колбу на 10 мл і довести до мітки підкисленим спиртом (1,5 мл хлористоводневої кислоти в 100 мл спирту) і перемішати для приготування розчину підкисленого.

Визначити оптичну щільність при 235 нм підкисленого спирту, підкисленого розчину стандарту і підкисленого випробуваного розчину, використовуючи як розчин порівняння нейтральний спирт, нейтральний розчин стандарту і нейтральний випробуваний розчин.

$$\text{Кількість} = 0,1C(Au-Ao/As-Ao)\text{мг},$$

де С концентрація мкг/мл у стандартному розчині

Au оптична щільність підкисленого досліджуваного розчину

As оптична щільність підкисленого стандарту

Ao оптична щільність підкисленого спирту

Тестостерон субстанція:

Розчинити 50 мг випробуваної субстанції у 100 мл етанолу, розбавити 2 мл до 100 етанолом. Виміряти оптичну густину при 241 нм. Розрахувати кількість, приймаючи питомий показник поглинання $E^{1\%}_{1\text{см}} 569$

Тестостерону деканоат субстанція:

Розчинити 10 мг випробуваної субстанції в 100 мл етанолу, розбавити 5мл до 50 етанолом. Виміряти оптичну густину при 241 нм. Розрахувати кількість, приймаючи питомий показник поглинання $E^{1\%}_{1\text{см}} 382$

Тестостерону енантат субстанція:

Розчинити 50 мг випробуваної субстанції у 100 мл етанолу, розбавити 2 мл до 100 етанолом. Виміряти оптичну густину при 241 нм. Розрахувати кількість, приймаючи питомий показник поглинання $E^{1\%}_{1\text{см}} 422$

7.10 ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДОМ ІЧ – СПЕКТРОСКОПІЇ

При дослідженні анаболічних стероїдів ІЧ - спектроскопія застосовується головним чином для ідентифікації субстанції та, меншою мірою для аналізу лікарських форм. Аналіз ІЧ-спектрів міститься у фармакопейних статтях практично всіх стероїдів, які застосовуються в медицині, для підтвердження справжності препарату.

Вимірювання проводять на ІЧ-Фур'ї спектрометрах, у середній ІЧ – області, за довжини хвилі від 2,5 до 20 мкм (4000-500 cm^{-1}).

Ідентифікація речовини може бути проведена шляхом зіставлення ІЧ-спектру досліджуваної речовини з аналогічним спектром його стандартного зразка або з його стандартним спектром. У першому випадку ІЧ - спектри знімають на тому самому приладі в однакових умовах. У другому випадку використовуються стандартні комерційні бібліотеки ІЧ-спектрів. Спектри анаболічних стероїдів зазвичай знімають у таблетках з бромідом калію або в розчині, причому як розчинник використовується хлороформ (анаболічні стероїди добре розчиняються в хлороформі). Даний тест можна проводити з чистими субстанціями анаболічних стероїдів, для ідентифікації лікарських форм та виявлення стероїдів у різних об'єктах необхідно виділити діючу речовину згідно з методиками підготовки проби.

Підготовку зразків анаболічних стероїдів (субстанції або виділеної діючої речовини) до зняття ІЧ-спектрів проводять в основному за такими методами:

1. Підготовка таблеток із бромідом калію:

Наважку твердої речовини (1 - 3 мг) ретельно змішують у вібротлинці або у ступці зі спектроскопічно чистим бромідом калію (150 - 200 мг) і суміш пресують при тиску 7,5 - 10 т/см^2 протягом 2-5 хв під вакуумом 2- 3мм. рт. ст.

Спектр отриманого зразка знімають щодо повітря або диска, приготованого з чистого KBr.

2. Підготовка до зняття спектра у розчині:

Розчин досліджуваної речовини у хлороформі з концентраціями від 1 до 10 % вводять у кювету з товщиною шару 0,1-1 мм. Спектр розчину знімають щодо чистого розчинника.

Для анаболічних стероїдів характерним є прояв поліморфізму. Поліморфні модифікації однієї й тієї ж речовини можуть давати різні спектри в таблетках з бромідом калію, тому спектри стандарту та досліджуваної речовини можуть не збігатися, навіть якщо ідентичні речовини. У цьому випадку для ідентифікації зіставляють спектри розчинів у хлороформі або, розчинивши досліджувану речовину та стандарт у безводному метанолі або хлороформі, розчинник упарюють насухо і порівнюють спектри твердих залишків (у таблетках з бромідом калію).

У додатку наведені спектри деяких анаболічних стероїдів, які можна використовувати для попередньої ідентифікації речовин.

За наявності відповідного обладнання для дослідження анаболічних стероїдів можливе використання приставки для проведення ІЧ - спектроскопічного дослідження рідких і твердих речовин методом Порушеного Повного Внутрішнього Відображення (НПВО).

Однак, при необхідності ідентифікації лікарських форм необхідно враховувати вплив допоміжних речовин, що заважає. Тому необхідно проводити попереднє виділення діючої речовини. Якщо спектр виходить недостатньо чистим, можна скористатися додатковим очищенням:

Для ідентифікації діючої речовини таблеток та вмісту капсул анаболічних стероїдів часто достатньо розтерти наважку таблеток, еквівалентну 50 мг діючої речовини, з 10 мл води та проекстрагувати 10 мл хлороформу. Профільтрувати, випарувати хлороформний (нижній шар) екстракту насухо і висушити. Далі можна знімати спектр сухого залишку після пресування з бромистим калієм або безпосередньо за допомогою НПВО для порошкоподібних речовин.

У складних випадках, коли вміст діючої речовини мало і спектр недостатньо чистий, можна рекомендувати доочищення препарату.

1. Змішати сухий залишок із 5 мл ацетону, декантувати розчин, додати 20 мл води, осад відфільтрувати, висушити.

2. Рекомендується також видалення супутніх речовин із таблетки до екстракції хлороформом за допомогою гексану. Анаболічні стероїди погано розчиняються в аліфатичних розчинниках, тому розтерту таблетку спочатку 3 рази змішують з 15 мл гексану, центрифугують та видаляють гексан. Залишок екстрагують хлороформом, фільтрують і висушують насухо.

Суспензію збовтати для рівномірного розподілу частинок, перенести аліквоту, еквівалентну 20 мг діючої речовини (при відомому вмісті) у ділільну лійку. Екстрагувати 4 порціями хлороформу по 10 мл, фільтруючи кожен порцію через вату, промиту хлороформом.

Одержані об'єднані екстракти хлороформні екстракти упарюють насухо на водяній бані. Далі можна знімати спектр сухого залишку після пресування з бромистим калієм або безпосередньо за допомогою НПВО для порошкоподібних речовин.

При недостатньо чистому спектрі слід скористатися методикою очищення ацетоном, наведеною для таблеток.

Виділення досить чистого для якісного ІЧ - спектру діючої речовини з масляних розчинів є складнішим завданням. Для виділення діючої речовини можна скористатися методикою екстракції метанолом після розведення масляного розчину гексаном або петролейним ефіром з подальшим очищенням ацетоном і водою.

ВИСНОВКИ

У методиці наведено результати вивчення нормативних, наукових, довідкових тощо інформаційних джерел щодо відомостей про дослідження анаболічних стероїдів; розглянуто загальну характеристику сучасних анаболічних стероїдів, фізико-хімічні властивості, механізм дії, методи аналізу та стратегію виявлення сучасних анаболічних стероїдів; розроблено методи виявлення та ідентифікації анаболічних стероїдів за допомогою якісних хімічних реакцій з використанням реактивів на основі кислоти сульфатної концентрованої (суміш кислоти сульфатної концентрованої з метиловим спиртом (7:3); розчину ваніліну в кислоті сірчаної концентрованої, розчину формальдегіду в кислоті сірчаної концентрованої); розроблено методи ідентифікації анаболічних стероїдів методом газової хроматографії з мас-селективним детектуванням, ІЧ та УФ-спектроскопії, ВЕРХ.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Бірюков С. М. Дослідження сильнодіючих лікарських засобів, що містять метандієнон і нандролон деканат в об'єктах криміналістичної експертизи / С. М. Бірюков, В. В. Вартузов, О. В. Мінін // Криміналістичний вісник. 2013. № 2 (20). С. 224–237.
2. Ohshima A. Effect of a synthetic androgen on biliary lipid secretion in the female hamster / A. Ohshima, B. I. Cohen, N. Ayyd // New York ; Mosbach :Department of Surgery, Beth Israel Medical Center. — 1996 Aug. — P. 879–886.
3. Про затвердження Переліків отруйних та сильнодіючих лікарських засобів: Наказ МОЗ України від 17.08.2007 р. № 490. Офіційний вісник України. 2007. № 67, стор. 238.
4. Всемирное антидопинговое агентство «Всемирный антидопинговый Кодекс. Запрещенный список 2007 г.» ВАДА, 2006 р.
5. Кайргалиев Д.В., Васильев Д.В., Гладырев В.В., Пономаренко Д.В., Внуков В.И. ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ АНДРОГЕННЫХ СТЕРОИДОВ (СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ). *Современные проблемы науки и образования*. 2014. № 2.
6. Park SJ, Pyo HS, Kim YJ, Kim MS, Park J. Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation. *Journal of Analytical Toxicology* 1990. №14. P. 84.
7. Державна Фармакопея України : у 3 т. / Держ. служба України з лік. засобів, Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. — 2-ге вид. — Харків : Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів, 2014. — Т. 2. — 724 с.
8. Aniński P. Hair analysis of anabolic steroids in connection with doping-control results from horse sample. *Journal of Mass Spectrometry*. 2008. No. 43. P. 1001–1008.
9. WADA adverse analytical findings and atypical findings reported by accredited laboratories. WADA, 2008. P.13
10. WADA prohibited list. International standard. Version 5.0, January 2010.

11. Вирюс Э.Д., Соболевский Т.Г., Родченков Г.М. Обнаружение оксандролонa и его метаболита в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения с химической ионизацией при атмосферном давлении после прекращения приема. *Журнал аналитической химии*. 2009, 64(1), С. 31–35.
12. Kam P.C.A., Yarrow M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia*. 2005. № 60. P. 685-692.
13. Basaria S., Wahlström J.T., Dobs A.S. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001. №86. P. 5108-5117.
14. Wu F.C.W. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin. Chem.* 1997. №43. P. 1289-1292.
15. Kicman A.T., Gower D.B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann. Clin. Biochem.* 2003. №40. P. 321-356.
16. Ruth A. Clinical Measurement of Steroid Metabolism. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001, 15(1) P. 1-16.
17. Makin H.L.J., Gower D.B., Kirk D.N. Metabolism of androgens. In: *Steroid Analysis. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall*. Glasgow 1995. P. 269-272.
18. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.* 1996. №42. P. 1001-1020.
19. Schänzer W., Opfermann G., Donike M. 17-epimerization of 17 α -methyl anabolic steroids in humans: metabolism and synthesis of 17 α -hydroxy-17 β -methyl steroids. *Steroids*. 1992. №57. P.537-549.
20. Schänzer W., Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroids metabolites. *Anal. Chim. Acta*. 1993. №275. P. 23-48.
21. Brooks RV, Firth RG, Sumner NA. Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. *British Journal of Sports Medicine*. 1975. №9. P. 89.

22. Donike M. Zum problem des Nachweises der anabolen steroide: gas-chromatographische und massenspezifische Möglichkeiten. *Sportarzt und Sportmedizin*. 1975. №26. P. 16.
23. Ward RJ, Shackleton CH, Lawson AM. Gas chromatographic–mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs. *British Journal of Sports Medicine*. 1975. №9. P. 93.
24. Masse R, Ayotte C, Dugal R. Studies on anabolic steroids I. Integrated methodological pproach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine. *Journal of Chromatography*. 1989. №489. P. 24.
25. Chung BC, Choo HYP, Kim TW, Eom KD, Kwon OS, Suh J, Yang J, Park J. Analysis of anabolic steroids using GC/MS with selected ion monitoring. *Journal of Analytical Toxicology*. 1990. №14. P. 91.
26. Ayotte C, Goudreault D, Charlebois A. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *Journal of Chromatography*. 1996. №687. P. 3.
27. Chiong DM, Consuegra-Rodriguez E, Almirall JR The analysis and identification of steroids. *Journal of Forensic Science*. 1992 Mar. №37(2). P. 488-502.
28. Parr MK, Geyer H, Reinhart U, Schänzer W Analytical strategies for the detection of non-labelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements. *Food Additives and Contaminants*. 2004.
29. Guan F., Uboh C. E., Soma L. R., Lio Y., Rudy J., Tobin T. Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005. № 829 (1-2). P. 56—68.
30. Pozo O.J., Van Eenoo P., Deventer K., Delbeke F.T. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2007. № 389(4). P. 1209—1224.
31. Yamashita K., Okuyama M., Watanabe Y., Honma S., Kobayashi S., Numazawa M. Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum

by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids*. 2007. №72(11-12). P. 819—827.

32. Hunina L.M. Antyestrohenni preparaty u klinitsi i sporti: klasyfikatsiya, struktura, mekhanizm diyii, pobichni efekty / L.M. Hunina, S.A. Oliynyk, I.V. Dosenko, A.V. Savosta // *Sportyvna medytsyna*. – 2007. – No1. – P. 84 – 89.

33. Zalesskiy V.N. Stratifikatsiya povyishennoho riska vznikoveniya doping-assotsiirovanykh pobochnykh effektov so storony serdechno-sosudistoy systemy u sportyvenov / Zalesskiy V.N., Dyinnik O.B. // *Sportivna meditsina*. – 2007. – No2. – P. 84 – 91

34. Zalesskiy V.N. Pobochnyie efektyi deystviya anabolicheskikh androgennykh steroidov u sportyvenov / V.N. Zalesskiy, O.B. Dyinnik // *Sportivna meditsina*. — 2007. — №1. — P. 77 – 83.

35. Bertrand M, Mass'e R, Dugal R. GC-MS approach for the detection and characterisation of anabolic steroids and their metabolites in biological fluids at major international sporting events. *Farmaceutische Tijdschrift Voor Belgie*. 1978. №55. P. 85.