

УВЭЖХ-МСВР - определение некоторых рилизинг-пептидов гормона роста в моче

*А.З. Темердашев¹, Е.В. Дмитриева¹, А.А. Азарян¹, Д.А. Бурмыкин²

¹Кубанский государственный университет,

Российская Федерация, 350055, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149

²ООО «Брукер», Российская Федерация, 119017, г. Москва, ул. Пятницкая, д. 50/2, стр. 1

*Адрес для переписки: Темердашев Азамат Зауалевич, E-mail: TemerdashevAZ@gmail.com

Поступила в редакцию 31 августа 2019 г., после доработки – 08 ноября 2019 г.

Повсеместное распространение ряда рилизинг-пептидов гормона роста и их употребление в профессиональном и любительском спорте в силу специфических свойств этих вспомогательных препаратов влечет за собой непрестанное внимание со стороны надзорных органов. Помимо проведения экспертиз изъятых материалов с целью установления действующих компонентов, присутствующих в них, целесообразен и необходим контроль их содержания в моче на уровне следовых концентраций. Это обусловлено тем, что эффективные дозы употребления рилизинг-пептидов гормона роста относительно невысоки, и скорость выведения их из организма зачастую не позволяет проводить определение нативных соединений и их метаболитов уже спустя несколько дней после употребления. Предложена методика определения некоторых рилизинг-пептидов гормона роста в моче с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения и твердофазным концентрированием аналитов. Изучена возможность применения различных сорбентов для проведения твердофазной экстракции. Оценена чувствительность определения этих веществ предложенным методом, установлено, что наибольшей чувствительности можно добиться с использованием подвижной фазы, состоящей из 0.1 % раствора трифторуксусной кислоты в воде и ацетонитрила, подкисленного трифторуксусной кислотой (0.1 %). Установлен фактор концентрирования при применении твердофазной экстракции. Из представленных данных видно, что наибольшая эффективность извлечения достигается благодаря применению катионообменных сорбентов, в то время как октадецильный сорбент, фактически, является неэффективным для решения поставленной задачи. Установлено, что матричные эффекты при выполнении исследований не превышали 15 %. Применение МСВР позволяет обеспечить высокую чувствительность благодаря селективности метода.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МСВР, рилизинг-пептиды, допинг, масс-спектрометрия.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 4, pp. 509-516

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.4.008

UHPLC-HRMS determination of some human growth hormone-releasing peptides in urine

*A.Z. Temerdashev¹, E.V. Dmitrieva¹, A.A. Azaryan¹, D.A. Burmikin²

¹Kuban State University, Stavropolskaya st., 149, Krasnodar, 350055, Russian Federation

²Bruker Ltd., Pyatnitskaya st., 50/2, Moscow, 119017, Russian Federation

*Corresponding author: Azamat Z. Temerdashev, E-mail: TemerdashevAZ@gmail.com

Submitted 31 August 2019, received in revised form 08 November 2019

Wide dissemination of growth hormone-releasing peptides for professional athletes as well as in amateur sports requires constant attention from the law enforcement agencies. However, in addition to examining the seized materials to establish their active components, it is advisable and necessary to control the growth hormone-releasing peptides in the urine at the trace concentration level since the effective doses of the use of growth hormone-releasing peptides are relatively low and the rate of their excretion from the body often does not allow the determination of native compounds and their metabolites even a few days after the administration.

A procedure for the measurement of some growth hormone-releasing peptides in the urine using the ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) in combination with the high-resolution mass spectrometry (HRMS) has been proposed. It was found that the highest sensitivity could be achieved by utilizing the mobile phase consisting of 0.1% solution of trifluoroacetic acid in water and acetonitrile acidified with trifluoroacetic acid (0.1%). The concentration factor using the solid-phase extraction has been established. As it could be seen from the presented data, the highest extraction efficiency was achieved using the cation-exchange sorbents, while the octadecyl sorbent, in fact, was ineffective in this case. The matrix effects were noted not to exceed 15% during the research. The use of HRMS allows for high sensitivity due to the selectivity of the method.

Keywords: UHPLC-HRMS, releasing-peptides, doping, mass-spectrometry

ВВЕДЕНИЕ

Определение низкомолекулярных соединений в целях криминалистической, токсикологической экспертизы или допинг-контроля вот уже несколько десятилетий практически полностью проводится с использованием методов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Последнее десятилетие перечень методов пополнила тандемная масс-спектрометрия, особенно после появления большого количества коммерчески доступных приборов. Результатом этого явилась разработка множества методик контроля запрещенных препаратов, отвечающих всем критериям качественного и количественного анализа, предъявляемым со стороны контролирующих органов, в частности, Всемирного Антидопингового Агентства (ВАДА). Долгое время практически монопольное положение в целях проведения количественного анализа занимали масс-спектрометры на основе масс-анализаторов типа тройной квадруполь (QqQ) [1, 2]. Возможность регистрации ионов-продуктов в режиме множественного мониторинга реакций (MRM) с использованием соударительной диссоциации позволяла решить главную проблему квадрупольных масс-спектрометров – относительно невысокую селективность и, как следствие, чувствительность, зачастую не позволяющую проводить анализ на следовом и ультраследовом уровне концентраций. На сегодняшний день применение QqQ-систем в целях проведения количественного анализа можно назвать «золотым стандартом», однако возможность проведения исключительно целевого анализа в режиме MRM сильно ограничивает его возможности в области криминалистических, токсикологических экспертиз и допинг-контроля.

Альтернативное решение стало возможным с развитием тандемных масс-спектрометров высокого разрешения [3–5], которые, на сегодняшний день, практически не уступают в чувствительности многим QqQ-системам. Основным фактором, сдерживающим их повсеместное распространение, является высокая цена как квадруполь-времяпролетных (QTOF) систем, так и масс-спектрометров на основе орбитальной ловушки (Orbitrap). Однако именно эти системы позволяют не только проводить количественный анализ на уровне следовых и ультраследовых концентраций, но и получать полные спектры как ионов-прекурсоров, так и ионов-продуктов в режиме динамического исключения ионов-прекурсоров или полного пропуска. Такая возможность позволяет в дальнейшем проводить ретроспективный анализ

и нецелевой скрининг широкого спектра соединений [6, 7], ограничивающийся, в первую очередь, используемой пробоподготовкой.

Среди подобных соединений, представляющих интерес, в частности, со стороны допинг-контроля, особое место занимают рилизинг-пептиды гормона роста и родственные им соединения [8–10]. Небольшие эффективные концентрации, высокая скорость выведения из организма и полнота метаболизма существенно осложняют их определение в биологических жидкостях, а нарушение условий транспортировки и хранения нативных веществ приводит к их деградации.

Механизм действия рилизинг-пептидов гормона роста заключается в том, что они стимулируют выработку эндогенного гормона роста, что запрещено ВАДА, поскольку позволяет получить несправедливое преимущество перед соперниками. Помимо этого, их применение позволяет скрыть употребление рекомбинантного гормона роста, что также запрещено. Стоит отметить, что большинство подобных соединений также не прошло цикл доклинических и клинических испытаний, что обуславливает необходимость контроля за их распространением. Учитывая, что соединения пептидной природы разлагаются при нагревании, их определение с использованием метода газовой хромато-масс-спектрометрии невозможно, что существенно ограничивает круг криминалистических и токсикологических лабораторий, способных проводить их определение.

Ранее уже рассматривались некоторые процедуры определения рилизинг-пептидов в различных объектах [11–16], однако, было установлено, что срок эксплуатации хроматографических колонок в режиме “Wrong-way round ionization”, описанный в нашей прошлой работе [13], существенно ниже, чем в присутствии муравьиной кислоты, и, фактически, является непригодным для проведения потоковых исследований. Кроме того, особо острым становится вопрос определения аналитов с чувствительностью, предъявляемой ВАДА – 2 нг/мл [17]. Достигнуть подобную чувствительность путем прямого анализа образцов мочи и плазмы затруднительно, что обуславливает необходимость введения дополнительного этапа предконцентрирования, например, твердофазной экстракции [18–23]. Классические методы определения с использованием процедуры «разбавил и вколпол», позволяют, как правило, достигать пределов детектирования на уровне от 5 до 20 нг/мл, а применение твердофазной экстракции (ТФЭ) позволяет снизить их в отношении некоторых

соединений до 20 пг/мл [1, 21–23], что позволяет расширить временное окно определения данных соединений в биологических жидкостях.

Принимая во внимание разнообразие соединений, используемых в качестве допинг-агентов, актуальной задачей является изучение эффективности различных сорбентов для ТФЭ с последующим их определением с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения (УВЭЖХ-МСВР).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование

Для проведения исследований использовали ультравысокоэффективный жидкостный хроматограф Elute UHPLC (Bruker Daltonik GmbH, Германия), оснащенный бинарным градиентным насосом, термостатируемым автосамплером и колоночным термостатом, совмещенный с квадруполь-время-пролетным масс-спектрометром maXis impact (Bruker Daltonik GmbH, Германия) с источником электро-распылительной ионизации под управлением ПО Bruker Compass HyStar 4.1. Последующую обработку данных проводили с использованием ПО Bruker Data Analysis 4.4. Разделение осуществляли в режиме обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с использованием аналитической колонки Waters Acquity BEH C₁₈ (75×2.1 мм, 1.7 мкм). Температура термостата колонок – 35 °С, объем вводимой пробы – 5 мкл. Изучение эффективности твердофазной экстракции проводили с использованием патронов Biotage Isolute C₁₈, SCX и Phenomenex Strata WCX, объемом 1 мл и сорбентом, массой 100 мг и вакуумным 10-позиционным манифолдом для ТФЭ Agilent Technologies.

Реактивы и реагенты

Для проведения исследований использовали ацетонитрил квалификации «gradient grade» (Sigma-Aldrich), метанол, квалификации «HPLC grade» (J.T. Baker), муравьиную кислоту (>99 %) (Acros Organics), формиат аммония, квалификации «х.ч.» («Вектон») и стандартные образцы аналитов: GHRP-6, ипаморелина, гексарелина, селанка и РТ-141 («Bioorganika»).

Количественный анализ проводили путем введения смеси пептидов в холостые (бланковые) образцы мочи с целью получения проб с концентрациями аналитов 100, 50, 20, 10, 5, 2 и 1 нг/мл.

Образцы мочи были получены от 10 добровольцев (мужчин и женщин) в возрасте от 19 до 30 лет и хранились при температуре –20 °С до проведения анализа.

Обсуждение результатов

Изменение состава подвижной фазы – один из способов управления не только параметрами удерживания аналитов, но и чувствительностью

анализа, особенно в жидкостной хромато-масс-спектрометрии. В ходе проведения исследований, были использованы системы подвижных фаз на основе подкисленных воды и ацетонитрила, и проведена оптимизация условий градиентного элюирования. В результате было принято решение рассмотреть два варианта, обеспечивших наилучшие результаты. В первом случае, подвижная фаза состояла из 0.1 % раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила, с добавкой 0.1 % муравьиной кислоты. К сожалению, его использование не позволило добиться чувствительности определения лучше, чем 20 нг/мл, в то время как её замена на вторую систему, в состав которой входили 0.1 % раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) (А) и ацетонитрил, с добавкой 0.1 % ТФУ (В), позволила снизить предел обнаружения до 5 нг/мл, в первую очередь, благодаря повышению эффективности ионизации аналитов. Условия градиентного элюирования и детектирования приведены в табл. 1 и 2. Хроматограмма смеси пептидов, полученная в условиях регистрации полного ионного тока, приведена на рис. 1.

Таблица 1

Условия градиентного элюирования рилизинг-пептидов гормонов роста. Скорость потока подвижной фазы – 0.3 мл/мин

Table 1

Growth hormone-releasing peptides gradient elution conditions. Mobile phase flow rate – 0.3 mL/min

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %
0.0	95	5
0.5	95	5
5.0	10	90
9.0	10	90
9.2	95	5
10.5	95	5

Таблица 2

Условия детектирования рилизинг-пептидов гормона роста в моче

Table 2

Detection conditions of growth hormone-releasing peptides in the urine

Параметр	Значение
Температура источника ионизации, °С	250
Напряжение на источнике ионизации, В	4500
Давление газа-распылителя (азот), кПа	100
Расход газа-осушителя (азот), л/мин	5
Скорость сканирования, Гц	3
Диапазон масс, <i>m/z</i>	150–3000
Давление газа-мишени в ячейке соударений (азот), мТорр	1.5

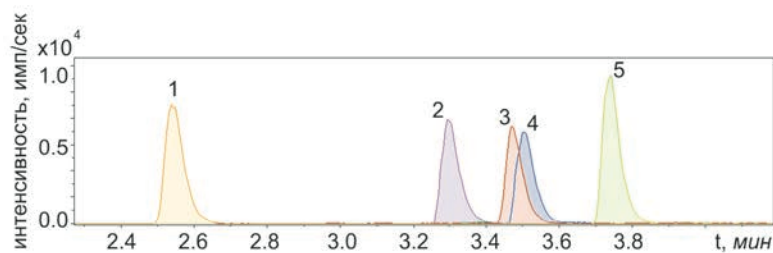


Рис. 1. Хроматограмма смеси пептидов, полученная в условиях регистрации полного ионного тока, с концентрацией 10 нг/мл: 1 – селанк, 2 – ипаморелин, 3 – GHRP-6, 4 – гексарелин, 5 – PT-141.

Fig. 1. Total ion current peptides mixture chromatogram with 10 ng/mL concentration: 1 – selank; 2 – ipamorelin, 3 – GHRP-6, 4 – hexarelin, 5 – PT-141.

Однако даже такая чувствительность является недостаточной и не отвечает требованиям ВАДА в отношении определения рилизинг-пептидов гормона роста, даже в случае применения прямого анализа мочи, без её предварительного разбавления в целях денатурации белка. Решением данной проблемы является применение твердофазной экстракции. Для этого аликвоту мочи, содержащей нативные аналиты, объемом 3 мл, загружали на патроны для ТФЭ. Предварительное кондиционирование патронов осуществляли с использованием смеси метанол : вода (50 : 50, v : v) и элюирование (объемом 0.5 мл) осуществляли смесью ацетонитрил:вода (90 : 10) для патронов C₁₈. Ввиду отличий в механизме удерживания катионообменных сорбентов (SCX и WCX), их кондиционирование осуществляли 2.5 % водным раствором аммиака в воде с последующим пропуском смеси ацетонитрил:вода (10 : 90). Элюирование осуществляли 5 % раствором ацетата аммония в метаноле

Как видно из табл. 3, наибольшая степень извлечения аналитов достигается при использовании патронов для твердофазной экстракции со слабым катионообменным сорбентом (WCX). Меньшая степень извлечения с использованием патронов SCX обусловлена тем, что аналиты сильнее удерживаются на сорбенте и количественного их извлечения удастся достигнуть только путем увеличения объема элюента в 2 раза, что приводит к уменьшению фактора концентрирования. При использовании октадецильного сорбента наблюдается существенный проскок аналитов уже в самом начале загрузки.

Немаловажным аспектом при проведении анализа является оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования. Применение режима динамического исключения ионов-прекурсоров не позволяет добиться выигрыша в чувствительности, однако в целях повышения информативности и возможности дальнейшего ретроспективного анализа данных, его применение может являться целесообразным. Не меньший интерес представляет режим, при котором масс-спектрометр постоянно осуществляет переключение между режимом сканирования полного ионного тока ионов-прекурсоров и широкополосным сканированием ионов-продуктов, при котором аналитический квадруполь пропускает весь заданный диапазон масс в ячейку соударений с целью получения их ионов-продуктов. В этом режиме, в случае наличия коэлюирующихся матричных соединений, будут получены спектры ионов-продуктов как аналитов, так и матричных компонентов. При этом вероятность ложного отбрасывания пика аналита ввиду его малой интенсивности отсутствует (что возможно при работе в режиме динамического исключения), однако однозначно установить принадлежность иона-продукта к конкретному иону-прекурзору в условиях реальных образцов биологических жидкостей практически невозможно. При этом, как и в случае динамического исключения ионов-прекурсоров, выигрыша в чувствительности, по сравнению с работой при сканировании полного ионного тока без проведения экспериментов в режиме тандемного масс-спектрометрического детектирования (**MS1**), не происходит, что объясняется потерями при формировании ионов-продуктов, которые компенсируются высокой селективностью

Таблица 3

Эффективность различных сорбентов в целях твердофазного концентрирования аналитов из мочи (C = 20 нг/мл, n = 3)

Table 3

Efficiency comparison of different SPE tubes for the analytes preconcentration (C = 20 ng/mL, n = 3)

Определяемое соединение	Степень извлечения, %		
	Biotage Isolute C ₁₈	Phenomenex Strata WCX	Biotage Isolute SCX
Селанк	35 ± 4	89 ± 5	76 ± 5
Ипаморелин	48 ± 5	94 ± 4	82 ± 5
GHRP-6	53 ± 5	91 ± 4	80 ± 5
Гексарелин	54 ± 5	91 ± 4	78 ± 5
PT-141 (IS)	70 ± 5	92 ± 4	86 ± 4

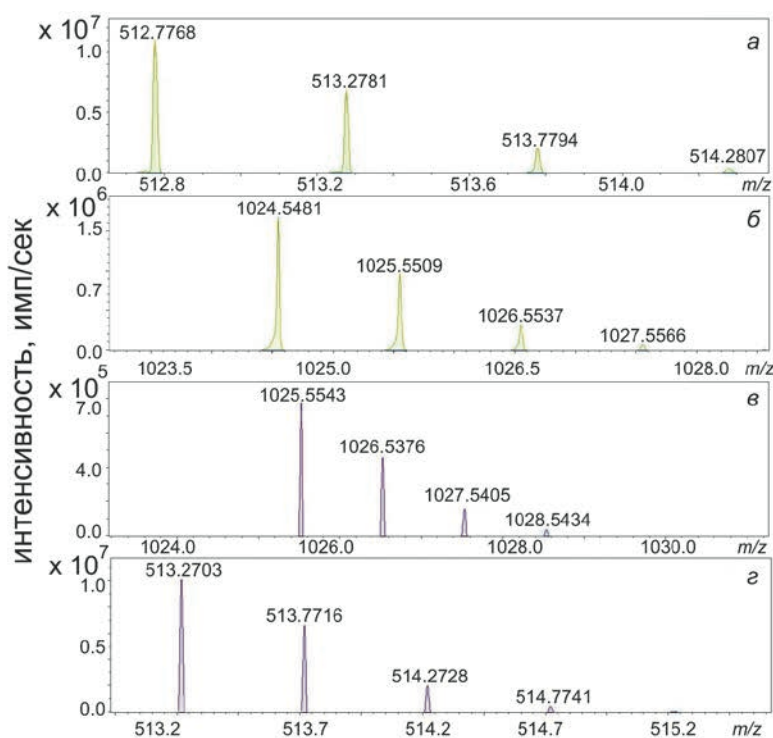


Рис. 2. Масс-спектры меланотана II (а, б) и и PT-141 (в, г).
 Fig. 2. Melanotan II (a, b) and PT-141 (c, d) mass-spectra

масс-спектрометра. Существенным недостатком подхода, основанного на работе без проведения MS/MS экспериментов является малая информативность о структурной информации аналитов и возможности возникновения хроматографически неразрешенных соединений, имеющих близкие значения m/z , которые не могут быть разрешены даже с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения. Примером

подобных соединений являются PT-141 и меланотан II (рис. 2а и рис. 2г). В присутствии обоих соединений в образце, несмотря на значимую для МСВР разницу в массах образующихся полизарядных ионов, могут наблюдаться завышение аналитического сигнала PT-141 из-за наложения моноизотопного пика двузарядного иона PT-141 с первым изотопным пиком двузарядного иона меланотана II. При этом

Таблица 4

Некоторые метрологические характеристики методики определения рилизинг-пептидов гормона роста в моче ($n = 6$). Внутренний стандарт – PT-141

Table 4

Some validation parameters of growth hormone-releasing peptides determination in the urine ($n = 6$). PT-141 peptide was used as the internal standard

Вещество	Детектируемое значение m/z	Детектируемый ион	Ошибка определения масс, Δppm	Концентрация раствора контроля качества (РКК), ng/ml	В один день		В разные дни		Матричные эффекты, %
					Точность, %	Воспроизводимость, %	Точность, %	Воспроизводимость, %	
Селанк	376.7242	$[M + 2H]^{2+}$	1.73	2	-5.6	11.4	-5.2	14.2	15
				10	-3.8	7.7	-3.6	10.5	9.2
				25	2.2	5.4	-2.9	11.9	4.5
Ипаморелин	356.7000	$[M + 2H]^{2+}$	0.84	2	-6.1	12.3	-7.0	13.6	12
				10	-4.2	9.1	-5	10.3	7.3
				25	2.5	4.9	2.9	5.9	4.8
GHRP-6	437.2295	$[M + 2H]^{2+}$	1.37	2	6.6	10.5	6.4	10.2	13
				10	4.3	8.3	4.2	8.1	6.4
				25	1.7	3.9	1.7	3.7	4.2
Гексарелин	444.2372	$[M + 2H]^{2+}$	1.58	2	5.5	10.7	5.7	11.0	12
				10	3.2	7.4	3.3	6.9	6.8
				25	1.3	2.8	1.3	3.1	5.0

их однозарядные ионы, имеющие существенно меньшую интенсивность в этих условиях (что, в условиях анализа биологических жидкостей, где концентрации аналитов чрезвычайно малы, приведет к их полному отсутствию в спектре), можно разделить даже с использованием масс-спектрометрии низкого разрешения (рис. 2б и рис. 2в).

С другой стороны, вероятность их присутствия в пробах биологических жидкостей спортсменов крайне мала, поскольку оба соединения не обладают свойствами, которые могут привести к улучшению демонстрируемых результатов, что позволяет использовать любое из них в качестве внутреннего стандарта, что и было использовано нами при проведении данного исследования (табл. 4).

Как видно из представленных данных, полученные результаты являются удовлетворительными. Дополнительным критерием оценки надежности результатов, в случае применения масс-спектрометрии высокого разрешения, является ошибка определения масс. Удовлетворительным, согласно критериям FDA [24], является значение, не превышающее 5 ppm в режиме MS1, которому полностью удовлетворяют результаты, полученные в ходе проведения исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены особенности определения некоторых наиболее распространенных препаратов, относящихся к классу «пептидного допинга» в моче с использованием твердофазной экстракции и оценкой эффективности патронов с различными сорбентами. Показано, что в целях извлечения аналитов из мочи целесообразным является применение слабых и сильных катионообменных сорбентов, обеспечивающих наиболее полное извлечение аналитов с пределом их обнаружения на уровне 1 нг/мл, который может быть уменьшен путем упаривания и перерастворения полученного в ходе ТФЭ элюата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-43-230004 р_а, с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was funded by RFBR according to the research project № 19-43-230004 r_a, with the use of the scientific equipment of the Ecological Analytical Core Facility 271 Center of the Kuban State University, unique identifier RFMEFI59317X0008.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thevis M., Kuuranne T., Geyer H. Annual banned-substance review: Analytical approaches in human sports drug testing // *Drug Test. Anal.* 2018. V. 10. P. 9–27.
2. Challenges in detecting substances for equine anti-doping / A.G. Fragkaki [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2017. V. 9. P. 1291–1303.
3. Probing for corticotropin-releasing hormone (CRH) in human blood for doping control purposes using immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS / A. Knoop [et al.] // *Anal. Methods.* 2017. V. 9. P. 4304–4310.
4. Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry / A. Thomas [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1259. P. 251–257.
5. Zvereva I., Dudko G., Dikunets M. Determination of GnRH and its synthetic analogues' abuse in doping control: Small bioactive peptide UPLC–MS/MS method extension by addition of in vitro and in vivo metabolism data; evaluation of LH and steroid profile parameter fluctuations as suitable biomarkers / *Drug Test. Anal.* 2018. V. 10. P. 711–722.
6. Лабутин А.В., Темердашев А.З. Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // *Масс-спектрометрия.* 2015. Т. 12, № 1. С. 30–38.
7. Rosano T.G., Wood M., Swift T.A. Postmortem Drug Screening by Non-Targeted and Targeted Ultra-Performance Liquid Chromatography– Mass Spectrometry Technology // *J. Anal. Tox.* 2011. V. 35. P. 411–423.
8. WADA Prohibited list 2019. [Электронный ресурс]: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf [дата обращения 21.08.2019]
9. Serum reference value of two potential doping candidates-myostatin and insulin-like growth factor-I in the healthy young male / D.S. Han [et al.] // *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2017. V. 14. P. 1–7.
10. Synthesis and characterization of the N-terminal acetylated 17-23 fragment of thymosin beta 4 identified in TB-500, a product suspected to possess doping potential / S. Esposito [et al.] // *Drug Test Anal.* 2012. V. 4. P. 733–738.
11. Esposito S., Deventer K., Van Eenoo P. Characterization and identification of a C-terminal amidated mechano growth factor (MGF) analogue in black market products // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012. V. 26. P. 686–692.
12. Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement / A. Thomas [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2010. V.2. P.144–148.
13. Применение ВЭЖХ-МС/МС для определения некоторых инсулиноподобных факторов мышечного роста / А.З. Темердашев [и др.] // *Аналитика и контроль.* 2016. Т. 20, № 2. С. 154–160.
14. Thomas A., Schänzer W., Thevis M. Immunoaffinity techniques coupled to mass spectrometry for the analysis of human peptide hormones: advances and applications // *Expert Rev. Proteomics.* 2017. V. 14. P. 799–807.
15. Characterization of in vitro generated metabolites of selected peptides <2 kDa prohibited in sports / A. Thomas [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2017. V. 9. P. 1799–1803.
16. Ikegami T. Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of biopharmaceutical drugs and therapeutic peptides: A review based on the separation characteristics of the hydrophilic interaction chromatography phases // *J. Sep. Sci.* 2019. V. 42. P. 130–213.
17. Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances. WADA Technical Document – TD2019MRPL. [Электронный ресурс]: <https://>

www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td-2019mrpl_eng.pdf [дата обращения 21.08.2019]

18. Determination of LongR3-IGF-I, R3-IGF-I, Des1-3 IGF-I and their metabolites in human plasma samples by means of LC-MS / A. Thomas [et al.] // *Growth Horm. IGF Res.* 2017. V. 35. P. 33–39.
19. Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin / E. Semenistaya [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2015. V. 7. P. 919–925.
20. Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement / A. Thomas [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2010. V. 2. P. 144–148.
21. Guan F., Robinson M.A. Comprehensive solid-phase extraction of multitudinous bioactive peptides from equine plasma and urine for doping detection // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 985. P. 75–90.
22. Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accuratemass quadrupole time-of-flight LC-MS / D. Cuervo [et al.] // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1065–1066. P. 134–144.
23. Peptide enrichment by ion-pair solid-phase extraction / P. Judak [et al.] // *J. Chromatogr. B.* 2019. V. 1121. P. 89–95.
24. Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data for the FDA Foods and Veterinary Medicine Program [Электронный ресурс]: <https://www.fda.gov/media/96499/download> [дата обращения 15.10.2019]

REFERENCES

1. Thevis M., Kuuranne T., Geyer H. Annual banned-substance review: Analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Testing and Analysis*, 2018, vol. 10, pp. 9–27. DOI: 10.1002/dta.2336
2. Fragkaki A.G., Kioukia-Fougia N., Kiousi P., Kioussi M., Tsiou M. Challenges in detecting substances for equine anti-doping. *Drug Testing and Analysis*, 2017, vol. 9, p. 1291–1303. DOI:10.1002/dta.2162
3. Knoop A., Thomas A., Bidlingmaier M., Delahaut P., Schänzer W., Thevis M. Probing for corticotropin-releasing hormone (CRH) in human blood for doping control purposes using immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS. *Analytical Methods*, 2017, vol. 9, pp. 4304–4310. DOI:10.1039/C7AY01349C
4. Thomas A., Walpurgis K., Krug O., Schänzer W., Thevis M. Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2012, vol. 1259, pp. 251–257. DOI:10.1016/j.chroma.2012.07.022
5. Zvereva I., Dudko G., Dikunets M. Determination of GnRH and its synthetic analogues' abuse in doping control: Small bioactive peptide UPLC-MS/MS method extension by addition of in vitro and in vivo metabolism data; evaluation of LH and steroid profile parameter fluctuations as suitable biomarkers. *Drug testing and analysis*, 2018, vol. 10, pp. 711–722. DOI:10.1002/dta.2256
6. Labutin A.V., Temerdashev A.Z. Nontarget Screening of the Markers of Synthetic Cannabinoids in Urine Using HPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Chemistry*, 2015, vol. 70, pp.1620–1628. DOI:10.1134/S1061934815140087
7. Rosano T.G., Wood M., Swift T.A. Postmortem Drug Screening by Non-Targeted and Targeted Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technology. *Journal of Analytical Toxicology*, 2011, vol. 35, pp. 411–423. DOI: 10.1093/anatox/35.7.411
8. *WADA Prohibited list 2019* (2019). Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf [accessed 21 August 2019]
9. Han D.S., Huang C.H., Chen S.Y., Yang W.S. Serum reference value of two potential doping candidates-myostatin and insulin-like growth factor-I in the healthy young male. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2017, vol.14, pp. 1–7. DOI:10.1186/s12970-016-0160-9
10. Esposito S., Deventer K., Goeman J., Van der Eycken J., Van Eenoo P. Synthesis and characterization of the N-terminal acetylated 17-23 fragment of thymosin beta 4 identified in TB-500, a product suspected to possess doping potential. *Drug Testing and Analysis*, 2012, vol. 4, pp.733–738. DOI:10.1002/dta.1402
11. Esposito S., Deventer K., Van Eenoo P. Characterization and identification of a C-terminal amidated mechano growth factor (MGF) analogue in black market products. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2012, vol. 26, pp. 686–692. DOI:10.1002/rcm.6144
12. Thomas A., Kohler M., Mester J., Geyer H., Schänzer W., Petrou M., Thevis M. Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement. *Drug Testing and Analysis*, 2010, vol.2, pp.144–148. DOI:10.1002/dta.120
13. Temerdashev A.Z., Gorshenina A.V., Svetlichnaya E.V., Labutin A.V. [Wrong-way-round ionization and hydrophilic liquid chromatography in the analysis of insulin-like growth factors]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2016, vol. 20, no. 2, pp. 154-160. DOI:10.15826/analitika.2016.20.2.003 (in Russian)
14. Thomas A., Schänzer W., Thevis M. Immunoaffinity techniques coupled to mass spectrometry for the analysis of human peptide hormones: advances and applications. *Expert Review of Proteomics*, 2017, vol. 14, pp. 799-807. DOI:10.1080/14789450.2017.1362338
15. Thomas A., Knoop A., Schänzer W., Thevis M. Characterization of in vitro generated metabolites of selected peptides <2 kDa prohibited in sports *Drug testing and analysis*, 2017, vol. 9, pp. 1799-1803. DOI:10.1002/dta.2306
16. Ikegami T. Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of biopharmaceutical drugs and therapeutic peptides: A review based on the separation characteristics of the hydrophilic interaction chromatography phases. *Journal of Separation Sciences*, 2019, vol. 42, pp. 130–213. DOI:10.1002/jssc.201801074
17. *Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances / WADA Technical Document – TD2019MRPL* (2019). Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf [accessed 21 August 2019]
18. Thomas A., Walpurgis K., Delahaut P., Fichant E., Schänzer W., Thevis M. Determination of LongR3-IGF-I, R3-IGF-I, Des1-3 IGF-I and their metabolites in human plasma samples by means of LC-MS. *Growth Hormone and IGF Research*, 2017, vol. 35, pp. 33-39. DOI:10.1016/j.ghir.2017.06.002
19. Semenistaya E., Krotov G., Rodchenkov G. Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin. *Drug Testing and Analysis*, 2015, vol. 7, pp. 919-925. DOI:10.1002/dta.1787
20. Thomas A., Kohler M., Mester J., Geyer H., Schänzer W., Petrou M., Thevis M. Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement. *Drug testing and analysis*, 2010, vol. 2, pp. 144-148. DOI:10.1002/dta.120

21. Guan F., Robinson M.A. Comprehensive solid-phase extraction of multitudinous bioactive peptides from equine plasma and urine for doping detection. *Analytica Chimica Acta*, 2017, vol. 985, pp. 75–90. DOI: 10.1016/j.aca.2017.07.005

22. Cuervo D., Loli C., Fernandez-Alvarez M., Munoz G., Carreras D. Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accuratemass quadrupole time-of-flight LC–MS. *Journal of Chromatography B*, 2017, vol. 1065–1066, pp. 134–144.

23. Judak P., Polet M., Van Eenoo P., Benoit A., Buisson C. Peptide enrichment by ion–pair solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 2019, vol. 1121, pp. 89–95.

24. *Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data for the FDA Foods and Veterinary Medicine Program*. Available at: <https://www.fda.gov/media/96499/download> [accessed 15 October 2019].