

DOI: <https://doi.org/10.32353/khrife.1.2019.020>
УДК 343.98; 340, 67

Н. Н. Космина,

кандидат юридических наук, старший научный сотрудник, заведующая
отделом исследования материалов, веществ и изделий
Харьковского НИЭКЦ МВД, г. Харьков, Украина,
e-mail: N.n.kosmina@com.ua

Е. В. Сидоренко,

судебный эксперт Харьковского НИЭКЦ МВД, г. Харьков, Украина,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7377-6809>
e-mail: Novitskaya/elena88@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕРОИДОВ

Рассмотрены методы исследования нандролона и метандиенона. Подобраны наиболее чувствительные реактивы, которые позволяют дифференцировать и идентифицировать данные лекарственные препараты. Проведено их исследование методами тонкослойной хроматографии, подобраны наиболее чувствительные системы растворителей для идентификации исследуемых веществ, проведены исследования по идентификации нандролона и метандиенона методом газовой хроматографии с ПД детектором и газовой хроматографии с мас-селективным детектором. Методом ИК-спектроскопии определены основные полосы поглощения, характерные для исследуемых лекарственных средств. Метод газовой хроматографии был применен для вычисления количественного состава действующего вещества.

Ключевые слова: нандролон, метандиенон, тонкослойная хроматография, ИК-спектрометр, газовая хроматография.

Постановка научной проблемы. Определение контролируемых веществ и препаратов в объектах судебно-химической (криминалистической) экспертизы является одной из основных задач, решаемых экспертно-криминалистическими центрами МВД.

Анаболическими стероидами называют класс фармакологических препаратов, которые по химической структуре и фармакологическому действию близки к тестостерону и являются его производными с ослабленным андрогенным и усиленным анаболическим эффектом. Практически все они имеют общий механизм фармакологического действия. Анаболические стероиды повышают пластические и энергетические процессы в организме человека, при этом усиливается функция клеточного дыхания и кислороднотранспортная функция крови, так как общее количество крови и эритроцитов повышается. В отличие от кортикостероидов, анаболические стероиды понижают агрегацию и адгезию тромбоцитов, а также свертываемость крови, которая улучшает микроциркуляцию при интенсивной физической нагрузке.

Широкому использованию тестостерона в лекарственной терапии мешало его выраженное андрогенное действие. В связи с этим были синтезированы стероидные соединения, близкие по структуре

тестостерону, либо имеющие выборочную анаболическую активность при меньшем выраженном андрогенном действии.¹

Анализ основных последних исследований. В Украине некоторые из анаболических стероидов находятся под национальным контролем и отнесены к сильнодействующим веществам. Разработки эффективных подходов к криминалистическому исследованию и методам определения сильнодействующих анаболических стероидов практически не рассматривались. Частичные исследования стероидных гормонов приведены в работах Бирюкова С. М.², Фицевой Н. А., Фицева И. Н.³

В связи с этим разработка эффективных подходов к криминалистическому исследованию методов определения сильнодействующих лекарственных средств с применением тонкослойной (ТСХ), газовой хроматографии с масс-селективным (ГХ-МС), пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД) детекторами, инфракрасной (ИК) спектроскопии является актуальной, поскольку не исключены как угрозы злоупотреблений ими на нелегальном рынке контролируемых веществ, так и появление фальсифицированной продукции (с неизвестным содержанием действующего начала) на легальном рынке фармпрепаратов.

Цель исследования. Использование в медицине, имеющиеся случаи отравления, а также попытки частичного исследования стероидов, отсутствие методических рекомендаций по исследованию качественного и количественного определения в экспертных организациях является одной из актуальных проблем современного химического анализа.

Целью данной работы является подбор наиболее чувствительных реактивов и систем для тонкослойной хроматографии, а также условий проведения газовой хроматографии с мас-селективным детектированием для качественного определения и количественного анализа методом газовой хроматографии, а также ИК-спектроскопии.

Изложение основного материала исследования. К методам, наиболее эффективным для применения в экспертизе исследования материалов, веществ и изделий, относятся различные виды хроматографии (ТСХ, ГЖ, ГЖ — МС), в сочетании с методом ИК-спектроскопии дают возможность установить структуру исследуемого вещества и идентифицировать его, а также определить

¹ *Машковский М. Д.* Лекарственные средства / В 2-х т., Т.1. 10-е изд. Стереотип. Москва : Медицина, 1986. С. 604–606.

² *Бірюков С. М., Вартузов В. В., Мінін О. В.* Дослідження сильнодіючих лікарських засобів, що містять метандієнон і нандрол он деканат в об'єктах криміналістичної експертизи. URL : <http://elar.naiu.kiev.ua/jspui/handle/123456789/2070>.

³ *Фицев И. М., Блохин В. К., Будников Г. К.* Хроматографические методы в криминалистической экспертизе. *Журн. аналит. химии.* 2004. Т. 59, № 12. С. 1289–1299.

концентрацію. Приоритет этих методов у простоте и экспресности. Они не требуют наличия специальных реактивов и растворителей, у них отсутствует стадия сложной пробоподготовки, на их определение не влияют наполнители (сахар, крахмал, стеарат и сода). Потому существует необходимость у создании чувствительных и малозатратных методов исследования препаратов данной группы для уменьшения сроков и быстрого реагирования при проведении химических исследований. Что касается представителей данной группы, то они все чаще становятся объектами исследования химико-токсикологических и химических лабораторий, поскольку их продажа контролирована на территории Украины и подлежит предметно количественному учету в аптечной сети.

Относительно недорогим, но достаточно точным методом исследования является тонкослойная хроматография (ТСХ). Определение хроматографических характеристик проводилось в разных органических растворителях. Для ТСХ использовались пластины Sorbfil. Как реактивы проявителей использовали реактив Марки и пары иода. При исследовании объектов на принадлежность к сильнодействующим анаболическим стероидам методом ТСХ использовали известные в экспертной практике хроматографические системы, с подвижными фазами, характеризующимися эффективностью и селективностью разделения, относительной доступностью и невысокой токсичностью. Состав подвижных фаз подбирали таким образом, чтобы полученные результаты были максимально эффективны и хорошо воспроизводились. Таким образом были отобраны системы для ТСХ, состав которых приведен в таблице 1.

*Таблица 1***Состав подвижных фаз для исследования методом ТСХ**

Система, №	Состав подвижных фаз
1	толуол — этанол — диэтиламин (9:1:1)
2	хлороформ — ацетон — этанол — 25%-ый водный раствор аммиака (20:30:3:1)
3	Метанол -- 25%-ый водный раствор аммиака (100:1, 5)
4	толуол — ацетон — этанол — 25%-ый водный раствор аммиака (45:45:7:3)
5	этилацетат — изопропанол — 25%-ый водный раствор аммиака (40:30:2)
6	хлористый метилен — эфир — метанол — вода (77:15:8:1, 2)

Учитывая, что исследуемые объекты хорошо растворимы в различных растворах, для подготовки проб использовались доступные растворители, такие как хлороформ, этанол и метанол.

В условиях ТСХ по 10 мкл этанольных экстрактов исследуемых объектов с помощью микрошприца наносили на пластину для

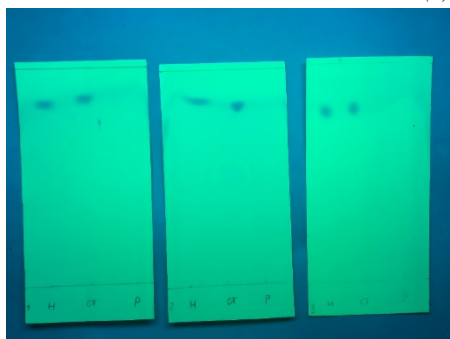
тонкослойной хроматографии «Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ». На эту же пластину в количестве по 10 мкл наносили стандартные образцы — 0,1% этанольный раствор метандиенона и нандролонa, а также контрольные образцы растворителя.

Пластину помещали в хроматографическую камеру, насыщенную одной из систем растворителей, и хроматографировали восходящим методом до подъема фронта элюента на 100 мм. После окончания хроматографирования пластину высушивали при 50°C в течение 10 мин, а потом выявляли хроматографические зоны по гашению флуоресценции при 254 нм, фиксируя при этом их положение. После этого выявленные хроматографические зоны проявляли визуализирующими реактивами.

Визуализацию хроматографических зон проводили реактивом Марки (1 часть 40%-го раствора формалина + 9 частей концентрированной серной кислоты) и в иодной камере, с насыщенными парами иода. Результаты исследования методом хроматографии в тонком слое сорбента с использованием различных подвижных фаз и способов визуализации хроматографических зон реагентами — проявителями, которые представлены на рис. 1 и в таблице 2.



(a)



(б)

Рис. 1 (а) общий вид хроматограмм ТСХ метандиенона в системах 1, 2, 3 после проявления в УФ 254 нм; (б) общий вид хроматограмм ТСХ метандиенона в системах 1, 2, 3 после проявления реактивом Марки; (в) общий вид хроматограмм ТСХ нандролонa в системах 1, 2, 3 после проявления в УФ 254 нм

Таблиця 2

**Значения величин хроматографической подвижности (R_f)
некоторых сильнодействующих анаболических стероидов
в хроматографических системах**

№	Исследуемые вещества	Значения величин хроматографической подвижности (R_f) в хроматографических системах						Окрашивание хроматографических зон	
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	реактив Марки	пары иода
1	Метандиенон	0, 56	0, 63	0, 71	0, 70	0, 65	0, 65	темно-коричневая	желто-коричневая
2	Нандролон	0, 44	0, 71	0, 71	0, 75	0, 67	0, 88	-	желто-коричневая

Анализируя полученные результаты хроматографической подвижности, приведенные в таблице, можно сделать вывод о том, что наиболее положительные характеристики разделения получены при использовании систем 1, 2, 6. При этом величины R_f во всех используемых системах органических растворителей близки между собой, поэтому для повышения селективности этого метода необходимо наличие образцов для сравнительного исследования указанных веществ.

Кроме тонкослойной хроматографии среди инструментальных методов целесообразно использование метода молекулярного спектрального анализа ИК — Фурье. Однако, как показывает экспертная практика, на исследование указанные вещества поступают в виде таблеток и масляных растворов и наряду с действующими веществами могут иметь наполнители: сахар, крахмал, соду и т.д., которые добавляются в таблетки и растворы при их изготовлении.

Для выделения анаболических стероидов с целью их дальнейшего исследования методом ИК-спектроскопии проводили их экстракцию органическими растворителями, потом концентрировали. Небольшое количество экстракта исследовали на ИК-спектрометре Nicolet iS10 с приставкой порушеного полного внутреннего отражения с алмазным кристаллом и условиями :

диапазон регистрации спектра — 4000–550 см⁻¹;

разрешительная способность — 4 см⁻¹;

количество сканов — 32.

Расшифровка выполнялась по библиотеке ИК-спектров из программного пакета «Омпіс 9.1». Для наявности исследований с целью установления молекулярного состава на рис. 2 приведены спектры стероидов.

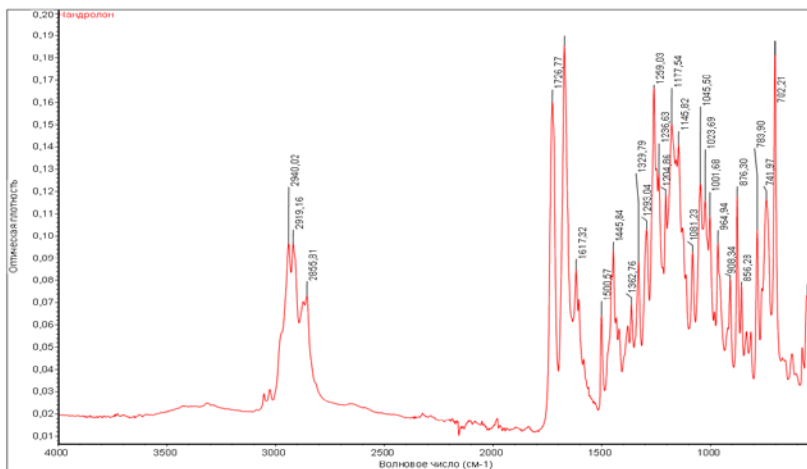


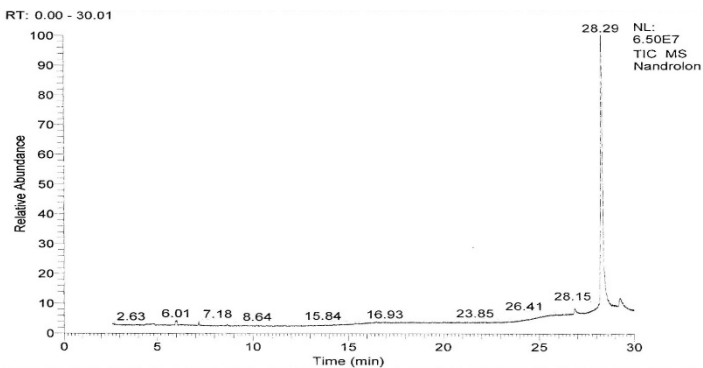
Рис. 2 ИК-спектр метанольного экстракта нандролона

Исследования объектов методом ГХ-МС проводили для подтверждения результатов анализа с применением ТСХ. Исследование проводилось с целью качественного определения органических компонентов в объекте исследования.

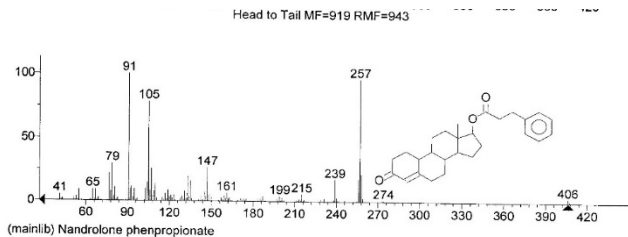
Для этого навески нандролона и метандиенона массами по 5 мг (измельченной средней пробы) растворяли в метаноле 1 мл.

Полученные метанольные экстракты фильтровали, переносили в стеклянные виалы и анализировали на газовом хроматографе с мас-селективным детектором с условиями: TRASE ULTRA GC/ISQ/AS 3000 II; капиллярная колонка — TG-5MS, длина — 30 м, диаметр — 0, 25 мм, фаза — 0, 25 мкм; газ-носитель — гелий, постоянный поток — 1, 2 мл/мин; инжектор — автоинжектор 7683, Split 1:50, температура испарителя T=280°C; температура колонки: Tнач.=100°C, держать 2 мин., нагрев — 25°C/мин, Tкнц=200°C, тримати 2 хв; нагрів — 10°C/хв, Tконеч.=280°C, держать — 7 мин, нагрев — 10°C/мин, Tкон=300°C, держать 5 мин, детектор — мас-селективный, температура интерфейса T=220°C, ионизация — электронным ударом, энергия ионизации — 70 eV, температура ионного источника T=200°C; температура квадруполя T=150°C; проба — 1 мкл.

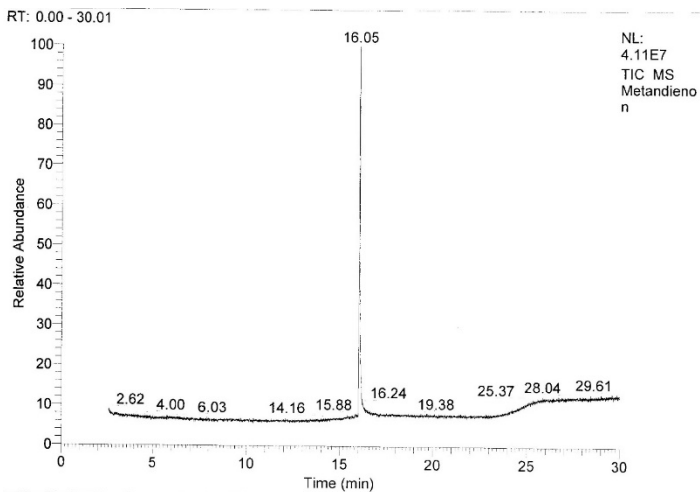
Хроматограммы и мас-спектры нандролона представлены на рис. 3 а, б, метандиенона — на рис. 3 в, г.



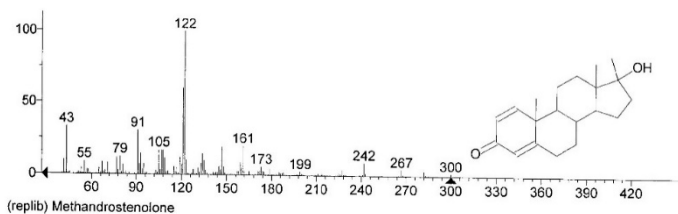
(a)



(b)



(c)



(2)

Рис. 3 (а) хроматограмма раствора нандролона в метаноле; (б) мас-спектр нандролона; (в) хроматограмма раствора метандиенона в метаноле; (г) мас-спектр метандиенона

Для разделения компонентов анаболических стероидов определили время удержания в условиях ГХ — ПИД.

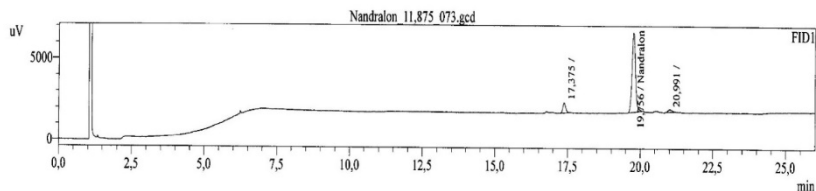
Количественное определение сильнодействующих анаболических стероидов в условиях ГХ — ПИД проводили по градуировочной зависимости, применяя абсолютную калибровку. В качестве внешнего стандарта использовался образец, предоставленный ГНИЭКЦ МВД Украины. Основными требованиями к воспроизводимости ГХ — ПИД, так же, как и для ГХ — МС, является точность приготовления калибровочных растворов и дозировка пробы, образца, а также строгое следование условиям хроматографирования как при проведении калибровки прибора, так и в дальнейших количественных определениях. Время удерживания исследуемых сильнодействующих анаболических стероидов при их газохроматографическом исследовании приведены в таблице 3.

Таблица 3

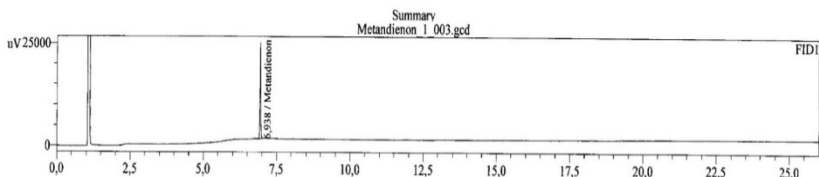
Время удерживания некоторых сильнодействующих анаболических стероидов при их газохроматографическом исследовании

№	Речовина, що досліджується	Час утримання, хв.
1	нандролон	19, 756
2	метандиенон	6, 938

Хроматограммы нандролона и метандиенона, полученные при хроматографическом исследовании в условиях ГХ — ПИД, представлены на рис. 4 а, б.



(a)



(б)

Рис. 4 (а) хроматограмма раствора нандролон в метаноле, (б) хроматограмма раствора метандиенон в метаноле

Выводы. Таким образом, в ходе проведенных исследований анаболических стероидов нандролон и метандиенон различными физико-химическими методами, можно сделать вывод, что комплексное применение этих методов дает возможность проводить их экспертное исследование, качественный и количественный состав присутствующих веществ у смеси и решать диагностические и идентификационные задачи.

References

- Biryukov, S. N., Vartuzov, V. V., Minin, O. V. (2018). *Doslidzhennya synnodyuyukhykh likarskykh zasobiv, shcho mistyat metandiyenon i Nandrolon dekanat v obyektakh kryminalistychnoyi ekspertyzy*. URL: <http://elar.naiu.kiev.ua/jspui/handle/123456789/2070> [in Ukrainian].
- Fitsev, I. M., Blokhin, V. K., Budnikov, G. K. (2004). *Khromatografichskiye metody v kryminalisticheskoy ekspertize*. 12. Zhurn. analit. khimii. 1289–1299 [in Russian].
- Mashkovskiy, M. D. (1986). *Lekarstvennyye sredstva*. Moskva: Meditsina. 604–606 [in Russian].

Н. М. Косміна, О. В. Сидоренко ДОСЛІДЖЕННЯ СТЕРОЇДІВ

У статті розглянуто методи дослідження нандролон і метандіенон. Підібрано найбільш чутливі реактиви, які дозволяють диференціювати і ідентифікувати дані лікарські препарати. Проведено ідентифікацію лікарських засобів методами газової хроматографії з мас-селективним детектором та методом газової хроматографії з ПДД — детектором. Крім визначення якісних характеристик лікарських засобів методом газової хроматографії з ПДД детектором проводився кількісний аналіз досліджуваних речовин. Методом ІЧ-спектроскопії визначено основні смуги поглинання, характерні для досліджуваних лікарських засобів.

У зв'язку з цим розробка ефективних підходів до криміналістичного дослідження і методів визначення сильнодіючих анаболічних стероїдів у різноманітних об'єктах судово-хімічної експертизи із застосуванням тонкошарової хроматографії, газової хроматографії з мас-селективним та полуменево-іонізаційним детекторами, інфрачервоної спектроскопії є актуальною, оскільки не виключені як загрози зловживання ними на нелегальному ринку, так і поява фальсифікованої продукції (з невідомим вмістом діючої речовини) на легальному ринку фармпрепаратів.

До ряду методів, найбільш ефективних при застосуванні в криміналістичній експертизі, належать різні види хроматографії (ТШХ, ГХ, ГХ-МС), їх поєднання з

методами ІЧ-спектроскопії дають можливість встановити структуру досліджуваної речовини та ідентифікувати її, а також визначити концентрацію. Перевагою цих методів являється простота і експресність. Вони не потребують наявності спеціальних реактивів та розчинників, для них може бути відсутня стадія складної пробопідготовки, а визначенню можуть не заважати наповнювачі, такі як цукор, крахмал, стеарати та сода.

Таким чином, у результаті проведення ряду досліджень анаболічних стероїдів нандролону та метандієнона різними фізико-хімічними методами, можна зробити висновок, що комплексне застосування цих методів дає можливість проводити експертне дослідження, визначати якісний та кількісний склад наданих речовин та сумішей, а також вирішувати діагностичні та ідентифікаційні завдання.

Ключові слова: нандролон, метандієнон, тонкошарова хроматографія, ІЧ-спектроскопія, газова хроматографія.

N. Kosmina, O. Sidorenko RESEARCH ON STEROIDS

This article examines the research methods on nandrolone and methandienone. The most sensitive reagents were selected to differentiate and identify these drugs. Medicinal products were identified by gas chromatography methods with mass-selective detector and gas chromatography method with PID detector. In addition to determining the qualitative characteristics of medicinal products by means of gas chromatography with PID detector, a quantitative analysis of the test substances was carried out. The main absorption bands characteristic of the investigated medicinal products was determined by IR spectroscopy.

In this regard, the development of effective approaches to forensic research and methods of determination on potent anabolic steroids in various objects of forensic chemical examination with the use of thin-layer chromatography, gas chromatography with mass-selective and flame-ionization detectors is relevant as the risks of their abuse in the illegal market and the availability of counterfeit products (with unknown active substance content) on the legal market are not excluded.

A number of methods that are most effective for use while examining materials, substances and products include various types of chromatography (TLC, GC, GC-MS) in combination with the method of IR-spectroscopy, provide an opportunity to establish the structure of the analyte and identify it, and also determine the concentration. The predominance of these methods is in simplicity and expressiveness. They do not require special reagents and solvents, there is no complex sample preparation for them, and their definition is not affected by fillers, such as sugar, starch, stearates and sodium carbonate.

Thus, as a result of a number of studies of anabolic steroids of nandrolone and methandienone by different physical and chemical methods, we can conclude that the complex application of these methods allows to conduct expert research, to determine the qualitative and quantitative composition of substances and mixtures, as well as to solve diagnostic and identification issues.

Keywords: nandrolone, methandienone, thin-layer chromatography, IR-spectrometer, gas chromatography.

Надійшла до редколегії 14.06.2019