

Luontaisten steroidien dopingkäytön osoittaminen analyttisin menetelmin

Laura Susanna Videnoja
Pro gradu -tutkielma
13.09.2013
Helsingin yliopisto
Analyttisen kemian laboratorio

Tiedekunta/Osasto) Fakultet/Sektion) Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos) Institution) Department Kemian laitos
Tekijä) Författare) Author Laura Susanna Videnoja		
Työn nimi) Arbetets titel) Title Luontaisten steroidien dopingkäytön osoittaminen analyttisin menetelmin		
Oppiaine) Läroämne) Subject Analyttinen kemia		
Työn laji) Arbetets art) Level Pro gradu -tutkielma	Aika) Datum) Month and year 09/2013	Sivumäärä) Sidoantal) Number of pages 106
Tiivistelmä) Referat) Abstract <p>Pro gradu -tutkielma keskittyy analyttisiin menetelmiin, joilla luontaisten eli endogeenisten steroidien dopingkäyttö osoitetaan ihmisvirtsasta. Endogeeniset anabolis-androgeeniset steroidit ovat välttämättömiä ihmiselle aina sikiöstä vanhuuteen, mutta niitä käytetään niiden anabolisten ominaisuuksiensa vuoksi myös dopingaineena. Steroidien endogeenisuus, pienet pitoisuudet näytteissä, virtsan hankaluus matriisina ja henkilökohtaiset steroidiprofiilin vaihtelut tuovat haastetta dopinganalytiikalle. Anabolis-androgeeniset steroidit myös metaboloituvat lähes täysin ennen niiden eritystä virtsaan ja vain pieni määrä alkuperäistä steroidia on havaittavissa virtsasta. Yhdisteen dopingkäyttö voidaankin havaita sen aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksien kasvuna tai tiettyjen aineenvaihduntatuotteiden suhteiden muutoksina. Maailman Antidopingtoimisto ohjaa vahvasti tätä analytiikkaa.</p> <p>Pitkään analytiikkaa hallinneiden kaasukromatografi-massaspektrometrinen menetelmien sijaan yhä useampi uusista tutkimuksista perustuu nestekromatografiaan. Endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa ollaan yhä enemmän myös siirtymässä tandem-massaspektrometriin menetelmiin. Isotooppisuhdemassaspektrometriaa hyödynnetään varmistusanalyseissa steroidin endogeenisen tai eksogeenisen alkuperän selvittämisessä. Elimistön oman ja ulkoisesti nautitun steroidin hiilen isotooppisuhteiden hiuksenhieno ero voidaan mitata tarkasti. Tutkielmassa valotetaan myös luontaisten steroidien dopinganalytiikan tulevaisuutta. Steroidien endogeenisyyden vuoksi niiden analytiikka ja raja-arvojen asettaminen on ollut erityisen haasteellista. Biologisen passin avulla dopinganalyysit painottuvat yhä enemmän henkilökohtaisiin muutoksiin eri yhdisteiden pitoisuuksissa ja suhteissa. Tarkan massan analysointireiden hyödyntäminen erityisesti uusien biomarkkereiden etsimisessä on laajan mielenkiinnon kohteena.</p> <p>Pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin Yhtyneet Medix Laboratorioiden huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan yksikössä. Työn aiheena oli testosteronin ja eräiden muiden endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamiseen käytettävän kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrin menetelmän jatkokehittäminen. Menetelmään muun muassa lisättiin yhdisteitä. Uuton ja nestekromatografisen fraktioiden olosuhteet optimoitiin kohdeyhdisteille, testattiin ja optimoitiin derivatisointimenetelmä niiden kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrin analyysiä varten ja suoritettiin menetelmän alustavaa testausta ja validointia steroidistandardeilla ja biologisilla näytteillä. Lopullinen menetelmä vaatii vielä lisätutkimusta.</p>		
Avainsanat) Nyckelord) Keywords luontaiset steroidit, dopinganalytiikka, analyttiset menetelmät, massaspektrometria		
Säilytyspaikka) Förvaringsställe) Where deposited Kumpulan kampuskirjasto		
Muita tietoja) Övriga uppgifter) Additional information Determination of natural steroids used for doping by analytical methods		

SISÄLLYSLUETTELO

SISÄLLYSLUETTELO	1
LYHENNELUETTELO	3
1. JOHDANTO	6
2. DOPINGVALVONTA	8
2.1 Maailman Antidopingtoimisto	8
2.2 Dopingtestauslaboratoriot	10
2.3 Dopingtestaus käytännössä	10
3. DOPINGAINEINA KÄYTETTÄVÄT LUONTAISET STEROIDIT	13
3.1 Rakenne	13
3.2 Metabolia	15
3.3 Farmaseuttinen käyttö	18
3.4 Dopingkäyttö	18
4. ANALYYSISTRATEGIAT LUONTAISTEN STEROIDIEN DOPINGKÄYTÖN OSOITTAMISESSA	20
4.1 Seulonta	20
4.2 Varmistusanalyysi	24
5. MITTAUSMENETELMÄT LUONTAISTEN STEROIDIEN DOPINGKÄYTÖN OSOITTAMISESSA	25
5.1 Kaasukromatografi-massaspektrometriset menetelmät	25
5.1.1 Kaasukromatografia-massaspektrometria	27
5.1.2 Kaasukromatografia-korkean resoluution massaspektrometria	34
5.1.3 Laaja kaksivaiheinen kaasukromatografia-massaspektrometria	37
5.1.4 Kaasukromatografia-tandem-massaspektrometria	40
5.2 Nestekromatografi-massaspektrometriset menetelmät	44
5.2.1 Nestekromatografia-tandem-massaspektrometria	46
5.3 Isotooppisuhdemassaspektrometriset menetelmät	51
5.3.1 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi ...	52
6. TULEVAISUUDEN NÄKYMÄT	58
KOKEELLINEN OSA: TESTOSTERONIN DOPINGKÄYTÖN OSOITTAMINEN KAASUKROMATOGRAFI-POLTTO-ISOTOOPPISUHDEMASSASPEKTRO- METRISESTI	60
7. TEORIA	60
7.1 Steroidit	60
7.2 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometria	61
8. KOKEELLINEN OSUUS	63
8.1 Kemikaalit ja reagenssit	63
8.2 Laitteistot	65
8.2.1 Kaasukromatografi-massaspektrometri	65
8.2.2 Nestekromatografi	66
8.2.3 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometri	67
8.3 Menetelmät	68
8.3.1 Uuton optimointi	68
8.3.2 Derivatisointi	70
8.3.3 Nestekromatografinen fraktiointi	71
8.3.4 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi ...	73

8.3.5 Lopullinen menetelmä ja sen testaus	75
9. TULOKSET JA POHDINTA	75
9.1 Uuton optimointi	75
9.2 Derivatisointi	77
9.3 Nestekromatografinen fraktiointi	83
9.4 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi	85
9.5 Lopullinen menetelmä	91
10. JOHTOPÄÄTÖKSET	96
11. KIRJALLISUUSVIITTEET	99
12. LIITTEET	103

LYHENNELUETTELO

A	androsteroni
AAc	androsteroniasetaatti
ACN	asetonitriili
APCI	kemiallinen ionisaatio normaali-ilmanpaineessa
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	hiilen isotooppien suhde
CHX	sykloheksaani
CI	kemiallinen ionisaatio
CID	törmäysindusoitu hajoaminen
DEE	dietyylieetteri
DTE	ditioerytritoli
E	etiokolanoloni
EAc	etiokolanoloniasetaatti
EI	elektroni-ionisaatio
epiT	epitestosteroni
epiTAc	epitestosteroniasetaatti
ERC	endogeeninen referenssiyhdiste
ESI	sähkösumutus-ionisaatio
GC-C-IRMS	kaasukromatografia-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometria
GCxGC-MS	laaja kaksivaiheinen kaasukromatografia-massaspektrometria
GC-HRMS	kaasukromatografia-korkean resoluution massaspektrometria

GC-MS	kaasukromatografia-massaspektrometria
GC-MS-MS	kaasukromatografia-tandem-massaspektrometria
HPLC	suuren erotuskyvyn nestekromatografia
IST	sisäinen standardi
KA	keskiarvo
LC-MS-MS	nestekromatografia-tandem-massaspektrometria
MRM	monireaktiomonitorointi
MS-MS	tandem-massaspektrometria
m/z	massa/varaus-suhde
ODS	oktadekyylisilaani
11-OHA	11 β -OH-androsteroni
11-OHAAc	11 β -OH-androsteroniasetaatti
PD	pregnandioli
PDAc	pregnandiolidiasetaatti
PTV	lämpötilaohjelmoitu höyrystäminen
QIT	kvadrupoli-ioniloukkuanalysointilaite
QTOF	kvadrupoli-lentoaika-analysointilaite
RSD	suhteellinen keskihajonta
RT-markkeri	retentioaikamerkkiaine
SCAN	massa-alueen pyyhkäisy
SD	keskihajonta

SIM	valittujen ionien seuranta
S/N	signaali/kohina-suhde
SRM	valittujen reaktioiden seuranta
T	testosteroni
TBME	tertbutyylimetyylieetteri
TC	kohdeyhdiste
TMS	trimetyylisilyyli
TMSI	trimetyylisilyylijodidi
TOF	lentoaika-analysaattori
UV/VIS	ultravioletti/näkyvä valo-spektrofotometrinen detektori
WADA	Maailman Antidopingtoimisto
5-EN	5-androsteeni-3 β ,17 α -dioli
5-ENAc	5-androsteeni-3 β ,17 α -diolidiasetaatti
5 α	5 α -androstaanidioli
5 α Ac	5 α -androstaanidiolidiasetaatti
5 β	5 β -androstaanidioli
5 β Ac	5 β -androstaanidiolidiasetaatti
$\delta^{13}\text{C}$	^{13}C delta-arvo
$\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$	^{13}C delta-arvon korjauskerroin

1. JOHDANTO

Ihmisluntoon on aina osaltaan kuulunut maineeseen ja menestykseen pyrkiminen urheilukilpailuissa. Yhtä kauan kun on kilpailtu, on urheilusuorituksia pyritty parantamaan erilaisin keinoin ja yhdistein. Nykyään urheilun reilu henki pyritään varmistamaan dopingtestein. Dopingvalvonta on haasteellista ja vaativaa työtä. Dopingnäytteiden analysointi on tarkkaan ohjattua luotettavan tuloksen ja maailmanlaajuisesti yhtenevän toiminnan takaamiseksi.

Tämä tutkielma keskittyy analyttisiin menetelmiin, joilla luontaisten eli endogeenisten steroidien dopingkäyttö osoitetaan ihmisvirtsaista. Rutiininomaisessa dopingtestauksessa steroidien dopingkäytön osoittamiseen kehitetyt menetelmät perustuvat virtsan käyttöön näytematriisina. Maailman Antidopingtoimisto on asettanut dopinganalytiikalle säädöksiä ja erityisvaatimuksia, jotka ohjaavat tarkasti tätä analytiikkaa. Laitetekninen kehitys dopinglaboratorioissa käytössä olevasta kvadrupolimassaspektrometrisestä seulonta-analyysistä aina tandem-massaspektrometriin menetelmiin on mahdollistanut steroidiprofiilin mittauksen yhä herkemmin.

Steroidien endogeenisuus, pienet pitoisuudet näytteissä, virtsan hankaluus matriisina ja henkilökohtaiset steroidiprofiilin vaihtelut tuovat lisähaastetta dopinganalytiikalle. Endogeenisiä steroideja erittyy jokaisessa ihmisessä luonnostaan ja yhdisteiden pitoisuudet ja keskinäiset suhteet vaihtelevat esimerkiksi sukupuolen, henkilökohtaisten erojen ja geeniperimän vuoksi. Poikkeavan steroidiprofiilin seulonta virtsasta nopeasti, tehokkaasti ja luotettavasti on erittäin haastavaa. Virtsa sisältää satoja yhdisteitä, joten tehokas näytteen esikäsittely on myös usein kallista ja aikaa vievää.

Dopingtestauslaboratorion tulee pystyä kiistatta osoittamaan johtuuko poikkeava steroidiprofiili esimerkiksi urheilijan henkilökohtaisesta poikkeamasta vai siitä syystä, että luontaista steroidia on nautittu myös ulkoisesti. Isotooppisuhdemassaspektrometriaa hyödynnetään varmistusanalyseissa steroidin endogeenisen tai eksogeenisen alkuperän selvittämisessä. Tekniikalla voidaan selvittää tutkittavan orgaanisen yhdisteen hiilen isotooppisuhteen ”sormenjälki”. Elimistön oman ja ulkoisesti nautitun steroidin hiilen isotooppisuhteiden hiuksenhieno ero voidaan mitata tarkasti.

Tutkielmassa valotetaan myös luontaisten steroidien dopinganalytiikan tulevaisuutta. Biologisen passin avulla dopinganalyysit painottuvat yhä enemmän henkilökohtaisiin muutoksiin eri yhdisteiden pitoisuuksissa ja suhteissa. Myös muiden stabiilien yhdisteiden isotooppien suhteiden hyödyntämistä dopinganalytiikassa tutkitaan.

Pro gradun kokeellinen osuus suoritettiin Yhtyneet Medix Laboratorioiden huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan yksikössä 2.1-20.4.2012. Työn aiheena oli testosteronin ja eräiden muiden endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamiseen käytettävän kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen (GC-C-IRMS) menetelmän jatkokehittely. Menetelmällä mitataan androsteronin, etiokolanolonin, pregnandiolin ja 11β -OH-androsteronin hiilen isotooppien suhteet, joiden avulla selvitetään onko virtsanäytteen poikkeavan steroidiprofiilin taustalla endogeenisten steroidien käyttöä. Kehitystyössä testattiin, muokattiin ja kehitettiin pidemmälle laboratoriossa käytössä olevaa analyysimenetelmää. Menetelmään muun muassa lisättiin yhdisteitä.

Endogeeniset steroidit, kuten testosteroni, erotetaan synteettisestä analogistaan hieman erilaisen hiilen isotooppikoostumuksen perusteella. Yhtyneet Medix Laboratorioissa näiden steroidien hiilen isotooppisuhteen ”kohdeyhdisteinä” käytetään androsteronia ja etiokolanolonia, jotka ovat elimistön androgeeniaineenvaihdunnan päätuotteet. ”Endogeenisinä referenssiyhdisteinä” käytetään pregnandiolia ja 11β -OH-androsteronia. Analyysimenetelmässä virtsanäyte hydrolysoidaan entsyymaattisesti, puhdistetaan nesteuton ja nestekromatografisen fraktioinnin avulla ja analysoidaan derivatisoimatta GC-C-IRMS-tekniikalla.

Kokeellisen osuuden päämääränä oli lisätä validoituun varmistusmenetelmään uusia kohdeyhdisteitä: 5α -androstaaniidioli, 5β -androstaaniidioli ja epitestosteroni. Näiden avulla testosteronin ja eräiden muiden endogeenisten steroidien dopingkäyttö voitaisiin mahdollisesti todeta aikaisempaa herkemmin. Tarkoituksena oli optimoida uuton ja nestekromatografisen fraktioinnin olosuhteet uusille kohdeyhdisteille, testata ja optimoida derivatisointimenetelmä niiden GC-C-IRMS-analyysiä varten ja suorittaa menetelmän alustavaa testausta ja validointia.

Pro gradu -tutkielman kirjallisen osuuden tavoite on paneutua endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa hyödynnettäviin analyttisiin menetelmiin joilla kiellettyjen yhdisteiden dopingkäyttö osoitetaan ihmisvirtsaasta. Tavoitteena on kertoa mahdollisimman

laajasti alan uutta tutkimusta unohtamatta kuitenkin analytiikkaa ohjailevaa säännöstöä ja dopinglaboratorioissa pääasiassa käytössä olevia validoituja menetelmiä; seikkoja joihin dopinganalytiikka nykyäänkin tukeutuu. Kokeellisen osan tavoite on kertoa dopinglaboratoriossa käytössä olevan isotooppisuhdemassaspektrometrinen menetelmän kehitystyöstä laajasti ja tarkasti aina tutkimuksen taustasta havaittuihin ongelmiin ja onnistumisiin.

2. DOPINGVALVONTA

2.1 Maailman Antidopingtoimisto

Suorituksen parantaminen dopingilla on urheilussa kielletty.¹ Tällä pyritään suojaamaan urheilijan terveyttä ja säilyttämään urheilun reilu henki. Maailman Antidopingtoimisto (WADA) perustettiin vuonna 1999 ja sen tehtävänä on edistää, koordinoida ja valvoa dopinginvastaista työtä maailmanlaajuisesti. Yhteisten pelisääntöjen asettamisen lisäksi WADA muun muassa järjestää koulutusta, puolustaa urheilun eettisyyttä ja takaa urheilijoille oikeusturvan. WADA on itsenäinen ja kansainvälinen yhdistys, jonka toimintaa eri maiden hallitukset ja urheilusäätiöt tukevat.²

WADA ylläpitää Maailman antidopingsäännöstöä,¹ jossa määritellään perusta dopingin vastaiselle työlle. Säännöstössä doping määritellään yhden tai useamman antidopingsäännön rikkomukseksi. Sen sisältämässä kiellettyjen aineiden ja menetelmien listassa³ luetellaan kaikki kilpailuissa ja harjoituskaudella dopingiksi määritellyt yhdisteet ja menetelmät. Lista sisältää satoja kemiallisesti ja farmakologisesti erilaisia yhdisteitä kymmenessä eri yhdisteryhmässä, kolme eri kiellettyä menetelmää ja kaksi yhdisteryhmää, jotka ovat kiellettyjä tietyissä urheilulajeissa. Osa ryhmien sisältämistä yhdisteistä on nimetty, mutta listassa kielletään yhdisteitä myös samankaltaisen kemiallisen rakenteen tai biologisen aktiivisuuden perusteella.³ Lista päivitetään vuosittain. Sääntöjen rikkominen ei koske vain näiden yhdisteiden tai menetelmien käyttöä, vaan myös esimerkiksi aikomus käyttää kiellettyä menetelmää, näytteenotosta kieltäytyminen, näytteenotossa huijaaminen tai kiellettyjen aineiden jakaminen on kiellettyä.¹ Urheilija voi saada kirjallisella anomuksella määräaikaisten erivapauden eräiden kiellettyjen aineiden tai menetelmien käyttämiseen lääketieteellisiin tarkoituksiin tai sairauden hoitoon (esimerkiksi

astmalääkkeet).² Kooste vuoden 2013 WADA:n julkaisemasta kiellettyjen aineiden listasta on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Kooste WADA:n kiellettyjen aineiden listasta.³

I. Kilpailujen aikana ja kilpailujen ulkopuolella kielletyt aineet ja menetelmät	
S0	Myyntiluvattomat lääkeaineet
S1	Anaboliset aineet
	S1.1a Eksogeeniset anabolis-androgeeniset steroidit
	S1.1b Endogeeniset anabolis-androgeeniset steroidit
	S1.2 Muut anaboliset aineet
S2	Peptidihormonit, kasvutekijät ja vastaavat aineet
S3	β-agonistit
S4	Hormonien antagonistit ja modulaattorit
S5	Diureetit ja muut peiteaineet
M1	Hapenkuljetuksen parantaminen
M2	Kemiallinen ja fysikaalinen manipulaatio
M3	Geenidoping
II. Kilpailun aikana kielletyt aineet ja menetelmät	
S6	Piristeet
S7	Huumaavat kipulääkkeet
S8	Kannabinoideit
S9	Glukokortikosteroidit
III. Tietyissä urheilulajeissa kielletyt aineet	
P1	Alkoholi
P2	Beetasalpaajat

Suomessa antidopingtyöstä vastaa WADA:n säännöstöä noudattava Suomen Antidopingtoimikunta ADT ry. Suomessa urheilun dopingia koskeva sääntely perustuu kansallisiin ja kansainvälisiin säännöstöihin. Urheilijat ja urheilun piirissä toimivat henkilöt sitoututetaan noudattamaan muun muassa Suomen antidopingsäännöstöä, jonka

välityksellä suomalainen urheilu sitoutuu myös Maailman antidopingsäännöstöön ja sen kiellettyjen aineiden listaan.

2.2 Dopingtestauslaboratoriot

WADA:n kiellettyjen aineiden listan³ määrittämien kiellettyjen yhdisteiden ja menetelmien väärinkäyttöä urheilussa valvotaan dopingtesteillä. Urheilijalta otetaan virtsa- ja/tai verinäyte, joka toimitetaan WADA:n hyväksymään (akkreditoimaan) testauslaboratorioon.⁴ Hyväksytyt laboratorion tietotaidon, työskentelytapojen ja laitteistojen pitää täyttää WADA:n asettaman Kansainvälisen laboratoriestandardin⁵ laatuvaatimukset. Laboratorioiden luotettavuutta ja laadun tasoa tarkkaillaan säännöllisesti laadunvarmistusnäytteillä. Akkreditointi on voimassa vuoden kerrallaan. WADA-akkreditoinnin lisäksi laboratoriolle tulee olla kansainvälinen EN ISO/IEC 17025-standardin mukainen akkreditointi ja sen tulee noudattaa Kansainvälistä laboratoriestandardia.⁵ Dopingtestauslaboratorioiden tulee sitoutua myös muun muassa tiukkoihin vastausaikoihin, laitevaatimuksiin ja uuden tutkimuksen tekoon. WADA:n hyväksymiä dopingtestauslaboratorioita on tällä hetkellä maailmassa 32, joista yksi on Suomessa.²

2.3 Dopingtestaus käytännössä

Dopingtestaus aina näytteenotosta sen analysoimiseen ja tulosten vastaamiseen saakka on tiukasti WADA:n valvomaa.⁴ Pyrkimyksenä on huolehtia prosessin lakikelpoisuudesta ja urheilijan oikeusturvasta. Dopingtestejä voidaan suorittaa kilpailun yhteydessä ja kilpailun ulkopuolella harjoituskaudella. Niitä voivat suorittaa WADA:n lisäksi kansallinen antidopingorganisaatio (Suomessa Suomen Antidopingtoimikunta ADT ry) ja kansainväliset lajiliitot. Testausprosessin tulee noudattaa WADA:n kansainvälistä testausstandardia.⁴ Tämä standardi pyrkii varmistamaan testimenettelyn laadun, luotettavuuden ja yhdenmukaisuuden.

Näytteet otetaan erillään näytteen analysoivasta laboratorion ja näytteenottoa valvotaan tarkasti mahdollisen manipulaation varalta. Suurin osa kilpailijoilta kerätyistä näytteistä on virtsanäytteitä, mutta myös verinäytteitä otetaan. Virtsanäytteen etuna on muun muassa näytteenoton helppous.

Näyte jaetaan kahteen näytepulloon (A- ja B-näyte), jotka sinetöidään ja merkitään koodeilla luovuttajan anonymiteetin takaamiseksi. Laboratoriossa näytteet vastaanotetaan ja tarkastetaan ja tiedot kirjataan ylös. A-näyte avataan näytteen analysoimiseksi ja B-näyte säilötään. Molemmat näytepulot säilytetään vähintään kolme kuukautta. Testaustahon pyynnöstä näytteitä saatetaan joskus säilyttää jopa kahdeksan vuotta mahdollisia myöhempiä analyysejä varten.

Seulonta-analyysien tarkoituksena on paljastaa epäilyttävät näytteet tarkempaa jatkotutkimusta varten. Analyysien haasteena on todeta satoja erilaisia yhdisteitä rajallisesta näytemäärästä mahdollisimman nopeasti. Seulontaa varten kehitetyt menetelmät ovat suhteellisen yksinkertaisia, nopeita, selektiivisiä ja herkkiä. Tutkittavien yhdisteiden suuren lukumäärän ja kemiallisten eroavaisuuksien takia yhdisteet seulotaan muutamalla erilaisella menetelmällä. Yleinen strategia on seuloa kemiallisesti samankaltaiset yhdisteet samalla menetelmällä. Menetelmät voivat perustua kromatografia-massaspektrometriaan tai olla immunologisia testejä. Kromatografi-massaspektrometriset menetelmät ovat nykyään huomattavasti käytetympiä niiden spesifisyyden ja herkkyuden takia ja immunologisia testejä käytetään lähinnä tilanteissa, joissa ne ovat välttämättömiä (esim. istukkahormonin määrittäminen). Lähes kaikki käytössä olevat seulontamenetelmät perustuvatkin kromatografia-massaspektrometriaan, joissa näytteet esikäsitellään yhdisteiden konsentroiduksi ja häiritsevien komponenttien poistamiseksi ennen analyysiä.

Mahdollisen positiivisen seulontatuloksen jälkeen löydös varmistetaan vielä erillisellä menetelmällä. Varmistusanalyysi suoritetaan usein spesifisemmällä menetelmällä kuin millä yhdiste on seulottu. Varmistukseen tulee käyttää mahdollisuuksien mukaan kromatografista menetelmää yhdistettynä massaspektrometriin. Massaspektrometrinen ajo pyritään suorittamaan koko massa-alueella mitaten, jolloin yhdisteistä saadaan täydelliset massapektrit. Tutkittavien yhdisteiden pienistä pitoisuuksista johtuen joudutaan kuitenkin usein suorittamaan ajot käyttäen esimerkiksi valittujen ionien seuranta (SIM). Tiettyjen yhdisteiden, kuten testosteronin, kohdalla kvalitatiivisen tunnistuksen lisäksi vaaditaan tarkka kvantitatiivinen tulos.

Varmistusanalytiikkaa ohjaa WADA:n tekninen dokumentti, jossa määritellään kromatografia-massaspektrometrinen analyysien identifikaatiokriteerit.⁶ Yhdisteiden identifointi perustuu niiden kromatografisiin retentioaikoihin ja massaspektrometriisiin

massa/varaus-suhteisiin (m/z), joita verrataan referenssinäytteiden vastaaviin ominaisuuksiin. Dokumentissa määritellään muun muassa sallitut retentioajan vaihtelut analyytin ja referenssistandardin välillä, diagnostisten ionien valinta ja niiden sallitut ionisuhteiden vaihtelut. Kaasukromatografiaan perustuvalla menetelmällä retentioajat eivät saa vaihdella kuin yhden prosenttiyksikön tai $\pm 0,2$ minuuttia (tiukemman kriteerin mukaan). Vähintään kolme diagnostista ionia (intensiteetiltään yli 5 %) vaaditaan yhdisteen tunnistamiseen normaaleissa massaspektrometrisissa mittauksissa. Ionien suhteellisten intensiteettien korkeimman intensiteetin kvantitointi-ioniin verrattuna pitää olla toistettavia (Taulukko 2).⁶

Taulukko 2. WADA:n asettamat kriteerit diagnostisten ionien ionisuhteiden vastaavuudelle, kun analyysimenetelmänä on kaasukromatografia-elektroni-ionisaatio-massaspektrometria (GC-EI-MS), kaasukromatografia-kemiallinen ionisaatio-massaspektrometria (GC-CI-MS) tai kaasukromatografia-tandem-massaspektrometria (GC-MS-MS).⁶

Suhteellinen intensiteetti (% kvantitointi-ionista)	GC-EI-MS; GC-CI-MS; GC-MS-MS
> 50 %	± 10 % (absoluuttinen)
25 % - 50 %	± 20 % (suhteellinen)
5 % - < 20 %	± 5 % (absoluuttinen)
< 5 %	± 50 % (suhteellinen)

Vasta varmistustuloksen ollessa positiivinen ilmoitetaan näytteenotosta vastaavalle antidopingorganisaatiolle ja WADA:lle. Ennen kilpailijan rankaisemista tällä on oikeus vaatia B-näytteen analysointia hänen itsensä ja/tai edustajansa läsnä ollessa.¹

3. DOPINGAINEINA KÄYTETTÄVÄT LUONTAISET STEROIDIT

Anabolis-androgeeniset steroidit ovat välttämättömiä ihmiselle aina sikiöstä vanhuuteen, erityisesti miehille. Steroideja tarvitaan mm. sikiön muuntumiseen miessukupuoliseksi, nuoruudessa sekundääristen sukupuoliominaisuuksien kehittymiseen ja miehen hedelmällisyyden säilyttämiseen. Steroidit vaikuttavat myös esimerkiksi lihaksiin, luihin, aivoihin ja maksaan. Terveiden aikuisten miesten plasman testosteronin fysiologinen pitoisuusalue on noin 10-35 nmol/l. Naisilla ja lapsilla sitä esiintyy vähäisempiä määriä (plasmapitoisuus alle 2 nmol/l).⁷ Steroidien anaboliset eli lihasmassaa kasvattavat ja androgeeniset eli hormonaaliset vaikutukset välittyvät solunsisäisten androgeenireseptoreiden kautta.⁸

WADA:n kiellettyjen aineiden listan³ kohdassa S1. kielletään anaboliset steroidit. Näitä steroideja käytetään dopingaineina niiden anabolisten eli elimistön valkuaisainesynteesiä lisäävien vaikutusten takia. Alakohta S1b. sisältää kiellettyjen endogeenisten steroidien listan. Endogeenisiä steroideja erittyy ihmiskehossa luonnostaan, mutta yhdisteet ovat ulkoisesti nautittuna kiellettyjä.

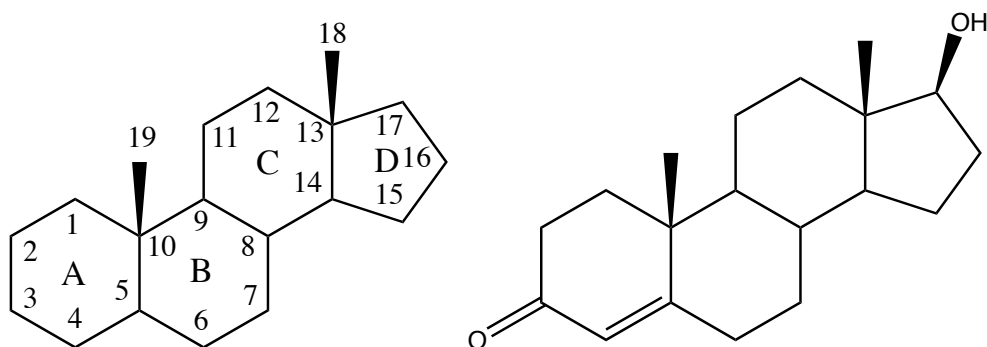
Kiellettyjä endogeenisiä steroideja WADA:n listan mukaan ovat testosteroni, dihydrotestosteroni, dehydroepiandrosteroni, androsteenidioli, androsteenidioni ja niiden isomeerit ja metaboliatuotteet.³

3.1 Rakenne

WADA:n listassa kielletyt anabolis-androgeeniset steroidit ovat rakenteellisesti hyvin samankaltaisia, mikä on haasteellista niiden analytiikan kannalta.

Testosteroni eli 17 β -hydroksiandrost-4-eeni-3-oni on tunnetuin anabolis-androgeeninen steroidi. Se on ns. C19-steroidi ja kuuluu luokkaan α,β -tyydyttymätön 3-ketosteroidi. Testosteroni on endogeeninen miessukupuolihormoni, jota muodostuu ihmiskehossa luonnollisesti kolesterolista.⁹ Miehillä testosteronia muodostuu pääasiallisesti kiveksissä ja naisilla vähäisempiä määriä munasarjoissa ja lisämunuaisissa.¹⁰ Se on tunnetuin ja biologisesti tärkein anabolinen hormoni jolla on suurin väärinkäyttöpotentiaali. C19-

steroidin yleinen kemiallinen rakenne ja testosteronin kemiallinen rakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. C19-steroidin yleinen kemiallinen rakenne ja testosteronin kemiallinen rakenne.

Dihydrotestosteroni eli 17β -hydroksi- 5α -androstaani-3-oni on tyydyttynyt 3-ketosteroidi ja testosteronin 5α -metaboliitti. Testosteroni muuntuu luonnostaan tietyissä kudoksissa dihydrotestosteroniksi. Steroidi erittyy virtsaan 5α -metaboliitteina, mikä näkyy kohonneina 5α -steroidimetaboliittien suhteena 5β -metaboliitteihin. Väärin käytettäessä sen aineenvaihduntatuotteiden suhteet muuttuvat virtsassa: androsteronin suhde etiokolanoloniin ja 5α -androstaanidiolin suhde 5β -androstaanidioliin kasvaa.¹¹

Dehydroepiandrosteroni eli 3β -hydroksiandrost-5-eeni-17-oni on yksi tärkeimmistä prohormoneista, eli kehossa aktiiviseksi anaboliseksi steroidiksi metaboloituvista yhdisteistä. Sen biologinen merkitys on kuitenkin vielä tuntematon, mutta steroidin mahdollisen suoritusta parantavan vaikutuksen takia yhdiste on liitetty WADA:n kiellettyjen aineiden listaan.^{3,12}

Myös muita testosteronin prohormoneita saatetaan käyttää dopingaineina. Androsteenioli eli androst-5-eeni- $3\beta,17\beta$ -dioli ja androsteeniidioni eli androst-4-eeni-3,17-oni ovat prohormoneja, jotka metaboloituvat elimistössä testosteroniksi.¹³

Epi-testosteroni (17α -hydroksi-androst-4-eni-3-oni) ei perinteisessä mielessä ole anabolinen hormoni, mutta sitä käytetään dopingissa peiteaineena. Epi-testosteronin käytöllä koitetaan peittää esimerkiksi testosteronin dopingkäyttö, joten sen käyttö on myös kielletty WADA:n listan mukaan.³

Boldenonia ja nortestosteronia voidaan pitää endogeenisinä steroideina, sillä niitä syntetisoidaan kehossa hyvin pieniä määriä. Hormonit ovat todennäköisesti steroidimetabolian sivutuotteita.¹⁰

3.2 Metabolia

Anabolis-androgeeniset steroidit metaboloituvat lähes täysin ennen niiden eritystä virtsaan ja vain pieni määrä alkuperäistä steroidia on havaittavissa virtsasta.¹⁴

Steroidien metabolia jaetaan vaiheen I ja vaiheen II reaktioihin. Vaiheen I reaktioilla tarkoitetaan entsyymien katalysoimia hapetus-, pelkistys- ja hydroksylaatioreaktioita. Muodostuneet metaboliitit ovat poolisempia jolloin ne erittyvät helpommin elimistöstä.¹⁰

C-4 ja C-5 -hiilen välisen kaksoissidoksen (Kuva 1) pelkistys 3-keto-4-ene-rakenteisten steroidien, kuten testosteronin, A-renkaassa tuottaa 5α - ja 5β -isomeerit. Muodostuneiden isomeerien suhteet riippuvat steroidista ja eroista D-renkaassa.¹⁰ Testosteronin 17-hydroksi-metaboliittien 5α - ja 5β -isomeerejä syntyy noin suhteessa 1:6, kun taas 17-keto-metaboliiteista muodostuu 5α - ja 5β -isomeereja noin yhtä paljon.¹⁰

5α -isomeerin 3-keoniryhmä pelkistyy nopeasti tuottaen 3α -hydroksi- 5α - ja 3β -hydroksi- 5α -isomeerit. 5β -isomeerin hydroksylaatio tuottaa vain 3α -hydroksi- 5β -rakenteen.¹⁰ Oraalisen testosteronin annon jälkeen on elimistön havaittu tuottavan enemmän 3α -hydroksi- 5α -metaboliittia ja vain pieniä määriä 3β -hydroksi- 5α -metaboliittia.¹⁰

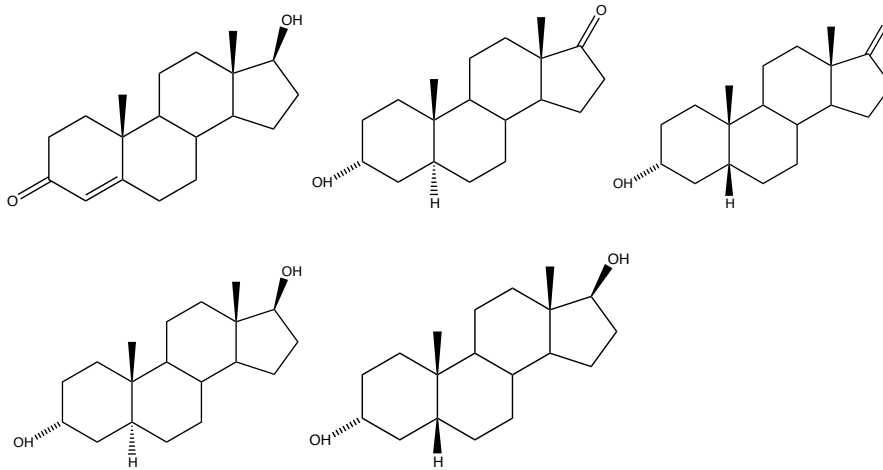
Luontaisten steroidien 17-hydroksyyliiryhmä hapetetaan entsyymaattisesti tuottaen 17-keoniryhmän. 17-keto-yhdisteet ovat monen luontaisen steroidin pääasiallisia metaboliatuotteita. Testosteronin metaboliassa osa 17β -keoniryhmistä pelkistetään takaisin 17β -hydroksyyliiryhmäksi.¹⁰

Vaiheen II reaktiot eli konjugaatioreaktiot liittävät steroidiin tai sen metaboliatuotteisiin glukuronidin tai sulfaatin.¹⁵ Konjugaatio helpottaa steroidimetaboliitin poistamista kehosta. Sekä glukuronidaatio että sulfataatio tapahtuu entsyymaattisesti.¹⁰ Suurin osa steroidimetaboliiteista erittyy virtsaan konjugoituneena, useimmiten glukuronidi tai sulfaatti lisätään steroidin C-3- tai C-17-asemissa oleviin hydroksidiryhmiin. 3α -

hydroksisteroidit eritetään virtsaan yleensä glukuronidikonjugaatteina, 3 β -hydroksisteroidit (kuten dehydroepiandrosteroni) taas pääasiassa sulfaattikonjugaatteina.¹⁶

Useat WADA:n kiellettyjen aineiden listalla luetelluista steroideista ovat testosteronin prekursoreita eli ne metaboloituvat testosteroniksi elimistössä. Tärkeimpiä prekursoreita ovat dehydroepiandrosteroni, androsteenidioli ja androsteenidioni. Dehydroepiandrosteronia muodostuu sukurauhasissa ja lisämunuaisessa kolesterolista muun muassa pregnenolonin ja hydroksipregnenolonin kautta.¹⁷ Kuvassa 2 on esitetty endogeenisten steroidien metaboliareitti, jossa luontaisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa käytettävät tärkeimmät steroidit on merkitty myös rakennekaavoin. Kuvasta voidaan havaita prohormonien merkitys testosteronin prekursoreina ja dopingtestauksen haaste osoittaa, minkä anabolis-androgeenisen steroidin dopingkäytöstä on kyse.

Testosteroni metaboloituu maksassa lähes täysin ennen eriytymistään virtsaan. Aineenvaihduntatuotteita on useita, mutta tärkeimpiä ovat 3 α -hydroksi-5 α -androstaani-17-oni (androsteroni), 3 α -hydroksi-5 β -androstaani-17-oni (etiokolanoloni), 3 β -hydroksi-5 α -androstaani-17-oni (epiandrosteroni), 5 α -androstaani-3 α ,17 β -dioli (5 α -androstaanidioli), 5 β -androstaani-3 α ,17 β -dioli (5 β -androstaanidioli) ja 5 α -androstaani-3 β ,17 β -dioli.¹⁵ Yhdisteiden rakennekaavat on esitetty kuvassa 3. Metaboliatuotteina niiden dopingkäyttö on myös kielletty.³



Kuva 3. Testosteronin ja sen yleisimpien metaboliittien rakenteet. Vasemmasta yläkulmasta alkaen: testosteronin, androsteronin, etiokolanolonin, 5 α -androstaanidiolin ja 5 β -androstaanidiolin kemialliset rakenteet.

3.3 Farmaseuttinen käyttö

Testosteronia on käytetty jo hyvin pian sen löytämisen jälkeen lääkinällisiin tarkoituksiin.⁸ Sitä tai muita anabolis-androgeenisia steroideja käytetään esimerkiksi sairauden tai ikääntymisen aiheuttaman testosteronituotannon alenemisen hoitoon miehillä. Steroideja voidaan käyttää myös anemian hoitoon.⁹ Hoito annetaan esimerkiksi lihaksen sisäisin ruiskein, oraalisesti, ihonalaisina kapseleina tai ihon läpi imeytyvinä geeleinä.

Oraalisesti annettu tai injektoitu steroidi kulkeutuu nopeasti verenkierron kautta maksaan, jossa se metaboloituu inaktiiviseksi.¹⁰ Farmaseuttisissa valmisteissa steroidimolekyyliä on muokattu pidempiaikaisen farmakologisen vaikutuksen aikaansaamiseksi. Steroidin esterifikaatio mahdollistaa tehokkaan injektion ja hitaan imeytymisen.⁸ Oikein käytettynä anabolis-androgeenisen steroidin käyttö lääkinällisiin tarkoituksiin aiheuttaa harvoin sivu- tai haittavaikutuksia.

3.4 Dopingkäyttö

Endogeenisiä anabolis-androgeenisia steroideja, erityisesti testosteronia, käytetään niiden anabolisten ominaisuuksiensa vuoksi myös dopingaineena. Rakenteellisesti testosteronia muistuttavia synteettisiä eli eksogeenisiä anabolisia steroideja, joita on pyritty

muokkaamaan aiheuttamaan vähemmän epähaluttuja androgeenisia vaikutuksia, käytetään myös dopingaineina.¹⁰

Testosteronin suuremman plasmapitoisuuden vaikutukset ovat selkeästi havaittavissa ihmisten luonnollisella, fysiologisella pitoisuusalueella; miehillä steroidin androgeeniset vaikutukset ovat selkeästi havaittavissa verrattuna naisiin ja lapsiin. Testosteronin dopingkäytössä pitoisuudet nousevat kuitenkin huomattavasti luonnollista pitoisuusaluetta korkeammalle ns. suprafysiologiselle pitoisuusalueelle. Vuonna 1996 tehdyssä tutkimuksessa todettiin kiistatta ensi kertaa suprafysiologisen testosteronin annostuksen (600 mg lihaksen sisäisenä ruiskeena viikoittain 10 viikon ajan) lisänsen dopingkäytössä toivottuja anabolisia vaikutuksia. Testosteronin käyttö yhdistettynä proteiinipitoiseen ruokavalioon ja erityisesti samanaikaiseen harjoitteluun lisäsi lihasmassa ja voimaa.¹⁸

Synteettisesti tuotetun testosteronin käyttö hillitsee luontaista testosteronin tuotantoa prosessissa, jossa esimerkiksi lutenisoivan hormonin pitoisuus pienenee. Lutenisoiva hormoni aktivoi luontaista testosteronintuotantoa. Epitesteronin tuotanto pienenee myös, jolloin synteettistä testosteronia käyttävän henkilön steroidien testosteronin ja epitesteronin pitoisuuksien suhde (testosteroni/epitesteroni-suhde) kasvaa.¹² Synteettisen epitesteronin dopingkäyttö perustuukin muiden steroidien dopingkäytön peittelemiseen ja pyrkimyksenä on pitää dopingtestauksessa seurattava testosteroni/epitesteroni-suhde normaaleissa rajoissa.

Testosteronin prekursorien dopingkäyttö perustuu niiden muuttumiseen kehossa testosteroniksi. Dehydroepiandrosteronia ja muita prohormoneja on ollut USA:n urheiluravinnemarkkinoilla vuodesta 1996. Niitä myydään ravintolisinä, joten niiden saatavuus on helppoa.¹⁹

Anabolis-androgeenisten steroidien dopingkäytössä hormonia annostellaan erilaisin ohjein.⁸ Annoksia voidaan ottaa sykleittäin, kasvattaen portaittain annosmäärää, vuorottelemalla eri steroideja tai ottamalla niitä samanaikaisesti. Huomattavasti farmakologisia valmisteita suurempi annostelu lisää tuntuvasti steroidien käytön haittavaikutuksia hormonaalisesti terveille ihmisille. Ongelmana voi olla myös pimeiltä markkinoilta saatavien tuotteiden epäpuhtaus. Naisilla testosteronin käytön haittavaikutuksia ovat muun muassa karvoitus, akne, äänen madaltuminen ja

kuukautiskierron häiriöt. Miehillä haittavaikutukset näkyvät oman hormonituotannon ja seksuaalitoimintojen heikkenemisenä, joka voi johtaa hedelmättömyyteen.

Anabolis-androgeenisten steroidien jatkuva väärinkäyttö saattaa edistää esimerkiksi sepelvaltimotaudin ja aivoinfarktin kehittymistä ja lisätä riskiä sairastua diabetekseen, keltatautiin tai erilaisiin infektioihin. Suurina annoksina vaikutuksia on myös mielialaan ja käyttäytymiseen, joka saattaa muuttua aggressiiviseksi.

4. ANALYYSISTRATEGIAT LUONTAISTEN STEROIDIEN DOPINGKÄYTÖN OSOITTAMISESSA

Vuonna 2012 WADA:n akkreditoimien laboratorioden analysoimasta 267 645 näytteestä löydöksiä oli 1,76 %:ssa. Löydös ei tarkoita vielä dopingrikkomusta, vaan urheilijalla voi olla esimerkiksi erivapaus käyttää löydettyä yhdistettä. Näistä löydöksistä 50,6 % oli anabolisia steroideja, joista 55,5 %:ssa löydös oli WADA:n testosteroni/epitestosteroni-suhteelle asettaman raja-arvon ylitys. Vuonna 2012 dopingtestauslaboratoriot tekivät siis 1202 normaalista poikkeavaa löydöstä.²⁰

4.1 Seulonta

Endogeenisten steroidien dopingkäyttö todetaan alustavasti anabolisten steroidien seulonnan yhteydessä mittaamalla ns. steroidiprofiili, jossa tarkkaillaan tiettyjen steroidien tai niiden aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksia ja keskinäisiä suhteita. Yhdisteen dopingkäyttö voidaan havaita sen aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksien kasvuna tai tiettyjen aineenvaihduntatuotteiden suhteiden muutoksina. Steroidiprofiilin tulokset ovat vielä varmistettava dopingkäytön osoittamiseksi. WADA:n teknisessä dokumentissa²¹ annetaan ohjeet endogeenisten anabolis-androgeenisten steroidien testaukseen ja raportoimiseen. Dokumentti on tarkoitettu epänormaalien virtsan steroidiprofiilin raportoimiseen yhtenäisellä tavalla kaikissa dopingtestauslaboratorioissa. Epänormaali steroidiprofiili johtuu tässä tapauksessa testosteronin, prohormonin (dehydroepiandrosteronin, androsteenidiolin, androsteenidionin), testosteronimetaboliitti dihydrotestosteronin tai peiteaine epitestosteronin käytöstä. Tätä teknistä dokumenttia laboratorioden on pakko noudattaa.

Steroidiprofiilissa on määritettävä tiettyjen endogeenisten steroidien pitoisuudet virtsanäytteessä. Yleisimpien steroidimetaboliittien lisäksi määritettäviä yhdisteitä ovat esimerkiksi epitestosteroni ja spesifiset metaboliitit kuten 5α -androstaanioli ja 5β -androstaanioli. Lisäksi tiettyjen steroidien pitoisuuksien keskinäisiä suhteita on mitattava. Steroidiprofiilissa määritettävät yhdisteet ja yhdisteiden suhteet on esitetty taulukossa 3.²¹

Taulukko 3. WADA:n ohjeistamat steroidiprofiilissa määritettävät yhdisteet ja yhdisteiden pitoisuuksien suhteet.

Pitoisuus	Yhdiste
	Testosteroni
	Dihydrotestosteroni
	Dehydroepiandrosteroni
	Epitestosteroni
	Androsteroni
	5α -androstaanioli
	5β -androstaanioli
Pitoisuuksien suhteet	Yhdisteet
	Testosteroni/epitestosteroni
	Androsteroni/etiokolanoloni
	5α -androstaanioli/ 5β -androstaanioli
	Androsteroni/testosteroni
	5α -androstaanioli/epitestosteroni

Steroidiprofiilin luomiseksi laboratorion tulee käyttää menetelmää, jolla voidaan arvioida määritettävien yhdisteiden pitoisuudet näytteessä. Menetelmässä tulisi käyttää kromatografia-massaspektrometriaa, deuteroituja sisäisiä standardeja, kalibraatiosuoraa ja kontrollinäytteitä menetelmän luotettavuuden takaamiseksi.²¹

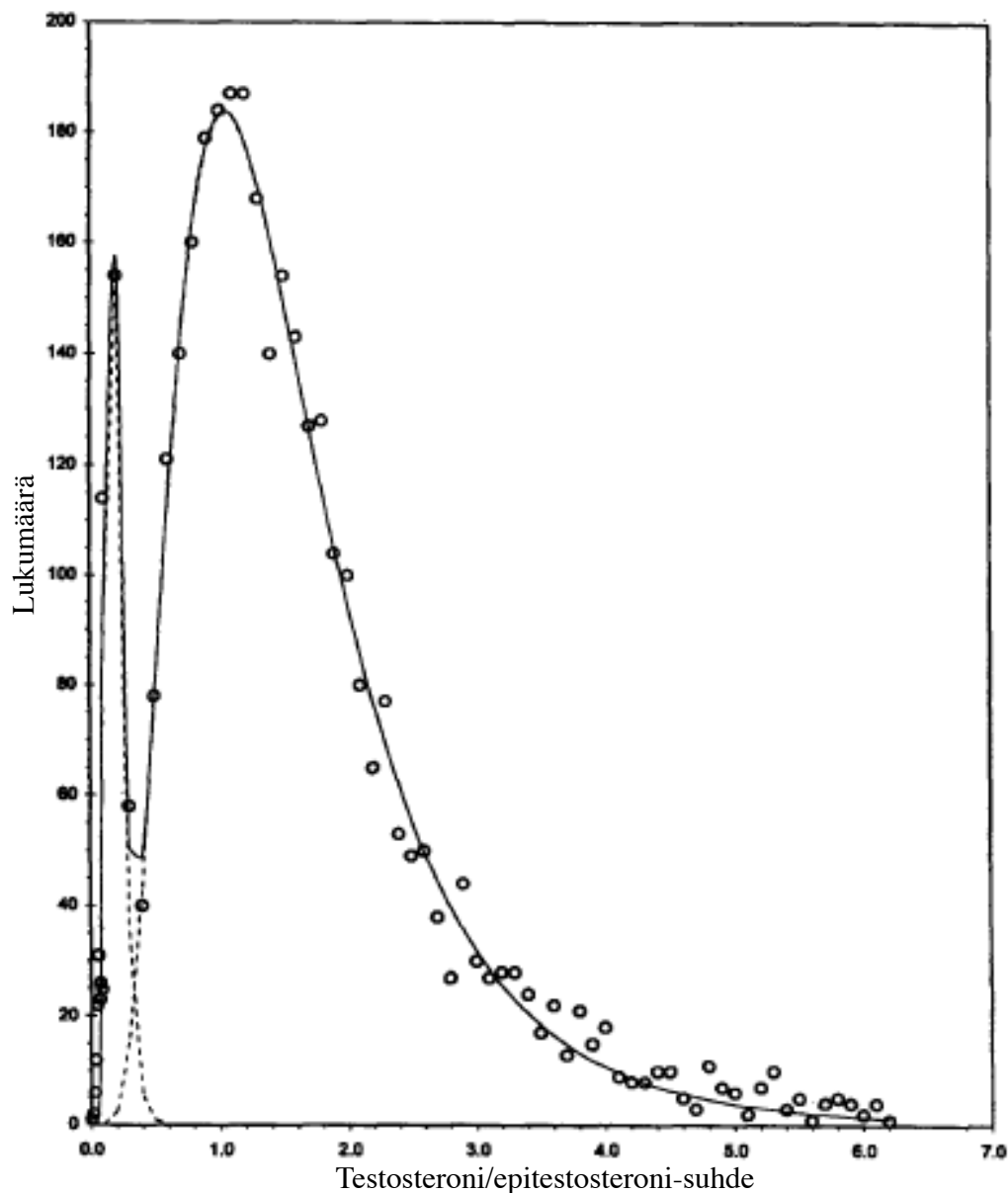
Steroidiprofiilissa mitattujen yhdisteiden pitoisuuksien ylittäessä WADA:n määrittämät raja-arvot on näyte analysoitava varmistusmenetelmällä. Yhdisteiden pitoisuuksien (vastaavat glukuronidoituneen yhdisteen pitoisuutta) raja-arvot ovat: 200 ng/ml testosteronille tai epitestosteronille, 10 000 ng/ml androsteronille tai etiokolanolonille ja 100 ng/ml dehydroepiandrosteronille. Seulontavaiheessa analyysit tehdään

yksittäismittauksina; epäilyttävän näytteen steroidipitoisuudet tulee varmistaa kolmesta rinnakkain analysoitavasta näytteestä.²¹

Myös steroidien keskinäisien suhteiden raja-arvojen ylittyessä on näyte analysoitava varmistusmenetelmällä. Perinteisesti tärkein steroidiprofiilissa mitattava parametri on edelleenkin testosteroni/epitestosteroni-suhde, jolle on asetettu raja-arvoksi neljä. Testosteroni/epitestosteroni-suhde on epäsuora testosteronin käyttöön viittava biomarkkeri. Empiiristen mittausten tuloksena raja-arvoksi tälle suhteelle asetettiin arvo kuusi, mutta vuonna 2006 raja-arvo laskettiin neljään tarkoituksena parantaa dopingkäytön toteamisen herkkyyttä. Testosteronia käytettäessä tämä suhde normaalisti ylittyy.²²

Testosteroni/epitestosteroni-suhteen käyttöön testosteronin dopingkäytön mittarina tulee suhtautua tietyin varauksin. Tutkittujen 3667 virtsanäytteen perusteella voidaan esimerkiksi päätellä, että miesten luonnollinen testosteroni/epitestosteroni-suhde alittaa useimmiten raja-arvon neljä, mutta tämä ei kuitenkaan poissulje väärin positiivisten tai negatiivisten tulosten mahdollisuutta (Kuva 4).²³ Raja-arvo saattaa ylittyä, vaikka testosteronia ei olisi käytettykään. Kohonnut suhde saattaa johtua esimerkiksi testosteroniglukuronidin liikaerityksestä tai epitestosteronin erityksen vähäisyydestä. Toisaalta testosteronia glukuronisoivan entsyymin geneettisestä polyformiasta johtuen tietyillä ihmisillä raja ei ylity vaikka testosteronia olisikin käytetty.²²

Epäselvissä tapauksissa pitkäaikaustestauksilla, jolloin urheilijasta otetaan useita näytteitä tietyllä aikavälillä, saadaan yleensä luotettava tieto henkilön luontaisista steroiditasoista. WADA:n dokumentissa testosteroni/epitestosteroni-suhteen luontaiseksi vaihteluksi määritellään miehillä suurimmillaan 30 %. Naisilla vaihtelu saa olla jopa 60 % sillä heillä testosteronin ja epitestosteronin pitoisuudet ovat lähellä yhdisteiden toteamisrajoja luontaisesti ja koska kuukautiskierron vaihtelut vaikuttavat hormonien pitoisuuksiin.²¹



Kuva 4. Rutiininomaisen dopingtestauksen yhteydessä määritettyjen testosteroni/epitestosteroni-suhteiden jakauma. Virtsanäytteet kerättiin 3667 miesurheilijalta. Kuva muokattu luvalla (Elsevier) lähteestä 23.

Steroidiprofiili saattaa kuitenkin muuttua esimerkiksi mikrobikontaminaation johdosta. Siksi seulonta-analyyseissä aina tarkistetaan myös näytteen analyysikelpoisuus. Mahdollinen näytteenotossa tapahtunut kontaminaatio, näytteen kuljetuksessa tapahtuneet viiveet ja virheet säilytyksessä saattavat edesauttaa mikrobien lisääntymistä virtsanäytteessä.¹¹ Mikrobitoiminnan seurauksena glukuronidi- tai sulfaattikonjugaatti saattaa irrota tai yhdisteen rakenne muuttua. Tämän vuoksi laboratoriot seuraavat erilaisia

indikaattoreita mahdollisen mikrobikontaminaation havaitsemiseksi. Edustavan näytteen vapaan testosteronin tai epitestosteronin osuus ei saisi ylittää 5 % steroidin kokonaismäärästä ja lisäksi profiilissa seurataan mikrobitoiminnasta kertovaa vapaan 5 α - ja 5 β -androstaani-3,17-dionin pitoisuutta.²¹

4.2 Varmistusanalyysi

Steroidiprofiilista saatujen tulosten perusteella näytteelle tehdään vielä varmistusanalyysi kielletyn steroidin dopingkäytön osoittamiseksi.²¹ Seulonnassa steroidiprofiilin perusteella pystytään löytämään epäilyttävät näytteet, jotka otetaan lähempään tarkasteluun varmistusanalyysissä. Varmistusanalyysissä yhdisteet identifioidaan, niiden pitoisuudet ja yhdisteiden suhteet mitataan tarkemmin ja tehdään isotooppisuhdemassaspektrometriaan perustuva mittaus.

Steroidiprofiilista saatujen tietojen perusteella varmistusanalyysissä tarkkaillaan erityisesti tiettyjä yhdisteitä riippuen epäilystä steroidista. Analysoitavia yhdisteitä ovat esimerkiksi testosteroni, dehydroepiandrosteroni, epitestosteroni, androsteroni ja etiokolanoloni. WADA ohjeistaa testosteroni/epitestosteroni-suhteen raja-arvon neljä ylittävien näytteiden käsittelyä ja raportoimista.²⁴

Kvalitatiivisena varmistustekniikkana endogeenisten steroidien analytiikassa käytetään kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometriaa (GC-C-IRMS).²¹ Tekniikka perustuu kemiallisesti tuotetun ja endogeenisen testosteronin hiilen isotooppisuhteen (¹³C/¹²C) eroihin.

5. MITTAUSMENETELMÄT LUONTAISTEN STEROIDIEN DOPINGKÄYTÖN OSOITTAMISESSA

5.1 Kaasukromatografi-massaspektrometriset menetelmät

Kaasukromatografia-massaspektrometria on kahden eri analyysitekniikan yhdistelmä. Sitä käytetään laajasti ja se on ollut pitkään yksi tärkeimmistä analyysimenetelmistä endogeenisten steroidien analytiikassa. Tekniikka soveltuu haihtuvien ja termisesti stabiilien, tai johdoksenmuodostuksella (derivatisoinnilla) sellaisiksi tehtävien, yhdisteiden erottamiseen ja tunnistamiseen ja pitoisuuksien mittaamiseen.

Massaspektrometrin ionisaatiokammiossa yhdisteet ionisoidaan, jolloin ne ionisaatiotavasta riippuen usein hajoavat spesifisiksi hajoamistuotteikseen. Nämä ovat hyvin pysyviä olosuhteiden pysyessä samoina ja kertovat yhdisteen kemiallisesta rakenteesta. Näytteen ionisointi voidaan tehdä usealla eri tekniikalla.

Elektroni-ionisaatio (EI) on perinteisesti yksi käytetyimmistä ionisaatiotekniikoista dopinanalytiikassa yhdistettynä GC-MS:iin.²⁵ EI:ssa näytteen sisältävää kaasua pommitetaan elektroneilla, jotka on tuotettu hehkulangalla. Elektronit ohjataan kaasun läpi ja kiihdytetään sähkökentän avulla. Elektronit törmäävät näytemolekyyleihin, jolloin ne virittyvät. Osa virittyneistä molekyyleistä luovuttaa elektroninsa, jolloin niistä muodostuu radikaalikationeita eli molekyylimolekyylejä M^+ kaavan (1) mukaisesti.



Tämän lisäksi molekyylimolekyylei yleensä pilkkoutuu yhdisteelle luonteenomaisella tavalla fragmentti-ioneiksi, joista suuri osa on positiivisesti varautuneita. Saatavilla on paljon EI:oon perustuvia spektrikirjastoja, joita voidaan käyttää apuna yhdisteiden tunnistamisessa. Dopinanalytiikassa tutkittavien yhdisteiden pilkkoutumisen, fragmentaation, tunteminen on välttämätöntä niiden luotettavaan tunnistukseen näytteistä.²⁵ Testosteronin EI tuottaa sille karakteristiset ionit m/z 288 (M^+), 273 (M^+-15), 270 (M^+-18), 246 (M^+-42) ja 124.²⁵

Muodostuneiden ionien erotus voidaan tehdä erilaisilla analysaattoreilla, jonne ionit johdetaan sähkökenttien avulla. Yksi yleisimmistä käytetyistä analysaattoreista dopinanalytiikassa on kvadrupolianalysaattori.²⁶ Laitteisto muodostuu neljästä

yhdensuuntaisesta metallisauvasta, joista vastakkaiset sauvaparit on sähköisesti kytketty toisiinsa. Erottuminen tapahtuu ionien kulkiessa näiden neljän hyperbolisen sauvan välistä. Toisessa sauvaparissa on positiivinen, toisessa negatiivinen tasavirtajännite. Lisäksi sauvoihin johdetaan radiotaajuinen vaihtojännite. Analysaattoriin saapuvat ionit ohjataan kulkemaan sauvojen välistä, mutta radiotaajuinen sähkökenttä saa ne värähtelemään poikittaissuuntaisesti kvadrupolin akseliin nähden. Vain ne ionit, joilla on radiotaajuisen vaihtojännitteen amplitudin ja taajuuden sekä tasajännitteen mukaan määräytyvä massa/varaus-suhde, pääsevät kulkemaan kvadrupolin läpi. Muut ionit törmäävät sauvoihin. Sauvojen taajuutta ja jännitteitä muuttamalla voidaan valita millaisia ioneja halutaan detektorille.

Muita käytettyjä analysaattoreita on esimerkiksi lentoaika-analysaattori (TOF). Lentoaika-analysaattorissa kaikille ioneille annetaan sama kineettinen energia, jolloin niiden nopeus riippuu vain niiden massasta mikäli ionien varaus on sama. Kevyemmät ionit lentävät tällöin nopeammin ja detektoidaan ennen raskaampia ioneja.²⁷

Massaspektrometri voidaan asettaa määrittämään vain tiettyjä m/z-suhteen ioneja käyttämällä SIM-mittausta, jolloin päästään parempiin herkkyysiin, tai tutkimalla koko valittua massa-aluetta käyttämällä massa-alueen pyyhkäisyä (SCAN), jolloin saadaan täydellinen massaspekttri. Dopinganalytiikalta vaadittavien pienien toteamisrajojen takia yhdisteiden analyysit suoritetaan usein käyttäen SIM-mittausta.

Detektorina (kaasu)kromatografia-massaspektrometriassa käytetään yleensä elektronimonistinta tai fotomonistinta. Detektorin antama signaali vielä vahvistetaan ja tallennetaan. Virtsaan erittyvien steroidien pitoisuudet vaihtelevat välillä 10 ng/ml ja 10 000 ng/ml, joten näytteiden laimentaminen eri pitoisuuksiin on välttämätöntä sopivan detektorivasteen saamiseksi.¹²

Kaasukromatografian ja elektroni-ionisaatio-massaspektrometrian kehitys 1980-luvulla tarjosi uuden vaihtoehdon aikaisemmin steroidien seulonta-analyyseissä käytetyille radioimmunologisille menetelmille. Sopivaan näytteen esikäsittelyyn yhdistettynä kaasukromatografia-massaspektrometria osoittautui tehokkaaksi menetelmäksi steroidien seulontaan.¹³

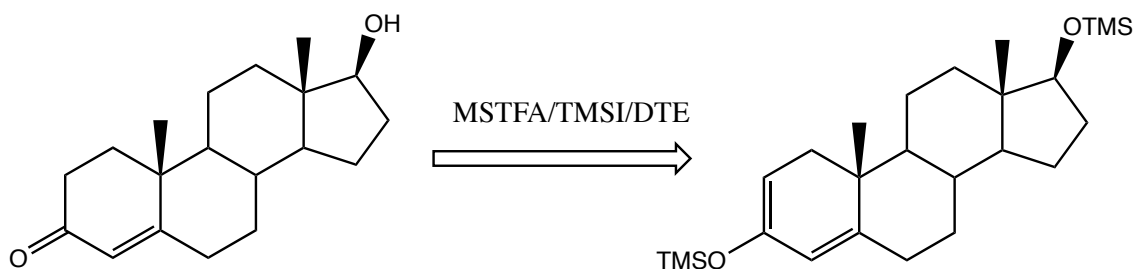
Rutiinikäyttöön soveltuva steroidien dopingkäytön toteamiseen soveltuva GC-MS-menetelmä kehitettiin Saksassa 1980-luvun alussa.²⁸ Analyysit tehtiin kvadrupoli-

massaspektrometrilla yhdistettynä kapillaarikaasukromatografiin. Näytteet puhdistettiin kiinteäfaasiuutolla (SPE), glukuronidikonjugoidut steroidimetaboliitit erotettiin vapaista steroideista neste-nesteuutolla (LLE) ja hydrolysoitiin β -glukuronidaasientsyymillä (*Escherichia coli*). Uuton jälkeen näyte derivatisoitiin, mikä osoittautui välttämättömäksi. Tämä paransi kohdeyhdisteiden niin kaasukromatografisia kuin massaspektrometrisiäkin ominaisuuksia ja menetelmän herkkyyttä.²⁸

5.1.1 Kaasukromatografia-massaspektrometria

1980-luvulla kehitetty seulonta-analyysimenetelmä on edelleen käytössä, mutta sitä on sittemmin muokattu ja yksinkertaistettu. SPE tehdään useimmin oktadekyyilisilaanimateriaalilla (ODS)²³ tai jätetään kokonaan pois²⁹ ja LLE:ssä käytetään useimmin tertbutyyylimetyylieetteriä (TBME).²⁹ Hydrolyysi suoritetaan useimmin käyttämällä β -glukuronidaasia (*Escherichia coli*),^{23,29} mutta myös *Helix Pomatian* glukuronidaasientsyymiä on käytetty.³⁰ Sisäisenä standardina analyysissä käytetään usein metyyli-testosteronia^{29,30} ja tiettyjen kohdeyhdisteiden, kuten esimerkiksi testosteronin ja epitestosteronin kohdalla niiden deutoituja analogeja.¹³ Näytteen esikäsittelyn vaiheet ovat kuitenkin pitkään pysyneet lähes muuttumattomina.

Yhdisteet derivatisoidaan useimmiten trimetyylisilyylijohtannaisikseen. Steroidien trimetyylisilylaatio (TMS) N-metyyli-N-trimetyylisilyylitrifluoriasetidilla (MSTFA) yhdessä sopivien katalysaattorien kanssa on osoittautunut tehokkaimmaksi derivatisointitavaksi.^{23,29-31} Kuvassa 5 on esitetty testosteronin derivatisoinnissa tapahtuva hydroksi- ja ketoryhmien trimetyylisilylaatio.²⁶

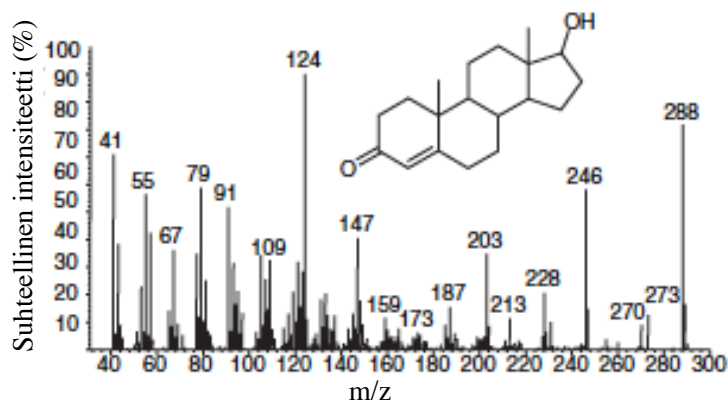


Kuva 5. Testosteronin derivatisointireaktio testosteroni-bis-O-TMS 2,4-isomeeriksi MSTFA-reagenssilla, jossa katalysaattorina on käytetty trimetyylisilylijodia (TMSI) ja ditioerytritolia (DTE).

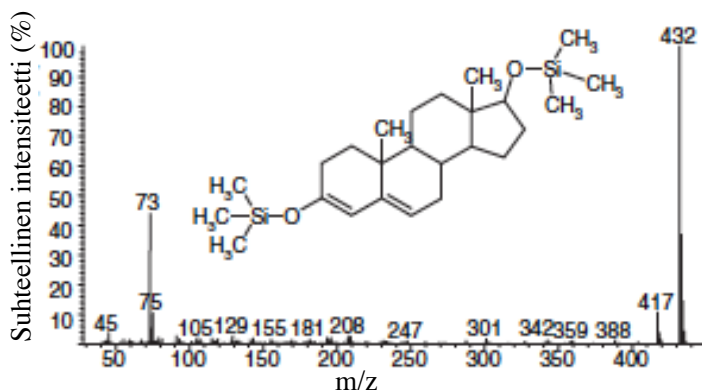
Näytteet syötetään analyysilaitteistoon käyttäen suoraa höyrystävää injektiota²³ tai jakoinjektiota.^{29,30} Yhdisteet ionisoidaan käyttämällä EI:ta ja useimmiten ionisaatioenergiana on 70 eV.^{23,29} Kaasukromatografi-massaspektrometrinen analyysi suoritetaan käyttäen SIM-menetelmää tarvittavan herkkyuden saavuttamiseksi, ja useimmiten seurattavia ioneja on kolmesta kuuteen tutkittavaa analyyyttiä kohden.^{23,26,29,30,32} Seurattavat ionit ovat usein molekyyli-ioneja ja/tai niistä muodostuneita fragmentti-ioneja (esimerkiksi metyyli- tai trimetyylisilyyliryhmän lohkeaminen).

Yhdisteiden derivatisoinnissa tapahtunut trimetyylisilylaatio vaikuttaa niiden hajoamisreitteihin elektroni-ionisaatiossa ja täten muodostuneet fragmentti-ionit ovat erilaisia kuin derivatisoimattomien yhdisteiden. Trimetyylisilyloitujen yhdisteiden EI-hajoamisreittien tunteminen on välttämätöntä luotettavien analyysien takaamiseksi.²⁵ Kuvassa 6 on esitetty EI-massaspektrometrit testosteronista ja kahdesta testosteronin trimetyylisilylaatiossa muodostuvasta yhdisteestä. Kuvasta on havaittavissa derivatisoimattoman ja derivatisoidun yhdisteen massaspektrometrien suuret erot; derivatisointi parantaa kohdeyhdisteiden tunnistettavuutta.

a

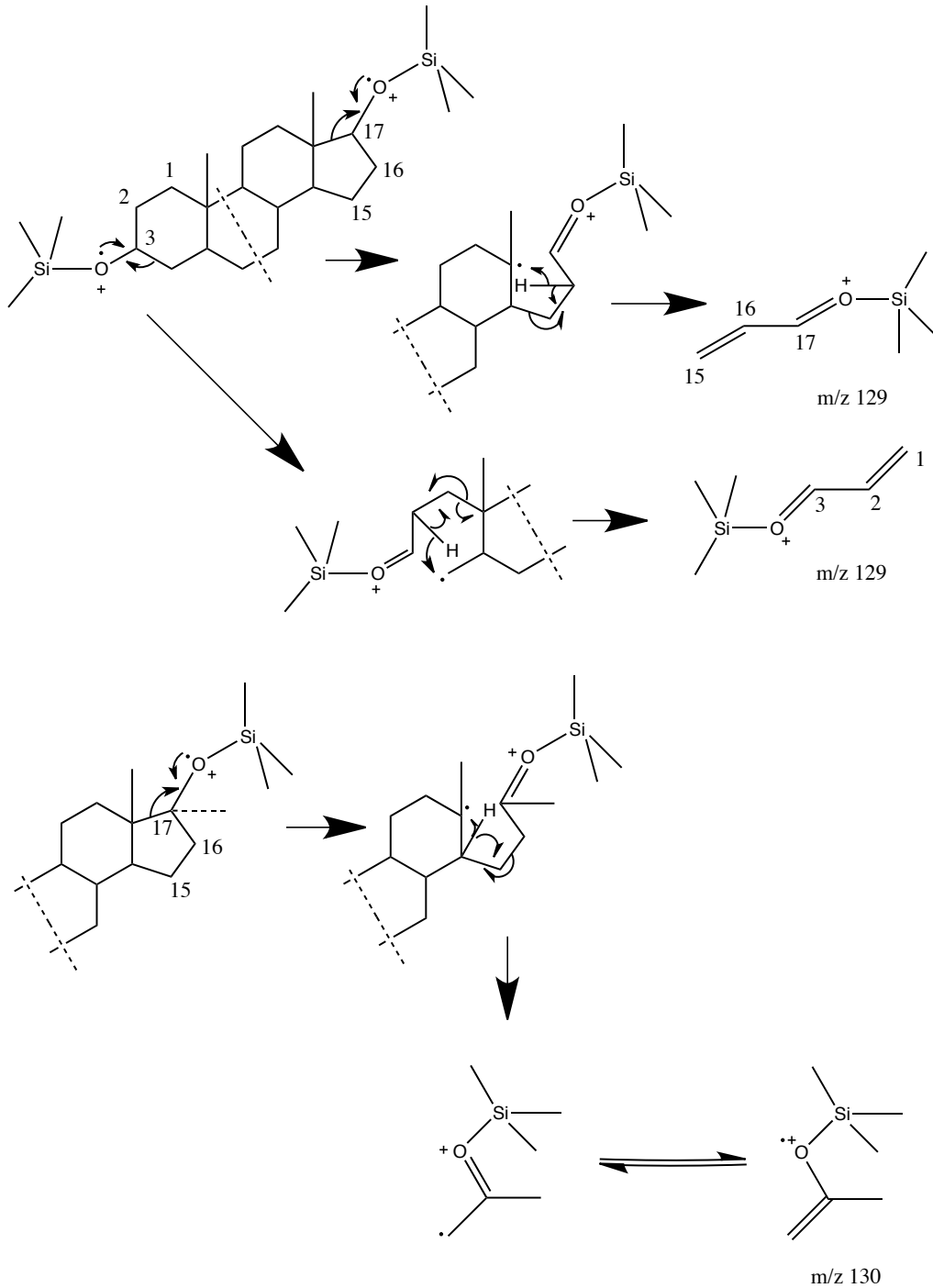


b



Kuva 6. EI-massaspektrometri: a) testosteroni (moolimassa 288 g/mol) b) testosteroni-bis-O-TMS-3,5-isomeeri (moolimassa 432 g/mol). Kuva muokattu luvalla (John Wiley and Sons) viitteestä 25.

Kuvassa 7 on esitetty trimetyylisilyloiduille steroidille tyypillisten fragmentti-ionien m/z 129 ja 130 mahdolliset hajoamisreitit. Vaikka fragmentti-ionin m/z 129 intensiteetti massaspekttrissä on pieni, se on tärkeä indikaattori steroidin 3- tai 17-hydroksyyli ryhmän onnistuneesta derivatisaatiosta.



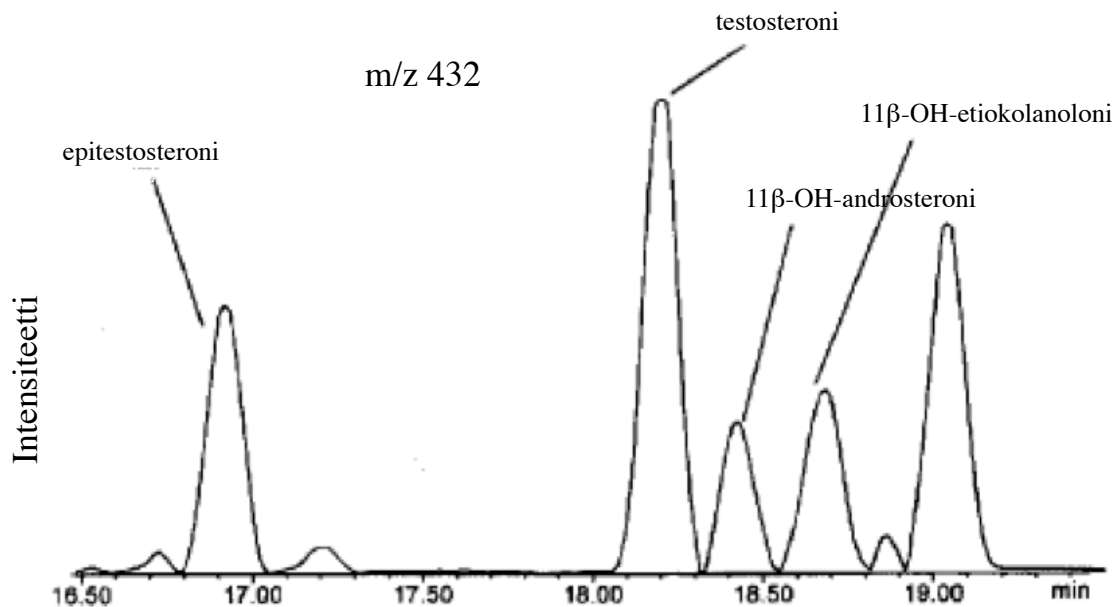
Kuva 7. Trimetyylisilyloiduille steroidille karakterististen fragmentti-ionien synty elektroni-ionisaatiossa.

Taulukossa 4 on esitetty muutamien endogeenisten steroidien dopinganalytiikassa seurattavien trimetyylisilyloitujen yhdisteiden molekyyli-ionit (M^+) ja fragmentti-ionit (m/z).²⁵

Taulukko 4. Trimetyylisilyloitujen dihydrotestosteronin, testosteronin, androsteronin ja etiokolanolonin EI-molekyyli- ja fragmentti-ionit (m/z). Taulukko muokattu luvalla (Elsevier) lähteestä 25.

Yhdiste	M ⁺	Fragmentti-ionit					
		M ⁺ -15	M ⁺ -15-90				
5a-dihydrotestosteroni-bis-TMS	434	419	329	239	202	143	142
testosteroni-bis-TMS, 3,5-isomeeri	432	417		342	208	129	105
testosteroni-bis-TMS, 2,4-isomeeri	432	417	327	231	194	179	129
androsteroni-bis-O-TMS	434	419	329	239	182	169	105
etiokolanoloni-bi-O-TMS	434	419	329	239	182	169	105

Yhdisteestä riippuen tällä menetelmällä saavutetaan 10-20 ng/ml toteamisraja.³³ Esimerkki rutiinikäytössä olevalla kvadrupolimassapektrometrisella anabolis-androgeenisten steroidien dopingkäytön seulontamenetelmällä ajetun näytteen ionikromatogrammista m/z 432 on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Ionikromatogrammi m/z 432, jossa näkyvät vasemmalta oikealle: TMS-derivatisoitujen epitestosteronin, testosteronin, 11β -OH-androsteronin ja 11β -OH-etioholanolonin piikit. Virtsa kerättiin terveeltä mieheltä ja se sisälsi noin 50 ng/ml testosteronia ja epitestosteronia. Näyte esikäsitelty SPE:lla, hydrolysoitu (*Helix Pomatia*) ja TMS-derivatisoitu (MSTFA-NH₄I). GC-MS-analyysi: Injektiotilavuus 2 μ l. Uunin lämpötilaohjelma: alkulämpötila 180 °C, lämpötilan nosto 3 °C/min 240 °C:een ja 10 °C/min loppulämpötilaan 300 °C:een. SIM-analysointi, kuusi ionia/yhdiste. Kuva muokattu luvalla (John Wiley and Sons) lähteestä 30.

Kaasukromatografi-massaspektrometrisia tekniikoita hyödyntävissä menetelmissä käytetään lähestulkoon aina kvadrupolianalyysia. TOF:n soveltuvuutta anabolis-androgeenisten steroidien dopinganalytiikkaan on myös tutkittu. Näytteen esikäsittely vastasi pitkälti rutiinomaisesti käytettyä esikäsittelyä kvadrupolianalyysiaattorille yhdistettynä uudelleen derivatisointitekniikkaan. Menetelmällä päästiin 60 ng/ml toteamisrajoihin käyttämällä tavanomaista jakoinjektiota, mutta kehitetyllä suuren tilavuuden injektointitavalla päästiin jopa 0,5 ng/ml toteamisrajoihin (TMS-metyylitestosteronille).³⁴

Taulukossa 5 on esitelty tyypillisiä esimerkkejä GC-MS-tekniikkaa endogeenisten steroidien dopinganalytiikkaan soveltavista menetelmistä.

Taulukko 5. Esimerkkejä GC-MS-tekniikkaa steroidianalytiikkaan soveltavista menetelmistä: Näytteen esikäsittelyn, kaasukromatografian ja massaspektrometrin parametreja.

Näytteen esikäsittely		Kaasukromatografian parametrit					Massaspektrometrin parametrit			Vuite
Esikäsittely	Derivatisointi	Kantokaasu	Kolonne	Injektio	Uunin lämpötilaohjelma	Analyysaattori	Ioni-sointi	MS-analyysi	Nume-ro	
SPE (ODS), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (DEE)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ -etaanitioli, 70 °C 30 min	Helium	5 % fenyyli-polyetyylisiloksaani HP-5 (25 m x 0,25 mm, filmi 0,33 μm)	Suora (30 s), 270 °C	100 °C (pito 1 min), 16 °C/min 200 °C:een, 3,8 °C/min 201 °C:een, 20 °C/min 320 °C:een, 320 °C, pito 5,5 min	Kvadrupoli	Kvadrupoli EI, 70 eV	SIM (50 ms)	23	
LLE (TBME), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ -etaanitioli (1000:2:6, v:v:v), 60 °C	Helium 1 ml/min	100 % metyyliisiloksaani HP-1 (17 m x 0,20 mm, filmi 0,11 μm)	Jakoinjektio 1/10, 280 °C, tilavuus 3 μl	140 °C, 40 °C/min 180 °C:een, 3 °C/min 240 °C:een, 40 °C/min 300 °C:een, pito 3 min	Kvadrupoli	EI, Kvadrupoli 70 eV	SIM (20 ms), ionia/analyytti	29	
SPE, hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Helix Pomatia</i>), LLE (DEE)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ , 60 °C 15 min	a)	a)	Jakoinjektio 1/10, 300 °C, tilavuus 2 μl	180 °C, 3 °C/min 240 °C:een, 10 °C/min 300 °C:een	Kvadrupoli	Kvadrupoli a)	SIM (50 ms tai vähemmän), 6 ionia/analyytti	30	
a)	TMS-derivatisointi: MSTFA-TMSI-DTE (1000:2:2, v:v:v), 60 °C 15 min	Helium 0,7 ml/min	a)	a)	180 °C (pito 1 min), 2 °C/min 250 °C:een, 5 °C/min 280 °C:een	Kvadrupoli	Kvadrupoli EI, 250 °C	SIM (50 ms)	32	
Hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (DEE)	TMS-derivatisointi: pyridiini-N,O-bis(trimetyylisilyyli)-trifluoroasetamidi, 80 °C 1 h	Helium 1,5 ml/min	Silikakapillaari (30 m x 0,32 mm, filmi 0,25 μm)	Suora/jakoinjektio ja suuren tilavuuden injektio, 280 °C	40 °C (pito 1 min), 50 °C/min 177 °C:een, pito 1 min, 5 °C/min 250 °C:een, 10 °C/min 320 °C:een	TOF	EI, 250 °C, 70 eV	SCAN, m/z 50-700	34	
SPE, hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (TBME),	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ -DTE (1:4:2, v:w:w), 65 °C 30 min	Vety	Kapillaarikolonne Ultra 1 (25 m x 0,2 mm, filmi 0,11 μm)	Jakoinjektio tilavuus 2 μl	180 °C, 2 °C/min 240 °C:een, 15 °C/min 320 °C:een, pito 2 min	Kvadrupoli	Kvadrupoli EI, 280 °C	SIM (10 ms)	35	
SPE (ODS), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (DEE)	Asetylointi: pyridiini-etikkahappoanhydridi (1:1, v:v), 60 °C 1 h	Helium 2 ml/min	Kapillaarikolonne SPB-50 (30 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μm)	Suora, 280 °C, tilavuus 1 μl	150 °C (pito 1 min), 20 °C/min 260 °C:een, 1,5 °C/min 280 °C:een, 2 °C/min 290 °C:een, pito 4,5 min, 5 °C/min 300 °C:een, pito 4 min	Kvadrupoli	EI, Kvadrupoli 70 eV	SCAN, m/z 50-700	36	

a) ei ilmoitettu

Kuten taulukosta 5 nähdään, endogeenisten steroidien GC-MS-analytiikassa käytetään lähes aina kvadrupolianalysointia, mutta TOF:n hyödyntämistä analytiikassa on myös tutkittu. Analysoitavien yhdisteiden laaja esikäsittely on välttämätöntä ja SPE ja LLE ovat käytetyimpiä menetelmiä yhdisteiden puhdistamiseen taustastaan. Steroidien hydrolysointi ja derivatisointi on myös välttämätöntä ennen yhdisteiden analyysiä. Yhdisteet derivatisoidaan useimmiten TMS-johdannaisikseen, mutta myös asetylointia on tutkittu. Ei on käytännössä ainoa hyödynnetty ionisaatiotekniikka ja yhdisteet analysoidaan useimmiten käyttäen SIM:a.

Steroidianalytiikassa matriisina oleva virtsa sisältää paljon erilaisia endogeenisiä yhdisteitä joista moni esikäsittelystä huolimatta päätyy mitattavaan näytteeseen. Vaikka rutiinikäytössä edelleen oleva (kvadrupoli)massaspektrometrinen menetelmä on herkkä ja selektiivinen, saattaa endogeeninen tausta häiritä tiettyjen steroidin mittausta ja vaikeuttaa tulkintojen tekoa. Esikäsittely on myös kallista ja aikaavievää. Lisäksi steroidisulfaateille ei ole myöskään onnistuttu kehittämään tarpeeksi luotettavaa analysointimenetelmää tätä tekniikkaa hyödyntäen.¹²

5.1.2 Kaasukromatografia-korkean resoluution massaspektrometria

Korkean resoluution massaspektrometriaa (GC-HRMS) on tutkittu steroidianalytiikassa taustan vähentämiseksi ja herkkyuden parantamiseksi. Tekniikka osoittautui toimivaksi retrospektiiviseen dopinganalytiikkaan, eli anabolisten steroidien ja niiden metaboliittien toteamiseen virtsasta pitkään niiden käytön lopettamisen jälkeen.^{37,38}

Nykyaikaiset steroidien GC-HRMS-analytiikassa käytettävät magneettisektorianalysointilaitteet ovat kaksoisfokusoivia; ennen magneettisektoria ionit erotetaan sähkösektorilla niiden kineettisten energioiden perusteella. Kaksoisfokusoivan laitteiston magneettisektori on sijoitettu laitteistossa ionilähteen ja sähkösektorin väliin, ja detektori on hyvin erotettu ionilähteestä taustan minimoimiseksi. SIM-analyysiin laitteistoa käytetään pitämällä magneettisektorin kiihdytysenergia vakiona ja vaihtelemalla sähkösektorin jännitettä vakioisessa magneettikentässä.^{37, 27}

Näytteiden esikäsittely on GC-HRMS-analytiikassa laajaa ja suoraa höyrystävää injektiota varten näytteiden puhdistus suuren erotuskyvyn nestekromatografilla (HPLC) on välttämätöntä. Yhdisteet derivatisoidaan MSTFA-TMSI-seoksella TMS-johdannaisiksi ja analysoidaan SIM-menetelmällä.^{37,38}

GC-HRMS:n todettiin tuottavan paremman signaalin ja helpottavan tulosten tulkintaa matalamman taustan ansiosta verrattuna kvadrupolianaalysaattoriin. Vuonna 1993 GC-HRMS:n todettiin mahdollistavan jopa 85 pg/ml toteamisrajan nandrolonin aineenvaihduntatuotteelle. Laajan ja tehokkaan näytteen esikäsittelyn todettiin kuitenkin olevan välttämätöntä, jotta menetelmä olisi varmasti luotettava myös pienillä pitoisuuksilla.³⁷

Yhdistettynä immunoaffiniteetikromatografiaan tai nestekromatografiseen fraktiointiin ja käyttämällä suoraa höyrystävää injektiota menetelmällä saatiin myös merkittäviä tuloksia: 116 positiivisesta dopingtapauksesta 75 osoitettiin positiivisiksi käyttäen vain GC-HRMS-tekniikkaa.³⁸ Tekniikka kuitenkin vaatii niin laajaa näytteiden esikäsittelyä, joten sen ei katsottu tuoneen merkittäviä parannuksia endogeenisten anabolisten steroidien dopinganalytiikkaan.

Taulukossa 6 on esitelty tyypillisiä esimerkkejä GC-HRMS-tekniikkaa endogeenisten steroidien dopinganalytiikkaan soveltavista menetelmistä. Analysaattorina kaikissa esitellyissä menetelmissä käytettiin kaksoisfokusoivaa magneettisektorianaalysaattoria.

Taulukko 6. Esimerkkejä GC-HRMS-tekniikkaa steroidianalytiikkaan soveltavista menetelmistä: Näytteen esikäsittelyn, kaasukromatografian ja massaspektrometrin parametreja.

Näytteen esikäsittely		Kaasukromatografian parametrit			Massaspektrometrin parametrit		Viite
Esikäsittely	Derivatisointi	Kolonne	Injektio	Uunin lämpötila-ohjelma	Ionisointi	MS-analyysi	Numero
Suorainjektiota varten HPLC tai immunoaffiniteettikromatografia, muuten ei ilmoitettuna	TMS-derivatisointi: MSTFA-TMSI	Ultra 1 (17 m x 0,2 mm, filmi 0,11 µm)	Suora- ja jakoinjektio, tilavuus 2 µl	185 °C, 5 °C/min 310 °C:een	EI, 240 °C, 65 eV	SIM	37
Suorainjektiota varten HPLC tai immunoaffiniteettikromatografia, muuten ei ilmoitettuna	TMS-derivatisointi: MSTFA-TMSI	Ultra 1 (17 m x 0,2 mm, filmi 0,11 µm)	Suora- ja jakoinjektio, tilavuus 2 µl	185 °C, 5 °C/min 310 °C:een	EI, 240 °C, 65 eV	SIM	38
Käytettiin standardeja, ei esikäsittelyä	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ I-etaanoli, 75 °C 30 min	a)	a)	20 °C, 280 °C:een 40 °C/min, pito 10 min	EI	SCAN, m/z 129-171	39

a) ei ilmoitettu

Kuten taulukosta 6 havaitaan, GC-HRMS-tekniikan soveltaminen endogeenisten steroidien analytiikkaan vaatii huomattavaa näytteiden esikäsittelyä. Yhdisteet pitää myös derivatisoida ennen analyysiä TMS-johdannaisikseen.

GC-HRMS-laitteistolla suoritettujen steroidien seulonta-analyysin ei ollakaan todettu korvaavan rutiininomaista kvadrupolimassaspektrometrin analyysia, vaan lähinnä toimivan täydentävänä analyysinä käytettävänä sen rinnalla. Menetelmä on spesifisempi ja herkempi, mutta ongelmia tuottavat menetelmän toimivuus kymmeniä yhdisteitä analysoitaessa samasta näytteestä. GC-HRMS-tekniikkaa onkin sittemmin käytetty tutkimaan TMS-derivatisoitujen steroidien EI-tekniikalla tuotettujen ionien alkuperää ja tarkempaa rakennetta.³⁹

5.1.3 Laaja kaksivaiheinen kaasukromatografia-massaspektrometria

Laajaa kaksivaiheista kaasukromatografiaa yhdistettynä massaspektrometriin on myös tutkittu endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamiseen ihmisvirtsa.⁴⁰⁻⁴² Tekniikassa kaksi kolonnia on yhdistetty. Toinen kolonni on lyhyt ja kiinteältä faasiltaan erilainen kuin ensimmäinen kolonni. Tästä syystä se erottaa mahdollisesti ensimmäisestä kolonnista samaan aikaan eluoituvat yhdisteet toisistaan. Kolonnien välissä on kylmäloukkumodulaattori, jonka kautta eluentti siirretään toiseen kolonniin jaksoittain.^{41,43} Laajan kaksivaiheisen kaasukromatografian erotuskyky on suurempi ja yhdisteiden signaali/kohina-suhde (S/N) yleensä parempi verrattuna tavalliseen yksivaiheiseen kaasukromatografiaan, jossa endogeenisten yhdisteiden aiheuttama tausta vaikeuttaa mittauksia ja tulosten tulkintaa.^{40,41} Siksi menetelmän on odotettu tuovan parannuksia verrattuna rutiininomaisesti käytettävään GC-MS-analyysiin.

Laaja kaksivaiheinen kaasukromatografia-massaspektrometria-tekniikkaan (GCxGC-MS) pohjautuvissa menetelmissä käytetään ionisaatiotekniikkana EI:n lisäksi kemiallista ionisaatiota (CI).⁴⁴ Se on pehmeämpi ionisaatiomenetelmä kuin EI. Molekyylit pilkkoutuvat vähemmän, mikä helpottaa moolimassan määrittämistä. Tekniikassa apuna käytetään reagenssikaasua, joka ionisoidaan elektroni-ionisaation avulla. Muodostuneet kaasuionit reagoivat edelleen muiden reagenssikaasun molekyylin kanssa. Tuloksena on stabiili reagenssi-ioniplasma, joka kemiallisten reaktioiden kautta ionisoi näytemolekyylit.

Näytteiden esikäsittely on hyvin vastaava kuin rutiininomaisessa GC-MS-menetelmässä: virtsanäytteet uutetaan SPE:lla⁴² tai LLE:lla,^{40,43} hydrolysoidaan ja derivatisoidaan TMS-johdannaisikseen^{40,43} tai asetyloidaan.⁴² Yhdisteet ionisoidaan käyttäen EI:ta⁴⁰ tai CI:ta.⁴² GCxGC-MS-analyyseissä massa-analysointina käytetään TOF:a^{40,43} tai kvadrupoli-analysointia.^{41,42} Analyysit suoritetaan käyttäen SCAN-mittausta.

TOF:n soveltuvuutta endogeenisten steroidien osoittamiseen GCxGC-MS-tekniikalla tutkittiin käymällä läpi jokainen WADA:n analyysille asettama kriteeri.⁴⁰ Kaikki WADA:n kriteerit täyttyivät yhtä lukuun ottamatta: kolmea diagnostista ionia (intensiteetiltään yli 5 %) ei löydetty kaikille tutkittaville yhdisteille. Tutkimuksessa kuitenkin todettiin yhdisteen täyden massaspektrometrin vastaavuuden referenssiyhdisteen massaspektrometriin olevan vähintäänkin yhtä laadukas kriteeri yhdisteen tunnistamiselle ja ehdotettiin mahdollisesti uutta kirjastohaun vastaavuuteen perustuvaa kriteeriä. Menetelmän herkkyyttä tulisi kuitenkin parantaa; tekniikka yhdistettynä EI:on ei mahdollista SIM-analyysiä eikä sopivia molekyyli-ioneja kaikille tutkittaville yhdisteille löydetty. Lisäksi laitteistoa yhdistettynä CI-tekniikkaan ei ole kaupallisesti saatavilla.⁴⁰

EI- ja CI-ionisaatiotekniikoita on verrattu yhdistettynä GCxGC-MS-tekniikkaan.^{41,42} Analysaattorina käytettiin kvadrupolianalysaattoria ja reaktiokaasuina käytettiin sekä ammoniakkia että metaania. Tutkituista vaihtoehdoista positiivinen CI (reaktiokaasuna ammoniakki) antoi lupaavimpia tuloksia: asetyloiduille tutkittaville anabolis-androgeenisille steroideille pystyttiin identifioimaan korkeaintensiteetilliset ja rakennespesifiset molekyyli-ionit. Toteamisrajaksi tutkituille steroideille saatiin jopa 0,3 ng/ml virtsassa (epitestosteroniasetaatti) käyttäen SCAN-mittausta, mikä täyttää hyvin WADA:n asettaman kriteerin anabolis-androgeenisten steroidien varmistusanalytiikan pitoisuusrajoille.⁴¹ Tutkitun menetelmän todettiin olevan käytännöllinen rutiniinomaisen GC-MS-menetelmän rinnalle käytettäväksi erityisesti aiemmin tuntemattomien steroidien analytiikassa hyödynnettäväksi.⁴² Näytteiden esikäsittely optimoitiin siten, että GCxGC-MS-analyysi olisi helppo yhdistää suoraan varmistusanalyysiin GC-C-IRMS:lla kattavan endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamiseen soveltuvan menetelmän luomiseksi.⁴¹ Yhdisteiden erotus niin GCxGC-MS- kuin IRMS-analyysissä oli parhaimmillaan kun näytteet derivatisoitiin etikkahappoanhydridi-pyridiini-seoksella asetyylijohtannaisikseen.

Taulukossa 7 on annettu esimerkkejä GCxGC-MS-tekniikkaa endogeenisten steroidien dopinganalytiikkaan soveltavista menetelmistä.

Taulukko 7. Esimerkkejä GCxGC-MS-tekniikkaa steroidianalytiikkaan soveltavista menetelmistä: Näytteen esikäsittelyn, kaasukromatografian ja massaspektrometrin parametreja.

Näytteen esikäsittely		Kaasukromatografian parametrit					Massaspektrometrin parametrit			Viite
Esikäsittely	Derivatisointi	Kantokaasu	Kolonit	Injektio	Uunin lämpötilajelma	Analy-saattori	Ionisointi	MS-analyysi	Numero	
LLE (TBME), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ l-taanitoli, 80° C 30 min	Helium 1,3 ml/min	Kolonnei 1: Pooliton (BPX5 30m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm) Kolonnei 2: Poolinen (BPX50, 1 m x 0,1 mm, filmi 0,2 µm)	Suora, tilavuus 1 µl	120 °C (pito 1 min), 4 °C/min 320 °C:een, pito 5 min	TOF	EI, 70 eV	SCAN	40	
SPE ja LLE (TBME), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>)	Asetylointi: pyridiini-etikkahappoanhydridi (1:1, v:v), 60 °C 1 h	Helium 1,3 ml/min	Kolonnei 1: 100% dimetyylipolysiloksaani (ZB-1ms, 30 m x 0,25mm filmi 1,0 µm) Kolonnei 2: 50% difenyyl: 50% dimetyyli polysilfenyyleeni-siloksaani (BPX50, 1,5m x 0,1 mm, filmi 0,1 m)	Suora/jakoinjektio, 300 °C	70 °C (pito 1 min), 40 °C/min 300 °C:seen, pito 35 min, 40 °C/min 340 °C:een, pito 5 min	Kvadrupoli	EI, 290 °C, 70 eV, ja positiivinen CI (ammoniaakki), 250 °C ja positiivinen CI (metaani) 250 °C	SCAN, massa-alue EI: 50-390 u, positiivinen CI (metaani): 70-420 u, positiivinen CI (ammoniaakki): 200-440 u	41	
SPE ja LLE, entsyymihydrolyysi	Asetylointi	Helium 1,3 ml/min	Kolonnei 1: 100% dimetyylipolysiloksaani (ZB-1ms, 30m x 0,25 mm, filmi 1,0 µm) Kolonnei 2: 50% fenyyli polysilfenyyleeni-siloksaani (BPX50, 1,5m x 0,1 mm, filmi 0,1 µm)	Suora/jakoinjektio, 300 °C	70 °C (pito 1 min), 40 °C/min 300 °C:seen, pito 35 min, 40 °C/min 340 °C:een, pito 5 min	Kvadrupoli	EI, 290 °C, 70 eV, ja positiivinen CI (ammoniaakki), 250 °C ja positiivinen CI (metaani) 250 °C	SCAN, massa-alue EI: 50-390 u, positiivinen CI (metaani): 70-420 u, positiivinen CI (ammoniaakki): 200-440 u	42	
LLE (TBME)	TMS-derivatisointi: pyridiini-N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluorasetamidi, 80 °C 30 min	Helium 1,5 ml/min	Kolonnei 1: Pooliton (BPX5 30 m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm) Kolonnei 2: Poolinen (BPX50 30 m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm)	Suora, 300 °C	Kolonnei 1: 240 °C (pito 1 min), 2 °C/min 260 °C:een, pito 10 min Kolonnei 2: 80 °C (pito 1min), 40 °C/min 240 °C:een, 2 °C/min 260 °C:een, 6 °C/min 330 °C:een, pito 5 min	TOF	230 °C	SCAN, massa-alue 45-750 u	43	

Taulukosta 7 voidaan havaita, että virtsanäytteiden analysoimiseen GCxGC-MS-tekniikalla vaaditaan laajaa näytteen esikäsitelyä (SPE tai LLE) ja yhdisteiden derivatisointia. Analysaattorina käytetään TOF:a tai kvadrupolianalysaattoria ja mittaukset suoritetaan käyttäen SCAN:ä.

GCxGC-MS parantaa yhdisteiden erottumista monimutkaisissa matriiseissa ja koko massa-alueen mittaus mahdollistaa luotettavan tunnistuksen lisäksi myös aiemmin tuntemattomien yhdisteiden toteamisen näytteestä. Menetelmä osoittautui hyväksi menetelmäksi käytettävänä rutiininomaisen GC-MS-menetelmän rinnalla erityisesti aiemmin tuntemattomien yhdisteiden löytämiseen ja identifiointiin.

5.1.4 Kaasukromatografia-tandem-massaspektrometria

Kaasukromatografia-tandem-massaspektrometriaa (GC-MS-MS) on tutkittu käytettäväksi steroidianalytiikassa vähentämään suuresta taustasta johtuvia ongelmia ja laskemaan yhdisteiden toteamisrajoja. Tandem-massaspektrometriassa tutkittavalle näytteelle tehdään kaksi (tai useampia) massa-analyysiä, joilla voidaan mitata koko tutkittava massa-alue. Mittausten välissä tietyt valitut ionit (prekursori-ionit) tai kaikki ionit voidaan käsitellä, kuten esimerkiksi törmäyttää ne inertin kaasun kanssa. Tällöin ne hajoavat pienemmiksi fragmenteiksi (törmäysindusoitu hajoaminen, CID) eli tuoteioneiksi, joita voidaan tarkkailla toisen massa-analyysin avulla. MS-MS-analyysijä voidaan suorittaa esimerkiksi liittämällä kvadrupolianalysaattoreita peräkkäin tai ioniloukun avulla.

GC-MS-MS ioniloukku-tekniikkaa on tutkittu menestyksekkäästi käytettäväksi steroidien seulonnassa ja varmistusanalyysissä.^{44, 45} Ioniloukku on laite, jossa kaasumuodossa olevia ioneja voidaan muodostaa ja säilyttää sähköisten ja magneettisten kenttien avulla. Kvadrupoli-ioniloukku-analysaattorissa (QIT) ionit erottuvat kvadrupolikentän avulla. Ionit säilytetään loukussa vaihtelemalla sauvojen potentiaaleja ja ne voidaan hallitusti päästää detektorille m/z -suhteensa perusteella. Prekursori-ionit valitaan siten, että menetelmä olisi mahdollisimman selektiivinen ja herkkä: ionien tulee olla intensiivisiä, m/z -suhteen tulee olla suuri ja ioni ei saa esiintyä taustassa.⁴⁴

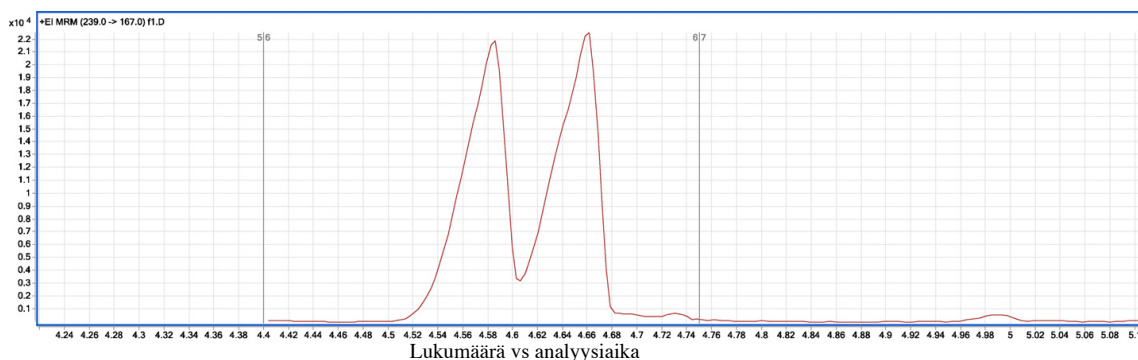
QIT-tekniikka on osoittautunut tehokkaaksi menetelmäksi pienien pitoisuuksien yhdisteiden tutkimiseen hankalista matriiseista kuten anabolisten steroidien osoittamiseen virtsasta.⁴⁴ Näytteet esikäsitellään kuten rutiininomaisessa GC-MS-analyysissä käyttäen SPE:a ja LLE:a ja TMS-derivatisointia. Valitut prekursori-ionit CID-fragmentoidaan

käyttäen törmäyskaasuna heliumia ja muodostuneiden tuoteionien koko massa-alue mitataan käyttäen monireaktiomonitorointi-analyysiä (MRM). MRM-analyysissä seurataan tutkittavalle ionille ominaisia useita tuoteioneja. Rakenteellisesti samankaltaiset steroidit fragmentoituvat samoissa CID-olosuhteissa, joten useita steroidimetaboliitteja pystytään detektoimaan samoissa olosuhteissa.^{44,45}

Kehitetyllä menetelmällä päästiin 0,5-4 ng/ml määrittämissä rajoihin,⁴⁴ norandrosteronin aineenvaihduntatuotteen toteamisrajaksi saatiin jopa 5 pg/ml.⁴⁵ Rakenteellisesti erilaisten tuoteionien ja kaikille yhdisteille sopivan kolonnin löytäminen on kuitenkin vaikeaa: erilaisten kolonnien testauskaan ei tuonut tähän ratkaisua.⁴⁵

GC-MS-MS-tekniikkaa kolmoiskvadrupolianaalysaattoria käyttäen on hiljattain tutkittu nopean ja kattavan dopingyhdisteiden seulontamenetelmän kehittämisessä.^{46,47} Kolmoiskvadrupolilaitteissa kolme kvadrupolia on liitetty peräkkäin. Tyypillisessä MS-MS-analyysissä yhdisteiden ionisoinnin jälkeen haluttu ioni (prekursori-ioni) valitaan ensimmäisen analyysointivaiheen avulla. Toinen kvadrupoli toimii törmäyskammiona jossa ionit fragmentoidaan CID-tekniikalla ja tämän jälkeen fokusoidaan. Kolmas kvadrupoli toimii massa-analyysointivaiheena muodostuneille tuoteioneille.

Menetelmä osoittautui sopivaksi muun muassa steroidiprofiilin kvantitatiiviseen mittaukseen ja useiden dopingyhdisteiden tunnistamiseen. Tutkittavat näytteet käsiteltiin kuten rutiininomaisessa GC-MS-menetelmässä käyttämällä LLE:a ja derivatisoimalla yhdisteet TMS-johdannaisiksi.^{46,47} Tarvittava näytemäärä pystyttiin laskemaan yhteen ml:aan ja analyysiaika alle kahdeksaan minuuttiin optimoimalla muun muassa käytetty injektiotapa lämpötilaohjelmoitu höyrystäminen (PTV).⁴⁶ Näinkin lyhyellä analyysiajalla saavutettiin kuitenkin vaadittava erotustehokkuus korkeillakin pitoisuusalueilla (Kuva 9): TMS-derivatisoidut androsteroni ja etiokolanoloni erottuivat toisistaan. Nopea analyysi ja vähäinen näytemäärä ovat tärkeitä seikkoja dopinganalytiikassa, missä näytemäärä on rajattu ja vastausajat tiukkoja.



Kuva 9. Siirtymän (m/z) 239 \rightarrow 167 ionikromatogrammi androsteroni-bis-TMS:lle ja etiokolanoloni-bis-TMS:lle pitoisuudella 4,8 $\mu\text{g/ml}$. Näyte esikäsitelty LLE:lla (DEE), hydrolysoitu (*Escherichia coli*) ja derivatisoitu (MSTFA-etaanitioli- NH_4I , 80 °C 60 min). GC-MS-MS-analyysi kolmoiskvadrupolianaalysaattoria käyttäen: PTV-injektio (alkulämpötila 100 °C, pito 0,15 min, lämpötilan nosto 12 °C/s 280 °C:een), injektio tilavuus 6 μl . Kolonni HP Ultra-1 (12,5 m x 0,2 mm, filmi 0,11 μm). Lämpötilaohjelma: alkulämpötila 100 °C, pito 0,2 min, lämpötilan nosto 90 °C/min 185 °C:een, 9 °C/min 230 °C:een ja 90 °C/min loppulämpötilaan 310 °C, pito 0,95 min. CID-fragmentaatio (törmäyskaasu tyyppi, törmäysenergia 5-35 eV). Kuva muokattu luvalla (Elsevier) lähteestä 46.

Analyysi suoritetaan käyttäen valittujen reaktioiden seuranta (SRM). SRM-analyysissä ensimmäisen massa-analyysin avulla valitaan tietty ioni, jonka tuoteioneista vain tietty päästetään detektorille toisessa massa-analyysissä. Näin saavutetaan varsin selektiivinen tunnistus. Menetelmässä seurattiin vähintään kahta siirtymää tutkittua yhdistettä kohden. Kehitetty menetelmä osoittautui herkäksi ja selektiiviseksi ja sillä päästiin jopa 1,0 ng/ml toteamisrajoihin (19-norandrosteronille). Menetelmä on myös hyvin kattava, ja vain muutamalle tutkitulle yhdisteelle (mm. stanotsoli) kehitetty menetelmä ei soveltunut.⁴⁶

Taulukossa 8 on esitelty tyypillisiä esimerkkejä GC-MS-MS-tekniikkaa endogeenisten steroidien dopinganalytiikassa hyödyntävistä menetelmistä.

Taulukko 8. Esimerkkejä GC-MS-MS-tekniikkaa steroidianalytiikkaan soveltavista menetelmistä: Näytteen esikäsittelyn, kaasukromatografian ja MS-MS-laitteiston parametreja.

Näytteen esikäsittely		Kaasukromatografian parametrit					MS-MS-parametrit		Viite
Esikäsittely	Derivatisointi	Kantokaasu	Koloni	Injektio	Uunilämpötilajohjelma	Analysaattori	MS-MS analyysi	Nume-ro	
SPE, hydrolyysi β -glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ -DTE (1000:2:4, v:w:w), 60 °C 30 min	Helium 1 ml/min	Metyylisilikoni (HP Ultra-1 25 m x 0,2 mm, filmi 0,11 μ m)	Suora (1 min), 280 °C, tilavuus 2 μ l	120 °C (pito 1,6 s), 50 °C/min 200 °C:een, 2 °C/min 245 °C:een, 25 °C/min 300 °C:een, pito 5 min	QIT	CID-fragmentointi (helium), MRM-analyysi, massa-alue 130-600 u	44	
SPE ja LLE (TBME), hydrolyysi β -glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>)	TMS-derivatisointi: MSTFA-propaniitoli-NH ₄ I (1000:3:2), 60 °C 15 min	Helium 1 ml/min	Polsilyfeneeni-polydimetyylisiloksaani (30 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μ m): 5% fenyyli (DB-5ms), 12% fenyyli (XLB) tai 3% fenyyli (BPX35). Polsilyfeneeni-polydimetyylisiloksaani 5% fenyyli (BPX5 30 m x 0,22 mm, filmi 0,25 mm) Polydimetyylisiloksaani (DB-1 30 m x 0,25 mm, filmi 0,1 μ m)	Suora (0,7 min)	170 °C, 20 °C/min 260 °C:een, 2,7 °C/min 305 °C:een, 20 °C/min 320 °C:een	QIT	CID-fragmentointi (helium) resonanssi- ja non-resonanssi-muodossa, MRM-analyysi	45	
Hydrolyysi β -glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (DEE)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ -etaanitoli, 80 °C 1 h	Vety 1 ml/min	HP Ultra-1 (12,5 m x 0,2 mm, filmi 0,11 μ m)	PTV-injektio: 100 °C (pito 0,15 min), 12 °C/s 280 °C:een, tilavuus 5 μ l	100 °C (pito 0,2 min), 90 °C/min 185 °C:een, 9 °C/min 230 °C:een, 90 °C/min 310 °C:een, pito 0,95 min	Kolmois-kvadrupoli	CID-fragmentointi (typpi, törmäys-energia 5-35 eV), SRM-analyysi	46	
Hydrolyysi fosfaattipuskuri ja β -glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (DEE)	TMS-derivatisointi: asetonitrili-MSTFA, 80 °C 30 min ja MSTFA-NH ₄ -etaanitoli, 80 °C 30 min	Helium 0,8 ml/min	HP Ultra-1 (12,5 m x 0,2 mm, filmi 0,11 μ m)	PTV-injektio: 25 °C (pito 0,2 min), 12 °C/min 310 °C:een, tilavuus 1,3 μ l	80 °C (pito 0,2 min), 70 °C/min 183 °C:een, 5,1 °C/min 220 °C:een, 50 °C/min 310 °C:een, pito 1,8 min	Kolmois-kvadrupoli	CID-fragmentointi (typpi), SRM-analyysi	47	
Hydrolyysi β -glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (TBME)	TMS-derivatisointi: MSTFA-NH ₄ -etaanitoli (100:1:2, v:w:v), 60 °C 30 min	Helium 1 ml/min	HP Ultra-1 (25 m x 0,2 mm, filmi 0,11 μ m)	Jakoinjektio 1/10, tilavuus 2 μ l	185 °C, 30 °C/min 230 °C:een, 15 °C/min 290 °C:een, 70 °C/min 310 °C:een, pito 1,5 min	Kolmois-kvadrupoli	CID-fragmentointi (typpi), SRM-analyysi	48	

Kuten taulukosta 8 voidaan havaita, GC-MS-MS-analyysiä varten näytteet esikäsitellään SPE- tai LLE-tekniikalla, hydrolysoidaan ja derivatisoidaan TMS-johdannaisikseen. Yhdisteet analysoidaan käyttäen QIT:a tai kolmoiskvadrupolianalysaattoria ja MRM- tai SRM-analyysiä.

GC-MS-MS osoittautui selektiiviseksi ja herkäksi tekniikaksi käytettäväksi anabolis-androgeenisten steroidien dopingkäytön seulonta-analyseissa. Haasteena kuitenkin on löytää ionisaatio- ja CID-parametrit, jotka sopisivat kaikille tutkittaville yhdisteille.⁴⁶ Menetelmän herkkyys saattaa myös kärsiä EI-tekniikalla tuotettujen pienien tuoteionien hajottamisesta toiseen kertaan: sopivien ionien löytäminen on haasteellista.

GC-MS(-MS)-tekniikkaa on perinteisesti suosittu steroidianalytiikassa, sillä virtsamatriisi on monimutkainen ja analysoitavien steroidimetaboliittien määrät ovat erittäin pieniä. Tekniikka sopii kuitenkin huonosti lämpöherkille ja derivatisoitavaksi huonosti sopiville yhdisteille kuten trenbolonille.²⁵ Lisäksi GC-MS(-MS)-analyysiä varten tarvitaan huomattavaa näytteen esikäsitelyä kuten analyyttien hydrolysointia ja derivatisointia. Tämä on paitsi aikaavievää, myös mahdollisesti ongelmallista jos reaktiot ovat epätäydellisiä. GC-MS(-MS)-analyysien rinnalle käytettäväksi soveltuvien uusien menetelmien kehittämiseen onkin ollut suuri tarve.

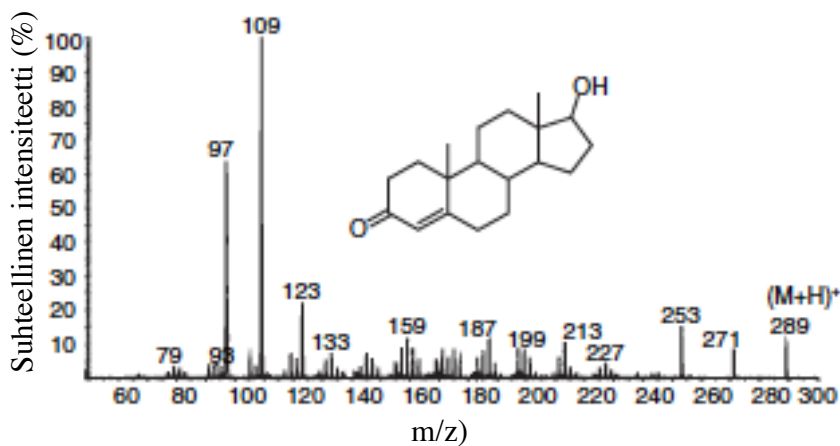
5.2 Nestekromatografi-massaspektrometriset menetelmät

Nestekromatografian, suuren erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) tai erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografian yhdistäminen massaspektrometriin on mahdollistanut uuden lähestymistavan steroidien ja niiden vaiheen I ja II metaboliittien analysointiin virtsanäytteistä. Dopinganalytiikalle nestekromatografia-massaspektrometria tarjoaa useita etuja verrattuna perinteiseen GC-MS:iaan: nopeampi näytteiden esikäsitely (ei derivatisointia tai konjugoituneiden steroidien hydrolysointia), paremmat toteamisrajat ja lämpöherkkien yhdisteiden analysointi on mahdollista.^{25,49-51}

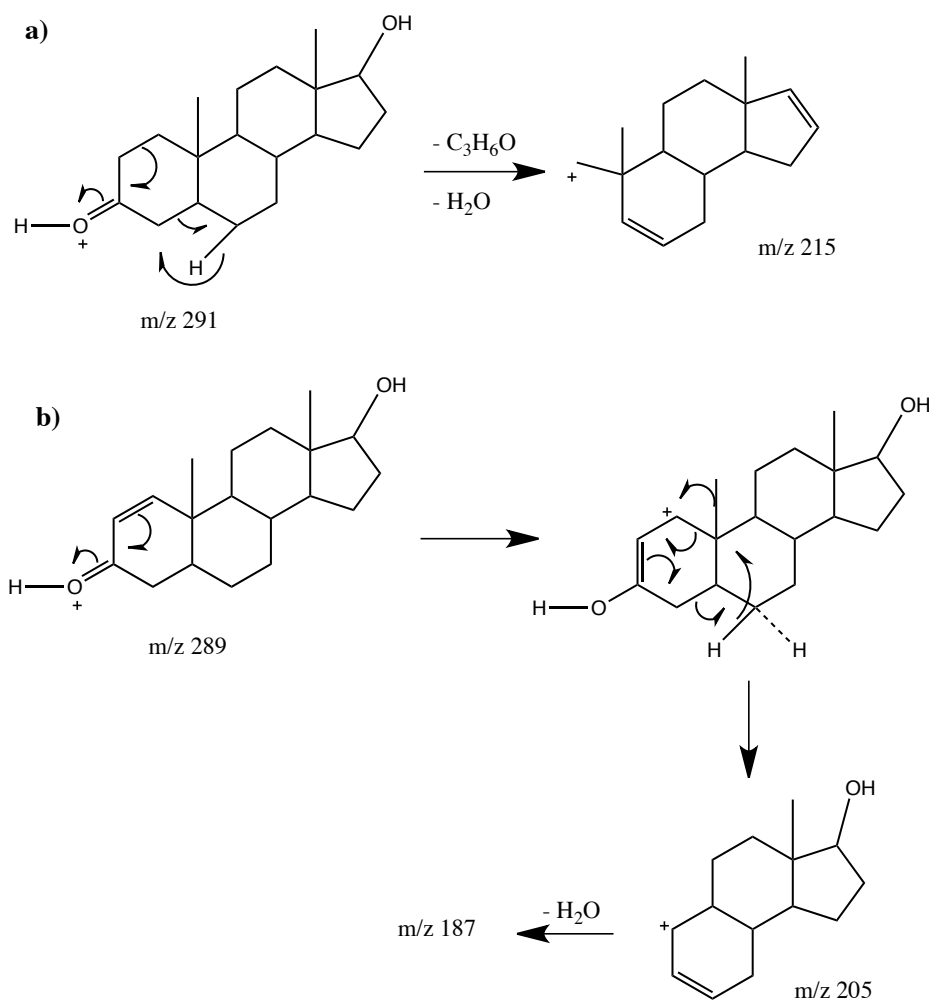
Nestekromatografi yhdistetään MS:iin käyttäen pehmeitä, ilmanpaineessa tapahtuvia ionisaatiotekniikoita kuten esimerkiksi sähkösumusionisaatiota (ESI) tai kemiallista ionisaatiota normaali-ilmanpaineessa (APCI).

ESI on pehmeä ionisaatiomenetelmä, jossa nestemäisestä metallikapillaarin läpi virtaavasta näytteestä muodostetaan nestesumu sähkökentän avulla. Liuotin haihtuu muodostuneista

varauksellisista pisaroista, kunnes pelkkä analytti siirretään massa-analysointiin. Sähkökentän jännitteitä muuttamalla voidaan ioneista tehdä positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita. Ionisaation vaihtaminen on helppoa jopa saman analyysin aikana; yhdisteelle optimaalisen ionisaation löytäminen on helppoa.²⁷ Kohdeyhdisteiden hajoamisen (dissosiaation) tunteminen käyttäen positiivista tai negatiivista ionisaatiota ja CID:ta on välttämätöntä luotettavan analyysituloksen saamiseksi.²⁵ Kuvassa 10 on esitetty protonoituneen testosteronin ESI-CID-massaspektrometri, josta on nähtävillä yhdisteelle tyypilliset tuoteionit. Kuvassa 11 on esitetty steroidien positiivisen ESI:n fragmentaatioreitti.



Kuva 10. Protonoituneen (M+H)⁺ testosteronin tuoteioni-ESI-massaspekttri. Yhdisteelle ominaiset tuoteionit ovat m/z 289 (M+H)⁺, 271 (M+H)⁺-18, 253, 187, 123, 109 ja 97. Kuva muokattu kuvalla (John Wiley and Sons) lähteestä 25.



Kuva 11. Steroidien positiivisen ESI:n fragmentaatioreitti a) asetonin ja veden lohkeaminen tyydyttyneestä 3-ketosteroidista ja b) karakteristisen tuote-ionin m/z 187 muodostuminen.

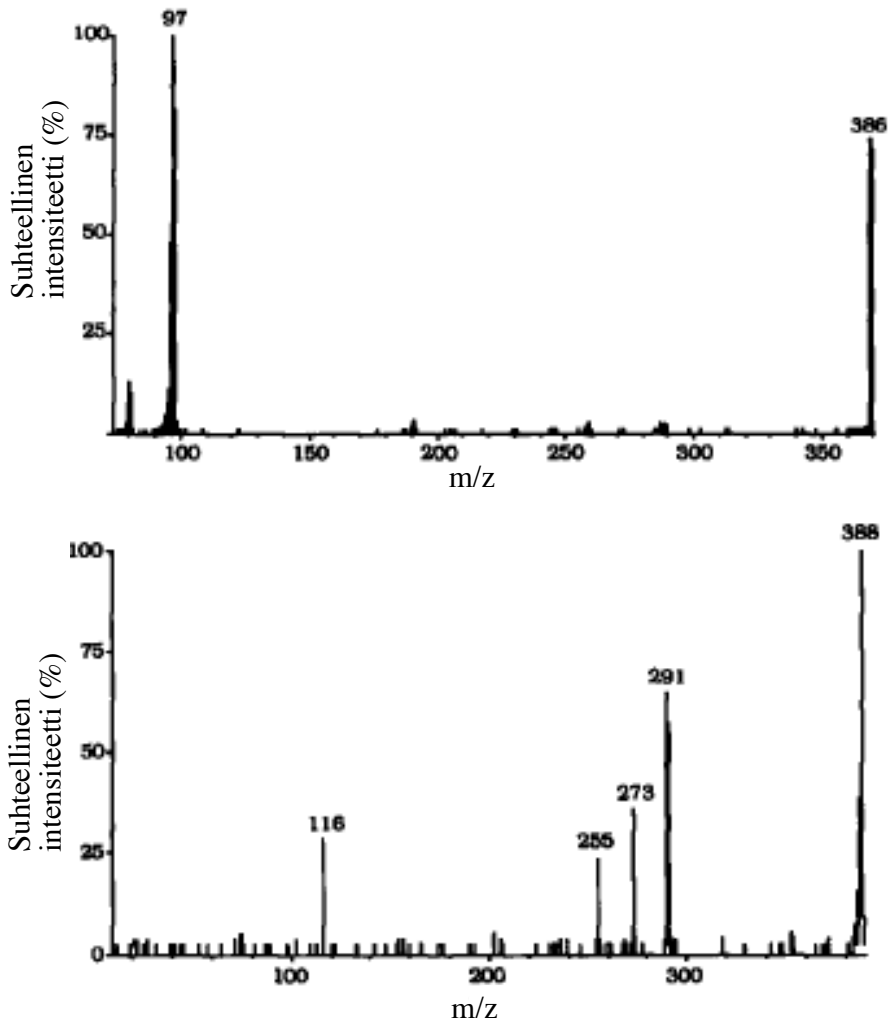
APCI-tekniikassa nestefaasissa olevat analyytit erotetaan liuottimesta ionisaatiolähteen höyrystimen avulla. Ionisointi tehdään korkeajännitteisen koronaneulan avulla, joka ensin virittää liuotinmolekyylit, jotka kemiallisesti ionisoivat itse analyytit.

5.2.1 Nestekromatografia-tandem-massaspektrometria

GC-MS-analyysiä varten steroidimetaboliittien glukuronidi- tai sulfaattikonjugaatti pitää irroittaa esimerkiksi entsyymihydrolyysillä ja yhdisteet pitää derivatisoida niiden kromatografisen käyttäytymisen parantamiseksi. Tämä kuluttaa aikaa ja reagensseja näytteen esikäsittelyvaiheessa ja mahdolliset epätäydelliset reaktiot hankaloittavat analyysin tulkintaa. Endogeeniset steroidit voidaan analysoida suoraan käyttäen nestekromatografi-tandem-massaspektrometria-tekniikkaa (LC-MS-MS).⁴⁹⁻⁵¹ Tämä mm.

säästää aikaa esikäsittelyvaiheessa ja antaa mahdollisesti uutta tietoa kohdehenkilön metaboliasta. Yhdisteiden suora analysointi antaa myös enemmän tietoa niiden faasi II-metaboliasta steroidiprofiilia varten.

Käytetty ionisaatiotekniikka vaikuttaa steroidisulfaattien ja -glukuronidien massaspektrometriseen käyttäytymiseen. Ionisaatiotekniikan vaikutusta steroidistandardien analysointiin tutkittiin jo vuonna 1996 käyttäen käänteisfaasi HPLC-MS-tekniikkaa yhdistettynä ESI:en ja kolmoiskvadrupolianaalysointilaiteeseen.⁵¹ APCI:ta ja ESI:ta on myös verrattu keskenään analysoimalla kahdeksan steroidiglukuronidia LC-MS-MS-laitteistolla, jossa oli kolmoiskvadrupolianaalysointilaite.⁴⁹ Käyttäen ESI:ta yhdisteet fragmentoituvat vähemmän ja häiritsevä tausta oli myös intensiteetiltään pienempää. Positiivinen ESI osoittautui optimaaliseksi ionisointitekniikaksi. Tuotettujen spektrien avulla yhdisteiden rakenteet pystyttiin varmistamaan, sillä yhdisteet tuottivat tarpeeksi monta spesifistä ionia.^{49,51} Negatiivisen ESI:n todettiin soveltuvan mahdollisesti nopeaan seulontaan.⁴⁹ Androsteronisulfaatin negatiivisen ESI:n ja positiivisen ESI:n tuottamat tandemmassaspektrit on esitetty kuvassa 12. Kuvasta voidaan havaita, että negatiivinen ionisaation tuottama spektri sisältää vähemmän rakenteellista tietoa yhdisteestä kuin positiivisen ionisaation tuottama spektri.



Kuva 12. Androsteronisulfaatin negatiivisen ESI:n (ylempi) ja positiivisen ESI:n (alempi) tuottamat kolmoiskvadrupoli LC-MS-MS-massaspektrit. Tutkimuksessa käytettiin steroidistandardeja. Kolonnina käytettiin pakattua silikakapillaarikolonnia (Hypersil C-18 BDS 250 mm x 300 μ m, faasi 3 μ m). Gradienttieluutio, A: 0,11 % (v/v) etikkahappo-7,5 mmol ammoniumasetaatti vedessä, B: 0,11 % (v/v) metanoli tai asetonitriili-7,5 mmol ammoniumasetaatti etikkahapossa. Ionisointi ESI (4 kV), CID-fragmentointi (argon, 30 eV). Muokattu luvalla (Elsevier) viitteestä 51.

Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografian yhdistämistä kvadrupoli-lentoaika-analysointiin (QTOF) on hiljattain tutkittu steroidiglukuronidien ja -sulfaattien kvantitointiin ihmisvirtsaista.⁵⁰ Virtsanäytteet puhdistettiin käyttäen SPE:a ja liuotettiin lopuksi asetonitriili-veteen. Gradientti optimoitiin siten, että tutkitut steroidisulfaatit ja -glukuronidit onnistuttiin erottamaan toisistaan tarpeeksi selektiivisesti mutta pitäen analyysiajan kuitenkin kohtuullisena (36 min). Tämä mahdollisti jopa dehydroepiandrosteroniglukuronidin isomeerien erottumisen toisistaan. Menetelmä ei kuitenkaan osoittautunut tarpeeksi herkäksi steroidiglukuronidien analyysiin ja steroidisulfaattien kohdalla ongelmaksi koitui spesifien tuoteionien vähäinen määrä.

QTOF-tekniikan avulla saadaan samanaikaisesti prekursori-ionin ja fragmentti-ionin tarkka massa matala- ja korkeaenergisillä törmäyksillä. Tällöin yhden analyysin perusteella saadaan maksimaalisesti tietoa valitsematta prekursori-ioniä etukäteen. Menetelmän herkkyys saatiin maksimoitua käyttämällä ionisointitekniikkana negatiivista ESI:ta.⁵⁰ Menetelmän selektiivisyys testattiin analysoimalla näytteitä myös GC-MS:lla. QTOF-MS-laitteistolla tehty analyysi osoittautui selektiivisemmäksi; fragmentaatiokuvaoiden avulla pystyttiin löytämään lisää yhdisteille spesifisiä ioneja. Kehitettyä analyysimenetelmää käytettiin myös steroidimetaboliittien kvantitoimiseen oraalisen testosteronin annon jälkeen. Menetelmällä päästiin vastaaviin tuloksiin kuin analysoimalla näytteet GC-MS:lla ja LC-MS-MS:lla. QTOF-analysointilaitteilla saadut tulokset vaikuttivat lupaavilta: spektri koko mitatulta massa-alueelta tuo paljon uutta tietoa, jota voidaan hyödyntää myös jälkikäteen esimerkiksi vielä tuntemattomien yhdisteiden tunnistamisessa ja toteamisessa.⁵⁰

Taulukossa 9 esitellään valittuja esimerkkejä LC-MS-MS-tekniikkaa endogeenisten steroidien dopinganalytiikassa soveltavista menetelmistä.

Taulukko 9. Esimerkkejä LC-MS-MS-teknikkaa steroidianalytiikkaan hyödyntävistä menetelmistä: Näytteen esikäsittelyn, nestekromatografian ja MS-MS-laitteiston parametreja.

Esikäsittely	Nestekromatografian parametrit				MS-MS-parametrit			Viite	
	Liikkuva faasi	Kolonne	Injektio	Gradientti	Analyysiaattori	Ionisointi	MS-MS-analyysi		
Käytettiin standardeja	b)	b)	Suora injektio	b)		Kolmois-kvadrupoli	ESI: 5 kV APCI: 3 uA, 350 °C	CID-fragmentointi (typpi), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ja 60 eV, massa-alue m/z 100-600	49
SPE	300 µl/min, 25 °C	BEH C18 (150 x 2,1 mm, filmi 1,7 µm) Esikolonne: BEH C18 (50 x 2,1 mm, filmi 1,7 µm)	4 °C, Tilavuus 20 µl	A: 0,1% metaanihappo vedessä B: 0,1% metaanihappo asetoni-tilassa. Gradientti A:B 95:5 % → 64:37 % 25 min aikana, 5:95 % 5 min aikana, tasapainotus 8 min.	QTOF			CID-fragmentointi, 5-70 eV, massa-alue m/z 95-1000	50
Käytettiin standardeja	5 µl/min	Hypersil C-18 BDS (150 x 1 mm) tai pakattu siikakapillaari (Hypersil C-18 BDS 250 x 300 µm)	a)	A: 0,11 % (v:v) etikkahappo-vesi, B 0,11 % (v:v) metanoli tai asetoni-tili- 7,5 mmol ammoniumasetaatti etikkahapossa	Kolmois-kvadrupoli	ESI: 4 kV		CID-fragmentointi (argon)	51
LLI (TBME)	300 µl/min	Eclipse Plus C-18 (50 x 2,1 mm, filmi 1,8 µm)	Tilavuus 10 µl	A: 0,1 % metaanihappo ja 1 mM ammoniumformaatti vedessä B: 0,1 % metaanihappo ja 1 mM ammoniumformaatti metanolissa. Gradientti: 0 min 45 % B, 1 min 45 % B, 3 min 50 % B, 10 min 50 % B, 11 min 95 % B, 11,5 min 95 % B, 12 min 45 % B, 15 min 45 % B .	Kolmois-kvadrupoli	Positiivinen ESI: 3 kV, 120 °C		SRM-analyysi, 2 siirtymä-yhdiste	52
SPE, hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLI (TBME) tai ei lainkaan esikäsittelyä	300 µl/min	BEH130 C-18 (100 x 2,1 mm, filmi 1,7 µm)	Tilavuus 10 µl	A: 0,01 % (v:v) metaanihappo ja 1 mM ammoniumformaatti vedessä B: 0,1 % (v:v) metaanihappo ja 1 mM ammoniumformaatti metanolissa. Gradientti 0 min 30 % B, 6 min 30 % B, 15 min 65 % B, 15,5 min 95 % B, 17,5 min 95 % B, 18 min 30 % B, 20 min 30% B.	Kolmois-kvadrupoli	Positiivinen ja negatiivinen ESI: 3 kV, 120 °C		CID-fragmentointi 20, 30 ja 40 eV, massa-alue m/z 250-600, prekursori-ionin skannaus ja SRM	53

a) ei ilmoitettu

b) ei tehty, suora injektio MS:iin

Kuten taulukosta 9 havaitaan, LC-MS-MS-analyysiä varten tutkittavia steroideja ei tarvitse derivatisoida. Myös virtsanäytteiden esikäsittely on useimmiten yksinkertaisempaa kuin GC-MS(-MS)-analyysissä. Analysaattorina käytetään kolmoiskvadrupolianaalysaattoria tai QTOF:a. ESI on käytetyin ionisaatiotekniikka.

Kolmoiskvadrupoli-, TOF- ja QTOF-analysaattoreita yhdistettynä nestekromatografiin on verrattu keskenään vasta eksogeenisten anabolisten steroidien analyysissä. Kolmoiskvadrupolianaalysaattori mahdollisti kaikkien kymmenen analyytin toteamisen WADA:n määrittämällä pienimmällä toteamisrajalla. TOF ja QTOF eivät olleet tarpeeksi herkkiä kaikkien tutkittavien analyyttien toteamiseen tällä tasolla. Lisäksi ongelmaksi muodostui laiteparametrien sovittaminen optimaaliseksi kaikille tutkittaville steroideille samanaikaisesti; jännitteen ja törmäysenergian optimointi oli vaikeaa. Eksogeenisten steroidien analytiikkaan kolmoiskvadrupoli vaikutti sopivammalta analysaattorilta, mutta tutkimuksessa todettiin TOF- ja QTOF-analysaattoreiden olevan lupaavia vielä tuntemattomien yhdisteiden tutkimiseen.⁵⁴

LC-MS-MS vaikuttaa lupaavalta tekniikalta anabolisten steroidien dopinganalytiikassa. Ongelmia kuitenkin on, erityisesti sopivien ionisaatiotekniikoiden- ja parametrien löytämisessä steroideille, joilla on konjugoitumaton keto-ryhmä. Tutkittavien yhdisteiden derivatisointia ennen LC-MS-MS-analyysiä on tutkittu, mutta yhtä ainoaa kaikille analysoitaville steroideille sopivaa derivatisointireagenssia ei löytynyt.⁵⁵ LC-MS-MS-analyysien resoluutio ei myöskään usein yllä GC-MS-analyysien tasolle, ainakaan vielä.⁵⁶

5.3 Isotooppisuhdemassaspektrometriset menetelmät

Endogeenistä alkuperää olevien steroidien dopingkäytön toteaminen on vaativaa, sillä steroidin alkuperä (eksogeeninen tai endogeeninen) on pystyttävä luotettavasti osoittamaan. Epätavallisen virtsan steroidiprofiilin lisäksi tiettyjen steroidien poikkeava ¹³C-pitoisuus on tärkeässä osassa dopingrikkomuksen osoittamisessa.

Vuodesta 1994 lähtien dopinganalytiikassa on hyödynnetty GC-C-IRMS-tekniikkaa. Laitteiston avulla voidaan erottaa synteettisesti tuotetut steroidit endogeenisesti tuotetuista niiden isotooppikoostumuksen perusteella. Laitteisto mittaa steroidien ¹³C/¹²C-suhdetta.⁵⁷

Farmaseuttisissa valmisteissa olevat steroidit syntetisoidaan useimmiten vain vähän ^{13}C -isotooppia sisältävistä soijan steroleista. Kasvien isotooppikoostumuksen erot johtuvat fotosynteesissä tapahtuvassa hiilen isotooppien fraktioinnista. ^{13}C -isotooppi eroaa massaltaan ^{12}C -isotoopista, jonka seurauksena sitä muodostuu vähemmän kasvien fotosynteesissä. Fotosynteesin eri reaktioreitteihin perustuen kasvit voidaan jakaa C_3 - ja C_4 -kasveihin. C_3 -kasveihin kuuluva soija sisältää vähemmän ^{13}C -isotooppia kuin C_4 -kasveihin kuuluva maissi ja muut C_3 -kasvit, kuten Euroopassa ja Aasiassa yleisesti syödyt riisikasvit.⁵⁸ Endogeenisesti tuotettujen steroidien edustaessa isotooppikoostumukseltaan kyseisen henkilön ruokavaliota, joka sisältää soijaa enemmän ^{13}C -isotooppia, voidaan endogeenista ja eksogeenista alkuperää olevat steroidit erottaa.

5.3.1 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi

GC-C-IRMS-laitteistoa käytetään testosteronin ja muiden endogeenisten steroidien dopingkäytön varmistamiseen. Seulonta-analyyseissä tietyt WADA:n asettamat kriteerit, kuten testosteroni/epitestosteroni-suhteen raja arvon neljä, ylittävät näytteet analysoidaan isotooppisuhdemassaspektrometrisesti. Analyysi kertoo orgaanisen yhdisteen isotooppisuhteen ”sormenjäljen”.⁵⁹

Yhdisteiden matalat pitoisuudet näytteessä saattavat vaatia suuria näytemääriä tarpeeksi suureen herkkyyteen pääsemiseksi. Lisäksi analysoitavien steroidien tulee olla hyvin eristetty virtsamatriisista ennen IRMS-analyysiä. Tämä on välttämätöntä, sillä IRMS-analyysin avulla saadaan selville vain näytteen sisältämän hiilen isotooppisuhte, ei tietoa yhdisteen rakenteesta. Tutkittujen yhdisteiden kanssa samanaikaisesti eluoituvat häiriöpiikit jäisivät helposti huomaamatta ja muuttaisivat tuloksia.

Näytteiden esikäsittely suoritetaan hyvin vastaavasti kuin GC-MS-laitteistolla tehtävissä seulonta-analyyseissä. Virtsanäytteet puhdistetaan SPE:lla ja LLE:lla käyttäen liuottimena TBME:ä ja hydrolysoidaan β -glukuronidaasilla.⁵⁹⁻⁶² IRMS-analyysissä näytteiden tulee olla erityisen puhdistettuja taustastaan, joten tämän jälkeen yhdisteet puhdistetaan HPLC-laitteistolla^{59,60,62} ja siirretään GC-C-IRMS-analyysiin.

Tiettyjen yhdisteiden (testosteroni, epitestosteroni, pregnandioli) kromatografisen erottumisen parantamiseksi GC-C-IRMS-analyyseissä on käytetty myös asetylointia yhdisteiden derivatisoinnissa. Ensimmäistä HPLC-puhdistusta käytetään yhdisteiden fraktiointiin. Fraktioinnin avulla yhdisteet saadaan erotettua toisistaan yhden-kolmen

steroidin ryhmiksi. Tämän jälkeen halutut yhdisteet asetyloidaan etikkahappoanhydridi-pyridiini-seoksella ja tämän jälkeen suoritetaan vielä toinen HPLC-fraktiointi.⁶² Kaksidimensionaaliseen kaasukromatografiin yhdistettynä esikäsittely on yksinkertaisempaa: HPLC-fraktiointia ei tarvita lainkaan ja kaikki tutkittavat yhdisteet asetyloidaan.⁶¹

Nykyaikainen GC-C-IRMS-laitteisto koostuu kaasukromatografista, polttouunista ja isotooppisuhdemassaspektrometrilla. Polttouuni koostuu hapetusreaktorista, pelkistysreaktorista ja vedenpoistolaitteistosta. Ennen varsinaista analyysiä laitteiston kunto tarkistetaan mittaamalla taustakaasujen (typpi, vesi, happi, argon ja hiilidioksidi) tasoja mahdollisen vuodon havaitsemiseksi ja varmistamalla tarpeellinen herkkyystaso referenssinä käytettävällä hiilidioksidilla.⁵⁹

Yhdisteet eluoituvat kaasukromatografian kolonnista polttouuniin, jossa kaikki yhdisteen sisältämä hiili poltetaan hapetusreaktorissa kvantitatiivisesti hiilidioksidiksi. Pelkistysreaktori poistaa ylimääräistä happea kaasuvirrasta ja pelkistää mahdollisesti muodostuneet typpioksidit, jotka saattaisivat haitata analyysiä. Lopuksi vesi poistetaan ja hiilidioksidi pääsee avoimen venttiilin läpi massaspektrometriin.⁵⁹

Hiilidioksidin isotooppisuhde mitataan tämän jälkeen isotooppisuhdemassaspektrometrillä, jossa näytteet ionisoidaan ja analysoidaan. Analyysissä mitataan massa/varaus-suhteita (m/z) 44, 45 ja 46, jotka edustavat hiilidioksidin isotooppimuotoja $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ja $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$.⁵⁹ Näiden ionien suhteista toisiinsa, ottaen huomioon hapen isotoopit, voidaan laskea ^{13}C -hiilen runsaus näytteessä.⁶³

Taulukossa 10 on esitelty tyypillisiä GC-C-IRMS-tekniikkaa endogeenisten steroidien dopinganalytiikassa hyödyntäviä menetelmiä.

Taulukko 10. Esimerkkejä GC-C-IRMS-tekniikkaa steroidianalytiikkaan hyödyntävistä menetelmistä: Näytteen esikäsittely ja GC-C-IRMS-parametrejä.

Näytteen esikäsittely		Kaasukromatografian parametrit				Hapetus	Pelkistys	Veden poisto	MS-parametrit	Viite
Esikäsittely	Derivatisointi	Kanto-kaasu	Kolonne	Injektio	Uuinn lämpötilaohjelma				Ionisointi	Numero
HPLC-puhdistus	Ei tehty	Helium 1,8 ml/min	50 % fenyyli-netyylisiloksaamikolonne (H 50+ 30 m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm)	Suora injektio (0,5 min), 280 °C, 3 µl	180 °C 1 min, 12 °C/min 250 °C:een, 3 °C/min 280 °C:een, 15 °C/min 300 °C:een, 4 min	Cu/Ni/Pt keraaminen kapillaari-reaktori 940-1000 °C		Nafion-membraani	EI, 130 eV:n saakka	59
SPE, LLE (TBME), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), HPLC-puhdistus	Ei tehty	Helium 2,2 ml/min	Deaktivoitu kolonne (1 m x 0,53 mm) ja Optima δ3 (20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm)	Kolonne-injektio, 50 °C/min	47 °C (pito 0,5 min), 30 °C/min 250 °C:een, 2 °C/min 270 °C:een, 15 °C/min 295 °C:een, pito 2 min	940 °C	a)	a)	a)	60
SPE, LLE (TBME), hydrolyysi β-glukuronidaasi (<i>Escherichia coli</i>), LLE (TBME)	Asetylointi: pyridiini-etikkahappoanhydridi, 60 °C 1 h		Kaksidimensionaalinen: Kolonne 1:100 % dimetylipolysiloksaani (ZBI-MS 30 m x 0,25 mm, filmi 1,0 µm) Kolonne 2: 50 % fenyyliipolysiloksaani (PBX-50 1,5 m x 0,10 mm, filmi 0,1 µm) Modulaatokolonne: deaktivoitu silikkapillaari (0,3 m x 0,1 mm), 130 °C	PTV-injektio (0,9 min, 5 psi), tilavuus 0,4-1,6 µl		Cu/Mn/Ni 940 °C	a)	Asetoni ja kuivajää -78 °C	a)	61
SPE, LLE (TBME), hydrolyysi β-glukuronidaasi (fraktioituista yhdisteistä <i>Escherichia coli</i>), HPLC-puhdistus ja fraktiointi, asetyloitujen fraktoiden toinen HPLC-puhdistus	Osalle HPLC-asetyloitua	Helium 1,2 ml/min	Deaktivoitu kolonne (1 m x 0,53 mm) ja Optima δ3 (20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm)	Kolonne-injektio, 50 °C/min	47 °C (pito 0,5 min), 30 °C/min 250 °C:een, 2 °C/min 270 °C:een, 15 °C/min 295 °C:een, pito 2 min	940 °C	a)	a)	a)	62
Useita SPE- ja LLE-vaihtoja, HPLC-fraktiointi	Ei tehty	Helium 1,4 ml/min	DB 17-MS (30 m x 0,25 mm, filmi 0,25 µm)	Suora injektio 280 °C, tilavuus 1-3 µl	70 °C (pito 2 min), 30 °C/min 270 °C:een, 2 °C/min 290 °C:een, 30 °C/min 300 °C:een, pito 3 min	940 °C	a)	a)	a)	64

a) ei ilmoitettu

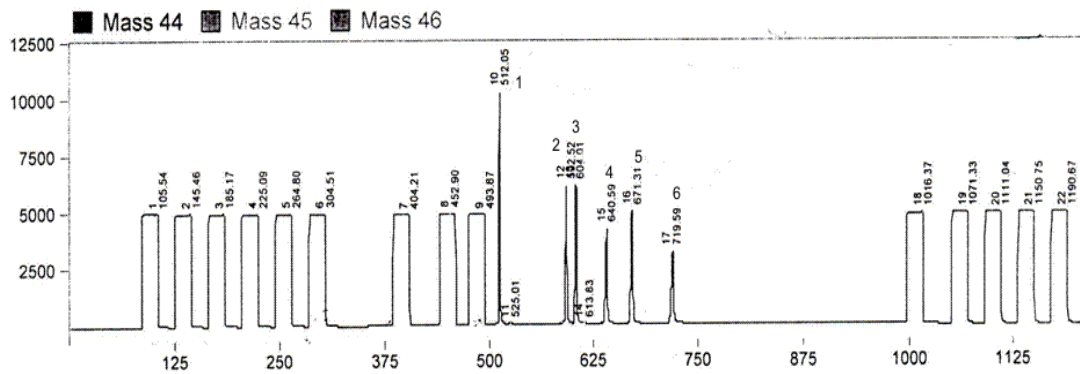
Kuten taulukosta 10 havaitaan, GC-C-IRMS-analyysiä varten virtsanäytteet on puhdistettava huolellisesti. Esikäsittelyyn kuuluu mahdollisesti useita SPE-, LLE- ja HPLC-puhdistusvaiheita. Tutkitut steroidit voidaan analysoida derivatisoimatta tai asetyloituina. Kaksidimensionaalisen kaasukromatografian yhdistämistä IRMS-laitteeseen on myös tutkittu, mutta yleensä käytetään vain yhtä kolonnia.

Analyysin jälkeen lasketaan niin sanotut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot kaavan (2) mukaisesti.⁶⁵ Tulos kertoo näytteen isotooppisuhteen verrattuna kansainväliseksi referenssistandardiksi valittuun fossiiliesiintymään Pee Dee Belemniteen. Referenssistandardina käytetään nykyään Vienna Pee Dee Belemniteä, jonka $\delta^{13}\text{C}$ -arvon on määritelty olevan +1,95 ‰ suhteessa edeltäjänsä.⁵⁹ Yhden promilleyksikön muutos $\delta^{13}\text{C}$ -arvossa vastaa 0,001099 ‰:n muutosta ^{13}C -hiilen runsaudessa.⁶⁵

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{näyte}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{standardi}}} \right) - 1 \right] \times 1000 \quad (2)$$

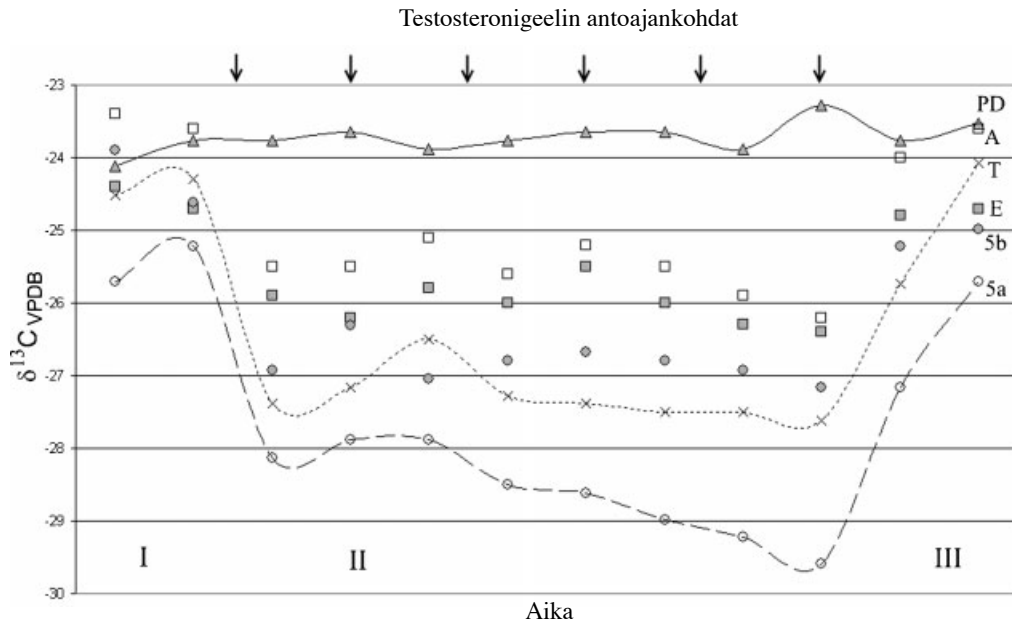
Synteettisen steroidin käyttö vaikuttaa luonnollisesti myös sen metaboliatuotteiden isotooppikoostumukseen.⁵⁷ Steroidin metaboliatuotteiden (kuten testosteronin tapauksessa androsteronin, etiokolanolonin, 5α -androstaaniidiolin ja 5β -androstaaniidiolin) $\delta^{13}\text{C}$ -arvo muuttuu henkilölle ominaisesta arvosta, koska steroidimetaboliitin isotooppikoostumusta luonnollisesta muuttaa synteettisesti valmistetun steroidin isotooppikoostumus.

Kyseiselle henkilölle luonnollinen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo saadaan mittaamalla isotooppikoostumus yhdisteistä, joiden metabolia on irrallinen kyseessä olevan steroidin metaboliareitistä (Kuva 2). Yhdisteitä kutsutaan taustamarkkereiksi tai endogeenisiksi referenssiyhdisteiksi.⁵⁹ Näitä yhdisteitä ovat esimerkiksi pregnandioli, 11-ketoetiokolanoloni ja 11β -OH-androsteroni.²¹ Esimerkki isotooppisuhdemassaspektrometrisen varmistusanalyysin kromatogrammista on esitetty kuvassa 13, jossa on nähtävillä kahden testosteronin metaboliatuotteen ja kolmen endogeenisen referenssiyhdisteen piikit ja pylvään muotoiset referenssikaasupiikit.⁶⁶



Kuva 13. Isotooppisuhdemassaspektrometrillä ajetun standardin kromatogrammi, Piikit eluotumisjärjestyksessä: 1. Sisäinen standardi, 2. Etiokolanoloni, 3. Androsteroni, 4. 11-ketoetiokolanoloni, 5. Pregnandioli ja 6. 11β -OH-androsteroni. Kolonni keskipoolinen polysiloksaanikolonni (Macherey & Nagel, Optima- δ -3, 20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μ m). Esikolonni faasiton silikakapillaari (Agilent Technologies, 2 m x 0,32 mm). Injektiotilavuus 1 μ l (spliless), injektorin lämpötila 300 °C. Uunin alkulämpötila 60 °C (pito 1,5 min), lämpötilan nosto 35 °C/min 265 °C:een asti ja 3 °C/min loppulämpötilaan 300 °C. Kantokaasu helium vakiovirtaudella 2 ml/min. Kuva julkaistu luvalla (Yhtyneet Medix Laboratoriot) lähteestä 66.

Synteettisesti valmistettu testosteroni valmistetaan soijasta, joka kuuluu C_3 -kasveihin. C_3 -kasvien $\delta^{13}C$ on noin -28 ‰ kun taas C_4 -kasvien $\delta^{13}C$ noin -14 ‰.⁵⁸ Endogeenisen testosteronin ja sen metaboliittien $\delta^{13}C$ -arvo vaihtelee yleensä -21,3 ‰:sta -24,4 ‰:een ja esteröityä testosteronia sisältävistä farmaseuttisista valmisteista saadun testosteronin -26,18 ‰:sta -30,04 ‰:een.⁶⁷ Synteettisesti valmistettu steroidi muuttaa mitatun steroidin $\delta^{13}C$ -arvoa negatiiviseen suuntaan, kun taas endogeenisten referenssiyhdisteiden $\delta^{13}C$ -arvot pysyvät muuttumattomina. Erot ovat pieniä mutta mitattavissa. Kuvassa 14 on nähtävissä testosteronigeelin vaikutus nuoren tervän miehen testosteronin, androsteronin, etiokolanolonin, 5α -androstaaniolin, 5β -androstaaniolin ja endogeenisen referenssiyhdiste pregnandiolin $\delta^{13}C$ -arvoihin. Kuvasta on selkeästi havaittavissa, kuinka pregnandiolin $\delta^{13}C$ -arvo pysyy muuttumattomana kun taas testosteronin ja sen metaboliatuotteiden $\delta^{13}C$ -arvot muuttuvat negatiiviseen suuntaan.



Kuva 14. Jatkuvan testosteronigeelin annon vaikutus nuoren terveen miehen tiettyjen steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvoihin. Steroidit: Kolmio pregnandioli (jatkuva viiva), avoin neliö androsteroni, neliö etiokolanoloni, avoin ympyrä 5α -androstaanidioli (katkoviiva), ympyrä 5β -androstaanidioli ja rastit testosteroni (pisteviiva). Kuva muokattu luvalla (John Wiley and Sons) lähteestä 62.

Asetyyliryhmän lisääminen tutkittavaan steroidiin derivatisoinnissa muuttaa sen hiilten isotooppikoostumusta ja näin ollen $\delta^{13}\text{C}$ -arvoa. Jotta derivatisoimattomien, mono- ja diasetyloitujen steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja voidaan verrata keskenään on asetyyliryhmän vaikutus otettava huomioon. Tämä huomioidaan tuloksia laskettaessa. Asetyloinnissa tapahtuu myös todennäköisesti kineettistä isotooppifraktioitumista, joka vaikuttaa yhdisteiden isotooppikoostumukseen. Tämä otetaan huomioon käyttämällä asetyloinnissa omaa sisäistä standardia, jonka $\delta^{13}\text{C}$ -arvoa tarkkaillaan vastaavasti kuin analyyttien.⁶²

Erilaiset kineettiset isotooppifraktioitumiset ovat riski IRMS-analyyseissä, joissa mitataan hyvin pieniä muutoksia analyyttien isotooppisuhteessa. Esimerkiksi jokainen näytteen esikäsittelyvaihe voi aiheuttaa fraktioitumista. Tästä syystä tavanomaiset, esimerkiksi GC-MS-menetelmien validoinnissa käytettävät laatuksiteerit eivät päde IRMS-analytiikkaan. Tärkeintä on saada yhdiste erotettua ilman että isotooppien fraktioitumista tapahtuu.⁶²

Isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi kertoo, ovatko urheilijan virtsan steroidimetaboliittien isotooppisuhdekoostumukset vastaavia endogeenisten

referenssiyhdisteiden kanssa. Kolmen promilleyksikön eroavaisuus tutkittavan yhdisteen ja endogeenisen referenssiyhdisteen $\delta^{13}\text{C}$ -arvossa raportoidaan löydöksenä. Näytteen matala steroidikonsentraatio saattaa johtaa analyysin raportoimiseen epäselvänä tapauksena, ellei tulos ole selkeästi positiivinen eli steroidimetaboliitin $\delta^{13}\text{C}$ -arvo on alle -28 ‰ .²¹ Positiivisen löydöksen tapauksessa isotooppisuhdemassaspektrometrillä analysoidut näytefraktiot ajetaan vielä GC-MS-laitteistolla yhdisteiden identifioimiseksi. GC-MS-laitteistossa käytetään samoja parametreja kuin GC-C-IRMS-laitteistossa ja analyysit suoritetaan käyttäen SCAN-mittausta. Tällöin voidaan aukottomasti identifioida tutkitut steroidit ja osoittaa, että yhdisteet eivät eluoidu päällekkäin, tausta ei muuta tulosta ja täten että tietyn steroidin tai steroidien isotooppisuhde poikkeaa endogeenisten referenssiyhdisteiden isotooppisuhteesta.⁶²

6. TULEVAISUUDEN NÄKYMÄT

Anabolis-androgeenisten steroidien dopingkäytön osoittaminen on vaativa tehtävä. Steroidisulfaattien analysoimisen haasteet, vedyn isotooppien suhteen käyttäminen varmistusanalyyseissä, uusien dopingkäytöstä kertovien biomarkkereiden löytäminen ja kokonaan uuden lähestymistavan ottaminen steroidien dopingtestaukseen ovat varmasti tämän hetken ja tulevaisuuden tärkeimpiä tutkimuskohteita.

Steroidiglukuronidien analysoiminen on dopinganalytiikassa rutiininomaista, mutta steroidisulfaattien analysoimiseen soveltuvaa tarpeeksi häiriöherkkää ja toistettavaa menetelmää ei olla onnistuttu vielä kehittämään.¹² Sulfaattikonjugaattien analysointia GC-MS- ja GC-C-IRMS-tekniikoilla on tutkittu kohtuullisen menestyksekkäästi dehydroepiandrosteronin metaboliiteilla. Dehydroepiandrosteroni metaboloituu pääasiassa sulfaattikonjugaatteina, joten sen dopingkäytön osoittamiseen steroidisulfaateille soveltuvan menetelmän löytyminen olisi erityisen tärkeää. Menetelmä osoittautui kuitenkin liian vaivalloiseksi rutiininomaiseen käyttöön, ja sen hyöty rajoittunee vielä tapauksiin, joissa steroidiglukuronidien GC-C-IRMS-analyysin tulokset eivät anna selvää tulosta.¹⁶

Vedyn eri isotooppien suhdetta on myös tutkittu käytettäväksi endogeenisten steroidien varmistusanalyysissä.^{64,68,69} Deuteriumin ja vedyn isotooppien suhdetta on analysoitu kaasukromatografi-lämpömuuntumis-isotooppisuhdemassaspektrometrillä kymmenestä endogeenisestä steroidista. Tutkimuksessa todettiin, että vedyn isotooppien suhdetta

voitaisiin mahdollisesti käyttää hiilen isotooppien suhteen ohella endogeenisten steroidien analytiikassa, mutta lisätutkimukset ovat tarpeen.⁶⁹

Endogeenisten steroidien dopingtestaus on nykypäivään saakka lähinnä keskittynyt tunnettujen yhdisteiden ja metaboliittien seuraamiseen virtsanäytteistä ja näiden vertaamiseen yleisiin referenssinäytteisiin ja sovittuihin raja-arvoihin. Käytetyimmän testosteronin (tai sen prekursorien) dopingkäytöstä kertovan biomarkkerin, testosteroni/epitestosteroni-suhteen, raja-arvon neljä asemaa on kritisoitu jo pitkään. Raja-arvon alentaminen kuudesta neljään vuonna 2005 ei ole tuottanut merkittävästi lisää positiivisia tuloksia Kölnin dopingtestauslaboratorion vuosien 2005 ja 2009 välillä analysoitujen näytteiden perusteella tehdyn tutkimuksen mukaan.²² Tutkimuksessa ehdotettiin täysin uudenlaista lähestymistapaa testosteronin dopingkäytön osoittamiseen, jossa käytettäisiin henkilökohtaisia vertailurajoja testosteroni/epitestosteroni-suhteelle ja seurattaisiin tiettyjen biomarkkereiden muutoksia henkilön steroidiprofiilissa. WADA:n dokumentissa²¹ käsitellään muita lupaavia dopingkäytöstä kertovia biomarkkereita, joita ovat esimerkiksi testosteronin suhde luteinisoivaan hormoniin.

Uusia endogeenisten steroidien dopingkäytöstä kertovia biomarkkereita etsitäänkin, ja lupaavia tuloksia ollaan jo saatu. Steroidien endogeenisyyden, henkilökohtaisten vaihteluiden ja laajan pitoisuusalueen takia niiden dopingkäytön osoittaminen on erityisen vaikeaa. Kiellettyjen steroidien dopingkäytöstä kertovien suorien ja epäsuorien biomarkkereiden pitkäaikaisseuranta saattaa tuoda helpotusta näihin ongelmiin. Pitkäaikaisseurannassa testattava henkilö toimii itse omana referenssinään, ja näytteistä etsitään tiettyjen biologisten markkereiden poikkeamia urheilijan omaan normaalitasoon verrattuna. Tätä menetelmää kutsutaan biologiseksi passiksi.^{46, 61}

On todennäköistä, että tulevaisuudessa GC-MS-MS syrjäyttää perinteisen GC-MS:n steroidiseulonassa tekniikan paremman selektiivisyyden ja herkkyyden takia. QTOF-tekniikan kehittyminen ja sovellutukset dopinganalytiikkaan saattavat myös olla tulevaisuudessa merkittäviä; tähän mennessä tekniikkaa on tutkittu menestyksekkäästi liitettynä nestekromatografiaan.⁵⁰ Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografi yhdistettynä QTOF:in on erityisesti mielenkiinnon kohteena, sillä se mahdollistaa ei-kohdistettujen (tuntemattomien) yhdisteiden seurannan ja mahdollisesti näin uusien biomarkkereiden löytämisen hyödynnettäväksi urheilijan biologisessa passissa.^{50,70}

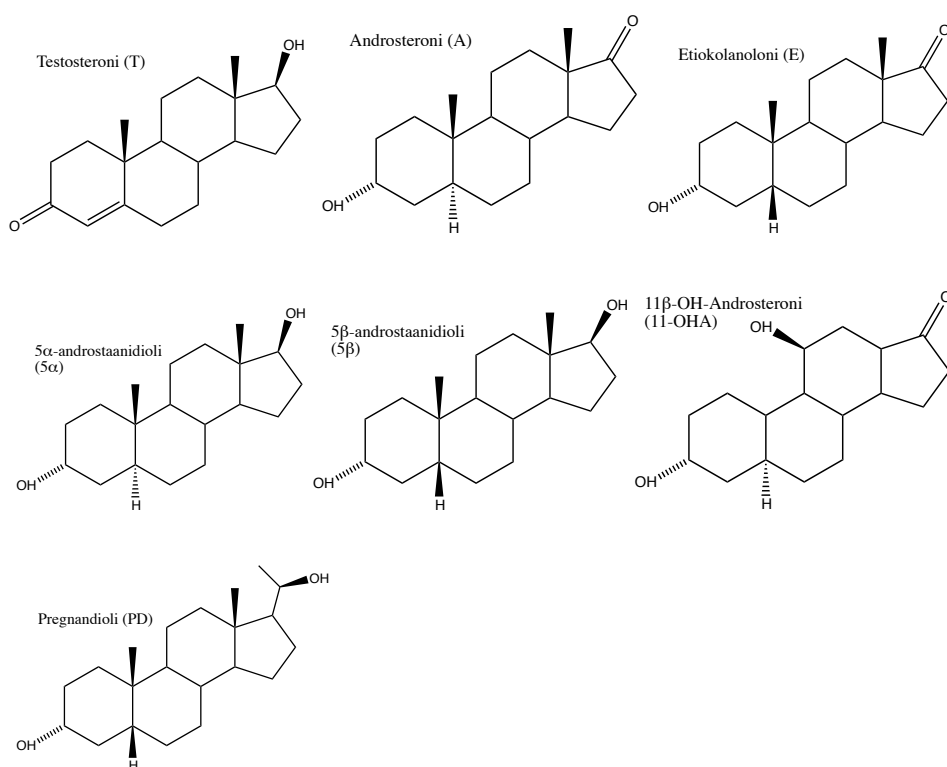
KOKEELLINEN OSA: TESTOSTERONIN DOPINGKÄYTÖN OSOITTAMINEN KAASUKROMATOGRAFI-POLTTO-ISOTOOPPISUHDEMASSASPEKTROMETRISESTI

7. TEORIA

7.1 Steroidit

Testosteroni (T) on tunnetuin C19-steroideista. Se on endogeeninen miessukupuolihormoni, jota muodostuu ihmiskehossa luonnollisesti kolesterolista. T on tunnetuin anabolisista, eli elimistön valkuaisainesynteesiä lisäävistä hormoneista. Se metaboloituu maksassa lähes täysin ennen eriytymistään virtsaan. Aineenvaihduntatuotteita on useita, mutta tärkeimpiä ovat androsteroni (A), etiokolanoloni (E), 5 α -androstaanioli (5 α) ja 5 β -androstaanioli (5 β).¹⁵

Testosteronin, sen tutkittujen steroidimetaboliittien ja endogeenisten referenssiyhdisteiden rakennekaavat on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. Testosteronin ja muiden tutkittujen steroidien rakennekaavat.

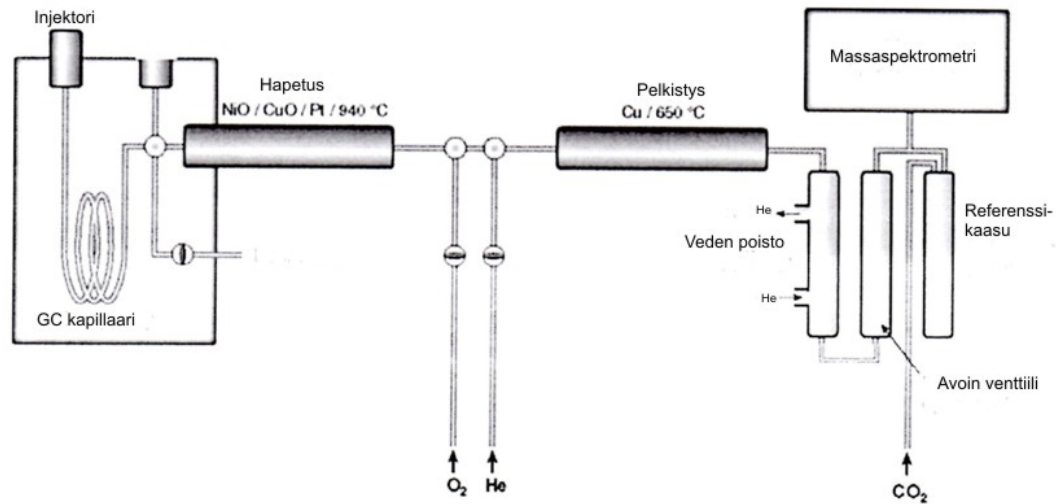
Testosteronin mahdollinen käyttö todetaan dopinganalyysissä alustavasti anabolisten steroidien seulonnan yhteydessä mittaamalla kaasukromatografi-massaspektrometrisesti (GC-MS) ns. steroidiprofiili, jossa tarkkaillaan tiettyjen steroidien tai niiden aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksia ja keskinäisiä suhteita. Perinteisesti tärkein steroidiprofiilissa mitattava parametri on edelleenkin testosteroni/epitestosteroni-suhde, jolle on asetettu raja-arvoksi neljä. Raja-arvon ylittyessä tulos tulee varmistaa dopingkäytön osoittamiseksi. Kvalitatiivisena varmistustekniikkana testosteronianalytiikassa käytetään GC-C-IRMS-menetelmää.

7.2 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometria

GC-C-IRMS-tekniikka perustuu kemiallisesti tuotetun ja endogeenisen testosteronin hiilen isotooppisuhteen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) eroihin. Analyysi kertoo orgaanisen yhdisteen isotooppisuhteen ”sormenjäljen”.

Laitteiston avulla voidaan erottaa synteettisesti tuotetut steroidit endogeenisesti tuotetuista niiden isotooppikoostumuksen perusteella. Farmaseuttisissa valmisteissa olevat steroidit syntetisoidaan useimmiten vain vähän ^{13}C -isotooppia sisältävistä soijan steroleista. Koska endogeenisesti tuotetut steroidit taas edustavat isotooppikoostumukseltaan kyseisen henkilön ruokavaliota, joka sisältää yleensä selvästi enemmän ^{13}C -isotooppia, voidaan endogeenista ja eksogeenista alkuperää olevat steroidit erottaa.⁵⁹

Nykyaikainen GC-C-IRMS-laitteisto koostuu kaasukromatografista, polttouunista ja isotooppisuhdemassaspektrometrasta (Kuva 16). Polttouuni koostuu hapetusreaktorista, pelkistysreaktorista ja vedenpoistolaitteistosta.⁵⁹



Kuva 16. Tyypillinen GC-C-IRMS-laitteisto. Kuva muokattu luvalla (John Wiley and Sons) lähteestä 59.

Yhdisteet eluivat kaasukromatografian kolonnista polttouuniin, jossa kaikki yhdisteen sisältämä hiili poltetaan hapetusreaktorissa kvantitatiivisesti hiilidioksidiksi. Pelkistysreaktori poistaa ylimääräistä happea kaasuvirrasta ja pelkistää mahdollisesti muodostuneet typpioksidit, jotka saattaisivat haitata analyysiä. Lopuksi vesi poistetaan ja hiilidioksidi pääsee avoimen venttiilin läpi.⁵⁹

Hiilidioksidin isotooppisuhteita mitataan tämän jälkeen isotooppisuhtemassaspektrometrillä. Analyysissä mitataan massa/varaus-suhteita (m/z) 44, 45 ja 46, jotka edustavat hiilidioksidin isotooppimuotoja $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ ja $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$.⁵⁹ Näiden ionien suhteista toisiinsa, ottaen huomioon hapen isotoopit, voidaan laskea ^{13}C -hiilen runsaus näytteessä.⁶³

Analyysin jälkeen lasketaan yhdisteen ns. $\delta^{13}\text{C}$ -arvo (‰), joka kertoo promilleina yhdisteen isotooppisuhteen verrattuna kansainväliseksi referenssistandardiksi valitun kalkkikiven Vienna Pee Dee Belemniten isotooppisuhteeseen.

Synteettisen steroidin käyttö vaikuttaa luonnollisesti myös sen metaboliatuotteiden eli analyysin kohdeyhdisteiden (TC) isotooppikoostumukseen.⁵⁷ Steroidin metaboliatuotteiden, kuten testosteronin tapauksessa androsteronin, etiokolanolonin, 5α -androstaaniidiolin ja 5β -androstaaniidiolin $\delta^{13}\text{C}$ -arvo muuttuu henkilölle ominaisesta arvosta, koska steroidimetaboliitin isotooppikoostumusta luonnollisesta muuttaa synteettisesti valmistetun steroidin isotooppikoostumus. Kyseiselle henkilölle luonnollinen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo saadaan mittaamalla isotooppikoostumus yhdisteistä, joiden metabolia on

irallinen kyseessä olevan steroidin metaboliareitistä. Yhdisteitä kutsutaan endogeenisiksi referenssiyhdisteiksi (ERC).⁵⁹ Näitä yhdisteitä ovat esimerkiksi pregnandioli (PD) ja 11 β -OH-androsteroni (11-OHA).²¹

8. KOKEELLINEN OSUUS

8.1 Kemikaalit ja reagenssit

Työssä käytetyt kemikaalit ja reagenssit on esitetty taulukossa 11.

Taulukko 11. Kemikaalit, niiden valmistajat, valmistuspaikka ja puhtausaste.

Kemikaali	Valmistaja	Valmistusmaa	Puhtausaste
2-Propanoli	Rathburn Chemicals	Skotlanti	HPLC
Pyridiini	Merck	Saksa	p.a.
Asetoni	Merck	Saksa	p.a.
Etyyliasettaatti	Rathburn Chemicals	Skotlanti	HPLC
Metanoli	Lab-Scan analytical sciences	Puola	HPLC
Asetonitriili	J.T.Baker	USA	HPLC
Dietyylieetteri	Merck	Saksa	p.a.
Natriumsulfaatti (kuiva)	Merck	Saksa	p.a.
Tert-butyylimetyylieetteri	Sigma-Aldrich	Saksa	≥ 99,8%
Sykloheksaani	Sigma-Aldrich	Saksa	≥ 99,7%
Fosforipentoksidi	Merck	Saksa	p.a.
Silikageeli	Merck	Saksa	-
Etikkahappoanhydridi	Merck	Saksa	≥ 98,5%
Etikkahappoanhydridi	Sigma-Aldrich	Saksa	p.a.

Työssä tutkitut steroidit on esitetty taulukossa 12. Taulukossa on esitetty myös käytetyt nestekromatografisen fraktioinnin retentioaikamerkkiaine (RT-markkeri) ja analyyseissä käytetyt sisäiset standardit (IST).

Taulukko 12. Työssä tutkittujen steroidien triviaalinimet, IUPAC-nimet, moolimassat, käytetyt lyhenteet, tarkoitus tutkimuksessa, valmistajat ja valmistumaat.

Triviaalinimi	IUPAC-nimi	Moolimassa (g/mol)	Lyhenne	Tarkoitus	Valmistaja, valmistusmaa
5 α -Androstaani-3 β -oli	5 α -androstaani-3 β -oli	276,46	RSTD	IST	Steraloids, USA
Etiokolanoloni	3 α -hydroksi-5 β -androstaani-17-oni	290,44	E	TC	Makor, Israel
Androsteroni	3 α -hydroksi-5 α -androstaani-17-oni	290,44	A	TC	Merck, Saksa
Pregnandioli	5 β -pregnan-3 α ,20 α -dioli	320,51	PD	ERC	Steraloids, USA
11 β -OH-androsteroni	3 α ,11 β -dihydroksi-5 α -androstaani-17-oni	278,39	11-OHA	ERC	Steraloids, USA
Epi-testosteroni	17 α -hydroksi-androst-4-ene-3-oni	288,42	epiT	TC	Steraloids, USA
5 α -Androstaanidioli	5 α -androstaani-3 α ,17 β -dioli	292,46	5 α	TC	Steraloids, USA
5 β -Androstaanidioli	5 β -androstaani-3 α ,17 β -dioli	292,46	5 β	TC	Steraloids, USA
5-Androsteeni-3 β ,17 α -dioli	5-androsteeni-3 β ,17 α -dioli	290,44	5-EN	IST	Steraloids, USA
β -Estradiol-3,17-diasetaatti	1,3,5 (10)-estratrien-3,17 β -dioliasetaatti	-	EST	RT-markkeri	Steraloids, USA

Työssä käytettiin myös eri steroideista valmistettuja kontrolleja ja referenssistandardeja, jotka on esitetty taulukossa 13. LC1-kontrollin avulla määritettiin fraktioiden keräysajat ensimmäisessä nestekromatografisessa fraktioinnissa. LC2-kontrolli asetyloitiin tutkittavien näytteiden kanssa ennen toista nestekromatografista fraktiointia, jossa sen avulla määritettiin fraktioiden keräysajat. Kontrollit ajettiin kahtena rinnakkaisena ilman fraktiointia. IRMS-standardiseoksella varmistettiin GC-C-IRMS-laitteen kromatografinen käyttökunto. IRMS-mix 2 asetyloitiin ja fraktioitiin tutkittavien näytteiden kanssa toisessa nestekromatografisessa fraktioinnissa. Fraktiot yhdistettiin ennen GC-C-IRMS-analyysiä.

Taulukko 13. Työssä käytetyt kontrollit ja standardiseokset.

LC1-kontrolli (metanoli)	
Yhdiste	Pitoisuus
11-OHA	125 µg/ml
5 α	125 µg/ml
5 β	125 µg/ml
PD	250 µg/ml
E	125 µg/ml
A	125 µg/ml
epiT	125 µg/ml
EST	50 µg/ml
LC2-kontrolli (asetonitriili/vesi, 77:23 %, v/v)	
Yhdiste	Pitoisuus
5 α	n. 1000 µg/ml
5 β	n. 1000 µg/ml
PD	n. 1000 µg/ml
epiT	n. 167 µg/ml
5-EN	n. 100 µg/ml
EST	50 µg/ml
IRMS-mix 1 (metanoli)	
Yhdiste	Pitoisuus
RSTD	100 µg/ml
E	100 µg/ml
A	100 µg/ml
11-ketoetiokolanoloni	100 µg/ml
PD	100 µg/ml
11-OHA	100 µg/ml
IRMS-mix 2 (sykloheksaani)	
Yhdiste	Pitoisuus
RSTD	50 µg/ml
epiT	n. 100 µg/ml
PD	n. 100 µg/ml
5 α	n. 100 µg/ml

8.2 Laitteistot

8.2.1 Kaasukromatografi-massaspektrometri

Työ suoritettiin Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) -kaasukromatografi-massaspektrometrilla (GC-MS) (Agilent 6890 -kaasukromatografi yhdistettynä Agilent 5973 -massaselektiiviseen ilmaisimeen). Automaattinen näytteensyöttäjä oli Agilent 7683. Työasemaohjelmistona toimi ChemStation. Laitteisto on esitelty kuvassa 17.



Kuva 17. Työssä käytetty kaasukromatografi-massaspektrometri.

GC-MS:n kolonni ja kaasukromatografian parametrit olivat vastaavat kuin GC-C-IRMS:ssa. Näin ollen GC-MS:a voitiin käyttää tietyissä analyyseissä GC-C-IRMS-laitteiston sijaan ja erityisesti kun haluttiin analysoida tutkittavien yhdisteiden spektrejä ja puhtautta.

Työssä käytettiin Macherey & Nagel (Düren, Saksa) -keskipoolista polysiloksaanikolonnia (Optima- δ -3, 20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μ m). Analyyttistä kolonnia ennen käytettiin esikolonniina Agilent-faasitonta silikakapillaaria (2 m x 0,32 mm). Injektiotilavuus oli 1 μ l (splitless) injektorin lämpötilan ollessa 300 °C (huuhtelu 100 ml/min 1,50 min päästä). GC-MS-siirtolinjan lämpötila oli 310 °C. Uunin alkulämpötila oli 60 °C (pito 1,5 min), lämpötilaa nostettiin 35 °C/min 265 °C:een asti ja 3 °C/min loppulämpötilaan 300 °C. Kantokaasuna toimi helium vakiovirtaudella 2 ml/min. Ionisaatiotekniikkana käytettiin elektroni-ionisaatiota (70 eV) ionilähteen lämpötilan ollessa 230 °C. Kvadrupolin lämpötila oli 150 °C. Massaspektrometrin kalibrointiin käytettiin perfluorotributyyliamiinia ja tutkittiin koko valittua massa-aluetta (pyyhkäisy m/z 40-600).

8.2.2 Nestekromatografi

Työ suoritettiin Agilent-nestekromatografilla. Työssä käytettiin Agilent 1100-sarjan nestekromatografia joka oli varustettu ultravioletin/näkyvän valon spektrofotometrisella

detektorilla (UV/VIS). Nestekromatografiin oli yhdistetty fraktionkerääjä Foxy Jr. (Isco, Lincoln, USA). Laitteisto on esitelty kuvassa 18.



Kuva 18. Työssä käytetty UV/VIS-nestekromatografi ja fraktionkerääjä.

Työssä käytettiin valmistajan Agilent-käänteisfaasikolonnia (Lichrospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5 μ m). Analyyttistä kolonnia ennen käytettiin esikolonnia Agilent-oktadekyylisilaanikolonnia (ODS Hypersil, 20 mm x 4 mm, 5 μ m). Injektiotilavuus oli 50 μ l, vakiolämpötila 30 °C ja seurattu aallonpituus 192 nm.

Ajoliuksina käytettiin suodatettua (Milli-Q, Millipore, Irlanti) Milli-Q-vettä ja 90 % asetonitriliä (ACN). Ajogradientit ovat esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. Käytetyt nestekromatografian ajogradientit.

Ajogradientti			
	LC1-fraktiointi, gradientti A	LC1-fraktiointi, gradientti B	LC2-fraktiointi
Gradientti	Milli-Q-vesi: 90 % ACN 63:37 % (v/v) → 0:100 % 22 min aikana	Milli-Q-vesi: 90 % ACN 67:33 % (v/v) → 39:61 % 21 min aikana → 0:100 % 5 min aikana	Milli-Q-vesi: 90 % ACN 23:77 % (v/v) → 0:100 % 33 min aikana
Pito	ei	5 min 90% ACN	5 min 90 % ACN
Post-run	5 min alkuolosuhteet	5 min alkuolosuhteet	5 min alkuolosuhteet

8.2.3 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometri

Työssä käytettiin Delta Plus Advantage-isotooppisuhdemassaspektrometria (Thermo Electron, Waltham, USA) yhdistettynä GC-C-Interface 3-polttoyksikköön (Thermo

Electron). Laitteisto oli kytkettynä Agilent 6890-kaasukromatografiin ja GC-PAL-näytteensyöttäjään (CTC-Analytics, Zwingen, Sveitsi). Laitteisto on esitelty kuvassa 19.



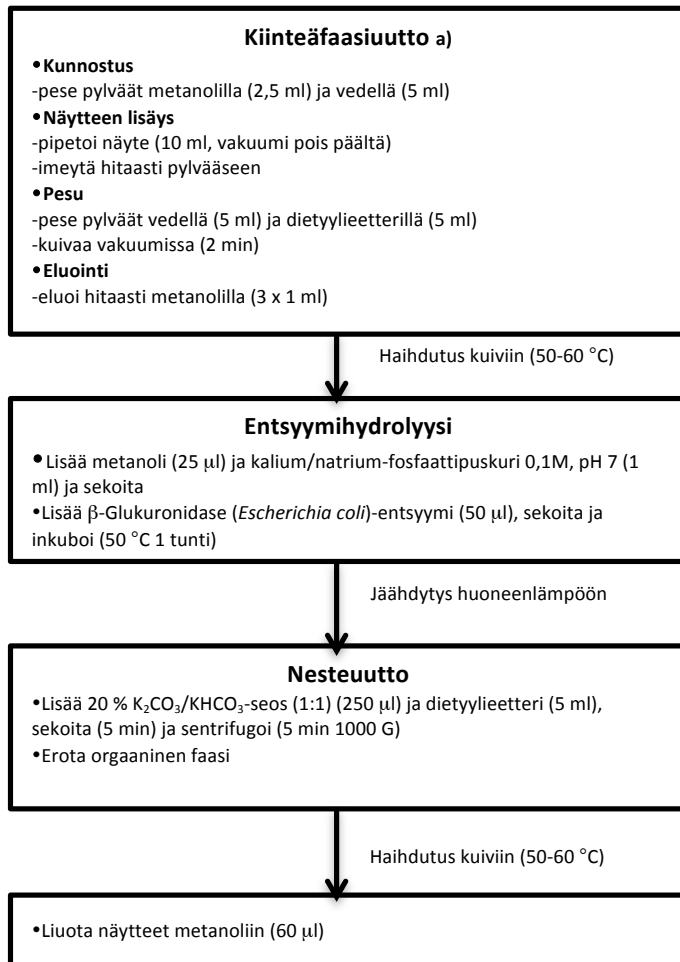
Kuva 19. Työssä käytetty kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometri.

GC-C-IRMS:n kolonni ja kaasukromatografian parametrit olivat vastaavat kuin GC-MS:ssa. Polttoreaktorin lämpötila oli 940 °C. Mittauksessa käytettiin referenssikaasuna hiilidioksidia (Laserhiilidioksidi 4,5, 100 %, AGA, Suomi), jonka isotooppisuhde on jäljitettävissä Schimmelmännin n-alkaanisarjan kautta kansainväliseen standardiin (kalkkikivi Vienna Pee Dee Belemnite). Ennen analyyttejä referenssikaasupulseja oli yhdeksän, analyyttien jälkeen viisi. Hapetusreaktori kunnostettiin puhtaalla hapella aina ennen mittauksia. Laite laskee automaattisesti yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot.

8.3 Menetelmät

8.3.1 Uuton optimointi

Käytössä olevassa menetelmässä virtsanäytteet puhdistetaan kiinteäfaasiuutolla jonka jälkeen steroidiglukuronidit hydrolysoidaan entsyymaattisesti ja uutetaan orgaaniseen liuottimeen (dietyylieetteri) nesteuutolla. Poolisimman yhdisteen, pregandiolin (PD), uuttumisessa on havaittu välillä ongelmia. Käytössä olevan steroidien varmistusmenetelmän näytteen esikäsittely on esitetty kuvassa 20.



a) Kiinteäfaasiuuttopatruuna: ODS-patruuna, Sep-Pak C18, 360 mg, partikkelikoko 55-105 µm, Waters, USA.

Kuva 20. Käytössä olevan steroidien varmistusmenetelmän näytteen esikäsittely esitetty kaaviokuvana.

Uutto optimoitiin lääkeainevapaaseen virtsaan valmistetuilla PD:a (pitoisuus 0,5 µg/ml) sisältävillä näytteillä käyttäen kolmea erilaista nesteuuttoa. Poolisimpana yhdisteenä PD uuttuu tutkittavista yhdisteistä huonoimmin orgaaniseen liuottimeen. Kokeet suoritettiin neljällä rinnakkaisella näytteellä. Testattavat uuttoliuottimet olivat tert-butyyylimetyylieetteri (TBME) ja dietyylieetteri (DEE), joiden lisäksi testattiin ulossuolausta DEE-uuttoliuottimen kanssa. 5 µl PD-standardiliuosta (1 mg/ml metanolissa) lisättiin testinäytteisiin ennen nesteuuttoa ja vertailunäytteisiin uuton jälkeen. Sisäisenä standardina (IST) optimoinnissa käytettiin RSTD:a (pitoisuus 0,5 µg/ml). Näytteiden esikäsittely suoritettiin soveltuvin osin vastaavasti kuin käytössä olevan anabolisten steroidien varmistusmenetelmässä.

Näytteet puhdistettiin kiinteäfaasiuutolla. Silika ODS-patruunat (Sep-Pak C18, 360 mg, Waters, USA) kiinnitettiin uuttolaitteiston kanteen ja kunnostettiin 2,5 ml metanolia ja 5 ml vettä. Tämän jälkeen patruunoihin pipetoitiin 10 ml lääkeainevapaata miesvirtsa (mies-0, kerätty vapaaehtoisilta, näytteet yhdistetty ja säilytetty pakasteessa) ja imeytettiin näyte hitaasti patruunaan. Patruunat pestiin 5 ml vettä ja kuivattiin vakuumissa kaksi minuuttia, jonka jälkeen ne pestiin 5 ml DEE:llä (konjugoimattomien steroidien poisto) ja kuivattiin vakuumissa kaksi minuuttia. Näytteet eluoiitiin hitaasti kolme kertaa 1 ml metanolia. Näytteet haihdutettiin kuiviin ilmavirralla 50-60 °C vesihauteessa.

Entsyymihydrolyysiä ei tehty, sillä kokeessa tutkittiin glukuronidoimattoman puhdasaineen uuttumista. Näytteet liuotettiin 25 µl metanolia ja 1 ml kalium/natrium-fosfaattipuskuria (0.1 M, pH 7) kuten rutiininomaisessa esikäsitelyssä.

IST:n lisäyksen jälkeen testinäytteisiin lisättiin 5 µl PD-standardiliuosta (1 mg/ml metanolissa) ja nesteuutto aloitettiin lisäämällä 250 µl 20 % K₂CO₃/KHCO₃-seosta (1:1). Tämän jälkeen lisättiin 5 ml tutkittavaa uuttoliuotinta (DEE tai TBME) ja vorteksoitiin käsin 30 sekuntia. DEE ulossuolauksen kanssa testattiin lisäämällä testi- ja vertailuputkiin DEE:n lisäyksen jälkeen noin 2 g kuivaa natriumsulfaattia samalla hitaasti vorteksoiden ja jatkamalla vorteksointia suuremmalla nopeudella vielä noin 30 sekuntia. Näytteet sentrifugoitiin 5 minuuttia (1000 G, Cryofuge 6000i, Heraeus Instruments, Saksa). Orgaaninen faasi erotettiin, haihdutettiin kuiviin Turbovap-haihdutuslaitteistossa (Turbovap LV Concentration Workstation, Caliper Life Sciences, USA) 45 °C:ssa ja siirrettiin eksikaattoriin (fosforipentoksidi/silikageeli) 15 minuutiksi.

Haihdutetut näytteet liuotettiin 60 µl metanolia, vertailunäytteisiin lisättiin 5 µl PD-standardiliuosta (1 mg/ml metanolissa) liuotuksen yhteydessä. Näytteet analysoitiin GC-MS:lla ja tutkittiin PD:n toistettavuutta ja saantoa. Pregnandiolin seurattavaksi kvantitointi-ioniksi valittiin massa/varaus (m/z) 216. RSTD:n kvantitointi-ioniksi valittiin sen taustavähennyksestä massaspektrometrillä valittu korkeimman intensiteetin m/z 243.

8.3.2 Derivatisointi

GC-C-IRMS-analyysiä varten varsinkin hyvin pooliset kohdeyhdisteet, kuten 5α ja 5β, pitää derivatisoida niiden kromatografisen käyttäytymisen parantamiseksi. Tässä työssä derivatisointi suoritettiin etikkahappoanhydridillä, jolloin steroideista syntyy

asetyylijohdannaisia. Asetylointi parantaakin huomattavasti mittausten toistettavuutta ja yhdisteiden erottumista niin HPLC-laiteiston kuin kaasukromatografian kolonneilla.⁶²

Tutkittaville yhdisteille testattiin erilaisia asetointiolosuhteita.^{62,71} Asetyloitujen yhdisteiden retentiojärjestys selvitettiin niin nestekromatografilla kuin myös GC-MS:lla. Lisäksi yhdisteet identifioitiin GC-MS:lla massaspektriin perustuen. Asetyloinnin sisäiseksi standariksi valittiin 5-androsteeni-3 β ,17 α -dioli (5-EN).

GC-MS-analyysiä varten asetointi suoritettiin seuraaville steroideille: A, E, 5 α , 5 β , epiT, PD, 11-OHA ja 5-EN. Kutakin steroidistandardia pipetoitiin erikseen kertakäyttöiseen haihdutusputkeen 10 μ l, paitsi 5-EN:a 3 μ l (kantaliuokset 1 mg/ml metanolissa). Liuokset haihdutettiin kuiviin 45 $^{\circ}$ C Turbovap-haihdutuslaitteella ilmavirrassa ja kuivattiin eksikaattorissa 15 min. Tämän jälkeen lisättiin 50 μ l pyridiiniä ja 50 μ l etikkahappoanhydridiä. Yhdisteet asetuloitiin 80 $^{\circ}$ C kuivahauteella (Dri-Block DB-3D, Techne, USA) tunnin ajan. Näytteet haihdutettiin kuiviin 45 $^{\circ}$ C Turbovap-laitteistossa typpivirralla ja liuotettiin 30 μ l etyyliasetaattia GC-MS-analyysiä varten. Steroidit analysoitiin epiT:a lukuunottamatta myös asetuloimattomina pitoisuuksilla 100 μ g/ml (A, E, PD, 11-OHA ja 5-EN) ja 333 μ g/ml (5 α ja 5 β).

Nestekromatografista analyysiä varten asetointi suoritettiin seuraaville steroideille: 5 α , 5 β , epiT, PD ja 5-EN. Steroidit (5 α , 5 β ja PD 60 μ l, epiT 10 μ l ja 5-EN 6 μ l (kantaliuokset 1 mg/ml metanolissa)) pipetoitiin erikseen haihdutusputkiin. Asetylointi suoritettiin muuten vastaavasti kuin edellä, mutta asetuloinnin inkubaatio-olosuhteina testattiin 80 $^{\circ}$ C 1h lisäksi myös 70 $^{\circ}$ C 45 min.^{62,71} Asetylointi tehtiin myös kahden eri valmisajan etikkahappoanhydridiä käyttäen (Taulukko 11).

Asetuloinnin jälkeen näytteet haihdutettiin kuiviin 45 $^{\circ}$ C vesihauteessa typpivirralla ja liuotettiin 60 μ l asetonitriili/Milli-Q-vettä (77:23 %, v/v) nestekromatografista analyysiä varten.

8.3.3 Nestekromatografinen fraktiointi

Uutetut näytteet puhdistettiin nestekromatografisesti ennen isotooppi-suhdemassaspektrometrissa analyysiä kaikkien häiritsevien yhdisteiden poistamiseksi. Ensimmäinen nestekromatografinen fraktiointi (LC1-fraktiointi) suoritettiin kaikille yhdisteille näytteen esikäsittelyn jälkeen. LC1-fraktioinnin jälkeen osa yhdisteistä

analysoitiin suoraan GC-C-IRMS-laitella, osa asetyloitiin ja fraktioitiin uudestaan nestekromatografisesti (LC2-fraktiointi).

Nestekromatografisen fraktioinnin onnistumisen ja retentioaikojen pysyvyyden varmistamiseksi näytteisiin lisättiin RT-markkeri. Molempien nestekromatografisten fraktiointien RT-markkeriksi valittiin β -estradiol-3,17-diasetaatti (EST).

Tutkittavien steroidien retentiojärjestys ja fraktiointiajat selvitettiin laboratoriossa jo entuudestaan tietyille yhdisteille (A, E, PD ja 11-OHA) käytetyllä LC1-fraktioinnilla (gradientti A). Lisäksi LC1-fraktiointia testattiin uutta kirjallisuudessa⁷² esitettyä gradienttia B käyttäen (Taulukko 14). Eri yhdisteiden retentiojärjestys tutkittiin ensin analysoimalla steroidit yksitellen ja fraktion keräysaikojen määrittämiseen käytettiin LC1-kontrollia (Taulukko 13).

LC2-fraktiointi optimoitiin asetyloiduille puhdasaineille (8.3.2 Derivatisointi). Kolonnina käytettiin LC1-fraktioinnissa käytettyä kolonnia ja testattiin kirjallisuudessa esitettyä⁶² gradienttia (Taulukko 14). Fraktion keräysaikojen määrittämiseen käytettiin steroidiseosta LC2-kontrolli (Taulukko 13).

Steroidiliuosten pitoisuudet on esitetty taulukossa 15 (kantaliuokset 1 mg/ml metanolissa). Ennen fraktiointia asetyloimattomat näytteet liuotettiin 60 μ l metanolia, asetyloidut näytteet 60 μ l ACN/Milli-Q-vettä (77:23 %, v/v). Kaikkiin näytteisiin lisättiin 3 μ g EST:a (kantaliuos 1mg/ml metanolissa) RT-markkeriksi.

Taulukko 15. LC1- ja LC2-fraktioinnin optimoinnissa käytettyjen steroidiliuosten pitoisuudet näytteissä.

Fraktiointi	Yhdiste	Pitoisuus näytteessä
LC1	epiT	125 μ g/ml
	11-OHA	125 μ g/ml
	E	125 μ g/ml
	A	125 μ g/ml
	5 α	250 μ g/ml
	5 β	250 μ g/ml
	PD	250 μ g/ml
LC2 (yhdisteet asetyloidaan)	epiT	167 μ g/ml
	5 α	1000 μ g/ml
	5 β	1000 μ g/ml
	PD	1000 μ g/ml
	5-EN	100 μ g/ml

Ennen asetyloimattomien yhdisteiden LC1-fraktiointia analysoitiin LC1-kontrolli. Vastaavasti ennen asetyloitujen puhtasaineiden LC2-fraktiointia analysoitiin asetyloitu LC2-kontrolli. Kontrollinäytteiden avulla tarkistettiin yhdisteiden erottuminen ja määritettiin fraktioinnin keräysajat. Keräysajat määritettiin $\pm 0,4$ min ensimmäisen ja viimeisen kerättävän yhdisteen piikin huipusta laskien. Piikkien häntiessä keräysaikaa lisättiin fraktion loppuun jotta koko yhdiste saatiin kerättyä ja fraktioinnin saanto optimoitua.

8.3.4 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi

Nestekromatografisesti fraktioidut näytteet analysoitiin GC-C-IRMS-laitteella. Validoidussa varmistusmenetelmässä GC-C-IRMS-laitteella on analysoitu asetyloimattomat A, E, PD ja 11-OHA. Tarkoituksena oli siis lisätä menetelmään asetyloituina analysoitavat yhdisteet (5α , 5β , epiT, PD), joista PD aiemmin analysoitiin asetyloimatta.

Asetylointi muuttaa yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja, sillä se lisää steroidiin eri isotooppisuhteen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) sisältävää hiiltä. Tästä syystä asetyloituina GC-C-IRMS-laitteella analysoitaville yhdisteille pitää määritellä ns. korjauskerroin. Sen avulla voidaan vertailla asetyloimattomia ja mono- sekä diasetyloituneita steroideja. Korjauskerroin määritetään kokeellisesti analysoimalla asetyloitujen ja asetyloimattomien puhtasaineiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot.⁶² Asetyloinnin sisäisen standardin (5-EN) avulla voidaan seurata, ettei isotooppifraktioitumista tapahdu asetyloinnin yhteydessä.

Asetyloitujen analyyttien korjauskertoimet määritettiin analysoimalla steroidit yksitellen kolmina rinnakkaisina asetyloimattomina ja asetyloituina sekä LC2-fraktioituina. Analyysejä käytettiin myös asetyloitujen yhdisteiden retentiojärjestyksen tutkimiseen. Steroidien pitoisuudet näytteissä on esitetty taulukossa 16 (kantaliuokset 1 mg/ml metanolissa). Lisäksi analyyseihin otettiin mukaan puhtas metanoli vertailunäytteeksi.

Menetelmän mittausalueen määrittämiseksi tutkittiin lineaarisuutta analysoimalla puhtasaineseosta rinnakkaismäärityksinä ($n = 3$). Detektorajaa ja herkkyyttä tutkittiin laimeimpien lineaarisuusnäytteiden avulla.

Lineaarisuusnäytteinä käytettiin steroidiliuoksia, jotka asetyloitiin: 5α , epiT ja 5-EN pitoisuusalueella 5-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ja PD pitoisuusalueella 10-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Asetyloidun 5β :n

mittausaluetta ei tutkittu erikseen, sillä sen oletettiin käyttäytyvän samalla tavalla kuin asetyloitu 5 α :n. Steroidien pitoisuudet liuksissa on esitetty myös taulukossa 16 (kantaliuokset 1 mg/ml metanolissa).

Taulukko 16. Korjauskertoimien ja asetyloitujen yhdisteiden retentioaikojen määrittämiseen sekä lineaarisuusmittauksiin käytettyjen steroidistandardien pitoisuudet näytteissä.

	Yhdiste	Pitoisuus näytteessä
Asetyloimattomat	epiT	100 μ g/ml
	5 α	100 μ g/ml
	5 β	100 μ g/ml
	PD	100 μ g/ml
	5-EN	100 μ g/ml
Asetyloidaan ja LC2-fraktioidaan	epiT	100 μ g/ml
	5 α	100 μ g/ml
	5 β	100 μ g/ml
	PD	100 μ g/ml
	5-EN	100 μ g/ml
Lineaarisuusliuos 1	epiT	5-150 μ g/ml
	5 α	5-150 μ g/ml
	PD	10-300 μ g/ml
Lineaarisuusliuos 2	5-EN	5-150 μ g/ml

Yhdisteiden asetyloinnin (8.3.2 Derivatisointi) ja LC2-fraktioinnin (8.3.3 Nestekromatografinen fraktiointi) jälkeen näytteet liuotettiin sykloheksaaniin (CHX), jossa oli RSTD:a pitoisuudessa 50 μ g/ml. Liuotuksen yhteydessä näytteisiin lisättiin kaksi tippaa 2-propanolia. Korjauskertoimien määrittämistä varten yhdisteet analysoitiin GC-C-IRMS:lla myös asetyloimattomina kolmena rinnakkaisena vastaavalla pitoisuudella (Taulukko 16).

GC-C-IRMS:n käyttökunto varmistettiin IRMS-mix1-liuoksella (Taulukko 13) tarkistamalla standardiliuoksen yhdisteiden kromatografinen erottuminen ja RSTD:n $\delta^{13}\text{C}$ -arvo. RSTD:n intensiteetin taso tarkistettiin ajamalla 50 μ g/ml RSTD CHX:ssa -näyte ennen analysoitavia näytteitä.

Asetyloitujen ja asetyloimattomien analyttien retentioaikoja ja $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja tarkkailtiin. Lineaarisuusnäytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja ja piikkien intensiteettejä tarkkailtiin.

8.3.5 Lopullinen menetelmä ja sen testaus

Optimoidut osa-alueet yhdistettiin lopulliseksi menetelmäksi ja testattiin menetelmän toistettavuutta ja oikeellisuutta. Lopullista menetelmää testattiin steroidistandardeilla ja biologisilla näytteillä.

Steroidistandardit (A, E, 5 α , 5 β , epiT, PD, 11-OHA ja 5-EN, kantaliuokset 1 mg/ml metanolissa) analysoitiin yksitellen. Steroidien pitoisuudet olivat LC1-näytteissä 100 $\mu\text{g/ml}$ ja täten LC2-näytteissä n. 83 $\mu\text{g/ml}$ ja GC-C-IRMS-näytteissä n. 69 $\mu\text{g/ml}$ (A, E, epiT) tai n. 138 $\mu\text{g/ml}$ (5 α , 5 β , PD, 11-OHA, 5-EN). Lisäksi otettiin mukaan puhdas metanoli vertailunäytteeksi.

Menetelmää testattiin myös biologisilla näytteillä. Sarjojen sisäisen toistettavuuden tutkimiseksi analysoitiin samassa sarjassa negatiivista (Mies-0) ja positiivista (Positiivinen QC, Panteston 40 mg p. o., kerätty vapaaehtoiselta) virtsanäytettä, joihin oli lisätty referenssistandardia. Analyysit suoritettiin rinnakkaismäärityksinä (n = 3). Menetelmän oikeellisuuden tutkimiseksi analysoitiin kaksi testinäytettä, joiden sisältämien steroidistandardien $\delta^{13}\text{C}$ -arvot olivat tiedossa. Lisäksi otettiin mukaan reagenssiblank (vesi) vertailunäytteeksi.

9. TULOKSET JA POHDINTA

9.1 Uuton optimointi

Analyysitulosten avulla laskettiin eri uuttoliuottimien toistettavuudet ja saannot yhdisteiden korkeimman intensiteetin omaavien kvantitointi-ionien avulla. Piikkien integroinnin tuloksista (pinta-ala) laskettiin PD:n intensiteetin suhde RSTD:n intensiteettiin, otettiin arvoista keskiarvot (KA), keskihajonta (SD) ja suhteellinen keskihajonta (RSD) toistettavuuden tutkimiseksi. Saanto laskettiin vertailu- ja testinäytteiden PD/RSTD-keskiarvojen suhteesta (%). Näytteisiin oli lisätty PD:a sama määrä, mutta vertailunäytteisiin uuton jälkeen. Näin maksimisaanto oli 100 %. PD:n Tulokset on esitetty taulukossa 17. Kahta mittaustulosta (taulukossa harmaalla), ei huomioitu tulosten laskennassa. TBME-testinäytteen 4 esikäsittely epäonnistui ja DEE + suola -vertailunäytteen 4 taso poikkesi erittäin paljon muista tuloksista.

Taulukko 17. Pregnandiolin uuttokokeen tulokset: PD:n ja RSTD:n piikkien intensiteetit, intensiteettien suhde (PD/RSTD), suhteen keskiarvo (KA), keskihajonta (SD), suhteellinen keskihajonta (RSD) ja laskettu saantoprosentti.

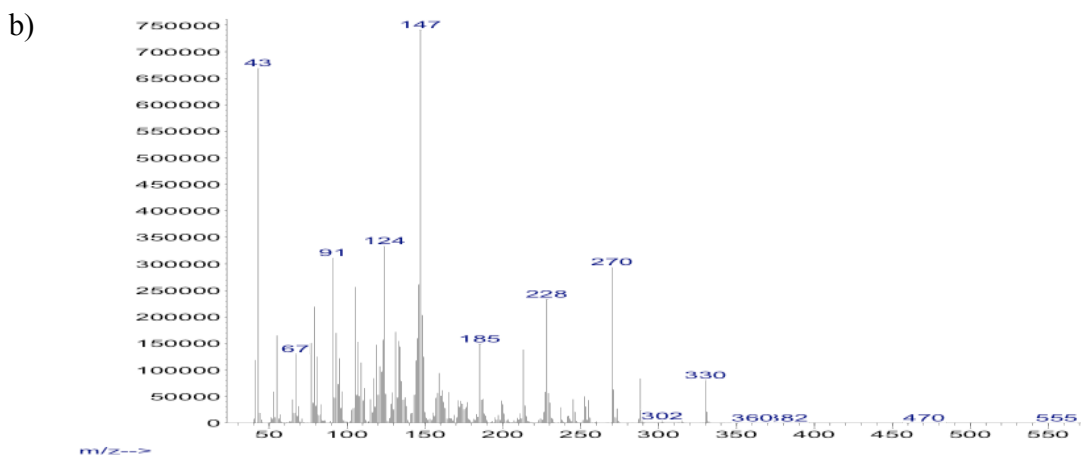
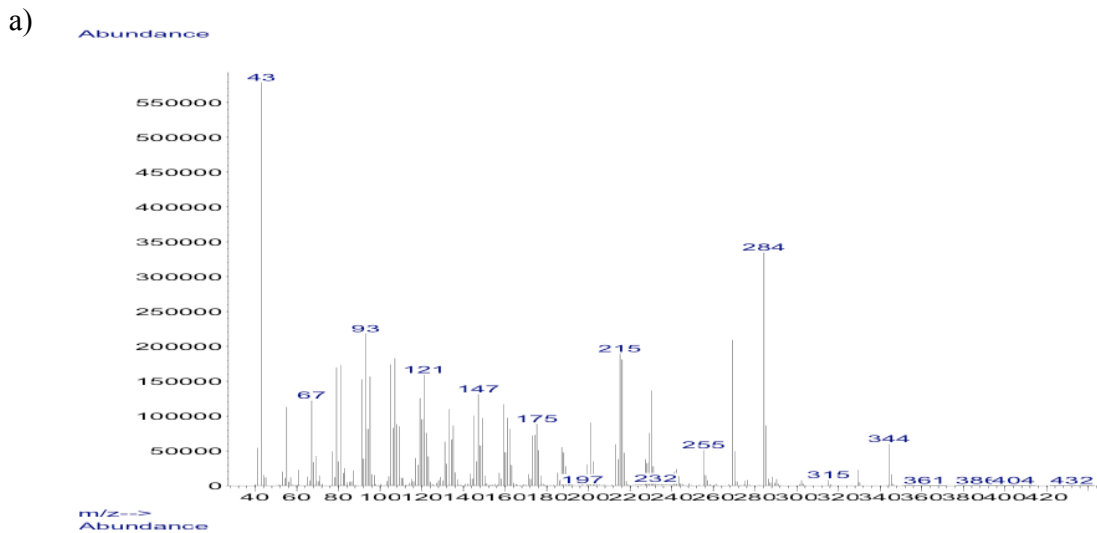
Uuttoliuotin	Intensiteetti						Saanto
DEE	PD	RSTD	PD/RSTD	KA	SD	RSD (%)	KA suhde (%)
testi1	4780406	7782705	0,614				
testi2	3963614	6166872	0,643				
testi3	3101247	4728324	0,656				
testi4	3094834	5306248	0,583	0,624	0,032	5,2	
vert1	5356087	4826325	1,110				
vert2	4851951	3346196	1,450				
vert3	5734125	5384852	1,065				
vert4	5205491	4470660	1,164	1,197	0,173	14,5	52,1
DEE + suola	PD	RSTD	PD/RSTD	KA	SD	RSD (%)	KA suhde (%)
testi1	3928469	6142927	0,640				
testi2	3797544	5949280	0,638				
testi3	3132434	5565274	0,563				
testi4	4249901	6664365	0,638	0,620	0,038	6,1	
vert1	6255890	6963666	0,898				
vert2	5548666	6465628	0,858				
vert3	5298930	5906534	0,897				
vert4	3002356	6998399	0,429	0,885	0,023	2,6	70,1
TBME	PD	RSTD	PD/RSTD	KA	SD	RSD (%)	KA-suhde (%)
testi1	4609567	5834820	0,790				
testi2	4399569	6708489	0,656				
testi3	4727651	6443992	0,734				
testi4	3710777	4250052	0,873	0,726	0,067	9,3	
vert1	6559440	6085320	1,078				
vert2	6528844	5937475	1,100				
vert3	5893029	5698710	1,034				
vert4	6524342	4695823	1,389	1,150	0,162	14,1	63,2

Laskettujen tulosten perusteella DEE ulossuolauksen kanssa olisi tehokkain uuttomenetelmä: saanto on 70,1 %. Uuton toistettavuus oli myös hyvä: RSD oli vain 6,1 %. Kokemuksen perusteella ulossuolaus on kuitenkin herkkä vaihteluille ja voi aiheuttaa taustaa. TBME:n saantoprosentti (63,2 %) oli lähes yhtä hyvä ja on toiminnaltaan todennäköisesti ulossuolausta varmempi, vaikka sen RSD jäikin 9,3 %:iin. DEE uuttoliuottimena jäi selkeästi muista vaihtoehdoista (saantoprosentti 52,1 %). TBME:n toimivuus testatulle poolisimmalle yhdisteelle (PD) takaa sen toimivuuden myös muille yhdisteille. TBME on käytössä myös muissa laboratorioissa steroidien uuttoliuottimena.⁶² Lopullisessa menetelmässä päätettiin siis käyttää TBME:ä uuttoliuottimena.

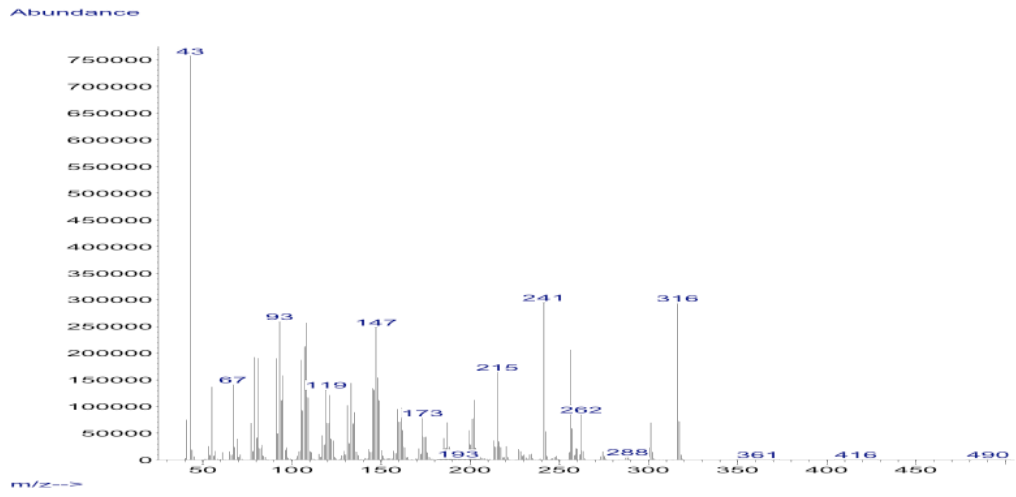
9.2 Derivatisointi

Derivatisoinnin onnistuminen varmistettiin GC-MS:lla. Derivatisoitujen yhdisteiden retentiojärjestys selvitettiin niin GC-MS:lla kuin myös nestekromatografilla. Derivatisoinnin inkubaatio-olosuhteina testattiin 80 °C 1h. Nestekromatografilla testattiin myös inkubaatio-olosuhteita 70 °C 45 min sekä kahden eri valmisajan reagenssia (etikkahappoanhydridi).

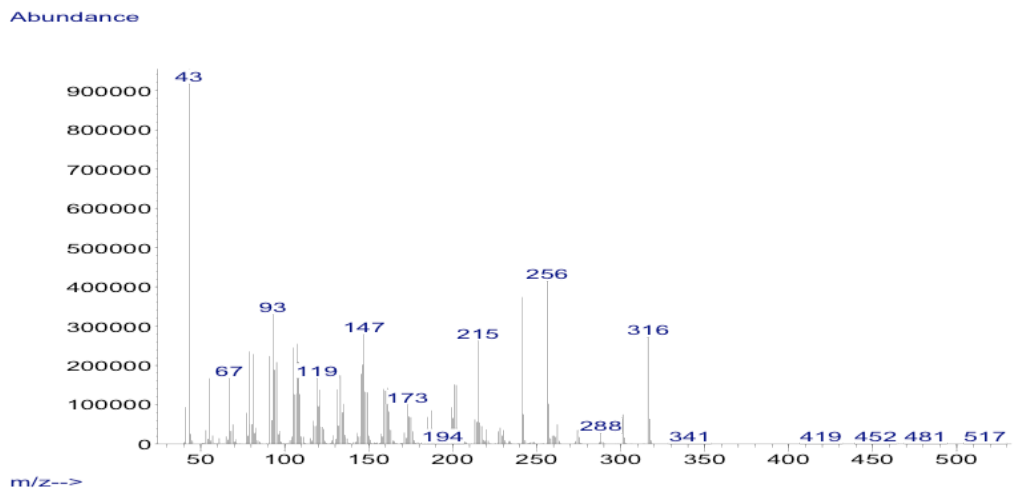
Derivatisoinnissa yhden hydroksyyliyhdyntien yhdisteistä muodostui monoasetaatteja: androsteroniasetaatti (AAc), etiokolanoloniasetaatti (EAc) ja 11 β -OH-androsteroniasetaatti (11-OHAAc). Dioleista muodostui diasetaatteja: 5 α -androstaanidiolidiasetaatti (5 α Ac), 5 β -androstaanidiolidiasetaatti (5 β Ac), epitestosteroniasetaatti (epiTAc), pregnandiolidiasetaatti (PDAc) ja 5-androsteeni-3 β ,17 α -diolidiasetaatti (5-ENAc). Monoasetaatit ja diasetaatit identifioitiin GC-MS:lla massaspektriin perustuen. Yhdisteiden massaspektrit on esitetty kuvassa 21.



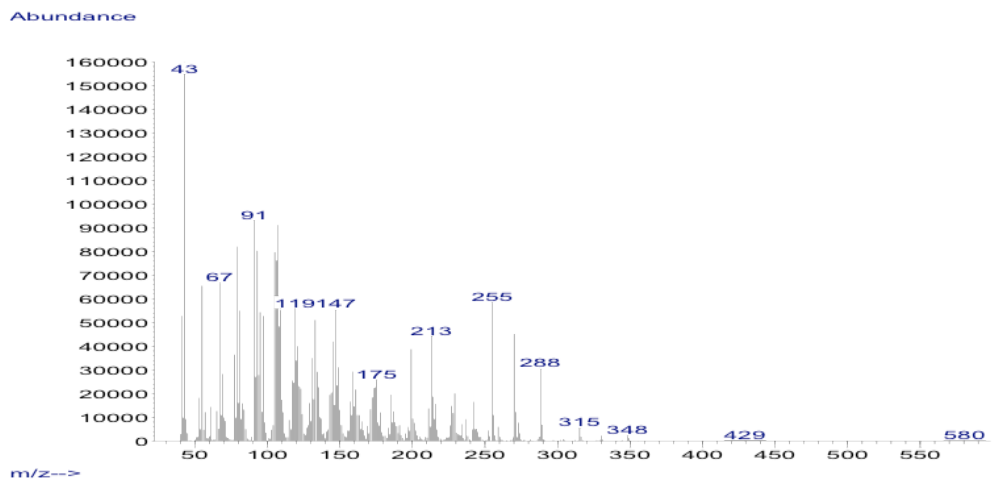
c)



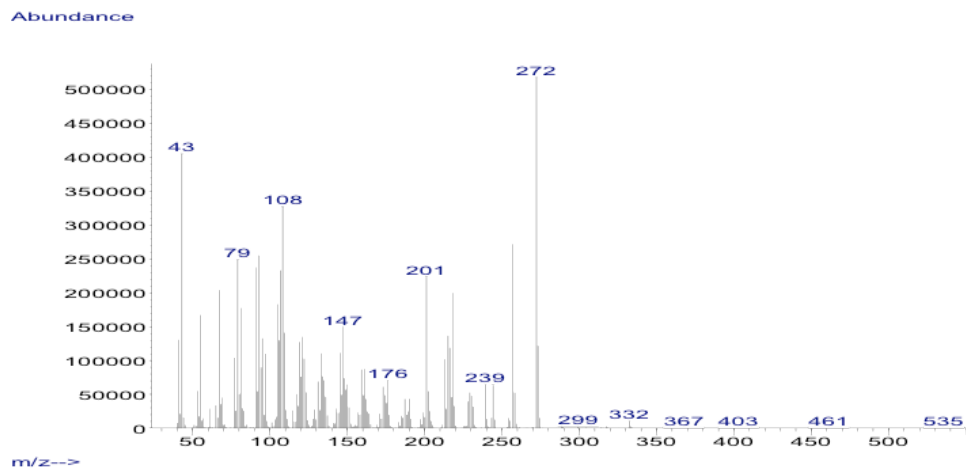
d)



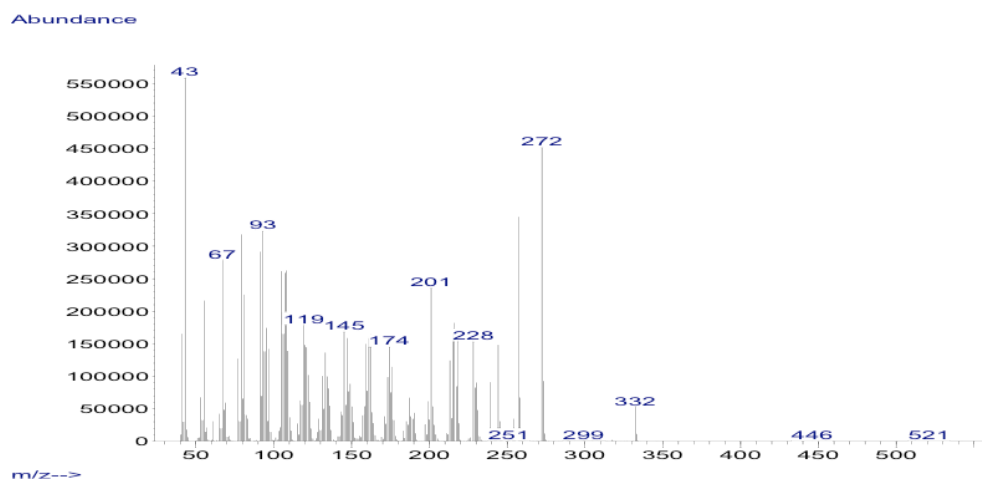
e)



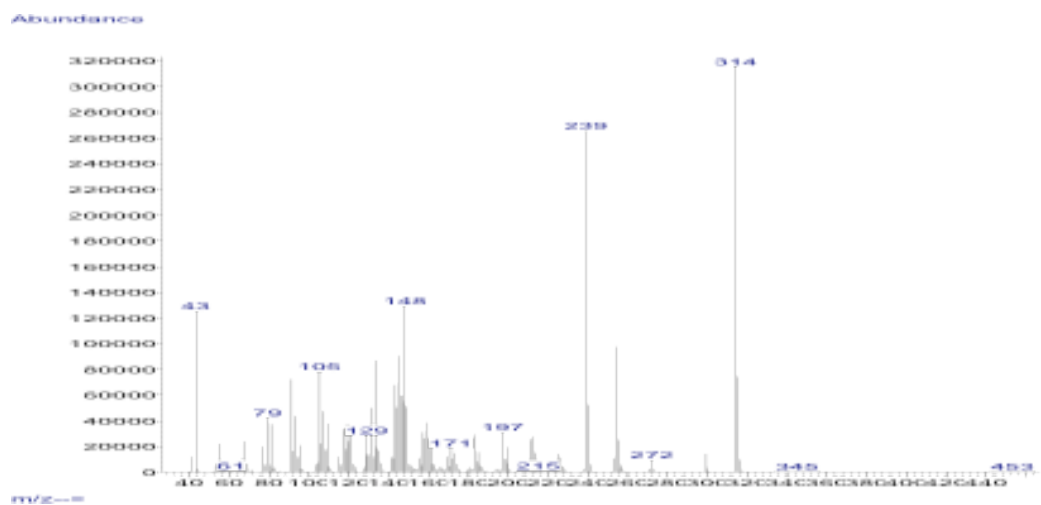
f)



g)



h)



Kuva 21. Asetyloitujen yhdisteiden spektrit: a) PDAc, b) epiTAc, c) 5 α Ac, d) 5 β Ac, e) 11-OHAAc, f) AAc g) EAc ja h) 5-ENAc. Kolonni keskipoolinen polysiloksaanikolonni (Macherey & Nagel, Optima- δ -3, 20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μ m). Esikolonni faasiton

silikakapillaari (Agilent Technologies, 2 m x 0,32 mm). Injektioilavuus 1 µl (spliless), injektorin lämpötila 300 °C (huuhtelu 100 ml/min 1,50 min päästä). GC-MS-siirtolinjan lämpötila 310 °C. Uunin alkulämpötila 60 °C (pito 1,5 min), lämpötilan nosto 35 °C/min 265 °C:een asti ja 3 °C/min loppulämpötilaan 300 °C. Kantokaasu helium vakiovirtaudella 2 ml/min. Ionisaatiotekniikka elektroni-ionisaatiota (70 eV), ionilähteen lämpötila 230 °C. Kvadrupolin lämpötila oli 150 °C. Kalibrointi perfluorotributyylimiinilla ja pyyhkäisy m/z 40-600.

Yhdisteiden GC-MS-retentioajat, pitoisuudet näytteissä ja piikkien intensiteetit on koottu taulukkoon 18. Tuloksista voidaan päätellä, että kaasukromatografisesti kaikki asetyloidut yhdisteet eivät kuitenkaan erotu. Osa yhdisteistä (AAc ja EAc, 5αAc ja 5βAc) eluoituvat päällekkäin. 5-ENAc eluoituu myös hyvin lähellä 5αAc:a ja 5βAc:a.

Taulukko 18. Asetyloimattomien ja asetyloitujen steroidien retentioajat, pitoisuudet ja intensiteetit GC-MS:lla.

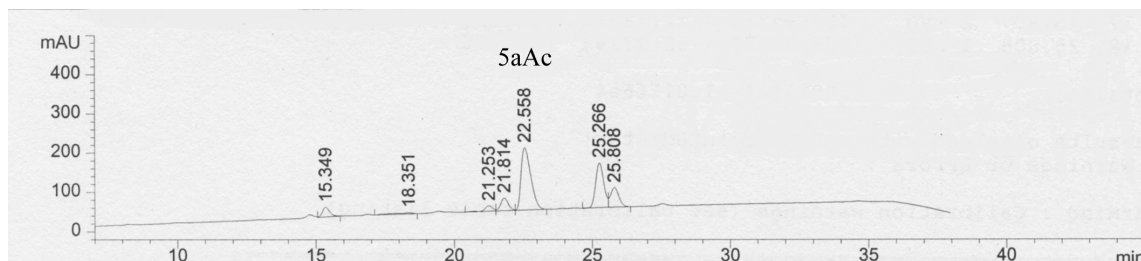
GC-MS-analyysi						
Yhdiste	Asetyloimaton			Asetyloitu		
	RT (min)	Pitoisuus (µg/ml)	Intensiteetti (pinta-ala)	RT (min)	Pitoisuus (µg/ml)	Intensiteetti (pinta-ala)
E	9,89	100	0,2 E8	10,54	333	3,8 E8
A	10,05	100	0,2 E8	10,55	333	3,1 E8
5-EN	9,93	100	1,0 E8	11,08	100	1,0 E8
5α	10,00	333	2,3 E8	11,14	333	3,1 E8
5β	9,84	333	2,9 E8	11,16	333	4,3 E8
epiT	-	-	-	11,53	333	5,8 E8
11-OHA	11,84	100	0,2 E8	12,45	333	2,2 E8
PD	11,06	100	0,2 E8	12,72	333	3,6 E8

Yhdisteiden erottumattomuus johtuu todennäköisesti käytössä olevasta suhteellisen poolisesta kolonnista. Poolittomamman kolonnin vaihtaminen akkreditoituun menetelmään lyhyellä aikavälillä on kuitenkin vaikeaa. Menetelmän jatkokehitys päätettiin pohjata Kölnin laboratorion menetelmään⁶² josta osa on jo validoitu (kohdeyhdisteinä A ja E asetyloimatta). Osa yhdisteistä analysoitaisiin asetyloituina ja osa sellaisenaan.

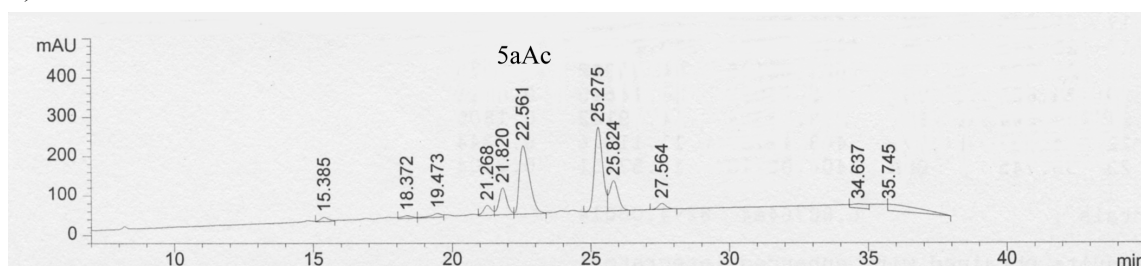
Asetyloitujen steroidien retentioaikoja nestekromatografilla selvitetessä huomattiin, että asetylointi ei välttämättä ollut täydellistä dioleille (5α, 5β, PD ja 5-EN). Asetyloitujen diolien, kuten 5αAc:n, kromatogrammeissa esiintyi useita piikkejä (Kuva 22). Testatuista inkubaatio-olosuhteista päädyttiin käyttämään 70 °C 45 min, sillä korkeammassa

lämpötilassa pidempään (80 °C 1 h) derivatisoitujen puhtasaineiden kromatogrammissa esiintyvät häiritsevät piikit (kuten retentioajalla 25,275 min) olivat intensiteeteiltään suurempia (Kuva 22 b).

a)

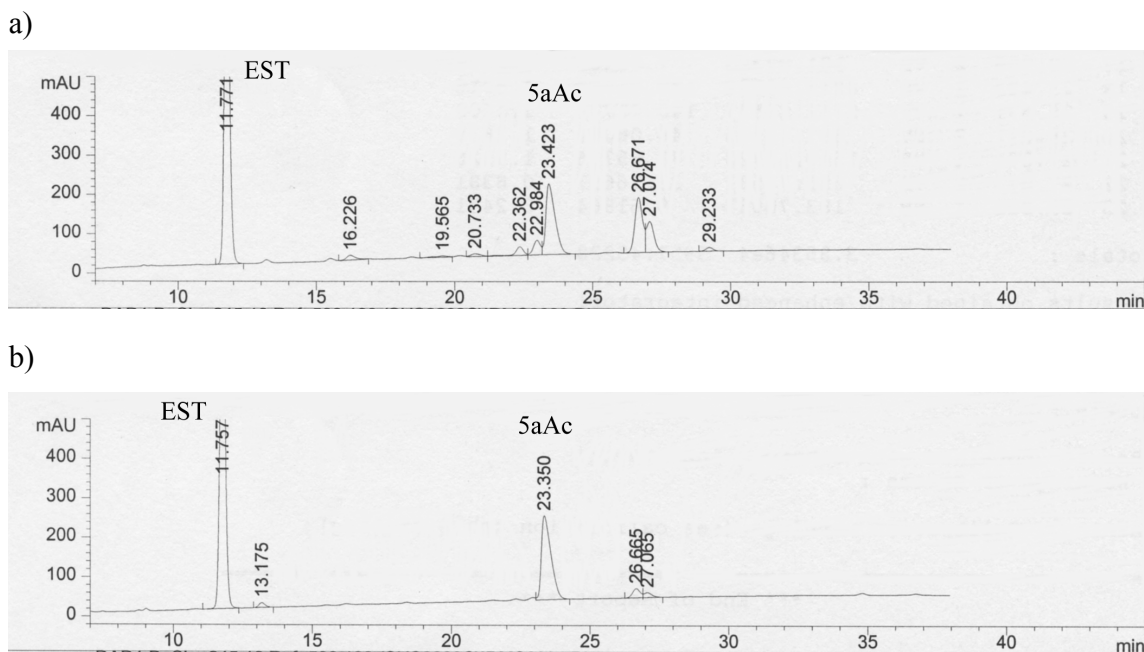


b)



Kuva 22. Nestekromatografi-kromatogrammi asetyloidun steroidistandardi $5\alpha:n$ analyysistä: a) inkubaatio-olosuhteet 70 °C 45 min ja b) inkubaatio-olosuhteet 80 °C 1 h. Kolonni käänteisfaasikolonni (Agilent Technologies Lichrospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5 μ m). Esikolonni oktadekyylisilaanikolonni (Agilent Technologies ODS Hypersil, 20 mm x 4 mm, 5 μ m). Injektio-tilavuus 50 μ l, lämpötila 30 °C ja aallonpituus 192 nm. Gradientti Milli-Q-vesi: 90 % asetontriili 23:77 % (v/v) \rightarrow 0:100 % 33 min aikana, pito 5 min 90 % asetontriili.

Asetylointia testattiin myös eri valmistajan derivatisointireagenssilla (etikkahappoanhydridi). Asetyloinnin havaittiin olevan erittäin herkkä käytetyille reagensseille, ja jopa käytetyn etikkahapon valmistajan vaikuttavan asetyloinnin täydellisyyteen (Kuva 23). Sigma Aldrichin etikkahappoanhydridillä asetyloidun $5\alpha:n$ kromatogrammissa (Kuva 23 b) esiintyy huomattavasti vähemmän häiritseviä piikkejä kuin Merckin etikkahappoanhydridillä asetyloidun $5\alpha:n$ kromatogrammissa (Kuva 23 a). Asetyloinnissa päätettiin siis käyttää Sigma Aldrichin etikkahappoanhydridiä.



Kuva 23. Nestekromatografi-kromatogrammi asetyloidun streoidistandardi 5α :n analyysistä (inkubaatio-olosuhteet $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 min): a) etikkahappoanhydridi Merck ja b) etikkahappoanhydridi Sigma Aldrich. Parametrit vastaavat kuin kuvassa 22.

Häiritsevien piikkien pääteltiin johtuvan osittain diolityyppisten steroidien epätäydellisestä diasetylaatiosta ja osittain asetylointituotteiden hajoamisesta. Häiritsevien piikkien tunnistus pyrittiin selvittämään GC-MS:llä siinä onnistumatta. Steroidiasetaattien retentioajat kuitenkin selvitettiin nestekromatografilla ja ne on esitetty taulukossa 19.

Taulukko 19. Asetyloitujen steroidien sarjojen välisten ($n = 5$) retentioaikojen keskiarvo (KA) nestekromatografilla, retentioaikojen keskihajonta (SD) ja suhteellinen keskihajonta (RSD).

Nestekromatografinen analyysi			
Yhdiste	KA (min)	SD	RSD (%)
epiTAc	7,34	0,06	0,80
5-ENAc	19,04	0,22	1,15
5 β Ac	20,89	0,25	1,21
5 α Ac	22,67	0,24	1,04
PDAc	29,06	0,29	1,00

Asetyloitujen steroidien retentioajoissa ei ollut sarjojen välillä paljon vaihtelua. RSD vaihteli välillä 0,80-1,21 %.

9.3 Nestekromatografinen fraktiointi

Nestekromatografinen fraktiointi optimoitiin asetyloimattomille ja asetyloiduille steroideille analysoimalla steroidistandardeja. Steroidistandardit tutkittiin yksitellen jotta retentioajoista saatiin varmuus. Yhdisteiden sarjojen välisten retentioaikojen keskiarvot ja määritetyt fraktiot on koottu taulukkoon 20.

Taulukko 20. Steroidien sarjojen välisten (n = 3 LC1-fraktioinneille, n = 5 LC2-fraktioinnille) retentioaikojen keskiarvot (KA), retentioaikojen keskihajonnat (SD), suhteelliset keskihajonnat (RSD) ja kerätyt fraktiot eri fraktioinneissa.

LC1-fraktiointi, gradientti A					LC1-fraktiointi, gradientti B				
Yhdiste	RT (KA, min)	SD	RSD (%)	Fraktio	Yhdiste	RT(KA, min)	SD	RSD (%)	Fraktio
11-OHA	8,34	0,05	0,63	I	11-OHA	9,48	0,05	0,54	I
T	-	-	-	II	T	-	-	-	II
epiT	12,04	0,06	0,50	III	epiT	15,49	0,10	0,61	III
5β	12,27	0,07	0,58		5β	16,10	0,08	0,49	
5α	13,08	0,08	0,63		5α	17,36	0,05	0,27	
E	13,92	0,11	0,77	IV	E	18,81	0,08	0,44	V
A	14,77	0,11	0,74		A	20,21	0,05	0,24	
PD	16,73	0,12	0,69	V	PD	23,44	0,14	0,58	VI
EST	21,05	0,005	0,02	-	EST	27,18	0,03	0,13	-
LC2-fraktiointi									
Yhdiste	RT(KA, min)	SD	RSD (%)	Fraktio					
epiTAc	7,34	0,06	0,80	I					
EST	11,33	0,18	1,55	-					
5-ENAc	19,04	0,22	1,15	II					
5βAc	20,89	0,25	1,21	III					
5αAc	22,67	0,24	1,04	IV					
PDAc	29,06	0,29	1,00	V					

a) Gradientti A: Milli-Q-vesi: 90% asetonitriili (ACN) 63:37 % (v/v) → 0:100 % 22 min aikana.

b) Gradientti B: Milli-Q-vesi: 90% asetonitriili (ACN) 67:33 % (v/v) → 39:61 % 21 min aikana → 0:100 % 5 min aikana, pito 5 min 90 % asetonitriili.

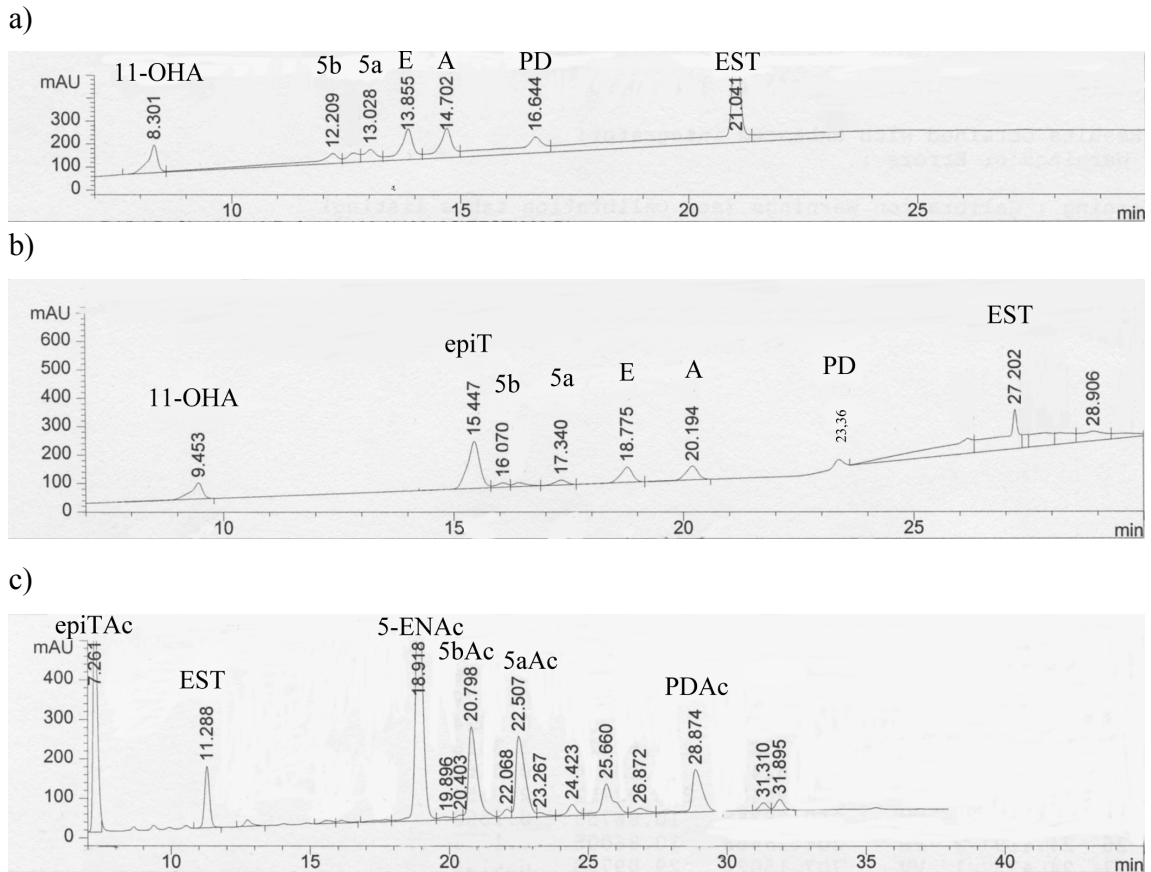
c) LC2-fraktioinnin gradientti: Milli-Q-vesi: 90 % asetonitriili 23:77 % (v/v) → 0:100 % 33 min aikana, pito 5 min 90 % asetonitriili.

LC1-fraktioinnissa testattiin kahta gradienttia, A ja B. Gradienttia A käytettäessä keräysajat määritettiin niin, että asetyloitavat ja asetyloimattomat yhdisteet kerättiin eri fraktioihin. Asetyloimattomina E:n ja A:n retentioajat eroavat GC-MS:lla (Taulukko 18), joten ne voitiin kerätä samana fraktioon.

Gradienttia B käytettäessä yhdisteet saatiin paremmin erottumaan toisistaan. Etenkin 5β ja 5α kohdalla voitiin olla varmoja, että fraktioon saataisiin kerättyä koko steroidi eikä isotooppifraktioitumista tapahdu fraktion keräysvaiheessa. Nestekromatografilla eri isotoopit erottuvat toisistaan hieman ja liian lyhyillä fraktionkeräysajoilla saattaa olla vaikutusta steroidin $\delta^{13}\text{C}$ -arvoon.⁷² 5α ja 5β päätettiin jo tässä vaiheessa erottaa eri fraktioihin ja käyttää LC1-fraktioinnissa gradienttia B. Fraktionkeräyksen jälkeen fraktiot I ja IV jätettäisiin odottamaan GC-C-IRMS-analyysiä varten ja loput fraktiot asetyloitaisiin (9.2 Derivatisointi) ja LC2-fraktioitaisiin.

LC2-fraktioinnissa testattiin yhtä gradienttia. Kerätyt fraktiot on esitetty taulukossa 20. Keräysajat määritettiin niin että jokainen yhdiste kerättiin omaan fraktioonsa jotta GC-C-IRMS:lla samaan aikaan eluoituvat yhdisteet ($5\alpha\text{Ac}$ ja $5\beta\text{Ac}$) saatiin erotettua. Tarvittaessa muita fraktioita voitaisiin myös yhdistää GC-C-IRMS-analyysiä varten. Asetyloinnin sisäinen standardi 5-ENAc kerättiin myös GC-C-IRMS-analyysiä varten.

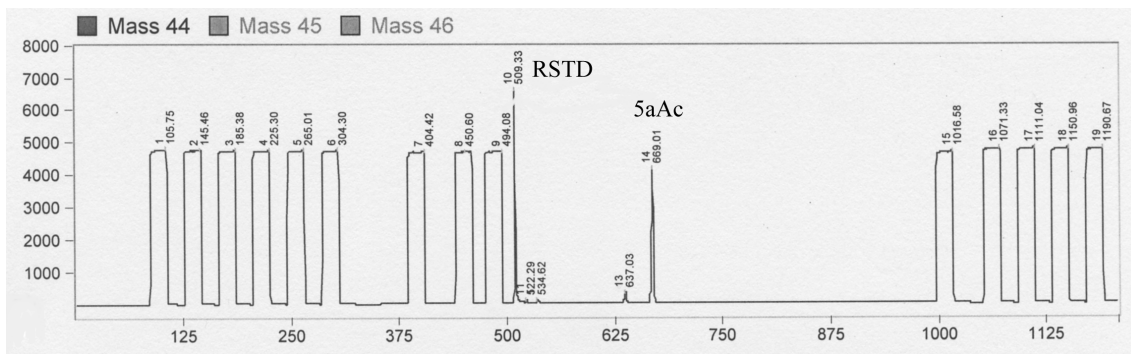
EST toimi RT-markkerina hyvin kaikissa kolmessa testatussa gradientissa: sen intensiteetti oli riittävä ja se eluoitui erillään muista yhdisteistä (Kuva 24). EST:n avulla tarkistettiin retentioaikojen, ja siten fraktion keräysaikojen, pysyvyys näytteissä. Kontrollien avulla keräysajat oli helppo määrittää jokaisessa tutkitussa ajogradientissa (Kuva 24) sillä kerätyt fraktiot olivat selvästi erillään toisistaan.



Kuva 24. LC1-kontrollin kromatogrammi ja tutkittavien steroidien piikit a) LC1-fraktiointi, gradientti A, b) LC1-fraktiointi, gradientti B, c) LC2-fraktiointi. Kolonni käänteisfaasikolonni (Agilent Technologies Lichrospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5 μ m). Esikolonni oktadekyylisilaanikolonni (Agilent Technologies ODS Hypersil, 20 mm x 4 mm, 5 μ m). Injektioilavuus 50 μ l, lämpötila 30 °C ja aallonpituus 192 nm. Gradientti a) Milli-Q-vesi: 90% asetonitrili (ACN) 63:37 % (v/v) \rightarrow 0:100 % 22 min aikana, b) Milli-Q-vesi: 90% asetonitrili (ACN) 67:33 % (v/v) \rightarrow 39:61 % 21 min aikana \rightarrow 0:100 % 5 min aikana, pito 5 min 90 % asetonitrili, c) Milli-Q-vesi: 90 % asetonitrili 23:77 % (v/v) \rightarrow 0:100 % 33 min aikana, pito 5 min 90 % asetonitrili.

9.4 Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi

Asetyloituina analysoitavien steroidien retentiojärjestys tutkittiin. Steroidistandardit analysoitiin yksitellen GC-C-IRMS-laitteistolla asetyloituina ja LC2-fraktioituina. Asetaattien intensiteetit olivat hyvät, kuten 5 α Ac:n kromatogrammista voidaan todeta (Kuva 25).



Kuva 25. $5\alpha\text{Ac}$:n GC-C-IRMS-kromatogrammi. Kolonni keskipoolinen polysiloksaanikolonni (Macherey & Nagel, Optima- δ -3, 20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μm). Esikolonni faasiton silikakapillaari (Agilent Technologies, 2 m x 0,32 mm). Injektio-tilavuus 1 μl (spliless), injektorin lämpötila 300 °C. Uunin alkulämpötila 60 °C (pito 1,5 min), lämpötilan nosto 35 °C/min 265 °C:een asti ja 3 °C/min loppulämpötilaan 300 °C. Kantokaasu helium vakiovirtaudella 2 ml/min.

Asetyloituina analysoitavien steroidien retentioajat määritettiin kolmesta rinnakkaisesta näytteestä, tulokset on esitetty taulukossa 21.

Taulukko 21. Uusien asetyloituina analysoitavien steroidien retentioaikojen keskiarvot (KA, n = 3) sekunneissa ja minuuteissa GC-C-IRMS -laitteella, retentioaikojen keskihajonta (SD) ja suhteellinen keskihajonta (RSD).

GC-C-IRMS-analyysi				
	RT (KA, s)	RT (KA, min)	SD (s)	RSD (%)
epiTAc	692,1	11,53	0,50	0,07
$5\alpha\text{Ac}$	670,6	11,18	0,12	0,02
$5\beta\text{Ac}$	669,5	11,16	0,22	0,03
PDAc	768,8	12,81	0,23	0,03
5-ENAc	673,6	11,23	0,20	0,03

Retentioaikojen sarjan sisäinen toistettavuus oli erittäin hyvä, RSD vaihteli välillä 0,02-0,07 %.

Jokaiseen näytteeseen ennen GC-C-IRMS-analyysiä lisättävän sisäisen standardin, RSTD:n, $\delta^{13}\text{C}$ -arvon tulee olla ennalta määrättyissä rajoissa tulosten oikeellisuuden takaamiseksi. RSTD:n $\delta^{13}\text{C}$ -arvot eivät pysyneet joka näytteen kohdalla laboratorion määrittämässä rajoissa (-29,2 ‰...-30,4 ‰) vaikka osa näytteistä analysoitiinkin uudestaan. Korjauskertoimien laskemista varten kolmen rinnakkaisen asetyloidun ja

asetyloimattoman steroidistandardin $\delta^{13}\text{C}$ -arvot koottiin ja laskettiin jokaiselle steroidille korjauskerroin $\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$. Tulokset on esitetty taulukossa 22.

Korjauskerroin laskettiin käyttäen kaavaa (3)⁶² :

$$n_{\text{cd}}\delta^{13}\text{C}_{\text{cd}} = n_{\text{c}}\delta^{13}\text{C}_{\text{c}} + n_{\text{d}}\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}} \Leftrightarrow \quad (3)$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}} = (n_{\text{cd}}\delta^{13}\text{C}_{\text{cd}} - n_{\text{c}}\delta^{13}\text{C}_{\text{c}}) / n_{\text{d}}$$

jossa n on hiilten lukumäärä yhdisteessä, c on yhdiste ja cd on asetyloitu yhdiste. Korjauskertoimet laskettiin suoraan kolmen rinnakkaisen näytteen $\delta^{13}\text{C}$ -arvon keskiarvoista.

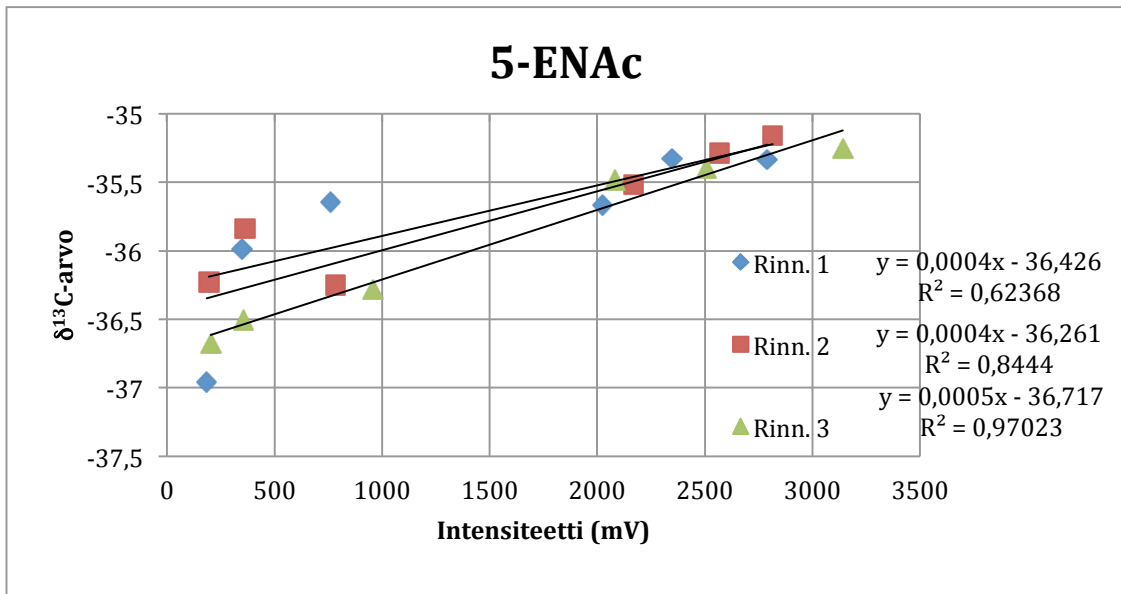
Taulukko 22. Kolmen rinnakkaisen asetyloidun ja asetyloimattoman steroidistandardin $\delta^{13}\text{C}$ -arvot, arvojen keskiarvot (KA), keskihajonta (SD), suhteellinen keskihajonta (RSD) ja lasketut korjauskertoimet ($\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$).

Yhdiste	Rinnakkainen			KA	SD	RSD (%)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$ (‰)
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) ₁	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) ₂	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) ₃				
epiT	-27,798	-27,478	-27,484	-27,587	0,183	-0,66	-66,79
epiTAc	-31,428	-31,274	-31,260	-31,321	0,093	-0,30	
5 α	-29,052	-29,053	-30,347	-29,484	0,747	-2,53	-58,55
5 α Ac	-35,269	-34,332	-34,015	-34,539	0,652	-1,89	
5 β	-30,790	-30,510	-30,743	-30,681	0,150	-0,49	-48,14
5 β Ac	-34,577	-33,492	-33,083	-33,717	0,772	-2,29	
PD	-28,516	-29,026	-29,044	-28,862	0,300	-1,04	-31,62
PDAc	-31,911	-28,058	-27,941	-29,303	2,259	-7,71	
5-EN	-29,428	-29,372	-29,364	-29,388	0,035	-0,12	-59,315
5-ENAc	-35,017	-34,438	-34,323	-34,593	0,372	-1,08	

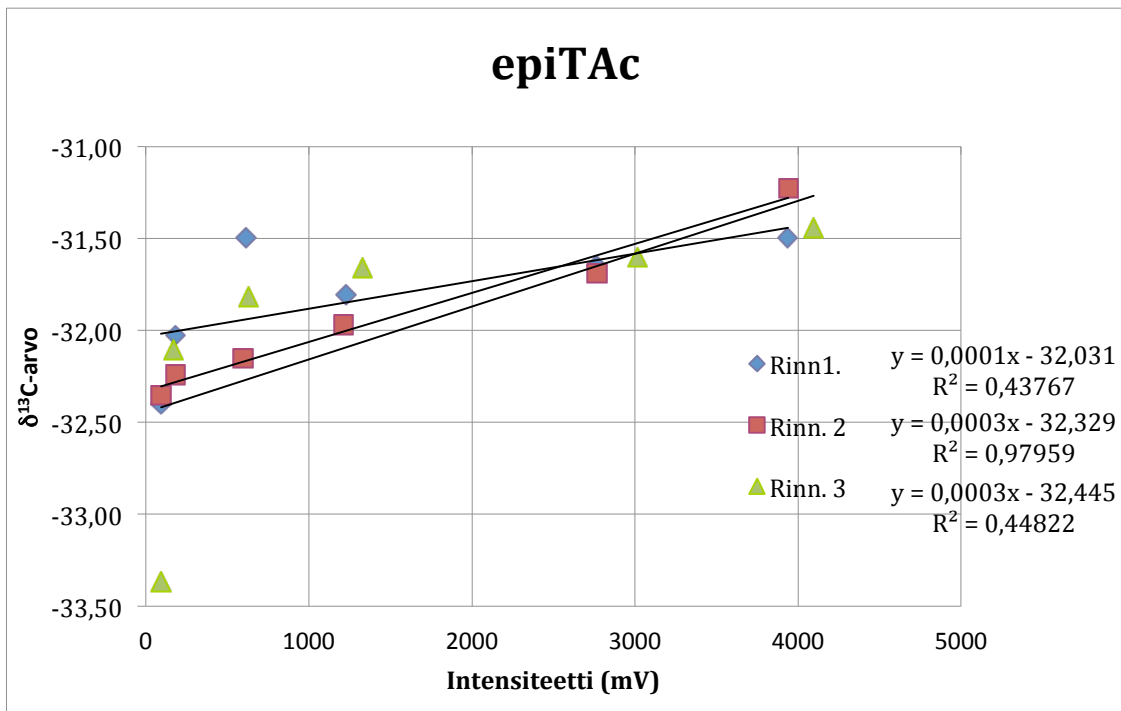
Korjauskertoimen $\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$ pitäisi olla samansuuruinen jokaiselle yhdisteelle, sillä jokainen steroidi asetyloitiin. $\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$ kuitenkin vaihteli -31,62 ‰:n ja -66,79 ‰:n välillä. 5 β Ac:n ja PDAc:n korjauskertoimet poikkesivat muiden yhdisteiden korjauskertoimista erittäin paljon. Tämä on nähtävissä myös yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoista, jotka vaihtelevat rinnakkaisissa näytteissä: PDAc:n RSD on jopa -7,71 %. Vaihtelevat RSTD:n $\delta^{13}\text{C}$ -arvot, yhdisteiden epätäydellinen asetyloituminen tai asetyloitujen tuotteiden hajoaminen (9.2 Derivatisointi) sekä mahdollisesti riittämättömät nestekromatografisen fraktioinnin keräysajat saattavat olla syynä vaihteleviin korjauskertoimien arvoihin.

Linearisuuskokeiden analyysistä tarkkailtiin yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja ja piikkien intensiteettejä, jotka on esitetty liitteessä 1. Linearisuuden tutkimiseksi piirrettiin eri yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvo vs. piikin intensiteetti -kuvaajat kolmista rinnakkaisista näytteistä. Kuvaajat on esitetty kuvassa 26.

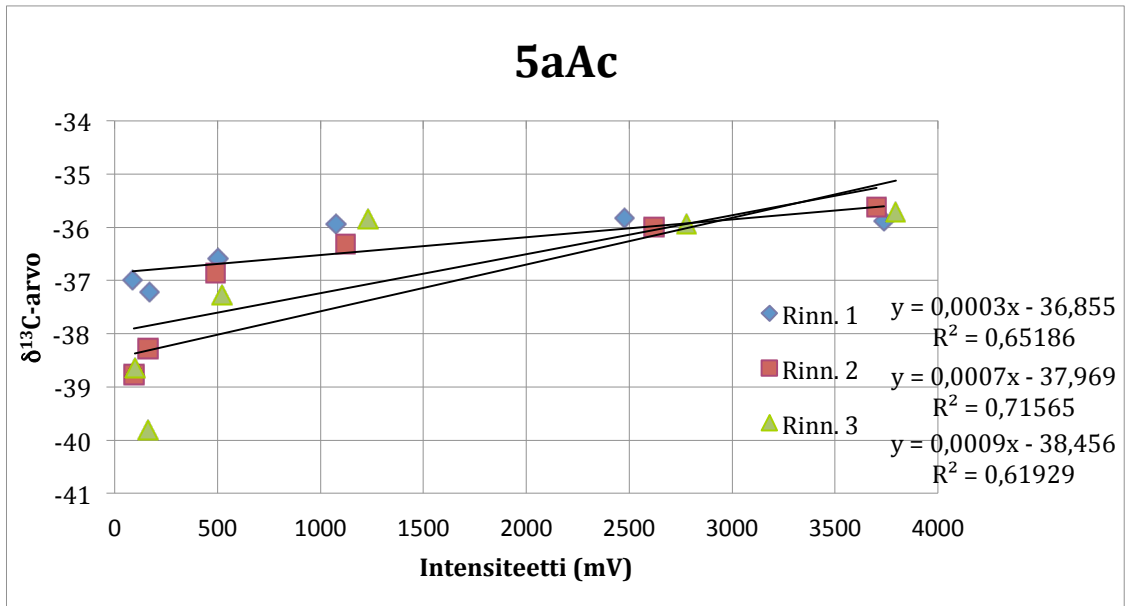
a)



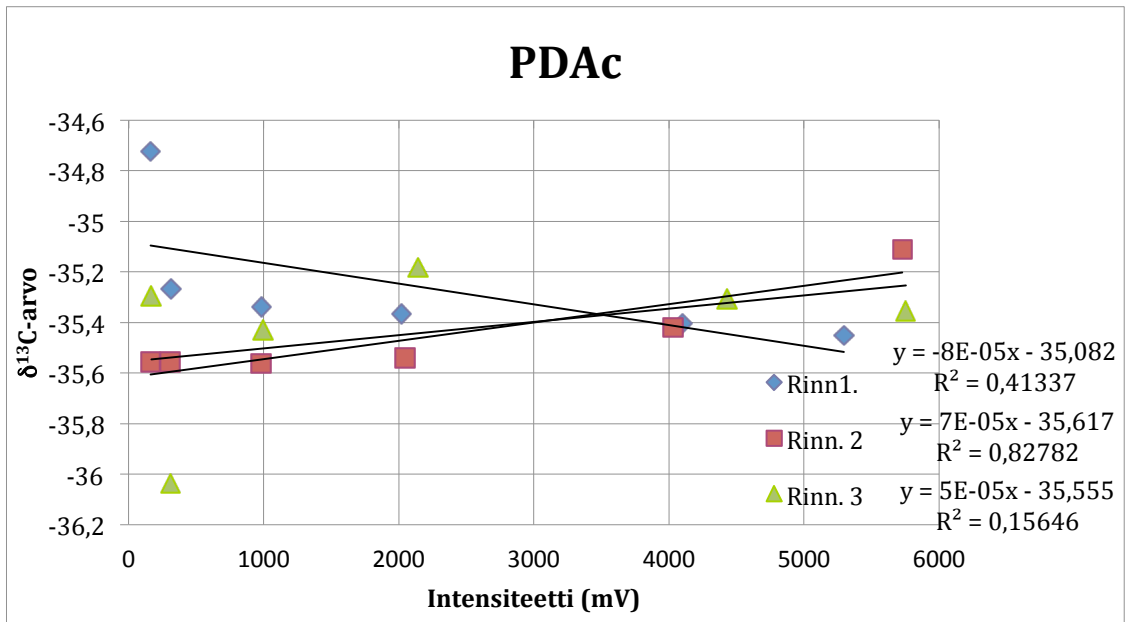
b)



c)



d)



Kuva 26. Linearisuuden tutkimiseksi piirretyt steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvo vs. piikin intensiteetti -kuvaajat, a) 5-ENAc, b) epiTAc, c) 5 α Ac ja d) PDAc.

Kuvaajasta saadun suoran kulmakertoimen kuvaa lineaarisuutta eli $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen riippuvuutta piikkien intensiteetistä. Kulmakertoimet on koottu taulukkoon 23. Mittausalueella piikkien intensiteetin vaikutuksen $\delta^{13}\text{C}$ -arvoihin tulisi olla mahdollisimman vähäistä, eli

kulmakertoimen olla mahdollisimman lähellä nollaa. Kaikkien tutkittavien yhdisteiden kulmakertoimet on esitetty taulukossa 23. Ne olivat hyvin pienet ja intensiteettien kasvaessa, eli korkeimmilla pitoisuuksilla, yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot eivät juurikaan muutu. Mitatulla mittausalueella (5 α Ac, epiTAc ja 5-ENAc pitoisuudella 5-150 $\mu\text{g/ml}$, PDAc pitoisuuksilla 10-300 $\mu\text{g/ml}$) menetelmä oli siis lineaarinen.

Taulukko 23. Rinnakkaisten lineaarisuuskoenäytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvo vs. piikin intensiteetti - kuvaajien kulmakertoimet rinnakkaisissa näytteissä ja kulmakertoimien keskiarvot (KA).

Yhdiste	Rinnakkainen			KA
	1	2	3	
5-ENAc	4 E-4	4 E-4	5 E-4	4,3 E-4
5 α Ac	3 E-4	7 E-4	9 E-4	6,3 E-4
PDAc	8 E-5	7 E-5	5 E-5	6,7 E-5
epiTAc	1 E-4	3 E-4	3 E-4	4,3 E-4

Menetelmän herkkyyttä ja toteamisrajaa tutkittiin lineaarisuuden yhteydessä laskemalla matalimpien pitoisuuksien näytteillä (injektoitavan liuoksen pitoisuudet: 5 α Ac, epiTAc ja 5-ENAc 5-25 $\mu\text{g/ml}$, PDAc 10-50 $\mu\text{g/ml}$) toistettavuutta kuvaava $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen suhteellinen keskihajonta RSD. Tulokset on esitetty taulukossa 24.

Taulukko 24. Laimeimpien rinnakkaisten (n = 3) näytteiden pitoisuudet, steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvot, niiden keskiarvot (KA), keskihajonnat (SD) ja suhteelliset keskihajonnat (RSD).

Pitoisuus 5 $\mu\text{g/ml}$ (PD 10 $\mu\text{g/ml}$)						
Yhdiste	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 3	KA	SD	RSD (%)
5 α Ac	-36,988	-38,770	-38,642	-38,13	0,994	-0,03
epiTAc	-32,400	-32,355	-33,366	-32,71	0,571	-1,75
PDAc	-34,722	-35,555	-35,295	-35,19	0,426	-1,21
5-ENAc	-36,955	-36,229	-36,678	-36,62	0,366	-1,00
Pitoisuus 10 $\mu\text{g/ml}$ (PD 20 $\mu\text{g/ml}$)						
Yhdiste	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 3	KA	SD	RSD (%)
5 α Ac	-37,213	-38,273	-39,801	-38,43	1,301	-3,39
epiTAc	-32,026	-32,243	-32,103	-32,12	0,110	-0,34
PDAc	-35,268	-35,554	-36,037	-35,62	0,389	-1,09
5-ENAc	-35,986	-35,839	-36,503	-36,11	0,349	-0,97
Pitoisuus 25 $\mu\text{g/ml}$ (PD 50 $\mu\text{g/ml}$)						
Yhdiste	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰), 3	KA	SD	RSD (%)
5 α Ac	-36,584	-36,856	-37,269	-36,90	0,345	-0,94
epiTAc	-31,495	-32,150	-31,817	-31,82	0,328	-1,03
PDAc	-35,338	-35,563	-35,429	-35,44	0,113	-0,32
5-ENAc	-35,644	-36,251	-36,284	-36,06	0,360	-1,00

$\delta^{13}\text{C}$ -arvojen RSD:n mukaan menetelmä oli hyvin toistettava tutkitulla pitoisuusalueella. Sen arvoissa ei ollut havaittavaa eroa eri yhdisteiden tai pitoisuuksien välillä vaan arvot vaihtelivat -0,03 %:n ja -3,39 %:n välillä.

Signaalin suhde taustakohinaan (S/N) laskettiin pienempien pitoisuuksien näytteiden kromatogrammeista. Rinnakkaisten näytteiden S/N-arvossa ei ollut havaittavaa eroa. Yhdistekohtaiset S/N-arvot näytteissä on esitetty taulukossa 25. Mitä suurempi on signaalin suhde taustakohinaan, eli mitä suuremman arvon S/N saa, sitä herkempi menetelmä on. Kun S/N saa arvon yli 5 tai 6 katsotaan herkkyuden yleensä olevan riittävä kvantitatiiviseen mittaukseen. Pienimmälläkin pitoisuudella S/N oli hyvä 7,25-18,83, korkeimmassa jopa 61,00 5-ENAc:lle.

Taulukko 25. Laimeimpien rinnakkaisten (n = 3) lineaarisuusnäytteiden pitoisuudet ja steroidikohtaiset S/N-arvot.

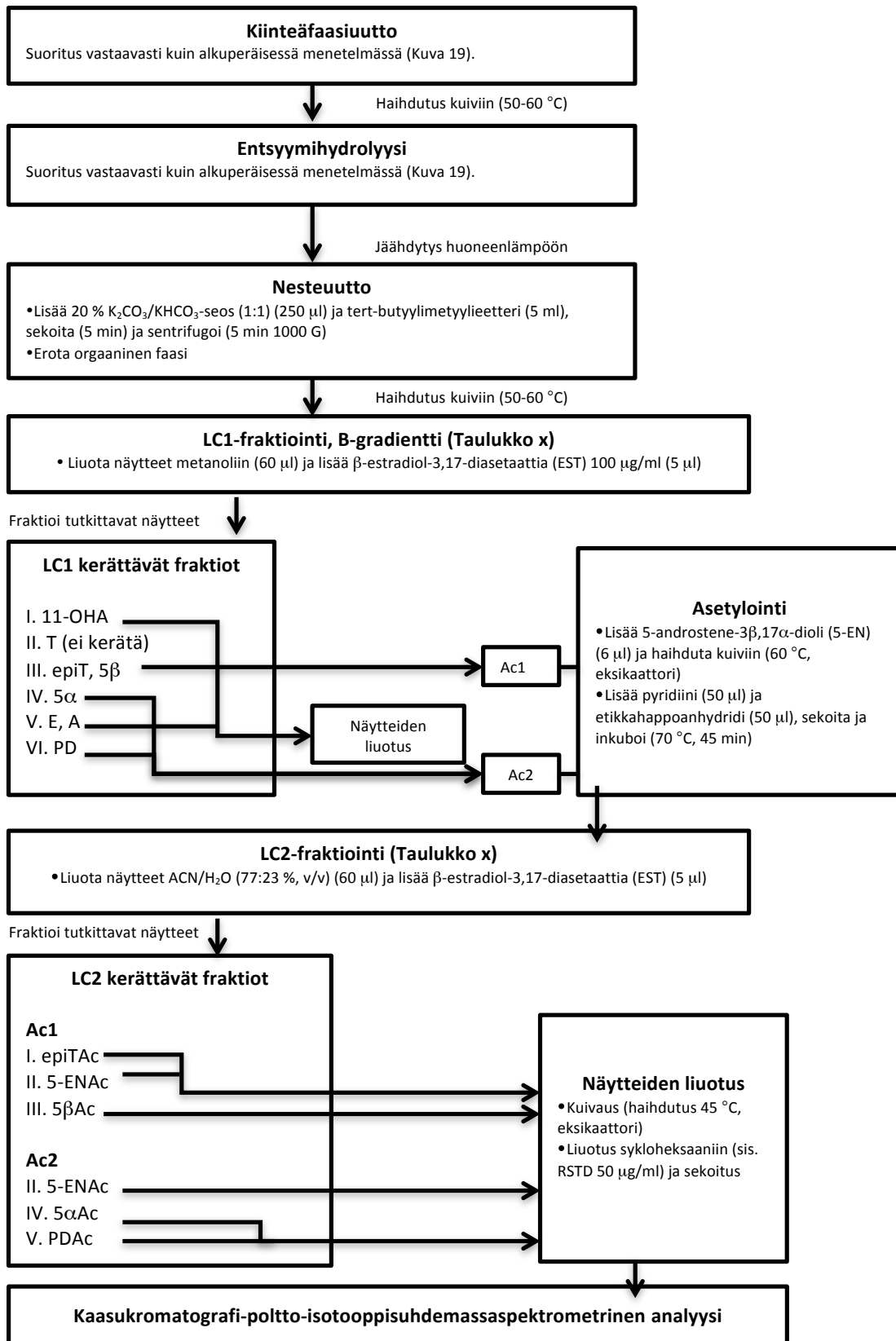
Pitoisuus	Yhdiste			
	epiTAc	5 α Ac	PDAc	5-ENAc
5 $\mu\text{g/ml}$, PD 10 $\mu\text{g/ml}$	7,75	7,25	13,25	18,83
10 $\mu\text{g/ml}$, PD 20 $\mu\text{g/ml}$	10,57	9,86	18,29	29,00
25 $\mu\text{g/ml}$, PD 50 $\mu\text{g/ml}$	9,50	7,75	15,00	61,00

Toteamisrajan todettiin olevan siis vähintään 5 $\mu\text{g/ml}$ sillä tutkittujen yhdisteiden S/N oli riittävä kvantitatiiviseen mittaukseen ja lisäksi $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen toistettavuus oli hyvä.

9.5 Lopullinen menetelmä

Menetelmäkehityksessä optimoitiin näytteen esikäsittely, asetylointi, nestekromatografinen fraktiointi ja kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi uusille asetyloiduille yhdisteille. Lopullista menetelmää testattiin steroidistandardeilla ja biologisilla näytteillä.

Steroidistandardeille näytteen esikäsittelyä ei suoritettu, vaan haihdutetut standardit liuotettiin suoraan metanoliin LC1-fraktiointia varten. Biologisille näytteille suoritettiin koko optimoitu näytteen esikäsittely. Näytteet käsiteltiin optimoidun lopullisen menetelmän mukaisesti. Lopullisen menetelmän työohje on esitetty kaaviona kuvassa 27.

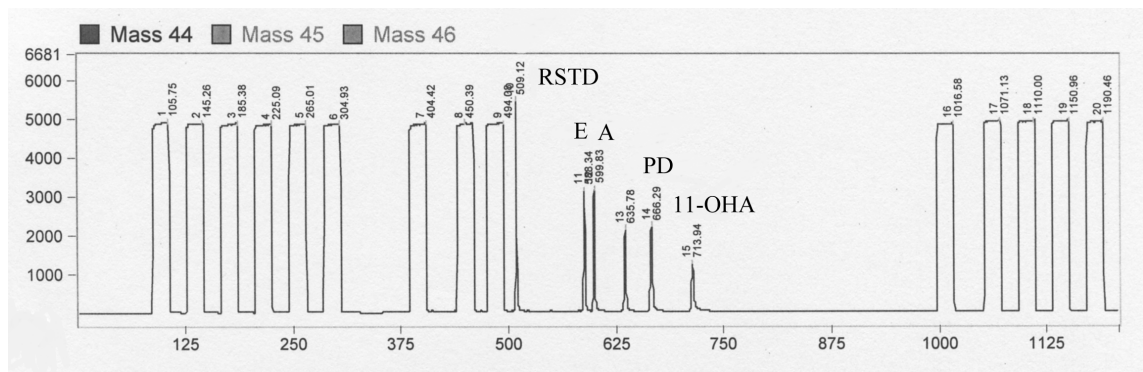


Kuva 27. Kaaviokuva lopullisesta menetelmästä.

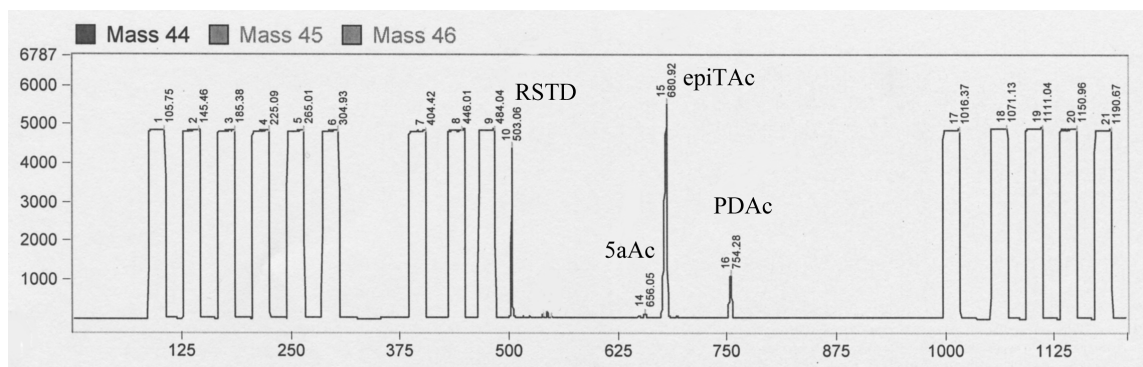
Näytteet puhdistettiin kiinteäfaasiuutolla, hydrolysoitiin entsymaattisesti ja uutettiin orgaaniseen liuottimeen. Näytteet puhdistettiin ja fraktioitiin nestekromatografisesti. Osa fraktioista jätettiin odottamaan GC-C-IRMS-analyysiä ja osa asetyloitiin ja fraktioitiin tämän jälkeen uudestaan nestekromatografisesti. Analyysiin otettiin IRMS-mix 1:n lisäksi mukaan uusi kontrolli, IRMS-mix 2, joka myös asetyloitiin ja LC2-fraktioitiin (Taulukko 13).

Laitteiston käyttökunto tarkistettiin ennen analyysijä käyttäen standardiseoksia IRMS-mix 1 ja IRMS-mix 2 (Taulukko 13). Standardiseosten kromatogrammit on esitetty kuvassa 28.

a)



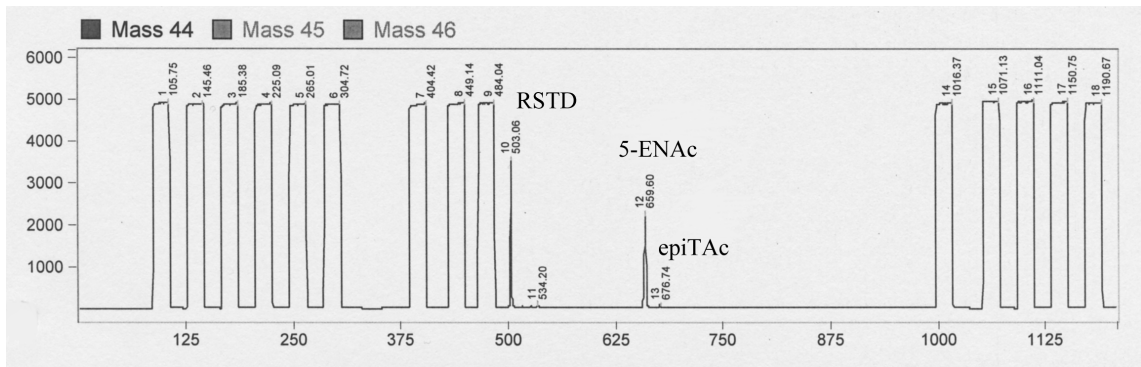
b)



Kuva 28. GC-C-IRMS-kromatogrammi, johon on merkitty tutkittavat yhdisteet, a) IRMS-mix 1, b) IRMS-mix 2. Kolonni keskipoolinen polysiloksaanikolonni (Macherey & Nagel, Optima- δ -3, 20 m x 0,25 mm, filmi 0,25 μ m). Esikolonni faasiton silikakapillaari (Agilent Technologies, 2 m x 0,32 mm). Injektio tilavuus 1 μ l (suora), injektorin lämpötila 300 °C. Uunin alkulämpötila 60 °C (pito 1,5 min), lämpötilan nosto 35 °C/min 265 °C:een asti ja 3 °C/min loppulämpötilaan 300 °C. Kantokaasu helium vakiovirtaudella 2 ml/min.

Steroidistandardit analysoitiin GC-C-IRMS-laitteistolla poikkeuksellisesti omissa fraktioissaan. Standardien analyyseistä tarkkailtiin yhdisteiden kromatografiaa sekä retentioaikoja ja $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja. Arvot vastasivat aiemmin analysoitujen steroidistandardien vastaavia (Taulukko 21, 22). Yhdisteiden identifioinnin varmistamiseksi näytteet analysoitiin myös GC-MS:lla ja tarkasteltiin steroidien puhtautta ja spektrejä. Spektrit vastasivat aiemmin analysoitujen steroidistandardien spektrejä (Kuva 21). Menetelmä siis toimi steroidistandardeja käytettäessä.

Biologisten näytteiden analyyseistä tarkkailtiin tutkittavien yhdisteiden kromatografista erottumista, retentioaikoja ja $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja. Yhdisteiden intensiteetit olivat kuitenkin liian alhaiset luotettavaan $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen vertailuun (Kuva 29). Varsinkin $5\alpha\text{Ac}$:n, $5\beta\text{Ac}$:n ja epiTAc:n intensiteetit olivat heikot. Sarjan sisäisen toistettavuuden tutkiminen ei siis onnistunut. Heikot intensiteetit johtuivat todennäköisesti fraktioiden yhdistämisessä tapahtuvasta hävikistä ja pienistä liuotustilavuuksista. Liuotuskäytäntöä ja liuotusputkia vaihtamalla hävikki saataisiin minimoitua ja toistettavuus tutkittua.



Kuva 29. Lopullisen menetelmän testaus biologisilla näytteillä, GC-C-IRMS-analyysi positiivisen QC:n näytteestä (yhdisteet 5-ENAc ja epiTAc). Parametrit vastaavat kuin kuvassa 28.

Menetelmän oikeellisuutta tutkittiin kahdella standardinäytteellä, joiden sisältämien yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot tunnettiin. Yhdisteiden intensiteetit olivat matalia, mutta oikeellisuutta päätettiin silti tarkastella. Tulokset on esitetty taulukossa 26, jossa on esitetty myös muiden laboratorioden ($n = 22$) tulosten keskiarvo ja niiden välinen hajonta. Toisen näytteen PDAc:n tuloksia ei ole esitetty koska analyysi epäonnistui. Tunnetut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot ja laboratorioden välisten $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen tulokset oli ilmoitettu asetyloimattomista yhdisteistä.

Siksi asetyloituna analysoitujen steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvot piti laskea käyttäen korjauskertoimia (Taulukko 22) ja kaavaa 3.

Taulukko 26. Kahden näytteen sisältämien tunnetut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot omaavien yhdisteiden retentioajat, mitatut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot, korjauskertoimet ($\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$), korjauskertoimen avulla lasketut asetyloimattoman steroidin $\delta^{13}\text{C}$ -arvot, tunnetut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot, laboratorioden (n = 22) välisten $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen tulosten keskiarvo (KA), mitattujen tulosten poikkeama ja laboratorioden $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen välinen hajonta.

Näyte	Yhdiste	RT (s)	Intensiteetti	Mitattu $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{dcorr}}$ (‰)	Laskettu $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Tunnetut $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Laboratorioden $\delta^{13}\text{C}$ (‰) KA	Poikkeama (‰)	Laboratorioden välinen hajonta (‰)
1	5 β Ac	656,1	345	-33,401	-48,14	-30,298	-	-29,09	-1,20	-3,1...+3,3
	5 α Ac	656,3	793	-39,23	-58,55	-35,163	-	-31,01	-4,15	-3,3...+3,4
	PDAc	753,9	978	-20,809	-31,62	-18,750	-	-19,76	1,01	-3,2...+5,3
2	PDAc	-	-	-	-31,62	-	-31,58	-31,18	-	-5,7...+2,8
	E	579,8	2674	-28,845	-	-	-28,83	-28,88	-0,02	-3,4...+1,9
	A	590,6	2722	-26,717	-	-	-27,26	-27,39	0,54	-2,3...+3,2

Tuloksista voidaan havaita, että A ja E tulokset olivat erittäin vertailukelpoisia eivätkä mitatut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot poikenneet juurikaan tunnetuista $\delta^{13}\text{C}$ -arvoista. Yhdisteiden mittaustulokset olivatkin luotettavat hyvien intensiteettien vuoksi. Näytteen 1 sisältämien yhdisteiden intensiteetit olivat niin pienet, ettei laitteisto pystynyt enää luotettavasti mittaamaan $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja. Silti 5 α Ac:a lukuunottamatta korjauskertoimien avulla lasketut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot poikkeivat vain vähän laboratorioden välisten $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen keskiarvosta ja mahtuivat laboratorioden tulosten väliseen hajontaan. 5 α Ac:n kohdalla havaittiin selvä poikkeama, joka johtui kenties epätäydellisestä asetyloitumisesta ja isotooppifraktioitumisesta.

10. JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn kirjallisessa osuudessa paneuduttiin luontaisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa hyödynnettäviin analyttisiin menetelmiin. Lisäksi kirjallisessa osuudessa käsiteltiin steroidien endogeenisyyden tuomaa haastetta analytiikalle ja Maailman Antidopingtoimiston tarkasti ohjaaman analytiikan vaatimuksia.

Laiteteknisen kehityksen todettiin mahdollistaneen seulonta-analyysin suorittamisen yhä herkemmin, yksinkertaisemmin ja nopeammin. Pitkään analytiikkaa hallinneiden kaasukromatografisten menetelmien sijaan yhä useampi uusista tutkimuksista perustuu nestekromatografiaan. Endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa ollaan yhä enemmän siirtymässä tandem-massaspektrometriisiin menetelmiin ja tarkan massan QTOF-analysointilaitteiden hyödyntäminen erityisesti uusien biomarkkereiden etsimisessä on laajan mielenkiinnon kohteena.

Steroidien endogeenisyyden vuoksi niiden analytiikka ja raja-arvojen asettaminen on ollut erityisen haasteellista. Tästä syystä luontaisten steroidien dopingkäytön osoittaminen pohjautuu tulevaisuudessa varmasti yhä enemmän henkilökohtaisiin raja-arvoihin. Urheilijan biologinen passi mahdollistaa pitkän aikavälin tarkkailun ja luontaisten steroidien dopingkäytöstä kertovissa biomarkkereissa tapahtuvan muutoksen osoittamisen helpommin.

Luontaisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa GC-C-IRMS-tekniikan vahvuus on kiistatonta. Tekniikalla pystytään luotettavasti todistamaan steroidin alkuperä sen hiilen isotooppisuhteen perusteella. Nykyään käytössä olevat menetelmät perustuvat hiilen isotooppisuhteen käyttöön, mutta myös vedyn isotooppisuhteen hyödyntämistä on tutkittu. IRMS-tekniikkaa kehitetään yhä herkemmäksi, jolloin sillä voitisiin havaita luontaisten steroidien dopingkäyttö yhä pidempään käytön lopettamisen jälkeen.

Kokeellisen osuuden aiheena oli testosteronin ja eräiden muiden endogeenisten steroidien dopingkäytön osoittamiseen käytettävän GC-C-IRMS-tekniikkaan pohjautuvan menetelmän jatkokehittely. Työssä validoituun analyysimenetelmään lisättiin kohdeyhdisteitä ja pyrittiin näin parantamaan menetelmän herkkyyttä. Uuton ja nestekromatografisen fraktioinnin olosuhteet optimoitiin kohdeyhdisteille, testattiin ja optimoitiin derivatisointimenetelmä niiden kaasukromatografi-poltto-isotooppi-

suhdemassaspektrometristä analyysiä varten ja suoritettiin menetelmän alustavaa testausta ja validointia steroidistandardeilla ja biologisilla näytteillä.

Näytteen esikäsittely optimoitiin nesteuuton osalta testaamalla erilaisia uuttoliuottimia ja nesteuttoa yhdistettynä ulossuolaukseen. Paras saanto saatiin käyttämällä dietyylieetteriä yhdessä ulossuolauksen kanssa (saanto 70,1 %), mutta ulossuolaukseen mahdollisesti liittyvien ongelmien takia päätettiin käyttää tertbutyyylimetyylieetteriä (saanto 63,2 %).

Asetylointi optimoitiin steroidistandardeilla testaamalla erilaisia inkubaatio-olosuhteita ja eri valmistajan reagensseja (etikahappoanhydridi). Näytteet analysoitiin GC-MS:lla ja nestekromatografilla. GC-MS-analyysien perusteella todettiin, että osa yhdisteistä ei erotu asetyloituina toisistaan. Päätettiin analysoida asetyloimatta steroidit androsteroni, etiokolanoloni ja 11 β -OH-androsteroni, joiden analyysimenetelmä on jo validoitu, ja analysoida asetyloituina pregnandioli sekä yhdisteet 5 α -androstaanidioli, 5 β -androstaanidioli ja epitestosteroni. Nestekromatografisista analyyseistä havaittiin, että asetylointi on erittäin herkkä käytetylle inkubaatio-olosuhteelle ja asetylointireagensseille. Inkubaatio-olosuhteina päätettiin käyttää 70 °C 45 min, sillä nestekromatografikromatogrammilla esiintyvät häiritsevät piikit olivat tällöin intensiteetiltään pienempiä. Reagenssivalmistajan valinnan todettiin olevan myös tärkeää asetylointituloksen optimoimiseksi.

Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrinen analyysi optimoitiin asetyloiduilla steroidistandardeilla. Asetyloinnin korjauskerroin määritettiin kokeellisesti analysoimalla asetyloitujen ja asetyloimattomien puhtasaineiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot ($n = 3$). Korjauskertoimen tulisi olla sama yhdisteestä riippumatta, mutta tulos vaihteli -31,62 %:n ja -66,79 %:n välillä. Menetelmän lineaarisuutta tutkittiin steroidistandardien avulla pitoisuusalueella 5-150 $\mu\text{g/ml}$ (5 α -androstaanidiolidiasetaatti, epitestosteroniasetaatti ja 5-androsteeni-3 β ,17 α -diolidiasetaatti) ja 10-300 $\mu\text{g/ml}$ (pregnandiolidiasetaatti). Menetelmä oli lineaarinen kyseisellä määritysalueella, koska steroidien mitatut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot eivät olleet riippuvaisia steroidin pitoisuudesta. Menetelmän herkkyyttä ja detektorajaa tutkittiin laimeimpien näytteiden avulla. Menetelmän todettiin olevan tarpeeksi herkkä myös matalimpien pitoisuuksien (5 α -androstaanidiolidiasetaatti, epitestosteroniasetaatti ja 5-androsteeni-3 β ,17 α -diolidiasetaatti 5 $\mu\text{g/ml}$, pregnandiolidiasetaatti 10 $\mu\text{g/ml}$) määrittämiseen.

Lopullista menetelmää testattiin steroidistandardeilla ja biologisilla näytteillä. Yhdisteiden piikkien intensiteetit jäivät kuitenkin liian alhaisiksi sarjan sisäisen toistettavuuden laskemiseksi. Kahden tunnetun $\delta^{13}\text{C}$ -arvon omaavan näytteen mitattujen $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen perusteella kuitenkin menetelmän oikeellisuus oli pääosin samaa tasoa muiden laboratoriodien kanssa.

Lopullinen menetelmä vaatii vielä lisätutkimusta. Asetylointiongelmista ei päästy täysin eroon, joten asetointi vaatii vielä lisäkokeita ja mahdollisesti eri valmistajien asetointireagenssien testausta. Asetyloinnin mahdollinen epätäydellisyys vaikuttaa asetoidun steroidin $\delta^{13}\text{C}$ -arvoon, joten asetointiongelman selvittyä myös korjauskertoimet on mitattava uudestaan. Myös nestekromatografisen fraktioinnin keräysajat pitää varmistaa riittävän pitkiksi isotooppifraktioitumisen poissulkemiseksi. Näytteiden esikäsittelyn yhteydessä tapahtuva hävikki pitää optimoida sopivien putkien valinnalla ja liuotustekniikalla.

GC-C-IRMS-tekniikan hyödyntäminen luontaisten steroidien dopingkäytön osoittamisessa on välttämätöntä. Tekniikka on haasteellinen ja sen vaatima virtsanäytteen laaja esikäsittely on aikaavievää. GC-C-IRMS-tekniikkaa tutkitaan siis varmasti tulevaisuudessa yhä yksinkertaisempien ja herkempien luontaisten steroidien dopingkäytön osoittamiseen hyödynnettävien analyysimenetelmien mahdollistamiseksi.

11. KIRJALLISUUSVIITTEET

1. World Anti-Doping Code http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf (22.08.2013)
2. www.wada-ama.org, (22.8.2013)
3. The 2013 Prohibited List http://www.wada-ama.org/documents/world_anti-doping_program/wadp-prohibited-list/2013/wada-prohibited-list-2013-en.pdf (17.08.2013)
4. International Standard for Testing http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Testing/2012/WADA_IST_2012_EN.pdf (22.08.2013)
5. International Standard Laboratories versio 7.0 http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf (22.08.2013)
6. Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification_Criteria_for_Qualitative_Assays_May_08_2010_EN.doc.pdf (22.08.2013)
7. Wu, F.W.C. *Clin. Chem.* 43 7 (1997) s. 1289.
8. Wadler, G.G. ja Hainline, B. *Drugs and the athlete*, F. A. Davis Company, Yhdysvallat, 1989, s. 55.
9. Mottram, D.R. *Drugs in Sport, 2. painos*, Taylor & Francis Group, Iso-Britannia, 1996, s. 73.
10. Schänzer, W. *Clin. Chem.* 42 7 (1996) s. 1001.
11. Ayotte, C. *Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids teoksessa Doping in Sports*, toim. Thieme, D. ja Hemmersbach, P., Springer, Saksa, 2010, s. 77.
12. Cawley, A.T. ja George, A.V. *Drug Test. Anal.* (2012).
13. Kickman, A.T. ja Goer, D.B. *Ann. Clin. Biochem.* 40 (2003) s. 321.
14. Parr, M., Flenker, U. ja Schänzer, W. *The Assay of Endogenous and Exogenous Anabolic Androgenic Steroids teoksessa Endocrine Updates: Hormone Use and Abuse by Athletes*, toim. Chigo, E., Lanfranco, F. ja Strasburger, C.J., Springer Science+Business Media, 2011, s. 121.
15. Schänzer, W. ja Donike, M. *Anal. Chim. Acta* 275 (1993) s. 23.

16. Piper, T., Opfermann, G., Thevis, M. ja Schänzer, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) s. 3171.
17. Mareck, U., Geyer, H., Flenker, U., Piper, T., Thevis, M. ja Schänzer, W. *Eur. J. Mass Spectrom.* 13 (2007) s. 419.
18. Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T.J., Tricker, R., Shirazi, A. ja Casaburi, R. *N. Engl. J. Med.* 335 1 (1996) s. 1.
19. Parr, M. ja Schänzer, W. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121 (2010) s. 528.
20. 2012 Anti-Doping Testing Figures Report <http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Testing-Figures/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf> (21.8.2013)
21. WADA Technical Document - TD2004EAAS, Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2004EAAS_Reporting_Evaluation_Testosterone_Epitestosterone_TE_Ratio_EN.pdf (22.08.2013)
22. Mareck, U., Geyer, H., Fusshöller, G., Schwenke, A., Haenelt, N., Piper, T., Thevis, M. ja Schänzer, W. *Drug Test. Anal.* 2 (2010) s. 637.
23. Ayotte, C., Goudreault, D. ja Charlebois, A. *J. Chromatogr. B* 687 (1996) s. 3.
24. Guidelines for the Reporting and Management of Elevated T/E Ratios and Endogenous Steroids http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Guidelines/WADA_Guidelines_Reporting_Elevated_TE_Ratios_2.0_EN.pdf (21.08.2013)
25. Thevis, M. ja Schänzer, W. *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) s. 79.
26. Saugy, M., Cardis, C., Robinson, N. ja Schweizer, C. *Baillière's Clin. Endoc. Metab.* 14 1 (2000) s. 111.
27. Robinson, J.W., Skelly Frame E.M. ja Frame II G.M. *Undergraduate Instrumental Analysis*, 6. p., CRC Press, USA, 2005, s. 1079.
28. Donike, M. *Dope Analysis teoksessa Official Proceedings - International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport, Florence, 10-12 May 1987*, toim. Donike, M., Geyer, H. ja Gotzmann, A., Italia, 1988, s. 53.
29. Marques, M., Pereira, H. ja de Aquino Neto, F. *J. Braz. Chem. Soc.* 17 2 (2006) s. 382.
30. Catlin, D.H., Cowan, D.A., de la Torre, R., Donike, M., Eraisse, D., Oftebro, H., Hatton, C.K., Starcevic, B., Becchi, M., de la Torre, X., Norli, H., Geyer, H. ja Walker, C.J. *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) s. 397.

31. Donike, M. ja Zimmermann, J. *J. Chromatogr.* 202 (1980) s. 483.
32. Southan, G.J., Brooks, R.V., Cowan, D.A., Kicman, A.T., Unnadkat, N. ja Walker, C.J. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 1 (1992) s. 87.
33. Trout, G.J. ja Kazlauskas, R. *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) s. 1.
34. Revelsky, A.I., Samokhin, A.S., Virus, E.D. ja Rodchenkov, G.M. *Drug Test. Anal.* 3 (2011) s. 263.
35. Munoz-Guerra, J., Prado, P. ja Vargas García-Tenorio, S. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) s. 7365.
36. Pujos, E., Cren-Olivé, C., Goetinck, P., Flament-Waton, M.M. ja Grenier-Loustalot, M.F. *Anal. Lett.* 45 (2012) s. 356.
37. Horning, S. ja Donike, M. teoksessa *Recent advances in Doping Analysis: Proceedings of the 11th Cologne Workshop on Dope Analysis, 7th to 12th March 1993*, toim. Donike, M., Geyer, H., Gotzmann, A., Mareck-Engelke, U. ja Rauth, S., Verlag Sport und Buch Strauss, Saksa, 1993, s. 155.
38. Horning, S. ja Schänzer, W. teoksessa *Recent advances in Doping Analysis (4): Proceedings of the Manfred Donike Workshop, 14th Cologne Workshop on Dope Analysis, 17th to 22nd March 1996*, toim. Schänzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A. ja Marech-Engelke, U., Verlag Sport und Buch Strauss, Saksa, 1996, s. 261.
39. Borges, C.R., Taccogno, J., Crouch, D.J., Le, L. ja Truong, T.N. *Int. J. Mass Spec.* 247 (2005) s. 48.
40. Mitrevski, B.S., Wilairat, P. ja Marriot, P.J. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) s. 2503.
41. Zhang, Y., Tobias, H.J. ja Brenna, J.T. *Analyst* 137 (2012) s. 3102.
42. Zhang, Y., Herbert, J.T., Auchus, R.J. ja Brenna, J.T. *Drug Test. Anal.* 3 (2011) s. 857.
43. Mitrevski, B.S., Brenna, J.T., Zhang, Y. ja Marriott, P.J. *J. Chromatogr. A* 1214 1–2 (2008) s. 134.
44. Munoz-Guerra, J., Careras, D., Soriano, C. ja Rodriguez, A.F. *J. Chromatogr. B* 704 (1997) s. 129.
45. Bowers, L.D., Borts, D.J. *J. Chromatogr. B* 687 (1996) s. 69.
46. Van Eenoo, P., Van Gansbeke, W., De Brabanter, N., Deventer, K. ja Delbeke, F.T. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) s. 3306.
47. De Brabanter, N., Van Gansbeke, W., Geldof, L. ja Van Eenoo, P. *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) s. 1416.
48. Delgadillo, M.A., Garrosta, L., Pozo, O.J., Ventura, R. ja Velasco, B. *J. Chromatogr. B* 897 (2012) s. 85.

49. Kuuranne, T., Vahermo, M., Leinonen, A. ja Kostiainen, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) s. 722.
50. Badoud, F., Grata, E., Boccard, J.G., D., Veuthey, J., Rudaz, S. ja Saugy, M. *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) s. 503.
51. Bowers, L.D. ja Sanaullah J. *Chromatogr. B* 687 (1996) s. 61.
52. Fabregat, A., Pozo, O.J., Van Renterghem, P., Van Eenoo, P., Marcos, J., Segura, J. ja Ventura, R. *Drug Test. Anal.* 3 (2011) s. 828.
53. Fabregat, A., Pozo, O.J., Marcos, J., Segura, J. ja Ventura, R. *Anal. Chem.* 85 (2013) s. 5005.
54. Pozo, O.J., Van Eenoo, P., Deventer, K., Elbardissy, H., Grimalt, S., Sancho, J.V., Hernandez, F., Ventura, R. ja Delbeke, F.T. *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) s. 107.
55. Athanasiadou, I., Angelis, Y.S., Lyris, E. ja Georgakopoulos, C. *Trends Anal. Chem.* 42 (2013) s. 137.
56. Pozo, O.J., Deventer, K., Van Eenoo, P. ja Delbeke, F.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) s. 2785.
57. Thevis, M. ja Schänzer, W. *Curr. Org. Chem.* 9 (2005) s. 825.
58. O'Leary, M.H. *BioScience* 38 5 (1988) s. 328.
59. Cawley, A. ja Flenker, U. *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) s. 854.
60. Piper, T., Flenker, U., Mareck, U. ja Schänzer, W. *Drug Test. Anal.* 1 (2009) s. 65.
61. Tobias, H.J., Zhang, Y., Auchus, R.J. ja Brenna, J.T. *Anal. Chem.* 83 (2011) s. 7158.
62. Piper, T., Mareck, U., Geyer, H., Flenker, U., Thevis, M., Platen, P. ja Schänzer, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) s. 2161.
63. Santrock, J., Studley, S.A. ja Hayes, J.M. *Anal. Chem.* 57 (1985) s. 1444.
64. Piper, T., Emery, C., Thomas, A., Saugy, M. ja Thevis, M. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) s. 5455.
65. Brand, W.A. *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) s. 225.
66. Yhtyneet Medix Laboratoriot (2011).
67. de la Torre, X., González, J.C., Pichini, S., Pascual, J.A. ja Segura, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) s. 645.
68. Piper, T., Degenhardt, K., Federherr, E., Thomas, A., Thevis, M. ja Saugy, M. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) s. 2911.
69. Piper, T., Thevis, M., Flenker, U. ja Schänzer, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) s. 1917.

70. Boccard, J., Badoud, F., Grata, E., Ouertani, S., Hanafi, M., Mazerolles, G., Lantéri, P., Veuthey, J., Saugy, M. ja Rudaz, S. *Forensic Sci. Int.* 213 (2011) s. 85.
71. Polet, M., Van Gansbeke, W. ja Van Eenoo, P. *Compound-Specific Isotope Ratio Analysis of Endogenous Steroids in Human Urine by GC-C-IRMS*, Universiteit Gent, Dopincontrolelaboratorium, 2011.
72. Riemann, P., Flenker, U. ja Schänzer, W. *Improved accuracy and precision of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of Androstane diols by optimizing HPLC parameters*, Deutsche Sportschule Köln, Center for Preventive Doping Research Institute of Biochemistry, 2012.

12. LITTEET

1. Lineaarisuuskokeiden analyysit.

Lineaarisuuskokeiden analyysit

Taulukko 1. Lineaarisuuskokeiden analyysit: yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot ja piikkien intensiteetit.

Pitoisuus 5 $\mu\text{g/ml}$ (PD 10 $\mu\text{g/ml}$)									
yhdiste	RT,1	RT,2	RT,3	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),3	Int.,1	Int.,2	Int.,3
RSTD	503,7	503,9	503,7	-29,730	-30,054	-30,079	3055	3205	3453
5aAc	657,7	657,7	657,7	-36,988	-38,770	-38,642	88	93	98
epiTAc	678,4	678,6	678,6	-32,40	-32,355	-33,366	93	94	94
PDAc	755,3	755,5	755,3	-34,722	-35,555	-35,295	163	163	169
5-ENAc	660,2	660,4	660	-36,955	-36,229	-36,678	185	195	204
Pitoisuus 10 $\mu\text{g/ml}$ (PD 20 $\mu\text{g/ml}$)									
yhdiste	RT,1	RT,2	RT,3	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),3	Int.,1	Int.,2	Int.,3
RSTD	503,7	503,7	503,7	-29,938	-30,096	-30,17	2871	2874	2854
5aAc	657,7	657,7	657,9	-37,213	-38,273	-39,801	167	161	162
epiTAc	678,4	678,6	678,8	-32,026	-32,243	-32,103	182	181	170
PDAc	755,5	755,3	755,7	-35,268	-35,554	-36,037	316	304	309
5-ENAc	660,4	660	660,2	-35,986	-35,839	-36,503	349	363	357
Pitoisuus 25 $\mu\text{g/ml}$ (PD 50 $\mu\text{g/ml}$)									
yhdiste	RT,1	RT, rinn. 2	RT, rinn. 3	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),3	Int.,1	Int.,2	Int.,3
RSTD	503,7	503,7	503,9	-29,712	-29,716	-29,851	3720	3861	3853
5aAc	657,7	657,7	657,9	-36,584	-36,856	-37,269	503	492	522
epiTAc	678,8	678,8	678,8	-31,495	-32,150	-31,817	614	596	630
PDAc	756,0	756,2	756,2	-35,338	-35,563	-35,429	986	982	993
5-ENAc	660,4	660,4	660,6	-35,644	-36,251	-36,284	761	785	957
Pitoisuus 50 $\mu\text{g/ml}$ (PD 100 $\mu\text{g/ml}$)									
yhdiste	RT,1	RT,2	RT,3	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),3	Int.,1	Int.,2	Int.,3
RSTD	503,9	503,9	503,9	-29,714	-29,864	-29,734	3748	4122	4273
5aAc	658,1	658,3	658,1	-35,938	-36,315	-35,839	1075	1122	1231
epiTAc	679,5	679,7	679,7	-31,807	-31,968	-31,658	1228	1212	1328
PDAc	757,2	757,2	757,2	-35,365	-35,541	-35,182	2020	2048	2142
5-ENAc	661,3	661,3	661,3	-35,668	-35,518	-35,485	2024	2170	2083
Pitoisuus 100 $\mu\text{g/ml}$ (PD 200 $\mu\text{g/ml}$)									
yhdiste	RT,1	RT,2	RT,3	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),3	Int.,1	Int.,2	Int.,3
RSTD	503,7	503,7	503,7	-29,966	-30,111	-30,141	3062	3054	3313
5aAc	659	659,2	659,0	-35,823	-35,986	-35,933	2475	2621	2777
epiTAc	681,1	681,1	681,1	-31,644	-31,688	-31,60	2765	2766	3014
PDAc	759,3	759,5	759,7	-35,403	-35,421	-35,308	4101	4027	4430
5-ENAc	661,3	661,5	661,1	-35,328	-35,288	-35,401	2349	2566	2507
Pitoisuus 150 $\mu\text{g/ml}$ (PD 300 $\mu\text{g/ml}$)									
yhdiste	RT,1	RT,2	RT,3	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),1	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),2	$\delta^{13}\text{C}$ (‰),3	Int.,1	Int.,2	Int.,3
RSTD	503,7	503,7	503,9	-29,953	-30,048	-29,904	2928	3064	3076
5aAc	659,4	659,6	659,6	-35,891	-35,617	-35,711	3738	3702	3796
epiTAc	682,0	682,0	682,2	-31,494	-31,225	-31,441	3938	3940	4096
PDAc	760,8	760,8	761,2	-35,453	-35,110	-35,355	5295	5727	5754
5-ENAc	661,5	661,7	661,7	-35,338	-35,157	-35,255	2790	2815	3141