



Heini Vanne

Anabolisten steroidien estereiden seulontamenetelmä humaaniseeru- mista LC-MS/MS-tekniikalla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

8.9.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Heini Vanne
Otsikko:	Anabolisten steroidien estereiden seulontamenetelmä humaaniseerumista LC-MS/MS-tekniikalla
Sivumäärä:	40 sivua + 4 liitettä
Aika:	8.9.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Laboratoriopäällikkö Tina Suominen Lehtori Miika Kuivikko

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen dopingtestauslaboratoriolle. Dopingtestauslaboratorio on Maailman antidopingtoimiston (WADA) akkreditoima laboratorio ja ainoa Suomessa. Dopingtestauksen tarkoituksena on ehkäistä dopingin käyttöä ja havaita dopingrikkomukset. Dopingtestauksesta Suomessa vastaa Suomen urheilun eettinen keskus, joka suunnittelee testausprosessin ja suorittaa näytteiden oton.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää anabolisten steroidien estereiden seulontamenetelmä humaaniseerumista nestekromatografi-tandemmassaspektrometrille. Seulontamenetelmän kehitykseen kuului näytteenkäsittelyn optimointi ja analysointimenetelmän kehitys LC-MS/MS-laitteelle. Tässä työssä käytettiin C8-käänteisfaasikolonnia, sähkösumutus-ionisointia ja kolmoiskvadrupolia.

Näytteenkäsittelyssä testattiin kolmea eri neste-nesteuutto-tekniikkaa, jotka olivat metyyli-tertbutyyli-etteri-uutto, heksaanietyyliasettaatti-uutto ja heksaani-etyyliasettaatti-uutto ulossuolauksella. Testattiin myös valitun derivatisointitekniikan toimivuutta ja selvitettiin optimaalinen liuotustilavuus.

Analyysimenetelmään kehitettiin sopiva gradientti ja asetettiin virtausnopeus ja kolonin lämpötila. Automaattisella optimoinnilla valittiin jokaisen tutkitun yhdisteen lähtöioni, kaksi tuoteionia ja törmäysenergiat.

Luotuun seulontamenetelmään valittiin neste-nesteuutoksi MTBE-uutto, derivatisointireagenssiksi Girard's P -derivatisointireagenssi ja näytteenkäsittelyssä liuotustilavuudeksi valittiin 50 µl. Menetelmässä boldenoniundesylenaatti ei derivatisoitunut ja kyseiselle yhdisteelle valittiin lähtöioniksi sen ei-derivatisoitu muoto. Muille yhdisteille löydettiin sopivat lähtö- ja tuoteionit.

Avainsanat: dopingtestaus, seulontamenetelmä, neste-nesteuutto, nestekromatografiamassaspektrometria

Abstract

Author: Heini Vanne
Title: Screening Method of Anabolic Steroid Esters in Human Serum with LC-MS/MS Technique
Number of Pages: 40 pages + 4 appendices
Date: 8 September 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Tina Suominen, Head of Laboratory
Miika Kuivikko, Senior Lecturer

This study was carried out for the Doping Control Laboratory of the National Institute for Health and Welfare. The Doping Control Laboratory is accredited by World Anti-Doping Agency (WADA), and it is only doping control laboratory in Finland. The main purpose of doping control is to prevent the use of doping and to detect anti-doping rule violations. In Finland, the Finnish Center for Integrity in Sports (FINCIS) is responsible for doping control procedure, which includes planning testing procedures and collecting samples.

The aim of this work was to develop screening method for esters of anabolic steroids in human serum. The analysis was performed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The screening method development included optimizing sample preparation and establish analysis method for LC-MS/MS. The study was carried out using C8 reverse phase column, electro spray ionization and triple quadrupole mass analyzer.

Three different liquid-liquid extraction techniques for sample preparation were tested. Techniques were methyl tert-butyl ether extraction, hexane ethyl acetate extraction and hexane ethyl acetate extraction with salting out. The chosen derivatization technique and optimum dissolving volume were tested.

A suitable gradient was developed for the analysis method and flow rate and column temperature were set. The precursor ions, the two product ions and collision energy for each studied compound were selected by automatic optimization.

For the created screening method, MTBE extraction was selected as the liquid-liquid extraction, Girard's P derivatization reagent as the derivatization reagent, and the final dissolution volume of the sample preparation was chosen to be carried out to 50 µl. Boldenone undecylenate was not derivatized and the non-derivatized form was chosen as the precursor ion for that compound. Suitable precursor and product ions were found for all the other compounds.

Keywords: doping control, screening method, liquid-liquid extraction, liquid chromatography tandem mass spectrometry

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Dopingtestaus	1
2.1	Maailman antidopingtoimisto, WADA	1
2.1.1	Antidopingsäännöstö	2
2.1.2	Kansainvälinen laboratoriostandardi	3
2.1.3	Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelo	3
2.2	Dopingtestaus Suomessa	6
3	Testosteroniesterit	7
4	Analysointitekniikat	12
4.1	Näytteen esikäsittely	12
4.1.1	Neste-nesteuutto	13
4.1.2	Derivatisointi	13
4.2	Nestekromatografi-tandemmassaspektrometri	14
4.2.1	Nestekromatografia	15
4.2.2	Tandemmassaspektrometria	16
5	Kemikaalit ja reagenssit	20
5.1	Kemikaalit ja reagenssit	20
5.2	Käytetyt laitteet	21
6	Menetelmän kehitys	22
6.1	Optimointi	23
6.2	Uuttomenetelmä	24
6.3	Gradientti	26
6.4	Liuotustilavuus	27
7	Tulokset	28
7.1	Optimointi	28
7.2	Uuttotesti	30
7.3	Gradientti	31

7.4	Liutustilavuus	35
8	Yhteenveto	37
	Lähteet	38
	Liitteet	
	Liite 1: Optimointiraportti	
	Liite 2: Uuttotestin tulokset	
	Liite 3: Gradienttitestin kromatogrammit	
	Liite 4: Liutustilavuustestin kromatogrammit	

Lyhenteet

ESI	<i>Electrospray ionization</i> , sähkösumutus-ionisaatio.
GC-MS	<i>Gas chromatography mass spectrometry</i> , kaasukromatografi-massaspektrometri.
IRMS	<i>Isotope mass spectrometry</i> , isotooppisuhdemassaspektrometri.
ISL	<i>The International Standard for Laboratories</i> , kansainvälinen laboratorio standardi.
ISTD	<i>Internal Standard</i> , sisäinen standardi.
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> , nestekromatografi-tandemmassaspektrometri.
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> , neste-nesteuutto.
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i> , useiden valittujen reaktioiden seuranta.
QC	<i>Quality control</i> , laadunvarmistus.
SEM	<i>Secondary electron multiplier</i> , elektronimonistin.
SRM	<i>Selective reaction monitoring</i> , valittujen reaktioiden seuranta.
SUEK	Suomen urheilun eettinen keskus.
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i> , Maailman antidopingtoimisto.

1 Johdanto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) dopingtestauslaboratoriolle anabolisten steroidien estereiden seulontamenetelmä humaaniseeruminäytteestä. THL:n dopingtestauslaboratorio on Maailman antidopingtoimiston (WADA) akkreditoima ja ainoa Suomessa. Kyseinen menetelmä on WADAn suosittelu, ja siksi se pyrittiin saamaan käyttöön myös Suomessa. [1.]

Analyysilaitteena tässä työssä käytettiin Agilentin nestekromatografi-tandem-massaspektrometriä (LC-MS/MS). Nestekromatografissa käytettiin C8-käänteisfaasikolonnia. Massa-analysaattorina käytettiin kolmoiskvadrupolia ja detektorina elektronimonistinta. Seulontamenetelmässä mukana oli 14 anabolisten steroidien esteriä ja sisäisinä standardeina oli testosteroni-d3, androstenedioni-d3 ja testosteroniundecanoaatti-d4. Lisäksi menetelmässä oli mukana testosteroni ja androstenedioni kyseisten yhdisteiden kvantitointia varten.

Tarkoituksena oli kehittää ja optimoida seulontamenetelmän näytteen esikäsitely ja LC-MS-ajo-olosuhteet. Alkuperäinen suunnitelma oli myös validoida seulontamenetelmä, mutta tätä ei ehditty tekemään. Testattiin erilaisia neste-nesteliuotinuuttoja ja optimoitiin nestekromatografian gradientti, virtausnopeus ja kolonin lämpötila. Näytteen analysointimenetelmään optimoitiin kullekin yhdisteelle kaksi siirtymää ja törmäysenergiat. LC-MS-laitteelle luotiin seulontamenetelmä useiden valittujen reaktioiden seurantatekniikkaa (MRM) hyödyntäen.

2 Dopingtestaus

2.1 Maailman antidopingtoimisto, WADA

Maailman antidopingtoimisto (World Anti-Doping Agency, WADA) johtaa ja säätelee kansainvälistä antidopingtoimintaa. WADA on perustettu vuonna 1999, ja se on riippumaton toimija, jonka tavoitteena on dopingvapaa urheilu [2]. WADAn

päätehtäviin kuuluu tieteellinen tutkimus, koulutus, antidopinglaboratorioiden akkreditointi, antidopingohjelmien kehittäminen ja dopingvalvonta. WADA ylläpitää antidopingsäännöstöä (The World Anti-Doping Code), joka yhdenmukaistaa antidopingsäännöt ja määräykset urheiluorganisaatioiden ja viranomaisten keskuudessa ympäri maailmaa. Valtiot ovat sitoutuneet antidopingsäännösten periaatteisiin ja tukemaan WADAn toimintaa Unescon kansainvälisen antidopingsovimuksen kautta. [3; 4.]

Säännösten lisäksi WADA julkaisee ja ylläpitää kansainvälisiä standardeja (International Standard). Standardit asettavat ohjeita ja sääntöjä kattaen erilaisia osa-alueita dopingvastaisesta työstä. Keskeisempiä standardeja ovat Kansainvälinen laboratoriostandardi (The International Standard for Laboratories, ISL), Kiellettyjen aineiden ja menetelmien lista (List of Prohibited Substances and Methods) ja Kansainvälinen testaus- ja tutkintastandardi (The International Standard for Testing and Investigations). Säännösten ja standardien noudattaminen on pakollista kaikille säännösten allekirjoittaneille. WADA julkaisee myös useita teknisiä dokumentteja ja ohjeita. [3; 5; 6; 7.]

2.1.1 Antidopingsäännöstö

WADAn antidopingsäännöstö on ydinasiakirja, joka harmonisoi antidopingpolitiikan, -säännöt ja -määräykset maailmanlaajuisesti. Sen tarkoituksena on puolustaa urheilijoiden oikeutta osallistua dopingvapaaseen kilpailutoimintaan, edistää samalla urheilijoiden terveyttä, yhdenvertaisuutta ja reilua kilpailua. Säännöstö varmistaa yhdenmukaisen, koordinoitun ja tehokkaan antidopingohjelman. Kaikki dokumentin allekirjoittaneet sitoutuvat noudattamaan sitä. Säännöstö määrittelee dopingiksi yhden tai useamman säännön rikkomuksen. Sääntörikkomuksia ovat muun muassa kielletyn aineen tai sen aineenvaihduntatuotteiden tai merkkiaineiden löytyminen urheilijalta otetussa näytteessä, kielletyn aineen tai menetelmän käyttö tai sen yritys, näytteenotosta kieltäytyminen tai sen epäonnistuminen tai kiertäminen, olinpaikkatietojen luovuttamisvelvollisuuden rikkominen ja jonkin dopingvalvonnan osa-alueen manipulointi tai sen

yryitys. Säännöstö yhdessä kahdeksan kansainvälisen standardin kanssa edistää yhdenmukaista antidopingtoimintaa. [3.]

2.1.2 Kansainvälinen laboratoriestandardi

Kansainvälinen laboratoriestandardi on yksi WADAn julkaisemista pakollisista kansainvälisistä standardeista. Sen päätarkoitus on taata kaikkien WADAn akkreditoimien tai hyväksymien laboratorioden luotettavat ja yhdenvertaiset testitulokset. ISL asettaa laatuvaatimuksia koskien mm. näytteiden säilyttämistä, näytteiden analyysiprosessia, käytettyjä laitteita ja työskentelytapoja. ISL:ssä määritellään myös akkreditointivaatimukset ja ulkoiseen ja sisäiseen laaduntarkkailuun liittyvät asiat. Laadunvarmistusta tehdään säännöllisesti mm. laadunvarmistusnäytteillä. [5.]

2.1.3 Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelo

Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelossa määritellään kielletyt aineet ja menetelmät kaikkina aikoina, kilpailuissa ja vain tietyissä lajeissa. Lista julkaistaan vuosittain, ja se tulee voimaan kolmen kuukauden kuluttua sen julkaisusta ilman mitään erillisiä toimenpiteitä. Listan aineet on valittu listalle, koska niillä voidaan parantaa suorituskykyä tulevissa kilpailuissa tai peittää kielletyn aineen tai menetelmän käyttö. Kaikkien WADAn säännöstön allekirjoittaneiden on tutustuttava kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelon uusimpaan versioon. Taulukossa 1 on kooste kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelosta. [6.]

Taulukko 1. Kooste kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelosta 2022 [6].

I.	Ryhmä	Kielletyt aineet ja metodit kaikkina aikoina
	S0	Myyntiluvattomat lääkkeet
	S1	Anaboliset aineet
	S2	Peptidihormonit, kasvutekijät, vastaavat aineet ja mimeetit
	S3	β_2 -agonistit

I. Ryhmä	Kielletyt aineet ja metodit kaikkina aikoina
S4	Hormoneihin ja aineenvaihduntaan vaikuttavat modulaattorit
S5	Diureetit ja peiteaineet
M1	Veren ja sen komponenttien manipulaation
M2	Kemiallinen ja fysikaalinen manipulaatio
M3	Geeni ja soludoping
II. Ryhmä	Kilpailun aikana kielletyt
S6	Piristeet
S7	Huumaavat kipulääkkeet
S8	Kannabinoidit
S9	Glukokortikoidit
III. Ryhmä	Tietyissä urheilulajeissa kielletyt aineet
P1	Beetasalpaajat

Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelo on jaettu kolmeen pääryhmään. (taulukko 1). Ryhmään I kuuluvat aineet ja menetelmät ovat kiellettyjä kilpailuissa ja kilpailujen ulkopuolella. Myyntiluvattomat lääkkeet (S0) ovat aina kiellettyjä. Niitä ovat aineet, joita ei ole hyväksytty ihmisen lääkinnällisiin tarkoituksiin tai jotka ovat kehitysvaiheessa tai joiden tuotanto on lopetettu. S0-ryhmään kuuluvat myös muuntohuumeet ja aineet, jotka on hyväksytty vain eläinlääkkeiksi. [6; 8.]

S1-ryhmään kuuluvat anaboliset aineet on jaettu anabolis-androgeenisiin steroideihin ja muihin anabolisiin aineisiin. Anabolis-androgeeniset steroidit ovat ihmisessä luonnostaan esiintyviä miessukupuolihormonin tapaan vaikuttavia aineita, mutta niiden ulkoinen käyttö on kielletty. Myös kemialliselta rakenteeltaan tai biologisilta vaikutuksiltaan vastaavat aineet on kielletty. Anabolis-androgeenisiin steroideihin kuuluu mm. testosteroni. [6; 8.]

Ryhmään S2 kuuluvat punasolutuotantoa stimuloivat aineet aeytropoietiinit ja erytropoieesia. Ryhmään kuuluvat myös peptidihormonit ja niitä vapauttavat aineet, kasvutekijät ja kasvutekijämodulaattorit. [6.]

Alaryhmässä S3 on β_2 -agonistit, jotka laajentavat hengitysteitä rentouttaen niitä ympäröiviä lihaksia. Suun kautta normaalia isommilla annoskoilla annosteltuna niillä on anabolisia vaikutuksia lihaksiin, minkä vuoksi ne ovat kiellettyjä. [6; 8.]

Hormonit ja aineenvaihduntaan vaikuttavat modulaattorit kuuluvat alaryhmään S4. Metabolisilla modulaattoreilla saadaan fyysisen rasituksen kaltaisia hyödyllisiä muutoksia ilman rasitusta. Insuliini kuuluu tähän ryhmään, sillä insuliinilla on heikko anabolinen vaikutus lihaksiin. Tyypin 1 diabetespotilaille voidaan myöntää erivapaus insuliinin käyttöön. [6; 8.]

Diureetit ja peiteaineet on luokiteltu alaryhmäksi S5. Diureetit poistavat elimistöstä suolaa ja nestettä ja lisäävät virtsan eritystä, jolloin ne voivat vähentää joidenkin dopingaineiden pitoisuutta virtsassa. Jotkin peiteaineet saavat aikaan verenkierron nestemäärän kasvun, jolloin hemoglobiinipitoisuus laskee ja urheilijan verinäytteen tulkittavuus voi heikentyä. [6; 8.]

Kiellettyjä menetelmiä ovat veren ja sen komponenttien manipulaatio (M1), kuten verensiirto, kemiallinen ja fysikaalinen manipulaatio (M2), kuten infuusiot eli suonen sisäiset nesteen siirrot. Myös geeni- ja soludoping on kielletty (M3). [6; 8.]

Ryhmään II kuuluvat aineet ovat kiellettyjä kilpailun aikana eli urheilija voi käyttää ryhmään kuuluvia lääkkeitä, mikäli ei osallistu kilpailuihin. Alaryhmät S6–S9 kuuluvat ryhmään II. [6.]

Piristeet (S6) vaikuttavat keskushermostossa nostaen vireystilaa ja vähentäen väsymyksen tunnetta. Piristeitä käytetään ADHD:n (deksamfetamiini), nuhan, yskän ja allergioiden hoidossa (pseudoefedriini). Useita piristeitä käytetään myös huumausaineina, kuten amfetamiinia. [6; 8.]

Huumaavat kipulääkkeet kuuluvat ryhmään S7. Huumaavia kipulääkkeitä käytetään vaikeuden kiputilojen hoidossa. Tunnetuin tällainen kipulääke on morfiini. Urheilijaa huumaavan kipulääkkeen käyttö voi hyödyttää vähentämällä väsymyksen tunnetta suorituksen aikana. [6; 8.]

Kasviperäisen kannabiksen vaikuttavia aineita tai niiden synteettisiä johdannaisia kutsutaan kannabinoideiksi ja niiden käyttö kilpailun aikana on kielletty, niiden mahdollisten suoritusta parantavien vaikutusten vuoksi. Kannabinoidit ovat jaoteltu alaryhmään S8. [6; 8.]

Alaryhmään S9 kuuluu glukokortikoidit. Niitä käytetään mm. reumasairauksien ja tulehduksellisten suolistosairauksien hoidossa. Glukokortikoidit saattavat parantaa elimistön rasituskestävyyttä ja vähentää väsymyksen tunnetta suorituksen aikana. Tämän vuoksi ne ovat kiellettyjen aineiden ja menetelmien listalla. [6; 8.]

Pääryhmään III kuuluu vain tietyissä urheilulajeissa kiellettyjä aineista. Alaryhmään P1 kuuluu beetasalpaajat. Beetasalpaajia käytetään verenpaineen ja sepelvaltimotaudin hoidossa, ja ne alentavat sydämen sykettä, rauhoittavat keskushermostoa ja vähentävät vapinaa. Beetasalpaajat ovat kiellettyjä osassa urheilulajeista vain kilpailuissa ja osassa sekä kilpailuissa että harjoituskaudella. [6; 8.]

2.2 Dopingtestaus Suomessa

Kansallisella tasolla dopingvalvontaa suorittaa kussakin maassa jokin riippumaton organisaatio noudattaen WADAn kansainvälistä testaus- ja tutkintastandardia (International Standard for Testing and Investigations). Suomessa dopingvalvonnasta vastaa Suomen urheilun eettinen keskus (SUEK). SUEK perustettiin 2016, ja se on vastuussa antidopingtoiminnan lisäksi kilpailumanipulaation torjunnasta sekä katsomoturvallisuuden ja -viihtyvyyden valtiosopimusten toimeenpanosta Suomessa. Vain WADA, SUEK ja kansainväliset lajiliitot tekevät Suomessa dopingtestejä. Ulkomailla suomalaisille urheilijoille testejä voi tehdä myös kyseisen maan kansallinen antidopingorganisaatio. SUEK noudattaa lisäksi ISO 9001 -laatu järjestelmää. [7; 9; 10.]

Dopingtestit tehdään virtsa- tai verinäytteestä tai molemmista. Suoritettavat dopinganalyysit riippuvat urheilijan urheilulajista ja siitä, onko testi otettu

kilpailussa vai sen ulkopuolella. Antidopingsäännösten piiriin kuuluvat urheilija voidaan kutsua testiin missä ja milloin tahansa. Pääasiassa kilpailun ulkopuoliin testeihin kutsutaan urheilijoita kohdennetusti tai arpomalla esimerkiksi tietyn ryhmän harjoituksissa olevista henkilöistä. SUEK tai muu testin tilannut antidopingorganisaatio on nimennyt urheilijan etukäteen kuuluvaksi testauspooliin. [11.]

Testauspooliin kuuluu antidopingorganisaation nimeämiä huppu-urheilijoita, jotka täyttävät tietyt SUEK:n tai kansainvälisen lajiliiton julkaisemat kriteerit. Testauspooliin kuuluvilla henkilöillä on yhteys- ja olinpaikkatietojen ilmoitusvelvollisuus, jotta tehokas ja tarkkaan ajoitettu dopingtestaus on mahdollista ilman ennakkoilmoitusta. Testauspooleja on Suomessa kaksi: yksilöurheilijoiden rekisteröity testauspooli ja joukkuelajien joukkuepooli. [12.]

3 Testosteroniesterit

Testosteroniesterit ovat testosteronin esteröityjä johdannaisia, joita ihmisen elimistö ei pysty tuottamaan. Testosteroniesterit hajoavat elimistössä testosteroniksi. Testosteronia käytetään lääkinnällisiin tarkoituksiin, mutta se on myös yksi yleisimmistä dopingaineista sen lihasvoimaa ja harjoituskestävyyttä kasvattavien ominaisuuksien takia. Testosteronivalmisteita on mm. lihaksensisäisinä injektioina, implantteina ja tabletteina. Yleisin käyttömuoto on lihaksensisäiset injektiot, joissa testosteroni on usein esteröityneessä muodossa, jotta se liukenee paremmin injektioöljyyn. [13.]

Testosteroniesterit kuuluvat kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelon anabolisten aineiden alaryhmään S1 [6]. WADAn vuoden 2020 tilastoista selviää, että kaikista raportoiduista dopingainelöydöksistä 47 % kuului anabolisten aineiden ryhmään. Raportoitujen löydösten osalta se on selkeästi isoin alaryhmä seuraavan ollessa piristeet (S6) 15 %:n osuudella. [14.]

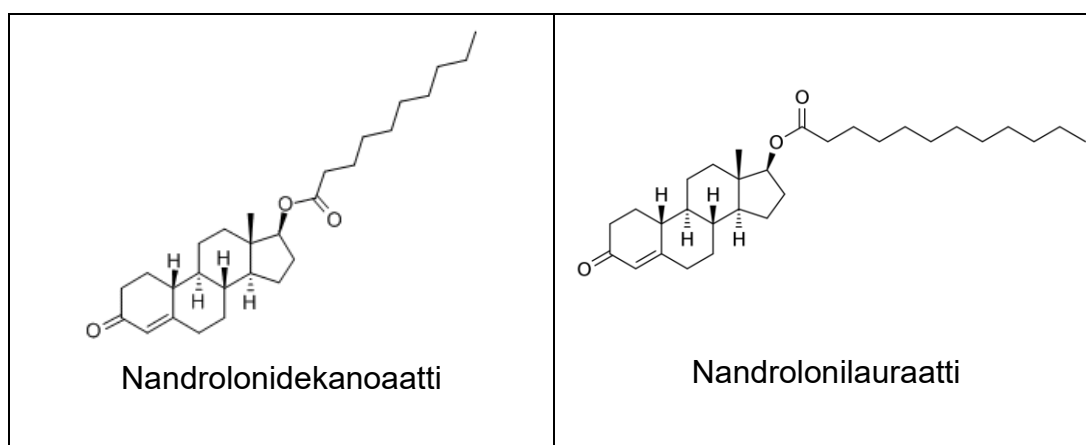
Testosteroniesteri-injektiot pistetään lihakseen, josta ne kulkevat hitaasti verenkiertoon. Testosteroniesterien päästyä verenkiertoon esteraasientsyymit

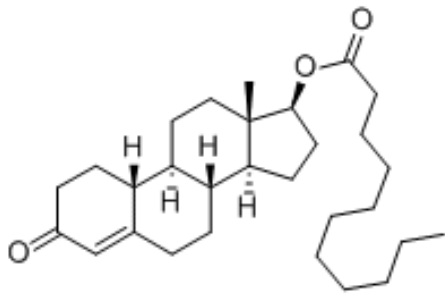
aloittavat estereiden hajottamisen testosteroniksi. Verestä voidaan havaita alkuperäistä esteröityä johdannaista vielä 4–11 päivän kuluttua testosteronijohdannaisten käytön jälkeen. Jos testosteroniesteriä löytyy elimistöstä, voidaan yksiselitteisesti vahvistaa dopingrikkomus. Tähän perustuu uusi seulontamenetelmä. [13; 15.]

Testosteronia ja sen muutamia metaboliitteja seulotaan rutiinianalyysillä virtsanäytteestä kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GC-MS). Näytteen steroidiprofiilia arvioidaan tiettyjen parametrien konsentraatioiden ja suhteiden avulla. Poikkeamat tutkittujen parametrien suhteen varmistetaan isotooppisuhdemassaspektrometrillä (IRMS), jolla voidaan erottaa syntetinen testosteroni tai sen metaboliitteja endogeenisestä testosteronista. IRMS-analyysi on pitkä ja monivaiheinen prosessi, ja rinnakkainen menetelmä on tarpeen. [13.]

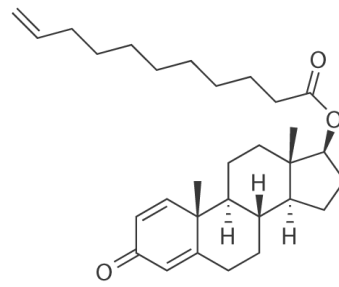
Steroidiesterit koostuvat steroidien perusrakenteesta ja sivuketjusta. Sivuketjuun kuuluu esteriryhmä (R-COO-R) ja pitkä hiilivetyketju. Esterit voidaan jakaa kahteen ryhmään yhdisteen sivuketjun pituuden mukaan. Nopeavaikutteisilla on lyhyt sivuketju ja hitaammin vaikuttavilla pitkä sivuketju. Taulukossa 2 on kaikki tässä seulonnassa tutkittavat yhdisteet ja niiden rakenteet. [15.]

Taulukko 2. Tutkittujen testosteroniestereiden nimet ja rakenteet.

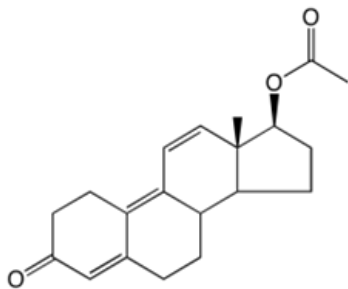




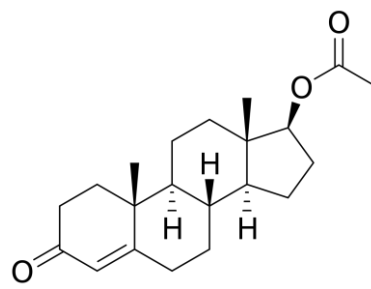
Nandroloniundekanoaatti



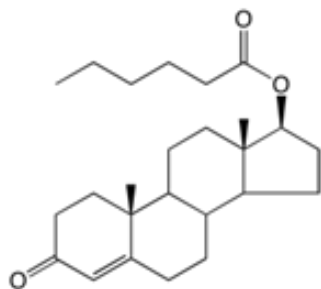
Boldenoniundesylenaatti



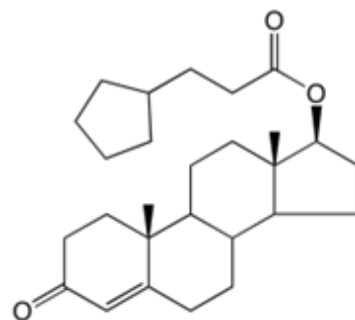
Trenboloni asetaatti



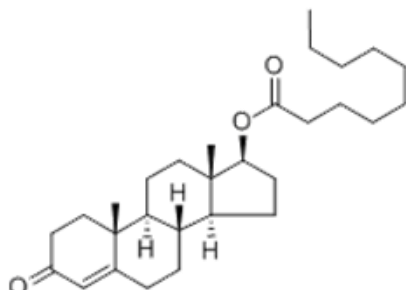
Testosteroni asetaatti



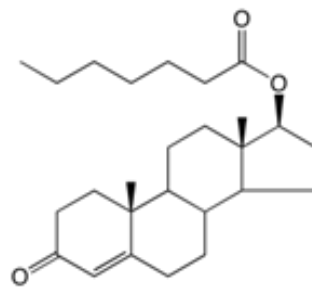
Testosteronikaproaatti



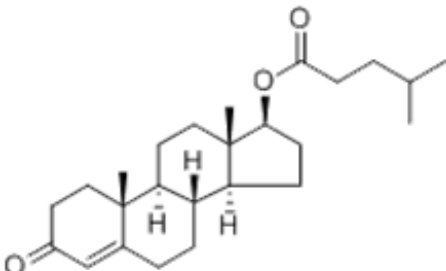
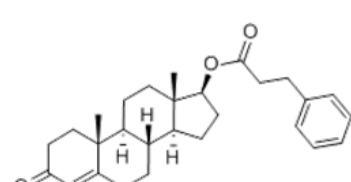
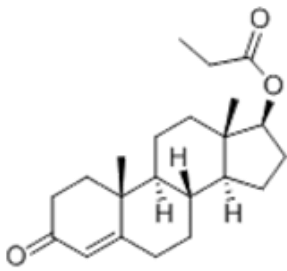
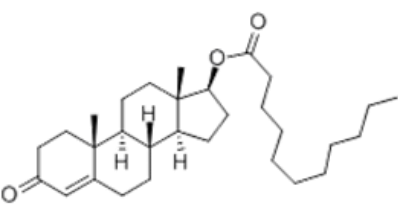
Testosteronisyypionaatti



Testosteronidekanaaatti



Testosteronienantaatti

 <p>Testosteroni-isokaproaatti</p>	 <p>Testosteronifenylpropionaatti</p>
 <p>Testosteronipropionaatti</p>	 <p>Testosteroniundekanoaatti</p>

Taulukkoon 3 on koottu kaikkien tutkittujen steroidiestereiden molekyyllipainot ja Girard-derivaattojen molekyyllipainot ($M+C_7H_7N_3$).

Taulukko 3. Tutkittujen steroidiestereiden molekyylipainot ja Girard-derivaatan molekyylipainot.

Yhdiste	Molekyylipaino (g/mol)	Girard-derivaatan molekyylipaino (g/mol)
Nandrolonidekanoaatti	428,6	561,40
Nandrolonilauraatti	456,7	589,42
Nandroloniundekanoaatti	442,7	575,40
Boldenoniundesylenaatti	452,7	586,40
Trenboloni asetaatti	312,4	445,24
Testosteroni asetaatti	330,5	463,28
Testosteronikaproaatti	386,6	519,34
Testosteronisypionaatti	412,6	545,36
Testosteronidekanoaatti	442,7	575,40
Testosteronienantaatti	400,6	534,37
Testosteroni-isokaproaatti	386,6	519,34
Testosteronifenylpropionaatti	420,6	553,33
Testosteronipropionaatti	344,5	477,30
Testosteroniundekanoaatti	456,7	589,40

Seulontamenetelmän yhdisteissä on kolme kahden yhdisteen paria, joilla on sama massa (taulukko 3). Yhdisteet ovat nandrolonilauraatti ja testosteroniundekanoaatti (456,7), testosteronikaproaatti ja testosteroni-isokaproaatti (386,6) ja nandroloniundekanoaatti ja testosteronidekanoaatti (442,7). Yhdisteet ovat rakenteellisesti erilaisia, joten niiden tuoteioni spektri on erilainen. Tässä seulontamenetelmässä yhdisteet seulotaan kuitenkin samoilla tuoteioneilla. Jos seulonnassa havaitaan pariin kuuluvia tuoteioneja, voidaan varmistaa kumpaa yhdistettä näyte sisältää jatkoanalyysissä erilaisella gradientilla ja isommalla määrällä tuoteioneja. Tavallisesti varmistusanalyysissä on kuusi tuoteionia, kun seulonnassa niitä on kaksi. Taulukkoon 4 on koottu sisäisten standardien ja

testosteroni ja androstenedionin molekyylipainot ja Girard-derivaattojen molekyylipainot.

Taulukko 4. Sisäisten standardien, testosteronin ja androstenedionin molekyylipainot ja Girard-derivaattojen molekyylipainot.

Yhdiste	Molekyyli- paino (g/mol)	Girard-derivaatan molekyyli- paino (g/mol)
ISTD testosteroniundekanoaatti-d4	460,39	593,45
ISTD testosteroni-d3	291,23	424,29
ISTD androstenedioni-d3	289,12	422,18
testosteroni	288,42	421,27
androstenedioni	286,41	419,25

4 Analysointitekniikat

4.1 Näytteen esikäsittely

Näytematriisina on humaaniseerumi. Seerumi on ihmisen kokoverestä erotettu osa, joka ei sisällä soluja, fibrinogeeniä ja muita hyytymistekijöitä [16]. Se on tavallisesti keltaista tai punertavaa. Seerumi sisältää vettä jopa n. 95 %, ja koostuu veden lisäksi proteiineista, peptideistä (mm. entsyymit ja hormonit), ravintoaineista, elektrolyyteistä ja monista muista pienistä molekyyleistä. Seerumi kuljettaa mainittuja molekyylejä kaikkialle kehoon. Näytteen käsittelyllä seerumista saadaan eroteltua haluttuja yhdisteitä helpommin analysoitavaan muotoon. Seuraavaksi esitellään tässä työssä käytetyt tekniikat. [17.]

4.1.1 Neste-nesteuutto

Neste-nesteuutto (Liquid-liquid extraction, LLE) on tekniikka, jolla erotellaan näytteestä haluttu yhdiste tai tietynlainen ryhmä yhdisteitä toiseen nestefaasiin. Tyypillisesti jonkinlainen uutto tarvitaan näytteen pudistamiseksi, konsentroiduksi tai liottimen vaihdon vuoksi. Kromatografiaa varten näytteen on oltava kokonaan liuenneena, jotta partikkelit eivät tuki kapillaareja tai kolonnia. [18, s. 170; 19, s. 604–605.]

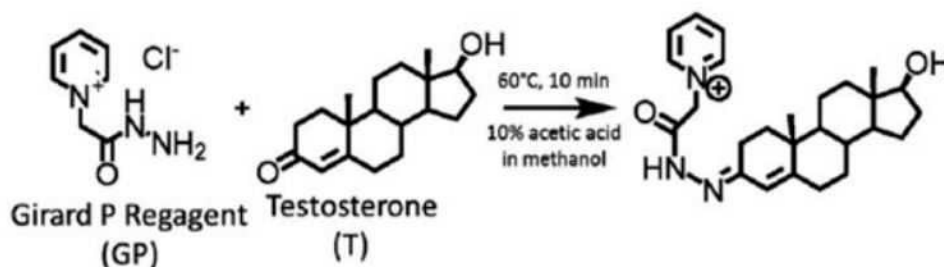
Neste-nesteuutossa tyypillisesti nesteet ovat vesipohjainen näyteliuos ja jokin orgaaninen liuotin, riippuen siitä millaisia yhdisteitä halutaan uutaa. Perusperiaate on, että poolinen yhdiste liukenee pooliseen ja pooliton poolittomaan nesteeseen. Näyteliuos ja orgaaninen liuotin eivät saa liueta toisiinsa, tai niiden tulee olla lähes liukenemattomia. Nesteet muodostavat kaksi erottuvaa kerrosta. Alempi kerros on kahdesta nesteestä tiheämpi (usein vesifaasi). Neste-nesteuutossa näyteliuosta ja orgaanista liuotinta sekoitetaan voimakkaasti, jotta nesteiden kosketuspinta-ala on mahdollisimman laaja ja yhdisteiden siirtyminen faasista toiseen nopeutuu. [19, s. 604–605.]

4.1.2 Derivatisointi

Derivatisointi on kemiallinen tekniikka, jolla muutetaan alkuperäinen tutkittava yhdiste joksikin johdannaiseksi eli derivaatiksi. Reaktiossa käytetään tavallisesti derivatisointireagenssia eli yhdistettä, joka reagoi alkuperäisen yhdisteen kanssa ja muodostaa uuden yhdisteen tutkitun yhdisteen kanssa. Derivatisoinnin avulla saadaan tutkittu yhdiste helpommin analysoitavaan muotoon. Derivatisoinnilla yhdisteen polaarisuutta voidaan muuttaa tai yhdisteestä voidaan tehdä helpommin haihtuva. Myös yhdisteen lämmönkestävyyttä voidaan muuttaa tai liittää yhdisteeseen funktionaalisia ryhmiä, joilla saadaan korkeampi signaali detektorilla. [20.]

Kuvassa on 1 esitetty Girard's P -derivatisointireagenssin ja testosteronin derivatisointireaktio. Girard's P -reagenssi valittiin, sillä kyseistä reagenssia on

käytetty validoiduissa steroidiestereiden seulontamenetelmissä. Girard's P -derivatisointireaktiossa yhdisteeseen sitoutuu $[C_7H_7N_3]$ -rakenne kuvassa 1 esitetyllä tavalla. [21.]



Kuva 1. Girard P -derivatisointireaktio [22].

4.2 Nestekromatografi-tandemmassaspektrometri

Nestekromatografi-tandemmassaspektrometrissä (LC-MS/MS) on yhdistetty nestekromatografi ja tandemmassaspektrometri, jolloin LC:llä kromatografisesti erotellut yhdisteet voidaan tunnistaa niiden massaspekttrin perusteella. LC-MS/MS-laitteiston näytteenkulun kaavakuva on kuvassa 2. Laitteisto koostuu LC:stä, johon kuuluu injektori, pumppu ja kolonni, ja tandemmassaspektrometristä, joka koostuu ionilähteestä, massa-analysaattoreista, detektorista ja tietokoneesta. [18, s. 153.]

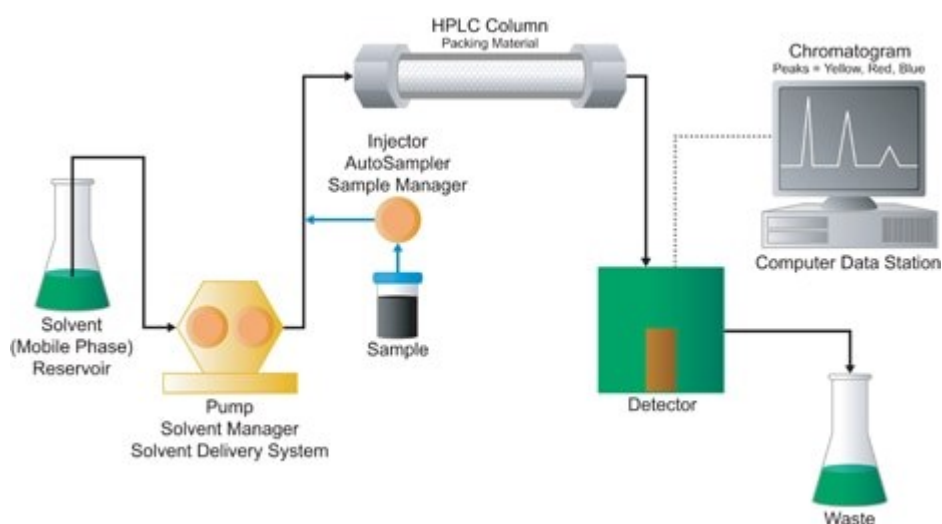


Kuva 2. LC-MS/MS-laitteiston kaaviokuva.

4.2.1 Nestekromatografia

Nestekromatografia on fysikaalinen erotus- ja puhdistustekniikka. Erottelu tapahtuu kromatografiakolonnissa tai -levyllä. Nestekromatografia perustuu kahden toisiinsa liukenemattoman faasin, stationäärifaasin ja liikkuvan faasin, vuorovaikutukseen. Näyteyhdisteet kulkevat eteenpäin liikkuvan faasin mukana ja pidättyvät stationäärifaasissa, jolloin yhdisteiden välille muodostuu ajallisesti mitattava ero. Voimakkaammin stationäärifaasiin sitoutuvat yhdisteet kulkevat hitaammin kolonnin läpi, kuin heikosti sitoutuvat yhdisteet. Erilaisia faaseja ja vuorovaikutusmekanismeja on paljon. Esimerkiksi ionivaihtokromatografia on kolonnikromatografia, jossa erottelu perustuu näyteionin ja kolonnin väliseen varauseroon [18, s. 158]. Tässä työssä käytetään kolonnikromatografioihin kuuluvaa adsorptiokromatografiaa, jolloin liikkuva faasi on neste ja stationäärifaasi kiinteää materiaalia sisältävä kolonni. [18, s. 140.]

Nestekromatografialaitteisto koostuu näytteensyöttäjästä, pumpusta, kolonnista ja detektorista, ja komponentteja yhdistävistä kapillaareista. Jos LC-laite on yhdistetty massaspektrometriin, detektorin sijaan näyteliuos ohjataan erityisominaisuuksin varustellulle ionilähteelle. LC-MS-laitteen ionilähteen tulee kytä poistamaan LC-ajoliuos näytteestä. LC:n rakenne näkyy kuvassa 3. [18, s. 153.]



Kuva 3. Nestekromatografian rakennekaavio [23].

Näytteen tulee olla nestemäisessä muodossa, jotta se sopii analysoitavaksi nestekromatografilla. Näyte injektoidaan liikkuvaan faasiin monitieventtiin avulla ja yleensä automaattisella näytteensyöttäjällä. Isokaraattisessa ajossa liikkuvan faasin eli eluentin koostumus on koko ajon ajan sama. Gradienttiajo on kyseessä, jos eluentin koostumusta muutetaan ajon aikana. [18, s. 171.]

Kromatografinen erottuminen tapahtuu kolonnissa. Kolonnit ovat tavallisesti 5–20 cm pitkiä teräsputkia ja ne on pakattu stationäärifaasilla, joka on tavallisimmin silikaa tai polymeeriä. Stationäärifaasin partikkelikoot ovat yleensä 2–5 µm. Pienempipartikkelisilla kolonneilla saavutetaan parempi resoluutio, eli erottuminen, koska partikkeleiden aktiivinen pinta-ala on suurempi. Kolonni on sijoitettu kolonniuuniin, jossa sen lämpötilaa voidaan kontrolloida. Kolonnin etupäähän voidaan asettaa esikolonni, jonka tehtävä on kerätä näytteiden sisältämät liukeneemattomat ja eluoitumattomat komponentit. Esikolonni pidentää kolonnin käyttöikä, ja se voidaan vaihtaa tarvittaessa. [18, s. 154–155; 23, s. 171.]

Käänteisfaasikromatografiassa liikkuva faasi on poolisempaa kuin stationääri-faasi. Stationäärifaasit ovat tällöin poolittomia silika- tai polymeeripohjaisia kolonneja, joihin on kemiallisesti sidottu hiilivetyketjiryhmiä, kuten oktadekyyli-(C18) ja oktyyliryhmä (C8). Myös poolisempia ryhmiä voidaan sitoa, kuten syanoryhmiä. Liikkuva faasi sisältää usein vettä ja jotain poolista liuotinta, kuten metanolia tai asetonitriliä. Käänteisfaasikromatografiassa näytteet eluoituvat poolisuusjärjestyksessä, siten että poolisimmat yhdisteet eluoituvat ensin. Pooliset yhdisteet sitoutuvat poolittomaan stationäärifaasiin lyhyemmän aikaa kuin poolittomat yhdisteet. [24, s. 174.]

4.2.2 Tandemmassaspektrometria

Tandemmassaspektrometrillä voidaan tunnistaa yhdisteitä ja määrittää niiden pitoisuus näytteessä. Massaspektrometria perustuu varattujen hiukkasten käyttäytymiseen sähkö- ja/tai magneettikentässä, jolloin ionit voidaan erotella toisistaan massa-varaus-suhteen perusteella. Tandemmassaspektrometriassa käytetään useampaa massa-analysaattoria peräkkäin, josta myös tandem-nimitys

johtuu. Menetelmällä voidaan analysoida erilaisia orgaanisia ja epäorgaanisia yhdisteitä, kuten lääkkeitä, proteiineja ja rasvoja. [24, s. 15, s. 116.]

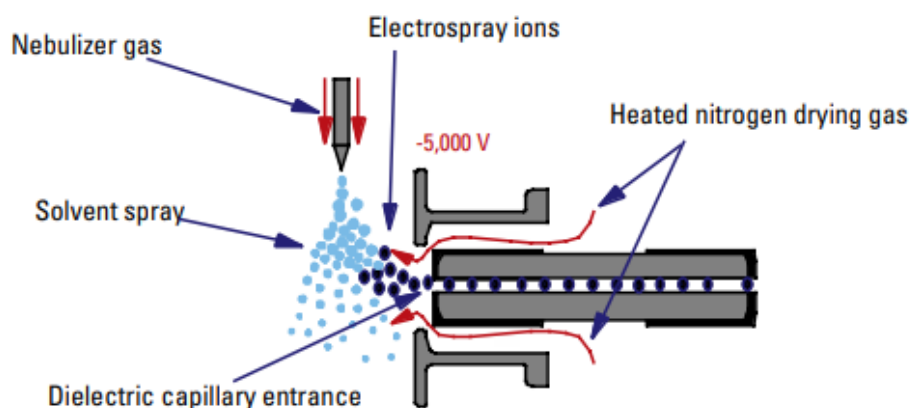
Massaspektrometri koostuu ionilähteestä, massa-analysointilaitteesta ja detektorista. Ionilähteessä näytteenäytöstä tai kromatografista tuleva näyte ionisoidaan ja saatetaan kaasufaasiin, jonka jälkeen ionit kulkevat vakuumissa olevaan massa-analysointilaitteeseen. Massa-analysointilaitteessa ionit erotellaan niiden massa- ja varaus-suhteen perusteella ja lopuksi ne havaitaan detektorilla. [18, s. 153.]

Ionilähteitä on paljon erilaisia ja sen valinta riippuu näytteen ominaisuuksista. LC-MS laitteistossa näyte on nesteinä saapuessaan ionilähteelle, joten ionisaatiota ennen ajo-osuus on haihdutettava pois. Tähän on kehitetty erilaisia menetelmiä, kuten sähkösumutus-ionisaatio (Electrospray ionization, ESI) ja ilmanpainainen kemiallinen ionisaatio. Tässä työssä käytettiin ESI-tekniikkaa. [24, s. 68.]

Massa-analysointilaitteista yleisin on kvadrupolimassa-analysointilaitte, joka suodattaa ioneja niiden massa- ja varaus-suhteen perusteella. Kvadrupoli perustuu ionien liikkeen stabiiliuteen kvadrupolisauvojen väliin muodostetussa sähkökentässä. Tässä työssä käytetään kolmoiskvadrupolimassa-analysointilaitteita. [18, s.125].

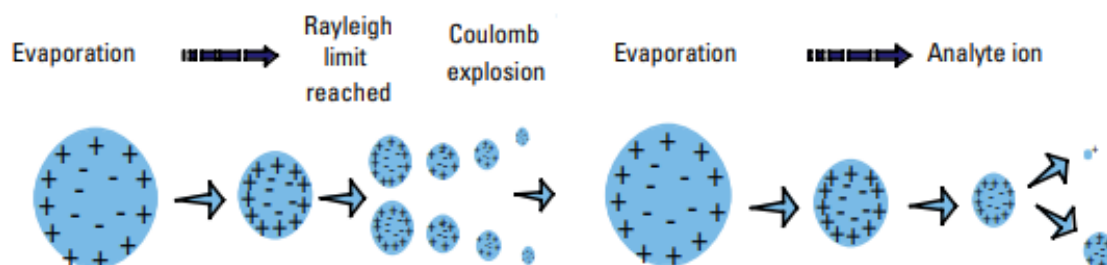
Sähkösumutus-ionisaatio

Sähkösumutus-ionisaatio (Electrospray ionization, ESI) on pehmeä ionisaatiotekniikka, jolla nesteessä olevat näytemolekyylit ionisoidaan ja samalla ajo-osuus haihdutetaan pois, jotta näyteionit saadaan kaasuksi [24, s. 71]. Kuvassa 4 ionisaatiotekniikan kaavakuva.



Kuva 4. Sähkösumutus-ionisaatio tekniikan kaavakuva [25].

Näyte pumpataan neulan läpi ylhäältä alaspäin kohti sumutuskammiota. Neulaan on johdettu n. 3–5 kV:n jännite, joka saa aikaan nesteessä olevien saman polariteetin omaavien hiukkasten siirtymisen liuoksen pintaan muodostaen varauksellisia aerosoleja. Sumutuskammiossa on kuivauskaasuna usein typpeä tai argonia. Kuivauskaasun avulla aerosoleista haihtuu ajoliuos ja varauksettomat hiukkaset. Aerosolien varaustiheys nousee haihtumisen seurauksena, ja lopuksi sähköinen poistovoima voittaa pintajännitteen ja aerosolit räjähtävät (ns. Coulumbinen räjähdys) jättäen vain halutun varauksen omaavia näyteioneja jäljelle. Tämä toistuu, kunnes kaikki ionit ovat kaasuna. Pooliset molekyylit tuottavat pääsääntöisesti protonoituneita molekyylejä ($[M+H]^+$), mutta myös adduktiioneja saattaa esiintyä. Ionien muodostumisprosessi on kuvattu kuvassa 5. [24, s. 71–73.]

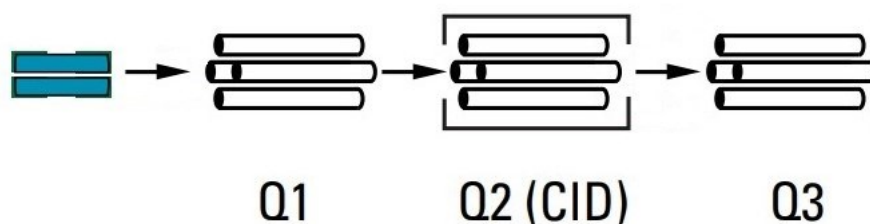


Kuva 5. Ionien muodostuminen ESI-ionisaatiossa [26].

Kolmoiskvadrupoli

Kvadrupolit suodattavat ioneja perusten niiden liikerataan kvadrupolisauvojen eli elektrodien muodostamassa sähkökentässä. Yhdessä kvadrupolissa kvadrupolisauvoja on neljä ja ne on asetettu yhdensuuntaisesti kuvan 6 mukaisesti. Vastakkaisiin sauvoihin on johdettu tasa- ja vaihtojännitteet elektronikentän muodostamiseksi. Ionin matkaan kvadrupolin läpi vaikuttaa sähkökentän jännitteet. Sähkökentän vaikutuksesta ionit värähtelevät niiden kulkusuuntaan nähden kohtisuoraan. Jos värähtelyn liikerata pysyy matalana, ioni läpäisee kvadrupolin ja päätyy detektorille. Jos värähtelyn liikerata on liian suuri, ioni törmää kvadrupolisauvoihin eikä saavuta detektoria. Näin tietyillä jännitteillä vain tietyn massa-varaus-suhteen omaavat ionit pääsevät koko sauvaston läpi detektorille. Muuttamalla jännitteitä voidaan säädellä, minkä m/z -arvon ionit detektoidaan. [24, s. 27–31.]

Kolmoiskvadrupolissa kvadrupoleja on kolme kytkettynä peräkkäin, joista ensimmäinen (Q1) ja kolmas kvadrupoli (Q3) ovat tavallisia kvadrupoleja, ja toinen kvadrupoli (Q2) on törmäyskammio. Kolmoiskvadrupolin rakennekaavio on esitetty kuvassa 6. Törmäyskammioon johdetaan törmäyskaasua, usein typpeä tai argonia, johon törmättyään ionit hajoavat fragmenteiksi eli tuoteioneiksi. Q2 ei suodata ioneja vaan kaikki ionit pääsevät sen läpi Q3:een. [24, s. 32–33.]



Kuva 6. Kolmoiskvadrupolin kaavakuva [26, muokattu].

Kolmoiskvadrupolin pyyhkäisytekniikat, jotka tässä esitellään, ovat tuoteionipyyhkäisy, lähtöionipyyhkäisy, neutraalipalan lohkeamispyyhkäisy ja valittujen reaktioiden seuranta (Selected reaction monitoring, SRM). Tuoteionipyyhkäisyssä Q1 on asetettu skannaamaan vain tietty ioni, joka kulkeutuu

törmäyskammioon ja hajoaa tuoteioneiksi, jonka jälkeen kaikkien syntynein tuoteionien massaspektri mitataan. Lähtöionipyyhkäisyssä Q1:n läpi pääsee kaikki ionit, ja Q3 päästää lävitse vain tiettyjä tuoteioneja, joita törmäyskammiossa on muodostunut. Neutraalipalan lohkeamispyyhkäisyssä Q1 ja Q3 on asetettu skannaamaan tiettyjä massoja, joiden ero on vakio a . Tällöin havaitaan ne ionit, joista fragmentoinnin yhteydessä irtoaa neutraalipala, jonka massa on a . Valittujen reaktioiden seurannassa Q1 skannaa vain yhtä m/z -arvoa ja vain kyseisen massan omaavat ionit pääsevät törmäyskammioon, minkä jälkeen Q3 skannaa vain tiettyä tuoteionia. Jos valittujen reaktioiden seurannassa monitoroidaan useaa ionia yhtä aikaa, kyseessä on MRM-tekniikka (Multiple reaction monitoring). [24, s. 32–33.]

Elektronimonistin

Detektorina tässä työssä käytettiin elektronimonistinta (Secondary electron multiplier, SEM). Elektronimonistimen tarkoitus on vahvistaa ionien virta emittimellä elektroneja. Kvadrupolilaitteissa tutkittavat negatiiviset ionit törmäävät aluksi positiiviseen konversiodynodiin, josta irtoaa positiivisia ioneja. Positiiviset ionit jatkavat kohti elektronimonistimen dynodia (katodi). Positiivisten ionien törmätessä dynodille, siitä irtoaa elektroneja ja negatiivisia ioneja, jotka vuorostaan kulkevat seuraavalle dynodille irrottaen lisää elektroneja. Näin elektronien määrä kasvaa ja lopuksi kaikki elektronit saapuvat keräimelle, jossa virta havaitaan. Elektronimonistin on yksi käytetyimmistä detektoreista kvadrupolilaitteissa. [24, s. 97.]

5 Kemikaalit ja reagenssit

5.1 Kemikaalit ja reagenssit

Työssä käytetyt kemikaalit ja reagenssit

- metanoli, HPLC-laatu, Honeywell Rieder-de Haen
- heksaani, Sigma-Aldrich, lot. I1184327 152

- etyyliasetatti. VWR Chemicals, lot. 21E254014_1
- metyyli-tert-butyylietteri (MTBE), lot. STBK1544 Sigma-Aldrich
- ammoniumformiaatti, Fluka, lot. L0350
- muurahaishappo, Honeywell, lot. 102426319
- Girard's P reagent, Biosynth Carbosynth, lot. 236631501.

Työssä käytettiin myös seuraavia liuoksia, joita valmistettiin laboratoriossa:

- kaliumkarbonaatti K_2CO_3 20 %- kaliumvetykarbonaatti $KHCO_3$ 20 %. $KHCO_3$: Merck lot. A1464854110, K_2CO_3 : Merck lot. A1045928713
- natriumkloridi (NaCl) kyllästetty, Merck tuote.nro.: 1.06404.5000 lot. K52211904119
- kaliumnatriumfosfaattipuskuri 0,8 mol/l pH 7,0: KH_2PO_4 : Merck lot. AM1206973912, Na_2HPO_4 : Supelco lot. F2170586135
- TMS-jodidi: Ammoniumjodidi lot. AO409537, 1,4-dithioerytritoli lot. SLCF0784, MSTFA lot. 0711-3, Macherey-Nagel.

Työssä tutkittujen testosteroniesterien valmistaja oli Streraloids.

5.2 Käytetyt laitteet

Tässä työssä käytetyt laitteet ja ohjelmistot

- LC/MS/MS-laitteisto "Alma"
 - nestekromatografi, Agilent Technologies 1290
 - esikolonne, Agilent Zorbax Eclipse Plus C-18 21 x 5 mm, 1,8 μ m (tuotenro. 821725-901)
 - kolonne, Agilent Zorbax XDB-C8; 2,1 x 50 mm; 3,5 μ m (tuotenro. 971700-906)
 - massaspektrometri, Agilent Technologies 6460
 - sähkösumutusionilähde (ESI)
 - kolmoiskvadrupolianaalysaattori, m/z 5–3000
- sentrifuugi, Sorvall RC 3BP, Sorvall
- ravistelulaite, Multitube Vortexer GS, Lab-tek Corporation Ltd.

- haihdutinlaitteisto, TurboVap, Biotage
- lämpöhaude, Dri-Blocj D8100/3, Tecne
- massHunter LC/MS Acquisition -ohjelma, Versio B08,02
- milli Q -vesi, tyyppi-1, Direct-Q 8 UV Remote.

6 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehityksessä selvitettiin Girard's P -derivatisointireagenssin toimivuutta, kehitettiin gradientti, selvitettiin eri uuttoliuottimien toimivuutta ja säädettiin näytteenkäsittelyn viimeinen liuotustilavuus.

Menetelmän näytteenkäsittelyn protokolla, jota sovellettiin tarpeen mukaan, oli seuraava

- Pipetoidaan 200 µl näytettä koeputkeen.
- Lisätään 20 µl ISTD-käyttöliuosta.
- Lisätään 3 ml uuttoliuotinta.
- Sekoitetaan 1 min multivorteksissa.
- Sentrifugoidaan 5 min noin 1000 g.
- Erotetaan orgaaninen faasi toiseen koeputkeen.
- Haihdutetaan kuiviin haihdutuslaitteistossa 45 C:ssa.
- Lisätään 20 µl Girard's P -derivatisointireagenssia.
- Lisätään 10-prosenttista etikkahappoa metanolissa 180 µl.

Jokaisesta tutkitusta yhdisteestä tehtiin 1 mg/ml puhtasaineliuokset metanoliin tai asetonitriliin menetelmänkehitystä varten. Lisäksi kaikista tehtiin laimennokset 10 µg/ml metanoliin tai asetonitriliin Valmistettiin myös seosliuos kaikista testosteroniestereistä (10 µg/ml) metanoliin. Sisäisten standardien käyttöliuos oli pitoisuudeltaan 50 ng/ml. A-ajoliuoksena käytettiin samaa A-ajoliuosta kuin laboratorion muissakin menetelmissä. Ajoliuokset valmistettiin vähintään viikoittain tai useammin tarpeen mukaan. A-ajoliuos sisälsi 2,5 mM ammoniumformiaattia ja 0,1-prosenttista muurahaishappoa vedessä. B-ajoliuos sisälsi 2,5 mM ammoniumformiaattia ja 0,1-prosenttista muurahaishappoa metanolissa. Lisäksi

valmistettiin laadunvarmistusnäytteet (quality control, QC). QC-näytteet valmistettiin seerumiin kahdelle pitoisuustasolle 0,5 ng/ml ja 5 ng/ml.

6.1 Optimointi

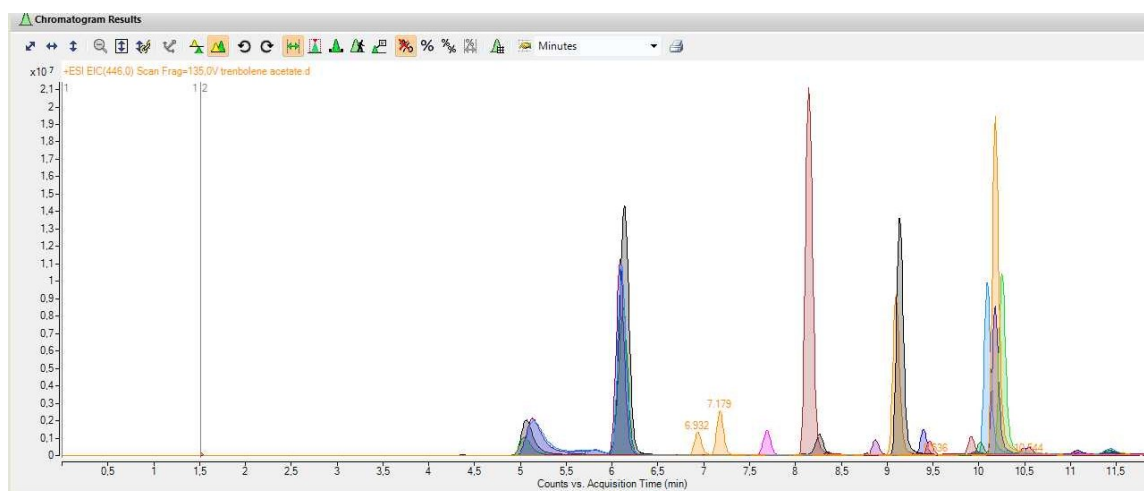
Aluksi testattiin yhdisteiden ionisoitumista ja derivatisoitumista. Varsinainen ionien ja olosuhteiden optimointi tehtiin automaattisella Optimaizer-ohjelmalla.

Jokaista puhdasainelaimennosta (10 µg/ml) pipetoitiin 20 µl omiin koeputkiin ja ne haihdutettiin kuiviin. Putkiin lisättiin 180 µl 10 %:sta etikkahappometanoliliuosta ja 20 µl Girard`s P derivatisointiliuosta (1 mg/ml, H₂O:ssa). Putket inkuboitiin 10 minuuttia 60 C°:n kuivahauteessa, jonka jälkeen näytteet siirrettiin sisäputkellisiin näytepulloihin. Jokainen näyte ajettiin lähtöionipyhkäisyllä taulukon 5 mukaisella gradientilla.

Taulukko 5. Lähtöionipyhkäisyn gradienttiajo. Ajo-ohjelman aika ja ajoliuosten A ja B koostumus.

Aika (min)	A-ajoliuos (%)	B-ajoliuos (%)
0,0	100	0
1,5	100	0
5,0	50	50
10,0	0	100

Kuvassa 7 on yhdisteiden intensiteetit ajan suhteen. Suurimmalla osalla yhdisteistä lähtöionin piikki näkyi hyvin. Kuvassa 7 keltaisella merkitty trenboloni asestaatin piikki oli kaksoispiikki ja huomattavasti matalampi intensiteetiltään kuin muiden. Boldenoniundesylenaatti ei tuottanut piikkiä ollenkaan.



Kuva 7. Lähtöioniajon kromatogrammi.

Massaspektrometrin parametrien optimointi suoritettiin automaattisella Optimizer-ohjelmalla. Optimizer-ohjelmaan syötettiin kunkin yhdisteen Girard's P -derivaattamolekyylin kemiallinen rakennekaava ($M+C_7H_7N_3$). Optimointi suoritettiin ilman kolonnia derivatisoiduista näytteistä. Optimizer antaa automaattisesti optimi lähtöionit (precursor ion), tuoteionit (product ion), ja törmäysenergiat (collision energy) kullekin yhdisteelle.

6.2 Uttomenetelmä

Eri uuttomenetelmien toimivuutta testattiin tutkituille yhdistelle ja käytetyllä matriisilla eli seerumilla. Kokeiltavaksi valittiin kolme eri uuttoa: metyyli-tert-butyyli-eteri-uutto (MTBE), heksaanietyyliasettaatti-uutto (Hex-EtAc) ja heksaanietyyliasettaatti-uutto ulossuolauksella (Hex-EtAc+suola). Uttomenetelmiä testattiin saantoprosentin avulla ja jokainen uutto tehtiin kahtena rinnakkaisena.

Uttotestejä varten valmistettiin seerumi-lisäysnäyte (50 ng/ml) pipetoimalla 25 µl steroidiestereiden seosliuosta (10 µg/ml) 5 ml:aan seerumipoolia. Seerumipooli on usean humaaniseeruminäytteen seos. Lisäksi valmistettiin heksaanietyyliasettaattiseos (70:30) ja kyllästettyä natriumkloridia vedessä. Aluksi putkiin 1–6 pipetoitiin 200 µl seerumi-lisäysnäytettä ja lisäksi taulukon 6 mukaiset

määrät muita liuoksia. Saantoputkiin 7–8 pipetoitiin seerumia, joka ei sisällä steroidiestereitä ja lisäksi taulukon 6 mukaiset liuokset.

Taulukko 6. Testatut uuttomenetelmät.

Putki	Uuttoliuokset
1–2	3 ml MTBE
3–4	3 ml heksaanietyyliasettaatti 70:30
5–6	3 ml heksaanietyyliasettaatti 70:30 50 µl kyllästetty NaCl
7–8	3 ml heksaanietyyliasettaatti 70:30

Kaikkia putkia 1–8 vorteksoitiin 1 minuutti ja sentrifugoitiin 5 minuuttia (n. 1000 g). Tämän jälkeen orgaaninen faasi erotettiin toiseen koeputkeeseen. Tässä vaiheessa putkiin 7–8 lisättiin kumpaankin 1 µl steroidiestereiden seosliuosta (10 µg/ml). Kaikki putket haihdutettiin kuiviin haihdutuslaitteistossa 45 °C:ssa. Näytteet derivatisoitiin lisäämällä 180 µl 10 %:sta etiikkahappo-metanoli-vesiliuosta ja 20 µl Girard` s P -derivatisointireagenssia (1 mg/ml, vedessä). Näytteet inkuboitiin 10 minuuttia kuivahauteella ja siirrettiin sisäputkellisiin näytepulloihin.

Uuttotestit ajettiin taulukon 7 mukaisella gradientilla, jossa ajoaikaa on pidennetty edelliseen verrattuna. Kolonnin lämpötila oli 55 astetta ja virtausnopeus oli 0,3 ml/min. Gradientin alussa ensimmäiset 2 minuuttia virtaus ohjattiin jätteesseen, jotta derivatisointireagenssia ei pääse massaspektrometriin.

Taulukko 7. Uuttotestin ajo-ohjelman aika ja ajoliuosten A ja B koostumus.

Aika (min)	A-ajoliuos (%)	B-ajoliuos (%)
0	100	0
1,5	100	0
5	50	50
15	0	100

6.3 Gradientti

Valmistettiin seosliuos (10 µg/ml), jolla testattiin erilaisia gradientteja. Taulukoissa 8 on gradientti 1 ja taulukossa 9 on gradientti 2. Kahta yhtä suuren maan omaavien yhdisteiden paria ei tässä vaiheessa vielä ollut yhdistetty, joten yhdisteet ovat erikseen nimettyinä ja kullakin on oma kromatogrammi. Ainoa yhdistetty pari on nandroloniundekanoaatti ja testosteronidekanoaatti. Muita ase-
tuksia ei muutettu.

Taulukko 8. Gradientti 1. Ajo-ohjelman aika ja ajoliuosten A ja B koostumus.

Aika (min)	A-ajoliuos (%)	B-ajoliuos (%)
0	80	20
1,5	80	20
5	40	60
15	0	100

Taulukko 9. Gradientti 2. Ajo-ohjelman aika ja ajoliuosten A ja B koostumus.

Aika (min)	A-ajoliuos (%)	B-ajoliuos (%)
0,0	100	0
1,5	100	0
5,0	50	50
15,0	0	100

6.4 Liuotustilavuus

Uuttotestin piikkien intensiteetin mataluuden takia, testattiin derivatisointitilavuuden vaikutusta piikkien intensiteettiin QC-näytteillä. Käytettiin aiemmin valmistettuja QC-näytteitä kahdella eri pitoisuustasolla: 5 ng/ml ja 0,5 ng/ml. Testatut tilavuudet olivat 180, 100 ja 50 µl. Pienempiä tilavuuksia testattiin kahdella rinnakkaisella koeputkella ja suurinta vain yhdellä näytteellä QC-näytteen määrän vähyyden vuoksi.

Pipetoitiin kumpaakin pitoisuustasoa viiteen eri koeputkeen. Kaikkiin kymmeneen koeputkeen pipetoitiin 20 µl ISTD-käyttöliuosta ja 3 ml MTBE:tä. Putket vorteksoitiin ja sentrifugoitiin 5 minuuttia 1000 G:llä, jonka jälkeen orgaaninen faasi erotettiin uuteen koeputkeen. Orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin haihdutuslaitteistossa 45 C°. Tämä jälkeen yhteen tason 5 ng/ml putkeen ja yhteen tason 0,5 ng/ml putkeen pipetoitiin 180 µl 10 %:sta etikkahappometanoliliuosta. Kahteen kummaankin tason putkeen pipetoitiin 100 µl 10 %:sta etikkahappometanoliliuosta ja kahteen kummankin tason putkeen 50 µl. Kaikkiin putkiin lisättiin 20 µl Girard's P -derivatisointireagenssia ja kaikki putket inkuboitiin 10 minuuttia 60 C°:ssa. Kaikki näytteet pipetoitiin sisäputkellisiin näytepulloihin ja ajettiin kehitetyllä menetelmällä. Gradienttia muokattiin vielä taulukon 10 mukaiseksi, jotta yhdisteet saataisiin erottumaan paremmin toisistaan.

Taulukko 10. Muokattu gradientti. Ajo-ohjelman aika ja ajoliuosten A ja B koostumus.

Aika (min)	A-ajoliuos (%)	B-ajoliuos (%)
0	80	20
1,5	80	20
2	40	60
15	0	100

7 Tulokset

7.1 Optimointi

Taulukkoon 11 on koottu saadut lähtöionit, tuoteionit ja törmäysenergiat, jotka tallennettiin seulontamenetelmään. Boldenoniundesylenaatti, jonka piikkiä ei ensimmäisessä testissä näkynyt, ei antanut automaattisella optimoinnillakaan kuin heikon intensiteetin. Sen lähtöioniksi valittiin alkuperäinen derivatisoitumaton ioni, jolla saatiin hyvät intensiteetit automaattisella optimoinnilla. Kolmella parilla yhdisteitä on sama massa. Parit ovat nandrolonilauraatti ja testosteroniudekanoaatti (590,4), testosteronikaproaatti ja testosteroni-isokaproaatti (520,4), nandroloniudekanoaatti ja testosteronidekanoaatti. Optimointiraportti on liitteessä 1.

Taulukko 11. Tutkituille yhdisteille valitut lähtöionit, tuoteionit ja törmäysenergiat

Yhdiste	Lähtöioni [M+H] ⁺	Tuoteionit	Törmäysenergiat (eV)
Nandrolonidekanoaatti	562,4	483,3 455,0	38 40
Nandrolonilauraatti/ Testosteroniundekanoaatti	590,4	511,3 163,1	38 58
Nandroloniundekanoaatti/ Testosteronidekanoaatti	576,4	497,3 469,3	42 38
Boldenoniundesylenaatti	453,3	149,2 99,2	18 22
Trenboloni asetaatti	446,2	367,2 264,1	26 38
Testosteroni asetaatti	464,3	385,2 151,0	30 50
Testosteronikaproaatti/ Testosteroni-isokaproaatti	520,4	441,2 151,0	34 50
Testosteronisyypionaatti	546,4	467,4 439,0	38 40
Testosteronienantaatti	534,4	455,3 427,0	34 36
Testosteronifenylpropionaatti	554,3	475,4 105,0	34 60
Testosteronipropionaatti	478,3	399,2 151,0	30 46
Testosteroni	422,3	343,2 163,0	30 42
Androstenedioni	420,3	342,2 313,2	30 30
ISTD testosteroni-d3	425,3	346,2 151,1	34 46
ISTD androstenedioni-d3	423,2	344,2 154,2	30 42
ISTD testosteroniundekanoaatti-d4	594,5	515,4 152,0	42 54

7.2 Uuttotesti

Tarkastellaan uuttojen onnistumista muutamien esimerkkiyhdisteiden avulla. Yhdisteiden saannot olivat hyvin erilaisia. Liitteessä 2 on kaikkien yhdisteiden saantoprosentit. Taulukkoon 12 on koottu viiden yhdisteen kahdesta rinnakkaisesta mittauksesta lasketut saantoprosentit. Rinnakkaiset mittaukset olivat keskenään melko erilaisia.

Taulukko 12. Viiden yhdisteen uuttotestin saantoprosentit uuttomenetelmillä.

Uutto	Androstenedioni-d3	Testosteroni asetaatti	Testosteronifenylpropionaatti	Testosteronisyypionaatti	Nandrolonidekanoaatti
Retentioaika (min)	5,01	8,17	10,5	11,7	12,7
MTBE (saanto-%)	110,0	100,7	54,6	34,1	18,0
Hex-etac (saanto-%)	95,3	94,5	70,4	37,6	12,6
Hex-etac+suola (saanto-%)	96,2	88,6	63,4	35,2	18,2

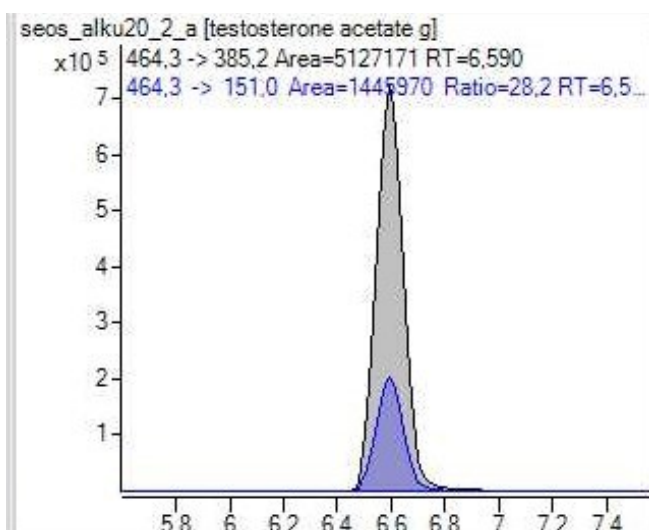
Tulosten perusteella valittiin sopiva uuttomenetelmä. Androstenedionin ja testosteroni asetaatin saantoprosentit olivat sadan prosentin luokkaa MTBE-uutossa ja molemmissa versioissa heksaani-etyyliasetatiuuttoja prosentit ylsivät yli 85 %:n. Testosteronifenylpropionaatin suurin saantoprosentti oli heksaanietyyliasetatiuutossa (70,4 %). Testosteronisyypionaatin prosentit olivat hyvin lähellä toisiaan kaikissa kolmessa uutossa. Saantoprosentit olivat vain hieman yli 30.

Kaikista heikoimmat saantoprosentit olivat nandrolonidekanoaattilla. Nandrolonidekanoaattin saannot olivat vain alle 20 %, parhaan ollessa hex-etac + suola, mutta ero MTBE uuttoon oli vain 0,2 %. Kokonaisuutta tarkastellessa yhdisteistä kuudella oli paras saantoprosentti MTBE-uutolla ja samoin kuudella yhdisteellä heksaanietyyliasetatiuutolla. Yhdisteet jakautuivat siten, että ensin eluoitu-neilla yhdisteillä MTBE-uutto oli paras ja keskivaiheilla eluoituivat Hex-EtAc-

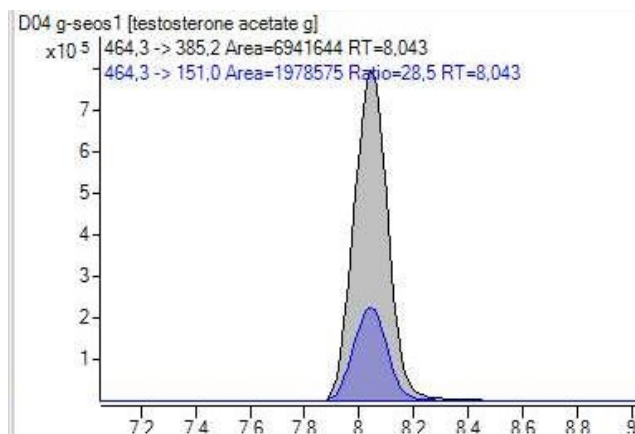
uutolla parhaan tuloksen saavuttaneet. Myöhemmin eluotuneilla yhdisteillä oli pienet saannot ja parhaana uuttona toimi Hex-EtAc + suola -uutto. Tällä perusteella Hex-EtAc + suola karsittiin pois ja vertailtiin kahta jäljelle jäänyttä uuttoa. Nyt parhaat saantoprosentit MTBE-uutolla saavutti 12 yhdistettä ja Hex-EtAc-uutolla 6 yhdistettä. Testosteroniestereiden seulontamenetelmään valittiin MTBE-uutto.

7.3 Gradientti

Kaikkien tutkittujen yhdisteiden ionikromatogrammit ovat liitteessä 3. Tässä esitetään testosteroni asetaatin, nandroloniundekanoaatin ja testosteronidekanoaatin ionikromatogrammit ja kaikkien tutkittujen yhdisteiden retentioajat. Kuvassa 8 ja 9 on testosteroni asetaatin ionikromatogrammit molemmilla gradientteilla. Gradientilla 1 (kuva 8) retentioaika on 6,59 ja gradientilla 2 (kuva 9) retentioaika on 8,043. Molemmilla gradientteilla piikit ovat melko symmetrisiä ja molemmat ionit tuottavat piikit.

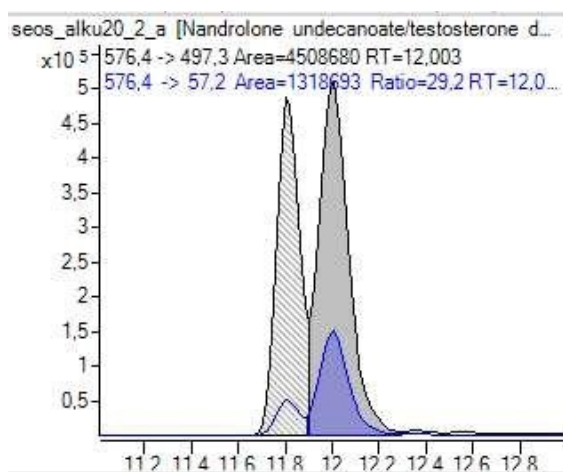


Kuva 8. Testosteroni asetaatin ionikromatogrammit gradientilla 1.

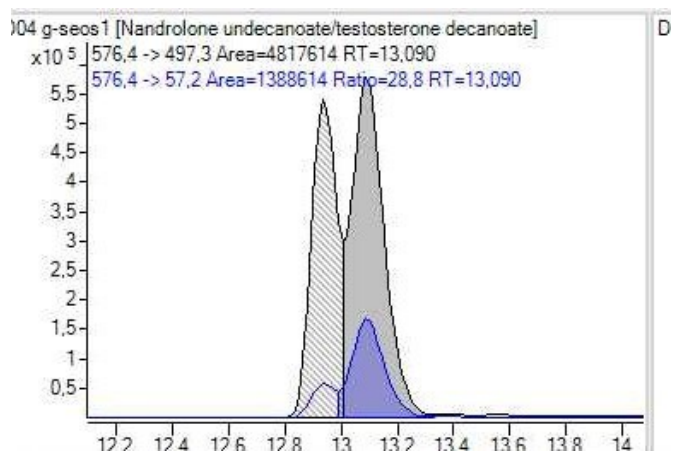


Kuva 9. Testosteroni asetaatin ionikromatogrammit gradientilla 2.

Nandroloniundekanoaatin ja testosteronidekanoaatin yhdistetty piikki on selkeästi kaksoispiikki kummallakin gradientilla (kuvat 10 ja 11). Tämä oli odotettua ja todettiin, että kaksoispiikit eivät vaikuta seulontaan, sillä yhdisteet voidaan erottaa varmistusmenetelmällä toisistaan.



Kuva 10. Nandroloniundekanoaatin ja testosteronidekanoaatin ionikromatogrammit gradientilla 1.



Kuva 11. Nandroloniundekanoaatin ja testosteronidekanoaatin ionikromatogrammit gradientilla 2.

Taulukkoon 13 on koottu yhdisteiden retentioajat kummallakin gradientilla.

Taulukko 13. Kaikkien yhdisteiden retentioajat gradienteilla 1 ja 2.

Yhdiste	Retentioaika (min) gradientilla 1	Retentioaika (min) gradientilla 2
ISTD testosteroni-d4	4,969	5,562
testosteroni	4,985	5,592
ISTD androstenedioni-d3	5,120	5,633
androstenedioni	5,028	5,649
testosteroni asetaatti	6,590	8,043
testosteronipropionaatti	7,323	8,946
testosteronifenylpropionate	8,857	10,480
testosteronikaproaatti	9,382	10,934
testosteroni-isokaproaatti	9,382	10,934
testosteronienantaatti	10,129	11,569
testosteronisyypionaatti	10,270	11,695
testosteronidekanoaatti	11,510	12,696
nandroloniundekanoaatti/ testosteronidekanoaatti	12,003	13,090
ISTD testosteroniundekanoaatti- d4	12,296	13,299
testosteroniundekanoaatti	12,270	13,314
nandrolonilauraatti	12,453	13,455
boldenoniundesylenaatti	13,478	14,269
trenboloni asetaatti	13,789	10,063

Gradienttien välillä ei ollut huomattavaa eroa yhdisteiden erotuksen suhteen. Gradientilla 1 yhdisteet erottuvat hieman tasaisemmin, kun gradientilla kaksi yhdisteet painottuvat gradientin loppupäähän. Gradientti 1 valittiin testosteronies-tereiden seulontamenetelmään.

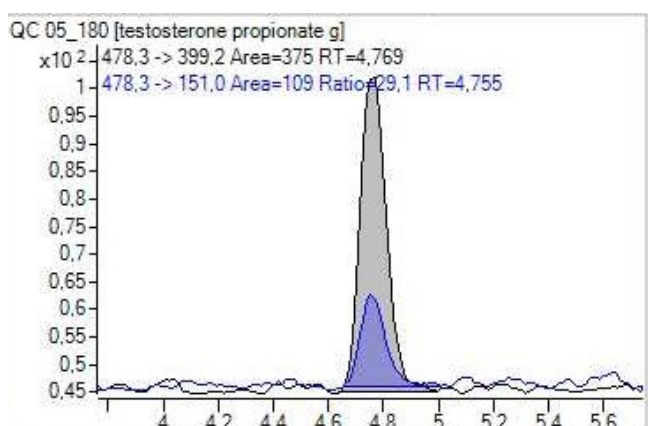
7.4 Liuotustilavuus

Tässä esitetään testosteronipropionaatti esimerkkiyhdisteenä tilavuuden vaikutuksesta piikin intensiteettiin. Kaikilla yhdisteillä kummallakin tasolla saatiin samsuuntaiset tulokset ja kaikki ionikromatogrammit ovat liitteessä 4. Taulukossa 14 on testosteronipropionaatin 399,2 m/z-arvon tuoteionien piikkien pinta-alat pitoisuustasolla 0,5 ng/ml.

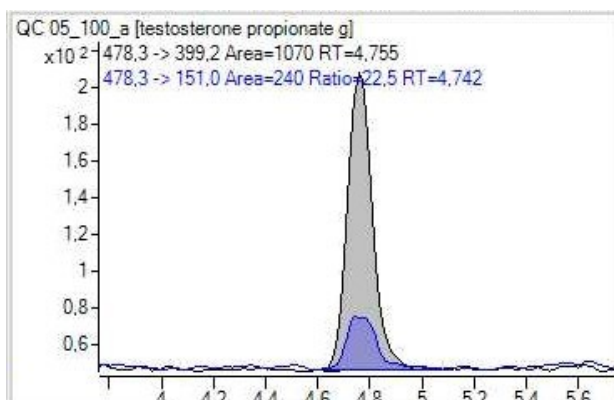
Taulukko 14. Testosteronipropionaatin tuoteionin (399,2 m/z) piikkien pinta-alat kullakin liuotustilavuudella.

Liutustilavuus (µl)	Testosteronipropionaatti 399,2 m/z (pinta-ala)
180	375
100	1070
50	3478

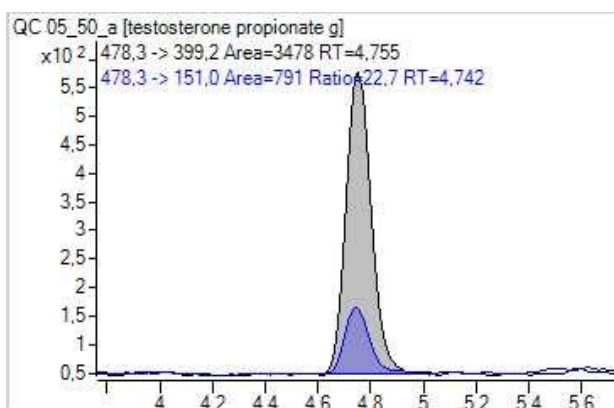
Piikkien pinta-ala kasvaa tilavuuden pienentyessä. 50 µl on riittävä tilavuus näytteen injektointiin laitteella. Kuvissa 13–18 on testosteronipropionaatin kromatogrammit tasolla 0,5 ng/ml kullakin liuotustilavuudelta. Piikit ovat symmetrisiä ja selkeitä. Steroidiestereiden seulontamenetelmään muutettiin liuotustilavuudeksi 50 µl.



Kuva 12. Testosteronipropionaatin ionikromatogrammit pitoisuudella 0,5 ja tilavuudella 180 µl.



Kuva 13. Testosteronipropionaatin ionikromatogrammi pitoisuudella 0,5 ng/ml ja tilavuudella 100 µl.



Kuva 14. Testosteronipropionaatin ionikromatogrammit pitoisuudella 0,5 ja tilavuudella 50 µl.

8 Yhteenveto

Tässä opinnäytetyössä kehitettiin anabolisten steroidiestereiden LC-MS/MS-seulontamenetelmä. Työhön kuului näytteenkäsittelyn testaus, optimointi ja MRM-menetelmän luominen THL:n dopingtestauslaboratorioon.

Seulontamenetelmän näytteen käsittelyyn valittiin neste-nesteuutoksi MTBE-uutto ja derivatisointitekniikaksi Girard's P -derivatisointi. Liutustilavuutta testattiin ja tilavuudeksi valittiin 50 µl. MRM-analysointimenetelmään valittiin kaikille yhdisteille lähtöionit, kaksi tuoteionia ja törmäysenergiat. Menetelmään luotiin myös sopiva gradienttiajo. Onnistuttiin kehittämään sopiva seulontamenetelmä, ja luotu menetelmä soveltuu validoitavaksi THL:n dopingtestauslaboratorioon.

Työn aikana testattiin myös toista derivatisointireagenssia ja muita gradienttiajoja. Näitä ei tässä työssä käydä läpi. Testattiin myös virtausnopeuden nostamista ja eri kolonnia, mutta tulokset eivät olleet paremmat ja kyseiset testit jätetään tässä työssä käsittelemättä. Näytteen esikäsittelyn faasien erotusvaihe suoritettiin tässä työssä käsin pipetoimalla. Kyseistä vaihetta voitaisiin tulevaisuudessa tehostaa erityisesti työtehokkuuden kannalta esimerkiksi kuivajään avulla, jolloin vesifaasi jäätyy ja orgaaninen faasi voidaan kaataa uuteen putkeen. Muutos lyhentäisi esikäsittelyyn kuluvaan aikaa.

Lähteet

- 1 Accredited laboratories. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/accredited-laboratories>> Luettu 3.8.22.
- 2 Who we are. 2022. Verkkoaineisto. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/who-we-are>> Luettu 29.3.2022.
- 3 World Anti-Doping Code. 2021. Verkkoaineisto. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/world-anti-doping-code>> 1.1.2021. Luettu 29.3.2022.
- 4 International convention against Doping in Sport. 2022. Verkkoaineisto. UNESCO. <<https://en.unesco.org/themes/sport-and-anti-doping/convention>> Luettu 26.4.2022.
- 5 International Standards. 2022. Verkkoaineisto. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/international-standards>> Luettu 31.3.22.
- 6 List of Prohibited Substances and Methods. 2022. Verkkoaineisto. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/prohibited-list>> 1.1.2022. Luettu 31.3.2022.
- 7 International standard for Testing and Investigations. 2021. Verkkoaineisto. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-testing-and-investigations-isti>> Luettu 29.3.2022.
- 8 Doping aineiden vaikutukset. 2022. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/kielletyt-aineet-ja-menetelmat/dopingaineet-ja-vaikutukset/>> Luettu 29.3.2022.
- 9 Dopingvalvonta. 2022. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/dopingvalvonta/>> Luettu 29.3.2022.
- 10 Antidopingtoiminnan historia. 2022. Verkkoaineisto. SUEK <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/dopingvalvonta/antidopingtoiminnan-historia/>> Luettu 30.3.22.
- 11 Dopingtestaus. 2022. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/dopingvalvonta/dopingtestaus/>> Luettu 30.3.2022.
- 12 Testauspooli. 2022. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/dopingvalvonta/testauspooli/>> Luettu 30.3.2022.

- 13 Forsdahl, Guro; Erceg, Damir; Geisendorfer, Thomas; Turkalj, Mirjana; Plavec, Davor; Thevis, Mario; Tretzel, Laura & Gmeiner Günter. 2015. Detection of testosteroni esters in blood. John Wiley & Sons Ltd.
- 14 Anti-Doping Testing Figures. 2020. Verkkoaineisto. WADA. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf> Luettu 7.4.2022.
- 15 Forsdahl, G; Vatne H.K; Geisendorfer, T & Gmeiner G. 2013. Screening of testosteroni esters in human plasma. John Wiley & Sons Ltd. <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full>>
- 16 Veriseerumi. 2016. Verkkoaineisto. Terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03718/veriseerumi>> Luettu 4.7.2022.
- 17 Psychogios, Nikolaos; Hau, David D.; Peng, Jun; Guo, An Chi; Mandal, Rupasri; Bouatra, Souhaila; Sinelnikov, Igor; Krishnamurthy, Ramanarayan; Eisner, Roman; Gautam, Bijaya; Young, Nelson; Xia, Jianguo; Knox, Craig; Dong, Edison; Huang, Paul; Hollander, Zsuzsanna; Pedersen, Theresa L.; Smith, Steven R; Bamforth, Fiona; Greiner, Russ; McManus, Bruce; Newman, John W.; Goodfriend, Theodore & Wishart, David S. 2011. The Human Serum Metabolome. Plos One. <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0016957>> Luettu 8.8.2022.
- 18 Jaarinen, Soili & Niiranen Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita.
- 19 Harris, Daniel C. 2016. Quantitative Chemical Analysis. 9th edition. New York; W. H Freeman & Company.
- 20 Derivatisointi. 2000. Verkkoaineisto. Regins Technologies Inc. <https://web.ahive.org/web/20160304002519/https://www.chromspec.com/pdf/gc_derivativization_methods.pdf> Luettu 8.8.2022.
- 21 Van Renterghema, Pieter; Viaene, Wouter; Van Gansbeke, Wim; Barra-binb, Juliana, Iannone, Michele; Poleta, Michael; T'Sjoend, Guy; Deventera, Koen & Van Eenoo, Peter. 2020. Validation of an ultra-sensitive detection method for steroid esters in plasma for doping analysis using positive chemical ionization GC-MS/MS. Journal of Chromatography B. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>
- 22 Frey, Alexander J; Wang, Qingqing; Busch, Christine; Feldman, Daniel; Bottalico, Lisa; Mesaros, Clementina A.; Blair, Ian A.; Vachani, Anil and Snyderf, Nathaniel W. 2016. Validation of highly sensitive simultaneous targeted and untargeted analysis of keto-steroids by Girard P

derivatization and stable isotope dilution-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry.

- 23 How Does High Performance Liquid Chromatography Work? 2022. Waters. Verkkoaineisto. <https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US > Luettu 25.4.2022.
- 24 Ketola, Raimo; Kostianen Risto; Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo (toim.). 2010. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki.
- 25 Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System. 2012. Verkkoaineisto. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3335-90135_QQQ_Concepts> s. 49
- 26 Basics of LC/MS. 1998. Verkkoaineisto. Agilent Technologies. <<https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>>

Optimointiraportti

Optimizer Report



Agilent Technologies

Instrument Information

Project Name D04_3
 Instrument Name Alma
 Instrument Model G6460A

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
nandrolone decanoate g	C35H51O3N3	561.39	1

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive Ion Source AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
562.4	70

Product Ion	Collision Energy	Abundance
483.3	38	20998
151.9	14	2787
96.8	34	329
325.3	18	169
89.4	30	1138
133	22	1025

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
nandrolone laurate g	C37H55O3N3	589.42	2

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive Ion Source AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
590.43	70

Product Ion	Collision Energy	Abundance
511.4	38	56800
57.3	60	17831
483.4	46	14442
80.2	46	9983
95.2	60	5957
162.9	54	3811

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Nandrolone undecanoate g	C36H53O3N3	575.41	3

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion	576.42	Fragmentor	70
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
497.3	38	193451	
57.2	60	45242	
469.3	42	26281	
80.2	42	18437	
95.1	58	17243	
135.1	58	19942	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Boldenone undecylenate g	C37H51O3N3	585.39	4

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion	586.4	Fragmentor	142
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
57.2	54	1710	
302.3	26	132	
323.2	26	136	
106.8	50	452	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
trenbolone acetate g	C27H31O3N3	445.24	5

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion	446.25	Fragmentor	106
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
264.1	38	48439	
367.2	26	46256	
339.2	30	14009	
251.1	46	17508	
324.2	34	8557	
80.2	42	2136	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone acetate g	C28H37O3N3	463.28	6

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
464.29	70

Product Ion	Collision Energy	Abundance
385.2	30	20261
162.9	42	4942
74.3	18	3551
135	54	4201
151	50	7758
447.6	14	2506

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone caproate g	C32H45O3N3	519.35	7

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
520.36	70

Product Ion	Collision Energy	Abundance
441.3	34	160809
151.1	46	32791
163	50	43021
135	58	32460
80.1	38	19070
123	60	21702

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone cypionate g	C34H47O3N3	545.36	8

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
546.37	70

Product Ion	Collision Energy	Abundance
467.4	38	9390
151	42	1663
294.7	26	240
311.3	18	274

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone decanoate g	C36H53O3N3	575.41	9

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS_100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
576.42		70	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
497.3	38	11225	
57.3	46	1757	
327.3	18	133	
331.4	14	192	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone enanthate g	C33H47O3N3	533.36	10

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS_100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
534.37		70	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
455.3	34	32513	
151.1	42	8031	
97.3	18	1092	
131.1	60	352	
286.8	14	247	
310	46	216	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone isocaproate g	C32H45O3N3	519.35	11

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS_100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
520.36		70	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
441.2	34	263257	
151	50	60312	
163	54	50072	
81.2	58	44138	
135	60	45043	
123	54	36847	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone phenylpropionate g	C35H43O3N3	553.33	12

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
554.34		70	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
475.4	34	12478	
105	60	4743	
308	18	288	
312	18	231	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone propionate g	C29H39O3N3	477.3	13

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
478.31		70	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
399.2	30	209342	
163	46	43682	
151	46	69270	
135	60	47047	
123	58	33066	
120	60	41280	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
testosterone undecanoate g	C37H55O3N3	589.42	14

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
590.43		70	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
511.3	38	68524	
151.1	54	23352	
163.1	58	33884	
123.1	50	14669	
80.2	38	10922	
135.1	60	15965	

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
ISTD testosterone undecanoate-d4 g	C37H51O3D4N3	593.45	15

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
594.46	70

Product Ion	Collision Energy	Abundance
515.4	42	77273
152	54	23385
164.1	60	22474
136	58	17308
121	60	9767
124	60	16346

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
ISTD testosterone-d3 g	C26H32O2D3N3	424.29	16

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
425.3	178

Product Ion	Collision Energy	Abundance
346.2	30	291202
163	46	100175
151.1	50	92810
120.1	60	69419
135	50	61611
123.1	50	56460

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
ISTD androstenedione-d3 g	C26H30D3O2N3	422.28	17

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
423.29	214

Product Ion	Collision Energy	Abundance
344.2	30	108653
120	58	27730
154	42	24651
111.1	60	27159
135	54	27899
80.2	38	16825

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Androstenedione g	C26H35O2N3	421.27	18

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion **Fragmentor**

422.28 142

Product Ion **Collision Energy** **Abundance**

232.8 14 326

255.9 50 253

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Testosterone g	C26H33O2N3	419.26	19

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion **Fragmentor**

420.27 106

Product Ion **Collision Energy** **Abundance**

97.2 18 1438

137.2 18 545

228.6 10 1374

234.9 14 381

239.4 18 133

111.3 34 1105

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
boldenone undecylenate ei deri.	C30H44O3	452.33	1

Method Name

C:\MassHunter\Methods\Optimointi\Optimointi_POS 100%B.m

Polarity Positive **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion **Fragmentor**

453.34 106

Product Ion **Collision Energy** **Abundance**

149.2 18 5269

269.2 14 11259

275.3 18 218

99.2 22 513

62 60 129

257.9 38 134

Uuttotestin tulokset

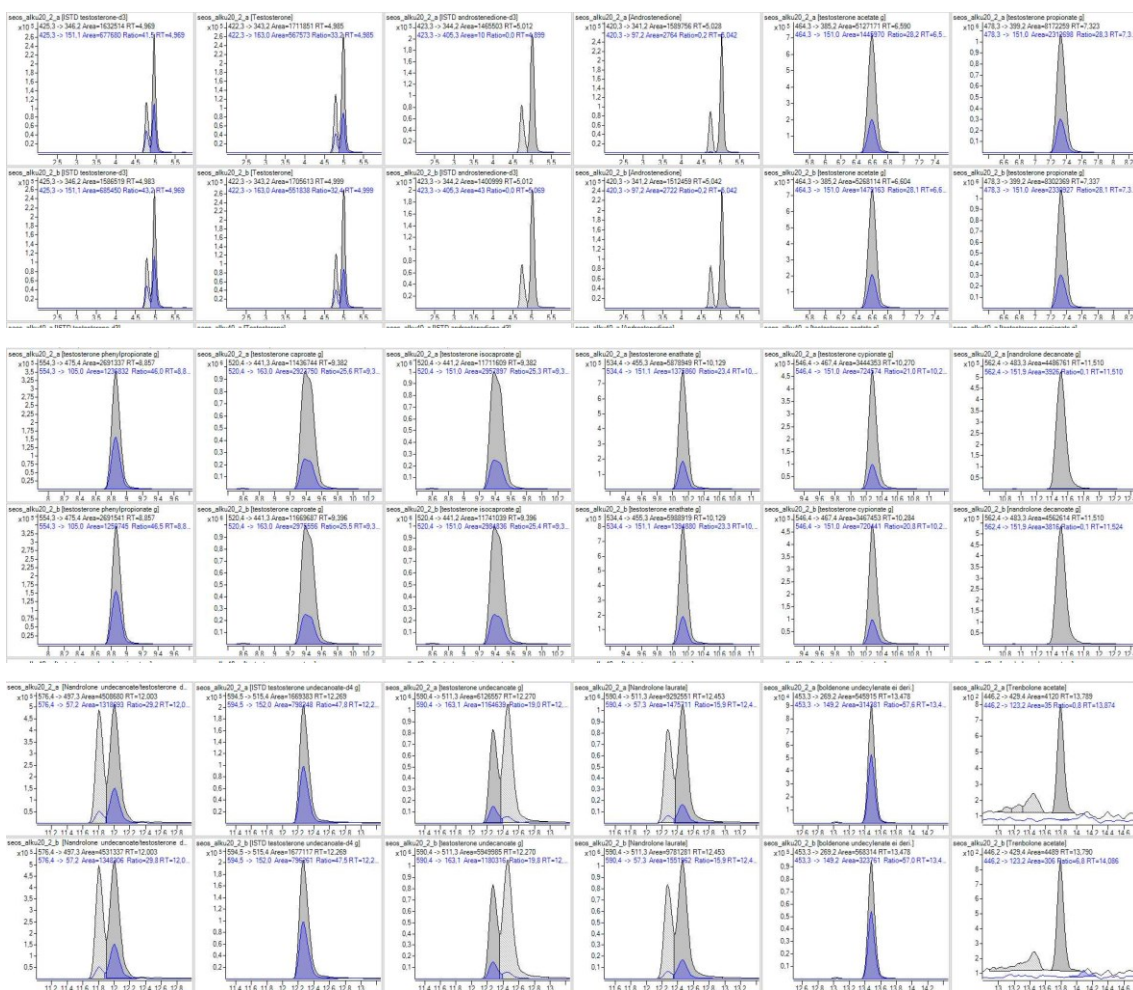
Taulukko 1. Uuttotestien tulokset.

Name	ISTD testosterone-d3 Results				ISTD androstenedione-d3 Results				Testosterone Results			
	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	Area ka	%
MTBE a	5,00	40282,2	39407,1	111,02	5,01	52410	50040	110,0	5,013	45195	44333	110,6
MTBE b	5,00	38532,1			5,00	47669			5,013	43471		
hex-etac1 a	5,00	30903,4	33759,6	95,1	5,01	39657	43356	95,3	5,013	34858	36180	90,3
hex-etac1 b	5,01	36615,8			5,01	47054			5,013	37502		
hex-etac1+suola a	5,00	31374	33296	93,8	5,00	42363	43755	96,2	5,013	33924	35934	89,6
hex-eatc1+suola b	5,00	35218			5,00	45148			5,013	37943		
100%-saanto a	5,01	28573,2	35496,6	100	5,01	39657	45498	100	5,013	32149	40083	100
100%-saanto b	5,00	42420,1			5,01	51339			5,013	48017		
	Androstenedione Results				Trenbolone acetate Results				testosterone acetate g Results			
	RT	Area	area ka	%	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	Area ka	%
MTBE a	5,014	63411,7	61007,3	109,2	7,311	227,96	179,15	87,6	8,171	104630	101616	101
MTBE b	5,014	58603			7,311	130,34			8,171	98602		
hex-etac1 a	5,014	47173,6	52841,8	94,6	7,311	156,20	189,9	92,8	8,171	88283	95334	94,5
hex-etac1 b	5,014	58510			7,325	223,61			8,171	102385		
hex-etac1+suola a	5,028	49727,6	50202,7	89,9	7,325	159,39	183,46	89,7	8,171	87423	89341	88,6
hex-eatc1+suola b	5,014	50677,7			7,311	207,53			8,171	91260		
100%-saanto a	5,014	48872	55869,1	100,0	7,311	165,17	204,55	100,0	8,171	82631	100883	100
100%-saanto b	5,014	62866,2			7,297	243,94			8,171	119136		
	testosterone propionate g Results				testosterone phenylpropionate g Res				testosterone caproate g Results			
	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	area ka	%
MTBE a	9,03	188068	181577	93,13	10,5235	22608,5	21504	54,629	10,99157	117039,9	111443	49,7
MTBE b	9,03	175087			10,5235	20399,4			10,99158	105845,3		
hex-etac1 a	9,03	172255	181437	93,06	10,5235	28048,4	27716	70,41	10,99157	147089,2	143530	64
hex-etac1 b	9,03	190619			10,5235	27383,4			10,99157	139970,2		
hex-etac1+suola a	9,03	166466	169856	87,1	10,5235	24695,8	24987	63,479	10,99158	126284,8	127019	56,7
hex-eatc1+suola b	9,03	173246			10,5235	25279			10,99157	127752,6		
100%-saanto a	9,03	160753	194973	100	10,5235	33132,3	39363	100	10,99157	189135,9	224108	100
100%-saanto b	9,03	229193			10,5235	45594,5			10,99157	259080,3		
	testosterone isocaproate g Results				testosterone enathate g Results				testosterone cypionate g Results			
	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	area ka	%	RT	Area	area ka	%
MTBE a	10,992	120192	113755	49,893	11,6118	34876,6	33292	34,1	11,72392	16619,9	15586	33,9
MTBE b	10,992	107318			11,6118	31707,1			11,72392	14551,2		
hex-etac1 a	10,992	150458	146358	64,193	11,5977	39991,9	36760	37,6	11,72392	18121,1	16614	36,2
hex-etac1 b	10,992	142259			11,6118	33528,3			11,72392	15107,4		
hex-etac1+suola a	10,992	131534	130172	57,094	11,5977	34729,4	34385	35,2	11,72392	15957,7	15894	34,6
hex-eatc1+suola b	10,992	128811			11,5977	34040,6			11,72392	15831,1		
100%-saanto a	10,992	190597	227996	100	11,5977	82102	97673	100	11,7239	39062,2	45939	100
100%-saanto b	10,992	265394			11,5977	113244			11,72392	52816,3		

	Boldenone undecylenate Results				nandrolone decanoate g Results				Nandrolone undecanoate/ testosterone decanoate Results			
	RT	Area	area ka	%	RT	Area	area ka	%	RT	Area	area ka	%
MTBE a	12,5817	20,147	20,14	29,91	12,72442	16191	15565,3	18,0	13,12	16263	15513	16,1
MTBE b	12,65228	20,124			12,72442	14939			13,12	14762		
hex-etac1 a	12,6805	11,041	9,82	14,59	12,72442	13269	10883,9	12,6	13,12	12744	10203	10,6
hex-etac1 b	12,55347	8,597			12,72442	8498,5			13,12	7662,2		
hex-etac1+suola a	12,60993	19,668	18,74	27,84	12,72442	16213	15762,1	18,2	13,12	16017	15802	16,4
hex-etac1+suola b	12,73695	17,818			12,72442	15311			13,12	15587		
100%-saanto a	12,72283	29,861	67,32	100	12,7244	73814	86413,0	100	13,12	83156	96583	100
100%-saanto b	12,65227	104,784			12,72442	99012			13,12	110010		
	ISTD testosterone undecanoate-d4 g R				testosterone undecanoate g Results				Nandrolone laurate Results			
	RT	Area	Area ka	%	RT	Area	area ka	%	RT	Area		
MTBE a	13,32742	4574,86	4359,4	15,6	13,3282	16773	15741,0	15,4804	13,47	25066	23934	14,656
MTBE b	13,32742	4143,95			13,3282	14709			13,47	22801		
hex-etac1 a	13,32742	3498,53	2797,43	10,01	13,3282	12256	9731,0	9,56992	13,47	18866	14963	9,1629
hex-etac1 b	13,32742	2096,32			13,3282	7206			13,47	11061		
hex-etac1+suola a	13,32743	4772,05	4688,71	16,78	13,32822	17328	16687,4	16,4111	13,47	25897	25638	15,699
hex-etac1+suola b	13,32742	4605,37			13,3282	16047			13,47	25378		
100%-saanto a	13,3274	24539,6	27946,3	100	13,3282	88418	101683,3	100	13,47	142708	163304	100
100%-saanto b	13,32742	31353			13,3282	114949			13,47	183900		

Gradienttitestin ionikromatogrammit

Gradientti 1



Gradientti 2

