



Jani Salminen

Uusien endogeenisten referenssiyhdisteiden validointi GC-C-IRMS-menetelmään

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

17.1.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Jani Salminen
Otsikko:	Uusien endogeenisten referenssiyhdisteiden validointi GC-C-IRMS-menetelmään
Sivumäärä:	51 sivua + 2 liitettä
Aika:	17.1.2024
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Kemisti Mari Piirainen Laboratoriopäällikkö Tina Suominen Lehtori Mia Ruismäki

Doping on määritelty kilpaurheilussa sellaiseksi toiminnaksi, joka parantaa suorituskykyä antidopingsäännösten vastaisilla tavoilla. Testosteronin ja muiden anabolisten steroidien käyttäminen kilpasuorituksen tehostamiseksi on Maailman antidopingjärjestö WADAn määräyksestä kiellettyä kaikkina aikoina, ja määräyksen laiminlyönnistä seuraa urheilijan välitön diskvalifiointi sekä mahdollisesti jopa kilpailukieltoa. Testosteronia esiintyy luontaisesti ihmisen kehossa. Sen synteettisen vastikkeen nauttimisen todistamiseksi on käytettävä isotooppisuhdemassaspektrometristä (IRMS) menetelmää, joka kykenee isotooppitasolla havaitsemaan yhdisteiden eroavaisuuksia.

Opinnäytetyö tehtiin THL:n dopingtestauslaboratoriossa. Opinnäytetyön aiheena oli lisätä ja validoida olemassa olevaan IRMS-menetelmään kaksi uutta endogeenistä referenssiyhdistettä, 5α -androst-16-en-3 α -ol (16-EN) sekä pregnanetrioli (PT). Validointi suoritettiin soveltaen voimassa olevaa omaa validointiohjetta, WADAn ohjeistusta ja WADAn ohjeissa määritettyjä laatutavoitteita. IRMS-menetelmässä virtsanäyte käy läpi esikäsitteilyn, johon kuuluu kiinteäfaasiuutto, entsyymaattinen hydrolyysi, nesteuutto sekä fraktiointi nestekromatografisesti. Isotooppisuhdemittaus vaatii näytteen tarkan puhdistamisen ja yhdisteiden erottelun, sillä endogeenisiä referenssiyhdisteitä ja kohdeyhdisteitä täytyy pystyä mittaamaan yksitellen. Synteettisten steroidien käyttö vahvistetaan, jos näytteessä olevan testosteronin tai muun kohdeyhdisteen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo poikkeaa riittävästi endogeenisistä referenssiyhdisteistä.

Opinnäytetyön ansiosta ollaan lähempänä uusien yhdisteiden validoimista menetelmään. Aikataulusyistä täydellistä validointia ei onnistuttu tekemään, mutta saatujen tulosten perusteella pregnanetrioli ja 16-EN ovat sopivia yhdisteitä IRMS-menetelmään.

Avainsanat: dopinganalytiikka, steroidit, isotooppisuhde-massaspektrometria, IRMS, validointi

Abstract

Author: Jani Salminen
Title: Validation of New Endogenous Reference Compounds for GC-C-IRMS Method
Number of Pages: 51 pages + 2 appendices
Date: 17 January 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Instructors: Mari Piirainen, Chemist
Tina Suominen, Head of the Laboratory
Mia Ruismäki, Senior Lecturer

Doping is considered as an activity that improves performance during competitive sports in ways that violate anti-doping regulations. The use of testosterone and other anabolic steroids to enhance competition performance is prohibited at all times according to the World Anti-Doping Agency (WADA), and failure to comply with the regulation results in the athlete's immediate disqualification, and possible suspension from competition. Since testosterone occurs naturally in the human body, to prove the intake of its synthetic counterpart, an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) method that can detect differences in compounds at the isotopic level must be used.

This study was carried out in THL's doping testing laboratory, located in Helsinki. The purpose of the study was to validate two new endogenous reference compounds (ERCs), 5α -androst-16-en-3 α -ol (16-EN) and pregnanetriol (PT) to an existing IRMS method. The validation was carried out by applying validating instructions, WADA's instructions and the quality goals defined in WADA's instructions. In the IRMS-method, the urine sample must undergo adequate sample pretreatment. The pretreatment procedure includes solid phase extraction, enzymatic hydrolysis, liquid extraction, and purification with liquid chromatography fraction collection. The measurement of isotopes requires the sample to be clean and the steroid compounds to be isolated, since the endogenous reference compounds and target compounds must be measured individually. Abuse of synthetic steroids is confirmed if testosterone or other target compounds in the sample exhibit significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ -values compared to the endogenous reference compounds.

With this study, the laboratory is closer to validating the new ERCs to the method. Due to scheduling reasons, a complete validation could not be performed. Based on the achieved results, pregnanetriol and 16-EN seem suitable for the IRMS method.

Keywords: anti-doping, steroids, isotope-ratio mass spectrometry, IRMS, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Hiilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotooppisuhde sekä δ^{13} -arvo	2
2.1	Isotooppinen fraktioituminen	3
2.2	Fotosynteesin vaikutus hiilen isotooppiseen fraktioitumiseen	3
2.3	Isotooppisen fraktioitumisen vaikutus yksilöihin	5
3	Steroidit	5
3.1	Testosteroni	6
3.2	Urheilijan steroidiprofiili	7
3.3	Synteettisen testosteronin tunnistus	8
4	GC-C-IRMS	9
4.1	Injektointi ja kaasukromatografinen erottelu	12
4.2	Polttoreaktori ja näytteen syöttö IRMS-laitteelle	13
4.3	Isotooppisuhdemassaspektrometri	15
4.3.1	Ionisaatio	15
4.3.2	Massa-analysaattori ja detektointi	16
4.3.3	IRMS-data	17
5	Näytteiden esikäsittely	17
5.1	Työssä käytetyt laitteet	18
5.2	Työssä käytetyt reagenssit ja standardit	19
5.3	Kiinteäfaasiuutto	21
5.4	Entsyymihydrolyysi	22
5.5	Nesteuutto	23
5.6	HPLC-fraktiointi	23
5.7	Isotooppisuhteiden mittaus IRMS-laitteella	25
6	Validointi	26
6.1	Selektiivisyys	27
6.2	Menetelmän mittausalue	27
6.2.1	Laitteen lineaarinen alue	27

6.2.2	Kvantitoinnin alarajan määrittäminen	29
6.3	Toistettavuus	30
6.4	Uusittavuus	30
6.5	Yhdisteiden säilyvyys	31
6.6	Häiriöalttius	31
6.7	Siirtymävirhe	31
6.8	Systemaattinen virhe, bias	32
6.9	Mittausepävarmuus	32
7	Validoinnin tulokset	32
7.1	Epitestosteronin tulokset	32
7.2	Selektiivisyys	35
7.3	Menetelmän mittausalue	35
7.3.1	Laitteen lineaarinen alue	35
7.3.2	Määrittämissrajat	36
7.4	Toistettavuus	36
7.5	Uusittavuus	37
7.6	Yhdisteiden säilyvyys	38
7.7	Häiriöalttius	39
7.8	Siirtymävirhe	41
7.9	Systemaattinen virhe, bias	42
7.10	Mittausepävarmuus	46
8	Yhteenveto	46
	Lähteet	47
	Liitteet	
	Liite 1: Kvantitoinnin alarajan määrittäminen	
	Liite 2: Säilyvyyskokeen tulokset	

Lyhenteet

11-OHA:	11 β -hydroxyandrosteroni
16-EN:	5 α -androst-16-en-3 α -ol
5aDiol:	5 α -androstan-3 α ,17 β -diol
5bDiol:	5 β -androstan-3 α ,17 β -diol
$\delta^{13}\text{C}$:	Delta-arvo. IRMS:llä mitatun yhdisteen ^{13}C - ja ^{12}C -isotooppien suhde verrattuna kansainväliseen standardiin (VPDB)
A:	Androsteroni
AAS:	Anabolis-androgeeninen steroidi
CRM:	<i>Certified Reference Material</i> . Varmistettu vertailumateriaali
EAAS:	Endogeeninen anabolis-androgeeninen steroidi
ERC:	<i>Endogenic Reference Compound</i> . Endogeeninen referenssiyhdiste
Etio:	Etiokolanoloni
GC-C-IRMS:	<i>Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometer</i> . Kaasukromatografi-polttoisotooppisuhdemassaspektrometri
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografi
LOQ:	<i>Limit of Quantification</i> . Määrittäysraja

PD: Pregnanedioli

PT: Pregnanetrioli

RSTD: Retentioaikastandardi

SPE: *Solid Phase* Extraction. Kiinteäfaasiuutto.

T: Testosteroni

TC: *Target Compound*. Kohdeyhdiste

THL: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

VPDB: *Vienna Pee Dee Belemnite*. Kansainvälinen ¹³C/¹²C-
isotooppistandardi

WADA: *World Anti-Doping Agency*. Maailman antidopingtoimisto

1 Johdanto

Suomessa on tehty dopinganalytiikkaa 1980-luvulta lähtien, kun Kansainvälinen olympiakomitea hyväksyi Suomeen ensimmäisen dopingtestauslaboratorion yleisurheilun MM-kisojen myötä [1]. Suomessa dopingtestausta vuonna 2023 tekee tämä sama laboratorio, joka on nykyisin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeuskemiyksikön dopingtestauslaboratorio. Näytteiden analysoinnin lisäksi laboratorio kehittää dopingtestaukseen uusia analyttisiä menetelmiä ja osallistuu dopinganalytiikkaan liittyvään tutkimustoimintaan [2].

Maailman antidopingtoimisto (WADA) johtaa ja säätelee kansainvälistä antidopingohjelmaa. Se vastaa mm. urheilussa kiellettyjen aineiden luetteloinnista, säännösten noudattamisen seurannasta sekä dopinglaboratorioiden akkreditoinnista [3]. WADA akkreditoi THL:n dopingtestauslaboratorion vuonna 2021, kun laboratorio oli onnistuneesti siirretty aiemman Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n toiminnan alta nykyiseen organisaatioon [1].

WADAn säännösten mukaan dopinglaboratorion on kyettävä havaitsemaan ja tunnistamaan dopingaineiksi luokiteltuja aineita, niiden metaboliitteja sekä dopingaineiden käyttöä ilmaisevia markkereita ihmisen biologisista eritteistä [4, s. 11]. Joissain tapauksissa laboratoriolta voidaan vaatia WADAn tai muun auktoriteetin taholta varmistusta epätyypillisiin steroidiprofiileihin, jolloin laboratorio suorittaa varmistuskokeen. Yksi mahdollisesti suoritettava varmistuskoe on synteettisten steroidien ja niiden metaboliittien tunnistaminen virtsanäytteestä kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrillä (GC-C-IRMS) [5, s. 1].

WADA päivittää joka vuoden alussa Kiellettyjen aineiden listan, joka sisältää luettelon kaikista kilpaurheilussa kielletyistä suoritustehoa parantavista aineista, kuten anabolis-androgeenisistä steroideista (AAS) ja kasvuhormoneista. WADA on erikseen määritellyt ne aineet, jotka on sallittu harjoituskaudella ja kielletty

kilpailukaudella, sekä ne aineet, joiden käyttöä ei sallita kummallakaan kaudella. Testosteroni on yksi AAS-yhdiste, jonka käyttö on WADAn mukaan täysin kielletty. [6, s. 3; 6.]

Testosteroni ja sen eri metaboliitit ovat luonnollisesti ihmisissä esiintyviä hormoneja. Dopingina käytetyn synteettisen testosteronin osoittaminen virtsanäytteestä vaatii menetelmän, jolla kyetään tunnistamaan kehon ulkopuolelta annosteltu steroidi. Useilla synteettisillä androgeenisillä steroideilla on niiden valmistuksessa käytettyjen raaka-aineiden vuoksi tyypillisesti erilainen hiilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -isotooppisuhte elimistön endogeeniseen tasoon verrattuna. [7, s. 24]. Isotooppisuhteiden mittaamiseen perustuvan IRMS-tekniikan sekä HPLC-fraktioinnin avulla virtsanäytteestä on mahdollista havaita luotettavasti, mikäli urheilija on väärinkäyttänyt testosteronia.

Tämän opinnäytetyön aiheena oli validoida THL:n dopinglaboratoriossa käytössä olevaan *Endogeeniset steroidit, IRMS varmistus, humaanivirtsa* -menetelmään kaksi uutta endogeenistä referenssiyhdistettä (ERC). Menetelmä on sitä luotettavampi, mitä useampaa ERC-yhdistettä voidaan hyödyntää mittauksissa [7, s. 24]. Validoinnissa käytettiin GC-C-IRMS-analyysitekniikkaa sekä validoinnin vaatimissa vaiheissa näytteenkäsittelyssä korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC), kiinteäfaasiuuttoa, hydrolyysia ja nesteuuttoa. Menetelmään validoitavat uudet kohdeyhdisteet olivat pregnanetrioli (PT) ja 5α -adrost-16-en- 3α -ol (16-EN). Työssä testattiin lisäksi myös epitestosteronin toimivuutta menetelmässä.

2 Hiilen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotooppisuhte sekä δ^{13} -arvo

Ilmakehän hiilidioksidi sisältää noin 98,9 % ^{12}C -isotooppia ja n. 1,1 % stabiilia ^{13}C -isotooppia. Hiilidioksidin ^{13}C -koostumus voidaan määrittää isotooppisuhdemassaspektrometrisesti mittaamalla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -isotooppisuhdetta R . Tulosten esittämisen yksinkertaistamiseksi R -arvot esitetään delta ^{13}C -arvoina eli $\delta^{13}\text{C}$ -arvoina. $\delta^{13}\text{C}$ -arvot lasketaan vertaamalla näytteestä mitattua

R -arvoa kansainväliseen Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) - isotooppistandardin R -arvoon kaavan 1 mukaisesti.

$$\delta^{13}C = \left[\frac{R_{näyte}}{R_{VPDB}} - 1 \right] \times 1000 \quad (1)$$

$\delta^{13}C$ -arvon yksikkö on promille (‰), ja se on sitä alhaisempi, mitä enemmän yhdisteessä on hiilen ^{12}C -isotooppia. Jos yhdisteessä on enemmän raskaampaa ^{13}C -isotooppia, $\delta^{13}C$ -arvo on puolestaan positiivisempi. [8.]

2.1 Isotooppinen fraktioituminen

Hiilen atomipaino jaksollisessa järjestelmässä on $12,011 \frac{g}{mol}$, koska noin yksi prosentti esiintyvistä hiilestä on painavampaa ^{13}C -isotooppia. Molemmat hiilen vakaista isotoopeista ovat suurimmaksi osaksi kemiallisesti keskenään yhteneviä sekä niiden muodostamat rakenteet pintapuolisesti samanlaisia. ^{13}C on kuitenkin 8 % painavampi kuin ^{12}C , ja tämän seurauksena isotoopit käyttäytyvät eri tavalla kemiallisissa reaktioissa. Isotooppista fraktioitumista tapahtuu, kun reaktion alussa on eri suhde isotooppeja kuin reaktion lopussa. Isotooppista fraktioitumista voi tapahtua termodynaamisesti, kineettisesti tai entsyymaattisen ^{13}C -syrjinnän seurauksena. [14.]

2.2 Fotosynteesin vaikutus hiilen isotooppiseen fraktioitumiseen

Yhteyttäminen eli fotosynteesi on biologinen prosessi, jonka avulla ilmakehän hiilidioksidi muutetaan hiilihydraatiksi usean eri metabolisen reitin kautta. Yhteyttävästä organismista riippuen fotosynteesin CO_2 -fiksaatiovaihe voi enemmän tai vähemmän syrjiä raskaampaa hiilen ^{13}C -isotooppia, mikä johtaa erilaisiin isotooppisiin fraktioitumisiin. [12.]

Suurin osa hiilidioksidin isotooppisesta fraktioitumisesta tapahtuu fotosynteesillä autotrofisten eliöiden toimesta. Fotosynteesin kautta tapahtuva isotooppinen fraktiointi vaihtelee kasvien välillä riippuen eriävistä hiilidioksidin fiksaation

kemiallisista reiteistä, joiden perusteella kasvit voidaan lajitella C₃-, C₄- ja CAM-kasveiksi. C₃-kasveihin kuuluu noin 90 % kaikista kasvilajeista, kuten esimerkiksi vehnä, riisi ja soijapavut. C₃-kasvien $\delta^{13}\text{C}$ -arvot sijoittuvat -30 ja -20 ‰:n välille. [9; 8, s. 334]. C₄-kasvit, kuten esimerkiksi sokeriruoko ja maissi, kasvavat alueilla, jotka kuumien ja kuivien olosuhteiden vuoksi ovat liian haastavia C₃-kasveille [10]. C₄-kasveilla $\delta^{13}\text{C}$ -arvo on keskimäärin -13 ‰ ja CAM-kasveilla, kuten ananaksella, $\delta^{13}\text{C}$ -arvot vaihtelevat C₃- ja C₄-kasvien arvojen välillä. [9, s. 209.]

C₃-kasvit käyttävät hiilen fiksaatioon C₃-reittiä eli Calvinin kiertoa. C₃-kasveissa tapahtuva isotooppinen fraktiointi on seurausta hiilidioksidikaasun diffuusiosta ilmakehästä kloroplastiin sekä Rubisco-entsyymin katalysoiman karboksylaation yhteisvaikutuksesta. Kaasujen vaihdossa ilmarako syrjii raskaampaa ¹³CO₂-isotooppia 4,4 ‰. Rubisco-entsyymi puolestaan syrjii yhä suurempaa osaa ¹³C-isotooppia karboksyloinnin aikana jopa 29–30 ‰. Näiden isotooppisten vaikutusten seurauksena karboksylaatioreaktion lopputuotteesta 3-fosfoglyseraatista vain pieni määrä sisältää ¹³C-isotooppia, jolloin kaiken kaikkiaan C₃-kasvien $\delta^{13}\text{C}$ -arvo on matala. [12.]

C₄-yhteyttämisessä isotooppinen syrjiminen on vähäisempää kuin C₃-yhteyttämisessä. C₄-yhteyttämisessä isotooppiseen syrjintään vaikuttaa alentavasti C₃-kasveista poikkeava PEP-karboksylaasientsyymi, jota C₄-kasvit käyttävät pääasiallisena hiilidioksidin fiksaatioentsyyminä Rubiscon sijaan [13]. Mesofyllissä tapahtuvassa PEP-karboksylaasin fiksaatioissa ¹³C-isotoopin syrjintä on vain n. 5,7 ‰. [12.]

CAM-kasvit käyttävät yhteyttämisreittiä, jossa tapahtuu vaihtelua päivän ja yön välillä. Päiväsaikaan fiksaatioon osallistuu Rubisco-entsyymi, jolloin CAM-kasvin $\delta^{13}\text{C}$ -arvo lähenee -28 ‰:a. Yöllä fiksaatio on lähes samanlaista kuin C₄-kasveilla PEP-karboksylaasientsyymien käytön vuoksi, jolloin kasvin $\delta^{13}\text{C}$ -arvo voi nousta -11 ‰:een. [40.]

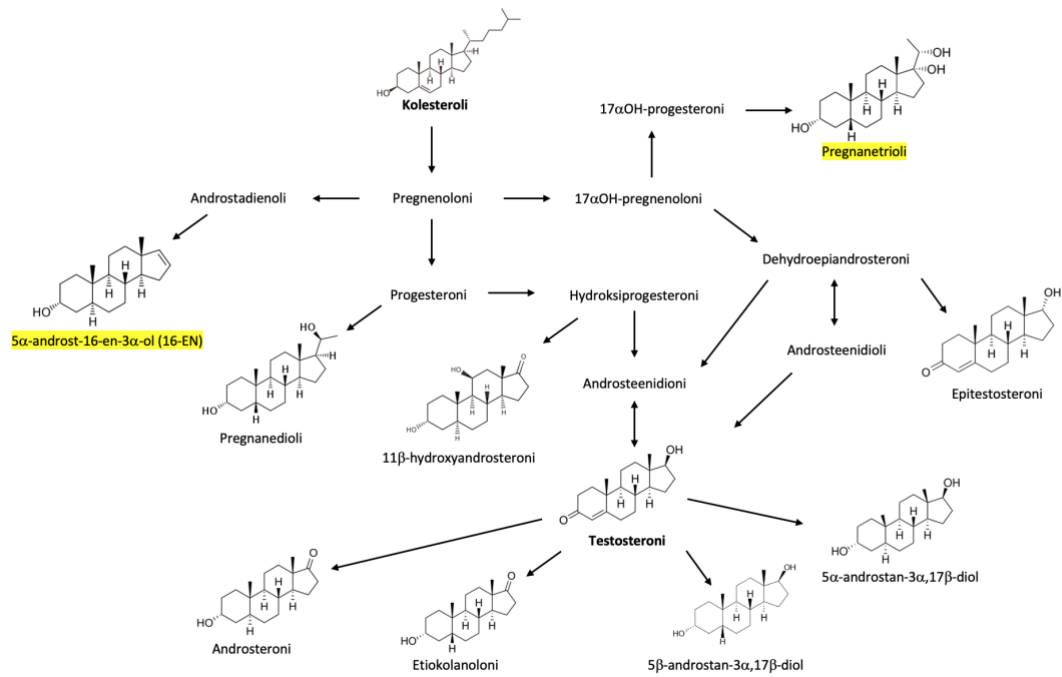
2.3 Isotooppisen fraktioitumisen vaikutus yksilöihin

Kasvien erilaisilla $\delta^{13}\text{C}$ -arvoilla on lopulta vaikutus siihen, minkälainen isotooppinen sormenjälki yksilöillä on. Ihmisen ruokavalio määräytyy pitkälti alueellisesti, jolloin myös ravinnossa käytettyjen C_3 - ja C_4 -kasvien määrä vaihtelee. Euroopassa yksilöiden ruokavalio sisältää runsaasti C_3 -kasveja, kuten esimerkiksi vehnää ja perunoita, ja yksilön endogeeninen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo on keskimäärin noin -23 ‰ . Yhdysvalloissa käytetään monissa ruuissa makeutusaineena ja säilöntäaineena maissista (C_4 -kasvi) valmistettua maissisirappia. Maissisirappia lisätään Yhdysvalloissa mm. virvoitusjuomiin, leipiin, muroihin, lihatuotteisiin ja säilykehedelmiin. Yhdysvalloissa väestön keskimääräinen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo on noin -21 ‰ . [14; 21.]

3 Steroidit

Steroidit ovat hiilirenkaista koostuvia lipideiksi luokiteltuja syklisiä yhdisteitä. Steroideilla on tärkeä rooli yksilön kasvussa, energiametabolismissa, homeostaasissa ja sukupuolikehityksessä. Steroidihormonit voidaan jakaa toimintansa perusteella neljään luokkaan: androgeeneihin, estrogeeneihin, progestogeenihin ja glukortikoideihin. Androgeeneistä eli mieshormoneista tunnetuin on testosteroni, joka on dopingkäytössä yleinen aine. Hormonitoiminnan lisäksi steroidit kuten kolesteroli ovat tärkeä osa solukalvon rakennetta. [15; 41.]

Jokaisen luontaisen steroidin lähtöaine on kolesteroli. Kolesterolin syntetisointi steroidiksi alkaa mitokondrion sisäkalvolla, jossa sijaitsee steroidogeneesiä katalysoivaa P450SCC-entsyymiä [16]. Steroidogeneesin seurauksena kolesteroli muuttuu pregnenoloniksi, joka kulkeuduttuaan solun endoplasmakalvostoon syntetisoi lopullisiksi steroidituotteiksi. Steroidien tuotantoa säätelee lisämunuaisen kuorikerroksen ACTH-hormoni sekä kivesten Leydigin solujen ja munasarjojen solujen LH-hormoni [17.] Dopinganalytiikalle olennaisten steroidien yksinkertaistetut metaboliareitit on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Dopinganalytiikassa tyypillisesti analysoitujen steroidien metaboliareitit lyhyesti [18; 19; 20]. Kuvassa on korostettu tässä opinnäytetyössä validoitavat endogeeniset referenssiyhdisteet.

3.1 Testosteroni

Testosteroni eli 17 β -hydroksiandrost-4-eeni-3-oni on tunnetuin ja biologisesti tärkein anabolis-androgeeninen steroidi. Testosteronia muodostuu pääasiallisesti miehillä kiveksissä, mutta myös naisilla vähäisempiä määriä lisämunuaisessa ja munasarjoissa [20]. Terveen naisen veriplasmassa esiintyy testosteronia noin kymmenen kertaa alhaisemmalla konsentraatiolla aikuisen mieheen verrattuna. Tietyissä kudoksissa, kuten aivoissa tai rasvakudoksessa, testosteroni voi katalysoitua aromataasi-entsyymien avulla naishormoni estradioliksi. [23.]

Testosteronilla on tärkeä rooli yksilön kehityksessä. Alkiovaiheessa testosteronin androgeeniset toiminnot ovat keskeisessä osassa alkion kehittyessä kohti miehen fenotyyppiä. Murrosiässä ja aikuisuudessa testosteroni on osallisena usean fysiologisen prosessin säätelyssä, kuten

luukudoksen ja lihasten proteiinien metaboloinnissa, seksuaalisessa ja kognitiivisessa toiminnassa ja punasolujen muodostuksessa [24].

Testosteronin käyttö suorituskykyä parantavana aineena on WADAn määräysten mukaan kilpaurheilijoilta täysin kiellettyä urheilukausien aikana sekä niiden ulkopuolella [6]. Kliinisissä hoidoissa testosteronin käyttö on tärkeä hoitomuoto erilaisiin hypogonadismi- eli testosteronin puutostiloihin, jolloin yksilö voi joutua käyttämään steroidia pysyvästi [25]. Toisaalta nykyään testosteronin ja muiden anabolis-androgeenisten steroidien käyttö lihasmassan ja kestävyuden tehostamisen parantamiseksi näkyy suuresti amatööriurheilijoiden, erityisesti nuorten miesten keskuudessa. AAS:n väärinkäyttö nuorella iällä voi johtaa vieroitusvaiheessa samankaltaisiin oireisiin, joita tavataan lähinnä iäkkäillä potilailla, jotka kärsivät ikääntymisestä johtuvasta testosteronitason laskemisesta. Tällaisia oireita ovat esimerkiksi lisääntynyt rasvan kertyminen, lihasmassan häviäminen, tunnetilojen heittäminen, kova uupumus ja masennus. Monelle käyttäjälle ainoa keino näiden vaikutusten kumoamiselle voi olla steroidien käytön uudelleen aloittaminen, joka voi johtaa addiktion kaltaiseen kierteeseen. [26.]

3.2 Urheilijan steroidiprofiili

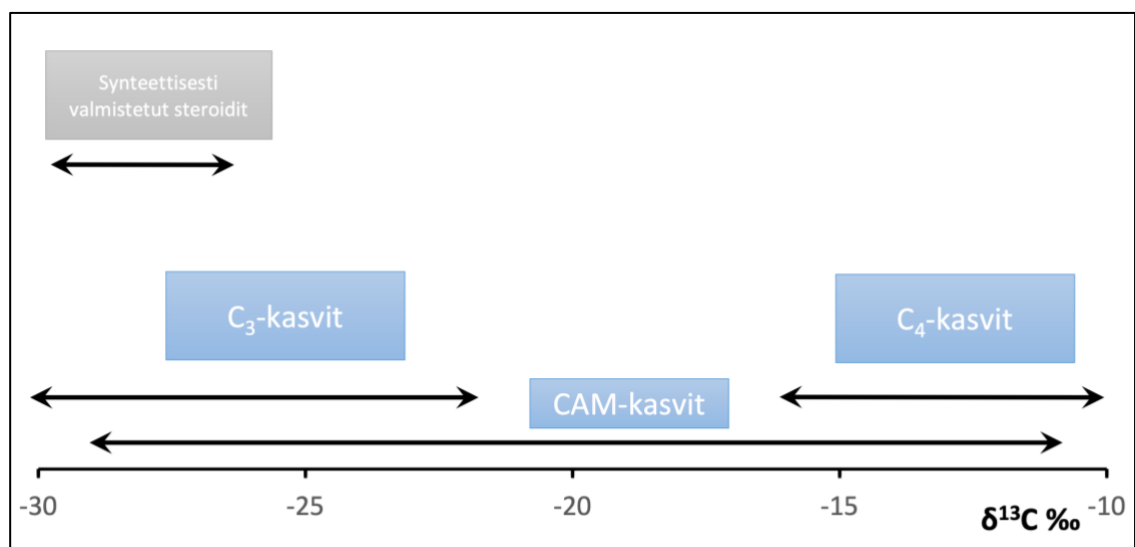
WADAn määräysten mukaan urheilijalta on kerättävä ja mitattava tietyltä aikaväliltä virtsanäytteistä steroidipitoisuuksia. Mittauksissa selvitetään yksittäisten endogeenisten anabolis-androgeenisten steroidien (EAAS) konsentraatioita sekä steroidien keskinäisiä suhteita. Näillä mittauksilla voidaan luoda jokaiselle urheilijalle yksilöllinen steroidiprofiili tai nk. biologinen passi. [27.]

Steroidiprofiilin hyöty dopinganalytiikassa on se, että sen avulla voidaan havaita normaalista poikkeavia muutoksia steroidiprofiilin seulonnan yhteydessä. Yksi tärkeä indikaattori steroidien mahdollisesta väärinkäytöstä on testosteroniglukuronin ja epitestosteroniglukuronin suhde T/E, jota voidaan mitata GC-MS-tekniikalla. Koska epitestosteronia muodostuu luonnollisen

testosteronin metabolian sivutuotteena, kohonnut T/E-suhde voi olla seurausta synteettisten steroidien käytöstä. Mikäli T/E-mittauksessa havaitaan kromatografisten piikkien pinta-alojen tai korkeuksien eron olevan yli 4, näyte määrätään CG-C-IRMS varmistusanalyysiin. Jos urheilijalla on oma yksilöllinen biologinen passi, eli useamman näytteen perusteella laskettu ns. normaalien steroidiparametrien rajat, T/E-rajana on silloin yksilöllinen. Varmistusanalyysissä selvitetään, johtuuko korkea testosteronitaso steroidien käytöstä. [11; 27.]

3.3 Synteettisen testosteronin tunnistus

Synteettisen testosteronin kuten myös muiden steroidien valmistuksessa käytetään soijapapuöljystä eristettyä fytosterolia, joka on rakenteeltaan ja fysiologialtaan samankaltainen kuin kolesteroli. Fytosterolista tuotetaan steroideja hyödyntämällä erityisesti *Mycobacterium*- ja *Rhodococcus*-suvun bakteerien mikrobiologista sterolikatabolismia [28]. Soija on C₃-kasvi, ja sen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo on -30 ja -26 promillen välillä [29], joten myös siitä valmistettu steroidi on $\delta^{13}\text{C}$ -arvoltaan alhainen. Kuvassa 2 on esitetty kaavio, josta näkyy eri kasvien ja synteettisesti valmistettujen steroidien sijoittumista $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen mukaan.



Kuva 2. Eri fraktioitettujen kasvien ja synteettisten steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -jakautuminen.

Synteettisen steroidin käytön vaikutukset ovat huomattavissa, koska yksilön ruokavalio ja sitä kautta endogeeninen $\delta^{13}\text{C}$ -arvo koostuu yhtä lailla C_3 -, CAM- ja C_4 -kasveista. Epäilyttävät $\delta^{13}\text{C}$ -muutokset huomataan, kun verrataan steroidien metaboliareitissä ennen testosteronia metaboloituneiden eli endogeenisten referenssiyhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja kohdeyhdisteiden eli testosteronin ja siitä edelleen metaboloituneiden steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvoihin. $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen mittauksessa käytetään IRMS-tekniikkaa.

4 GC-C-IRMS

IRMS-tekniikan historia ulottuu vuoteen 1947, jolloin Alfred O. Nier julkaisi tutkimuksen hiilen, typen ja hapen isotooppeja mittaavasta massaspektrometristä [30]. Nykyisin IRMS-tekniikkaa käytetään monella eri tutkimusalalla, kuten arkeologiassa, rikosanalytiikassa, lääkekehityksessä ja biologisissa tutkimuksissa. IRMS-tekniikan avulla voidaan mm. rikosanalytiikassa selvittää epäillyn vaatteista kerätyn mullan alkuperä hiilen ja typen isotooppeja mittaamalla, tai vastaavasti selvittää huumelastien alkuperä mittaamalla uusien takavarikoitujen huumeiden typpi-isotooppeja ja vertaamalla niitä aiemmin takavarikoituihin lasteihin, jolloin voidaan määrittää, onko kyseinen huume tunnetusta tai uudesta alkuperästä. IRMS-analytiikasta on hyötyä myös ruokapetostutkimuksissa, sillä sen avulla voidaan määrittää, onko korkeahintaisempi luonnonmukaisesti kasvatettuna markkinoitu lihatuote oikeasti sitä mitä pakkauksessa väitetään, vai todellisuudessa sisätiloissa rehulla kasvatettua. [31.]

Isotooppisuhdemassaspektriin yhdistetyllä kaasukromatografilla (kuva 3) tehdään rutiininomaisesti analyysejä dopingtestauslaboratoriossa. IRMS-analyysejä tehdään kuitenkin suhteessa vähemmän muihin laboratorioissa tehtäviin analyysihin verrattuna, koska se tehdään vain testausorganisaation pyynnöstä, mikäli virtsanäytteen steroidiprofiili on poikkeava. IRMS on kuitenkin WADAn määräysten mukaan pakollinen osa dopinglaboratorion analyysikykyä [4, s. 106]. GC-C-IRMS mahdollistaa virtsanäytteestä löytyvien synteettisten ja

endogeenisten steroidien $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -isotooppisuhteiden määrittämisen ja niiden avulla $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen laskemisen.



Kuva 3. THL:n dopingtestauslaboratoriossa käytössä oleva GC-C-IRMS-laitteisto.

GC-C-IRMS kuvaillaan WADAn teknisessä dokumentissa ns. varmistusmenetelmäksi. GC-C-IRMS-analyysi suoritetaan sellaisille näytteille, jotka aiheuttavat EAAS-seulonnassa epätyypillisen steroidiprofiilin. Epätyypillisiä piirteitä steroidiprofiilissa voi olla esim. testosteroni-epitestosteronisuhde, joka on yli 4, androsteroni-testosteronisuhde, joka on alle 20 tai yli 250 ng/ml pitoisuus 5α Diol-steroidia miehillä tai 150 ng/ml naisilla, 5α Diolin suhteen epitestosteroniin ollessa yli 10. [5, 32]. WADA tai muu testausjärjestö saattaa pyytää GC-C-IRMS-analyysiä näytteelle myös ilman epätyypillistä havaintoa steroidiprofiilissa.

GC-C-IRMS-analyysissä määritetään $\delta^{13}\text{C}$ -arvo virtsassa esiintyvillä kohdeyhdisteille (TC) ja ERC-yhdisteille. Taulukossa 1 on esitetty tyypillisimmät analyysissä mitatut steroidit.

Taulukko 1. GC-C-IRMS-analysissä mitatut steroidit.

Kohdeyhdisteet (TC)	Endogeeniset referenssiyhdisteet (ERC)
Androsteroni	Pregnanedioli
Etiokolanoloni	Pregnanetrioli
5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol)	5 α -androst-16-en-3 α -ol (16-EN)
5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol)	11 β -hydroxy-androsteroni (11-OHA)
Testosteroni	
Epitestosteroni (ei pakollinen)	

TC- ja ERC-yhdisteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoista lasketaan erotus, jonka perusteella päätellään, onko urheilija käyttänyt steroideja. WADAn määräysten mukaan laboratorion on validoitava vähintään kaksi ERC-yhdistettä mittauksia varten sekä kyettävä mittaamaan kaikkia taulukossa 1 esitettyjä kohdeyhdisteitä epitestosteronia lukuun ottamatta. Positiivisen tuloksen kriteerit on esitetty WADAn teknisessä dokumentissa *TD2022IRMS* [5, s. 8].

GC-C-IRMS-laitteisto koostuu kolmesta pääkomponentista: ensin näyte kulkee injektorin kautta kaasukromatografiin, jossa yhdisteet erottuvat kromatografisesti. Sitten yhdisteet kuljetetaan polttoreaktoriin, jossa yhdisteet poltetaan hiilidioksidiksi ja vedeksi. Muodostuneet $^{12}\text{CO}_2^+$ - ja $^{13}\text{CO}_2^+$ -ionit erotellaan lopuksi isotooppisuhdemassaspektrometrissä ja niiden intensiteetit mitataan. IRMS-ohjelmisto määrittää näytteestä ja isotooppistandardina toimivasta referenssikaasusta mitattujen signaalien avulla yhdisteen $\delta^{13}\text{C}$ -arvon. Jos yhdisteelle haluttiin mitata sen tarkka atomimassa identifioimista varten, näytettä voidaan halutessa ohjata laitteistoon kytketyille kvadrupolimassaspektrometrille. THL:n dopingtestauslaboratorion IRMS-

laitteisto koostuu kokonaisuudessaan kuudesta moduulista, jotka on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Työssä käytetyn IRMS-laitteiston komponentit.

Moduuli	Kuvaus
Triplus RSH Autosampler	Automaattinen näytteensyöttäjä
Trace 1310 Gas Chromatograph	Kaasukromatografi
GC IsoLink II	Polttoreaktori
Conflo IV	Liitântäkomponentti polttoreaktorista IRMS:lle
Delta V Plus Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS)	Isotooppisuhdemassaspektrometri
ISQ QD Single Quadrupole Mass Spectrometer	Massaspektrometri

4.1 Injektointi ja kaasukromatografinen erottelu

Näyte kulkeutuu kaasukromatografiin injektorin avulla. Kaasukromatografisia injektointitekniikoita ovat mm. jakoinjektio (split injection) ja suorainjektio (splitless injection). Molemmissa tekniikoissa näyte injektoidaan ruiskulla septumin läpi lasiseen injektorin sisäputkeen eli lineriin. Injektorin sisälämpötila on korkea, jotta näytteen yhdisteet höyrystyvät nopeasti kaasufaasiin. Jakoinjektiossa injektorin sisällä olevan aukinaisen jakoventtiilin läpi virtaa kantajakaasua kolonnin pään ohi vieden näytettä mukanaan. Kolonniin virtaavan näytteen määrä on pieni, joten jakoinjektio on sopiva menetelmä suuripitoisille näytteille. THL:n dopinglaboratorion IRMS-menetelmässä käytetään suorainjektiota, koska näytteiden steroidipitoisuudet ovat alhaisia.

Suorainjektiossa jakoventtiili on kiinni koko injektion ajan, jolloin lähes koko näytemäärä saadaan kolonniin. [33, s. 186–189.]

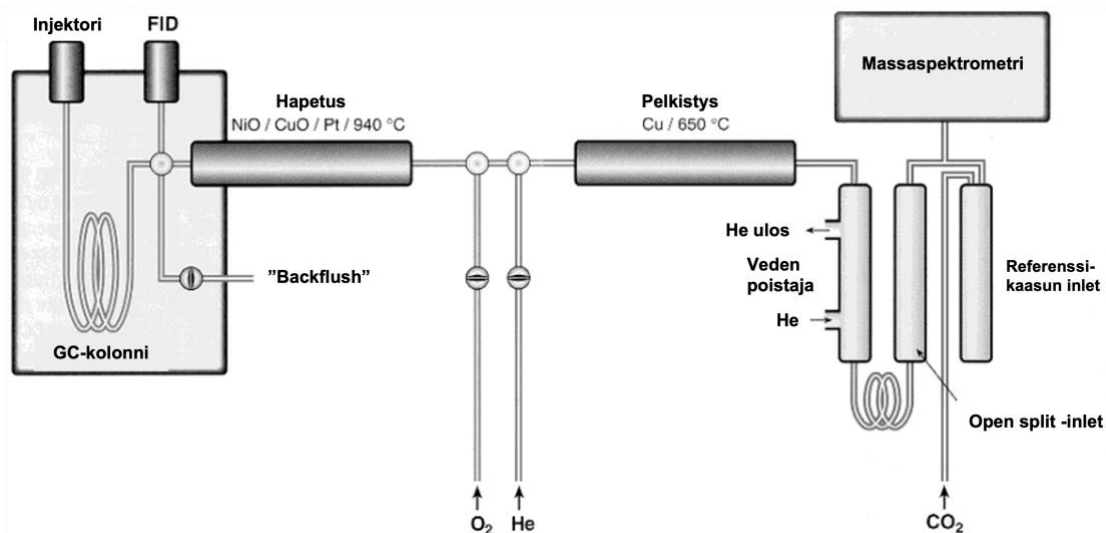
Kantokaasuna käytetty helium kuljettaa höyrystyneen näytteen kaasukromatografian kapillaarikolonneihin yhdisteiden erottelua varten. Kolonnin uunille asetetaan gradientti, eli uunin lämpötila kasvaa ajon aikana lämpötilaohjelman mukaisesti. Ajon loppuvaiheessa lämpötila nostetaan lähelle kolonnin maksimilämpötilaa, jotta kolonni saadaan puhdistettua vaikeimmin haihtuvista yhdisteistä. Tehokkaalla ilmankierrolla uuni saadaan jäähdytettyä alkulämpötilaan seuraavaa ajoa varten. Kaasukromatografisissa menetelmissä kolonnit ovat yleensä 20–30 m pitkiä ja ne on valmistettu silikasta. Kolonnin sisäpinnalla on stationäärifaasi, joka on useimmiten valmistettu polysiloksaaniin. IRMS-menetelmässä kolonnina käytettiin Agilentin HP-5ms kolonnia, jonka stationäärifaasi on 5 % fenyyli- ja 95 % metyyli-polysiloksaania. [33, s. 190–191.]

Kaasukromatografiatekniikalla voidaan erotella hajoamatta höyrystyviä yhdisteitä. Yhdisteet kulkevat kolonnissa sitä nopeammin, mitä helpommin ne höyrystyvät, joten yhdisteet eluoituvat usein kiehumisjärjestyksessä. IRMS-menetelmässä yhdisteiden erottelu kaasukromatografisesti on tärkeää, sillä sisäisenä standardina käytetyn 5α -androstan- 3β -olin sekä näytteessä mahdollisesti esiintyvien epäpuhtauksien täytyy erottua mitattavasta yhdisteestä. [33, s. 183.]

4.2 Polttoreaktori ja näytteen syöttö IRMS-laitteelle

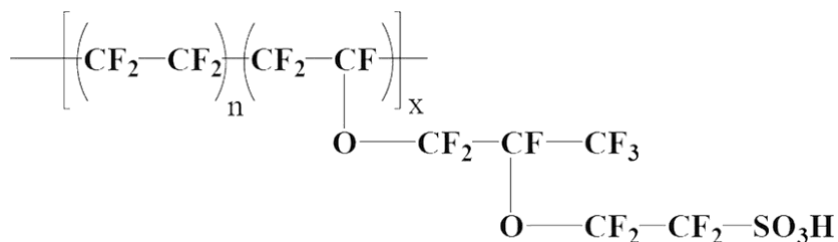
Kolonnissa erottunut näyte kulkeutuu kapillaaria pitkin GC-IsoLink II -moduuliin, joka sisältää polttoreaktorin. Polttoreaktorissa näyte kulkee hapetusreaktorin, pelkistysreaktorin ja vedenpoistajan lävitse (kuva 4). Hapetusreaktori koostuu alumiinioksidiputkesta, joka sisältää kolmea lankaa: nikkelioksidia, kuparioksidia ja platinaa. IRMS-menetelmässä hapetusreaktori kuumennetaan $940\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen, jolloin näytteessä olevat yhdisteet palavat täydellisesti hiilidioksidiksi ja vedeksi. Ennen jokaista IRMS-ajoa hapetusreaktoria oksidoidaan 2 tuntia reaktorissa mahdollisesti olevien ylimääräisten typpioksidien poistamiseksi.

Hapetusreaktorin jälkeen näyte ohjataan kupariseen pelkistysreaktoriin, jossa poistetaan poltossa syntyneet ylimääräiset NO_x-sivutuotteet. Epätäydellinen pelkistyminen voidaan havaita kohonneesta m/z 30 -signaalista. [34.]



Kuva 4. Kaaviokuva IRMS-poltoreaktorista [35, muokattu].

Näytekaasu kulkee pelkistysreaktorista vedenpoistajaan, jossa vesimolekyylit kuivataan pois viemällä kaasu vettäläpäisevän Nafion-kalvon läpi. Nafion (kuva 5.) on polymeeri, jolla on tetrafluorietyyleeni-tukiranka ja perfluorinoidut eetterisivuketjut, joiden päissä on hydrofiilisiä sulfonihapporyhmiä. Heliumvirtaus työntää näytekaasun nestemolekyylit Nafion-kalvon läpi ja ulos vedenpoistajasta, samalla regeneroiden sulfonihapporyhmiä uudelleen käytettäväksi. [36]. Kuivatut hiilidioksidimolekyylit kulkevat kapillaaria pitkin Conflo IV -liitännäkomponenttiin, joka sisältää näytekaasun ja referenssikaasun "open split" -inletit.



Kuva 5. Nafionin kemiallinen rakennekaava.

Jotta isotooppisuhteiden mittaus näytekaasusta onnistuu, on mittauksen yhteydessä mitattava referenssikaasuna käytettävää hiilidioksidia, jonka isotooppisuhteet tunnetaan. IRMS-mittauksessa käytettävä referenssikaasu on kalibroitu kaupallisia steroidireferenssejä vastaan, joiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot ovat jäljitettävissä VPDB:hen [7]. Näytekaasun ja referenssikaasun signaalien intensiteettien tulisi olla mahdollisimman lähellä toisiaan, jotta tulokset ovat kaikkein luotettavimpia. IRMS-menetelmässä käytetään Conflo IV -komponenttia, joka toimii sekä liitoksena kaasuvirtauksen ja IRMS-laitteiston välillä, kuin myös näyte- ja referenssikaasun automaattisena laimentajana. Sekä näytekaasu että referenssikaasu päätyvät toisesta päästä avoimiin lasiputkiin juuri ennen siirtymistä ionisaattoriin. Näihin lasiputkiin johdetaan heliumia, joka laimentaa kaasuja sopivaksi mittauksiin. [37.]

4.3 Isotooppisuhdemassaspektrometri

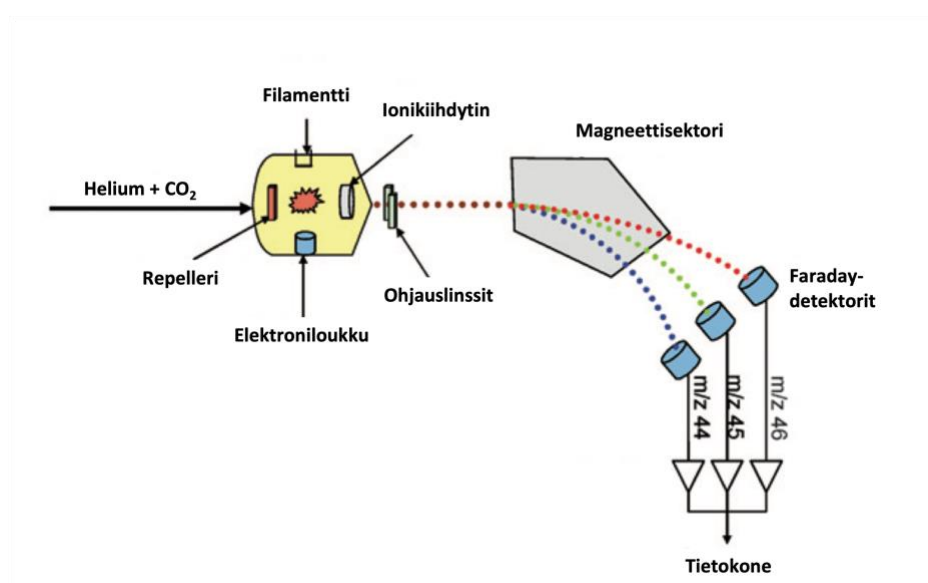
4.3.1 Ionisaatio

IRMS-menetelmässä näytekaasu ionisoidaan elektronipommituksella. Elektronipommitus-ionisaatiossa näytekaasu johdetaan ionisointikammioon, jossa sitä pommitetaan kuumennetusta filamentista irronneilla elektroneilla. Elektroneja kiihdytetään sähkökentässä, jolloin ne saavat kineettistä energiaa. Elektronin osuessa näytemolekyylin, molekyyli menettää elektronin ja muodostaa positiivisesti varautuneen molekyyli-ionin M^+ . M^+ -ioniin jää paljon ylimääräistä energiaa, minkä takia molekyyli-ionin sidokset voivat katketa, jolloin muodostuu positiivisesti varautunut ioni ja neutraali ioni. Neutraali ioni on altis

hajoamaan elektronipommituksesta yhä pienemmiksi molekyyleiksi. Näytteensyötön ja elektronisuihkun välissä on elektrodi, jolla on positiivinen varaus. Elektrodi työntää syntyneitä positiivisia ioneja ulos ionisointikammiosta kohti massa-analysointia. [33, s. 124.]

4.3.2 Massa-analysointilaite ja detektointi

Ionit keskitetään ohjauslinssien avulla massa-analysointilaiteeseen, joka IRMS:ssä koostuu magneettisektorista ja faraday-kuppi-detektoreista (kuva 6). Magneettisektori erottaa ionit massa-varaussuhteen (m/z) mukaan magneettikentän avulla. Ionin lentäessä magneettikenttään se kokee kentän suuntaisen voiman ja ionin lentorata muuttuu. Kevyet ionit kaartuvat enemmän kuin painavimmat, minkä seurauksena ionit voidaan kerätä omiin detektoreihinsa. [33, s. 126–127.]

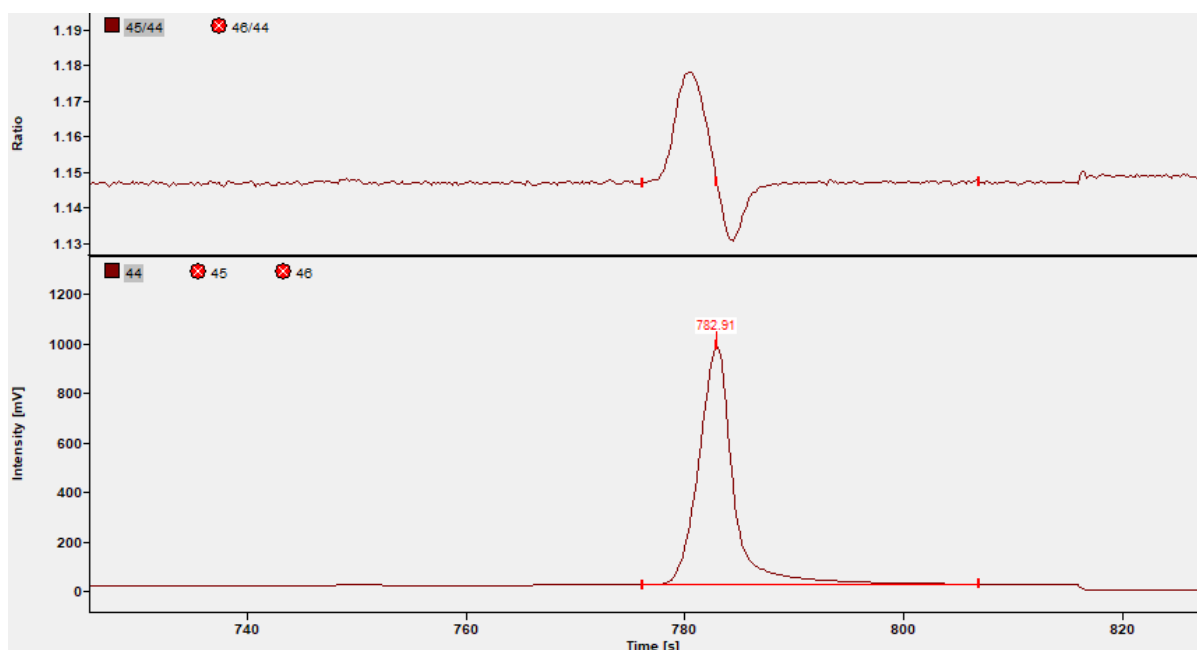


Kuva 6. IRMS:n massa-analysointilaiteen toiminta [31, muokattu].

Faraday-kupit keräävät CO₂-ioneja m/z -arvoilla 44, 45 ja 46. Faraday-kuppi on vakuumiin sijoitettu metallinen kuppi, joka sieppaa siihen osuvan varautuneen ionin. Hiukkasen varaus siirtyy metalliin ja ioni neutraloituu. Virtapiiriin kytketty kuppi välittää signaalin tietokoneelle. [38.]

4.3.3 IRMS-data

IRMS:n tietokoneohjelmisto piirtää kromatogrammit m/z 44 $^{12}\text{CO}_2^+$ -ionille (kuva 7, alempi kuvaaja), sekä samanaikaisesti hiilidioksidin ionien 45/44-suhteelle (kuva 7, ylempi kuvaaja). 45/44-kuvaajasta nähdään, että painavampi ^{13}C -isotooppi eluoituu nopeammin kuin ^{12}C -isotooppi. 45/44-kuvaajasta näkyvää isotooppista heiluntaa käytetään validointiparametrina, kun määritetään piikin puhtautta ja tutkitaan mahdollista koeluutiota. [39.]

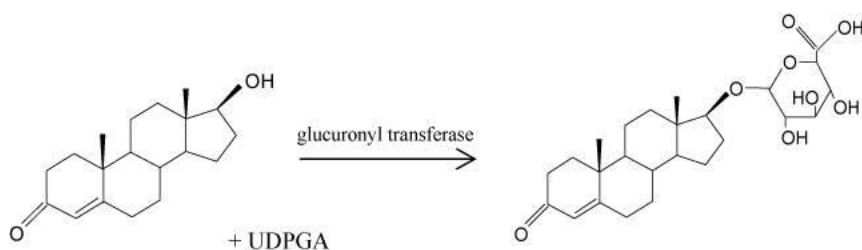


Kuva 7. IRMS-ohjelmiston piirtämät kromatogrammit. Ylempi kromatogrammi kuvaa näytteen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -suhdetta ja alempi 44 m/z ionin signaalia.

5 Näytteiden esikäsittely

Jotta virtsanäyte voidaan mitata IRMS-laitteistolla, sen on käytävä läpi kattava esikäsittely. Validointia varten analyysisarjojen näytteet esikäsiteltiin THL:n dopingtestauslaboratorion menetelmäohjetta *Endogeeniset steroidit, IRMS-varmistus, humaanivirtsa (DO-93)* noudattaen. Laboratorion käyttämä menetelmäohje pohjautuu italialaisen dopingtestauslaboratorion vuonna 2012 julkaisemaan artikkeliin [7].

Kaasukromatografista erottelua varten tutkittavien analyyttien on oltava höyrystyviä ja termisesti vakaita. Steroidin metabolisoitumisen toisessa vaiheessa yhdiste pyrkii hydrofiiliseksi konjugoitumalla glukuronihapon tai sulfaattiosan kanssa (kuva 8). Konjugoitunut steroidi erittyy virtsaan vapaata steroidia paremmin, ja noin 97 % virtsan androgeenisistä steroideista onkin konjugoituneita. Konjugoituneet steroidit eivät kuitenkaan täytä kaasugromatografisen erottelun kriteereitä, vaan glukuronidi tai sulfaattiosa on pilkottava pois esikäsitteilyn aikana. [11.]



Kuva 8. Testosteronin konjugoituminen virtsan glukuronihapon (UDPGA) kanssa [11].

Validoinnissa analysoidut näytteet esipuhdistettiin kiinteäfaasiuutolla, hydrolysoitiin entsyymaattisesti ja uutettiin emäksisessä pH:ssa tert-butyylimetyylieetteriin. Uuton jälkeen näyte fraktioitiin nestekromatografilla. Fraktioituidut näytteet haihdutettiin kuiviin, minkä jälkeen ne liuotettiin sisäiseen standardiin ja analysoitiin IRMS-laitteella.

5.1 Työssä käytetyt laitteet

Taulukossa 3 on esitetty työssä käytetyt laitteet.

Taulukko 3. Validointityössä käytetyt laitteet.

Laite	Valmistaja/täsmennys
Kiinteäfaasiuuttolaitteisto	Phenomenex
Kiinteäfaasikolonne	SEP-PAK Plus C18, nro. WAT020515, Waters, USA
Multivortex	Lab-tek Corporation Ltd
Sentrifugi	Sorvall RC 3BP
Vakuumeiksikaattori	
Haihdutuslaitteisto	Biotage TurboVap
Vesihaude	50 °C
Nestekromatografi	Agilent 1100 jossa fraktionkerääjä
Isotooppisuhdemassaspektrometri	ThermoFisher Scientific

5.2 Työssä käytetyt reagenssit ja standardit

Taulukossa 4 on esitetty työssä käytetyt reagenssit.

Taulukko 4. Validointityössä käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Täsmennys
β -glukuronidaasi	<i>Escherichia coli</i> K12
Dietyylieetteri	pro analyysi-laatu
Tert-butyylimetyylieetteri	HPLC-laatu
Metanoli	HPLC-laatu
Asetonitrili	Merk LiChrosolv gradient grade HPLC -laatu
Isopropanoli (2-propanoli)	HPLC-laatu
Sykloheksaani	HPLC-laatu
Kalium/natriumfosfaattipuskuri	0,1 M, pH 7, LIRG-186
$K_2CO_3/KHCO_3$	0,2 %

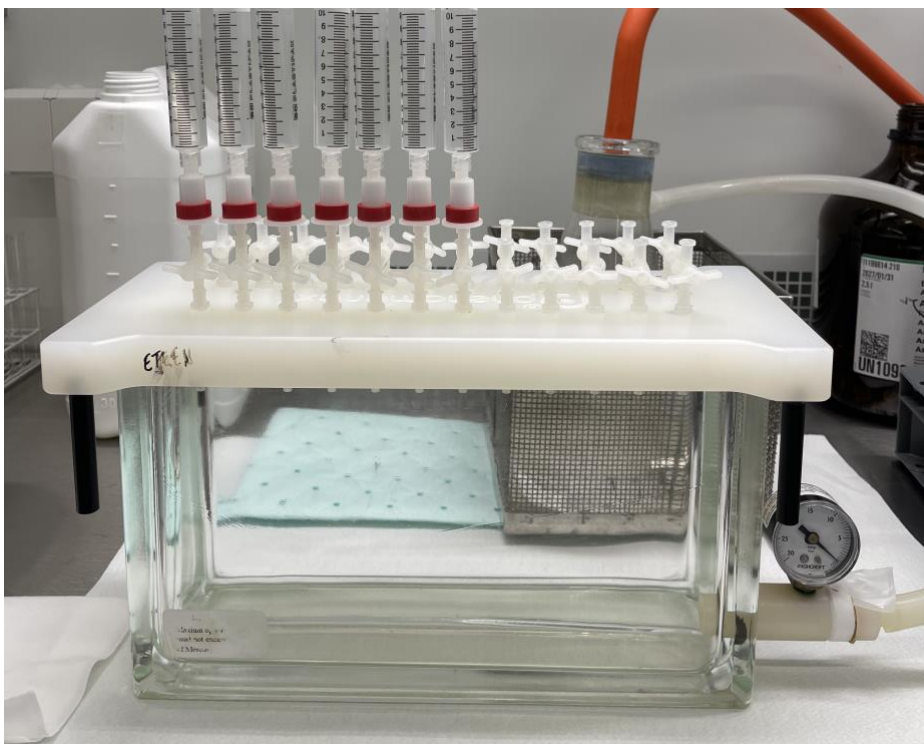
Taulukossa 5 on esitetty työtä varten valmistetut referenssistandardit ja sisäiset standardit.

Taulukko 5. Työtä varten valmistetut standardit.

Standardi	Valmistus	Kuvaus
LC1 ISTD - käyttöliuos	1:1:2 IRMS LC1 ISTD- kantaliuos:metanoli:MilliQ-vesi	Retentioaikareferenssi LC1-ajossa
LC1 MIX	1:1 IRMS LC1 MIX:MilliQ-vesi	Käytetään LC1-ajon fraktioiden keräysikkunoiden määrittämiseen
IRMS RSTD - käyttöliuos	160 µl RSTD-kantaliuosta (1 mg/ml) 15,84 ml sykloheksaania 4 ml isopropanolia	5 α -androstan-3 β -ol 8 µg/ml Retentioaikareferenssi IRMS-ajossa
IRMS MIX 1,2,3	1:6 MIX 1,2 tai 3 kantaliuos:sykloheksaani- isopropanoli (seossuhde 4:1)	IRMS-laitteen kromatografisen toimintakunnon testaaminen
USADA 34-2	1:4 USADA 34-2 - kantaliuos:RSTD-käyttöliuos (1 mg/ml)	(CRM) Kaupallinen referenssistandardi, jonka delta-arvot tunnetaan
MX018-1, 2	1:30 MX018-1,2-kantaliuos:RSTD- käyttöliuos (1 mg/ml)	(CRM) Kaupallinen referenssistandardi, jonka delta-arvot tunnetaan

5.3 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutossa käytettiin poolittomia silikapohjaisia C18-käänteisfaasikolonneja vakuumitoimisessa laitteistossa (kuva 9). Ennen näytteiden lisäämistä kolonni kunnostettiin 2,5 ml:lla metanolia ja 5 ml:lla vettä. Kolonniin lisättävän näytteen määrä riippui aikaisemmin näytteelle tehdystä anabolisten steroidien seulonnasta, jossa mitattiin virtsan sisältämien ERC- ja TC-kohdeyhdisteiden pitoisuudet GC-MS-tekniikalla.



Kuva 9. Kiinteäfaasiuuttolaitteisto.

Lisätyn näytteen annettiin hitaasti imeytyä kolonnin läpi, minkä jälkeen kolonni pestiin vedellä ja pylväät kuivattiin vakuumissa. Kuivattuihin pylväisiin lisättiin 5 ml dietyylieetteriä, jolla pestiin pois virtsaan erittyneet vapaat eli konjugoitumattomat steroidit ja niiden metaboliitit. Näytteet eluoiitiin lopuksi borosilikaattiputkeen 3 x 1 ml:lla metanolia, ja putket haihdutettiin kuiviin typpihaihduttimessa 60 °C:ssa.

5.4 Entsyymihydrolyysi

Typpihaihduttimessa kuivattuihin näyteputkiin pipetoitiin 25 µl metanolia ja 1 ml kalium/natrium-fosfaattipuskuria. Putket vorteksoitiin huolellisesti, minkä jälkeen niihin lisättiin *Escherichia coli* -bakteerista eristettyä β-glukuronidaasi-entsyymiä. Putket vorteksoitiin uudelleen, ja lisäksi putkia käännettiin niin, että entsyymi kävi läpi myös putken yläosan. Tämän jälkeen putket asetettiin 50-asteiseen vesihauteeseen inkuboitumaan yhdeksi tunniksi.

β -glukuronidaasi-entsyymi hydrolysoi konjugoituneen steroidin β -glukuronidiosan tehden steroidista vapaan ja sopivamman kaasukromatografiseen erotteluun. Glukuronidin hydrolyysiin sopivaa entsyymiä voidaan eristää *E. coli*n lisäksi naudan maksasta (ketodaasi) tai nilviäisistä kuten viinimäkikotiloista (β -glukuronidaasi). *E. coli*n β -glukuronidaasi-entsyymi on kuitenkin todettu kaikkein spesifimmäksi virtsan steroidien β -glukuronidikonjugaatteihin. Hydrolyysireaktio käynnistyy tyypillisesti lievästi happamasta pH:sta neutraaliin, sillä glukuronidi on hydrolyysille resistentti emäksisessä ympäristössä. [11.]

5.5 Nesteutto

Inkuboinnin jälkeen huoneenlämpöön jäädytettyihin putkiin lisättiin 250 μ l 20-prosenttista kaliumkarbonaattipuskuria ($K_2CO_3/KHCO_3$) jolla säädettiin liuoksen pH. Liuos uutettiin 5 ml:aan tert-butyylimetyylieetteriä, jonka jälkeen putkia vorteksoitiin minuutin ajan ja lopuksi sentrifugoitiin 5 min ajan 1000 G:ssä. Orgaaninen faasi ja siihen uuttuneet vapaat steroidit ja steroidien metaboliitit siirrettiin muovisella pasteur-pipetillä toiseen borosilikaattiputkeen ja haihdutettiin kuiviin typpihaihduttimella. Haihdutetut näytteet liuotettiin 120 μ l:aan LC1 ISTD -liuosta huolellisesti vorteksoimalla ja kääntelemällä putkia niin, että liuos kävi läpi putken seinämät. Liuotettu näyte siirrettiin suippoputkellisiin LC-näytepulloihin nestekromatografista fraktiointia varten.

5.6 HPLC-fraktiointi

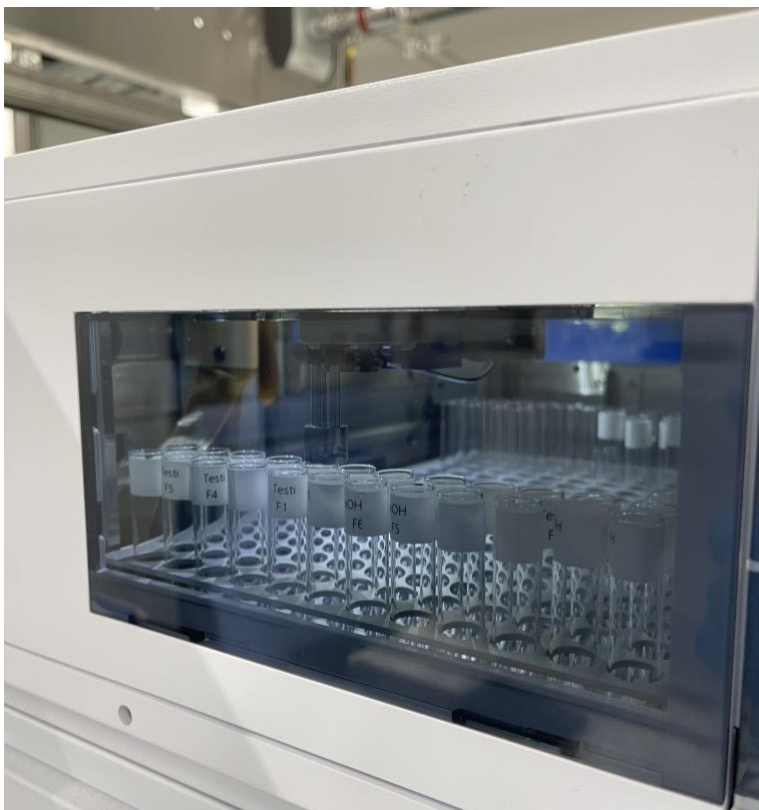
HPLC-fraktioinnin hyödyntäminen steroidianalyseissä mahdollistaa usean yhdisteen tutkimisen samanaikaisesti pienistä näytetilavuuksista. Fraktioinnin tärkeimpänä tarkoituksena on päästä eroon näytteen uuton jälkeen esiintyvistä epäpuhtauksista, joiden läsnäolo häiritsee IRMS-analyysia. Koska virtsanäytteet sisältävät useita eri TC- ja ERC- yhdisteitä vaihtuvilla pitoisuuksilla, HPLC-fraktiointi on myös edellytys sille, että jokainen yhdiste saadaan tarkasti laimennettua sopimaan IRMS-mittauksen lineaariselle alueelle. HPLC-fraktiointi perustuu kontrollinäytteellä määriteltujen fraktionkeräysaikaisten perusteella

näytteen jakamisen yhdisteittäin omille fraktioilleen. Rutiinianalyseissä fraktioiteja suoritetaan kaksi, sillä testosteronifraktioon jää häiritseväksi yhdisteeksi vielä toistaiseksi tunnistamaton epäpuhtaus. Testosteronin lisäfraktiointi suoritetaan samalla nestekromatografilla käyttäen eri kolonnia. Tässä validointityössä testosteronia ei mitattu, joten ylimääräistä fraktiointia ei suoritettu sarjojen yhteydessä lukuun ottamatta epitestosteronille tehtyä testifraktiointia. HPLC-fraktioinnin parametrit on esitetty taulukossa 6. Parametrit koskevat ensimmäistä fraktiointia.

Taulukko 6. HPLC-laiteparametrit.

HPLC-fraktiointi	
Kolonne	ACE5 C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (ACE)
Eluentti	A: H ₂ O B: 90 % asetonitrili
Menetelmä	IRMS_100_valid2023
Virtaus	1,0 ml/min
Injektio	100 µl
Uuni	38°C
Gradientti	42 % B (pito 31 min) → 61 % B (0,1 minuutissa) → 72 % B (3,9 minuutissa, pito 6 min) → 100 % B (0,1 minuutissa, pito 7,9 min) → 42 % B (0,1 minuutissa, pito 5 min)
DAD-detektio	192 nm ja 245 nm

Fraktiot keräytyivät omiin putkiinsa (kuva 10.), joista sen jälkeen haihdutettiin pois ajoliuoksina käytetyt asetonitrili ja puhdistettu vesi typpihaihduttimella.



Kuva 10. Fraktionkerääjä.

Kuiviksi haihdutetut fraktioputket asetettiin vakuumieksikaattoriin täydellistä kuivumista varten. Tämän jälkeen fraktiot liuotettiin IRMS-ajossa käytettyyn retentioaikastandardiin (RSTD). RSTD:n määrä oli jokaiselle fraktiolle yksilöllinen, ja se perustui steroidiprofiiliseulonassa mitattuihin steroidikonsentraatioihin. Liuotetut fraktiot suljettiin autosamplerin vialeihin odottamaan IRMS-ajoa.

5.7 Isotooppisuhteiden mittaus IRMS-laitteella

IRMS-laitteelle suoritettiin monia toimintakunnon tarkastamiseen liittyviä testejä ja toimenpiteitä ennen näytteiden ajoa. Kaasulinjaston tiiviys tarkistettiin argonvirtauksen avulla kolmella eri laiteasetuksella, jotta mahdollisten vuotojen sijainti saatiin rajattua. Reaktorin oksidointi ajoitettiin yleensä niin, että se tapahtui aamuyöllä ennen analyysijä. Massa-analysaattorin toimintakunto tarkistettiin myös ennen ajoa hiilidioksidipulsseilla. Ennen näytteiden liuottamista RSTD-

liuokseen sen puhtaus tarkistettiin analysoimalla sen intensiteetit sellaisenaan. Automaattisen näytteensyöttäjän injektorin neula pestiin vielä automaattisella pesumetodilla ennen injektointeja. Näytteiden yhteydessä ajettiin referenssistandardeja. IRMS-laitteen parametrit ovat esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. IRMS-laitteen parametrit.

IRMS	
Kolonni	HP5-MS, 30 m x 0.25 mm, filmi 0.25 µm
Esikolonni	Silikakapillaari, deaktivoitu ilman faasia 2 m x 0.32 mm
Polttoreaktori	940 °C
Menetelmät	<i>GC-menetelmä:</i> Steroids.tr2.meth <i>Autosampler-menetelmä:</i> 2 µl.rsh.meth <i>IRMS-menetelmä:</i> Steroids.met
Virtaus	Helium, vakiovirtaus, 1,5 ml/min
Injektio	2 µl, splitless 260 °C, ruiskun tilavuus 10 µl, ilmatilavuus neulassa näytteen jälkeen 1 µl
Purge	Purge flow 70 ml/min 1,50 min päästä
Uuni	150 °C (pito 1 min) 25 °C/min → 260 °C 3 °C/min → 290 °C 35 °C/min → 310 °C (pito 1 min) Ajoaika 1030 s = 17 min

6 Validointi

Validointi suoritettiin laboratorion laatimaa WADAn määräyksiin nojautuvaa validointisuunnitelmaa noudattaen. WADAn määräysten mukaan validoitavan menetelmän täytyy olla selektiivinen ja spesifinen mitattaville yhdisteille. Muita määritettyjä ehtoja on esimerkiksi, että menetelmän kvantitoinnin alaraja jokaista ERC-yhdistettä kohden saa olla enintään 50 ng/ml ja että siirtymävirhettä ei saa esiintyä. Validointi tehtiin kahdelle ERC-yhdisteelle,

pregnanetriolille ja 16EN:lle. Validointiin otettiin alkuvaiheissa myös kokeilumielessä mukaan TC-yhdiste epitestosteroni, jota laboratorio oli hieman entuudestaan jo tutkinut.

6.1 Selektiivisyys

Validoinnissa yhdisteiden selektiivisyyttä tarkasteltiin tutkimalla yhdisteiden piikkien puhtautta seitsemästä eri näytteestä, sekä IRMS-analyysin 44/45-isotooppisuhteiden muotoja. 44/45-isotooppisuhteen piikin isotooppisen heilunnan tulee näyttää symmetriseltä, eikä viitteitä häiritsevää koeluutiosta tule ilmetä.

6.2 Menetelmän mittausalue

Virtsan vaihtelevat TC- ja ERC-konsentraatiot (ng/ml–µg/ml) vaikeuttavat menetelmän mittausalueen määrittämistä, sillä näytteiden tilavuudet voivat vaihdella. Tämän vuoksi WADA on määrännyt mittausalueen määrittämisen parametreiksi seuraavat mittaukset: ionilähteen lineaarisen alueen määrittäminen, laitteen lineaarisen alueen määrittäminen ja kvantitoinnin alarajan (LOQ) määrittäminen koko näytteenkäsittelyprosessin jälkeen.

Ionilähteen lineaarisen alueen määrittäminen kuuluu laboratorion päivittäisiin rutiinitarkastuksiin. Ionilähteen lineaarisuusmittauksessa laite mittaa eri intensiteetin CO₂-pulssien tuloksia, joita verrataan valmistajan antamiin ohjeisiin. Ionilähteen lineaarisen alueen määrittäminen ei vaikuta validoitavien analyttien, joten tässä validoinnissa ei enempää keskitytä siihen.

6.2.1 Laitteen lineaarinen alue

Laitteen lineaarinen alue mitattiin menetelmään validoitaville uusille aineille 16-EN ja pregnanetrioli. Lineaarinen alue laskettiin myös epitestosteronille. Mittauksen yhteydessä ajettiin sertifioituja referenssistandardeja (USADA 34-2, MX018-1, MX018-2). Mittausta varten valmistettiin MIX3-kontrollinäyte, joka

sisälsi menetelmään validoitavien analyyttien lisäksi epitestosteronia ja RSTD:n. Kantaliuoksen pitoisuus jokaisen analyytin osalta oli 50 µg/ml.

Kantaliuoksesta MIX3 valmistettiin laimennossarja sykloheksaani:propanoliin (CHX:IPA) laimentamalla. Linearisuusmittausta varten ajettiin kaksi sarjaa. Ensimmäisellä sarjalla laskettiin lineaariset alueet epitestosteronille ja 16-EN:lle, ja toisella sarjalla pregnanetriolille. Molempien laimennossarjat on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 1. Laimennokset lineaaristen alueiden mittaukseen.

Sarja 1		Pitoisuus (µg/ml)		Sarja 2		Pitoisuus (µg/ml)	
Näyte	16-EN	Epitestosteroni		Näyte	Pregnanetrioli		
1	1	1		1	10		
2	2	2		2	20		
3	5	5		3	25		
4	10	10		4	40		
5	15	15		5	50		
6	25	25		6	75		
7	40	40		7	100		
8	50	50		8	150		
				9	250		

Ensimmäinen lineaarisuusajoa tehtiin *Steroids.met* -metodilla. Toinen lineaarisuusajoa tehtiin päivitetyllä *Steroids_IRMS_7.met* -metodilla. Päivitetystä metodista korjattiin pregnanetriolin piikin integrointiparametrejä. Jokaisesta laimennoksesta mitattiin kolme rinnakkaismäärittystä. WADA:n asettamien validointikriteerien mukaan laitteen lineaarisen pitoisuusalueen kuuluu täyttää seuraavat kriteerit:

- Jokaisen pitoisuustason rinnakkaismittausten δ^{13} -arvojen keskiarvo saa poiketa kaikkien lineaarisuusalueella olevien mittausten keskiarvosta enintään 0,5 ‰.
- Jokaisen pitoisuustason rinnakkaismittausten δ^{13} -arvojen keskihajonta saa olla enintään 0,5 ‰. [5, s. 14.]

6.2.2 Kvantitoinnin alarajan määrittäminen

Kvantitoinnin alarajan (LOQ) määrittäminen ERC-yhdisteille on haastavaa virtsan steroidiprofiilin vaihtelevan konsentraation vuoksi. Virtsassa esiintyvien steroidien pitoisuudet voivat vaihdella ng/ml ja µg/ml väliltä eri yksilöillä, mikä aiheuttaa haasteita näytteiden valmistamisessa. Luotettavan analyysituloksen saamiseksi LOQ-määrittystä varten tarvitaan usealta eri kohdehenkilöltä peräisin olevaa virtsamatriisia.

LOQ-määrittämisessä näyte esikäsiteltiin menetelmäohjetta *Endogeeniset steroidit, IRMS-varmistus, humaanivirtsa (DO-93)* noudattaen. Näytteinä käytettiin kahdesta eri nollavirtsasta (Lapsi-0 11/23 ja Seka-0 OMP<1,014 6/23) koottuja laimennoksia. Nollavirtsoista toisessa (Lapsi-0 11/23) tutkittavien yhdisteiden pitoisuus oli matala, ja toisella (Seka-0 OMP<1,014 6/23) tutkittavien yhdisteiden pitoisuus oli hieman korkeampi. Nollavirtsoista tehtiin sekoituksia viidellä tasolla siten, että matalin pitoisuustaso kullekin tutkittavalle yhdisteelle oli enintään 50 ng/ml. Näytteet analysoitiin kolmena rinnakkaisena. Laimennokset ja tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet laimennoksissa on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. LOQ-määrittämiseen valmistetut näytelaimennokset ja niiden pitoisuudet tutkittaville yhdisteille.

Näyte	Sekoitusuhde		Pitoisuus (ng/ml)	
	Lapsi-0 11/23	Seka-0 OMP<1,014 6/23	PT	16EN
LOQ 1	25,0 ml	–	30,69	7,20
LOQ 2	22,5 ml	2,5 ml	45,02	18,80
LOQ 3	20,0 ml	5,0 ml	59,35	29,16
LOQ 4	7,5 ml	7,5 ml	102,35	62,10
LOQ 5	3,0 ml	12,0 ml	145,34	95,04

Määritetty LOQ hyväksyttiin, jos tutkittavan yhdisteen signaali oli laitteen lineaarisella alueella enintään 25 ml:n näytetilavuudella sekä jos rinnakkaismittausten keskihajonta oli enintään menetelmän mittausepävarmuus.

6.3 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuutta testattiin toistettavuuskokeella. Toistettavuus tutkittiin esikäsittelemällä ja analysoimalla menetelmän negatiivinen kontrollinäyte viitenä rinnakkaisena. Kokeessa määritettiin, ovatko yhdisteet havaittavissa jokaisessa kontrollinäytteessä ja pysyvätkö delta-arvojen hajonnat WADAn asettaman menetelmän suurimman sallitun mittausepävarmuuden rajoissa (0,7 %) [5, s. 5].

6.4 Uusittavuus

Uusittavuuskokeella tutkittiin mittaussarjojen välistä toistettavuutta. Menetelmän negatiivinen kontrollinäyte analysoitiin 10 rinnakkaisena kahteen sarjaan jaettuna. Tutkittavien yhdisteiden kuului olla havaittavissa jokaisessa

kontrollinäytteessä, ja delta-arvojen hajontojen tuli pysyä WADAn menetelmälle asettaman suurimman sallitun mittausepävarmuuden rajoissa (0,7 ‰).

Uusittavuuskokeen toisen sarjan näytteiksi käytettiin toistettavuusmittauksessa ajettuja näytteitä, ja toinen sarja tehtiin uutena.

6.5 Yhdisteiden säilyvyys

Yhdisteiden säilyvyys eli stabiilius testattiin analysoimalla esikäsitellyt näytteet toistamiseen viiden vuorokauden kuluttua ensimmäisestä analyysikerrasta.

Testisarjana käytettiin validoinnin viimeisenä ajettua sarjaa. Testin tarkoituksena oli selvittää, ovatko tutkittavat yhdisteet havaittavissa vielä säilytyksen jälkeen.

6.6 Häiriöalttius

Validoitavien yhdisteiden häiriöalttiutta tutkittiin usealla tavalla. HPLC-fraktioinnin aikana tutkittiin, haihtuuko näytettä analyysiin huomattavasti vaikuttavalla tavalla, jos kerätyt fraktiot jäävät viikonlopun yli fraktiokeräimeen. HPLC-fraktioinnin aikana tutkittiin häiriöalttiutta myös ajamalla puhtasaineita ennen ja jälkeen näytteiden fraktioimista. 16-EN-yhdisteen epäiltiin haihtuvan muita TC- ja ERC-yhdisteitä helpommin. Sen häiriöalttius haihtumiselle tutkittiin niin, että joitain 16-EN-fraktioita haihdutettiin 65 °C:ssa ja toisia 45 °C:ssa.

6.7 Siirtymävirhe

Menetelmän siirtymävirhettä tutkittiin analysoimalla näyte, joka ei sisältänyt tutkittavia yhdisteitä. Näytteenä käytettiin puhdistettua vettä, ja se analysoitiin validoitavia yhdisteitä korkealla pitoisuudella sisältävän kontrollinäytteen jälkeen. Siirtymävirhettä ei saisi esiintyä, eli puhtaasta vesinäytteestä ei saa löytyä tutkittavia yhdisteitä. Puhdas vesinäyte kävi läpi saman esikäsitelyprosessin kuin sarjan muutkin näytteet.

6.8 Systemaattinen virhe, bias

Virtsa on matriisina hyvin vaihteleva yksilöistä riippuen. Eri alkuperää olevat näytteet voivat käyttäytyä hieman eri tavalla näytteenkäsittelyprosessin eri vaiheissa, kuten hydrolyysissa ja kromatografisessa fraktioinnissa. Tämän takia steroidien mittausten epävarmuuden ja mittausvirheen määrittämisessä tulee oikeudenmukaisten tulosten saamiseksi käyttää matriisina virtsaa, eikä esimerkiksi vettä.

Menetelmän systemaattinen virhe määritettiin Piperin ym. [22] esittelemän lineaarisen sekoitusmallin avulla. Testissä negatiiviseen virtsanäytteeseen, jonka 16-EN- ja PT-pitoisuudet olivat tunnettuja, lisättiin tutkittavia steroideja viidellä eri pitoisuustasolla. Näytteet esikäsiteltiin ja analysoitiin kahtena rinnakkaisena. Mittausvirhe laskettiin lineaarisen sekoitusmallin lineaarisovituksesta. Mittausvirhe sai olla enintään yhtä suuri kuin WADAn asettama menetelmän suurin sallittu mittausepävarmuus (0,7 ‰).

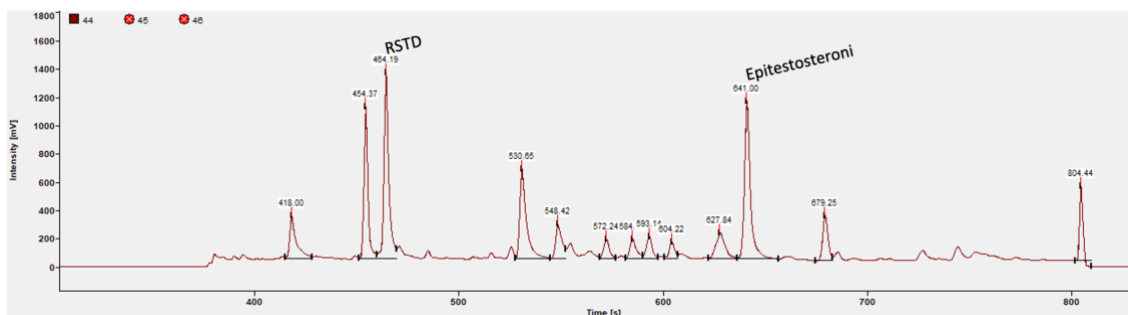
6.9 Mittausepävarmuus

Menetelmän mittausepävarmuus validoitaville yhdisteille määritettiin uusittavuuden ja mittausvirheen perusteella. Mittausepävarmuus validoitaville yhdisteille sai olla WADAn määräysten mukaan enintään 0,7 ‰.

7 Validoinnin tulokset

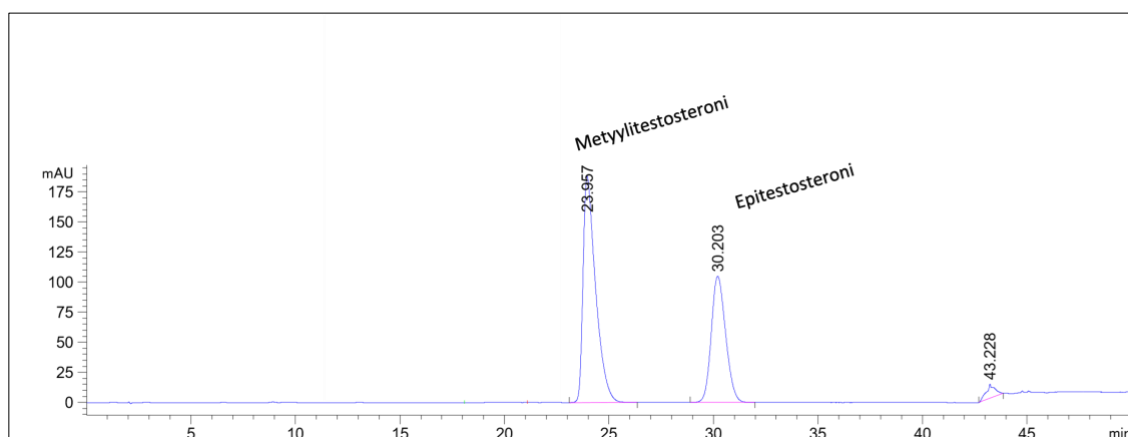
7.1 Epitestosteronin tulokset

Epitestosteroni on lisätyövaiheita vaativa yhdiste, sillä sen fraktio ensimmäisen HPLC-puhdistuksen jälkeen jää epäpuhtaaksi (kuva 11).



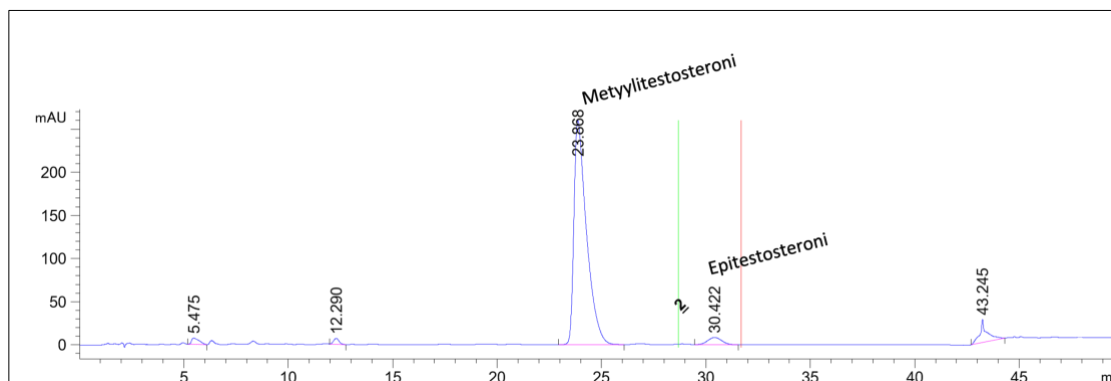
Kuva 11. Epitestosteronifraktion IRMS-kromatogrammi yhden LC-fraktioinnin jälkeen.

Epitestosteronifraktiota puhdistettiin ylimääräisellä HPLC-fraktioinnilla. Fraktiointia varten nestekromatografilla ajettiin puhdasainesekoitus, joka sisälsi epitestosteronia ja sisäisenä standardina metyylitestosteronia. Kuvassa 12 on esitetty puhdasainesekoituksen LC-kromatogrammi.



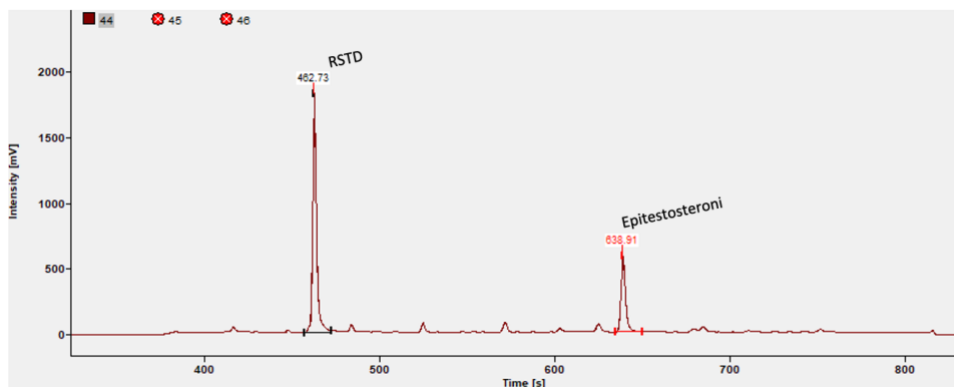
Kuva 12. Epitestosteronin puhdasaineen LC-kromatogrammi.

Kuvasta 12 nähdään, että epitestosteroni erottuu selkeästi metyylitestosteronista, joten sen puhdistaminen omaan fraktioonsa on mahdollista. Epitestosteronille laskettiin fraktionkeräysikkuna kahden puhdasainesekoitus-rinnakkaisnäytteen retentioaikojen perusteella, jonka jälkeen viidestä nollavirtsasta ja yhdestä positiivivirtsasta eristettiin epitestosteroni. Kuvassa 13 on yhden nollavirtsan epitestosteronin LC-kromatogrammi.



Kuva 13. Nollavirtsan epitesteronin LC-kromatogrammi.

Nollavirtsassa oli LC-kuvaajan perusteella havaittavissa pieni pitoisuus epitesteronia. Kuvassa 13 näkyvät vihreä ja punainen viiva epitesteronipiikin molemmiin puolin kuvastavat fraktionkeräyksen alkua ja loppua. Kerätty puhdas epitesteronifraktio haihdutettiin kuiviin typpihaihduttimella, liuotettiin RSTD-liuokseen ja siirrettiin viaaliin IRMS-analyysiä varten. Nollavirtsan IRMS-kromatogrammi on esitetty kuvassa 14.

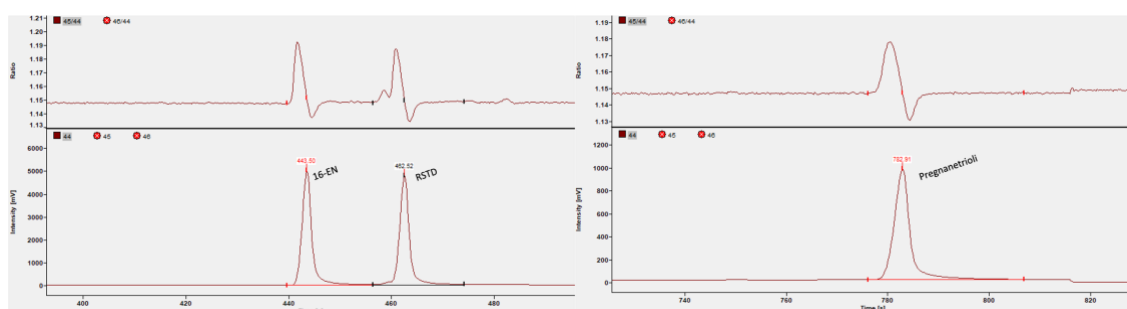


Kuva 14. Puhdistetun epitesteronifraktion IRMS-kuvaaja nollavirtsasta.

Kuvasta 14 nähdään, että epitesteronin puhdistus ylimääräisellä fraktioinnilla onnistui. Piikin signaalin intensiteetti jokaisessa näytteessä oli yhdisteelle erikseen määritetyn lineaarisen alueen sisällä. Epitesteronia voidaan tämän tutkimuksen perusteella tulevaisuudessa harkita lisättäväksi menetelmään. Tässä validointityössä epitesteronille ei kuitenkaan aikataulusyistä suoritettu enempää validointiin liittyviä mittauksia.

7.2 Selektiivisyys

Menetelmä todettiin selektiiviseksi validoitaville yhdisteille. Kuvasta 15 näkyvät yhdisteiden IRMS-kromatogrammit intensiteetille (alempi kuvaaja) ja isotooppisuhteelle (ylempi kuvaaja). Molempien steroidien isotooppisuhdekuvaajista näkyy selkeästi isotooppinen heilunta, eli miten raskaammat ^{13}C -isotoopit eluoituvat ennen kevyempiä ^{12}C -isotooppeja. Myös yhdisteiden signaalien piikit näyttävät normaaleilta, eikä ylimääräisiä häiritseviä piikkejä esiinny.



Kuva 15. Kromatogrammit 16-EN- ja PT-yhdisteiden signaalien intensiteetistä ja isotooppisuhteista.

7.3 Menetelmän mittausalue

7.3.1 Laitteen lineaarinen alue

Lineaarinen alue tutkittiin kahdella sarjalla. Ensimmäisellä sarjalla saatiin laskettua 16-EN:lle ja epitestosteronille lineaariset alueet. Pregnenetriolin lineaarinen alue saatiin laskettua ajamalla toinen sarja korkeammilla pitoisuuksilla. Lineariset alueet tutkituille yhdisteille on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Validoitavien yhdisteiden lineaariset alueet.

Lineaariset alueet 1. sarjassa 15.11.23			Lineaariset alueet 2. sarjassa 4.12.23		
ERC	Vaste m/z 44		ERC	Vaste m/z 44	
	Alin	Ylin		Alin	Ylin
16-EN	839	5804	PT	410	8663
Epitestosteroni	348	8874			

7.3.2 Määrittysraja

Kvantitoinnin alaraja onnistuttiin määrittämään molemmille ERC-yhdisteille. Viidestä sekoitusnäytteestä ensimmäinen, jossa pitoisuus pregnanetriolin osalta oli 30,69 ng/ml sopi PT:n aikaisemmin määritetylle lineaariselle alueelle, joten se määritettiin yhdisteen kvantitoinnin alarajaksi. 16-EN-yhdisteen lineaariselle alueelle sopi sekoitusnäytteen 3 pitoisuus, ja yhdisteen LOQ-arvoksi määritettiin 29,16 ng/ml. Jokaisen LOQ-määrittämisessä mitatun sekoitusnäytteen tulokset ovat koottuna yhteen liitteessä 1.

7.4 Toistettavuus

Taulukossa 11 on esitetty toistettavuuskokeen tulokset.

Taulukko 11. Toistettavuuskokeen tulokset.

Näyte	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
	Pregnanetrioli	16-EN
Neg 1	-23,98	-24,56
Neg 2	-24,16	-24,19
Neg 3	-23,91	-23,91
Neg 4	-23,83	-24,34
Neg 5	-24,27	-23,7
Keskihajonta	0,18	0,34

Molempien validoitavien yhdisteiden viiden rinnakkaisen mittauksen keskihajonnat pysyvät sallitun rajan 0,7 ‰ sisällä. Tämän perusteella molempien validoitavien ERC-yhdisteiden tulokset ovat toistettavia.

7.5 Uusittavuus

Uusittavuuskokeen tulokset on esitetty taulukossa 12. Pregnanetriolin jälkimmäisessä mittauksessa toisen negatiivisen virtsakontollinäytteen tulos ei ollut lineaarisuusalueen sisällä, joten sitä ei otettu mukaan laskuihin. Molempien ERC-yhdisteiden sarjojen välinen keskihajonta oli alle 0,7 ‰, joten molemmat yhdisteet läpäisivät uusittavuuskokeen.

Taulukko 12. Uusittavuuskokeen tulokset.

Näyte	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
	Pregnanetrioli		16-EN	
	14.11.	30.11.	14.11.	30.11.
Neg. virtsa 1	-23,98	-23,43	-24,56	-23,88
Neg. virtsa 2	-24,16		-24,19	-23,59
Neg. virtsa 3	-23,91	-23,56	-23,91	-23,61
Neg. virtsa 4	-23,83	-23,37	-24,34	-23,54
Neg. virtsa 5	-24,27	-23,04	-23,70	-23,43
Sarjojen välinen keskihajonta	0,40		0,38	

7.6 Yhdisteiden säilyvyys

Säilyvyyskokeessa mitattiin yksi näytesarja uudestaan viiden päivän kylmähuonesäilytyksen jälkeen. Ensimmäisen mittauksen jälkeen näytepullot sinetöitiin uudelleen säilytystä varten. Säilyvyyttä tarkasteltiin kolmesta näkökulmasta: pysyvätkö tutkittavien yhdisteiden signaalien intensiteetit saman tasoisina, muuttuuko piikin puhtaus ja miten paljon näytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot eroavat säilytyksen jälkeen. Mittausten data kokonaisuudessaan esitellään liitteessä 2.

Pregnanetrioli-fraktion tuloksista huomattiin, että kahden näytteen yhdisteen signaali oli laskenut säilytyksen jälkeen, kun taas niiden RSTD:n signaalin intensiteetissä ei ollut muutosta. Säilytyksellä saattaa tämän perusteella olla vaikutusta pregnanetriolin säilyvyyteen. 16-EN-fraktiossa ei puolestaan havaittu säilytyksen aiheuttamia muutoksia signaalien intensiteeteissä. Kummankaan yhdisteen piikkien puhtauksissa ei näkynyt muutoksia säilytyksen jälkeen.

Näytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen eroavaisuudet on esitetty taulukossa 13. Taulukossa tuoreina mitattujen näytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvot esitellään tunnisteella "9" ja säilönnän jälkeiset $\delta^{13}\text{C}$ -arvot tunnisteella "9s". Suurin sallittu ero $\delta^{13}\text{C}$ -arvoissa on 0,5 ‰. Pregnanetriolin mittauksessa kaikki näytteet eivät pysyneet raja-arvon sisällä, mutta 16-EN-yhdisteellä näytteet pysyivät. Näiden tulosten perusteella näytteiden ylimääräisellä säilömisellä on merkittävä vaikutus ainakin pregnanetriolin tulosten luotettavuuteen.

Taulukko 13. Säilyvyyden vaikutus näytteiden $\delta^{13}\text{C}$ -arvoihin.

Näyte	PT			16-EN		
	$\delta^{13}\text{C}_9$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{9s}$ (‰)	$\Delta \delta^{13}\text{C} $ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_9$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{9s}$ (‰)	$\Delta \delta^{13}\text{C} $ (‰)
M2E	-23,62	-24,40	0,78	-24,62	-24,28	0,34
Seka-0	-23,29	-23,16	0,13	-23,71	-23,64	0,07
N2B	-22,09	-22,45	0,36	-22,93	-23,30	0,37
M4E	-22,88	-22,72	0,17	-23,91	-23,68	0,23
M10A	-23,90	-24,00	0,11	-24,13	-24,35	0,22
UBL	-23,43	-22,85	0,58	-23,64	-23,45	0,19
QC	-19,16	-19,31	0,15			

7.7 Häiriöalttius

Fraktiokeräimessä viikonlopun yli säilytetyistä näytteistä saatiin mitattua signaalit. Koska fraktiokeräysputket jäävät avoimina fraktiokeräimen, kontaminaatio on kuitenkin mahdollista. Kromatogrammeista tutkittiin piikkien puhtautta, eikä häiritseviä piikkejä havaittu. Näytteiden jättäminen viikonlopun yli fraktiokeräimeen on mahdollista, mutta ei suositeltavaa.

HPLC-fraktioinnin alussa ja lopussa mitatuilla puhtasaineajoilla voitiin selvittää, vaikuttaako usean näytteen ajaminen yhtäjaksoisesti merkittävästi yhdisteiden retentioaikoihin. Taulukossa 14 on esitetty neljän sarjan puhtasainesekoitusretentioajat pregnanetriolille ja 16-EN:lle. Taulukossa esitetty retentioaika alussa on kahden mittauksen keskiarvo. Pregnanetriolilla retentioajat muuttuvat hieman ajon aikana, ja 16-EN:llä ne pysyvät lähes samana.

Taulukko 14. Puhtasaineajojen HPLC-retentioaikoja.

LC MIX, Pregnanetrioli			
Sarja	Retentioaika alussa (min)	Retentioaika lopussa (min)	Erotus (min)
3	32,34	32,24	0,10
4	33,08	33,14	0,05
6	32,32	32,45	0,12
7	32,49	32,60	0,11
LC MIX, 16-EN			
Sarja	Retentioaika alussa (min)	Retentioaika lopussa (min)	Erotus (min)
3	50,10	50,10	0,00
4	50,07	50,06	0,01
6	49,96	49,96	0,00
7	50,11	50,12	0,01

16-EN fraktion haihtumisesta aiheutuva häiriö mitattiin yhdellä sarjalla. Sarjassa esikäsiteltiin ja mitattiin negatiivinen kontrollivirtsa viitenä rinnakkaisena. Näistä rinnakkaisista kaksi ensimmäistä 16-EN-fraktiota haihdutettiin 65 °C:ssa, ja loput kolme 45 °C:ssa. Haihdutusten jälkeen fraktiot liuotettiin RSTD-standardiin työohjeen mukaisesti ja fraktiot analysoitiin IRMS-laitteella. Fraktioista mitatut signaalit ja $\delta^{13}\text{C}$ -arvot on esitetty taulukossa 15.

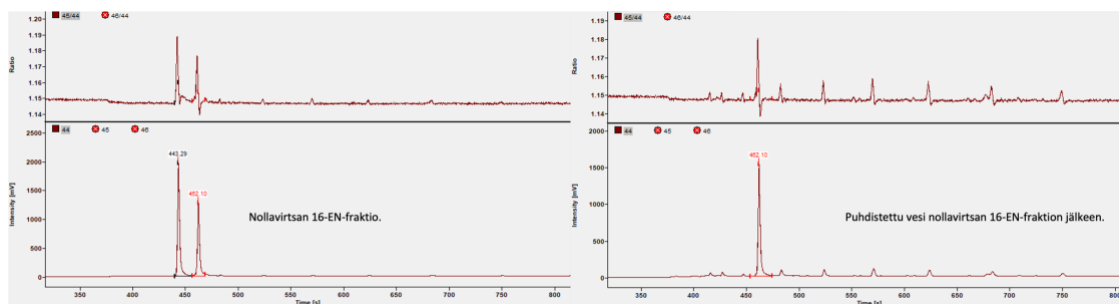
Taulukko 15. 16-EN fraktion häiriöalttius haihdutuslämpötilalle.

		Lineaarinen alue	
		839–5804	
Näyte	Haihdutus- lämpötila (°C)	Signaali (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Neg. virtsa 1	65	820	-23,879
Neg. virtsa 2	65	653	-23,590
Neg. virtsa 3	45	1026	-23,614
Neg. virtsa 4	45	1321	-23,536
Neg. virtsa 5	45	1590	-23,430

Taulukosta 15 nähdään, että korkeammassa lämpötilassa haihdutettujen fraktioiden mitatut signaalit jäivät yhdisteen lineaarisen alueen ulkopuolelle. Yhdistettä haihtuu korkeammassa lämpötilassa haihduttaessa merkittävästi, joten jatkossa 16-EN täytyy haihduttaa alhaisemmassa lämpötilassa.

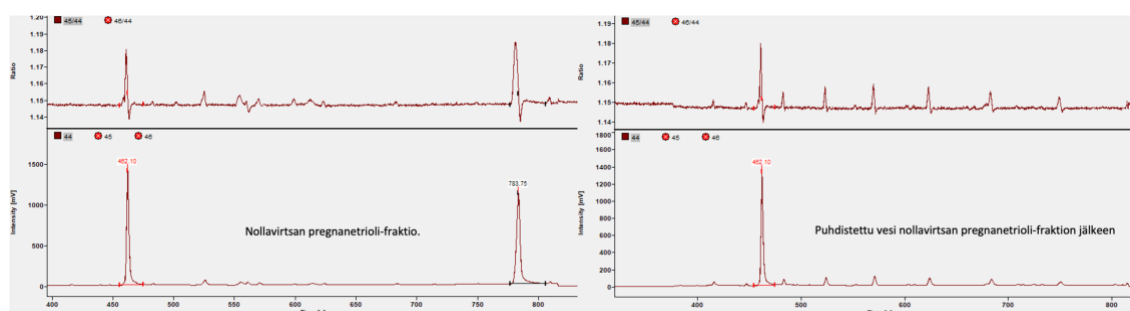
7.8 Siirtymävirhe

Menetelmän siirtymävirhe tutkittiin analysoimalla puhdistettua vettä nollavirtsan jälkeen. Kuvassa 16 on esitetty 16-EN-fraktion IRMS-kromatogrammit nollavirtsalle ja puhtaalle vedelle. Siirtymävirhettä ei esiinny. Pienet epäpuhtaudet, joita puhdistetun veden kromatogrammissa näkyy, johtuvat näytteen liuotuksen yhteydessä konsentroituneista kontaminaatioista, joita voi siirtyä esim. RSTD-liuoksen mukana näytteeseen.



Kuva 16. IRMS-kromatogrammit nollavirtsan 16-EN fraktiolle ja nollavirtsan jälkeen ajatulle puhdistetulle vedelle. Puhdistetun veden kromatogrammissa ei näy piikkiä 16-EN-yhdisteen retentioajalla.

Kuvassa 17 on pregnanetrioli-fraktion kromatogrammit nollavirtsalle ja puhdistetulle vedelle. Myöskään pregnanetrioli ei aiheuttanut siirtymävirhettä.



Kuva 17. IRMS-kromatogrammit nollavirtsan pregnanetrioli-fraktiolle ja nollavirtsan jälkeen ajatulle puhdistetulle vedelle. Puhdistetun veden kromatogrammissa ei näy piikkiä pregnanetrioli-yhdisteen retentioajalla.

7.9 Systemaattinen virhe, bias

Menetelmän systemaattinen virhe pregnanetriolille ja 16-EN:lle laskettiin yhdisteiden puhtasaineseoksista lineaarisen sekoitusmallin avulla. Lineaarista sovitusta varten valmistettiin validoitavia yhdisteitä eri pitoisuuksilla sisältäviä näyteseoksia lisäämällä puhtasaineita nollavirtsaan. Valmistetut näyteseokset ja niiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 16.

Taulukko 16. Lineaarista sekoitusmallia varten valmistetut näyteseokset.

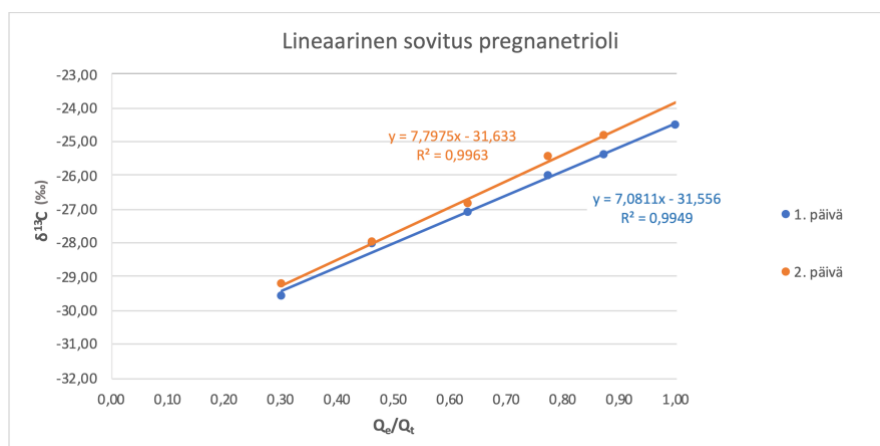
	Näytetilavuus (ml)	Alkuperäinen pitoisuus (ng/ml)		Lisätty steroidiseos (µl)		Loppupitoisuus (ng/ml)	
		PT	16-EN	PT (17,4 µg/ml)	16-EN (11,7 µg/ml)	PT	16-EN
Näyte 1	10	301	118	0	0	301	118
Näyte 2	10			25	25	345	147
Näyte 3	10			50	50	388	1767
Näyte 4	10			100	100	475	235
Näyte 5	10			200	200	649	352
Näyte 6	5			200	200	997	586

Kahtena eri päivänä ajetuista näytteistä laskettiin kahden rinnakkaisnäytteen $\delta^{13}\text{C}$ -arvot. Näistä delta-arvoista määritettiin keskiarvot. Näyteliuksille laskettiin Q_e/Q_t -arvot eli alkuperäisen pitoisuuden suhde loppupitoisuuteen puhdaisaineseoksen lisäyksen jälkeen. Nämä tulokset on esitetty taulukossa 17.

Taulukko 17. Pregnanetriolin ja 16-EN:n mitatut $\delta^{13}\text{C}$ -arvot bias-määrittystä varten.

	Q_e/Q_t	PT		16-EN	
		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
		1. Päivä	2. Päivä	1. Päivä	2. Päivä
Näyte 1	1,00	-24,52			
Näyte 2	0,80	-25,39	-24,85	-24,63	-25,02
Näyte 3	0,67	-26,02	-25,45	-25,24	-25,85
Näyte 4	0,50	-27,12	-26,85	-26,43	-26,76
Näyte 5	0,34	-28,04	-27,99		-27,54
Näyte 6	0,20	-29,58	-29,25	-28,45	-29,43

Taulukosta 17 pois jätetyt $\delta^{13}\text{C}$ -arvot eivät pysyneet yhdisteille määritettyjen lineaaristen alueiden sisällä. Q_e/Q_t - ja yksittäisen päivän $\delta^{13}\text{C}$ -arvoille tehtiin lineaarinen sovitus, jonka avulla määritettiin bias laskemalla erotus suoran leikkauspisteen ja validoinnin aikana mitattujen puhtasaineiden keskiarvon väliltä. Kuvassa 18 on esitetty pregnanetriolin molempien päivien lineaariset sovituksset.



Kuva 18. Pregnanetriolin molempien päivien lineaariset sovitukset.

Yhdisteiden systemaattisille virheille määritettiin lisäksi myös mittausepävarmuus. Biaksen epävarmuus laskettiin THL:n dopintestauslaboratorion ohjeiden mukaisesti kaavalla (2).

$$u_{bias} = \sqrt{\frac{bias^2 + sd_{int}^2}{n + u_{ref}^2}} \quad (2)$$

u_{bias} = biaksen epävarmuus

$bias$ = lineaarisovituksen leikkauspisteen poikkeama puhtasaineen $\delta^{13}C$ -arvosta

sd_{int} = lineaarisovituksen suoran yhtälöllä jokaiselle näyteliuokselle laskettujen leikkauspisteiden keskihajonta

n = mittausten lkm.

u_{ref} = puhtasainerinnakkaismääritysten keskihajonta

Taulukkoon 18 on laskettu molempien yhdisteiden systemaattiset virheet, sekä systemaattisten virheiden epävarmuudet. Bias on molemmilla yhdisteillä alle raja-arvon 0,7 ‰. Systemaattisten epävarmuuksien kahden päivän tulos täytyy yhdistää, jotta voidaan laskea koko menetelmän mittausepävarmuus yhdisteelle. u_{bias} arvot yhdistettiin $u_{bias(RMS)}$ -arvoksi kaavalla (3) (THL:n dopingtestauslaboratorion ohje). Taulukossa 18 on esitetty myös yhdisteiden $u_{bias(RMS)}$ -arvot.

$$u_{bias(RMS)} = \sqrt{\frac{u_{bias1}^2 + u_{bias2}^2}{n}} \quad (3)$$

Taulukko 18. Pregnanetriolin ja 16-EN:n systemaattinen virhe ja biaksen epävarmuus.

Yhdiste	bias $\delta^{13}\text{C}$ (keskiarvo-leikkauspiste) (‰)		$U_{\text{bias}} \delta^{13}\text{C}$ (‰)		$U_{\text{bias(RMS)}} \delta^{13}\text{C}$ (‰)
	1. päivä	2. päivä	1. päivä	2. päivä	
PT	0,38	0,46	0,65	0,7	0,678
16-EN	0,10	0,53	0,24	0,59	0,449

7.10 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus laskettiin kaavalla (4). Lasketut mittausepävarmuudet on esitetty taulukossa 19. Molemmille yhdisteille lasketut mittausepävarmuudet alittivat WADAn asettaman rajan 0,7 ‰.

$$u_c = \sqrt{S_w^2 + u_{\text{bias(RMS)}}^2} \quad (4)$$

S_w = uusittavuus

Taulukko 19. Pregnanetriolille ja 16-EN:lle lasketut mittausepävarmuudet.

Yhdiste	u_c (‰)
PT	0,69
16-EN	0,46

8 Yhteenveto

Opinnäytetyö edisti pregnanetriolin ja 16-EN:n validointia menetelmään.

Validointia ei kuitenkaan saatu täydellisesti suoritettua, sillä aikataulusyistä

referenssipopulaatiot yhdisteille jäivät tekemättä. IRMS on herkkä laite ja se vaatii paljon testiajoja ja mahdollisia huoltotoimenpiteitä, jos tuloksissa esiintyy poikkeavuuksia. Validoinnin aikana IRMS-laitteelle jouduttiin tekemään huoltotoimenpiteinä reaktorin vaihto, kun useammassa sarjassa huomattiin yhdisteelle 5aD piirtyneen 45/44-kuvaajan olevan huono. Reaktorin vaihdon jälkeen δ^{13} -arvot poikkesivat normaalista, joten laitteelle suoritettiin jatkotoimenpiteinä retentiogapin leikkaus, sekä isotooppistandardin kalibrointi. Toimenpiteiden jälkeen δ^{13} -arvot palautuivat normaaleiksi ja validointia voitiin jatkaa. Koska näytteiden esikäsittelyprosessi vei tässä validointityössä aina vähintäänkin kaksi päivää, ja huoltotoimenpiteiden jälkeen IRMS-laitteiston toimintakykyä jouduttiin testailemaan useiden päivien ajan, aikatauluun tuli viivästyksiä.

Validoinnin ohella testattiin epitestosteronin lisäämistä menetelmään. Epitestosteronin todettiin olevan käyttökelpoinen yhdiste, kunhan sille suoritetaan toinen HPLC-fraktiointi. IRMS-rutiinianalysissä esikäsittelyprosessi kestää jo kolme päivää, sillä testosteronin täydellinen puhdistaminen vaatii ylimääräisen HPLC-fraktiointin. Epitestosteronin mukaan ottaminen rutiinisarjaan saattaisi venyttää esikäsittelyä vielä yhdellä päivällä, ellei sen fraktiointia olisi mahdollista yhdistää testosteronifraktiointin HPLC-menetelmään.

Opinnäytetyössä saatujen tulosten avulla laboratorio on lähempänä yhdisteiden validoimista menetelmään. Saadut tulokset näyttävät hyvältä ja ne osoittavat, että pregnanetrioli ja 16-EN ovat sopivia menetelmään.

Lähteet

- 1 Antidopingtoiminnan historia. Verkkoaineisto. Suomen urheilun eettinen keskus SUEK ry. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/dopingvalvonta/antidopingtoiminnan-historia/>>. Luettu 27.10.2023.
- 2 Oikeuskemia. Verkkoaineisto. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/valtion-palvelut/oikeuskemia>>. Luettu 27.10.2023.
- 3 Maailman antidopingtoimisto WADA. Verkkoaineisto. Suomen urheilun eettinen keskus SUEK ry. <<https://suek.fi/tutkinta/yhteistyossa/maailman-antidopingtoimisto-wada/>>. Luettu 27.10.2023.
- 4 International Standard for Laboratories. Verkkoaineisto. World Anti-Doping Agency. 2021. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf>. Luettu 2.11.2023.
- 5 Detection of Synthetic Forms of Prohibited Substances by GC/C/IRMS. Verkkoaineisto. World Anti-Doping Agency. 1.1.2022. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/td2022irms_v1.0_final_eng_0_0.pdf>. Luettu 2.11.2023.
- 6 The Prohibited List 2023. Verkkoaineisto. World Anti-Doping Agency. 2023. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-05/2023list_en_final_9_september_2022.pdf>. Luettu 6.11.2023.
- 7 De la Torre, Xavier; Colamonici, Cristiana; Curcio, Davide; Molaioni, Francesco; Botrè, Francesco. 2012. A comprehensive procedure based on gas chromatography–isotope ratio mass spectrometry following high performance liquid chromatography purification for the analysis of underivatized testosterone and its analogues in human urine. *Analytica Chimica Acta* 756, s. 23–29.
- 8 O’Leary, Marion H. 1988. Carbon Isotopes in Photosynthesis. *BioScience* Vol. 38 No. 5, s. 329–336.
- 9 Isotope Fractionation in the Biosphere. Verkkoaineisto. 2003. <<http://www.geo.cornell.edu/geology/classes/Geo656/656notes03/656%2003Lecture28.pdf>>. Luettu 14.11.2023.
- 10 C4 Photosynthesis. Verkkoaineisto. <<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/phoc.html#c2>>. Luettu 14.11.2023.
- 11 Gomes, Rachel L; Meredith, Will; Snape, Colin. E; Sephton, Mark A. 2009. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Jul 12;49 s. 1133–1140.

- 12 von Caemmerer, Susanne; Ghannoum, Oula; Pengelly, Jasper J. L.; Cousins, Asaph B. 2014. Carbon isotope discrimination as a tool to explore C₄ photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, Issue 13, s. 3459–3470.
- 13 Agarie, Sakae; Sasaki, Haruto, Matsuoka, Makoto; Miyao-Tokutomi, Mitsue. 2001. Overexpression of C₄ Phosphoenolpyruvate Carboxylase Increased Carbon Isotope Discrimination in Transgenic Rice Plants. *Plant Production Science*, s. 311–312.
- 14 Bütz, Daniel E; Casperson, Shanon L; Whigham, Leah D. 2013. The emerging role of carbon isotope ratio determination in health research and medical diagnostics. *J. Anal. At. Spectrom*, Vol 29, s. 594–598.
- 15 Adhya; Annuario; Lancaster; Price; Baron-Cohen; Srivastava. 2018. Understanding the role of steroids in typical and atypical brain development: Advantages of using a “brain in a dish” approach. *Journal of Neuroendocrinology*.
- 16 Irvankoski, Sini. 2018. Kolesterolin solunsisäinen aineenvaihdunta. Kandidaatintutkielma ja tutkimusprojekti. Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos.
- 17 Rone, Malena B; Fan, Jinjiang; Papadopoulos, Vassilios. 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta*. s. 646–658.
- 18 Vogg, Nora; Müller, Tobias; Floren, Andreas; Dandekar, Thomas; Scherf-Clavel, Oliver; Fassnacht, Martin; Kroiss, Matthias; Kurlbaum, Max. 2022. Targeted metabolic profiling of urinary steroids with a focus on analytical accuracy and sample stability. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*. Vol 25, s. 44–52.
- 19 Squires, E. James; Bone, Christine; Cameron, Jocelyn. 2020. *Pork Production with Entire Males: Directions for Control of Boar Taint*. University of Guelph, Department of Animal Biosciences.
- 20 Videnoja, Laura Susanna. 2013. Luontaisten steroidien dopingkäytön osoittaminen analyttisin menetelmin. Pro gradu -tutkielma. Helsingin yliopisto, Analyttisen kemian laboratorio. Helda.
- 21 Morgan R. E. 2013. Does consumption of high-fructose corn syrup beverages cause obesity in children? *Pediatric Obesity*. Vol 8 Issue 4.
- 22 Piper, Thomas; Mareck, Ute; Flenker, Ulrich; Mario Thevis; Platen, Petra; Schänzer, Wilhelm. 2008. Determination of ¹²C/¹³C ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22: 2161–2175.

- 23 Durdiaková, Jaroslava; Celec, Peter; Ostatníková, Daniela. 2011. Testosterone and its metabolites – modulators of brain functions. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*.
- 24 Saudan; Baume; Robinson; Avois; Mangin; Saugy. 2006. Testosterone and doping control. *British Journal of Sports Medicine*. Jul; 40 i21–i24.
- 25 Huhtaniemi, Ilpo. Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim*. Anabolisten steroidien käyttöön liittyvät terveysvaarat. 110(10):1020-.
- 26 Tauchen, Jan; Jurásek, Michael; Huml, Lukáš; Rimpelová, Silvie. 2021. Medicinal Use of Testosterone and Related Steroids Revisited. *Molecules*. Feb; 26(4): 1032.
- 27 Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. WADA Technical Document – TD2016EAAS. 2016. Verkkoaineisto. World Anti-doping Agency. <<https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-td2016eaas-eaas-measurement-and-reporting-en.pdf>>. Luettu 22.12.2023.
- 28 Wang, Feng-Qing; Yao, Kang; Wei, Dong-Zhi. 2011. From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones. *Soybean and Health*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.).
- 29 Zhou, Xiuwen; Xiong, Beibei; Ma, Xiao; Jin, Baohui; Xie, Liqi; Rogers, Karyne M; Zhang, Hui; Wu, Hao. 2023. Towards Verifying the Imported Soybeans of China Using Stable Isotope and Elemental Analysis Coupled with Chemometrics. *Food Fraud and Authenticity: Developments in Technologies*.
- 30 Nier, Alfred O. 1947. A Mass Spectrometer for Isotope and Gas Analysis. *Review of Scientific Instruments*. American Institute of Physics.
- 31 Jackson, Glen P; Muccio, Zeland. 2008. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst*. The Royal Society of Chemistry. 2009. 134, 213–222.
- 32 Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. WADA Technical Document – TD2018EAAS. 2018. Verkkoaineisto. World Anti-doping Agency. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018eaas_final_eng.pdf>. Luettu 25.12.2023.
- 33 Niiranen, Jukka; Soili, Jaarinen. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5.–6. painos. Helsinki. Edita Publishing Oy.
- 34 Riekenberg, P.M.; van der Meer, M.T.J.; Schouten, S. 2020. Practical considerations for improved reliability and precision during determination of $\delta^{15}\text{N}$ values in amino acids using a single combined oxidation-reduction reactor. NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research.

- 35 Calderone, Giovanni; Guillou, Claude; Reniero, Fabiano. 2004. Characterization of European Wine Glycerol: Stable Carbon Isotope Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- 36 Leckrone, Kristen, J.; Hayes, John, M. 1997. Efficiency and Temperature Dependence of Water Removal by Membrane Dryers. *Analytical Chemistry*. Vol. 69, No. 5 s. 911–918.
- 37 Continuous Flow Interface Isotope Ratio MS. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FCMD%2Fbrochures%2Fbr-30140-conflo-iv-br30140-en.pdf>>. Luettu 27.12.2023.
- 38 Detecting Ions in Mass Spectrometers with the Faraday Cup. 2011. Verkkoaineisto. <<https://www.spectroscopyonline.com/view/detecting-ions-mass-spectrometers-faraday-cup>>. Spectroscopy. Luettu 28.12.2023.
- 39 Juchelka, Dieter; Piper, Thomas; Thevis, Mario. Verkkoaineisto. GC-MS-IRMS: Undisputable results by coupling of GC-IRMS with high-resolution mass spectrometry for final confirmation in sports drug testing <<https://anchem.pl/wp-content/uploads/2021/04/GC-Isolink-IRMS-Aplikacja-Antydoping.pdf>>. Thermo Scientific. Luettu 28.12.2023.
- 40 More, Sanket J.; Ravi; Raju, Saravanan. 2022. Chapter 17 - Carbon isotope discrimination studies in plants for abiotic stress. *Climate Change and Crop Stress*.
- 41 Atkovska, Kalina; Klingler, Johannes; Oberwinkler, Johannes; Keller, Sandro; Hub, Jochen S. 2018. Rationalizing Steroid Interactions with Lipid Membranes: Conformations, Partitioning, and Kinetics. *ACS Central Science*. vol. 4(9) s. 1155–1165.

Kvantitoinnin alarajan määrittäykset

Taulukko 1. LOQ-määrittäysten data.

		Lineaarinen alue mV		
		PT		16EN
		410-8663		839-5804
LOQ_1	PT (30,69 ng/ml)		16EN (7,2 ng/ml)	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)
LOQ_1_1	-23,832	2741	-23,951	209
LOQ_1_2	-23,815	2560	-23,989	193
LOQ_1_3	-24,15	1318	-23,565	132
Avg	-23,93	2206,33	-23,84	178
SD	0,19		0,23	
LOQ_2	PT (45,021 ng/ml)		16EN (18,8 ng/ml)	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)
LOQ_2_1	-24,099	1717	-23,531	839
LOQ_2_2	-24,165	1914	-23,218	748
LOQ_2_3	-23,909	1892	-23,248	677
Avg	-24,06	1841,00	-23,33	754,67
SD	0,13		0,17	
LOQ_3	PT (59,352 ng/ml)		16EN (29,16 ng/ml)	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)
LOQ_3_1	-24,203	1955	-23,087	1369
LOQ_3_2	-24,08	1888	-23,242	1261
LOQ_3_3	-23,975	1805	-22,868	1125
Avg	-24,09	1882,67	-23,07	1251,67
SD	0,11		0,19	
LOQ_4	PT (102,345 ng/ml)		16EN (62,1 ng/ml)	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)
LOQ_4_1	-24,252	1919	-23,41	2121
LOQ_4_2	-24,204	1895	-23,355	2031
LOQ_4_3	-24,245	1904	-23,331	1901
Avg	-24,23	1906,00	-23,37	2017,67
SD	0,03		0,04	
LOQ_5	PT (102,345 ng/ml)		16EN (62,1 ng/ml)	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)	$\delta^{13}\text{C}$	Ampl. 44 (mV)
LOQ_5_1	-23,943	1538	-23,392	2061
LOQ_5_2	-24,186	1426	-23,298	1893
LOQ_5_3	-24,403	1666	-23,142	1867
Avg	-24,18	1543,33	-23,28	1940,33
SD	0,23		0,13	

Säilyvyyskokeen data

Taulukko 1. Validointisarjan 9 data.

Sarja 9 13.12.2023								
Lineaarisuusalue								
410-8663						839-5804		
	PT		RSTD		16-EN		RSTD	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44
M2E	-23,62	1228	-29,97	1451	-24,62	821	-30,25	1391
Seka-0	-23,29	1491	-30,01	1388	-23,71	1345	-30,21	1309
N2B	-22,09	1365	-29,95	1069	-22,93	916	-30,03	1197
M4E	-22,88	482	-30,30	1282	-23,91	138	-30,24	1195
M10A	-23,90	611	-30,13	1323	-24,13	1441	-30,53	1161
UBL	-23,43	504	-30,06	1235	-23,64	1500	-30,32	1203
QC	-19,16	1444	-29,98	1171				

Taulukko 2. Validointisarja 9 viiden päivän kylmäsäilytyksen jälkeen.

Sarja 9, 5 pv säilytyksen jälkeen 18.12.2023								
Lineaarisuusalue								
410-8663						839-5804		
	PT		RSTD		16-EN		RSTD	
Näyte	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44	$\delta^{13}\text{C}$	Amp 44
M2E	-24,40	610	-30,15	1569	-24,28	802	-30,21	1347
Seka-0	-23,16	960	-30,10	1302	-23,64	1463	-30,26	1404
N2B	-22,45	1230	-29,82	1134	-23,30	1013	-30,26	1382
M4E	-22,72	358	-30,39	1304	-23,68	769 *	-30,32	7170
M10A	-24,00	486	-30,25	1290	-24,35	1440	-30,15	1189
UBL	-22,85	358	-29,98	1277	-23,45	1448	-30,44	1171
QC	-19,31	1188	-29,86	1144				

*näytettä oli konsentroitua haihduttamalla pienempään tilavuuteen ennen uusintainjektiota.