



Miia Marin

# Cut-off-tason määrittäminen tietyille kvantitoitaville yhdisteille dopinganalytiikassa LC-MS/MS- ja LC-Q-TOF-MS-menetelmillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

22.11.2024

## Tiivistelmä

Tekijä:	Miia Marin
Otsikko:	Cut-off-tason määrittäminen tietyille kvantitoitaville yhdisteille dopinganalytiikassa LC-MS/MS- ja LC-Q-TOF-MS-menetelmillä
Sivumäärä:	43 sivua + 5 liitettä
Aika:	22.11.2024
Tutkinto:	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Kemisti Laura Harju Laboratoriopäällikkö Tina Suominen Lehtori Kari Raatikainen

---

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen dopingtestauslaboratoriolle. Työn tarkoituksena oli määrittää cut-off-tasot tietyille kvantitoitaville yhdisteille. Yhdisteet olivat efedriini, pseudoefedriini, metyylifedriini, norpseudoefedriini, morfiini, prednisoni, flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihapo ja 4-kloorifenoksisietikkahappo.

Dopinganalytiikassa näytteistä tehdään ensiksi seulonta-analyysit, joiden avulla suuresta näytemäärästä erotetaan mahdollisesti positiiviset näytteet. Jos näyte osoittautuu seulonnassa positiiviseksi, siitä tehdään vielä varmistusanalyysi. Varmistusanalyysin avulla varmistetaan positiivinen tulos. Tietyille yhdisteille voidaan kuitenkin määrittää seulontamenetelmään cut-off-taso, jonka alle jäävistä pitoisuuksista ei tarvitse tehdä varmistusanalyysiä, vaan tulos on suoraan negatiivinen.

Työn toteutuksessa näytteet valmistettiin yhdisteiden threshold- ja MRL-tasolle sekä käsiteltiin seulonta- ja varmistusmenetelmillä. Menetelmät sisälsivät laimentamista, hydrolyyseja, SPE-uuttoja sekä neste-nesteuuttoja. Esikäsittelyjen jälkeen näytteet analysoitiin LC-MS/MS- ja LC-Q-TOF-MS-laitteistoilla.

Cut-off-tasot saatiin määritettyä onnistuneesti jokaiselle yhdisteelle. Efedriinille cut-off-tasoksi saatiin 5,0  $\mu\text{g/ml}$ , pseudoefedriinille 75,0  $\mu\text{g/ml}$ , metyylifedriinille 5,0  $\mu\text{g/ml}$ , norpseudoefedriinille 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , morfiinille 500,0  $\text{ng/ml}$ , prednisonille 200,0  $\text{ng/ml}$ , flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihapolle 10,0  $\text{ng/ml}$  ja 4-kloorifenoksisietikkahapolle 3,0  $\mu\text{g/ml}$ .

THL:n dopingtestauslaboratorio ottaa tulokset käyttöönsä. Jatkossa näytteiden analysointi on hieman nopeampaa, koska varmistusanalyysiä ei tarvitse tehdä seulontatuloksen ollessa cut-off-tason alapuolella.

Avainsanat: dopinganalytiikka, LC-MS/MS, LC-Q-TOF-MS, cut-off-tasot

---

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

## Abstract

Author: Miia Marin  
Title: Determining the Cut-off-level for Specific Quantifiable Compounds in Doping Analytics Using LC-MS/MS and LC-Q-TOF-MS Methods  
Number of Pages: 43 pages + 5 appendices  
Date: 22 November 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services  
Degree Programme: Laboratory Sciences  
Instructors: Laura Harju, Chemist  
Tina Suominen, Head of the Laboratory  
Kari Raatikainen, Senior Lecturer

---

This thesis study was conducted for the Doping Control Laboratory of the Finnish Institute for Health and Welfare. The purpose of the study was to determine the cut-off-levels for certain quantifiable compounds. The compounds were ephedrine, pseudoephedrine, methylephedrine, norpseudoephedrine, morphine, fluticasone propionate 17 $\beta$ -carboxylic acid, and 4-chlorophenoxyacetic acid.

In doping analytics, the samples are first analyzed using screening methods, which are used to separate potentially positive samples from a large batch. If the sample is positive in the screening, a confirmatory test is performed to verify the result. However, for certain compounds, the cut-off-levels can be defined for the screening method, below which the concentrations do not require a confirmatory test, and the result is directly negative.

In this study, the samples were prepared at the threshold and MRL levels of the compounds and processed using screening and confirmatory methods. These methods included dilution, hydrolyses, SPE extractions, and liquid-liquid extractions. After sample pre-treatments, the samples were analyzed using LC-MS/MS and LC-Q-TOF-MS instrumentation.

Cut-off-levels were successfully determined for each compound. The cut-off-levels obtained were 5.0  $\mu\text{g/ml}$  for ephedrine, 75.0  $\mu\text{g/ml}$  for pseudoephedrine, 5.0  $\mu\text{g/ml}$  for methylephedrine, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  for norpseudoephedrine, 500.0  $\text{ng/ml}$  for morphine, 200.0  $\text{ng/ml}$  for prednisone, 10.0  $\text{ng/ml}$  for fluticasone propionate 17 $\beta$ -carboxylic acid, and 3.0  $\mu\text{g/ml}$  for 4-chlorophenoxyacetic acid.

THL's doping control laboratory takes the results into use. In the future, sample analysis will be slightly faster, as confirmatory test will no longer be required when the screening result is below the cut-off-level.

Keywords: doping analytics, LC-MS/MS, LC-Q-TOF-MS, cut-off-levels

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Dopingaineet	2
2.1	Dopingtestaus	3
2.2	Dopinganalyysin kulku	4
3	Kielletyt aineet	5
3.1	Luokka S6 – Piristeet	5
3.2	Luokka S7 – Huumaavat kipulääkkeet	7
3.3	Luokka S9 – Glukokortikoidit	8
4	Nestekromatografia-massaspektrometria	8
4.1	Nestekromatografia	9
4.2	Massaspektrometria	9
4.2.1	Sähkösumutusionisaatio	10
4.2.2	Tandemmassaspektrometria	10
4.2.3	Lentoaika-massa-analysaattori	11
5	Käytetyt reagenssit ja muut tarvikkeet	12
6	Näytteiden käsittely	13
6.1	Näytteiden valmistus	14
6.2	Kvalitatiiviset seulonta-analyysit	16
6.3	Kvantitatiiviset varmistusanalyysit	18
7	Näytteiden analysointi	20
7.1	Laitteen toimintakunnon tarkastaminen	20
7.2	Käytetyt menetelmät ja parametrit	20
8	Tulokset	23
8.1	Efedriini	24
8.2	Pseudoefedriini	26
8.3	Metyyliefedriini	30

8.4	Norpseudoefedriini	32
8.5	Morfiini	33
8.6	Prednisoni	36
8.7	Flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo	38
8.8	4-kloorifenoksietikkahappo	39
9	Lopuksi	40

	Lähteet	41
--	---------	----

#### Liitteet

Liite 1: Kontrollinäytteiden ja sisäisten standardien tiedot

Liite 2: Nollavirtsojen tiedot

Liite 3: Menetelmien gradienttiohjelmat

Liite 4: Menetelmien massa-asetukset

Liite 5: Kvantitointimenetelmien kalibrointisuorat

## Lyhenteet

- 4-CPA: *4-Chlorophenoxyacetic acid*. 4-kloorifenoksietikkahappo.
- EPO: Erytropoietiini. Ihmisen luonnollinen hormoni.
- ESI: *Electrospray ionization*. Sähkösumutusionisaatio.
- IAAF: *International Association of Athletics Federations*. Yleisurheilun kansainvälinen kattojärjestö.
- ISTD: *Internal standard*. Sisäinen standardi.
- KOK: Kansainvälinen olympiakomitea.
- LC-MS/MS: *Liquid chromatograph-tandem mass spectrometer*. Nestekromatografi-tandemmassaspektromeri.
- LC-Q-TOF-MS: *Liquid chromatograph quadrupole time-of-flight mass spectrometer*. Nestekromatografi-kvadrupoli-lentoaika-massaspektrometri.
- M: *Morphine*. Morfiini
- M3G: *Morphine-3-glucuronide*. Morfiini-3-glukuronidi.
- M6G: *Morphine-6-glucuronide*. Morfiini6-glukuronidi.
- MRL: *Minimum reporting limit*. Vähimmäisraportointiraja.
- m/z: *Mass-to-charge ratio*. Massa-varaus-suhde.
- QC: *Quality control*. Laatuksentrolli.
- SPE: *Solid Phase Extraction*. Kiinteäfaasiuutto.

SUEK: Suomen urheilun eettinen keskus.

THL: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

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

## 1 Johdanto

Dopingvalvontaa on tehty maailmassa jo vuodesta 1928 lähtien. Dopingvalvonta alkoi, kun Kansainvälinen yleisurheiluliitto (IAAF) kokosi listan aineista, jotka parantavat urheilijan suorituskykyä. Ensimmäiset dopingtestit tehtiin kuitenkin vasta vuonna 1966. Suomessa ensimmäisiä säännöksiä ja listoja dopingaineisiin liittyen alettiin laatia 1980-luvulla ja Kansainvälinen olympiakomitea (KOK) hyväksyi Suomen ensimmäisen dopingtestauslaboratorion vuonna 1983. Nykyään dopingvalvontaa kansainvälisesti kontrolloi Maailman antidopingtoimisto (WADA) ja kansallisesti Suomen urheilun eettinen keskus (SUEK). [1.]

Opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeuskemistiikan dopingtestauslaboratoriossa. Dopingtestauslaboratorio on saanut WADAn akkreditoinnin ja se noudattaa myös SFS-EN ISO/IEC 17025 -akkreditointia. Dopingtestauslaboratorio tekee yhteistyötä WADAn, SUEKin ja eri lajiliittojen kanssa. Laboratorion tehtävänä on analysoida dopingnäytteitä ja osallistua tutkimustoimintaan. [2.]

Opinnäytetyössä määritettiin ns. cut-off-tasot tietyille kvantitoitaville yhdisteille. Kyseiset yhdisteet olivat efedriini, pseudoefedriini, metyyli-fedriini, norpseudoefedriini, morfiini, prednisoni, flutikasonipropionaatti  $17\beta$ -karboksyylihappo ja 4-kloorifenoksisietikkahappo eli 4-CPA.

Dopinganalytiikassa näytteet analysoidaan ensiksi kvalitatiivisella seulontamenetelmällä, jolloin löydetään mahdolliset positiiviset näytteet. Seulontamenetelmästä saadun tuloksen ollessa positiivinen näytteestä tehdään myös varmistusanalyysi. Dopingtestauslaboratorio voi kuitenkin määrittää jokaiselle yhdisteelle seulontamenetelmään cut-off-tason, jonka alle jääviä pitoisuuksia ei tarvitse erikseen varmistaa varmistusanalyysillä, vaan tulos voidaan raportoida negatiivisena. Näin voidaan nopeuttaa näytteiden analysointia ja vähentää laboratorion työmäärää.

Cut-off-tasojen määrittäminen perustuu WADAn ohjeisiin. WADA on teknisessä dokumentissaan (TD2022DL) määrittänyt tietyille yhdisteille ns. threshold-tason. Threshold-taso on yhdistekohtainen raja-arvo, jonka ylittävät pitoisuudet raportoidaan positiivisena ja alle jäävät pitoisuudet negatiivisena. Threshold-tasoja käytetään apuna cut-off-tasojen määrittämisessä.

Joillekin yhdisteille WADA on määrittänyt vähimmäisraportointirajan (eng. minimum reporting level, MRL), jonka alle jääviä pitoisuuksia ei raportoida ollenkaan. Myös tällaisille yhdisteille voidaan määrittää seulontamenetelmään cut-off-taso.

Opinnäytetyössä näytteet valmistettiin yhdisteiden threshold- ja MRL-tasoilla ja käsiteltiin seulonta- sekä varmistusmenetelmillä. Menetelmissä näytteet käsiteltiin laimentamalla, kiinteäfaasiuutolla ja neste-neste-uutolla. Näytteet analysoitiin nestekromatografi-tandemmassaspektrometrillä (LC-MS/MS) ja nestekromatografi-kvadrupoli-lentoaika-massaspektrometrillä (LC-Q-TOF-MS).

## **2 Dopingaineet**

Doping tarkoittaa yksinkertaisesti selitettynä yhtä tai useampaa dopingrikkomusta. Dopingrikkomuksiin kuuluvat mm. kiellettyjen aineiden tai menetelmien löytyminen urheilijan näytteestä, yritys käyttää kiellettyä menetelmää tai ainetta, näytteiden manipulointi tai sen yritys, dopingtestistä kieltäytyminen sekä kiellettyjen aineiden hallussapito ja niiden välittäminen. [3.]

Yleisimpiä dopingaineita ovat anaboliset steroidit, erilaiset piristeet, diureetit, peiteaineet, huumausaineet ja peptidihormonit. Anabolisilla steroideilla voidaan vaikuttaa mm. lihaskasvuun ja palautumiseen. Piristeitä käytetään urheilijan jakamisen parantamiseen ja väsymyksen estämiseen. Diureetit ja peiteaineet poistavat kehosta nesteitä ja tällä tavalla voidaan piilottaa huumeiden käyttöä. Huumausaineita voidaan käyttää peittämään vammojen ja väsymyksen aiheuttamaa kipua. Peptidihormoneista yleisin on erytropoietiini (EPO), joka vaikuttaa urheilijan voimatasoihin ja punasolujen määrään. [4.]

Dopingiksi lasketaan myös kiellettyjen dopingmenetelmien käyttö, joita ovat esimerkiksi geeni- ja veridoping. Geenidopingilla tarkoitetaan nukleiinihapposekvenssien muuntamista sekä geenimuunneltujen solujen hyödyntämistä suorituskyvyn parantamisessa. Geenidopingissa urheilijan kehosta poistetaan haluttu solu, se muokataan laboratoriossa halutunlaiseksi ja siirretään takaisin urheilijaan. [5.] Veridopingissa verta poistetaan ihmisen kehosta ja myöhemmin injektoidaan takaisin, jotta veren happipitoisuus saadaan korkeammaksi [4].

WADAn ylläpitämästä *Kielletyt aineet ja menetelmät urheilussa* -listasta voi tarkistaa, mitkä kaikki aineet ja yhdisteet luetaan dopingaineiksi [6]. Listassa on noin 300 erilaista ainetta. Aineet on jaettu ryhmiin sen mukaan, onko kyseinen aine kielletty aina vai ainoastaan kilpailujen aikana tai vain tietyssä lajissa. Aineet on jaettu myös alaryhmiin niiden vaikutusten ja ominaisuuksien mukaan. [7.]

Myös SUEK ylläpitää listaa kielletyistä aineista. SUEKilla on myös KAMU-lääkehaku, josta urheilija voi tarkistaa, sisältääkö jokin tietty lääkevalmiste kiellettyjä aineita. Urheilija on itse vastuussa mahdollisesta dopingrikoksesta, mikäli hänen näytteestään löytyy dopingiksi luokiteltavia aineita. [7.]

## 2.1 Dopingtestaus

Suomessa urheilijoilta dopingnäytteitä ottavat SUEK, WADA ja kansainväliset lajiliitot. Kansalliset lajiliitot puolestaan voivat tilata SUEKilta dopingtestejä. Dopingtestaukselle on tarkasti määritellyt vaatimukset, jotka WADA on laatinut. Dopingtestit ovat joko virtsa- tai verinäytteitä, ja niitä otetaan kilpailukaudella sekä kauden ulkopuolella. Urheilijan pitää olla testaajan tavoitettavissa, sillä testi voidaan ottaa milloin ja missä tahansa. Kilpailutesti otetaan kilpailutapahtuman yhteydessä. Kilpailutestinäytteistä tutkitaan kaikki tunnetut dopingaineet ja mahdollinen näytteen manipulointi. Kilpailun ulkopuolisista näytteistä analysoidaan mm. peiteaineet, diureetit, peptidihormonit, anaboliset aineet ja kasvutekijät. [8.]

Dopingnäytteet ovat enimmäkseen virtsanäytteitä. Testaustilanteessa urheilija antaa yhden virtsanäytteen, joka jaetaan kahteen eri näytepulloon (nk. A- ja B-näyte). Testattava urheilija tarkistaa, että pullojen koodit täsmäävät ja ne ovat muutoinkin asianmukaisia. Tämän jälkeen pulloet sinetöidään kuvan 1 mukaisesti.



Kuva 1. Urheilijan A- ja B-näytteet sinetöidyissä näytepulloissa [9].

Urheilijoista otetaan jonkin verran myös verinäytteitä. Verinäytteet voivat olla laskimoverta tai ns. kuivaverinäytteitä. Verinäytteiden avulla voidaan tunnistaa kasvuhormonien ja veren manipulointiin liittyvien aineiden käyttö. [8.] Näytteiden ottamisen jälkeen näytteet pakataan ja kuljetetaan asianmukaisesti dopingtestauslaboratorioon analysoitavaksi.

## 2.2 Dopinganalyysin kulku

Pakatut näytteet kuljetetaan WADAn akkreditoimaan dopingtestauslaboratorioon analysoitavaksi. Näytteiden kuljetuksesta vastaa joko kuriiri tai dopingtestausorganisaatio. Kuljetusta valvotaan valvontalomakkeella. Laboratorion vastaanotossa näytelaukut ja niiden sisältö tarkistetaan. Näytelaukkujen vastaanottaja tarkistaa jokaisen sinetin ehjyyden ja tietojen täsmävyuden. A-näytepullo avataan analyysijä varten, B-pulloa ei avata, mutta se säilötään asianmukaisesti mahdollista B-analyysiä varten. [10.] Näytteiden vastaanotossa virtsanäytteistä tarkastetaan niiden väri ja sakkaisuus, mitataan pH sekä kirjataan ominaispaino ylös. Näillä tavoilla voidaan havaita mahdollinen näytteen manipulointi tai väärentäminen. [11, s. 19.]

Jokaisesta A-näytteestä tehdään ensiksi ns. seulonta-analyysi, jonka tarkoituksena on havaita mahdollinen positiivinen tulos. Seulontamenetelmät perustuvat yleensä kromatografia-massaspektrometriaan tai immunologisiin testeihin. Menetelmistä on pyritty kehittämään mahdollisimman herkkiä, selektiivisiä ja nopeita. Seulontamenetelmiä on muutamia erilaisia, ja kemiallisesti samankaltaisia yhdisteitä pyritään seulomaan keskenään samoilla menetelmillä. Seulonta-analyysien haasteena on kuitenkin näytemäärän rajallisuus ja kiellettyjen aineiden laaja kirjo. [10.]

Jos näyte todetaan seulonta-analyysissä positiiviseksi, tulos varmistetaan varmistusanalyysilla. Varmistusanalyysissa käytetään spesifisempää menetelmää kuin seulonnassa. Myös varmistusanalyysi tehdään A-näytteestä. Laboratorio avaa B-näytteen vain dopingtestausorganisaation erillisestä pyynnöstä. A-näytteen ollessa positiivinen urheilijalla tai dopingtestausorganisaatiolla on halutesaan oikeus vaatia B-näytteen analysointia, sekä tulla seuraamaan analyysiä laboratorioon. [10; 11, s. 24.]

### **3 Kielletyt aineet**

Tässä opinnäytetyössä tutkittavat yhdisteet luokitellaan dopingaineiksi. Efedriinit ja 4-CPA kuuluvat luokkaan S6. Luokassa S6 olevat yhdisteet ovat piristeitä. Prednisoni ja flutikasonipropionaatti  $17\beta$ -karboksyylihappo kuuluvat luokkaan S9, eli ne ovat glukokortikoideja. Morfiini puolestaan luetaan huumaavaksi kipulääkkeeksi, ja se kuuluu ryhmään S7. [12.]

#### **3.1 Luokka S6 – Piristeet**

Piristeet ovat sellaisia yhdisteitä, jotka lisäävät urheilijan vireystilaa. Ne vaikuttavat keskushermoston kautta ja vähentävät väsymystä. WADAn tilastojen mukaan noin 15 % positiivisista dopingtuloksista johtuu piristeiden käytöstä. S6-luokkaan kuuluvat yhdisteet ovat kiellettyjä kilpailuissa, mutta eivät kilpailujen ulkopuolella. [7.]

Efedriini on luonnollinen amiini, ja sen rakenne on samankaltainen amfetamiinin kanssa. Efedriiniä käytetään hillitsemään ruokahalua ja avaavana lääkkeenä nuhan ja allergioiden hoidossa. Efedriini on kielletty vain, jos virtsan efedriinipitoisuus on yli 10 µg/ml. [13.]

Pseudoefedriini on lääke, jota käytetään lievittämään mm. poskiontelotulehduksen, keuhkoputkentulehduksen ja astman oireita. Pseudoefedriiniä käytetään myös vähentämään ruokahalua ja auttamaan painonpudotuksessa. Myös pseudoefedriini muistuttaa rakenteeltaan amfetamiinia, minkä takia sitä käytetään myös ei-lääketieteellisiin tarkoituksiin. [14.] Pseudoefedriini luetaan kielletyksi aineeksi pitoisuuden ollessa yli 150 µg/ml.

Metyyliefedriini on efedriinin kaltainen keskushermoston kautta vaikuttava aine. Metyyliefedriini laajentaa keuhkoputkia, ja sitä käytetäänkin flunssaoireiden hoidossa. Myös metyyliefedriini luokitellaan kielletyksi vain pitoisuuden ollessa yli 10 µg/ml. [13.]

Norpseudoefedriini tunnetaan myös nimellä katiini. Se on psykoaktiivinen aine, ja sillä on piristäviä vaikutuksia. Norpseudoefedriini muistuttaa läheisesti efedriiniä ja muita amfetamiinijohdannaisia. Norpseudoefedriiniä käytetään esimerkiksi painonpudotuksessa hillitsemään ruokahalua. Norpseudoefedriiniä on myös monissa reseptivapaissa yskänlääkkeissä ja nenäsumutteissa. [15.] Norpseudoefedriinin esiintyminen virtsassa sallitaan pitoisuuden ollessa alle 5 µg/ml.

4-kloorifenoksietikkahappo eli 4-CPA on meklofenoksaatin ja klorofenesiinin pääasiallinen metaboliitti. Dopinganalytiikassa käytetään joidenkin tutkittavien aineiden kohdalla niiden metaboliitteja ns. kohdeyhdisteinä, koska metaboliitit ovat sopivampia analyttisiin tarkoituksiin. 4-CPA on valittu kohdeyhdisteeksi, kun halutaan tutkia meklofenoksaatin käyttöä. 4-CPA:n löytyminen virtsanäytteestä voi johtua meklofenoksaatin tai 4-CPA:ta sisältävien elintarvikkeiden käytöstä. On myös tutkittu, että klorofenesiiniä sisältävien voiteiden ja

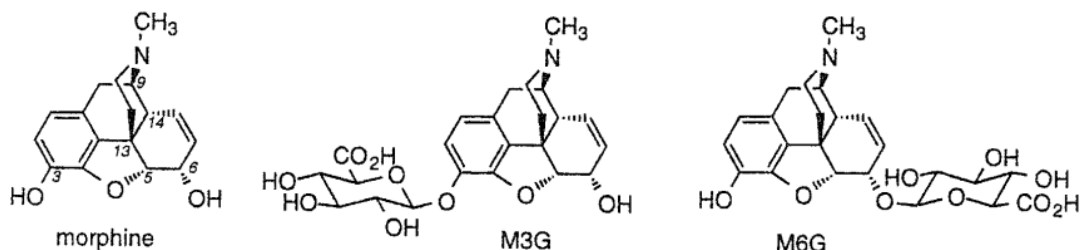
kosmetiikkatuotteiden käyttö voi aiheuttaa 4-CPA:n esiintymistä virtsassa. [16; 17.] 4-CPA on kielletty pitoisuuden 5 µg/ml yläpuolella.

### 3.2 Luokka S7 – Huumaavat kipulääkkeet

Huumaavat kipulääkkeet ovat vahvoja lääkkeitä, joita käytetään lievittämään kipua loukkaantumisten ja leikkauksien jälkeen. Niillä on huumaava vaikutus, minkä takia niitä käytetään myös huumausaineina. Huumaavan vaikutuksen ansiosta lääkkeet vähentävät urheilussa syntyvää väsymyksen tunnetta, minkä seurauksena urheilijan suorituskyky ja jaksaminen paranee. Huumaavien kipulääkkeiden käyttö on kielletty vain kilpailujen aikana. [7.]

Morfiini luokitellaan huumaavaksi kipulääkkeeksi ja se koostuu viidestä renkaasta. Morfiinin rakenne on jäykkä, mutta fenoliryhmä ja sekundaarinen alkoholiryhmä yhdistettynä aminoryhmään tekee morfiinista kemiallisesti aktiivisen. [18.] Morfiini on kielletty vain virtsan morfiinipitoisuuden ollessa yli 1 µg/ml.

Ihmisen elimistössä morfiini metaboloituu erilaisiksi metaboliatuotteiksi, suurimmaksi osaksi glukuronidikonjukaateiksi. Vapaa morfiini (M) metaboloituu pääasiassa morfiini-3-glukuroniksi (M3G) ja morfiini-6-glukuronidiksi (M6G). Näiden lisäksi syntyy pieniä määriä muita metaboliitteja, kuten morfiini-3,6-diglukuronidia ja normorfiinia. Noin 50 % vapaasta morfiinista muuntuu M3G-muotoon ja noin 10 % muuttuu muotoon M6G. Loput noin 40 % jää vapaaksi morfiiniksi. [18; 19.] Kuva 2 havainnollistaa morfiinin ja sen glukuronidien kemiallista rakennetta.



Kuva 2. Morfiinin, morfiini-3-glukuronidin ja morfiini-6-glukuronidin kemialliset rakennekaavat [18].

### 3.3 Luokka S9 – Glukokortikoidit

Glukokortikoidien käytöllä voidaan parantaa urheilijan rasituskestävyyttä ja vähentää tulehdusreaktioita. Niitä käytetään esimerkiksi reumasairauksien, allergioiden, astman ja ylirasitusvammojen hoidossa. Suurina annoksina glukokortikoideilla pystytään vähentämään väsymyksen tunnetta ja parantamaan urheilusuoritusta. Myös glukokortikoidit ovat kiellettyjä vain kilpailuissa. [7.]

Prednisonia käytetään immuunivälitteisten reaktioiden, tulehdusten ja erilaisten kasvaimia aiheuttavien sairauksien hoidossa. Prednisoni on glukokortikoidi, jota voidaan valmistaa kortisonista. Ihmisen elimistössä prednisoni muuttuu prednisononiksi. [20.] Prednisonin käyttö on kiellettyä pitoisuuden ollessa yli 300 ng/ml.

Flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo (lyh. flutikasonipropionaatti-M) on flutikasonipropionaatin metaboliitti. Se on farmakologisesti inaktiivinen ja todella vesiliukoinen. Tästä syystä flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo erittyy suurimmaksi osaksi virtsaan. Flutikasonipropionaatilla on tulehdusta ja astmat-tisia oireita vähentävää vaikutusta. Flutikasonipropionaatti metaboloituu todella nopeasti karboksyylihappo-derivaataksi. [21.] Flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo on kielletty pitoisuuden ollessa yli 30 ng/ml.

## 4 Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografia on analyttinen menetelmä, jota käytetään monipuolisesti erilaisissa laboratorioanalyysissä. Nestekromatografian tärkeimmät osat ovat automaattinen näytteensyöttäjä, ajoliuosten pumppausjärjestelmä, näytteen injektointiventtiili, kolonni ja detektor. Detektoriksi voidaan valita massaspektrometri, joka on tehokkain detektor kromatografista analyysiä varten. Massaspektrometrian ansiosta yhdisteistä saadaan sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista tietoa ja ne voidaan erottaa toisistaan, vaikka kromatografinen analyysi ei yksistään siihen pystyisi. [22, s. 668, 559.]

## 4.1 Nestekromatografia

Nestekromatografia (eng. liquid chromatography, LC) on yleinen analyysitekniikka laboratorioissa. Tekniikka soveltuu orgaanisten ja epäorgaanisten yhdisteiden analysointiin. Nestekromatografialla voidaan analysoida yhtäaikaaisesti monta eri yhdistettä ja tekniikka mahdollistaa suurien molekyylien, kuten proteiinien ja lääkeaineiden, analysoinnin. [23, s. 153.]

Nestekromatografiassa yhdisteiden erottuminen tapahtuu liikkuvan faasin ja stationäärifaasin välillä. LC:llä voidaan teoriassa analysoida kaikki sellaiset yhdisteet, jotka saadaan liukenemaan mihin tahansa liuottimeen. LC-laitteessa on injektori, jonka kautta näyte injektoidaan liikkuvaan faasiin. Liikkuvaa faasia eli eluenttia pumpataan tietyllä virtausnopeudella kolonnin läpi. Kolonni on täytetty stationäärifaasilla ja erottuminen tapahtuu, kun yhdisteet viiptyvät eri ajan liikkuvassa faasissa ja stationäärifaasissa. Yhdisteet, jotka pidättyvät stationäärifaasissa pidemmän ajan, kulkevat kolonnin läpi hitaammin kuin lyhyemmän aikaa pidättyvät yhdisteet. Erottumisen jälkeen yhdisteet havaitaan detektorin avulla. Detektor voi olla esimerkiksi massaspektrometri tai ultraviolettidetektor. [24, s. 171.]

## 4.2 Massaspektrometria

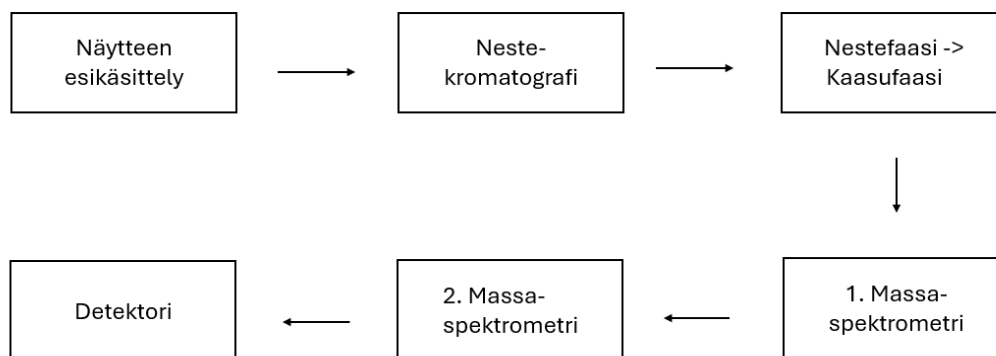
Massaspektrometria (eng. mass spectrometry, MS) on tarkka menetelmä, joka voidaan yhdistää kromatografiaan. Tällöin yhdisteiden erottelun ja kromatografisen analyysin tuottamat tiedot voidaan hyödyntää massa-analyysissä. Massaspektrometriassa tutkittavat yhdisteet ionisoidaan molekyyli-ioneiksi. Tällaisilla molekyyli-ioneilla on ylimääräistä energiaa, jonka vaikutuksesta molekyyli-ionit pilkkoutuvat massafragmenteiksi. Massaspektrometriassa nämä massafragmentit erotellaan toisistaan niiden massa-varaussuhteiden ( $m/z$ ) avulla. [23, s. 122.]

#### 4.2.1 Sähkösumutus-ionisaatio

Nestekromatografissa erottuneet yhdisteet pitää ionisoida, jotta ne voidaan analysoida massaspektrometrilla. Yksi yleisimmistä ionisointitekniikoista on sähkösumutus-ionisaatio (eng. electrospray ionization, ESI). ESI-tekniikka on pehmeä ionisointitekniikka ja sitä voidaan käyttää suurille ja termisesti labiileille yhdisteille. Nestekromatografista tuleva näyteliuos kuljetetaan korkeajännitteiseen kapillaariin, jossa muodostuu varautuneita pisaroita. Seuraavaksi varautuneista pisaroista poistetaan liuotin haihuttamalla. Liuottimen haihtuessa pisaran koko pienenee ja sen varaus kasvaa. Pisaran varauksen kasvettua tarpeeksi suureksi pisarat räjähtävät pienemmiksi ja varautuneiksi aerosolihiukkasiksi. Aerosolihiukkaset kuljetetaan massaspektrometriin analysoitavaksi. [25.]

#### 4.2.2 Tandemmassaspektrometria

Tandemmassaspektrometriassa (MS/MS) yhdistetään kaksi massa-analysaattoria. MS/MS-tekniikalla tutkittavista yhdisteistä saadaan tarkempaa tietoa kuin yksivaiheisella massa-analyysillä. MS/MS-tekniikka on hyvin spesifinen ja sen avulla on mahdollista tutkia epäpuhtaita ja monimutkaisia näytteitä. Ensimmäisessä massa-analysaattorissa valitaan ionilähteessä ionisoituneista ioneista prekursori-ioni, joka eristetään. Tässä vaiheessa kaikki ylimääräiset ja hyödyttömät ionit saadaan suodatettua pois. Prekursori-ionille tehdään haluttu reaktio, ja reaktiossa syntyneet tuoteionit kuljetetaan toiseen massa-analysaattoriin analysoitavaksi. [24, s. 116.] Kuvassa 3 on kuvattu näytteen kulkeutuminen LC-MS/MS-laitteiston läpi.



Kuva 3. Tutkittavien yhdisteiden ensimmäinen erottelu tapahtuu LC-laitteistossa, minkä jälkeen ionit siirretään nestefaasista kaasufaasiin. Toinen erottelu tapahtuu ensimmäisessä massa-analysaattorissa. Erottelun jälkeen ionit siirretään toiseen massa-analysaattoriin, jossa halutut ionit erotetaan muista ioneista ja havaitaan detektorin avulla [muokattu, 26].

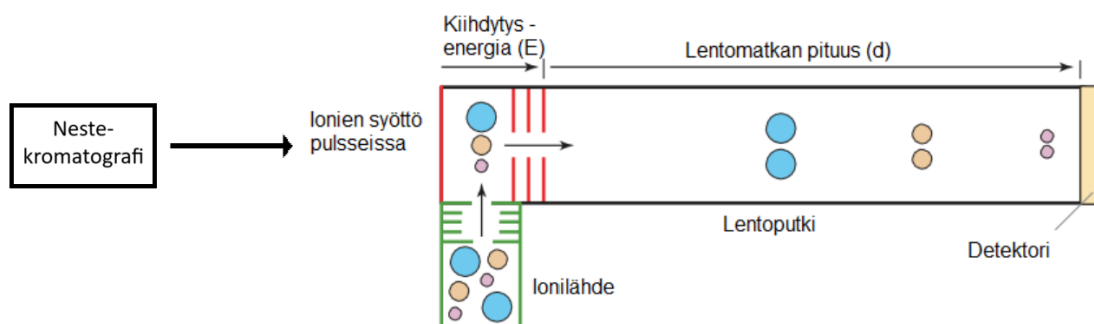
#### 4.2.3 Lentoaika-massa-analysaattori

Nestekromatografi voidaan yhdistää esimerkiksi kvadrupoli-lentoaika-massa-analysaattoriin (eng. quadrupole time-of-flight mass spectrometer, Q-TOF-MS). LC-Q-TOF-MS-tekniikassa nestekromatografissa erottuneet ja ionisoituneet yhdisteet kuljetetaan lentoaika-analysaattoriin. Lentoaika-analysaattorissa yhdisteet erottuvat toisistaan niiden  $m/z$ -suhteiden avulla [24, s. 39].

Nestekromatografisen erottelun ja ionisoinnin jälkeen yhdisteet kulkeutuvat ensiksi kvadrupoliin. Kvadrupoli on tietynlainen suodatin, joka päästää ioneja lävitseen niiden  $m/z$ -suhteiden perusteella. Kvadrupoliin asetetaan ensiksi tietty jännite, jolloin vain tietyn  $m/z$ -suhteen ionit pääsevät läpi. Kun jännitettä muutetaan, myös läpi pääsevien ionien  $m/z$ -suhde muuttuu. Näin voidaan tarkastella tiettyä  $m/z$ -aluetta. Kvadrupolin jälkeen ionit kuljetetaan lentoaika-analysaattoriin. [24, s. 27–28.]

Lentoaika-analysaattorissa ioneihin kohdistetaan sähköinen potentiaali, minkä seurauksena ionit alkavat liikkua kentättömässä alueessa. Ionit lähtevät

liikkeelle ionilähteestä ja kulkevat kentättömän alueen läpi detektorille. Tähän matkaan kuluvan ajan avulla voidaan määrittää ionin  $m/z$ -arvo. Lentoaika-analyssaattorissa mitataan siis aikaa, joka ioneilta kuluu ”lentämiseen” ionilähteestä detektorille. [24, s. 39.] Kuvassa 4 havainnollistetaan näytteen kulkeutumista LC-Q-TOF-MS-laitteistossa.



Kuva 4. Tutkittavien yhdisteiden ensimmäinen erottelu tapahtuu nestekromatografissa, jonka jälkeen ne ionisoidaan. Syntyneet ionit kuljetetaan pulsseina TOF-analysaattoriin. Kiihdytysenergian ansiosta ionit lähtevät kulkemaan kohti detektoria. Kevyimmät ionit saavuttavat detektorin nopeammin kuin suurimassaiset ionit [muokattu, 27].

## 5 Käytetyt reagenssit ja muut tarvikkeet

Työn toteutuksessa käytettiin puhtaita, LC-laatuksia kaupallisia reagensseja, jotka ovat peräisin eri valmistajilta. Lisäksi käytettiin laboratorion omia itsevalmistamia liuoksia. Liitteeseen 1 on koottu keskeisimmät tiedot käytetyistä kontrollinäytteistä ja sisäisistä standardeista. Varsinaisten näytteen valmistuksessa käytettiin taulukon 1 puhtasaineita.

Taulukko 1. Näytteiden valmistuksessa käytetyt puhdasaineet.

Puhdasaine	Valmistaja	Eränumero	Pitoisuus (mg/ml)
Efedriini	LGC	87250	1,0
Pseudoefedriini	Lipomed	775.1B0.1	1,0
Metyyliefedriini	Supelco	FN03232011	1,0
Norpseudoefedriini	LGC	85494	1,0
Vapaa morfiini	Cerilliant	FE08221801	0,1
M3G	Cerilliant	FE06011605	0,1
M6G	Cerilliant	FE07271601	0,1
Prednisoni	LGC	36668	1,0
Flutikasonipropionaatti-M	TRC	7-XSL-51-5	1,0
4-CPA	Sigma-Aldrich	BCBV4015	1,0

Reagenssien ja liuosten lisäksi työssä käytettiin muita yleisiä laboratoriotarvikkeita ja -laitteita, kuten automaattipipettejä, sentrifugeja, borosilikaattiputkia sekä LC-näytepulloja.

## 6 Näytteiden käsittely

Työn toteutus alkoi näytteiden valmistamisella, jonka jälkeen näytteille tehtiin tarvittavat käsittelyt. Näytteiden käsittelyä tarvitaan, jotta näyte saadaan analyysikelpoiseen muotoon. Yleisiä käsittelytekniikoita ovat esimerkiksi näytteiden liuottaminen, uuttaminen, konsentroiminen ja puhdistaminen. [22, s. 782.]

Näytteet käsiteltiin seulonta- ja varmistusmenetelmillä, jotka sisälsivät laimentamista, hydrolyysejä sekä uuttoja. Threshold-tason näytteet analysoitiin sekä seulonta- että varmistusmenetelmillä ja MRL-tason näytteet vain seulontamenetelmillä. MRL-näytteistä ei tehty varmistusmenetelmää, koska se ei ollut oleellinen cut-off-tasojen määrittämisen kannalta. Näytteiden analysointiin käytettiin LC-MS/MS- ja LC-Q-TOF-MS-laitteistoja.

Jokaisessa analyysisarjassa oli mukana kontrolli- ja nollanäytteitä. Nollanäytteiden avulla varmistetaan, että laitteessa ei ole kontaminaatioita eikä se anna vääriä positiivisia tuloksia. Kontrollinäytteillä (QC) varmistetaan, että laite pystyy antamaan positiivisen tuloksen. Kontrollinäytteillä pystytään myös arvioimaan laitteen toimintakykyä. Näytteiden käsittelyssä jokaiseen näytteeseen lisättiin sisäistä standardia (ISTD). Hyvä sisäinen standardi on kemiallisesti stabiili eikä se reagoi tutkittavien yhdisteiden kanssa. [22, s. 97,109.]

Näytteiden valmistuksessa käytettiin ominaisuuksiltaan erilaisia nollavirtsoja. Ne olivat erilaisia ominaispainoiltaan ja pH-arvoiltaan. Nollavirtsojen tarkemmat tiedot on esitetty liitteessä 2. Jokainen rinnakkainen näyte tehtiin eri nollavirtsaan.

## 6.1 Näytteiden valmistus

### Threshold-tason näytteet

Työssä valmistettiin 10 rinnakkaista näytettä jokaisesta taulukon 2 yhdisteestä. Näytteet tehtiin taulukossa näkyvällä threshold-tasolla sekä puolikkaalla threshold-tasolla. Jokaisesta yhdisteestä tehtiin omat 10 rinnakkaista näytettä, mutta metyylliefedriini ja norpseudofedriini yhdistettiin samoihin näytteisiin aika-  
taulusyistä.

Taulukko 2. Yhdisteet, joilla on WADAn määrittämä threshold-taso.

Yhdiste	Threshold-taso (µg/ml)
Efedriini	10,0
Pseudofedriini	150,0
Metyylliefedriini	10,0
Norpseudofedriini	5,0
Morfiini	1,0

Efedriininäytteet valmistettiin pipetoimalla 1 mg/ml kantaliuosta 10 µl ja lisäämällä 990 µl nollavirtsaa. Pseudoefedriini näytteisiin pipetoitiin 120 µl kantaliuosta (1 mg/ml) ja 680 µl nollavirtsaa. Metyyliefedriinin ja norpseudoefedriinin 1 mg/ml kantaliuokset piti ensiksi laimentaa pitoisuuteen 100 µg/ml. Metyyliefedriini-norpseudoefedriini näytteisiin pipetoitiin metyyliefedriinin laimennettua kantaliuosta 80 µl ja norpseudoefedriinin laimennettua kantaliuosta 40 µl sekä 680 µl nollavirtsaa. Kaikista näytteistä tehtiin vielä laimennos suhteessa 1:1, jotta näytteet voitiin analysoida myös puolikkaalla threshold-tasolla.

Morfiininäytteiden valmistuksessa piti ottaa huomioon morfiinin metabolia ja sen kautta syntyvät metaboliitit. Työssä cut-off-taso haluttiin määrittää kokonaismorfiinille, joten näytteiden valmistuksessa piti huomioida metaboliittien prosenttiosuudet. Näytteen konsentraatioksi haluttiin 1 µg/ml eli 1 000 ng/ml. Tästä vapaan morfiinin osuus on 40 % eli 400 ng/ml. M3G:n osuus on 500 ng/ml ja M6G:n osuudeksi jää 100 ng/ml. M3G:n ja M6G:n pitoisuudet pitää vielä kertoa kertoimella 1,6. Kerroin tulee morfiinin ja metaboliittien molekyyliainemassojen suhteesta 461,5 g/mol : 285,34 g/mol. Taulukossa 3 on esitetty metaboliittien osuudet, pitoisuudet ja laimennettujen kantaliuosten pipetoitavat määrät.

Taulukko 3. Morfiinin ja sen päämetaboliittien osuudet sekä laimennettujen kantaliuosten pipetoitavat määrät.

Yhdiste	Osuus (%)	Osuus (ng/ml)	Kantaliuos (µg/ml)	Pipetoitava määrä (µl)
M	40	400	10	40
M3G	50	800	10	80
M6G	10	160	10	16

Vapaan morfiinin, M3G:n, M6G:n alkuperäisistä kantaliuoksista (taulukko 1) tehtiin laimennos pitoisuuteen 10 µg/ml. Jokaista laimennettua kantaliuosta pipetoitiin samaan borosilikaattiputkeen yllä olevan taulukon mukaisesti ja lisättiin nollavirtsaa niin, että lopputilavuudeksi saatiin 1 ml. Tällä tavalla näytteiden kokonaismorfiinipitoisuudeksi saatiin 1 000 ng/ml.

Näytteistä tehtiin vielä laimennos, jotta saatiin puolet threshold-tasosta. Laimennos tehtiin pipetoimalla 400 µl 1 000 ng/ml näytettä ja lisäämällä 400 µl nollavirtsaa.

#### MRL-tason näytteet

Taulukossa 4 on esitetty yhdisteet, joilla on WADAn määrittämä MRL-taso. Myös näistä yhdisteistä valmistettiin 10 rinnakkaista näytettä kyseisellä MRL-tasolla.

Taulukko 4. Työssä käytetyt yhdisteet ja niiden MRL-tasot.

Yhdiste	MRL-taso
Prednisoni	300,0 ng/ml
Flutikasonipropionaatti 17β-karboksyylihappo	30,0 ng/ml
4-kloorifenoksetikkahappo (4-CPA)	5,0 µg/ml

Prednisoni näytteet valmistettiin pipetoimalla 7,5 µl laimennettua kantaliuosta (100 µg/ml) ja lisäämällä 2,5 ml nollavirtsaa. Flutikasonipropionaatti 17β-karboksyylihappo näytteet tehtiin pipetoimalla laimennettua 10 µg/ml kantaliuosta 7,5 µl ja lisäämällä 2,5 ml nollavirtsaa. 4-CPA näytteisiin lisättiin 12,5 µl kantaliuosta (1 mg/ml) ja 2,5 ml nollavirtsaa. Kaikki näytteet vorteksoitiin huolellisesti.

## 6.2 Kvalitatiiviset seulonta-analyysit

### Menetelmä D03

Efedriini-, pseudoefedriini-, metyylliefedriini-, norpseudoefedriini- ja morfiininäytteet analysoitiin seulontamenetelmällä D03. Näytteet käsiteltiin THL:n dopingtestauslaboratorion työhöjeen *Piristeiden ja muiden dopingaineiden "Dilute-and-shoot" seulonta, virtsa (D03, D0-172)* mukaisesti.

"Dilute and shoot" -menetelmä on yksinkertainen ja nopea näytteenkäsittelytekniikka ja sen suurimpia hyötyjä ovatkin helppous ja kustannustehokkuus.

Näytettä ainoastaan laimennetaan, jonka jälkeen se injektoidaan sellaisenaan LC-MS-laitteistoon. Menetelmää voidaan käyttää vähän proteiineja sisältäville näytteille, esimerkiksi virtsanäytteille. [28.]

Näytteitä pipetoitiin 100 µl suoraan sisäputkellisiin LC-näytepulloihin ja lisättiin 100 µl sisäistä standardia (ISTD). Näytteet vorteksoitiin hyvin ja sentrifugoitiin 1 200 G:ssä 5 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet analysoitiin LC-Q-TOF-MS-laitteistolla (Qarri).

### Menetelmä D01

Prednisoni- ja flutikasonipropionaatti 17β-karboksyylihaponäytteet analysoitiin seulontamenetelmällä D01. Menetelmällä analysoidaan neutraaleja, emäksisiä ja amfoteerisia dopingaineita. Työohjeena käytettiin dopingtestauslaboratorion ohjetta *Dopingaineiden (neutraalit, emäksiset ja amfoteeriset yhdisteet) nestekromatografis/tandemmassaspektrometrinen seulonta virtsasta (D01, DO-146)*.

Ensiksi näytteille tehtiin entsyymaattinen hydrolyysi. Borosilikaattiputkiin pipetoitiin 2 ml näytettä ja 20 µl ISTD-liuosta. Putket vorteksoitiin huolellisesti, minkä jälkeen niihin lisättiin 750 µl kalium/natrium-fosfaattipuskuria (0,8 M, pH 7) ja 25 µl *Escheria coli* -bakteerista eristettyä β-Glucuronidaasi-entsyymiä. Borosilikaattiputket vorteksoitiin uudestaan ja näytteitä inkuboitiin vesihauteella +50 °C:ssa yhden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen putket jäähdytettiin huoneenlämpöön ja niihin lisättiin 100 µl muurahaishappoa (100 %).

Entsyymaattisen hydrolyysin jälkeen näytteet uutettiin kiinteäfaasiuutolla. Kiinteäfaasiuutto (engl. solid phase extraction, SPE) on suosittu ja monipuolinen näytteenkäsittelytekniikka ja se soveltuu moneen eri tarkoitukseen. SPE-tekniikkaa voidaan käyttää mm. näytteen puhdistukseen, rikastukseen, derivatisointiin ja suolanpoistoon. SPE-tekniikassa analyyttien erottuminen tapahtuu kiinteän faasin ja nestefaasin välillä. Näyteliuos imeytetään hitaasti SPE-patruunan kiinteään faasiin, jotta kaikki halutut analyytit tarttuvat siihen. Kiinteäfaasi on valittu siten, että tutkittavat analyytit tarttuvat siihen mutta ylimääräiset analyytit eivät.

Ylimääräiset analyytit pestään pois sopivalla pesuliuksella. Pesujen jälkeen tutkittavat analyytit eluoidaan keräysputkeen oikeanlaisella eluointiliuksella. [29, s. 677–678.]

Kiinteäfaasiuutossa käytettiin Biotagen Pressure<sup>+</sup>48 -uuttolaitteistoa ja Phenomenex Strata Screen C -uuttopatruunoita, joissa on C8-faasi. Ensiksi SPE-patruunat aktivoitiin 0,5 ml:lla metanolia ja kunnostettiin 0,5 ml:lla 2-prosenttista muurahaishappoa. Näytteet siirrettiin uuttopatruunoihin ja imeytettiin hitaasti niiden läpi. Patruunoita pestiin 1 ml:lla 2-prosenttista muurahaishappoa, 1 ml:lla puhdasta laboratoriovettä (Milli-Q-vesi) ja 0,5 ml:lla 10-prosenttista metanolia. Pesujen jälkeen näytteet eluointiin hitaasti 2 ml:lla eluointiliuosta. Eluointiliuos sisälsi 5 %:a ammoniakkia, 50 %:a asetonitriiliä ja 50 %:a metanolia.

Kiinteäfaasiuuton jälkeen näytteet haihdutettiin kuiviin haihdutuslaitteistossa +45 °C:ssa typpivirran avulla ja haihdutusjäännös liuotettiin 100 µl:aan ajoliuosteosta (A: 90 %, B: 10 %). Ajoliuosten tarkemmat tiedot löytyvät luvusta 7.2. Putket vorteksoitiin ja näytteet siirrettiin sisäputkellisiin LC-näytepulloihin. Näytepullot sentrifugoitiin 1 200 G:ssä viiden minuutin ajan. Lopuksi näytteet analysoitiin LC-MS/MS-laitteistolla (Alma).

4-CPA-näytteet analysoitiin seulontamenetelmällä D02. Menetelmässä näytteiden käsittely tapahtui täysin samalla tavalla kuin menetelmässä D03 ja näytteet analysoitiin samalla LC-Q-TOF-MS-laitteistolla.

### 6.3 Kvantitatiiviset varmistusanalyysit

#### Efedriinin kvantitointimenetelmä

Efedriini-, pseudoefedriini-, metyylifedriini- ja norpseudoefedriininäytteet analysoitiin seulontamenetelmän jälkeen kvantitointimenetelmällä. Työohjeena käytettiin ohjetta *Efedriinit, kvantitointi, humanivirtsa (D0-54)*. Työssä käytettiin valmiiksi valmistettuja kalibrintiliuoksia tasoilla 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml ja 30 µg/ml. Lisäksi mukaan otettiin nollanäytteet ja

kontrollinäytteet. Nollanäytteistä tehtiin yksi määrittäminen. Kontrollinäytteet ja varsinaiset näytteet tehtiin kolmena rinnakkaisena määrittämisnäytteenä.

Näytteitä pipetoitiin LC-näytepulloon 50 µl ja lisättiin 1 475 µl sisäisen standardin työliuosta. Työliuos valmistettiin jokaisen sarjan yhteydessä pipetoimalla 300 µl ISTD-kantaliuosta ja lisäämällä 99 ml A-ajoliuosta sekä 6 ml B-ajoliuosta. Näytepulloja vorteksoitiin 30 sekuntia, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin viiden minuutin ajan 1 200 G:ssä. Näytteet analysoitiin LC-MS/MS-laitteella.

#### Morfiinin kvantitointimenetelmä

Seulonta-analyysin jälkeen morfiininäytteille tehtiin myös kvantitatiivinen analyysi. Näytteet käsiteltiin työhöjeen *Morfiini ja kodeiini, Kvantitointi, Humaanivirtsa (D0-115)* mukaisesti.

Työssä käytettyjen valmiiden kalibrointiliuosten pitoisuudet olivat 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1 000 ng/ml, 2 500 ng/ml ja 5 000 ng/ml. Kontrollinäyte MK-QC1000 tehtiin kolmena rinnakkaisena määrittämisnäytteenä, myös tutkittavista näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista määrittäystä. Nollanäytteet tehtiin vain yhtenä määrittämisnäytteenä.

Työ alkoi näytteiden laimentamisella. Jokaista näytettä pipetoitiin omiin borosilikaattiputkiinsa 100 µl ja lisättiin 900 µl Milli-Q-vettä. Putket vorteksoitiin huolellisesti. Laimennettuja näytteitä pipetoitiin uusiin putkiin 100 µl ja lisättiin 20 µl ISTD-työliuosta. ISTD-työliuos valmistettiin pipetoimalla 500 µl sisäisen standardin kantaliuosta ja 1 500 µl metanolia. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 5 mg kysteiniä ja 100 µl suolahappoa (37 %). Putket vorteksoitiin huolellisesti ja inkuboitiin kuivahauteessa +100 °C:ssa 90 minuuttia. Tätä vaihetta kutsutaan happohydrolyysiksi. Happohydrolyysissä morfiinin metaboliitit M3G ja M6G hydrolysoituvat eli palautuvat takaisin vapaaksi morfiiniksi. Näin ollen menetelmällä voidaan mitata suoraan kokonasmorfiinipitoisuutta eikä metaboliitteja tarvitse ottaa erikseen huomioon tulosten käsittelyssä. [19.]

Seuraavaksi putkiin pipetoitiin 2 ml kalium-fosfaattipuskuria (0,2 M, pH 6.5), jonka seurauksena hydrolyysireaktio loppui. Putkien annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi, jonka jälkeen niihin lisättiin 250 µl K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/KHCO<sub>3</sub>-liuosta (20 %), 240 µl kaliumhydroksidia (10 M), 1 ml kylläistä natriumkloridiliuosta ja 5 ml etyyliasettaattia. Putkia vorteksoitiin noin minuutin ajan ja sentrifugoitiin 5 minuuttia 1 000 G:ssä. Tämän jälkeen päällimmäiseksi muodostunut etyyliasettaattifaasi pipetoitiin uuteen putkeen ja haihdutettiin kuiviin haihdutuslaitteistossa +45 °C:ssa typpivirran avulla. Haihdutusjäynnös liuotettiin 1 ml:aan ajoliuosseosta (A: 95 %, B: 5 %). Ajoliuosten tiedot on esitetty luvussa 7.2. Näytteet siirrettiin LC-näytepulloihin ja analysoitiin LC-MS/MS-laitteistolla.

## 7 Näytteiden analysointi

### 7.1 Laitteen toimintakunnon tarkastaminen

Analyysilaitteet ovat päivittäin aktiivisessa käytössä ja niiden kuormitus on suurta. THL:n dopingtestauslaboratoriossa tehdään päivittäisiä ja viikoittaisia ylläpito- ja huoltotoimenpiteitä, jotta laitteet toimisivat mahdollisimman oikealla tavalla ja olisivat mahdollisimman pitkäikäisiä. Näin myös minimoidaan tilanteet, joissa laitteet antaisivat vääriä positiivisia tai negatiivisia tuloksia.

Päivittäisiin toimenpiteisiin kuuluu jäteastian tarkastaminen, ionilähteen puhdistaminen, pesu- ja ajoliuosten vaihto tarvittaessa, ajolinjojen huuhtelu sekä massan virityksen ja referenssihiukkien tarkastus. Viikoittaisia huoltotoimenpiteitä ovat ionilähteen ultraäänipuhdistus, ajoliuospullojen ja ajolinjojen huuhtelu metanolilla, öljytason tarkastus ja tietokoneiden päivittäminen. Näiden toimenpiteiden lisäksi laitteille tehdään ammattilaisten suorittamia vuosihuoltoja.

### 7.2 Käytetyt menetelmät ja parametrit

Taulukkoon 5 on koottu keskeisimmät tiedot käytetyistä menetelmistä. Kaikissa menetelmissä käytettiin samaa A-ajoliuosta, B-ajoliuoksessa oli hieman eroja riippuen menetelmästä. A-ajoliuos valmistettiin mittaamalla 50 ml ajoliuosten

kantaliuosta ( 2,5 mM ammoniumformiaatti, 0,1 % muurahaishappo) ja lisäämällä 950 ml Milli-Q-vettä. Menetelmän D01 B-ajoliuos sisälsi 25 ml ajoliuosten kantaliuosta ja 475 ml asetonitriliä. Menetelmissä D02, D03, Efedriini.kvant ja Morfiini.kvant käytettiin samaa B-ajoliuosta, joka valmistettiin mittaamalla 25 ml ajoliuosten kantaliuosta, 95 ml asetonitriliä ja 380 ml metanolia.

Taulukko 5. Käytettyjen menetelmien tiedot

Menetelmä	Laitteisto	Kolonne	Vir- taus- nopeus ( $\mu$ l/min)	Injek- tiotila- vuus ( $\mu$ l)	Kolon- niu- nin läm- pötila ( $^{\circ}$ C)
D01	LC-MS/MS	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm (1,8 $\mu$ m)	400	5	30
D02	LC-Q-TOF-MS	Restek Raptor Biphenyl 3.0 x 50 mm (2,7 $\mu$ m)	400	1	40
D03	LC-Q-TOF-MS	Restek Raptor Biphenyl 3.0 x 50 mm (2,7 $\mu$ m)	400	1	40
Efedriini.kvant.	LC-MS/MS	Restek Raptor Biphenyl 3.0 x 50 mm (2,7 $\mu$ m)	500	1	30
Morfiini.kvant.	LC-MS/MS	Restek Raptor Biphenyl 3.0 x 50 mm (2,7 $\mu$ m)	400	5	30

Liitteeseen 3 on koottu jokaisen menetelmän gradienttiohjelmat ja liitteeseen 4 menetelmien massa-asetukset. Näytteet analysoitiin kuvien 5 ja 6 laitteistoilla.



Kuva 5. Agilent Technologiesin mallin 6460 LC-MS/MS-laitteisto.



Kuva 6. Agilent Technologiesin mallin 6545 LC-Q-TOF-MS-laitteisto.

## 8 Tulokset

WADA on päättänyt, että threshold-yhdisteiden kohdalla laboratorio voi itse päättää cut-off-tason. Analyysien avulla todistetaan, että valittu cut-off-taso on riittävä ja oikeanlainen. Dopingtestauslaboratorio on valinnut, että threshold-yhdisteiden cut-off-taso on puolet niiden threshold-tasosta. MRL-yhdisteiden kohdalla cut-off-taso määritetään laskennallisesti.

Seulontamenetelmissä näytteiden pitoisuudet laskettiin jakamalla näytteen analyytin ja sen ISTD:n vasteiden suhde kontrollinäytteen analyytin ja sen ISTD:n vasteiden suhteella. Lopuksi tulos kerrottiin näytteen teoreettisella pitoisuudella (threshold- tai MRL-taso). Kvantitointimenetelmissä näytteiden pitoisuudet saatiin suoraan datankäsittelyohjelmistosta. Näytteistä tehtiin kuitenkin kolme rinnakkaista määrittystä, joten niistä laskettiin keskiarvot.

Threshold-tason näytteille laskettiin pitoisuudet seulonta- ja kvantitointimenetelmästä sekä bias eli poikkeama. MRL-tason näytteille cut-off-tasot laskettiin pitoisuuksien, keskiarvojen, keskihajontojen ja poikkeamien avulla.

## 8.1 Efedriini

Efedriininäytteet analysoitiin ensiksi seulontamenetelmällä ja sen jälkeen kvantitointimenetelmällä. Taulukossa 6 on vertailtu seulonta- sekä kvantitointimenetelmistä saatuja pitoisuuksia ja liitteessä 5 on esitetty kvantitointimenetelmästä saadut kalibrointisuorat.

Taulukko 6. Seulonta- ja kvantitointimenetelmästä saadut pitoisuudet efedriininäytteille pitoisuustasolla 5,0 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (µg/ml) Kvantitointimenetelmä
1	2,66	3,63
2	2,74	4,03
3	3,01	4,24
4	2,99	4,21
5	2,63	4,23
6	3,77	4,02
7	3,12	3,84
8	3,00	4,44
9	3,21	3,92
10	2,68	4,23
<b>Keskiarvo</b>	<b>2,98</b>	<b>4,08</b>

Taulukosta 6 nähdään, että seulontamenetelmästä saadaan matalampia pitoisuuksia kuin kvantitointimenetelmästä. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että kvantitointimenetelmä on tarkempi kuin seulontamenetelmä ja näin ollen myös lopullisissa tuloksissa on hieman eroja. Näytteiden teoreettinen pitoisuus on 5,0 µg/ml, molemmat menetelmät antavat kuitenkin pienempiä pitoisuuksia. Tämä voi johtua esimerkiksi siitä, että virtsamatriisien ominaisuudet voivat vaikuttaa efedriinin käyttäytymiseen virtsassa.

Kummastakin menetelmästä saatujen keskiarvojen avulla laskettiin poikkeama. Poikkeama tarkoittaa seulonta- ja varmistusmenetelmien välistä mittaustulosten keskiarvojen prosentuaalista eroa. Kaikkien threshold-näytteiden kohdalla poikkeama laskettiin kaavalla (1).

$$\text{Poikkeama} = \frac{\text{Pitoisuus (seulonta)} - \text{Pitoisuus (kvantitointi)}}{\text{Pitoisuus (kvantitointi)}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Näin ollen pitoisuustasolla 5,0 µg/ml poikkeamaksi saatiin -26,96 % ≈ -27,0 %. Taulukosta 7 puolestaan nähdään efedriininäytteiden pitoisuudet threshold-tasolla 10,0 µg/ml.

Taulukko 7. Efedriininäytteiden pitoisuudet kummassakin menetelmässä pitoisuustasolla 10,0 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (µg/ml) Kvantitointimenetelmä
1	7,37	6,79
2	7,21	7,34
3	7,41	7,69
4	7,70	7,95
5	7,05	8,01
6	11,58	7,43
7	8,14	7,26
8	8,11	8,35
9	9,01	7,84
10	7,22	8,59
<b>Keskiarvo</b>	<b>8,08</b>	<b>7,72</b>

Taulukosta 7 nähdään, että pitoisuustasolla 10,0 µg/ml seulontamenetelmä antaa korkeampia tuloksia kuin kvantitointimenetelmä. Näytteille laskettiin poikkeama aiemmin mainitulla tavalla, tulokseksi saatiin 4,66 % ≈ 4,70 %.

Poikkeama-arvojen tulee olla  $\geq -50\%$ , jotta valittu cut-off-taso on riittävä. Jos poikkeama-arvo olisi alle  $-50\%$ , valittu cut-off-taso ei olisi riittävä ja sitä pitäisi pienentää. Poikkeama ei saa olla alle  $-50\%$ , jotta mitään oleellisia ja merkittäviä pitoisuuksia ei jää varmistamatta seulonta-analyysin jälkeen.

Efedriinin threshold-tasolla ( $10,0\ \mu\text{g/ml}$ ) poikkeamaksi saatiin  $4,70\%$  ja puolikkaalla threshold-tasolla ( $5,0\ \mu\text{g/ml}$ ) poikkeamaksi laskettiin  $-27,0\%$ . Molemmat arvot täyttävät asetetut kriteerit ja näin ollen voidaan sanoa, että efedriinin cut-off-taso on puolet threshold-tasosta eli  $5,0\ \mu\text{g/ml}$ .

Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että seulontatuloksen ollessa alle cut-off-tason ( $5,0\ \mu\text{g/ml}$ ), varmistusanalyysiä ei tarvitse tehdä. Tulos on tällöin suoraan negatiivinen. Jos seulontatulos on cut-off-tason ja threshold-tason välissä ( $5,0\ \mu\text{g/ml} - 10,0\ \mu\text{g/ml}$ ), näytteestä tehdään varmistusanalyysi. Varmistusanalyysi tehdään myös tuloksen ollessa yli  $10,0\ \mu\text{g/ml}$ . Jos varmistusanalyysin jälkeen näytteestä saatu lopullinen tulos on alle  $10,0\ \mu\text{g/ml}$ , näyte raportoidaan negatiivisena. Vain threshold-tason yläpuolella olevat pitoisuudet luetaan positiivisiksi.

## 8.2 Pseudoefedriini

Pseudoefedriinistä tehtiin kaksi seulonta-analyysiä ja yksi kvantitointianalyysi. Ensimmäisessä seulonta-analyysissä huomattiin, että pitoisuudet  $150\ \mu\text{g/ml}$  ja  $75\ \mu\text{g/ml}$  ovat liian korkeita kontrollinäytteen pitoisuuteen sekä menetelmän mitausalueeseen verrattuna. Tästä syystä ensimmäinen seulonta-analyysi antoi suuresti vaihtelevia ja liian korkeita tuloksia (taulukko 8).

Ensimmäisen seulonnan jälkeen näytteet päätettiin laimentaa ja analysoida uudestaan. Pitoisuustasolla  $150\ \mu\text{g/ml}$  näytteet laimennettiin nollavirtsalla pitoisuuteen  $15\ \mu\text{g/ml}$ , minkä jälkeen ne käsiteltiin työohjeen mukaisesti (luku 6.2). Pitoisuustason  $75\ \mu\text{g/ml}$  näytteet käsiteltiin pipetoimalla  $10\ \mu\text{l}$  näytettä suoraan ensimmäisen seulonnan LC-näytepullosta ja lisäämällä  $90\ \mu\text{l}$  A-ajoliuosta.

Näytteille ei tehty seulontamenetelmän esikäsittelyä vaan analysoitiin sellaisenaan. Tällä tavalla tuloksista saatiin parempia.

Taulukko 8. Pseudoefedriininäytteiden ensimmäinen seulonta-analyysi.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Taso 75 µg/ml	Pitoisuus (µg/ml) Taso 150 µg/ml
1	207,83	732,24
2	205,77	184,92
3	156,37	190,52
4	159,05	210,62
5	158,78	558,21
6	162,40	522,36
7	249,06	826,84
8	193,77	825,05
9	215,37	280,92
10	166,64	531,99
<b>Keskiarvo</b>	<b>187,51</b>	<b>486,37</b>

Taulukosta 8 huomataan näytteiden pitoisuuksien olevan epäluotettavia. Tulokset eivät vastaa lainkaan oikeaa pitoisuutta.

Taulukossa 9 on laimennettujen pseudoefedriininäytteiden tulokset.

Taulukko 9. Laimennettujen näytteiden tulokset toisessa seulonta-analyysissä.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Taso 75 µg/ml	Pitoisuus (µg/ml) Taso 15 µg/ml
1	74,03	12,82
2	79,46	12,77
3	70,41	13,01
4	58,91	13,35
5	73,78	12,32
6	67,48	13,58
7	86,47	15,48
8	78,25	15,06
9	82,69	12,83
10	57,27	11,57
<b>Keskiarvo</b>	<b>72,88</b>	<b>13,28</b>

Taulukosta 9 nähdään, että nyt näytteiden tulokset ovat luotettavampia ja vastaavat paremmin teoreettisia pitoisuuksia.

Threshold-tason (150 µg/ml) näytteet päätettiin kuitenkin jättää pois kvantitointianalyysistä, koska pseudoefedriininäytteiden kohdalla käytettiin eri sisäistä standardia kuin muissa efedriinien kvantitointisarjoissa. Pseudoefedriininäytteille tehtiin oma ISTD soveltaen olemassa olevaa ISTD:n valmistusohjetta. Muissa sarjoissa ollutta oikeaa ISTD:tä ei pystytty käyttämään, koska se ei olisi riittänyt myöhempisiin kvantitointisarjoihin. Oikeaa ISTD:tä ei pystytty tekemään lisää, koska siihen tarvittavan pseudoefedriinin tilaus oli viivästynyt eikä aiempaa erää ollut enää jäljellä. Tästä huolimatta cut-off-taso voitiin määrittää pelkkien 75 µg/ml näytteiden perusteella. Taulukkoon 10 on koottu kvantitointimenetelmän tulokset ja liitteessä 5 on menetelmän kalibrointisuora.

Taulukko 10. Pitoisuustasolla 75 µg/ml olevien näytteiden tulokset kvantitointimenetelmästä.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml)
1	101,01
2	101,26
3	98,90
4	100,20
5	98,19
6	98,76
7	95,98
8	98,89
9	100,62
10	101,85
<b>Keskiarvo</b>	<b>99,57</b>

Efedriinin kvantitointimenetelmässä kalibrointisuoran pitoisuusalue oli 1–30 µg/ml, joten pseudoefedriininäytteet (75 µg/ml) piti laimentaa suhteessa 1:10. Laimennoskerroin otettiin huomioon tulosten käsittelyssä. Taulukosta 10 nähdään, että menetelmä antaa odotettua suurempia tuloksia. Syitä tähän voivat olla virtsamatriisien vaikutukset ja sisäisen standardin ominaisuudet. Sisäinen standardi oli valmistettu soveltaen vain tätä tarkoitusta varten, joten sen toimivuus pseudoefedriinille ei välttämättä ollut ihanteellinen.

Poikkeaman laskemiseen pitoisuustasolla 75 µg/ml käytettiin toisen seulonta-analyysin keskiarvoa 72,88 µg/ml ja kvantitointimenetelmän keskiarvoa 99,57. Näin ollen poikkeamaksi saatiin  $-26,81\% \approx -26,80\%$ .

Tulos on yli  $-50\%$ , joten pseudoefedriinin cut-off-tasoksi voidaan määrittää 75,0 µg/ml.

### 8.3 Metyyliefedriini

Metyyliefedriininäytteistä tehtiin seulonta- ja varmistusanalyysi. Taulukoihin 11 ja 12 on koottu metyyliefedriininäytteiden pitoisuudet seulonta- ja kvantitointimenetelmistä molemmilla pitoisuustasoilla. Kvantitointimenetelmän kalibrointisuorat on esitetty liitteessä 5.

Taulukko 11. Molemmista menetelmistä metyyliefedriininäytteille saadut tulokset pitoisuustasolla 5,0 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (µg/ml) Kvantitointimenetelmä
1	3,05	4,59
2	3,04	4,62
3	2,87	4,68
4	2,96	4,73
5	2,81	4,72
6	2,91	4,83
7	3,81	4,92
8	3,53	5,07
9	3,49	4,79
10	2,63	5,14
<b>Keskiarvo</b>	<b>3,11</b>	<b>4,81</b>

Taulukon 11 mukaan seulontamenetelmä antaa pienempiä pitoisuuksia kuin kvantitointimenetelmä. Pitoisuuksien vaihtelu seulonta- ja kvantitointimenetelmien välillä voi johtua esimerkiksi pipettien välisistä eroista. Kvantitointimenetelmiä tehdessä käytettiin tarkempia ja useammin kalibroituja pipettejä kuin seulontamenetelmissä.

Saatujen keskiarvojen avulla laskettiin poikkeama, jonka arvoksi saatiin  $-35,34\% \approx -35,30\%$ .

Taulukko 12. Metyyliefedriininäytteiden pitoisuudet threshold-tasolla 10,0 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (µg/ml) Kvantitointimenetelmä
1	8,26	9,63
2	7,85	8,98
3	7,90	9,30
4	8,14	9,70
5	6,96	9,54
6	7,78	9,92
7	10,17	9,87
8	9,02	9,85
9	9,27	9,97
10	7,46	10,47
<b>Keskiarvo</b>	<b>8,28</b>	<b>9,72</b>

Taulukosta 12 nähdään kvantitointimenetelmän antavan suurempia pitoisuuksia kuin seulontamenetelmä. Kvantitointimenetelmästä saadut tulokset ovat tarkempia ja luotettavampia, koska menetelmä on tehty pitoisuuksien määrittämiseen. Seulontamenetelmä puolestaan on tehty aineiden alustavaan havaitsemiseen näytteestä. Kvantitointimenetelmästä tarkemman tekee myös kuuden pisteen kalibrointi, kun taas seulontamenetelmässä kalibrointi tapahtuu yhden pisteen kautta. Pitoisuustasolla 10,0 µg/ml näytteiden poikkeamaksi saatiin –14,81 %  $\approx$  –14,80 %.

Metyyliefedriinin threshold-tasolla poikkeamaksi saatiin –14,80 % ja puolikkaalla threshold-tasolla poikkeama on –35,30 %. Molemmat arvot täyttävät kriteerit, joten metyyliefedriinin cut-off-tasoksi voidaan valita 5,0 µg/ml.

## 8.4 Norpseudofedriini

Myös norpseudofedriininäytteistä tehtiin seulonta- ja kvantitointimenetelmä. Norpseudofedriininäytteiden pitoisuudet on esitetty taulukoissa 13 ja 14, lisäksi liitteessä 5 on kvantitointimenetelmän kalibrointisuorat.

Taulukko 13. Norpseudofedriininäytteiden tulokset pitoisuustasolla 2,5 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (µg/ml) Kvantitointimenetelmä
1	0,95	1,75
2	1,02	1,73
3	0,86	1,60
4	0,87	1,70
5	0,88	1,73
6	0,70	1,66
7	1,30	1,73
8	1,17	1,96
9	1,15	1,64
10	0,78	1,85
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,97</b>	<b>1,74</b>

Taulukosta 13 huomataan, että seulontamenetelmä antaa huomattavasti pienempiä tuloksia kuin kvantitointimenetelmä. Syitä tähän voivat olla pipetoinnin epätarkkuus, norpseudofedriinin käyttäytyminen erilaisissa nollavirtsamatriiseissa sekä seulonta- ja kvantitointimenetelmien väliset erot. Seulontamenetelmä ja kvantitointimenetelmä on tehty myös eri laitteilla, joten laitteiden väliset erot voivat vaikuttaa tuloksiin. Poikkeamaksi pitoisuustasolla 2,5 µg/ml saatiin – 44,25 % ≈ – 44,30 %.

Taulukko 14. Molempien menetelmien antamat tulokset threshold-tasolla 5,0 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus ( µg/ml) Kvantitointimenetelmä
1	3,31	3,71
2	3,21	3,43
3	3,01	3,26
4	3,08	3,53
5	2,79	3,57
6	2,54	3,65
7	4,18	3,59
8	3,67	3,92
9	3,77	3,54
10	2,78	3,88
<b>Keskiarvo</b>	<b>3,24</b>	<b>3,61</b>

Taulukosta 14 huomataan, että norpseudofedriinin threshold-tasolla 5,0 µg/ml seulontamenetelmän ja kvantitointimenetelmän tulosten keskiarvot vastaavat lähes toisiaan. Poikkeamaksi saatiin  $-10,25\% \approx -10,30\%$ .

Kummankin pitoisuustason poikkeama-arvot ovat yli  $-50\%$ , joten norpseudofedriinin cut-off-tasoksi voidaan valita 2,5 µg/ml. Tulosten perusteella kyseinen taso on riittävä ja luotettava.

## 8.5 Morfiini

Morfiininäytteiden kohdalla morfiinin metabolia huomiotiin sekä näytteiden valmistuksessa, että tulosten käsittelyssä. Seulontamenetelmässä mitattiin erillisinä yhdisteinä vapaa morfiini, M3G ja M6G. Tästä syystä jokaisen metaboliitin pitoisuus laskettiin erikseen, jonka jälkeen pitoisuudet laskettiin yhteen. Näin saatiin määritettyä näytteen kokonaismorfiinipitoisuus.

Kvantitointimenetelmässä pystyttiin mittaamaan suoraan näytteiden kokonaismorfiinipitoisuudet. Taulukoissa 15 ja 16 on vertailtu menetelmistä saatuja pitoisuuksia morfiinin threshold-tasolla sekä puolikkaalla threshold-tasolla. Liitteessä 5 on kvantitointimenetelmän kalibroitisuorat.

Taulukko 15. Seulonta- ja kvantitointimenetelmistä pitoisuustasolla 500,0 ng/ml saadut pitoisuudet morfiininäytteille.

Näyte	Pitoisuus (ng/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (ng/ml) Kvantitointimenetelmä
1	391,94	425,43
2	446,36	438,30
3	408,81	433,72
4	383,11	478,54
5	442,35	477,38
6	393,90	484,84
7	458,86	431,62
8	408,46	446,16
9	461,73	460,25
10	366,94	462,72
<b>Keskiarvo</b>	<b>416,25</b>	<b>453,89</b>

Taulukosta 15 nähdään seulontamenetelmän antavan matalampia pitoisuuksia kuin kvantitointimenetelmä. Molemmat menetelmät antavat hieman alhaisempia tuloksia kuin teoreettinen pitoisuus 500,0 ng/ml. Pitoisuuksien pieni vaihtelu on kuitenkin normaalia. Poikkeama-arvoksi saatiin  $-8,29\% \approx -8,30\%$ .

Taulukko 16. Molempien menetelmien pitoisuudet morfiinin threshold-tasolla 1 000,0 ng/ml.

Näyte	Pitoisuus (ng/ml) Seulontamenetelmä	Pitoisuus (ng/ml) Kvantitointimenetelmä
1	1086,11	855,02
2	1113,87	884,79
3	1156,32	888,93
4	1076,93	913,51
5	1300,02	856,06
6	1051,33	883,37
7	1292,40	858,97
8	1114,55	796,60
9	1286,02	863,80
10	1082,17	940,19
<b>Keskiarvo</b>	<b>1155,97</b>	<b>874,12</b>

Taulukosta 16 nähdään, että tasolla 1 000,0 ng/ml seulontamenetelmä antaa korkeampia pitoisuuksia kuin kvantitointimenetelmä. Tämä on hyvä, koska tällöin näytteiden seulontavaiheessa mahdolliset positiiviset löydökset eivät jää huomaamatta. Poikkeamaksi saatiin 32,24 %  $\approx$  32,20 %.

Molemmilla pitoisuustasoilla poikkeama-arvot täyttävät kriteerit. Näin ollen tulosten perusteella voidaan todeta, että morfiinin cut-off-taso on 500,0 ng/ml ja se on analytiikan kannalta riittävä ja oikeanlainen.

## 8.6 Prednisoni

Prednisoninäytteet analysoitiin vain seulontamenetelmällä. Näytteille laskettiin pitoisuudet ja saadut tulokset on esitetty taulukossa 17.

Taulukko 17. Prednisoninäytteiden pitoisuudet MRL-tasolla 300,0 ng/ml.

Näyte	Pitoisuus (ng/ml)
1	530,35
2	449,84
3	581,84
4	503,54
5	553,96
6	584,51
7	575,99
8	503,04
9	465,79
10	500,73
<b>Keskiarvo</b>	<b>524,96</b>

Taulukosta 17 huomataan, että näytteiden pitoisuudet ovat huomattavasti korkeampia kuin MRL-taso 300,0 ng/ml.

Näytteistä laskettiin keskihajonta ja poikkeama. Poikkeama tarkoittaa mittausten keskiarvon ja MRL-tason välistä poikkeamaa. Nyt poikkeama laskettiin kaavalla (2).

$$\text{Poikkeama} = \text{Keskiarvo} - \text{MRL\_taso} \quad (2)$$

Keskihajonnaksi saatiin 48,22 ng/ml ja poikkeamaksi 224,96 ng/ml.

Cut-off-tasojen laskeminen perustuu WADAn ohjeisiin. Tässä tapauksessa näytteiden pitoisuus 524,96 ng/ml on yli MRL-tason, joten cut-off-taso lasketaan kaavalla (3).

$$\text{Keskiarvo} - (2 \cdot \text{Keskihajonta} + \text{Poikkeama}) \quad (3)$$

Näin ollen cut-off-taso prednisonille on 203,56 ng/ml  $\approx$  200,0 ng/ml. Tulos pyöristetään alaspäin, jotta merkittäviä pitoisuuksia ei jää varmistamatta. Jos näytteestä saatu tulos on alle cut-off-tason, varmistusanalyysiä ei tarvitse tehdä, ja tulos on suoraan negatiivinen. Jos saatu tulos on yli 200,0 ng/ml, näytteestä tehdään varmistusanalyysi. Varmistusanalyysin jälkeen näyte raportoidaan negatiivisena tuloksen ollessa MRL-tason (300,0 ng/ml) alapuolella ja positiivinen tuloksen ollessa yli 300,0 ng/ml.

## 8.7 Flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo

Myös flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo näytteet analysoitiin vain seulontamenetelmällä. Näytteistä laskettiin pitoisuudet (taulukko 18).

Taulukko 18. Flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihaponäytteiden pitoisuudet MRL-tasolla 30,0 ng/ml.

Näyte	Pitoisuus (ng/ml)
1	58,56
2	41,01
3	47,59
4	39,03
5	45,65
6	36,40
7	46,49
8	24,42
9	29,77
10	45,75
<b>Keskiarvo</b>	<b>41,47</b>

Taulukon 18 mukaan näytteiden pitoisuudet ovat korkeampia kuin teoreettinen pitoisuus 30,0 ng/ml. Pitoisuuksien keskihajonnaksi saatiin 9,72 ng/ml ja poikkeamaksi 11,47 ng/ml. Näytteiden pitoisuus 41,47 ng/ml ylittää MRL-tason, joten cut-off-taso lasketaan aiemmin mainitulla tavalla.

Näin ollen flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihapon cut-off-tasoksi saatiin 10,56 ng/ml  $\approx$  10,0 ng/ml.

## 8.8 4-kloorifenoksietikkahappo

4-CPA-näytteet analysoitiin seulontamenetelmällä ja tuloksista laskettiin pitoisuudet. Näytteiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 19.

Taulukko 19. 4-CPA-näytteiden pitoisuudet tasolla 5,0 µg/ml.

Näyte	Pitoisuus (µg/ml)
1	3,75
2	5,25
3	5,86
4	4,73
5	4,41
6	4,33
7	4,04
8	5,15
9	3,45
10	4,61
<b>Keskiarvo</b>	<b>4,56</b>

Nyt taulukosta 19 huomataan pitoisuuksien olevan hieman alhaisempia kuin teoreettinen pitoisuus. Pitoisuuksien keskihajonnaksi saatiin 0,73 µg/ml. Nyt näytteiden pitoisuus on alle MRL-tason (5,0 µg/ml), joten cut-off-taso lasketaan kaavalla (4).

$$\text{Keskiarvo} - (2 \cdot \text{Keskihajonta}) \quad (4)$$

Näin ollen 4-CPA:n cut-off-tasoksi saatiin 3,10 µg/ml  $\approx$  3,0 µg/ml.

## 9 Lopuksi

Opinnäytetyön tavoitteena oli määrittää cut-off-tasot efedriinille, pseudoefedriinille, metyyli-fedriinille, norpseudoefedriinille, morfiinille, prednisonille, flutikasoonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihapolle sekä 4-kloorifenoksisietikkahapolle.

Työn suoritus alkoi näytteiden valmistamisella. Näytteet valmistettiin yhdisteiden threshold- ja MRL-tasoilla. Threshold-tason näytteet käsiteltiin sekä seulontaa kvantitointimenetelmillä, MRL-tason näytteet vain seulontamenetelmillä. Näytteet analysoitiin LC-MS/MS- ja LC-Q-TOF-MS-laitteistoilla, saatujen tulosten avulla näytteille laskettiin pitoisuudet ja cut-off-tasot määritettiin WADAn ohjeiden mukaan.

Tuloksista huomattiin, että seulonta- ja varmistusmenetelmistä saadut pitoisuudet vaihtelivat ja näytteiden todelliset pitoisuudet olivat hieman erilaisia kuin teoreettiset pitoisuudet. Näytteiden todellinen pitoisuus ei ole koskaan täysin sama kuin teoreettinen pitoisuus, ja esimerkiksi kemialliset reaktiot, matriisivaikutukset sekä näytteenkäsittely ja -säilytys vaikuttavat pitoisuuteen. Huomattiin myös, että seulonta- ja kvantitointimenetelmien välisissä tuloksissa on hieman eroja. Kvantitointimenetelmät ovat tarkempia, koska ne on tehty määrittämään pitoisuuksia tarkasti. Seulontamenetelmien tarkoitus puolestaan on havaita mahdollisten dopingaineiden käyttö.

Opinnäytetyön tavoite saavutettiin ja cut-off-tasot saatiin määritettyä jokaiselle mukana olleelle yhdisteelle. Tulokset ovat luotettavia ja THL:n dopingtestauslaboratorio ottaa tulokset käyttöönsä. Cut-off-tasojen määrittämisen ansiosta näytteiden analysointi nopeutuu ja varmistusanalyysien tarve vähenee. Jatkossa dopingtestauslaboratorion ei tarvitse tehdä varmistusanalyysijä ”turhaan”, vaan varmistukset voidaan kohdistaa näytteisiin, jotka oikeasti voivat olla positiivisia. Opinnäytetyön tulosten ansiosta voidaan säästää aikaa ja resursseja sekä kasvattaa laboratorion työtahokkuutta.

## Lähteet

- 1 Antidopingtoiminnan historia. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/anti-dopingtoiminta/dopingvalvonta/antidopingtoiminnan-historia/>>. Luettu 10.9.2024.
- 2 Oikeuskemia. Verkkoaineisto. THL. <<https://thl.fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/turva/oikeuskemia>>. Päivitetty 1.8.2024. Luettu 10.9.2024.
- 3 World Anti-Doping Code. 2021. World Anti-Doping Agency.
- 4 Doping in sport: What is it and how is it being tackled. Verkkoaineisto. BBC. <<https://www.bbc.com/sport/athletics/33997246>>. Luettu 10.9.2024.
- 5 Wahi, Abhishek; Nagpal, Riya; Verma, Surajpal; Narula, Akshay; Kumar Tonk, Rajiv & Kumar, Suresh. 2023. A comprehensive review on current analytical approaches used for the control of drug abuse in sports. Microchemical Journal. Vol. 191.
- 6 Kielletyt aineet ja menetelmät urheilussa (KAMU). Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/kielletyt-aineet-ja-menetelmat/>>. Luettu 10.9.2024.
- 7 Dopingaineiden vaikutukset. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/kielletyt-aineet-ja-menetelmat/dopingaineet-ja-vaikutukset/>>. Luettu 10.9.2024.
- 8 Dopingtestaus. Verkkoaineisto. SUEK. <<https://suek.fi/antidopingtoiminta/dopingvalvonta/dopingtestaus/>>. Luettu 10.9.2024.
- 9 Specialist Manufacturer of Anti-Doping Products for Sport. Verkkoaineisto. Versapak. <<https://versapak-anti-doping.com/>>. Luettu 10.9.2024.
- 10 Videnoja, Laura Susanna. 2013. Luontaisten steroidien dopingkäytön osoittaminen analyttisin menetelmin. Pro gradu -tutkielma. Helsingin yliopisto, Analyttisen kemian laboratorio. Helda-tietokanta.
- 11 Kolmonen, Marjo. 2011. Accurate mass-based analysis in human sport doping control: Application of liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry. Picaset Oy.
- 12 Prohibited List. 2024. World Anti-Doping Agency.

- 13 Docherty, J.R. 2008. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *British Journal of Pharmacology*. Vol. 154. s. 606–622.
- 14 Glowacka, Krystyna & Wiela-Hojenska, Anna. 2021. Pseudoephedrine – Benefits and Risks. *International Journal of Molecular Sciences*. 22. no. 10: 5146.
- 15 Norpseudoephedrine. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/norpseudoephedrine>>. Luettu 23.10.2024.
- 16 Rubio, Ana; Görgens, Christian; Krug, Oliver; Okano, Masato; Fedoruk, Matthew; Ahrens, Brian; Geyer, Hans & Thevis, Mario. 2021. Chromatographic-mass spectrometric analysis of the urinary metabolite profile of chlorophenesin observed after dermal application of chlorophenesin-containing sunscreen. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.
- 17 WADA Technical Letter - TL01. Meclofenoxate. Version 4.0. World Anti-Doping Agency.
- 18 Andersen, Gertrud; Christrub, Lona & Sjogren Per. 2003. Relationships among morphine metabolism, Pain and side effects during long-term treatment: An update. *Journal of Pain and Symptom Management*. Vol 25, s. 74–91.
- 19 Hyppölä, Sampo. 2022. Morfiinin, kodeiinin ja etyyli morfiinin metabolia, farmakokinetiikka ja kvantitatiivinen määrittäminen dopingnäytteestä hydrolyysimenetelmällä. Pro gradu-tutkielma. Itä-Suomen yliopisto. Farmasian laitos. eRepo-tietokanta.
- 20 Prednisone. Verkkoaineisto. DrugBank Online. <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00635>>. Luettu 22.10.2024.
- 21 Nair, Sneha G.; Patel, Daxesh P.; Sanyal, Mallika; Singhal, Puran & Shrivastav, Pranav S. 2016. Simultaneous analysis of glucocorticosteroid fluticasone propionate and its metabolite fluticasone propionate 17b-carboxylic acid in human plasma by UPLC-MS/MS at sub pg/ml level. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol 135. s. 1–7.
- 22 Harris, Daniel C. & Lucy, Charles A. 2016. *Quantitative Chemical Analysis*. Ninth edition. New York. W.H. Freeman & Company.
- 23 Niiranen, Jukka; Soili, Jaarinen. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5., uudistettu painos. Helsinki. Edita Publishing Oy.

- 24 Ketola, Raimo; Kostiainen, Risto; Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki. Hakapaino.
- 25 Banerjee, Shibdas & Mazumdar, Shyamalava. 2012. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. International journal of Analytical Chemistry. Vol. 2012.
- 26 Witold M. Winnik & Kirk T. Kitchin. 2008. Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 233. s. 100–106.
- 27 Lilja, Janne-Kristian. 2017. Piristeiden toteaminen virtsasta ”Dilute and Shoot” QTOF-menetelmällä – menetelmänkehitys. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
- 28 Tamama, Kenichi. 2023. Dilute and shoot approach for toxicology testing. Frontiers in Chemistry. Vol. 11 – 2023.
- 29 A. Zwir-Ference, M. Biziuk. 2006. Solid Phase Extraction Technique – Trend, Opportunities and Applications. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 15, No. 5 (2006), s.677–690.

## Kontrollinäytteiden ja sisäisten standardien tiedot

Laboratorio on valmistanut itse kaikki kontrollinäytteet ja sisäiset standardit.

### Seulontamenetelmä D01

Kontrollinäyte: sisältää 45 erilaista neutraalia, emäksistä ja amfoteerista yhdistettä. Tämän työn kannalta tärkeimmät ovat prednisoni ja flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihappo. Liuos on valmistettu metanoliin.

ISTD: metanolinen liuos, joka sisältää yhdisteitä amfetamiini-D8, buprenorfiini-D4, triamsinoloniasetonidi-D7, formoteroli-D6, raloksifeeni-D4 ja testosteroni-glukuronidi-D3. Tässä työssä prednisoninäytteiden pitoisuuksien laskemiseen käytettiin triamsinoloniasetonidi-D7:n antamaa vastetta ja flutikasonipropionaatti 17 $\beta$ -karboksyylihaponäytteiden kohdalla käytettiin testosteroni-glukuronidi-D3:n vastetta.

### Seulontamenetelmät D02 ja D03

Kontrollinäyte (D02): sisältää noin 40 erilaista happamaa ja amfoteerista yhdistettä, joista tämän työn kannalta oleellisin on 4-CPA. Liuos on metanolinen.

Kontrollinäytteet 1 ja 2 (D03): Molemmat kontrollinäytteet ovat metanolisia liuoksia ja sisältävät kymmeniä eri yhdisteitä. Kontrollinäyte 1:ssä tärkeimmät yhdisteet tämän työn kannalta ovat norpseudoefedriini, efedriini, M6G ja metyyli-fedriini. Kontrollinäyte 2:ssa oleellisimmat yhdisteet ovat morfiini, M3G ja pseudoefedriini.

ISTD (D02 ja D03): sisäisen standardin käyttöliuos sisältää

- mefrusidia
- d<sub>4</sub>-buprenorfiinia

- d<sub>8</sub>-amfetamiinia
- morfiini-3β-D-glukuronidi-d<sub>3</sub>:sta
- d<sub>7</sub>-propranololia ja
- d<sub>8</sub>-formoterolia.

#### Efedriinien kvantitointimenetelmä

Kontrollinäyte (efedriinit): sisältää 10 µg/ml efedriiniä, 5 µg/ml norpseudoefedriiniä ja 10 µg/ml metyyli-fedriiniä. Liuos on valmistettu nollavirtsaan.

Kontrollinäyte (pseudoefedriini): sisältää 150 µg/ml pseudoefedriiniä nollavirtsasssa.

ISTD: sisältää efedriiniä, norpseudoefedriiniä, pseudoefedriiniä ja metyyli-fedriiniä deuteroiduissa muodoissa.

#### Morfiinin kvantitointimenetelmä

Kontrollinäyte (1000 ng/ml): nollavirtsaan tehty liuos, joka sisältää morfiinia, etyylimorfiinia ja kodeiini-6-glukuronidia.

ISTD: sisältää kodeiini-D<sub>3</sub>:sta, morfiini-3β-D-glukuronidi-D<sub>3</sub>:sta ja etyylimorfiini-D<sub>5</sub>:sta metanolisessa liuoksessa.

## Nollavirtsojen tiedot

Taulukko 1. Näytteiden valmistuksessa ja analyyseissä nollanäytteinä käytettyjen virtsojen tiedot.

Näyte	pH	Ominaispaino
1. Matala pH (mies)	5,36	1,015
2. Nollavirtsa 10/21	5,84	1,015
3. Normaali ominaispaino (mies)	6,12	1,017
4. Normaali ominaispaino (nainen)	5,76	1,017
5. Nollavirtsa 9/23	5,79	1,013
6. Korkea ominaispaino	5,93	1,027
7. Korkea pH	7,74	1,011
8. Nollavirtsa 6/24	6,82	1,012
9. Matala ominaispaino	6,37	1,008
10. Nollavirtsa 6/23	5,77	1,018

## Menetelmien gradienttiohjelmat

Taulukko 1. Seulontamenetelmän D01 gradienttiohjelma.

Aika (min)	Ajoliuos A (%)	Ajoliuos B (%)
0,00	95	5
1,00	95	5
9,00	10	90

Taulukko 2. Gradienttiohjelma seulontamenetelmille D02 ja D03 sekä morfiinin kvantitointimenetelmälle.

Aika (min)	Ajoliuos A (%)	Ajoliuos B (%)
0,0	95	5
0,5	95	5
3,0	75	25
7,5	0	100
9,0	0	100
post-time 1,5 min	95	5

Taulukko 3. Efedriinin kvantitointimenetelmän gradienttiohjelma.

Aika (min)	Ajoliuos A (%)	Ajoliuos B (%)
0,50	95	5
7,50	70	30
10,00	70	30
10,01	95	5
11,00	95	5

## Menetelmien massa-asetukset.

Taulukko 1. Seulontamenetelmän D01 massa-asetukset.

Parametri	Tarkennus
Ion source	AJS ESI
Gas temperature	200 °C
Gas flow	8 l/min
Nebulizer	25 psi
Sheath gas temperature	350 °C
Sheath gas flow	12 l/min
Capillary +	3500 V
Capillary -	3500 V
Nozzle voltage +	500 V
Nozzle voltage -	0 V

Taulukko 2. Tutkittavien yhdisteiden siirtymät ja törmäysenergiat menetelmässä D01.

Yhdiste	Lähtöioni	Tuoteioni	Fragmentaatio (V)	CE (V)*
Flutikasonipropionaatti-M	453.2	275.1	115	28
Prednisoni	359.2	341.1	105	8

\*CE = Collision energy, törmäysenergia.

Taulukko 3. Menetelmän D02 massa-asetukset.

Parametri	Tarkennus
Ion source	Dual AJS ESI, negative polarity
Gas temperature	150 °C
Gas flow	5 l/min
Sheath gas temperature	375 °C
Sheat gas flow	11 l/min
Fragmentor	175 V
Capillary	4500 V
Nozzle voltage	500 V
Skimmer 1	65
Octopole RF	750 V
Acquisition	m/z 50-1000
Referenssimassat (sis. kalibrointi)	112.98 ja 966.00

Taulukko 4. D03 menetelmän massa-asetukset.

Parametri	Tarkennus
Ion source	Dual AJS ESI, positive polarity
Gas temperature	150 °C
Gas flow	5 l/min
Sheat gas temperature	375 °C
Sheat gas flow	11 l/min
Fragmentor	120 V
Capillary	4500 V
Nozzle voltage	500 V
Skimmer 1	65
Octopole RF	750 V
Acquisition	m/z 50-1000
Referenssimassat (sis. kalibrointi)	121.05 ja 922.00

Taulukko 5. Efedriinin kvantitointimenetelmän massaparametrit.

Parametri	Tarkennus
Gas temperature	200 °C
Gas flow	8 l/min
Sheat gas temperature	350 °C
Sheat gas flow	12 l/min
Nebulizer	35 psi
Capillary	3500 V
Charging	500 V

Taulukko 6. Siirtymät ja törmäysenergiat efedriinin kvantitointimenetelmässä.

Yhdiste	Lähtöioni	Tuoteioni	Fragmentaatio (V)	CE (V)
Metyyliefedriini	180.1	162.1	71	12
Pseudoefedriini	166.1	148	61	8
Efedriini	166.1	148	71	8
Norpseudoefedriini	152.1	134	61	4

Taulukko 7. Massa-asetukset morfiinin kvantitointimenetelmässä.

Parametri	Tarkennus
Gas temperature	200 °C
Gas flow	8 l/min
Nebulizer	35 psi
Sheath gas temperature	350 °C
Sheath gas flow	12 l/min
Capillary +	3500 V
Capillary -	3500 V
Nozzle voltage +	500 V
Nozzle voltage -	0 V

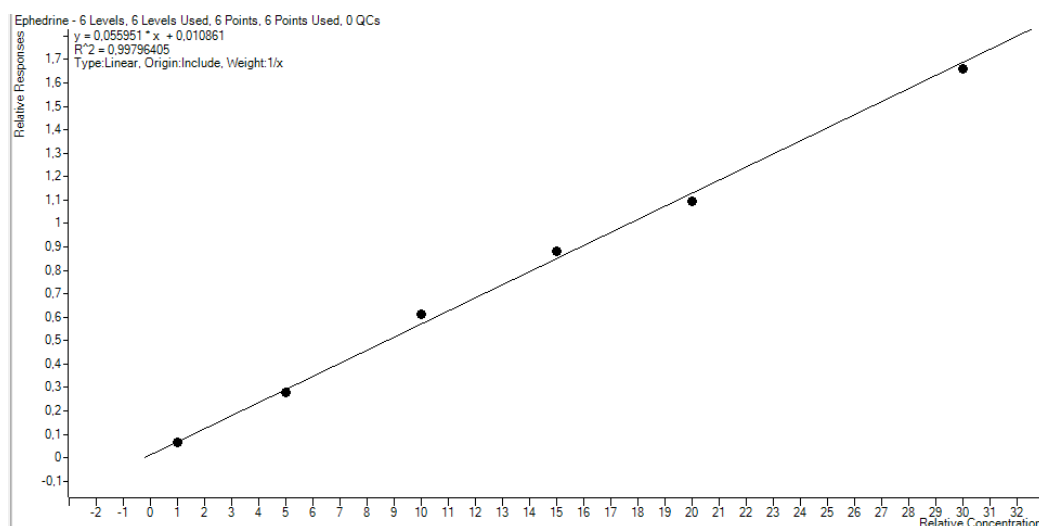
Taulukko 8. Siirtymät ja törmäysenergiat morfiinille.

Yhdiste	Lähtöioni	Tuoteioni	Fragmentaatio (V)	CE (V)
Morfiini	286.2	165	150	40

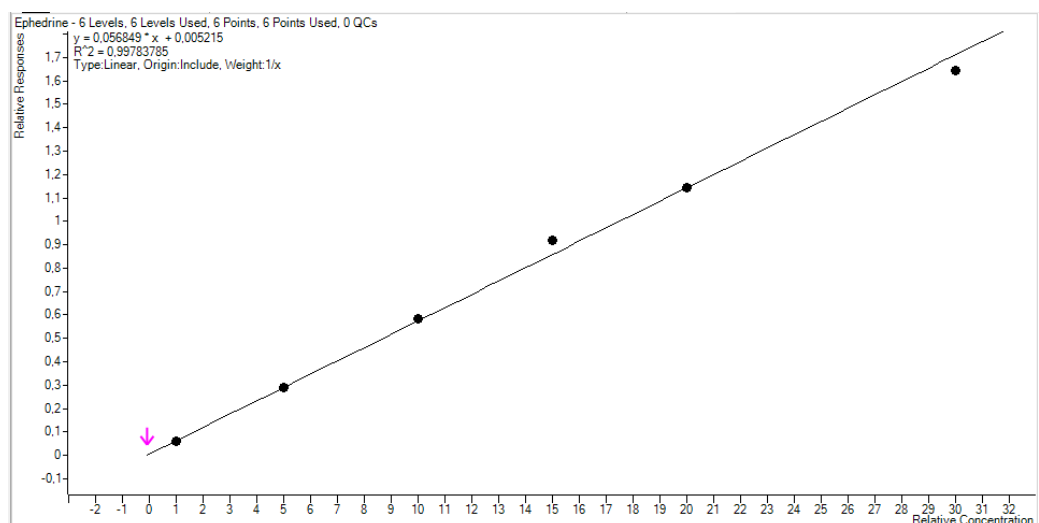
## Kvantitointimenetelmien kalibrointisuorat

Kvantitointimenetelmissä näytteet analysoitiin kahdessa eri sarjassa suuren näyttemäärän vuoksi (pl. pseudoefedriini). Ensimmäisessä sarjassa analysoitiin näytteet 1-5 threshold-tasolla ja näytteet 1-5 puolikkaalla threshold-tasolla. Toisessa sarjassa mukana oli loput näytteet molemmilta tasoilta. Jokainen näyte tehtiin työhöjään mukaan kolmena rinnakkaisena määrittäksenä.

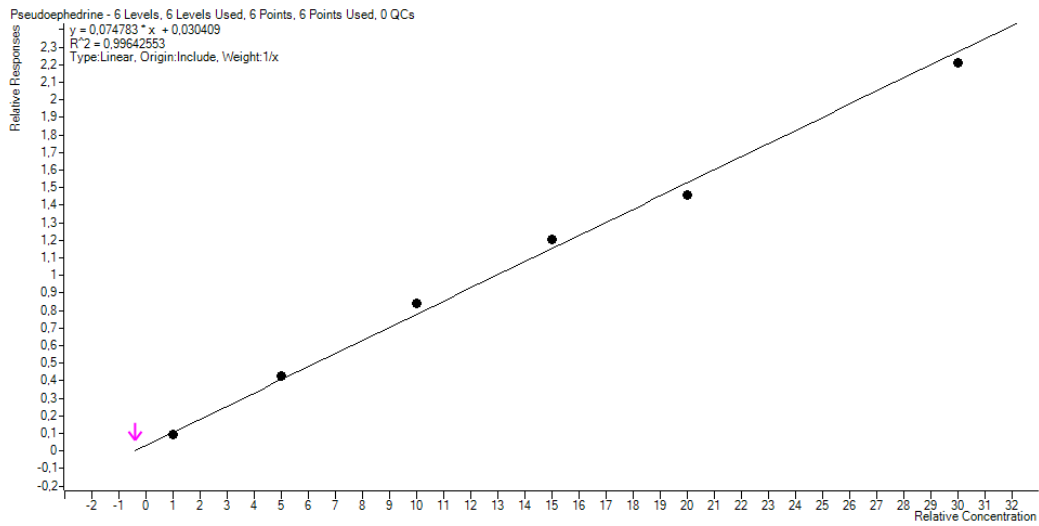
### Efedriinien kvantitointimenetelmä



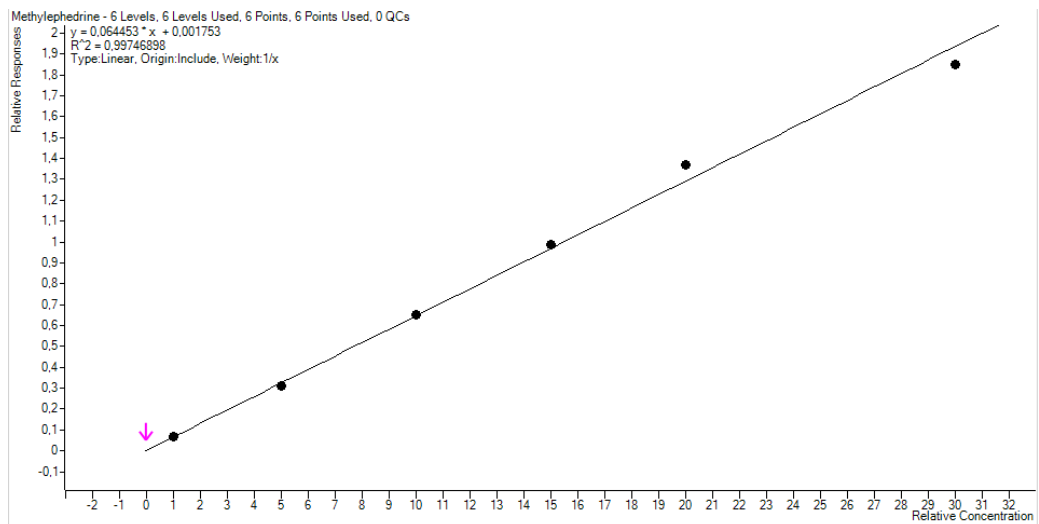
Kuva 1. Efedriini\_kvantitointi\_sarja1



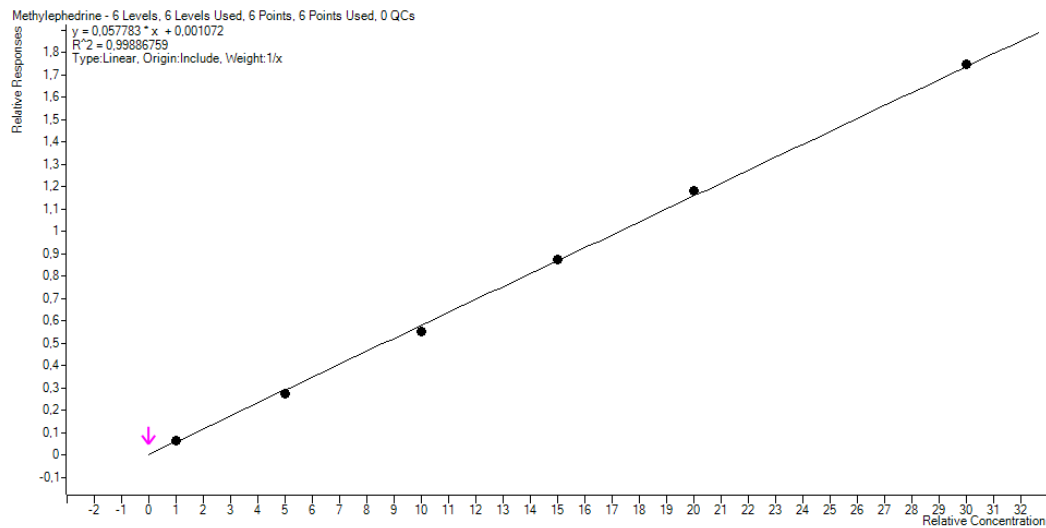
Kuva 2. Efedriini\_kvantitointi\_sarja2



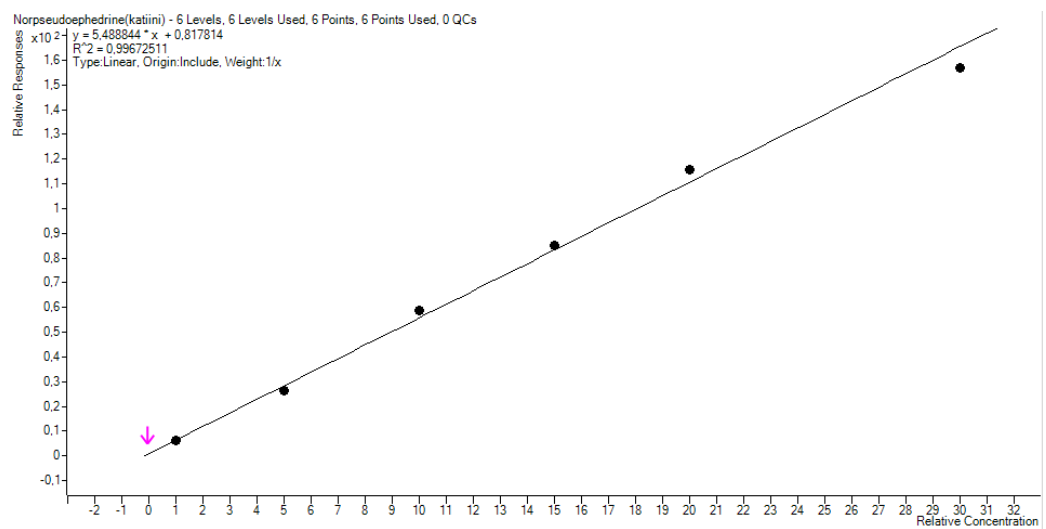
Kuva 3. Pseudoefedriini\_kvantitointi\_sarja1



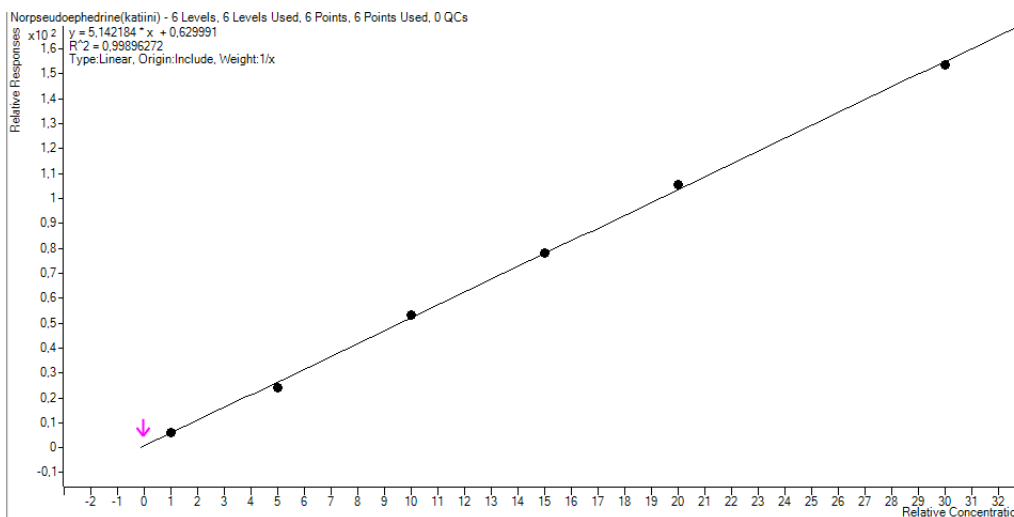
Kuva 4. Metyyliefedriini\_kvantitointi\_sarja1



Kuva 5. Metyyliefedriini\_kvantitointi\_sarja2

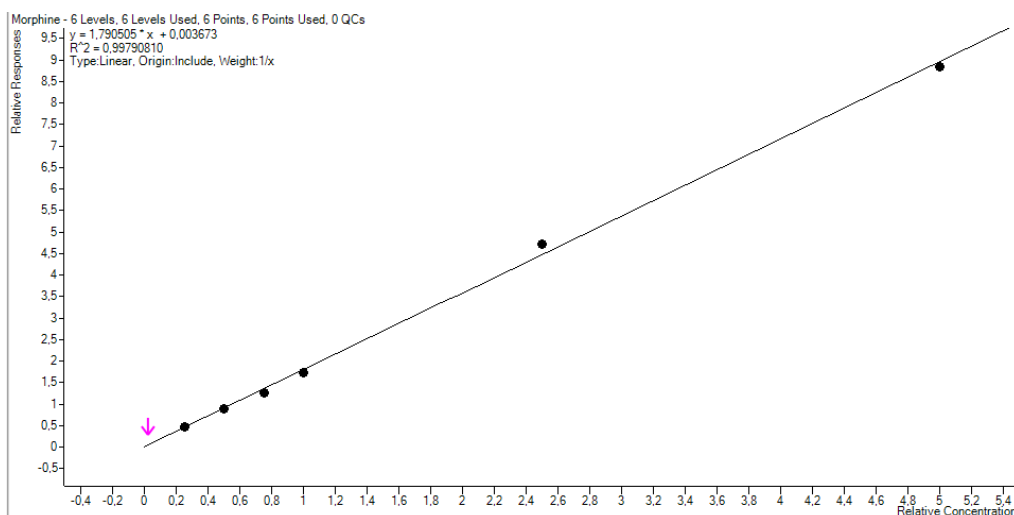


Kuva 6. Norpseudoefedriini\_kvantitointi\_sarja1

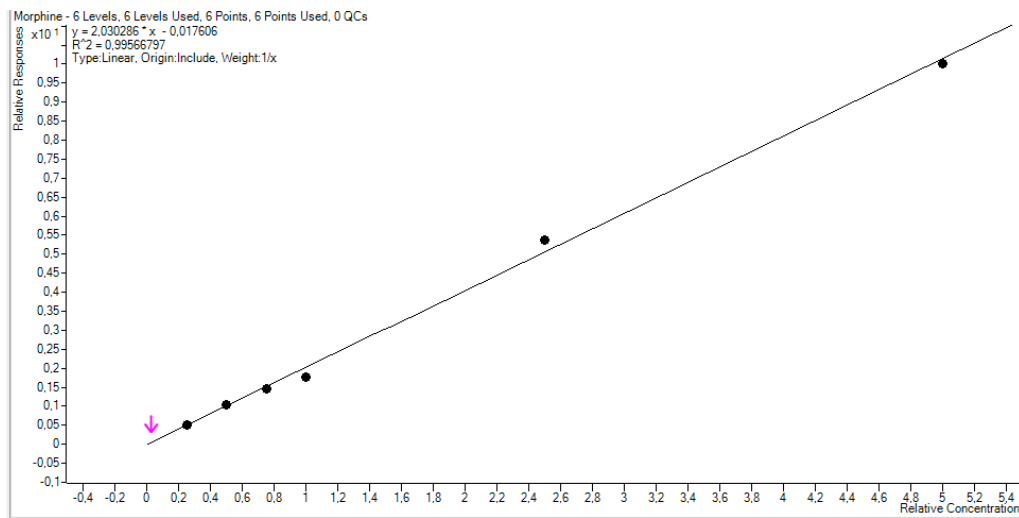


Kuva 7. Norpseudoefedriini\_kvantitointi\_sarja2

### Morfiinin kvantitointimenetelmä



Kuva 8. Morfiini\_kvantitointi\_sarja1



Kuva 9. Morfiini\_kvantitointi\_sarja2