

Sanna Määttänen

IRMS-menetelmän päivittäminen ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

11.1.2019

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Sanna Määttänen IRMS-menetelmän päivittäminen ja validointi</p> <p>48 sivua + 7 liitettä 11.1.2019</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalytikko (AMK)</p>
<p>Tutkinto-ohjelma</p>	<p>Laboratorioanalytiikka</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Yliopettaja Jukka Niiranen Asiantuntija Katja Rautava DI Tieteellinen Johtaja Tina Suominen FaT, Helsingin antidopinglaboratorio</p>
<p>Synteettinen testosteroni on yksi useimmin kilpaurheilussa käytetyistä dopingaineista. Sen käytön havaitseminen on haastavaa, sillä synteettinen ja endogeeninen testosteroni ovat kemiallisesti ja farmakologisesti identtiset. Niiden hiilen isotooppisuhteissa, $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, on kuitenkin huomattu olevan eroja ja näitä eroja voidaan mitata isotooppisuhdemassaspektrometrisesti (IRMS).</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan osastolla, jossa otetaan käyttöön uutta GC-C-IRMS-laitteistoa (kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometri). Työn tavoitteena oli validoida vanha, osittain käytössä ollut menetelmä, uudelle laitteelle ja tehdä samalla parannuksia menetelmään mahdollisuuksien mukaan, sillä nykyinen menetelmä on hidas ja työläs. Myös Maailman Antidopingtoimisto WADA:n määräysten takia antidopinglaboratoriossa on oltava menetelmä synteettisten endogeenisten steroidien ja niiden metaboliatuotteiden havaitsemiseen. Menetelmä kattaa testosteronin ja sen metaboliitit sekä menetelmässä käytetyt endogeeniset vertailuyhdisteet.</p> <p>IRMS-menetelmässä näytteen puhdistukseen käytettäviä LC-fraktioiteja yritettiin lyhentää testaamalla erilaisia LC-metodeja. Validoinnissa määritettiin laitteen lineaarinen mitta-alue, menetelmän satunnaisvirhe, systemaattinen virhe, mittausepävarmuus ja tehtiin menetelmävertailua sekä arvioitiin menetelmän toimivuutta ja näytteiden säilyvyyttä.</p> <p>IRMS-menetelmää ei onnistuttu kehittämään nopeammaksi, mutta pienempiä parannuksia saatiin tehtyä. Validointi on osittain kesken eikä kaikkia suunniteltuja toimenpiteitä menetelmän kehittämiseksi ole vielä kokeiltu. Toistettavuudet ja uusittavuudet ovat hyvät ja tulokset ovat käyttökelpoisia ja niitä hyödynnetään validoinnissa myöhemmin, kun loput validointimittaukset on tehty. Opinnäytetyön ansiosta ollaan lähempänä menetelmän täydellistä validoimista.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>GC-C-IRMS, dopingtestaus, anaboliset steroidit, testosteroni</p>

Author Title	Sanna Määttänen Updating and Validation of IRMS Method
Number of Pages Date	48 pages + 7 appendices 11 th of January 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, Senior Lecturer Katja Rautava, MSc, Specialist Titti Suominen, PhD, Scientific Director, Helsinki Doping Control Laboratory
<p>Synthetic testosterone is one of the most abundantly used doping agents in sports. Detection of its misuse is a challenge, as the endogenous testosterone is chemically and pharmacologically identical to its synthetic analog. However, there are variations in carbon isotopic fractionation between the testosterone from different origins. These isotopic differences can be measured with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS).</p> <p>This bachelor's thesis study was carried out in United Medix Laboratories Ltd.'s antidoping laboratory where the new GC-C-IRMS System (Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometer) was being introduced. The target of the work was to improve, if possible, and to validate the previously used method for the new device. A faster method was tried to be developed as it is slow and laborious at present. Due to some regulations of World Anti-Doping Agency WADA, it is also necessary for anti-doping laboratories to have a method for detecting synthetic endogenous steroids and their metabolites. With IRMS method it is possible to detect testosterone, its metabolites and the endogenous reference compounds used in the method.</p> <p>LC-fractionations, that were used to purificate the sample in IRMS method, were tried to be shortened by creating new LC-methods and testing them in practice. Method linearity, precision, bias and measurement uncertainty were defined in validation, and also method comparison, method fitness for purpose and preservability of the analytes in samples were tested.</p> <p>Minor improvements were made for the IRMS method, but the attempt to shorten LC-fractionations was not successful. Because of numerous delays, the validation work is still going on and there are still some ideas for improving the method that can be tested. The method precision for each compound showed to be adequate. The collected results will be exploited later when the rest of the validation measurements are finished. As a result of this work, achieving the target of completing the method validation is much closer.</p>	
Keywords	GC-C-IRMS, doping, antidoping, anabolic steroids, testosterone

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Dopingvalvonta	3
2.1	Dopingrikkomukset	3
2.2	Dopingvalvonnan tavoitteet ja maailman antidopingohjelma	3
2.3	Dopingvalvonnan menetelmät	4
2.4	Dopingtestaus	5
2.4.1	Testauspooli	5
2.4.2	Virtsanäytteen otto	5
2.4.3	Analysointi	6
2.4.4	Positiiviset ja poikkeavat testitulokset	6
2.4.5	Seuraamukset	7
3	Testosteroni	7
3.1	Steroidien perusrakenne ja testosteronin tehtävät	7
3.2	Biosynteesi ja vaikutusmekanismi	8
3.3	Testosteronin metabolia	10
3.4	Testosteronin dopingkäytön vaikutukset steroidi- ja hormoniprofiiliin	12
4	Hiilen isotooppisuhteet	13
4.1	Hiilen isotooppisuhteet luonnossa	13
4.2	Luontaisten steroidien isotooppisuhteet	13
4.3	Testosteronin käytön vaikutus isotooppisuhteisiin ja käytön toteaminen IRMS-analyysillä	14
5	Isotooppisuhdemassaspektrometria	16
5.1	IRMS:n historia dopingvalvonnassa	16
5.2	GC-C-IRMS–tekniikka	17
5.3	Isotooppisuhdemassaspektrin data	22
6	Työn käytännön osuus	23
6.1	Reagenssit ja liuosten valmistus	24

6.2	Laitteisto ja tarvikkeet	25
6.3	Näytteiden esikäsittely	26
6.3.1	Uutto	27
6.3.2	Nestekromatografiset fraktioinnit ja niiden optimointi	29
6.4	IRMS	32
6.5	Validointi	32
7	Tulokset ja tulosten tarkastelu	35
7.1	Fraktiointimenetelmät	35
7.2	Validoinnin tulokset	36
7.2.1	Laitteen lineaarinen mittausalue kohdeyhdisteille	36
7.2.2	Satunnaisvirhe	37
7.2.3	Systemaattinen virhe, bias	39
7.2.4	Mittausepävarmuus	41
7.2.5	Menetelmävertailu	42
7.2.6	Menetelmän toimivuus	42
7.2.7	Säilyvyys	43
8	Yhteenveto	43
	Lähteet	46
	Liitteet	
	Liite 1. Työssä käytetyt reagenssit	
	Liite 2. IRMS_100. M ja LC2_45 -HPLC-metodien parametrit	
	Liite 3. TriPlus RSH Autosamplerin parametrit metodissa 2ul.rsh.meth	
	Liite 4. Trace 1310 Kaasukromatografian parametrit metodissa Steroids.tr2.meth	
	Liite 5. Delta V Plus IRMS -massa-analysaattorin parametrit metodissa Steroids.met	
	Liite 6. ISQ-kvadrupolimassaspektrometrin parametrit metodissa Steroids.meth	
	Liite 7. Validointisarjat	

Lyhenteet

5 α D	<i>5α-androstaani-3α,17β-dioli</i> . Käytetään nimiä 5 α -androstaanidioli ja 5 α -Diol. Endogeeninen kohdeyhdiste.
5 β D	<i>5β-androstaani-3α,17β-dioli</i> . Käytetään nimiä 5 β -androstaanidioli ja 5 β -Diol. Endogeeninen kohdeyhdiste.
11OHA	<i>11β-hydroksiandrosteroni</i> . Endogeeninen referenssiyhdiste, ts. endogeeninen vertailuyhdiste.
$\delta^{13}\text{C}$	Delta-arvo. Kertoo IRMS-kohde- tai referenssiyhdisteen hiilen isotooppien ^{13}C ja ^{12}C suhteen verrattuna kansainväliseen standardiin (VPDB).
$\Delta\delta^{13}\text{C}$	Delta-delta-arvo. Kohde- ja referenssiyhdisteparin delta-arvojen erotus (TC-ERC).
A	<i>5α-androstaani-3α-oli-17-oni</i> . Käytetään nimeä androsteroni. Endogeeninen kohdeyhdiste.
AAS	<i>Anabolis-androgeeninen steroidi</i> .
ADAMS	The Anti-Doping Administration & Management System. Tietojärjestelmä antidopingtoiminnassa.
ERC	<i>Endogenic Reference Compound</i> . Endogeeninen referenssiyhdiste, ts. endogeeninen vertailuyhdiste.
Etio	<i>5β-androstaani-3α-oli-17-oni</i> . Käytetään nimeä etiokolanoloni. Endogeeninen kohdeyhdiste.
GC-C-IRMS	<i>Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometer</i> . Kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometri.
LC	<i>Liquid Chromatograph</i> . Nestekromatografi.

Mies-0	Negatiivinen kontrolli. Synteettisten anabolisten steroidien suhteen negatiivinen, miehiltä kerätty poolattu virtsanäyte.
PD	<i>5β-pregnaani-3α-20α-dioli</i> . Käytetään nimeä pregnandioli. Endogeeninen referenssiyhdiste, ts. endogeeninen vertailuyhdiste.
POS QC	<i>Positive quality control</i> . Positiivinen kontrolli. Synteettisen testosteronin käytön jälkeen kerätty virtsanäyte.
RBL	<i>Reagent Blank</i> . Reagenssinolla, puhdistettu vesi.
T	<i>Testosteroni</i> . Endogeeninen kohdeyhdiste.
TBME	<i>Tertiäärinen butyylimetyylieetteri</i> .
TC	<i>Target compound</i> . Kohdeyhdiste.
VPDB	<i>Vienna Pee Dee Belemnite</i> . Kansainvälinen standardi, maa-aines, jonka delta-arvo (C 13/12) tunnetaan tarkasti ja jota vasten mitattuja kohde- tai referenssiyhdisteiden delta-arvoja arvioidaan.
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i> . Maailman Antidopingtoimisto.

1 Johdanto

Maailman Antidopingtoimisto WADA (World Anti-Doping Agency) määrittelee dopingin yhden tai useamman antidopingsäännön rikkomukseksi [1]. WADA perustettiin vuonna 1999 edistämään ja ohjaamaan dopingin vastaista työtä urheilussa maailmanlaajuisesti. Se puolustaa urheilun eettisyyttä ja takaa urheilijalle oikeusturvan. WADA:n päätehtäviä ovat tieteellinen tutkimus, koulutus, antidopinglaboratorioiden akkreditointi, antidopingohjelmien kehittäminen, kiellettyjen aineiden ja menetelmien listan ylläpito sekä WADA:n Säännösten (World Anti-Doping Code) ylläpito, kehittäminen ja noudattamisen seuranta. WADA:n Säännösten tarkoituksena on yhdenmukaistaa antidopingkäytäntöjä eri maissa ja urheilulajien lajiliitoissa. [2; 3.]

Dopingtestausanalytiikkaa saa tehdä vain WADA:n akkreditoimissa tai hyväksymissä laboratorioissa sen kansainvälisiä standardeja ja teknisiä dokumentteja noudattaen [1]. Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelo listaa kaikki harjoitus- ja kilpailukaudella kielletyt dopingaineet ja -menetelmät [4]. Sen kohdassa S1 on listattu anabolis-androgeeniset steroidit, joita suurin osa (50 %) kaikista positiivisista dopinglöydöksistä WADA:n tilastojen mukaan on [5; 6, s. 15].

Testosteroni on endogeeninen anabolis-androgeeninen steroidi. Sitä tuotetaan luonnollisesti kehossa, joten sen dopingkäyttöä on haastavaa osoittaa. Seulontavaiheessa dopingnäytteistä mitataan kaasukromatografis -massaspektrometrisesti ns. steroidiprofiilia eli tiettyjä steroideja ja niiden suhteita sekä metaboliatuotteita, joita verrataan urheilijasta aiemmin mitattuihin steroidiprofiileihin. Lisäksi muutamille steroideille tai steroidien suhteille on asetettu raja-arvot. Poikkeava tulos urheilijan steroidiprofiilissa muihin saman urheilijan näytteisiin verrattuna tai steroidiprofiili, joka poikkeaa ns. normaalista steroidiprofiilista, kun kyseessä on urheilijan ensimmäinen näyte, voi antaa epäilyksen dopingin käytöstä. Tällöin lajiliitto tai WADA voi pyytää varmistusanalyysien suorittamista. [7.]

Luonnollisen ja synteettisen testosteronin rakenne on identtinen, mutta niiden hiilen isotooppisuhteissa on hienoisia eroja, jotka johtuvat urheilijan ruokavaliosta ja synteettisen testosteronin valmistukseen käytetyistä kasvisteroleista. Näitä isotooppisuhteita, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, voidaan mitata isotooppisuhdemassaspektrometrisesti (IRMS) ja erottaa näin

synteettinen testosteroni, tai sen metaboliatuotteet, endogeenisista. Steroidiprofiili tehdään seulontavaiheessa jokaisesta urheilijanäytteestä. WADA, lajiliitto tai muu vastaava organisaatio voi pyytää laboratorion tekemään epäilyttävästä näytteestä steroidiprofiilin markkereiden (steroidiprofiiliin kuuluvien steroidien tai niiden suhteiden) kvantitatiivisen analyysin, jolla varmistetaan ensimmäisen seulonta-analyysin tulos, sekä IRMS-varmistusanalyysin [7]. GC-C-IRMS:n eli kaasukromatografi-poltto-isotooppisuhdemassaspektrometrin toiminta hiilen isotooppianalytiikassa perustuu kohdeyhdisteen täydelliseen palamiseen hiilidioksidiksi ja syntyneiden erimassaisten hiilidioksidimolekyylien ($^{13}\text{CO}_2$ ja $^{12}\text{CO}_2$) intensiteettien mittaamiseen.

Opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n (YML) huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan osastolla (HuLaDo). HuLaDon aiempi IRMS-laitte poistettiin käytöstä. Uusi GC-C-IRMS on asennettu ja opinnäytetyön tavoitteena oli testata, voiko vanhan, osittain käytössä olleen menetelmän esikäsittelyä kehittää nopeammaksi ja validoida IRMS-menetelmä uudelle laitteelle. Validoinnissa määritettiin menetelmän satunnaisvirhe, systemaattinen virhe, menetelmän toimivuus, näytteiden säilyvyys, lineaarinen mittausalue sekä tehtiin menetelmävertailua ja arvioitiin siirtymävirhe ja mittausepävarmuus. WADA:n vaatimusten takia IRMS-menetelmä on oltava käytössä jokaisessa antidopinglaboratoriossa, joten on tärkeää saada menetelmä mahdollisimman pian käyttöön uudella laitteella.

Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy on ollut syksyyn 2018 asti suomalainen yritys, jonka SYNLAB-konserni hiljattain osti. YML kuuluu nyt SYNLAB Finland Oy:hyn. YML tarjoaa laajasti laboratoriopalveluita kliinisen kemian ja mikrobiologian, patologian ja genetiikan aloille sekä lääkeaine-, huume- ja dopinganalytiikkaan. YML:n testauslaboratoriot ovat Finas-akkreditoituja. Dopinganalytiikalla on myös WADA-akkreditointi.

2 Dopingvalvonta

2.1 Dopingrikkomukset

Urheilijat sitoutuvat noudattamaan WADA:n antidopingsäännöstöä, jossa on esitetty kaikki antidopingsääntöjen rikkomukseksi katsottavat teot ja joka on kaikille ja aina julkinen dokumentti. Rikkomuksiksi katsotaan muun muassa kiellettyjen aineiden käyttö, käytön yritys, kiellettyjen aineiden löytyminen urheilijan elimistöstä, hallussapito ja levittäminen tai levittämisen yritys. Myös näytteenotosta kieltäytyminen, olinpaikkatietojen ilmoitusvelvollisuuden rikkominen tai manipulaatio jollakin dopingvalvonnan alueella ovat dopingrikkomuksia. [1].

2.2 Dopingvalvonnan tavoitteet ja maailman antidopingohjelma

WADA:n Säännöstön ja siihen perustuvan maailman antidopingohjelman tavoitteina on turvata urheilijan oikeus osallistua dopingvapaaseen urheiluun ja täten edistää urheilijoiden oikeudenmukaisuutta, yhdenarvoisuutta ja terveyttä maailmanlaajuisesti. Säännöstö ja antidopingohjelma pyrkivät varmistamaan, että kansainvälisen ja kansallisen tason antidopingohjelmat ovat yhdenmukaisia, koordinoituja ja tehokkaita dopingkäytön havaitsemiseen ja ehkäisemiseen. [1.]

Maailman antidopingohjelma koostuu kolmesta osasta: säännöstöstä, kansainvälisistä standardeista sekä käytännön toimintamalleista ja ohjeistuksista. Säännöstön tarkoituksena on edistää dopingin vastaisia toimia olemalla yhdenmukaistavana pohjana antidopingtoiminnassa. Kansainvälisten standardien tehtävä on yhdenmukaistaa eri antidopingyhdistysten toimintaa antidopingohjelmien tietyillä teknisillä ja toiminnallisilla alueilla. Esimerkiksi dopingtestauslaboratoriot noudattavat kansainvälistä laboratoriostandardia. Käytännön toimintamallit ja ohjeistukset tarjoavat ratkaisuja eri antidopingtoiminnan alueilla. Ne ovat WADA:n suosittamia, mutta eivät pakollisia sen alaisuudessa toimiville antidopingorganisaatioille. [1.]

2.3 Dopingvalvonnan menetelmät

WADA:n Säännöstö ja siihen liittyvät kansainväliset standardit sitovat kaikkia sen allekirjoittaneita urheilun toimijoita, joita ovat kansalliset ja kansainväliset olympia- ja paraolympiakomiteat, WADA, suuret tapahtumajärjestäjät, antidopingjärjestöt, lajiliitot ja muut urheiluyhdistykset. Vain allekirjoittaneet voivat toimia urheilussa. Lista Säännöstön allekirjoittaneista toimijoista on aina julkisena WADA:n internetsivuilla. Jokaisella urheilun toimijalla on oltava Säännöstöön perustuva antidopingohjelma. Toimijan, esimerkiksi lajiliiton, on huolehdittava, että sen jäsenet, kuten urheilijat, hyväksyvät antidopingohjelman. Näin jokainen urheilija on kytköksissä Säännöstöön ja veloitettu noudattamaan sitä. [1; 8.] WADA valvoo Säännöstön noudattamista erilaisin menetelmin, ja sillä on ohjelma noudattamisen valvontaa varten. Valvontaan kuuluvat muun muassa auditoinnit, kyselytutkimukset, pakolliset tietovaatimukset, ADAMS-järjestelmä (The Anti-Doping Administration & Management System) ja mikä tahansa muu WADA:n saama tai keräämä informaatio. ADAMS on tietojärjestelmä, jossa antidopingsysteemin piiriin kuuluvat urheilijat ja sidosryhmät voivat hoitaa asioitaan ja jakaa tietoa. ADAMS:ssa on muun muassa testaus suunnitelmat ja laboratoriotulokset, kiellettyjen aineiden erivapausmenettelyt, dopingrikkomukset ja olinpaikkatietoilmoitukset [9]. WADA tekee yhteistyötä eri maiden lakia valvovien viranomaisien kanssa varmistaakseen, että dopingvalvonta on joka maassa lain nojalla mahdollista. [1; 8; 9.]

WADA ylläpitää ja päivittää Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luetteloa. Kiellettyjen aineiden käyttöä valvotaan dopingtestauksella, joka on yksi tärkeimmistä dopingvalvonnan menetelmistä. WADA:lla tulee olla toimijoiden kanssa yhteistyössä seurantaohjelma myös sellaisille aineille, jotka eivät ole Kiellettyjen aineiden ja menetelmien luettelossa mutta joiden esiintyvyyttä halutaan valvoa väärinkäyttöpotentiaalin vuoksi [1, s. 36].

Muita dopingvalvonnan menetelmiä ovat tutkimus ja koulutus. Niiden avulla pyritään tehokkaiden antidopingohjelmien kehittämiseen ja dopingkäytön ennaltaehkäisyyn. [1, s. 98–101.]

2.4 Dopingtestaus

Dopingtestausta tehdään Kansainvälisen testaus- ja tutkintastandardin ja Kansainvälisen laboratoriostandardin määräämällä tavalla. Urheilutapahtumalla on mieluiten vain yksi taho, joka suunnittelee ja toteuttaa dopingtestauksen. Testauksen toteuttaja tekee ensin testaus suunnitelman. Siihen kuuluu riskinarviointi, jossa arvioidaan mm. todennäköisimmin käytetyt kielletyt aineet ja urheilulajit, joissa niitä käytetään. Sen jälkeen valitaan testattavat urheilijakategoriat, testaustyyppit, näytetyypit ja näytteistä tehtävät analyysit. [1, s. 40.]

2.4.1 Testauspooli

Testauspooli on dopingtestauksen järjestäjän valitsema ryhmä urheilijoita, joihin dopingtestaus erityisesti kohdentuu ja joilla on olinpaikkatietojen ilmoitusvelvollisuus testauspooliin kuulumisen ajan. Ilmoitusvelvollisuuden tarkoituksena on, että urheilija voidaan tavoittaa dopingtestiin milloin vain ilman ennakkovaroitusta. Olinpaikkatiedot ilmoitetaan ADAMS-järjestelmän kautta, ja ilmoitusvelvollisuuden rikkominen saattaa aiheuttaa vakavia seuraamuksia. [1, s. 41; 10.]

2.4.2 Virtsanäytteen otto

Urheilija voi saada kutsun dopingtestiin missä ja milloin tahansa koti- tai ulkomailla. Testikutsun saatuaan urheilijan on pysyttävä testihenkilöstön valvonnassa dopingtestin loppuun asti. Urheilija saa ottaa mukaansa yhden avustajan ja tarvittaessa tulkin. Virtsates-tissä urheilija pesee kätensä ilman saippuaa ja valitsee näyteastian. Näytteenotto tapahtuu samaa sukupuolta olevan valvojan läsnä ollessa, jolla on oltava koko ajan suora näköyhteys näytteenantoon. Vain näytteen antaja (urheilija) saa käsitellä näyteastiaa siihen asti, että se on sinetöity. Valvotun näytteenoton jälkeen virtsa jaetaan lopullisiin näytepulloihin, jotka urheilija ensin valitsee ja tarkastaa. Urheilija kaataa virtsaa kuvan 1 kal-taisiin A- ja B-pulloihin, jättää hieman virtsaa näytteenottoastian pohjalle ja sulkee A- ja B-pullot sinetöintikorkeilla.



Kuva 1. Dopingtestauksessa käytetään Berlinger-näytepulloja [10].

Ylijäämävirtsasta testaushenkilöstö varmistaa analyysikelpoisuuden mittaamalla näytteen ominaispainon ja pH:n. Näytepullot pakataan asianmukaisesti ja lähetetään alkupe-
räisissä koteloihinsa dopingtestauslaboratorioon. [11; 12.]

2.4.3 Analysointi

Vain WADA:n akkreditoimat tai hyväksymät laboratoriot saavat analysoida dopingnäytteitä. Jos kyseessä on kilpailutesti, näytteestä analysoidaan kaikki tunnetut dopingaineet ja menetelmät sekä mahdollinen näytteen manipulointi. Kilpailun ulkopuolisessa testissä analysoidaan vain tietyt aineet tai menetelmät. Analysointitapa on kaksivaiheinen: ensimmäinen vaihe on seulonta, jossa epäilyttävät näytteet havaitaan, ja toisessa vaiheessa epäilyttävistä näytteistä tehdään varmistusanalyysit. Analyysit tehdään ensimmäisen kerran aina A-pullostta. [1, 11.] Dopingnäytteen seulonnassa määritetään myös steroidiprofiili, jossa seurataan urheilijan tiettyjen luonnollisten steroidien pitoisuuksien ja niiden suhteiden vaihtelua epäilyttävien näytteiden havaitsemiseksi.

2.4.4 Positiiviset ja poikkeavat testitulokset

Mikäli analysoitu näyte antaa positiivisen tai poikkeavan tuloksen, käynnistetään varmistusmenettelyt. Jos myös varmistusanalyysistä saadaan positiivinen tulos, selvitetään, onko urheilijalla ollut lääkärin myöntämä erivapaus kiellettyjen aineiden tai menetelmien käyttöön. Mikäli erivapaus löydetystä yhdisteestä tai menetelmästä on, testituloksen käsittelyä ei yleensä jatketa enää positiivisena. Jos urheilijalla ei ole erivapautta, tutkitaan onko poikkeava näyte syytä luokitella positiiviseksi näytteeksi eli dopingrikkomukseksi.

Positiivisesta tuloksesta lähetetään selvityspyyntö, jossa määrätyn ajan sisällä urheilijalla on oikeus pyytää B-analyysiä. B-analyysi tehdään B-pullosta. Jos urheilija ei pyydä B-analyysiä, katsotaan hänen luopuneen oikeudestaan B-analyysiin. Urheilija tai hänen edustajansa saa olla mukana B-analyysissä. Jos B-analyysi on negatiivinen, testituloksen käsittelyä ei jatketa enää positiivisena, mutta jos B-analyysikin on positiivinen, katsotaan urheilijan syyllistyneen antidopingrikkomukseen. Urheilijalla on vielä oikeus reiluun kuulemiseen, jossa hän voi yrittää selittää dopingrikkomustaan esimerkiksi kontaminoituneesta lisäravinteesta tai muusta tuotteesta johtuvaksi, mutta viime kädessä hän on itse vastuussa siitä, ettei käytä mitään kiellettyjä aineita tai menetelmiä. [1; 11.]

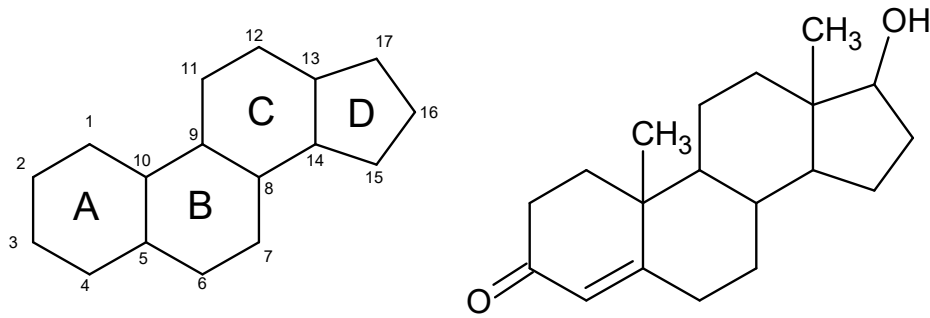
2.4.5 Seuraamukset

Seuraamukset riippuvat dopingrikkomuksesta: onko kyseessä yksilö vai joukkue ja tapahtuiko dopingrikkomus kilpailussa vai kilpailun ulkopuolella. Yleisiä seuraamuksia ovat kilpailusta poistaminen, palkintojen, sijoituksen ja pisteiden menetykset sekä kilpailukiellot niin yksilöurheilijoille kuin joukkueillekin. [1.]

3 Testosteroni

3.1 Steroidien perusrakenne ja testosteronin tehtävät

Steroidit ovat lipideiksi luokiteltuja orgaanisia yhdisteitä, joiden tärkeimpiä tehtäviä eläinkunnassa on toimia solurakenteiden osina ja hormoneina [13]. Steroidihormoneita ovat mm. sukupuolihormonit, joita tuotetaan pääasiassa kiveksissä, lisämunuaisissa ja munasarjoissa kolesterolista. Steroideiksi kutsutaan yhdisteitä, joiden perusrakenteena on syklopentanoperhydrofenantreeni (ts. steraani tai gonaani), joka koostuu neljästä hiiliveytyrenkaasta: A, B, C ja D. Kuvassa 2 vasemmalla on esitetty steroidien perusrakenne, jossa hiilet on numeroitu steroideille tyypillisessä järjestyksessä. [14, s. 1–2, 268.]



Kuva 2. Steroidien perusrakenne (vas.) ja testosteroni (oik.).

Lähes kaikissa luonnollisissa steroideissa on yksi, tai useimmiten kaksi, metyyliiryhmää renkaiden yhtymäkohdissa, hiilissä C10 ja C13 (ks. kuva 2, oikealla). Tällaisia steroideja kutsutaan C19-steroideiksi. Androgeenit ovat C19-steroideiden tärkeä ryhmä. [14, s. 1-2, 268.]

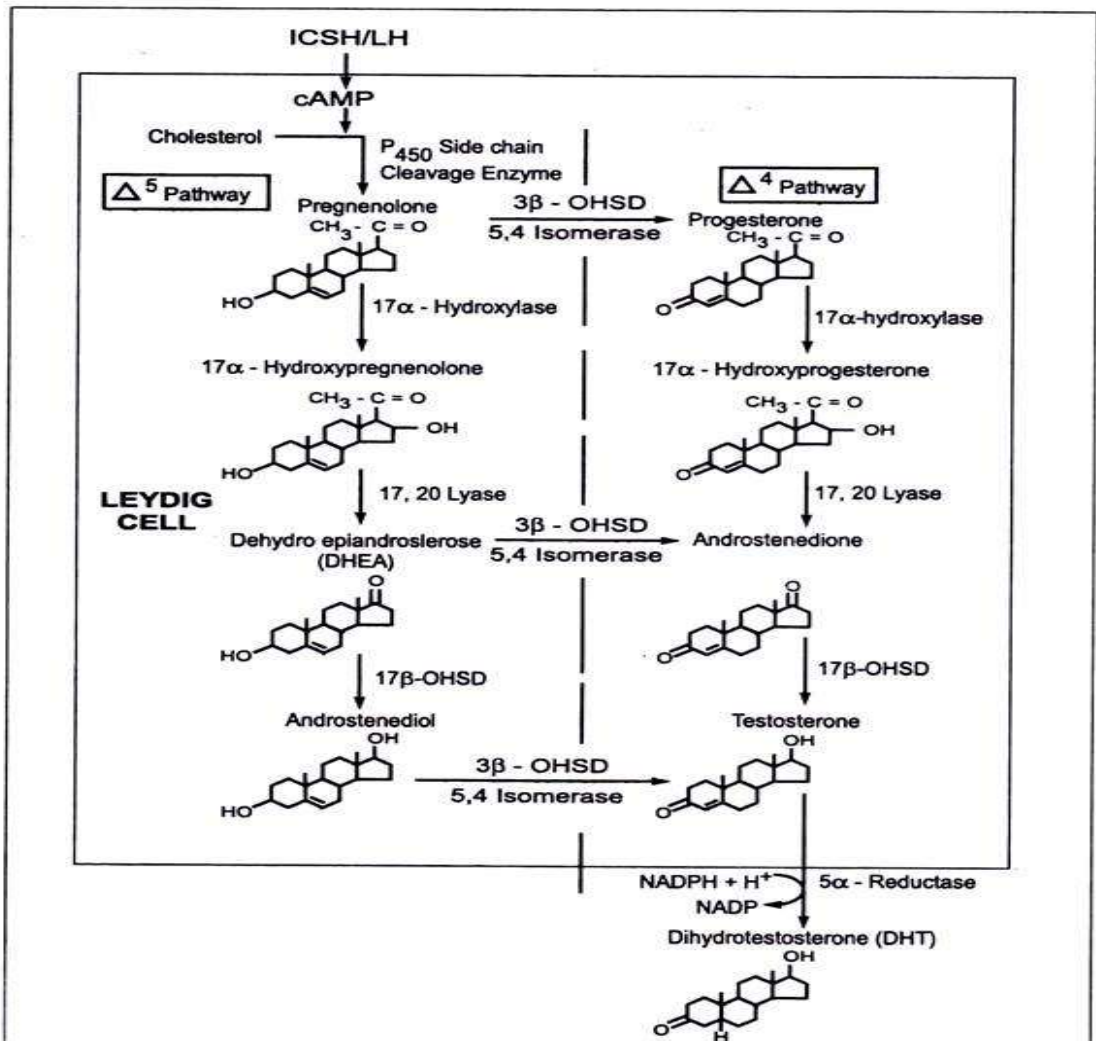
Androgeeni testosteronilla on useita tärkeitä tehtäviä eri ikävaiheissa. Testosteronin vaikutus alkaa miehillä jo sikiökaudella, kun sen tuotanto aloittaa sukuelinten maskulinisoinnin. Puberteetissa testosteronin tuotanto alkaa uudelleen ja saa aikaan poikien sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehittymisen, siittiötuotannon sekä anaboliset vaikutukset. Sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehittymisellä tarkoitetaan sukuelinten kasvua, häpy- ja kainalokarvoitusta sekä parrankasvua, ja anabolisia vaikutuksia ovat mm. kasvupyrähdys, äänihuulten paksuuntuminen, lihasmassan kasvu ja punasolunmuodostus. Puberteetin jälkeen testosteronin tuotanto pysyy miehillä suhteellisen tasaisena läpi elämän. Naisilla taas tapahtuu äkillinen sukurauhasten hormonituotannon väheneminen, mikä tunnetaan vaihdevuosina. [15.] Testosteronin käyttö urheilussa perustuu sen tuomaan hyötyyn monissa lajeissa. Se siirtää elimistön katabolia-anaboliasapainoa anaboliseen suuntaan ja poistaa jo lyhytaikaisessa käytössä ylikuntoa ja lisää harjoituskestävyyttä. Sopivaan harjoitteluun ja ruokavalioon yhdistettynä testosteroni kasvattaa huomattavasti lihasvoimaa, sekä nopeuttaa urheiluvammoista toipumista. [16.]

3.2 Biosynteesi ja vaikutusmekanismi

Testosteroni on anabolis-androgeeninen steroidi, jota esiintyy luonnollisesti miehissä ja naisissa. Anabolis-androgeeninen tarkoittaa, että steroidilla on anabolisia (kudosta ra-

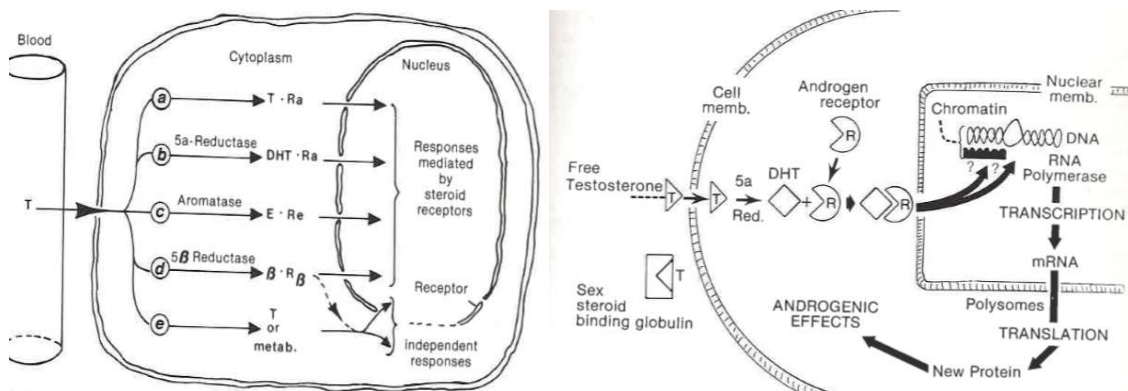
kentavia) ja androgeenisia (miestyyppisiä) vaikutuksia. [17.] Miehillä testosteroni tuotetaan pääasiassa (95-prosenttisesti) kiveksissä, mutta pienissä määrin myös lisämunuaisen kuoriosassa ja naisilla lisämunuaisen ja munasarjojen erittämistä testosteronin esiasteista [16]. Lutenisoivaa hormonia (LH) syntetisoituu aivolisäkkeen etulohkossa, mistä se erittyy vereen ja kulkeutuu kiveksiin Leydigin soluihin. Siellä LH stimuloi miehillä testosteronin tuotantoa. [15.]

Testosteroni valmistetaan kolesterolista monen vaiheen kautta entsyymaattisen toiminnan tuloksena kahta eri reaktioreittiä. Kuvassa 3 on esitetty kummatkin eli Δ^5 - ja Δ^4 -reaktioreitit. Kolesterolin sivuketju pilkkoutuu muodostaakseen pregnenolonia. Pregnenoloni muuntuu useiden entsyymaattisten reaktioiden kautta lopulta testosteroniksi, kuten kuvassa 3 on esitetty. [18, s. 919–920.]



Kuva 3. Testosteronin biosynteettiset reaktioreitit [19].

Synteesin jälkeen vapaa testosteroni sitoutuu suurimmaksi osaksi plasman proteiineihin, kuten SHBG:hen (sex hormone binding globulin), TEBG:hen (testosterone-estrogen binding globulin) ja seerumin albumiiniin [18, s. 919]. Vapaa testosteroni (n. 2 %) on biologisesti aktiivista ja kulkeutuu verenkierrassa kohdekudoksiin, joissa se pääsee solun sytoplasmaan diffuusion avulla. Myös albumiiniin heikosti sitoutunut testosteroni saattaa olla aktiivista [15]. Sytoplasmassa testosteroni joko sitoutuu suoraan androgeenireseptoreihin tai metaboloituu ensin estradioliksi, 5 α -dihydrotestosteroniksi (DHT) tai 5 β -metaboliiteiksi ja sitoutuu sitten spesifisiin steroidireseptoriin, kuten kuvassa 4 on esitetty.

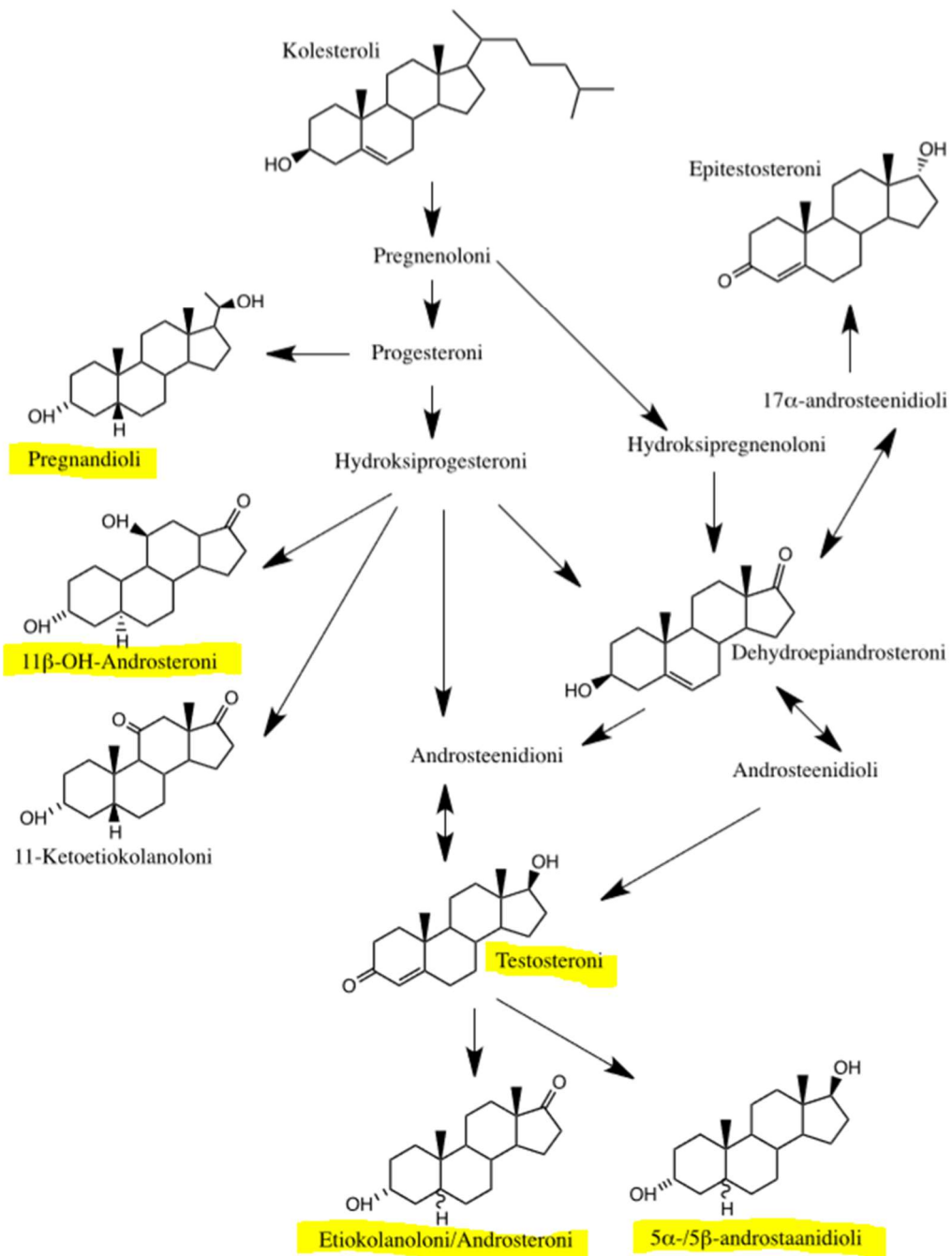


Kuva 4. Havainnekuvat testosteronin siirtymisestä solulimaan ja metaboloitumisesta (vas.) sekä sen vaikutusmekanismista (oik.) [20, s- 58–59].

Steroidi-reseptorikompleksi kuljetetaan tumaan, jossa se sitoutuu kromatiiniin ja vaikuttaa proteiinisynteesiin (kuva 4). Proteiinisynteesissä syntyvät proteiinit tuottavat anaboliset ja androgeeniset vaikutukset. [20, s. 58–59.]

3.3 Testosteronin metabolia

Steroidit metaboloituvat pääasiassa maksassa ja yleisimmät metaboliitit erittyvät virtsaan glukuronidi- ja -sulfaattikonjugaatteina [18, s. 919–920]. Dopingkäytön osoittamisessa testosteronin tärkeimmät metaboliitit ovat androsteroni, etiokolanoloni sekä 5 α - ja 5 β -androstaaniidolit. Myös pieni osa testosteronista erittyy virtsaan sellaisenaan glukuronidi- tai sulfaattikonjugaattina. [17.] Edellä mainitut yhdisteet ovat IRMS-kohdeyhdisteitä ja osa steroidiprofilia. Kuvan 5 metaboliikaaviossa on merkitty keltaisella IRMS-analyysissä seurattavat yhdisteet.



Kuva 5. Testosteronin synteesi ja IRMS-analyysissä havaittavien yhdisteiden metaboliareitti. [21.]

Testosteronin metaboliareitit ovat hyvin monimutkaisia ja niihin liittyy useita entsyymien katalysoimia ja vapaasti tapahtuvia hapetus-, pelkistys- ja hydroksylaatioreaktioita jokaisessa renkaassa (A-D) sekä konjugaatiota ja epimerisaatiota [14, s. 476]. Kuva 5 on siis yksinkertaistettu malli IRMS:n kannalta olennaisista kohdeyhdisteistä.

3.4 Testosteronin dopingkäytön vaikutukset steroidi- ja hormoniprofiiliin

Urheilijaa seurataan yksilönä usein dopingtestein urheilu-uransa aikana. Testitulokset tallennetaan ADAMS-järjestelmään, jolloin uusia testituloksia päästään vertaamaan vanhoihin ja arvioimaan, onko esimerkiksi hormoniprofiilissa tapahtunut merkittäviä muutoksia. Testosteronin dopingkäyttö johtaa urheilijan elimistössä, ja erityisesti hormonaalisessa säätelyjärjestelmässä lukuisiin muutoksiin, joita voidaan käyttää markkereina dopingtestauksessa. [16.]

Testosteroni esiintyy elimistössä peilikuvaisomeerinsa epitestosteronin kanssa jokseenkin samanlaisissa pitoisuuksissa. Testosteroni-epitestosteronisuhde (T/E-suhde) on jokaisella yksilöllinen, mutta vakaa läpi elämän. Synteettinen testosteroni sisältää vain testosteronia, mikä nostaa T/E-suhdetta. Korkea T/E-suhde on tärkein peruste epäiltäessä testosteronin dopingkäyttöä. Joskus urheilija voi peitellä dopingkäyttöään ottamalla myös epitestosteronia T/E-suhteen korjaamiseksi. Epänormaali T/LH-suhde (testosteroni-lutenisoiva hormoni) saattaa myös olla osoitus dopingkäytöstä. Aivolisäke erittää lutenisoivaa hormonia (LH), joka indusoi testosteronin tuotantoa. Elimistön ulkopuolelta tullut testosteroni jarruttaa LH:n tuotantoa ja kohottaa näin T/LH-suhdetta. Myös A/T-suhdetta (androsteroni/testosteroni) voidaan käyttää testosteronin käytön lisäosoitukseksi, sillä A/T-suhde voi laskea pitkäaikaisen testosteronin käytön seurauksena. Synteettistä testosteronia käytettäessä elimistön endogeenisten anabolisten steroidien isotooppisuhteet muuttuvat. Isotooppisuhteita voidaan seurata IRMS-analyysillä. Se on erittäin spesifinen, ja positiivista tulosta voidaan pitää varmana osoituksena synteettisen testosteronin käytöstä. [16.]

4 Hiilen isotooppisuhteet

4.1 Hiilen isotooppisuhteet luonnossa

Ilmakehän hiilidioksidista 98,9 % on ^{12}C ja 1,1 % on ^{13}C . Hiilen isotooppisuhteella R tarkoitetaan hiili-13:n suhdetta hiili-12:een: $R = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$. Erilaisten kasvien isotooppisuhteet vaihtelevat hienoisesti isotooppifraktioitumisen johdosta. Fraktioitumisessa toinen isotoopeista jää syrjään suhteessa toiseen. Fotosynteesi on tärkeä tekijä isotooppifraktioitumisessa, ja kasvien onkin huomattu käyttävän kolmea erilaista fotosynteesityyppiä ja niiden perusteella kasvit jaetaan 3C-, 4C- ja CAM-kasveihin. Kasvien isotooppikoostumukset eroavat toisistaan niin, että 3C-kasvien delta-arvot (isotooppisuhte R verrattuna standardiin) ovat negatiivisimmat, 4C-kasvien delta-arvot ovat vähemmän negatiiviset ja CAM-kasvien delta-arvot voivat vaihdella suuresti. [22.]

Koska hiilen isotooppisuhteiden vaihtelut ovat hyvin pieniä (vain joitakin promilleja), mitattavan materiaalin isotooppisuhdetta verrataan voimassa olevan standardin isotooppisuhteeseen, joka on asetettu nollassaoksi. Tällä hetkellä kansainvälisenä standardina käytetään VPDB:tä eli Vienna Pee Dee Belemnittiä. Isotooppivaihteluita ilmaistaan delta-arvoina $\delta^{13}\text{C}$, jotka lasketaan kaavan 1 mukaan.

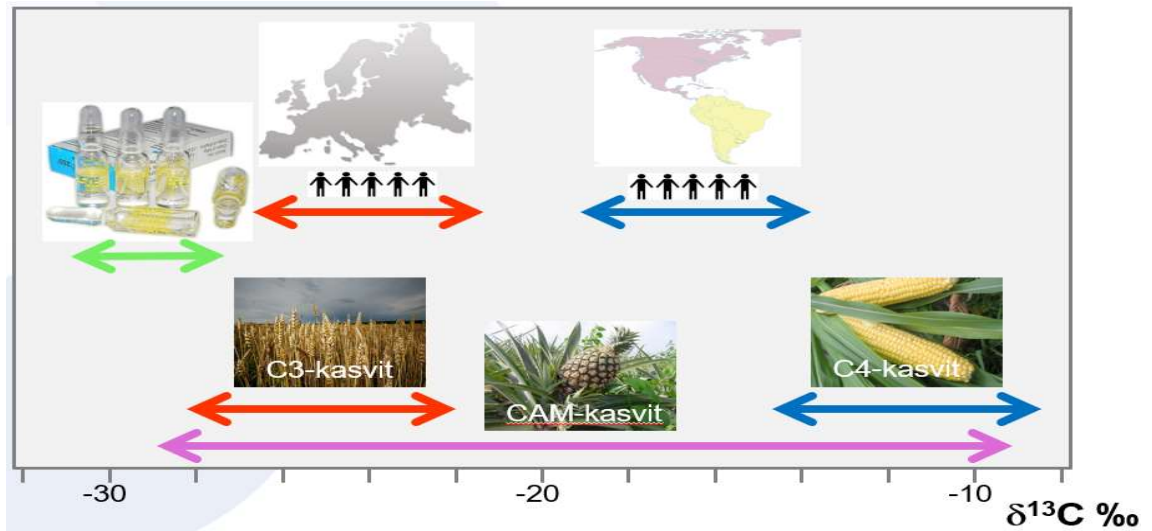
$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{näyte}}}{R_{\text{VPDB}}} - 1 \right) * 1000R \quad (1)$$

Koska VPDB:n C13/C12-arvo on hyvin korkea ja se on asetettu nollassaoksi, lähes kaikki luonnosta esiintyvät orgaaniset materiaalit saavat negatiivisen delta-arvon. [23.]

4.2 Luontaisten steroidien isotooppisuhteet

Ulrich Flenker ym. [24] tutkivat virtsaan erittyvien luonnollisten endogeenisten steroidien $\delta^{13}\text{C}$ -arvoja ja niihin vaikuttavia tekijöitä. Itse steroidihormonin tai sen metaboliitin biosynteesin lisäksi delta-arvoihin vaikuttivat sukupuoli, ehkäisyvalmisteiden käyttö, matkustaminen ja fyysinen aktiivisuus. Jo aiemmin on tiedetty, että ruokavalio vaikuttaa steroidien delta-arvoihin. Alueilla, joilla kulutetaan paljon 4C-kasveja, endogeenisten ste-

roidien delta-arvot ovat vähemmän negatiivisia kuin enimmäkseen 3C-kasveja kuluttavilla alueilla. Näin matkustaminen ”oman ruokakulttuurin alueelta” toiselle voi vaikuttaa delta-arvoihin. [24.]

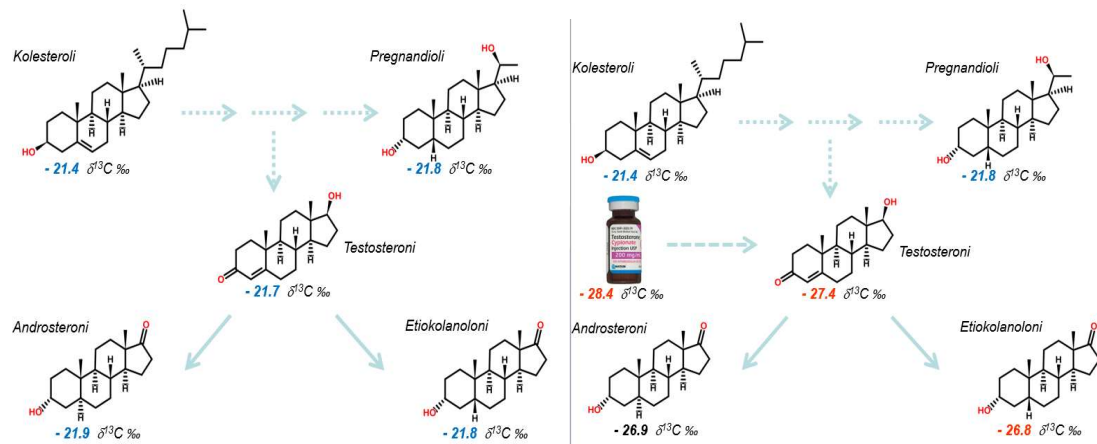


Kuva 6. Delta-arvot orgaanisessa materiaalissa [25].

Kuvassa 6 on esitetty erilaisten kasvien delta-arvoja ja niiden alueellista vaikutusta ihmisten steroidien isotooppisuhteisiin. Synteettisen testosteronin käyttö (kuvassa vasen laita) vaikuttaa delta-arvoihin alentavasti.

4.3 Testosteronin käytön vaikutus isotooppisuhteisiin ja käytön toteaminen IRMS-analyysillä

Koska ihmisen ruokavalio sisältää sekä 3C- että 4C-kasveja, mutta synteettinen testosteroni valmistetaan osittaisella synteetillä vain 3C-kasvien fytosteroleista, on sen delta-arvo huomattavasti negatiivisempi, kuin endogeenisten steroidien arvot ihmisillä normaalisti.



Kuva 7. Luonnollisten endogeenisten steroidien delta-arvoja (vas.) ja synteettisen testosteronin (dopingin) vaikutus niihin (oik.) [25].

Kuvassa 7 on esitetty, kuinka synteettisen testosteronin (lääkepullo kuvan oikeallapuolella) käyttö vaikuttaa kohdeyhdisteiden (TC, target compound) eli testosteronin, androsteronin, etiokolanolonin delta-arvoihin. Kuvasta havaitaan, että pregnandioliin, joka on irrallaan testosteronin metaboliareitistä, dopingin käyttö ei vaikuta. Tästä syystä pregnandiolia käytetään IRMS-analyysissä yhtenä ERC:nä (endogenous reference compound) eli endogeenisena referenssiyhdisteenä. Jos henkilön näytteessä tiettyjen ERC-TC-parien delta-arvojen ero on enemmän kuin 3‰, näyte täyttää ensimmäisen kohdan WADA:n ohjeistuksessa positiiviseksi näytteeksi tulkitsemisesta. [25; 26.] Tässä työssä toisena ERC:nä käytettiin 11OHA:a eli 11-β-OH-androsteronia.

IRMS-analyysillä määritetään virtsanäytteestä kohde- ja referenssiyhdisteiden delta-arvot. Sitä ei tehdä normaalitilanteessa automaattisesti, vaan varmistusmetodina ja joko dopingtestauslaboratorion harkitsemana testinä tai dopingtestausauktoriteettien pyynnöstä. WADA:n tekninen dokumentti WADA TD2016IRMS määrää, että IRMS-varmistusanalyysi on tehtävä, jos laboratorio saa varmistusanalyysipyynnön ADAMS:n kautta epäilyttävän steroidiprofiilin johdosta tai jos biologisessa passissa havaitaan epätyypillinen löydös. Vaikka steroidiprofiilin ja biologisen passin markkereissa ei näkyisikään mitään epäilyttävää, WADA tai tapahtuman dopingtestauksen järjestäjä voi siitä huolimatta pyytää varmistusanalyysiä. [26.]

5 Isotooppisuhdemassaspektrometria

GC-C-IRMS-tekniikkaa käytetään kemialliseen analyysiin monella eri tieteenalalla. Tekniikan avulla selvitetään yleensä tutkittavan orgaanisen yhdisteen alkuperää mittaamalla sen "isotooppinen sormenjälki".

5.1 IRMS:n historia dopingvalvonnassa

Kansainvälinen olympiakomitea kielsi synteettisten anabolis-androgeenisten steroidien (AAS) käytön vuonna 1974, kun niiden laaja dopingkäyttö tuli julki 1970-luvun alussa. Pystyäkseen osoittamaan synteettisen AAS:n käytön laboratoriot rupesivat kehittämään erityisesti GC-MS-metodeja tunnistaa synteettisiä steroideja ja niiden metaboliatuotteita. Testosteronin dopingkäyttö kiellettiin 1982. Seuraavana vuonna Donike ym. kehittivät T:n käytön osoittamiseksi metodin, joka perustui T/E-suhteen määrittämiseen. [17.]

GC-MS-metodit toimivat tunnistamisessa ja kvantitatiivisissa määrityksissä, mutta EAAS-yhdisteiden (endogeenisten anabolis-androgeenisten steroidien) synteettiset kopiot ovat kemiallisesti ja farmakologisesti identtisiä luonnollisesti ihmisissä esiintyviin analogeihinsa verrattuna. "Synteettisen endogeenisen" testosteronin dopingkäyttöä ei siis voida todistaa varmasti vain löytämällä testosteronia ja sen metaboliatuotteita urheilijan elimistöstä. [23.]

Isotooppianalytiikan historia dopingvalvonnassa alkoi 1990, kun Southan ym. huomasi, että elimistön erittämässä ja farmaseuttisessa käytössä olevan testosteronin ¹³C-koostumuksessa oli eroja. 1994 Michel Becchi ym. raportoivat virtsanäytteille sopivasta GC-C-IRMS -metodista ja tulevana vuosina useat tutkijaryhmät tekivät merkittäviä edistysaskelaita kohti isotooppisesti rikastuneiden steroidien mittausta GC-C-IRMS:lla. Tärkeä askel IRMS-testauksessa oli myös se, että menetelmästä alettiin puhua anti-doping-säännöissä testosteronin käytön varmistavana analyysinä vuonna 2000, ja 2003 sitä pidettiin jo parhaimpana menetelmänä havaita synteettisiä EAAS-yhdisteitä. [27, s. 1–3.]

5.2 GC-C-IRMS–tekniikka

GC-C-IRMS-tekniikka perustuu sen kolmen pääkomponentin yhteen kytkemiseen ja toimintaan. Automaattinen näytteensyöttäjä injektioi näytettä kaasukromatografiin (GC), joka erottelee yhdisteet, ja ne saapuvat polttoreaktoriin (C eli combustion). Polttoreaktoriin orgaaniset näytemolekyylit poltetaan täydellisesti hiilidioksidiksi ja vedeksi. Hiilidioksidi ja vesi kulkevat kuivaajan kautta isotooppisuhdemassaspektrometrille (IRMS), joka erottelee eripainoiset hiilidioksidimolekyylit, $^{13}\text{CO}_2$ ja $^{12}\text{CO}_2$, ja mittaa niiden intensiteetit. YML:n GC-C-IRMS:ssä on myös erillinen kvadrupolimassailmaisain, jonne näytevirta voidaan haluttaessa johtaa GC-kolonnista yhdisteiden kemiallisen rakenteen tunnistamista varten. Kuvassa 8 on työssä käytetty IRMS-laitteisto.



Kuva 8. GC-C-IRMS-laitteisto.

Näytteensyöttö

GC-C-IRMS:ssä käytetään normaaleja kaasukromatografisia näytteensyöttötekniikoita, joista yleisimmät ovat jako- ja suorainjektio (split/ splitless). Näytettä injektoidaan injektoriuiskulla septumin läpi lineriin, jonka lämpötila on normaalisti korkea ja näyte höyrystyy nopeasti. Jakoinjektiossa käytetään suurta ohivirtausta, joka huuhtelee injektorin nopeasti tyhjäksi näytemolekyyleistä, jolloin vain pieni osa näytteestä pääsee kolonniin. Menetelmä sopii hyvin esimerkiksi suuren pitoisuuden näytteille. YML:n IRMS-menetelmässä käytetään suorainjektiota. Suorainjektiossa ohivirtaus on kokonaan kiinni tietyn aikaa injektion jälkeen. Menetelmä sopii hyvin pienille pitoisuuksille ja yhdisteille, jotka eivät kestä korkeita lämpötiloja, sillä koko näytemäärä ohjataan kolonniin, eikä injektorin lämpötilan tarvitse olla kovin korkea, kun näytteellä on enemmän aikaa höyrystyä. [28 s. 114–120.]

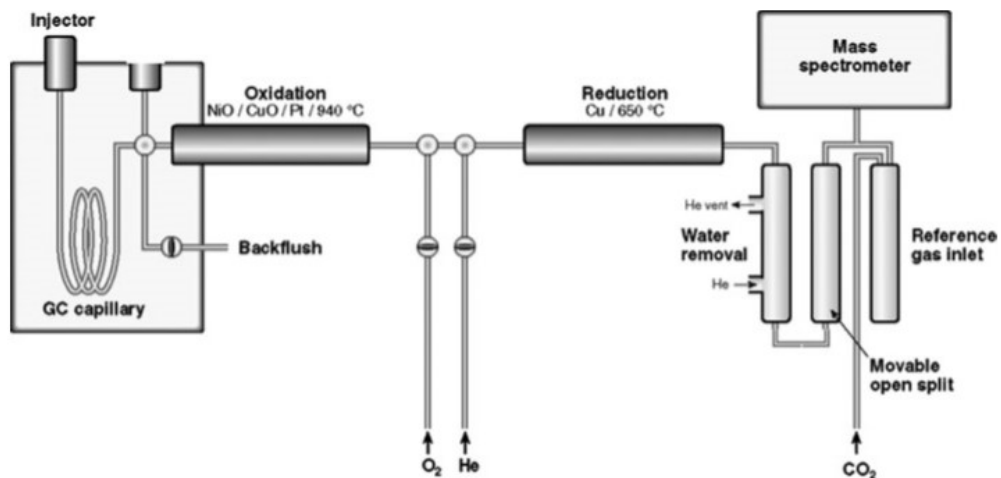
Kolonniuuni ja kolonnit

Injektorin paine työntää näytteen kantajakaasun mukana kolonniin ja kolonniuuniin. Kolonniuunin ohjelma voi olla isoterminen eli vakiolämpötilainen tai gradientti eli muuttuva. [28, s. 121.] IRMS-menetelmässä steroideille käytettiin gradienttiajoa. Kapillaarikolonnit ovat pituudeltaan normaalisti 5-50 m, ja ne on valmistettu silikasta, jonka sisällä on useimmiten polysiloksaaniin sidottu stationäärifaasi. Stationäärifaasi valitaan aina käyttötarkoituksen mukaan ja se on yleensä jokin polymeeri 0,1-3 µm:n paksuisena kerroksena. [28, s. 122–123.] Näytevyöhyke on välillä vuorovaikutuksessa stationäärifaasin kanssa ja kulkee kaasufaasin mukana eteenpäin. Eri yhdisteiden vuorovaikutus stationäärifaasin kanssa vaihtelee, mikä johtaa kromatografiseen erottumiseen. Työssä käytettiin kolonnia, jonka stationäärifaasina oli 5% fenyyli- ja 95 % metyyliipolysiloksaani. Lisäksi ennen analyttistä kolonnia uunissa oli esikolonnina 2 m faasitonta deaktivoitua silikakolonnia, jonka tarkoitus on suojata erottelevaa kolonnia likaantumiselta.

Polttoreaktori

Kolonnista näyte kulkee polttouuniin, joka koostuu hapetusreaktorista, pelkistysreaktorista ja vedenpoistajasta, ks. kuva 9. Hiilen isotooppeja mitattaessa orgaaniset yhdisteet palavat täydellisesti hiilidioksidiksi ja vedeksi 940 °C:n lämpötilassa alumiinisessa hapetusreaktorissa, jossa on nikkelioksidi-, kuparioksidi- ja platinalangat. [29.] Näyteyhdiste

hajoaa korkeassa lämpötilassa atomeikseen ja hiili- ja vetymolekyylit reagoivat metallioksidien hapen kanssa.



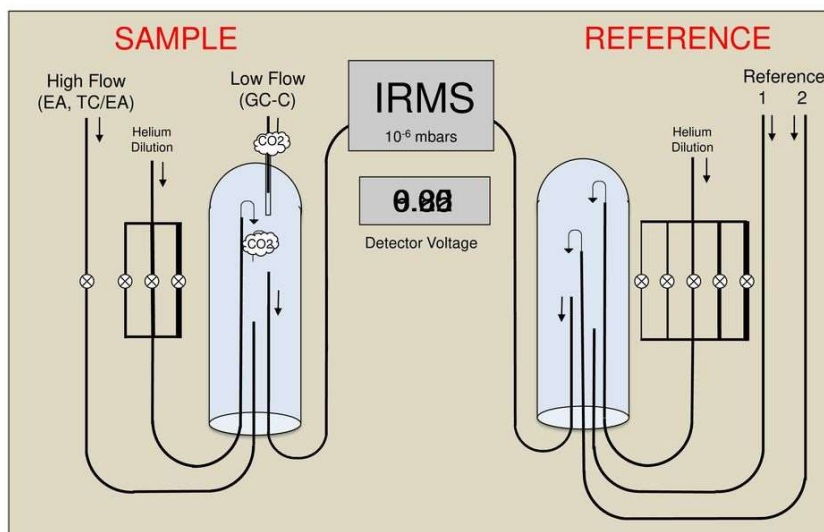
Kuva 9. IRMS-polttoreaktori [23].

Pelkistysreaktiossa poistetaan ylimääräinen happi ja mahdollisesti syntyneet typen oksidit. Syntyneet vesimolekyylit kuivataan vedenpoistajassa (Nafion-kuivain). Nafion on fluorattu polymeeri, joka toimii puoliläpäisevän kalvon tavoin. Vesimolekyylit kulkevat vaivatta sen lävitse, mutta syntyneet hiilidioksidimolekyylit jatkavat sen ohi kapillaaria pitkin Conflo IV open splitiin. Nafion-kuivaajaa huuhdellaan toiselta puolelta jatkuvasti heliumvirralla, joka kuivaa vesimolekyylit ja säilyttää näin kuivaustehon. [23; 29.]

Conflo IV ja kaasut

Conflo on liitännäskomponentti kaikille jatkuvan virtauksen oheislaitteille ja IRMS:iin. Se vähentää virtauksen muutoksia, hallinnoi referenssi- ja näytekaasun pääsyä IRMS:lle ja laimentaa tarvittaessa. Conflo IV sisältää kaksi tärkeää lasikapillaaria, reference gas inletin ja sample gas inletin. Inletit ovat open split -tekniikkaa, jossa putken toinen pää on avoin, ks. kuva 10.

IRMS Universal Interface (ConFlo IV)



Kuva 10. Kaavakuva open-split-tekniikasta [30]. Reference gas inlet on kuvassa vasemmalla ja sample gas inlet kuvassa oikealla.

Näyte- ja kaasukapillaarit johtavat open-splitin sisään ja kaasujen pääsyä IRMS:lle hallinnoidaan näitä kapillaareja liikuttelulla. Reference gas inletissä hiilidioksidin pääsyä IRMS:lle säädetään reference gas-kapillaaria liikuttamalla ja sample gas inletissä liikutetaan MS-kapillaaria. Heliumia käytetään laimennuskaasuna ja referenssikaasuna käytetään hiilidioksidia. [29.] Referenssikaasua käytetään IRMS:n kalibrointiin. CO₂ on kalibroitu kaupallisia referenssistandardeja vasten, joiden delta-arvot on jäljitettävissä VPDB:hen. [31.] Reference gas inlet pulssittaa hiilidioksidin ja pulssit ajetaan jokaisen näytteen yhteydessä. Niiden delta-arvot asetetaan oikeiksi kaupallisten referenssistandardien (CRM) avulla ja näytteet lasketaan hiilidioksidin delta-arvoja vasten.

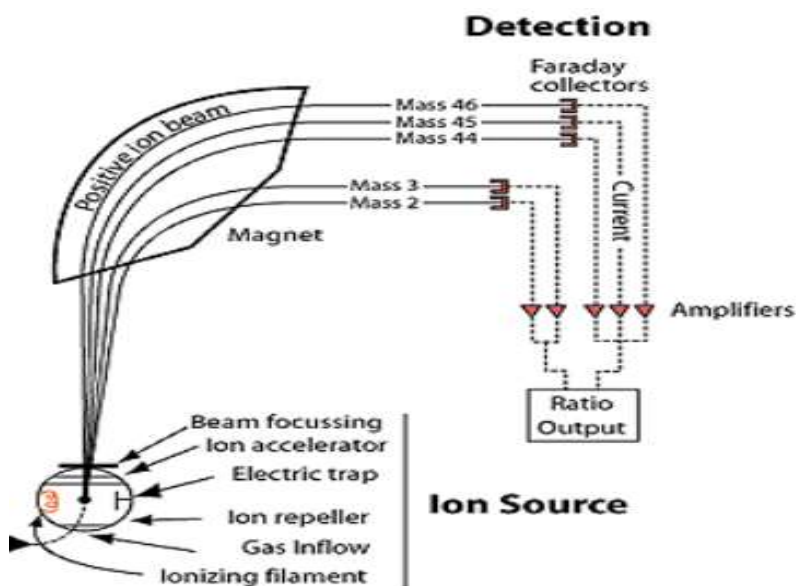
Ionisaatio

Tässä validointityössä käytetyillä kvadrupoli- ja isotooppisuhdemassa-analysaattoreilla oli käytössä elektroni-ionisaatio (EI). EI:ssa ionisointikammioon saapuvaa näytekäasua pommitetaan tietyn energisillä, sähkökentässä kiihdytetyillä elektroneilla (IRMS 124 eV ja Q-MS 70 eV), jotka syntyvät kuumennetusta metalli-filamentista (tungsten IRMS:ssa). Elektronin törmäys näytemolekyylisiin aiheuttaa elektronin irtoamisen näytechdisteeltä, jolloin siitä muodostuu orgaaninen ioni. EI:ssa muodostuu tyypillisesti positiivisia M⁺ -

ioneja, ja näytemolekyylä, joka on menettänyt vain yhden elektronin, kutsutaan molekyyli-ioniksi. Molekyyli-ioniin jää törmäyksestä yleensä vielä niin paljon energiaa, että se fragmentoituu eri tavoin pienemmiksi osiksi sen hiilirungosta ja toiminnallisista ryhmistä riippuen. Jokainen yhdiste pilkkoutuu sille ominaisella tavalla ja EI on toistettava ionisointimenetelmä, minkä johdosta tunnistamisessa voidaan käyttää spektrikirjastoja. [32 s. 8–11; 33 s. 8–13.] Isotooppisuhdemassa-analysaattorilla mitataan vain hiilidioksidia, joka ei erityisesti fragmentoidu.

IRMS:n massa-analysaattori

Ionisaatiossa syntyneet ionit fokusoidaan ja ohjataan massa-analysaattoriin, jossa ne erotellaan massa-varaussuhteensa mukaan (m/z). Massa-analysaattoreita ovat kvadruolit, sektorilaitteet, lentoaika-analysaattorit, ioniloukut, Orbitrap ja fourier-muunnosionisykloniresonanssi. IRMS:ssa on massa-analysaattorina magneettisektori. Magneettisektoreilla on hyvä resoluutio, erittäin hyvä herkkyys sekä suurehko massa-alue ja tarkkan massan määrityskyky. Ionisaation jälkeen ionit kiihdytetään sähkökentässä kohti magneettia. Magneetti taivuttaa ionien lentoratoja sitä enemmän, mitä pienempi m/z -luku sillä on, ks. kuva 11.



Kuva 11. Magneettisektorin toiminta ja detektointi faraday-kupeilla, muokattu lähteestä [34].

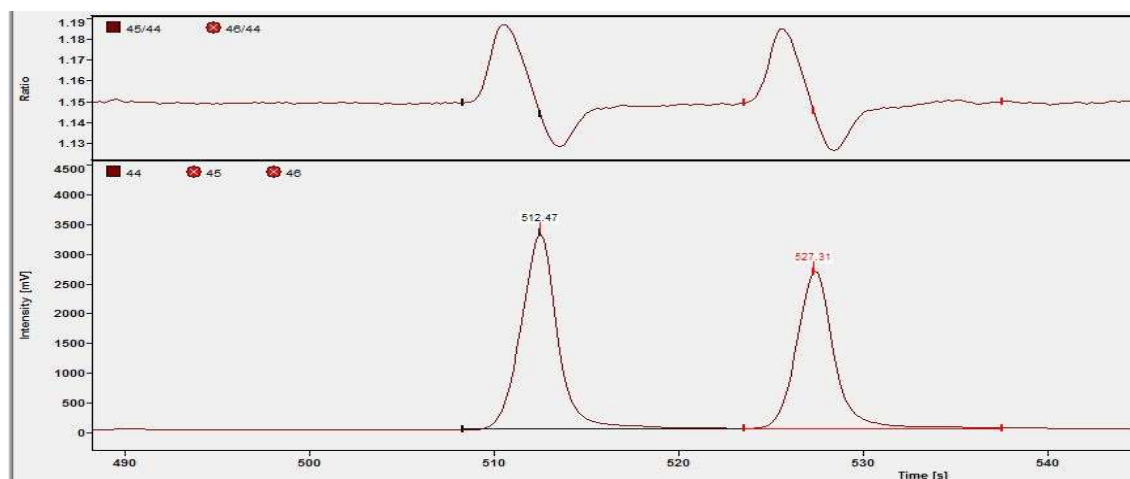
Erimassaiset ionit lentävät eri kollektoreille (faradayn kupit), jossa ne detektoidaan. [29; 32 s. 21–25.]

Kollektorit ja massadetektori

IRMS:ssa ionit ”kerätään” ns. faradayn kuppeihin (faraday collectors kuvassa 11), joihin vain halutun massasuhteen ionit pääsevät erottelevan raon lävitse. Faradayn kupit on asetettu niin, että ne keräävät CO₂-ionit massaluvuilla m/z 44, 45 ja 46, eli ¹²C¹⁶O¹⁶O⁺, ¹³C¹⁶O¹⁶O⁺ ja ¹²C¹⁶O¹⁸O⁺ sekä analyysiä häiritsevän ¹²C¹⁶O¹⁷O⁺. Hapen häiritsevän isotoopin ¹⁷O vaikutus otetaan huomioon algoritmin avulla. Faradayn kupissa voi olla elektronimonistin, joka vahventaa signaalia ennen kuin se välittyy eteenpäin. Siinä ioni osuu monistimen ensimmäiselle dynonille, joka irrottaa siitä elektroneja. Elektronit kiihdytetään seuraavalle dynonille, josta irtoaa tyypillisesti yksi tai kaksi elektronia yhtä saapuvaa kohti. Tämä toistuu useita kertoja ja virta voimistuu huomattavasti. [23; 29; 35, s. 4–12].

5.3 Isotooppisuhdemassaspektrin data

Isotooppisuhdemassaspektrometrilta saatava kuvaaja poikkeaa normaalista massaspekttristä. Kuvaajissa näkyy vain hiilidioksidin signaali sen eri massaluvuilla tai massalukujen suhteina. Kuvaajat voidaan asettaa näyttämään eri massalukujen signaalit erikseen tai samanaikaisesti. Kuvan 12 ylempi kuvaaja on massalukujen 45 ja 44 suhde ja siitä voidaan havaita, että molekyylit eri isotooppisuhteilla eivät eluoidu tasaisesti: piikin aluksi eluoituu suhteessa enemmän raskaampaa ja lopuksi kevyempää yhdistettä. Siksi oikeanlainen integrointi on erittäin tärkeää oikean tuloksen saamiseksi.



Kuva 12. IRMS-kromatogrammi: Etiokolanolonin ja androsteronin isotooppisuhdekuvaaja (yläp.) ja signaalin intensiteetti (alap.).

Kuvan 12 alemmassa kromatogrammissa näkyy massaluvun 44 signaali. Laite antaa tulokseksi koko piikin delta-arvon.

6 Työn käytännön osuus

Validoitava analyysimenetelmä oli käytössä aiemmin suurelta osin. Toista nestekromatografista fraktiointia ei ollut vielä validoitu menetelmään ja laite oli uusi, joten ennen varsinaista validointityötä menetelmää oli kokeiltava ja yritettävä kehittää siitä nopeampi. Menetelmä LC-fraktioinnilla pohjautuu Italian dopinglaboratorion käyttämään menetelmään [31]. Näytteen esikäsitteily kestää nykyisellään kolme päivää. Myös IRMS:n toiminta oli testattava ja sillä analysoitavien kohdeyhdisteiden lineaariset mittausalueet määritettävä.

Normaalitilanteessa ennen IRMS-varmistusanalyysiä tehdään Anabolisten steroidien seulonta (Anaboliset steroidit, GC/MS/MS-seulonta, humaanivirtsassa, DO-142), jonka tulosten avulla arvioidaan, kuinka paljon virtsanäytettä tarvitaan uuttoon IRMS-analyysissä. Steroidiseulonnan tuloksia käytettiin myös IRMS-varmistuksen loppuvaiheessa, jossa näytteiden fraktiot liuotettiin sellaisiin tilavuuksiin, että niiden signaalin intensiteetit ovat IRMS:lla sopivat ja osuvat lineaariselle mittausalueelle.

Analysoitavien näytteiden lisäksi jokaisessa sarjassa analysoitiin negatiivinen kontrolli (Mies-0), positiivinen kontrolli (POS QC) ja reagenssinolla (RBL). Reagenssinollalla varmistettiin, että systeemi oli puhdas kontaminaatioista ja kontrollinäytteillä varmistettiin, että laite antoi oikein negatiivisen tai positiivisen tuloksen sekä arvioitiin laitteiston toimintakuntoa. [23]. Mies-0 on synteettisten anabolisten steroidien suhteen negatiivinen, miehiltä kerätty poolattu virtsanäyte (käytössä erä 4/18), POS QC on testosteronin (Panteston) käytön jälkeen kerätty virtsanäyte (käytetty erää 5/16) ja reagenssinollana käytettiin puhdistettua vettä. IRMS-ajoja ennen laitteella ajettiin CO₂-pulsseja, joiden avulla varmistettiin, että laitteen toistettavuus oli laitevalmistajan antamien rajojen sisällä eli pulssien delta-arvojen keskihajonta sai olla enintään 0,06. Lisäksi ajettiin intensiteetiltään nousevia tai laskevia CO₂-pulsseja, joista laskettiin kuvaajan (delta-arvot intensiteetin m/z 44 funktiona) kulmakerroin. Koska intensiteetin ei pitäisi vaikuttaa delta-arvoihin, tulee kulmakertoimen olla mahdollisimman lähellä nollaa laitevalmistajan antamien rajojen sisällä. Kulmakerroin sai olla korkeintaan 0,02. Jokaisen validointisarjan yhtey-

dessä ajettiin CRM-näytteet (USADA:t). USADA 34-2 ja 35-1 ovat kaupallisia referenssistandardeja, joiden delta-arvot tunnetaan tarkasti. Niiden avulla voidaan arvioida mm. IRMS:n käyttökuntoa. USADA-standardien sisältämät yhdisteet ja niiden delta-arvot löytyvät taulukoista 10 ja 11. Referenssistandardeilla seurattiin systemaattista virhettä kyseisessä analyysissä ja pitkällä aikavälillä. Referenssistandardin injektointi jokaisessa sarjassa oli hyvä indikaattori seurattaessa systeemin suorituskykyä [36].

GC-C-IRMS-laitteistossa oli yhtenä osana tavallinen kvadrupolimassadetektor. Menetelmässä injektio jaettiin niin, että tietty osuus näytettä meni isotooppimassailmaisimelle ja toinen osuus kvadrupolimassailmaisimelle (Q-MS). Ennen validointia Q-MS:lle tehtiin oma massaspektrikirjasto IRMS-kohdeyhdisteistä ajamalla puhtasaineita ja tallentamalla niiden massaspektrit omaksi kirjastokseen.

6.1 Reagenssit ja liuosten valmistus

Endogeenisten steroidien IRMS-varmistusanalyysin työnkulkuun kuuluu uutto, ensimmäinen nestekromatografinen fraktiointi eli LC-fraktiointi (LC1), toinen LC-fraktiointi (LC2) ja IRMS-ajo. Liitteessä 1, taulukossa 1, on lueteltu kussakin työvaiheessa käytetyt reagenssit. Taulukossa 1 on kuvattu sellaisten liuosten teko, joiden on oltava aina tuoreita tai jotka tehdään laimentamalla kantaliuoksesta.

LC1 retentioaikastandardi ja LC1 ISTD on valmistettu metanoliin. Käyttöliuokset valmistettiin aikaisemmin laimentamalla 40-prosenttiseksi metanolin suhteen. LC1-metodin lähtögradientissa on orgaanista liuotinta (asetonitrili) 37,8 %, mikä saattaa aiheuttaa piikkien levenemistä liuotinvaikutuksen myötä. Asetonitrili ja metanoli eivät ole täysin verrattavissa toisiinsa, mutta työssä testattiin metanolin suhteen 25-prosenttisiä käyttöliuoksia.

Taulukko 1. LC 1 -fraktioinnin ja IRMS-analyysin käyttöliuosten valmistus.

Käyttöliuos	Kantaliuos	Liutotin	Valmistus suhdeluksena, kantaliuos+liutotin
LC1 Retentioaikastandardi	IRMS RT LC1 Mix, metanolissa	Milli-Q -vesi	1+3
LC1 sisäisen standardin käyttöliuos	IRMS-LC1 ISTD kantaliuos, metanolissa	Milli-Q -vesi	1+3
IRMS MIX 1 ja 2, referenssistandardit	IRMS MIX 1 ja 2, CHX:IPA	Sykloheksaanin ja isopropanolin seos (4+1)	1+3
USADA 34-2 ja USADA 35-1, referenssistandardit	USADA 34-2 ja USADA 35-1	Sykloheksaanin ja isopropanolin seos (4+1)	1+15

Taulukko 2. LC 2-fraktioinnin käyttöliuosten valmistus.

Kantaliuos/ liutotin	Käyttöliuos	
	LC2 Retentioaikastandardi	LC2 Sisäisen standardin käyttöliuos
17a-Methyltestosterone 100 µg/ml	125 µl	250 µl
Testosterone 1 mg/ml	5 µl	-
Metanoli	70 µl	150 µl
Milli-Q -vesi	300 µl	600 µl

LC 2 -fraktioinnin käyttöliuosten valmistus on kuvattu taulukossa 2. Tarkemmat tiedot käyttöliuosten tekoon käytetyistä kantaliuoksista löytyvät liitteen 1 taulukosta 2.

6.2 Laitteisto ja tarvikkeet

Näytteiden esikäsittelyyn kuuluu kiinteäfaasiuutto, entsyymaattinen hydrolyysi, nesteuutto ja LC 1- ja LC 2 -fraktioinnit.

Esikäsittelyssä käytettiin seuraavia laitteita ja tarvikkeita:

- Phenomenex kiinteäfaasiuuttolaitteisto
- 10 ml:n luer-lock-kertakäyttöruisku
- Waters, Sep-Pak® Plus C18 Cartridges -kiinteäfaasiuuttopatruunat (WAT020515, #041337020A)
- vesihaude
- Zymark, TurboVap®LV Evaporator -haihdutin
- Caliper Life Sciences, TurboVap®LV Concentration Work Station -haihdutin (TV1043N16159)

- Agilent Technologies 1100 Series nestekromatografi "Elsa" (G1312A Bin Pump, G1322A Degasser, G1316A COLOM, G1319A ALS, G1315A DAD)
- LC1-kolonne ACE 5 C18, 250 x 4,6 mm id (ACE-121-2546, #V16-9213)
- LC2-kolonne Agilent Pursuit Diphenyl 150 x 4,6 mm, 5 µm (A3040150R046, #3040175096)
- Ordior Foxy® Jr. -fraktiointilaite.

Uusi IRMS-laite, jolle menetelmä päivitettiin ja validoitiin, on Thermo Fisher Scientificin toimittama GC IsoLink II™ IRMS System, joka koostuu seuraavista komponenteista:

- TriPlus RSH Autosampler with Split/Splitless injector
- Conflo IV Interface
- Trace 1310 Gas Chromatograph, jossa kolonnina Agilent HP-5MS, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, 19091S-433, serial no. USP748717H ja faasiton esikolonne FS, Deactivated 0,320 mm, 160-2325-10
- GC IsoLink II (Combustion)
- Delta V Plus Isotope Ratio MS
- ISQ QD Single Quadrupole Mass Spectrometer
- Aux Gas IRMS.

Aux Gas IRMS -lisähappi asennettiin jälkikäteen, koska veden määrän huomattiin olevan laitteistossa pieni. "Vesitausta" vaikuttaa mittausten lineaarisuuteen, ja sen korjaamiseksi käytetään lisähapetta.

6.3 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittely tehtiin Yhtyneet Medix Laboratorioiden ohjeen Endogeeniset Steroidit, IRMS-Varmistus, Humaanivirtsa (SOP DO-93) mukaan, silmällä pitäen menetelmän kehittämismahdollisuuksia ja testaten uusia ideoita käytännössä. IRMS:lla analysoitavien näytteiden tulee olla erittäin puhtaita, sillä kaikki hiiltä sisältävät yhdisteet häiritsevät määrittystä. Tästä syystä esikäsittelyyn liittyy paljon puhdistustekniikoita, kuten kiinteäfaasiuutto ja fraktioinnit.

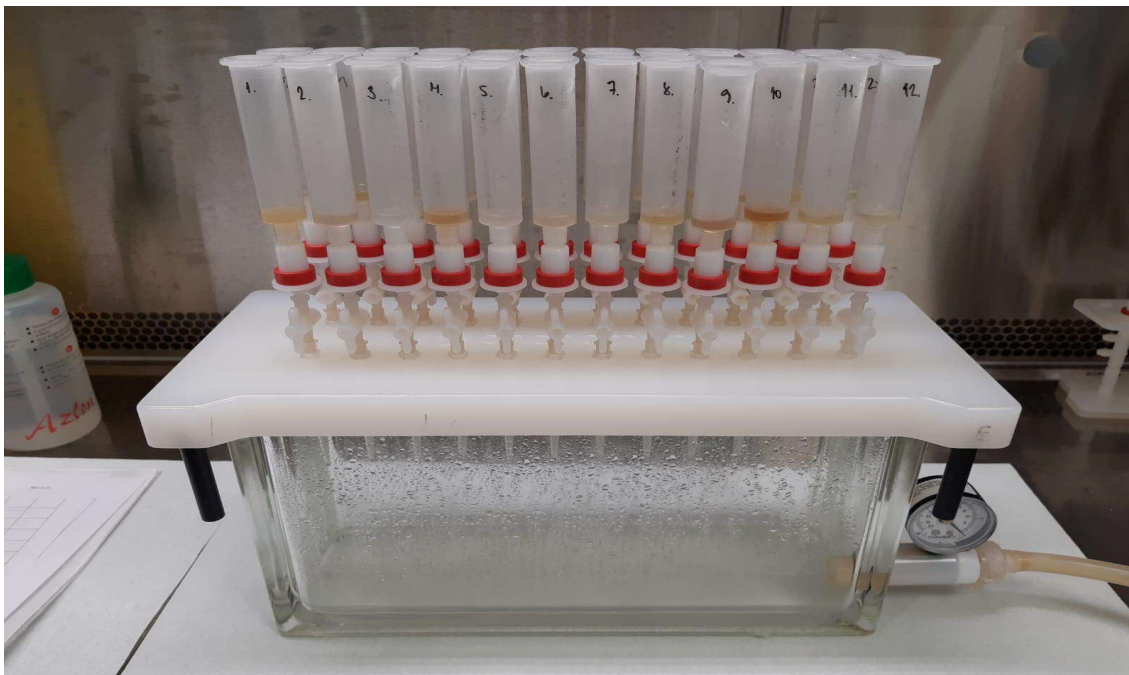
6.3.1 Uutto

Uuton ensimmäinen osuus oli kiinteäfaasiuutto, jossa virtsanäyte esipuhdistettiin häiritsevästä epäpuhtauksista. C18-patruunat ja ruiskut kiinnitettiin Phenomenex-kiinteäfaasiuuttolaitteiston kanteen, kuten kuvissa 13 ja 14 on esitetty.



Kuva 13. C18-patruuna ja ruisku.

Patruunat kunnostettiin 2,5 ml:lla metanolia ja 5 ml:lla vettä. Näytettä, kontrolleja ja RBL:ää pipetoitiin pylvääseen työohjeen (SOP DO-93) mukainen määrä. Virtsanäytteen määrä riippui anabolisten steroidien seulonnan tuloksista. Tiputuslaitteistoon saatiin vaakuumi ilmapumpun avulla ja näytteet imeytettiin hitaasti patruunaan. Yhdisteet keskipoolisista poolittomiin tarttuvat patruunan C18-faasiin.



Kuva 14. Phenomenex-uuttolaitteisto.

Pylväät pestiin vetämällä pylväiden läpi ensin 5 ml vettä ja sitten 5 ml dietyylieetteriä ja kuivattiin vakuumissa 2 min pesujen välissä ja jälkeen. Tällä käsittelyllä vapaat eli konjugoitumattomat, sellaisenaan virtsaan erittyneet steroidit ja niiden metaboliitit sekä muut yhdisteet, poistetaan. Keräysputket asetettiin tiputuslaitteiston sisälle ja näytteet eluoiitiin pylväistä hitaasti kolme kertaa yhdellä millilitralla metanolia. Uutos haihdutettiin vesihauhteessa +60 °C:ssa typpivirralla.

Haihdutuksen jälkeen putkeen pipetoitiin 25 µl metanolia ja 1 ml kalium/natrium-fosfaattipuskuria (0,1 M, pH 7), vorteksoitiin ja lisättiin 50 µl β-glukuronidaasientsyymiä. Näytteitä inkuboitiin tunti vesihauhteessa +50 °C:ssa. Steroidit erittyvät virtsaan erittäin liukoisina β-glukuronidijohdannaisina. Entsyymaattinen hydrolyysi β-glukuronidaasilla irrottaa glukuronihappo-osan [37]. Tämä on erityisen tärkeää, mikäli näytteet ajetaan kaasukromatografilla ja ne on saatava helpommin höyrystyviksi.

Putket jäähdytettiin huoneenlämpöön ja niihin lisättiin 250 µl 20-prosenttista kalium/kaliumvetykarbonaattiseosta pH:n säätämiseksi. Näytteet uutettiin 5 ml:lla tertiääristä butyylimetyylieetteriä (TBME) vorteksoimalla putkia korkkeineen multivorteksilla yhden minuutin. Näytteitä sentrifugoitiin 5 min 2000 rpm, orgaaninen faasi erotettiin kertakäyttöiseen borosilikaattiputkeen ja haihdutettiin TurboVap®LV-laitteella. Haihdutusjäännös

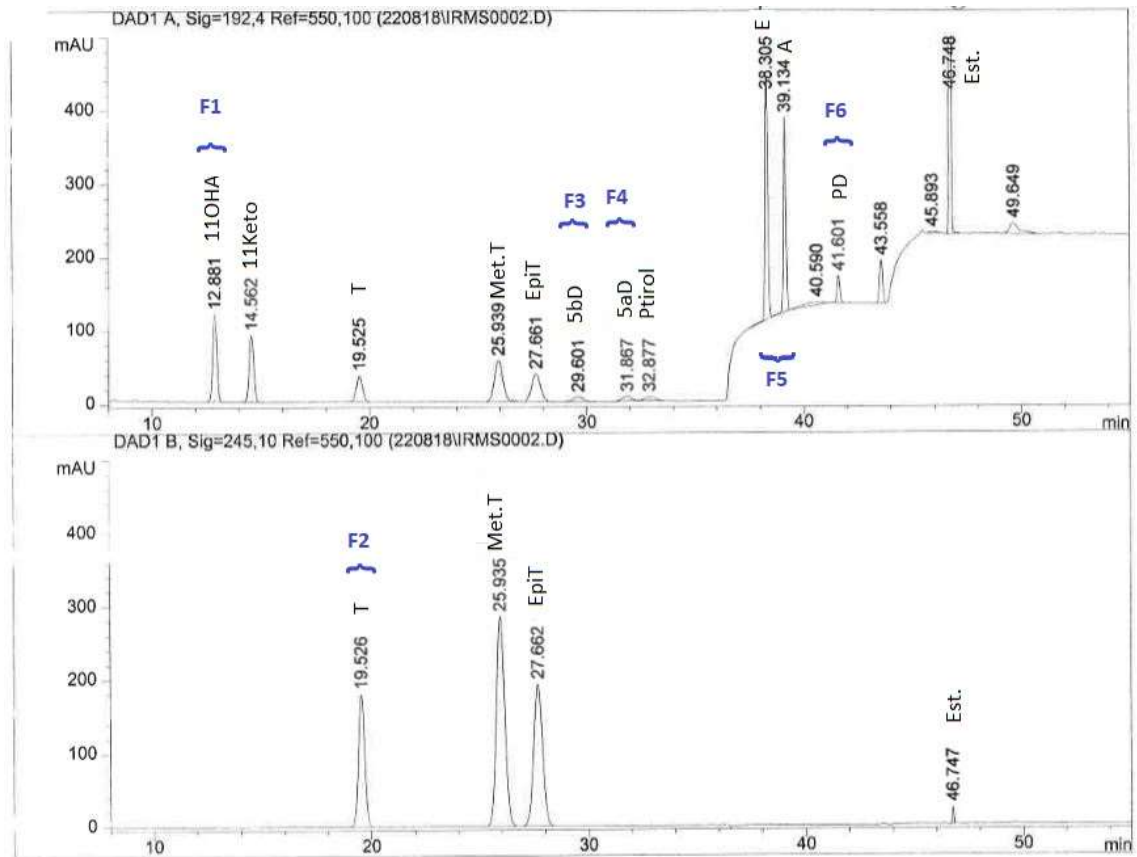
liuotettiin 120 µl:aan IRMS LC1 ISTD-käyttöliuosta, jonka valmistus on kuvattu taulukossa 1. Näytteet siirrettiin 2 ml:n sisäputkellisiin vialeihin.

Aikaisemmin haihdutusjäännös oli liuotettu 110 µl:aan LC1 ISTD-käyttöliuosta. LC1 -fraktioinnissa laite injektoi vialista 100 µl, mitä on hankala saada siirrettyä borosilikaatti-putkesta, sillä näytettä jää hieman putken reunoille. Liuotintilavuus muutettiin 120 µl:ksi saannon parantamiseksi ja ilmakuplien välttämiseksi LC-kolonnissa.

6.3.2 Nestekromatografiset fraktioinnit ja niiden optimointi

LC-fraktioinnit tehtiin LC-DAD-yhdistelmällä (liquid chromatograph diode array detector). Kohdeyhdisteet absorboivat UV-valoa eri aallonpituuksilla, joten jokaista yhdistettä ei saada näkymään hyvin kromatogrammissa. Mittausaallonpituuksina käytettiin sisäisen standardin yhdisteiden estradiolin ja metyyli-testosteronin absorptiomaksimeja, 192,4 nm ja 245 nm.

Jotta näytteet voidaan fraktioida, tulee kerättävien yhdisteiden retentioajat ja keräysikkunat määrittää. LC1-ajoissa käytetään Agilentin 1100 Series nestekromatografi "Elsaa", IRMS_100-metodia ja ACE 5 C15 -kolonnia. IRMS_100-metodin parametrit löytyvät liitteestä 2. Retentioaikakontrolli ajetaan metodilla kahteen kertaan (ks. Kromatogrammi kuvassa 15), jonka jälkeen lasketaan keskiarvoiset retentioajat ja määritetään keräysikkunat lisäten marginaalit retentiokeskiarvon molemmille puolille ohjeen mukaan (ks. Kuva 16).



Kuva 15. LC1 retentioaikakontrollin kromatogrammi.

Määritetyt keräysajat syötetään Ordior-fraktiointilaitteelle, joka fraktioi näytteet uusiin keräysputkiin. Jokaisesta näytteestä saadaan kuusi fraktiota. Kuvaan 15 on merkitty retentioaikakontrollin yhdisteet sekä kerättävien yhdisteiden fraktiot (F1–F6).

Fraktio	Yhdisteet	Keräys ennen (min)	Keräys jälkeen (min)
F1	11-β-OH-Androsterone (11OHA) (11-ketoetiocholanolone (11-keto) Ei kerätä)	0,8	0,8
F2	Testosterone (T)	0,8	0,9
F3	5-β-Androstan-3α,17β-diol (5bDiol)	1,0	*1,0
F4	5-α-Androstan-3α,17β-diol (5aDiol)	1,0	1,0
F5	Etiocholanolone (Etio) Androsterone (A)	0,6	0,7
F6	5β-Pregnane-3α, 20α-diol (PD)	0,5	0,6

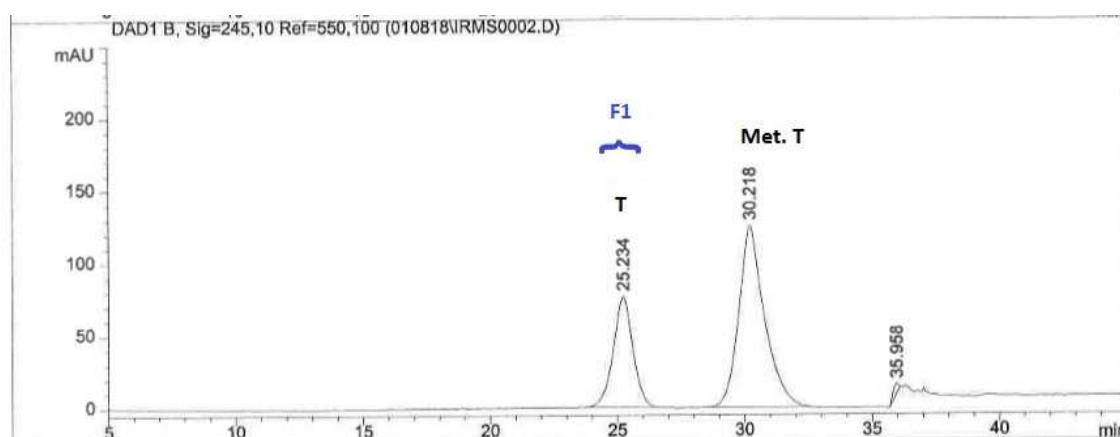
* Mikäli seuraava fraktio alkaa ennen kuin edellinen loppuu: Fraktion vaihto puoliväliin peräkkäisten fraktioiden piikkien huippuja.

Kuva 16. Ohje fraktioiden keräysikkunoiden määrittämiseksi.

LC1-fraktiointiin yritettiin kehittää nopeampaa menetelmää. Kokeiltiin 100-prosenttista asetonitriiliä B-ajoliuksena 90 %:n sijasta. Yhdisteet eluoutuivat huomattavasti nopeammin ja piikit olivat kapeampia, mutta 5βD, 5αD ja pregnanetrioli, jota ei kerätä, eivät erottuneet toisistaan niin hyvin, että ne olisi voitu fraktioida erilleen. Laittevalmistajan mukaan myös 100-prosenttinen asetonitriili voi aiheuttaa ongelmia laitteistolle pidemmällä aikavälillä. Kokeiltiin myös aikaistaa gradientin vaihdosta, mutta siitä saatava hyöty olisi ollut vain joitakin minutteja. IRMS_100-metodi päätettiin pitää entisellään.

Ensimmäisen fraktioinnin jälkeen putket kerättiin laitteelta. Muut, paitsi F2- eli testosteronifraktio siirrettiin jääkaappiin odottamaan. F2 on fraktioitava uudelleen, sillä testosteroni ei erotu sitä suuremmasta, toistaiseksi tunnistamattomasta, epäpuhtauspiikistä ensimmäisessä fraktioinnissa. F2-putket haihdutettiin kuiviin typpivirralla +60 °C:ssa ja haihdutusjäännös liuotettiin LC2 ISTD -käyttöliuokseen, jonka valmistus on kuvattu taulukossa 2. LC2-fraktioinnissa käytettiin samaa nestekromatografia, LC2_45-metodia ja Pursuit Diphenyl -kolonna. A-ajoliuksena oli puhdistettu vesi ja B-ajoliuos oli 100-prosenttista metanolia. Metodin LC2_45 parametrit löytyvät liitteestä 2.

Testosteronin retentioaika ja keräysikkuna määritetään samaan tapaan kuin LC1-fraktioinnissa. LC2 -retentioaikakontrolli (valmistusohje taulukossa 2) ajetaan kahteen kertaan ja testosteronipiikin retentioajasta ja piikinleveydestä lasketaan keskiarvot. Keräysikkuna lasketaan kaavan $Keräysikkuna = KA (retentioaika) \pm \left(\left(\frac{KA (piikin\ leveys)}{2} \right) + 0,2\ min \right)$ mukaan. LC2-retentioaikakontrollin kromatogrammi ja on esitetty kuvassa 17. Keräysajat syötetään fraktiointilaitteelle, joka kerää yhden fraktion (T) per näyte.



Kuva 17. LC2-retentioaikakontrolli.

LC2-vaihetta yritettiin kehittää nopeammaksi. LC2_45-metodissa on portaittainen gradientti. Kokeiltiin eri nopeuksilla nousevia gradientteja sekä suurempaa virtausnopeutta. Lähes millään kokeilluista metodeista testosteroni ei erottunut metyyli-testosteronista, vaan ne eluoutuivat samassa piikissä. Hitaasti nousevalla gradientilla testosteroni erottui, mutta sisäisenä standardina käytetty metyyli-testosteroni ei erottunut epäpuhtauspiikistä. LC2_45-metodi päätettiin jättää entiselleen.

6.4 IRMS

Putket toisesta fraktioinnista kerättiin laitteelta ja ne haihdutettiin typpivirralla +60 °C:ssa n. 30 min yhdessä ensimmäisestä fraktioinnista saatujen näytteiden kanssa. Haihdutusjäännös liuotettiin RSTD-käyttöliuokseen, joka on ~8 µg/ml 5a-androstaani-3b-olia sykloheksaanin ja isopropanolin seoksessa. Liuotustilavuudet riippuvat anabolisten steroidien seulonnan tuloksista. Pienin käytetty liuotustilavuus oli 20 µl. 20 µl on vain pisara, jota on liikuteltava putken pohjalla, jotta se keräisi mahdollisimman paljon haihdutusjäännöstä. Jos liuotinta jäi putkien reunoille, ne sentrifugoitiin pikaisesti (1 min 2000 rpm) ennen sisäputkellisiin vialeihin siirtoa.

Ennen näytteiden analysointia IRMS:lla, laite oli oksidoitava ja sillä oli ajettava hiilidioksidipulseja toimintakunnon tarkastamiseksi. Uuden RSTD-käyttöliuoksen intensiteetin taso testattiin ennen näytteiden liuottamista ja jokaisen validointisarjan aluksi ja lopuksi ajettiin referenssistandardit IRMS MIX1, IRMS MIX2, USADA 34-2 ja USADA 35-1. GC-C-IRMS:lla on omat metodit autosamplerilla, kaasuromatografilla ja massa-analysointilaitteilla, ja niiden laiteparametrit löytyvät liitteistä 3, 4 ja 5. Kaikki validointisarjat ajettiin myös ISQ-kvadrupolimassalle, jolla yhdisteet voitiin tarvittaessa tunnistaa. Q-MS-parametrit löytyvät liitteestä 6. Isotooppisuhdemassalla tunnistus tapahtuu retentioaikojen avulla.

6.5 Validointi

Validointi suoritettiin Yhtyneet Medix Laboratorioiden validointisuunnitelman VALIDOINTISUUNNITELMA IRMS_04_Ver 2.0, Hulado, Katja Rautava 24.4.2018 mukaan. Validointisarjoja oli 14, joita tehtiin opinnäytetyön kuluessa 8 sekä uusittiin validointisarjat 1 ja 2. Validointitulokset laskettiin näiden 10 sarjan perusteella. Analysoidut validointisarjat ja niiden tiedot on esitetty liitteessä 7.

GC-C-IRMS:n lineaarinen mittausalue

Laitteen lineaarinen mittausalue oli määritettävä ennen virtsanäytteiden analysointia. Puhtaista kohde- ja referenssiyhdisteistä tehtiin taulukon 3 mukaiset laimennossarjat. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista mittausta.

Taulukko 3. Puhdasainesta valmistettujen näytteiden pitoisuudet.

TC / ERC	Puhdasainenäytteiden pitoisuudet µg/ml									
5a-dioli	1	2	4	5	10	15	20	25	-	-
5b-dioli	1	2	4	5	10	15	20	25	-	-
11-Hydroksiandrostero- roni	1	2	4	5	10	15	20	25	-	-
Androsteroni	2.5	5	10	20	30	40	50	-	-	-
Etiokolonoloni	1	2	4	5	10	15	20	25	-	-
Pregnanedioli	1	2	4	5	10	15	20	25	40	-
Testosteroni	1	2	4	5	10	15	20	25	-	-

δ -arvojen tulisi säilyä samoina riippumatta siitä, kuinka suuri pitoisuus analyttiä analysoidaan. Laitteella on kuitenkin rajansa, ja mittausalueen tutkimiseksi laskettiin δ -arvojen keskiarvo ja keskihajonta. Lineaarinen mittausalue on pitoisuusalue, jolla δ -arvot poikkeavat keskiarvosta enintään $\pm 0,5\%$ ja keskihajonta rinnakkaisten mittausten välillä on enintään $0,5\%$ [36].

Satunnaisvirhe

IRMS-menetelmän satunnaisvirhettä arvioitiin tutkimalla sarjojen sisäistä toistettavuutta ja sarjojen uusittavuutta. Sarjan sisäistä toistettavuutta tutkittiin analysoimalla samassa sarjassa useita negatiivisia ja positiivisia virtsanäytteitä (ks. liite 7, taulukko 1, validointisarjat 1 ja 3). Tehtiin viisi rinnakkaismäärittystä. Sarjojen uusittavuutta tutkittiin samoilla positiivisilla ja negatiivisilla virtsanäytteillä, jotka analysoitiin eri päivinä. Rinnakkaismäärittämiä tehtiin yksi viitenä eri päivänä sarjoissa 1–5. Satunnaisvirhettä tutkittiin laske-
malla yhdisteiden δ -arvojen ja retentioaikojen keskihajonta sekä kohdeyhdisteiden ja endogeenisten referenssiyhdisteiden δ -arvojen erotuksen keskihajonta. [38.] Mittausepävarmuuden laskemista varten jokaiselle yhdisteelle määritetään mittausepävarmuustekijä $u_{\text{prec.}}$, eli delta-arvojen uusittavuuden suhteellinen keskihajonta positiivisista kontrolleista. Toistettavuuden mittausepävarmuustekijää ei huomioida mittausepävarmuuden

laskemisessa, sillä sarjojen sisäisen hajonnan ajatellaan olevan hyvin pieni verrattuna sarjojen uusittavuuden hajontaan.

Systemaattinen virhe, bias

IRMS-menetelmän systemaattista virhettä eli oikeellisuutta (bias) tutkittiin analysoimalla näytteitä, joiden δ -arvot tunnetaan (USADA:t). Näytteenä käytettiin keinotekoisia virtsaa, johon lisättiin tunnettua standardia. Systemaattista virhettä tutkittiin laskemalla kohde- ja referenssiyhdisteiden absoluuttisten δ -arvojen poikkeamat vertailutuloksista. [34]. Mittausepävarmuuden laskemiseksi jokaiselle yhdisteelle lasketaan u_{bias} tai $u_{\text{bias(RMS)}}$, eli systemaattisen virheen epävarmuus tai yhdistetty epävarmuus.

Mittausepävarmuus

Menetelmän mittausepävarmuutta (u %) arvioitiin systemaattisen- ja satunnaisvirheen avulla. Mittausepävarmuus saa olla absoluuttisena lukuna enintään $u \leq 1,00\%$. [38.]

Menetelmävertailu

Validoinnissa analysoitiin näytteitä, jotka oli analysoitu myös toisessa WADA-akkreditoitussa dopinglaboratoriossa, ja tulosten yhdenmukaisuutta arvioitiin tilastollisin testein. Lisäksi vertailtiin näytteiden positiivisuutta ja negatiivisuutta. Validointisarjoissa 5, 6 ja 7 analysoitiin vertailunäytteitä, jotka oli testattu myös Kölnin dopinglaboratoriossa. [38.]

Menetelmän toimivuus

Menetelmän toimivuudella tarkoitetaan sitä, että menetelmä on tarkoitukseensa sopiva [33]. IRMS-menetelmän toimivuutta tutkittiin analysoimalla negatiivisia nollavirtsanäytteitä ja laskemalla niistä jokaisen kohde- ja referenssiyhdisteparin δ -arvojen erotukset eli $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -arvot (ts. delta-delta-arvot) ja delta-delta-arvojen keskiarvot ja keskihajonnat. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -arvo on erittäin tärkeä tulkittaessa IRMS-varmistuksen tuloksia dopingtestauksessa. Menetelmä on toimiva, jos

- $\text{ka } \Delta\delta^{13}\text{C} + 2 \text{ sd} \leq 3\%$ (A, T, 5 α D ja 5 β D osalta)
- $\text{ka } \Delta\delta^{13}\text{C} + 2 \text{ sd} \leq 4\%$ (Etio:n osalta)
- $\text{sd } \Delta\delta^{13}\text{C} \leq 1,2\%$ kaikille ERC-TC -pareille. [38.]

Kaikkia näytteitä ei ehditty analysoidaan. Tulokset laskettiin tässä työssä vain 5βD:n osalta. 5βD:n delta-delta-arvojen keskihajonnan tulee olla enintään 1,2 ‰ ja sen delta-delta-arvojen keskiarvon, johon on lisätty kaksi keskihajontaa, tulee olla alle 3 ‰.

Säilyvyys

Säilyvyyttä arvioitiin validointisarjan 8 avulla. Osa näytteistä oli ajettu IRMS:llä kahteen kertaan kolmen päivän erolla (Mies-0, PosQC ja kaksi negatiivista urheilijanäytettä).

Validointisuunnitelmasta poikkeaminen

Työssä poikettiin validointisuunnitelmasta. Siirtymävirhettä, eli edellisen näytteen aiheuttamaa kontaminaatiota ei analysoitu validointisuunnitelmassa suunnitellulla tavalla. Validointisuunnitelman mukaan siirtymävirhe olisi pitänyt analysoida standardin jälkeen injektoidulla metanolinäytteellä (LC1-fraktioinnissa) ottamalla talteen fraktiot ja ajamalla ne IRMS:lla, mutta metanolifraktiot hävitettiin joka kerta. Siirtymävirhettä voidaan kuitenkin arvioida reagenssinollanäytteen avulla, joka ajettiin LC1- ja LC2-fraktioinneissa aina positiivisen kontrollin jälkeen. Reagenssinollan fraktiot otettiin talteen ja analysoitiin IRMS:lla.

7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

7.1 Fraktiointimenetelmät

LC1- ja LC2-fraktiointimenetelmiä ei muutettu merkittävästi. Metodeja yritettiin kehittää nopeammiksi, mutta kokeilusta huolimatta esikäsittelyä ei saatu nopeutettua. Liuotusreagenssiin orgaanista osuutta LC1-fraktioinnissa laskettiin 40 %:sta 25 %:iin ja liuotus-tilavuus nostettiin 120 µl:aan. Nestekromatografiset menetelmät päätettiin pitää ennallaan, sillä testatut menetelmät eivät sovi analyteille tai uudesta metodista saatava ajallinen etu olisi ollut hyvin vähäinen. LC-metodeihin lisättiin neulanpesut, sillä analysoidessa reagenssinollanäytettä huomattiin siirtymävirhettä edellisestä näytteestä. Ongelma poistui neulanpesujen lisäyksen myötä. Aiemmin siirtymää ei ollut huomattu, sillä vanha laite

ei ollut riittävän herkkä. LC2-fraktioinnin testosteronin keräysikkunan määrittystä päätettiin muuttaa, kun huomattiin, että testosteronipiikillä on tapana ”kurottaa” eteenpäin ajojen edetessä. Nyt testosteronin keräysikkuna määritetään laskemalla retentioaikakontrollien retentioaikojen keskiarvo. Keräyksen aloitus on 1,7 min ennen retentioaikaa ja lopetus 1,8 min RT:n jälkeen.

7.2 Validoinnin tulokset

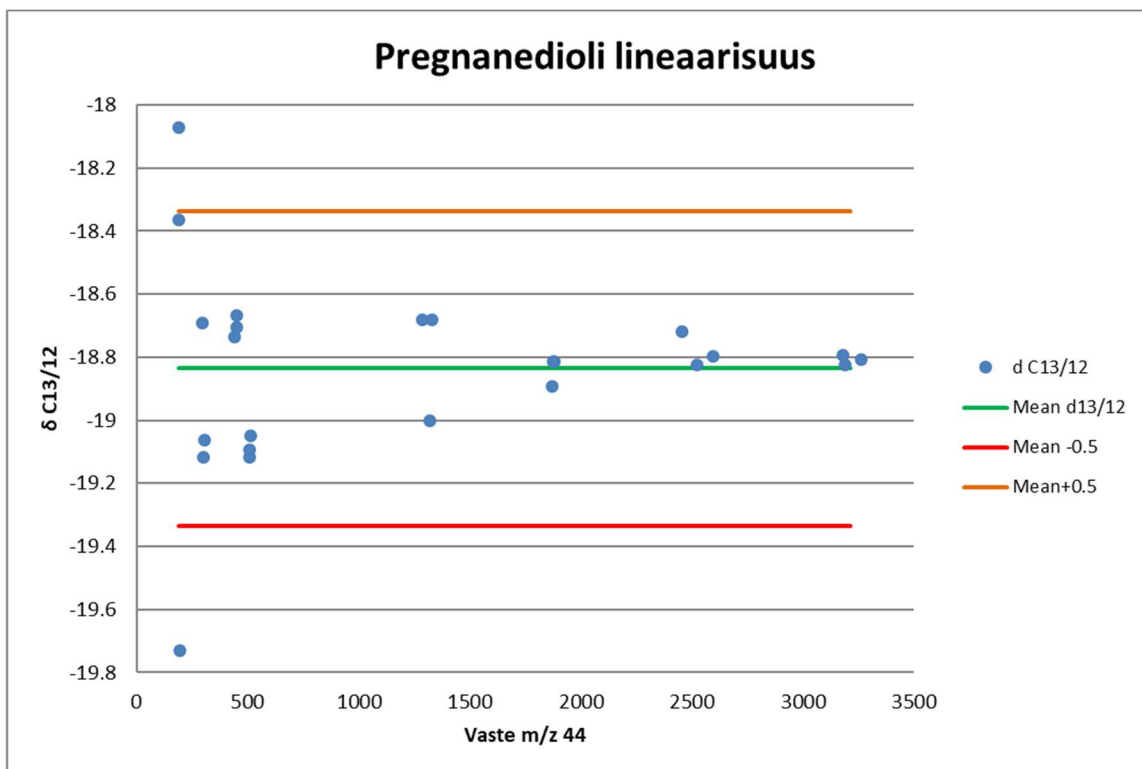
7.2.1 Laitteen lineaarinen mittausalue kohdeyhdisteille

Laitteen lineaarinen mittausalue määritettiin ennen varsinaisen validoinnin alkua ja toisen kerran ionilähteen vaihtamisen jälkeen. Ionilähde jouduttiin vaihtamaan lineaarisuusongelmien takia, eivätkä aiemmin mitatut lineaarisuusalueet enää päteneet. Taulukossa 4 on laitteelle määritetyt lineaarisuusalueet eri ajankohtina. Lineaarisuusalueet esitetään signaalin intensiteetteinä, sillä tarkoilla pitoisuuksilla ei ole IRMS-analysissä merkitystä.

Taulukko 4. Mittausalueet kohdeyhdisteille eri aikoina.

Lineaarisuusalueet ennen ionilähteen vaihtoa				Lineaarisuusalueet 25.7.18 lähtien, ionilähteen vaihdon jälkeen.			
TC/ERC	Vaste m/z 44		Ajo pvm.	TC/ERC	Vaste m/z 44		Ajo pvm.
	Min.	Maks.			Min.	Maks.	
11OHA	260	5180	2018-05-08	11OHA	200	6300	2018-07-30
T	175	3470	2018-05-11	T	230	4250	2018-08-31
5bD	185	3800	2018-05-11	5bD	300	4600	2018-07-26
5aD	380	4350	2018-05-08	5aD	140	4500	2018-07-27
E	530	6400	2018-04-30	E	400	11600	2018-08-31
A	530	6700	2018-05-14	A	450	8000	2018-07-25
PD	185	4460	2018-04-24	PD	300	3260 (4900)	2018-08-31 (2018-07-25)

Kuvassa 18 on esitetty esimerkki PD:n lineaarisuusmittausten kuvaajasta. Vihreä viiva kuvaa delta-arvojen keskiarvoa ja punainen ja oranssi viiva kuvaavat rajoja ($\pm 0,5\%$ keskiarvosta), jonka sisällä mittausten tai niiden keskiarvon tulisi olla niin, että rinnakkaisten mittausten keskihajonta on alle $0,5\%$. Kuvassa vasteeltaan matalimpien mittausten rinnakkaisten keskihajonta on yli $0,5\%$, joten ne eivät kuulu lineaariseen mittausalueeseen.



Kuva 18. Pregnanediolin lineaarisuuskuvaja ionilähteen vaihtamisen jälkeen.

7.2.2 Satunnaisvirhe

Satunnaisvirhettä arvioitiin laskemalla sarjojen sisäistä toistettavuutta positiivisista ja negatiivisista kontrolleista. Tuloksiin (taulukot 5, 6, 7 ja 8) on laskettu retentioaikojen, delta-arvojen ($\delta^{13}\text{C}$) ja delta-delta-arvojen ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) keskiarvot ja keskihajonnat. Taulukoissa on laskettu $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -arvot kaikille yhdisteille käyttäen ERC:nä sekä PD:tä että 11OHA:aa. Toistettavuuteen ja uusittavuuteen ei ole raja-arvoja, mutta tuloksia voidaan verrata WADA:n kriteeriin puhtasaineiden keskihajonnoille mittausalueella, minkä mukaan delta-arvojen keskihajonnan täytyy alittaa 0,5 ‰ rinnakkaisilla mittauksilla [33].

Taulukko 5. Toistettavuus yhdisteittäin samassa sarjassa analysoiduista negatiivisista kontrolleista (Mies0), n=5.

TC/ERC	Ka, retentioaika	StDev, retentioaika	Ka, δ c 13/12	StDev, δ c 13/12	Ka, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC- ERC), ERC = PD	StDev, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC- ERC), ERC = PD	Ka, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC- ERC), ERC = 11OHA	StDev, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC- ERC), ERC = 11OHA
11OHA	646.24	0.30	-24.41	0.25	-0.44	0.36		
5aDiol	539.98	0.28	-24.14	0.41	-0.70	0.35	-0.26	0.62
5bDiol	524.64	0.17	-25.59	0.23	0.75	0.22	1.19	0.45
A	537.44	0.22	-24.10	0.18	-0.74	0.23	-0.31	0.35
Etio	521.78	0.23	-25.69	0.19	0.85	0.31	1.29	0.24
PD	620.22	0.33	-24.84	0.14			-0.44	0.36
Testo	601.18	0.18	-24.87	0.34	0.03	0.44	0.47	0.30

Taulukko 6. Toistettavuus yhdisteittäin samassa sarjassa analysoiduista pos. kontrolleista (PosQc), n=5.

TC/ERC	Ka, retentioaika	StDev, retentioaika	Ka, δ c 13/12	StDev, δ c 13/12	Ka, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = PD	StDev, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = PD	Ka, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = 11OHA	StDev, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = 11OHA
11OHA	659.40	0.24	-23.83	0.09	-0.27	0.22		
5aDiol	550.06	0.09	-27.78	0.09	3.67	0.20	3.94	0.11
5bDiol	534.52	0.11	-27.98	0.08	3.88	0.11	4.15	0.14
A	547.68	0.11	-27.34	0.06	3.24	0.18	3.51	0.12
Etio	531.46	0.09	-27.60	0.09	3.49	0.18	3.76	0.11
PD	631.48	0.23	-24.10	0.17			-0.27	0.22
Testo	601.18	0.18	-24.87	0.34	0.03	0.44	0.47	0.30

Toistettavuuksissa WADA:n kriteeri puhdasaineiden $\delta^{13}\text{C}$ -keskihajonnoille täyttyy kaikilla yhdisteillä. 5 α D:lla on suurehko hajonta. Tulokseen vaikuttavat negatiivisen kontrollin pienet steroidipitoisuudet ja häiritsevä tausta IRMS-ajoissa. 5 α D ei puhdistu riittävän hyvin käytössä olevilla fraktiointimenetelmillä, ja epäpuhtaudet vaikuttavat merkittävästi yhdisteen delta-arvoihin.

Sarjojen välisen uusittavuuden tulokset on esitetty taulukoissa 7 ja 8. Uusittavuuksissa WADA:n kriteeri puhdasaineiden delta-arvojen keskihajonnoille mittausalueella täyttyy kaikilla yhdisteillä. Etio:lla, PD:llä ja T:llä ovat suurimmat hajonnat. Testosteronin tulos johtuu luultavimmin siitä, että sen pitoisuudet negatiivisessa kontrollissa ovat hyvin pienet. Myös PD:n pitoisuus positiivisessa kontrollissa on hyvin pieni. Etio:n kohdalla tulos saattaa johtua sen eluoitumisesta hyvin lähekkäin androsteronin kanssa, jonka delta-arvot ovat positiivisempia, mikä aiheuttaa muutoksia etiokolanolonin delta-arvoihin ja sitä myöten myös hajontaan. Sarjojen välillä keskihajonnat ovat myös luonnollisesti suuremmat kuin sarjojen sisällä, ja lisäksi kaikki tulokset sisältävät mittauksia sekä vanhalla että uudella ionilähteellä, mikä voi vaikuttaa tuloksiin.

Taulukko 7. Uusittavuus yhdisteittäin eri sarjoissa analysoiduista neg. kontrolleista (Mies0), n=5.

TC/ERC	Ka, retentioaika	StDev, retentioaika	Ka, δ c 13/12	StDev, δ c 13/12	Ka, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = PD	StDev, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = PD	Ka, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = 11OHA	StDev, $\Delta\delta$ c 13/12 (TC-ERC), ERC = 11OHA
11OHA	651.32	8.23	-24.50	0.27	-0.11	0.23		
5aDiol	543.86	6.48	-23.88	0.32	-0.73	0.43	-0.62	0.52
5bDiol	528.26	6.01	-25.28	0.23	0.68	0.25	0.79	0.46
A	541.36	6.29	-23.94	0.05	-0.67	0.10	-0.56	0.23
Etio	525.5	5.98	-25.89	0.40	1.28	0.38	1.39	0.57
PD	624.56	7.64	-24.61	0.13			0.11	0.23
Testo	605.72	7.46	-25.07	0.49	0.46	0.40	0.57	0.35

Taulukko 8. Uusittavuus yhdisteittäin eri sarjoissa analysoiduista pos. kontrolleista (PosQc), n=5.

TC/ERC	Ka, retentioaika	StDev, retentioaika	Ka, δ c 13/12	StDev, δ c 13/12	Ka, Δδ c 13/12 (TC-ERC), ERC = PD	StDev, Δδ c 13/12 (TC-ERC), ERC = PD	Ka, Δδ c 13/12 (TC-ERC), ERC = 11OHA	StDev, Δδ c 13/12 (TC-ERC), ERC = 11OHA
11OHA	650.74	8.14	-23.87	0.12	-0.44	0.27		
5aDiol	543.44	6.39	-27.69	0.27	3.38	0.34	3.82	0.27
5bDiol	528.22	5.95	-28.16	0.16	3.85	0.27	4.29	0.16
A	541.28	6.79	-27.43	0.08	3.12	0.30	3.56	0.07
Etio	525.30	6.58	-27.85	0.20	3.54	0.32	3.99	0.17
PD	623.66	7.88	-24.31	0.36			0.44	0.27
Testo	606.28	8.00	-28.34	0.18	4.03	0.32	4.47	0.15

Jokaiselle yhdisteelle laskettiin uusittavuuden epävarmuus u_{prec} käyttäen PosQc:n delta-arvoja. Tulokset on esitetty taulukossa 9. Tulosten laskemiseksi käytettiin kaavaa (2).

$$u_{prec} = \frac{|StDev(\delta C_{13/12})|}{Ka(\delta C_{13/12})} \times 100 \quad (2)$$

Taulukko 9. Uusittavuuden epävarmuus yhdisteittäin.

TC/ERC	u_{prec} %
11OHA	0.48
5aDiol	0.97
5bDiol	0.56
A	0.29
Etio	0.73
PD	1.49
Testo	0.64

7.2.3 Systemaattinen virhe, bias

Systemaattinen virhe laskettiin USADA 34-2 ja USADA 35-1 -virtsanäytteiden tuloksista. Saatuja delta-arvoja verrattiin valmistajan ilmoittamiin delta-arvoihin. Tulokset ja USADA-standardien delta-arvot on esitetty taulukoissa 10 ja 11. Biakselle ei ole raja-arvoja, mutta tuloksia voidaan verrata WADA:n kriteeriin, jonka mukaan puhtasaineen delta-arvo saa poiketa maksimissaan 0,5 % keskiarvosta. Testosteronille ja 11OHA:lle ei laskettu biasta, sillä USADA:t eivät sisällä ko. yhdisteitä.

Taulukko 10. Androsteronin, etiokolonolonin ja pregnanediolin bias USADA 34-2 -näytteellä arvioituna.

Näytetyyppi	Yhdiste	δ 13C/12C	USADA 34-2 referenssiarvo	Referenssiarvon epävarmuus	Bias δ 13C/12C (näyte - referenssiarvo)	Bias % referenssiarvosta
Uutettu näyte	A	-27.437	-27.02	0.18	-0.42	1.54
Uutettu näyte	Etio	-29.05	-28.91	0.11	-0.14	0.48
Uutettu näyte	PD	-31.315	-31.51	0.1	0.20	0.62

Taulukko 11. 5 α -Diolin, 5 β -Diolin ja pregnanediolin bias USADA 35-1 -näytteellä arvioituna.

Näytetyyppi	Yhdiste	δ 13C/12C	USADA 35-1 referenssiarvo	Referenssiarvon epävarmuus u_{ref}	bias δ 13C/12C (näyte - referenssiarvo)	Bias % referenssiarvosta
Uutettu näyte	5aDiol	-30.917	-30.52	0.09	-0.40	1.30
Uutettu näyte	5bDiol	-29.046	-28.98	0.12	-0.07	0.23
Uutettu näyte	PD	-19.014	-18.43	0.12	-0.58	3.17

Kun tuloksia vertailtiin WADA-kriteeriin, huomattiin, että toinen PD-tulos poikkeaa yli 0,5 ‰ referenssiarvosta. Koska kyseessä ei ole puhdasaineesta tehty ajo, vaan virtsaan valmistettu ja uutettu näyte, tulos ei ole täysin vertailukelpoinen kriteerin kanssa ja tulos saattaa poiketa siitä. PD:n mittaustulos pysyy myös mittausepävarmuuden rajoissa: mikäli PD:n delta-arvo on positiivisempi, kuin -36,63 ‰, tulos on menetelmän mittausepävarmuuden (2,73 % ja 1,00 ‰) rajoissa. Virtsanäytteissä pregnandiolin delta-arvot ovat normaalisti välillä -19 ja -26 ‰. Pregnandiolin vasteissa on ollut suurta vaihtelua. Vaikuttaa siltä, että pienikin muutos liuotusreagenssien orgaanisen liuottimen osuudessa aiheuttaa eroja PD:n saantoon, mikä voi vaikuttaa saatuun tulokseen.

Systemaattiselle virheelle laskettiin epävarmuustekijä mittausepävarmuuden arviointia varten. Biaksen epävarmuus laskettiin kaavalla (4).

$$u_{bias} = \sqrt{(bias^2 + u_{ref}^2)} \quad (4)$$

u_{bias} = biaksen epävarmuus

bias = yhdisteen poikkeama % referenssiarvosta

u_{ref} = referenssiarvon epävarmuus.

Pregnandiolille on kaksi U_{bias} -arvoa. Arvot yhdistettiin $U_{bias(RMS)}$ -arvoksi kaavalla (5). Biaksen epävarmuudet on esitetty taulukossa 12.

$$u_{bias(RMS)} = \sqrt{\frac{(u_{bias1}^2 + u_{bias2}^2)}{n}} \quad (5)$$

Taulukko 12. Kohdeyhdisteille lasketut u_{bias} ja $u_{bias(RMS)}$ -arvot.

Näytetyyppi	USADA 34-2		USADA 35-1		
	TC/ERC	u_{bias}	TC/ERC	u_{bias}	$u_{bias(RMS)}$
Uutettu näyte	A	1.55	5aD	1.3039	
Uutettu näyte	Etio	0.50	5bD	0.2574	
Uutettu näyte	PD	0.63	PD	3.171	2.29

7.2.4 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus lasketaan kaavalla (6). Lasketut mittausepävarmuudet yhdisteittäin on esitetty taulukossa 13. 11OHA:lle ja T:lle ei ole laskettu mittausepävarmuuksia, sillä niiden systemaattista virhettä ei ole vielä arvioitu.

$$u_c = \sqrt{u_{prec}^2 + u_{bias(RMS)}^2} \quad (6)$$

u_c = Mittausepävarmuus

u_{prec} = Uusittavuuden mittausepävarmuus

$u_{bias(RMS)}$ = Oikeellisuuden yhdistetty mittausepävarmuus

Taulukko 13. Yhdisteille lasketut mittausepävarmuudet.

Yhdiste	u_c %
A	1.58
Etio	0.88
PD	2.73
5aD	1.62
5bD	0.62
11OHA	
T	

WADA:n mittausepävarmuuskriteerin ($u_{\max} \leq 1,00 \text{ ‰}$) täyttymistä voidaan arvioida ottamalla esimerkiksi yksittäinen mittaustulos. Jos näytteestä saadaan PD:n delta-arvoksi 24,50 ‰ ja mittausepävarmuus on 2,73 %, niin promilleina mittausepävarmuus on 0,67 ‰, mikä alittaa raja-arvon.

7.2.5 Menetelmävertailu

Kölnissä ja YML:ssä analysoitujen näytteiden tuloksille tehtiin jokaisen yhdisteen osalta parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille menetelmien vertailemiseksi. Menetelmät antoivat samoja tuloksia 95 %:n luottamustasolla 5β -androstaanidiolin, androsteronin, etiokolanolonin, pregnandiolin ja testosteronin osalta. 5α -androstaanidiolin osalta menetelmien antamat tulokset poikkesivat merkittävästi 95%:n luottamustasolla. 5α D-fraktioiden IRMS-kromatogrammeissa näkyi häiritsevää taustaa, eivätkä kaikki tulokset olleet käyttökelpoisia, mistä ero luultavimmin johtuu. Menetelmävertailun otoksessa oli vain negatiivisia näytteitä. Kummankin laboratorion menetelmillä kaikista näytteistä saatiin negatiiviset tulokset tai tulosta ei voitu määrittää (inconclusive). Positiivisuutta ei pystytty vertaamaan, sillä käytössä ei ollut positiivisia vertailunäytteitä.

7.2.6 Menetelmän toimivuus

Menetelmän toimivuutta arvioitiin tässä työssä vain 5β -Diolin osalta, sillä validointinäytteiden analysointi on kesken. WADA:n teknisessä dokumentissa (TD IRMS) ohjeistetaan analysoimaan menetelmän toimivuuden arviointiin 20 miehen 20 naisen negatiivista virtsanäytettä [26]. 5β -Diolin osalta käytettävissä oli yhteensä 21 tulosta ja muiden osalta vieläkin vähemmän. Tuloksista ei voi vetää varmoja johtopäätöksiä. Taulukossa 14 on esitetty WADA:n kriteerit ja näytteiden 5β -Diolin $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -arvojen tulokset laskettuna kummankin endogeenisen referenssiyhdisteen kanssa.

Taulukko 14. Menetelmän toimivuuden osittaiset tulokset 5β -Diolille.

ERC	TC	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ St.Dev.		$\Delta\delta^{13}\text{C}$ Ka + 2*St.Dev.	
		Wada kriteeri	Tulos	Wada kriteeri	Tulos
PD	5β -Diol	$\leq 1,2\text{‰}$	0.80	$\leq 3\text{‰}$	2.23
11OHA	5β -Diol	$\leq 1,2\text{‰}$	0.72	$\leq 3\text{‰}$	2.48

Tulokset pysyvät WADA:n kriteereissä, ja niiden pohjalta voidaan suuntaa antavasti arvioida, että menetelmä tulee todennäköisesti olemaan sopiva ja toimiva 5 β -Diolille.

7.2.7 Säilyvyys

Muutamassa fraktiossa näytteistä, jotka mitattiin kahteen kertaan, näytti olevan eroavaisuuksia delta-arvoissa kolmen päivän kuluttua ensimmäisen mittauksen jälkeen. Tarkastelussa huomioitiin mittaukset, joissa delta-arvo poikkesi enemmän kuin 0,5 % jompaan kumpaan suuntaan. Sitä, kumpaan suuntaan delta-arvot poikkeavat, tai että minkä yhdisteen delta-arvot muuttuvat todennäköisimmin, ei pystytä luotettavasti arvioimaan näin pienen otoksen pohjalta. Varmojen johtopäätösten vetoon säilyvyydestä tarvitaan suurempi otos. Lähtökohtana analyysissä kuitenkin on, ettei näytteitä seisoteta, vaan ne laitetaan ajoon valmistuttuaan.

8 Yhteenveto

Jatkotoimenpiteet

Esikäsitteilyn entsyymaattista hydrolyysiä voisi tulevaisuudessa yrittää lyhentää. Entsyymien valmistajan mukaan optimi-pH:ssa (6,0–6,5) ja 46 °C:ssa glukuronidikonjugaattien pilkkoutuminen on nopeaa. 45 min riittää em. lämpötilassa [37]. Työssä käytettiin tunnin inkubointia korkeammassa 50 °C:ssa, joten lyhyempi inkubointi voi riittää.

Fraktiointimenetelmiä ei onnistuttu nopeuttamaan ja niitä voisi vielä yrittää kehittää niin, että vain yksi fraktiointi riittäisi. Parissa muussa Euroopan dopinglaboratoriossa tällainen menetelmä on saatu toimimaan. Fraktiointimenetelmä pitäisi tehdä kokonaan uusiksi niin, että kokeiltaisiin erityyppistä kolonnia ja erilaista LC-metodia. Metodien pituuden voisi maksimissaan kaksinkertaistaa yhdestä tunnista kahteen pidentämällä portaittaisia gradientteja ja/tai lisätä ja yrittää erittäin hitaasti ja tasaisesti nousevaa gradienttia. Vaikka ajoaika kaksinkertaistuisi, näytteet olisivat seuraavana aamuna valmiina fraktioituina, eikä fraktiointiin tarvitsisi käyttää toista kokonaista päivää. Kummatkin käytössä olleet LC-kolonnit (C18 ja Diphenyl) tulisi testata uutta metodia varten sekä lisäksi voisi testata pienempipartikkelisempaa kolonnia. Aikaisemmin laboratoriossa on testattu yhden fraktioinnin menetelmää, mutta se ei ACE 5 C18 -kolonnilla onnistunut. Nyt validoitavassa

menetelmässä toinen fraktiointi on tehty testosteronin huonon erottumisen vuoksi. Validoinnin aikana huomattiin, että myös 5 α D erottuu huonosti epäpuhtauksista. Isotooppisuhdemassakuvaajassa 5 α D-piikin molemmiin puolin näkyy epäpuhtautta, joka vaikuttaa 5 α D:n delta-arvoihin merkittävästi pienillä pitoisuuksilla. Fraktiointimenetelmää voidaan siis joutua joka tapauksessa kehittämään lähitulevaisuudessa. Yhdisteiden säilyvyyksiä aiotaan tutkia vielä enemmän ajamalla vanhoja validointisarjoja uudestaan.

Päätelmät

Jokaisessa sarjassa ajatut CRM-näytteet antoivat oikeat tulokset mittausepävarmuuden rajoissa yhdellä poikkeuksella. Validointisarjan 1 uusinnassa pregnandiolin delta-arvo poikkesi 0,52 ‰ USADA 35-1 -näytteessä, kun raja on 0,5 ‰. Voidaan kuitenkin todeta, että saadut tulokset ovat luotettavia kaupallisten referenssistandardien perusteella.

Laitteen lineaarinen mittausalue määritettiin kahteen kertaan, sillä laitteessa oli ongelmia lineaarisuuden kanssa. Aluksi vesitausta oli matala ja IRMS:iin asennettiin lisähappimoduuli korjaamaan tilannetta. Myöhemmin ilmeni vieläkin vakavampia lineaarisuusongelmia, ja lopulta koko massa-analysointilaitteen ionilähde oli vaihdettava. Lineaarisuusongelmien lisäksi Conflo IV -moduulissa katkesi reference gas open splitin kapillaari. Ongelmat viivyttivät validointityötä kuukausia ja jotkut validointisarjoista jouduttiin uusimaan, mutta ionilähteen vaihdon jälkeen laite on toiminut lineaarisesti eikä suuria viivytyksiä enää tapahtunut. Lineaarinen mittausalue määritettiin uudestaan ionilähteen vaihdon jälkeen ja vasterajat ovat käytössä.

Tehtyjen testien perusteella ei voida vielä varmuudella sanoa, että menetelmä täyttää sille asetetut kriteerit. Validointityö on onnistunut tähän asti hyvin, mutta viivästysten takia se on edelleen kesken. Menetelmän toistettavuudet ja uusittavuudet ovat hyvät, mutta 5 α D:n kohdalla on sellaisia epäpuhtausongelmia, jotka on ratkaistava ennen kuin 5 α D:n mittaaminen menetelmällä voidaan todeta luotettavaksi. Tähän mennessä analysoitujen tulosten perusteella menetelmä vaikuttaa tarkoituksenmukaiselta ja toimivalta, etiokolanolonin, androsteronin, 5 β -androstaaniidiolin ja pregnandiolin mittaamisessa. Testosteronista ja 11-hydroksiandrosteronista ei ole vielä oikeellisuustuloksia ja ne määritetään validoinnin myöhemmissä vaiheissa, mutta niiden toistettavuudet ja uusittavuudet ovat hyvät.

Opinnäytetyön aikana kerättyjä tuloksia voidaan käyttää myöhemmin validoinnissa, kun loput validointisarjat on saatu mitattua, ja saatua tietoa menetelmäkehityksessä. Opinnäytetyön ansiosta ollaan myös lähempänä validoinnin onnistumista ja WADA-määräysten täyttämistä.

Lähteet

- 1 World Anti-Doping Code 2015 with 2018 amendments. 2015. World Anti-Doping Agency.
- 2 Who We Are | World Anti-Doping Agency. 2018. Verkkoaineisto. WADA. <https://www.wada-ama.org/en/who-we-are>. Päivitetty 2018. Luettu 8.5.2018.
- 3 Maailman antidopingtoimisto WADA. Verkkoaineisto. Suomen Urheilun Eettinen Keskus SUEK ry. <<https://www.suek.fi/maailman-antidopingtoimisto-wada>>. Luettu 8.5.2018.
- 4 International Standards | World Anti-Doping Agency. 2018. Verkkoaineisto. WADA. <<https://www.wada-ama.org/en/international-standards>>. Luettu 8.5.2018
- 5 The World Anti-Doping Code. 2018. International Standard. Prohibited List January 2018. WADA.
- 6 World Anti-Doping Agency. 2015 Anti-Doping Testing Figures – Laboratory Report.
- 7 WADA Laboratory Expert Group. 2015. WADA Technical Document – TD2016EAAS. Endogenous Anabolic Androgenic Steroids - Measurement and Reporting.
- 8 World Anti-Doping Code – International Standard. 2018. Code Compliance by Signatories April 2018. World Anti-Doping Agency.
- 9 ADAMS | World Anti-Doping Agency. Verkkoaineisto. <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/adams>>. Luettu 19.5.2018.
- 10 Why does USADA collect a minimum of 90mL of urine during sample collection? 2014. Verkkoaineisto. USADA. < <https://www.usada.org/why-does-usada-collect-a-minimum-of-90ml-of-urine/>>. Luettu 20.5.2018.
- 11 Dopingvalvonta – www.suek.fi. Verkkoaineisto. Suomen Urheilun Eettinen Keskus SUEK ry. <<https://www.suek.fi/dopingvalvonta>>. Luettu 20.5.2018.
- 12 World Anti-Doping Code – International Standard. Testing and Investigations January 2017. World Anti-Doping Agency.
- 13 Lipidit. Verkkoaineisto. Internetix-Lukion ja peruskoulun kursseja. <http://opinnot.internetix.fi/fi/materiaalit/bi/bi2/02_solun_biomolekyylit/03_lipidit?C:D=1464653&m:selres=1464653> ja http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/ke/ke1/5._bio-orgaaninen_kemia/5.3lipidit?C:D=2141385&m:selres=2141385>. Luettu 26.9.2018.

- 14 H.L.J. Making & D.B. Gower & D.N. Kirk. 1995. Steroid Analysis. Chapman & Hall.
- 15 Huhtaniemi Ilpo ja Toppari Jorma. 2017. Miehen lisääntymistoimintojen säätely. Duodecim Oppiportti. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Verkkoartikkeli. Luettu 26.9.2018.
- 16 Seppälä Timo. 2006. Testosteroni ja sen dopingkäytön osoittaminen. Suomen Urheilun Eettinen Keskus SUEK ry. Verkkodokumentti. <<https://www.suek.fi/documents/10162/40614/Testosteroni+ja+sen+dopingk%C3%A4yt%C3%B6n+osoittaminen>>. Luettu 26.9.2018.
- 17 Schänzer Wilhelm. 1996. Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clinical Chemistry 42:7 1001-1020. Institute of Biochemistry, German Sports University of Cologne. Verkkoartikkeli. Luettu 26.9.2018.
- 18 Delvin Thomas M. 7th edition. 2011. Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations. John Wiley & Sons, Inc.
- 19 Gupta Harika. Testosterone: Meaning, Source and Synthesis (With Diagram). <http://cdn.biologydiscussion.com/wp-content/uploads/2016/02/clip_image002-26.jpg>. Verkkoartikkeli. Luettu 27.9.2018.
- 20 Walder Gary I. & Hainline Brian. 1989. Drugs and the Athlete. F. A. Davis Company.
- 21 Videnoja Laura Susanna. 2013. Luontaisten steroidien dopingkäytön osoittaminen analyttisin menetelmin. Pro gradu -tutkielma. Helsingin yliopisto.
- 22 O'Leary Marion H. 1981. Carbon Isotope Fractionation in Plants. Pergamon Press Ltd.
- 23 Cawley Adam T. & Flenker Ulrich. 2008. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. Wiley InterScience: John Wiley & Sons, Ltd.
- 24 Flenker Ulrich, Günter Ute & Schänzer Wilhelm. 2007. $\delta^{13}\text{C}$ -Values of endogenous urinary steroids. Institute of Biochemistry, German Sports University of Cologne. Elsevier Inc.
- 25 Leinonen Antti, Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy. "Luonnollisten aineiden" dopingkäytön toteaminen. Power Point-esitys. Luettu 3.10.2018.
- 26 WADA Laboratory expert group. 2015. WADA Technical Document - TD2016IRMS. Detection of Synthetic Forms of Endogenous Androgenic Anabolic Steroids by GC/C/IRMS. WADA - World Anti-Doping Agency.

- 27 Bowers Larry D., Hilderbrand Richard L. & Symanski Elisha J. 2003. Application of Gas Chromatography-Combustion-Isotope ratio Mass Spectrometry to Doping Control. 2nd Annual USADA Symposium on Anti-Doping Science Los Angeles California, USA. United States Anti-Doping Agency. Colorado Springs, Colorado, USA.
- 28 Niiranen Jukka. 2016. Kromatografia Kevät 2016 TB15S- power-point esitys. Opetusmateriaali, Metropolia Ammattikorkeakoulu. Luettu 10.10.2018.
- 29 Thermo Fisher Scientific. IRMS Operator Training -opetusmateriaali.
- 30 Fox Cynthia. Modified 5/2018. Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry. Power Point -esitys. <<https://slideplayer.com/slide/12873740/>>. Kuva kopioitu 30.10.2018.
- 31 De la Torre Xavier, Colamonici Cristiana, Curcio Davide, Molaionni Francesco & Botre 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, 23-29. Elsevier.
- 32 Toukoniitty Esa. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Massaspektrometria -opetusmateriaali. L_7_MS.ppt -Powerpoint -esitys. Luettu 16.10.2018.
- 33 Niiranen Jukka. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Yhdistelmätekniikat-opetusmateriaali. Yhdistelmätekniikat_ja_menetelmän_kehitysK2018.pdf -dokumentti. Luettu 16.10.2018.
- 34 Arizona Board of Regents. 2005. Gas Source: Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS). Verkkoaineisto. SAHRA-Isotopes. <<http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/methods/gas.html>>. Kuva kopioitu 30.10.2018.
- 35 Ion Collectors and Detectors -Power Point-esitys. Verkkoaineisto. SIMION® Ion and Electron Optics Simulator, Scientific Instrument Services Inc. Luettu 17.10.2018. <https://simion.com/hipirms/d4_lecture.pdf>.
- 36 Dr. T. Piper, Dr. Corinne Buisson & Dr. X. de la Torre. GC-C-IRMS Technical Note. World Anti-Doping Agency.
- 37 β -Glucuronidase from E. coli K 12 | Sigma-Aldrich. Verkkoaineisto. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/bgalsro?lang=fi®ion=FI&gclid=EAlaIQobChMIxtHTHdbB3QIVGc53Ch0G-wjE-AAYASAAEgLSCvD_BwE>. Luettu 17.9.2018.
- 38 HuLaDo/Katja Rautava 24.4.2018. Validointisuunnitelma, IRMS_04_Ver 2.0. Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy sisäinen dokumentti.

Työssä käytetyt reagenssit

Taulukko 1. Validointityössä käytetyt reagenssit työvaiheittain.

Työn vaihe ja käyttötarkoitus	Reageenssin nimi	Valmistaja ja tuotenumero	Eränumero	Pitoisuus	Liutin	Käytetty
UUTTO						
Matriisi	Keinotekoinen virtsa, pH 6,0	Sisäinen, LIRG-190	19.6.17 Mihyv			Validointisarja 2
	Keinotekoinen virtsa	Sisäinen, LIRG-190	040418Mihyv			Validointisarja 2 uusinta
Pesu	Diethyl Ether	Merck KGaA, 1.00921.5000	K47900821624			Validointisarjat 1-6
Eluointi	Metanoli	VWR Chemicals, 20864.320				Validointisarjat 1-6
Hydrolyysi	b-Glucuronidase from E.coli K12	Roche Diagnostics GmbH, 03707601001	27721521			Validointisarjat 1-6
Hydrolyysi	Kaliumnatriumfosfaattipuskuri	Sisäinen, LIRG-186	16.5.2018 Mihyv	0,1 mol/l, pH 7,0		Validointisarjat 1-6
Nesteutto	K ₂ CO ₃ 20% - KHCO ₃ 20%	Sisäinen, LIRG-279	13/02/18 takor/vikii			Validointisarjat 1-6
Nesteutto	tert-Butylb methyl ether	Sigma-Aldrich, 34875-2.5L-M	STBG9095			Validointisarjat 1-6
LC1-FRAKTIOINTI						
Ajoliuos B	Asetonitrili	Merck, 1.00030.2500	I802830545			Validointisarjat 1-2
			I879530715			Validointisarjat 3, 4, 5, 6 sekä 2 ja 1 uusinnat
Retentioaikastandardi	IRMS RT LC1 Mix	Sisäinen	190418 Maattsa		MeOH	Validointisarjat 1-6
ISTD Kanta	IRMS-LC1 ISTD kantaliuos	Sisäinen	20.2.2018 takor/Vikii		MeOH	Validointisarjat 1-6
	IRMS LC ISTD kantaliuos	Sisäinen, LIRG-726	28/05/18 vikii		MeOH	Validointisarja 1 ja 2 uusinnat

Taulukko 2. Taulukko validointityössä käytetyistä reagensseista työvaiheittain jatkuu.

LC2-FRAKTIOINTI						
Ajoliuos B	Metanoli	VWR Chemicals, 20864.320	18B064013			Validointisarjat 1-3 ja 6
			18C014015			Validointisarjat 4, 5
			18D114003			Validointisarjat 2 uusinta
			18D274014			Validointisarjat 1 uusinta
Retentioaikastandardi ja ISTD kanta	17a-Methyltestosterone	Sisäinen	TA 13.3.18	100 µg/ml	MeOH	Kaikki Validointisarjat
Retentioaikastandardi kanta	Testosterone	Sisäinen, KLP-130/1	271107tm	1 mg/ml	MeOH	Kaikki Validointisarjat
IRMS-analyysi						
*RSTD kanta	5a-androstan-3b-ol	Sisäinen	070917Vikii/Tuaho	1 mg/ml	CHX:IPA	Kaikki Validointisarjat
RSTD:n laimennokset	Sykloheksaani	Sigma-Aldrich, 650455-1L	MKBD0455			Validointisarjat 1-5
RSTD:n laimennokset	Sykloheksaani	Sigma-Aldrich, 34855	SZE9307B			Validointisarjat 6, 1 ja 2 uusinnat
RSTD:n laimennokset	2-propanoli		TA 7.9.17			Validointisarjat 1-6
	2-propanoli	Sigma-Aldrich, 34863-2.5L-M	STBH1746			Validointisarja 2 uusinta
			STBH4332			Validointisarja 1 uusinta
Referenssistandardi	IRMS MIX1	Sisäinen	130617Karau		CHX:IPA	Kaikki Validointisarjat
Referenssistandardi	IRMS MIX2	Sisäinen	130617Karau		CHX:IPA	Kaikki Validointisarjat
Referenssistandardi	USADA 34-2	Herbert Tobias, Brenna Laboratory, Cornell University	151216Vikii (lyofilisoidun referenssistandardin liuotus)	200 µg/ml	CHX:IPA	Kaikki Validointisarjat
Referenssistandardi	USADA 35-1	Herbert Tobias, Brenna Laboratory, Cornell University	151216Vikii (lyofilisoidun referenssistandardin liuotus)	200 µg/ml	CHX:IPA	Kaikki Validointisarjat

*RSTD-kantaliuoksesta valmistettiin noin kerran viikossa tai joka kerta uusi käyttöliuos laimentamalla sykloheksaanin ja isopropanolin seokseen (4 osaa sykloheksaania + 1 osa isopropanolia). Sopivaksi pitoisuudeksi havaittiin noin 8 µg/ml. Käyttöliuos ei säily montaa viikkoa. IRMS- analyysissä alkaa näkmään hiilivetykontaminaatiota, kun RSTD käyttöliuos on seissyt 2-3 viikkoa.

IRMS_100. M ja LC2_45 -HPLC-metodien parametrit

Taulukko 1. LC:n autosamplerin parametrit.

1100 Autosampler 1, Methods IRMS_100.M & LC2_45.M	
Injection Mode	Needle Wash
Injector Volume	100.00 µl
Wash Vial	91
Drawspeed	200 µl/min
Ejectspeed	200 µl/min
Draw position	0.0 mm

Taulukko 2. LC:n pumpun parametrit.

1100 Binary Pump		
Method	IRMS_100.M	LC2_45.M
Column flow	1.000 ml/min	1.000 ml/min
Stoptime	55.00 min	45.00 min
Posttime	5.00 min	5.00 min
Solvent A 1	58.0 % (H2O)	55.0 % (H2O)
Solvent B 1	42.0 % (ACN 90%)	45.0 % (MeOH)

Taulukko 3. Fraktiointimetodien gradientin aikaohjelmat.

1100 Binary Pump Timetable		
IRMS_100.M	Time	Solvent B %
	33.00	42.0
	33.01	61.0
	37.00	72.0
	41.00	72.0
	41.10	100.0
	53.00	100.0
	53.10	42.0
LC2_45.M	Time	Solvent B %
	40.00	45.0
	40.10	100.0
	49.00	100.0
	49.10	45.0

Taulukko 4. LC-metodien kolonniuunin ohjelmat.

1100 Colum Thermostat 1, Methods IRMS_100.M & LC2_45.M	
Left temperature	38.0 °C
Right temperature	38.0 °C
Enable analysis	When temp. Is within setpoint +/- 0.8 °C

Taulukko 5. LC-metodien detektorin parametrit.

1100 Diode Array Detector 1, Methods IRMS_100.M & LC2_45.M						
Signal	Wavelength (nm)	Bandwidth (nm)	Reference (nm)	Reference bandwidth (nm)	Peak width	Slit
A	192	4	550	100	0.1 min	4 nm
B	245	10	550	100		
C	195	10	550	100		

TriPlus RSH Autosamlerin parametrit metodissa 2ul.rsh.meth

The screenshot displays the configuration window for the TriPlus RSH Autosampler, titled "TriPlus RSH Autosampler - GC Liquids". The interface is organized into several sections with tabs for "General", "Washes", "Sync", "Advanced", and "CoolTray".

Injection port: Injector: Injector A (SSL), Type: Single

Injection mode: Mode: Basic

Rapid mode: Rapid mode: Disable

Syringe type: Syringe volume (µL): 10.0, Needle length (mm): 57

Sampling: Sample volume (µL): 2.0, Plunger strokes: 6, Air and filling mode: Custom, Air volume (µL): 1.0, Filling volume (µL): 5.0

Injection: Injection depth: Custom, Pre-injection dwell time (s): 1.0, Post-injection dwell time (s): 2.0, Fast injection, Injection depth (mm): 45, Penetration speed (mm/s): 50, Injection Speed (µL/s): 55.0

Sampling depth in vial: Sample vial depth (mm): 30.0, Bottom sense, Height from bottom (mm): 1.0

Sample viscosity: Sample type: Custom, Sample pullup speed (µL/s): 1, Delay after plunger strokes (s): 0.2, Viscosity delay (s): 0.2

On the right side, there is a diagram of a syringe with labels "Sample" and "Air" indicating the injection point.

Kuva 1. Yleisiä tietoja IRMS-systeemin autosamlerista ja injektorista.

Instrument Evaluation

Oven S/SL (front) Run Table

S/SL mode: Splitless w/Surge Carrier mode: Constant Flow

Inlet

Temperature: 260 °C
Split flow: 50.0 mL/min
Split ratio: 33.3
Splitless time: 1.50 min

Surge

Surge pressure: 50.000 psi
Surge duration: 1.50 min

Septum purge

Purge flow: 5.0 mL/min
Constant septum purge:
Stop purge for: 1.50 min

Carrier flow

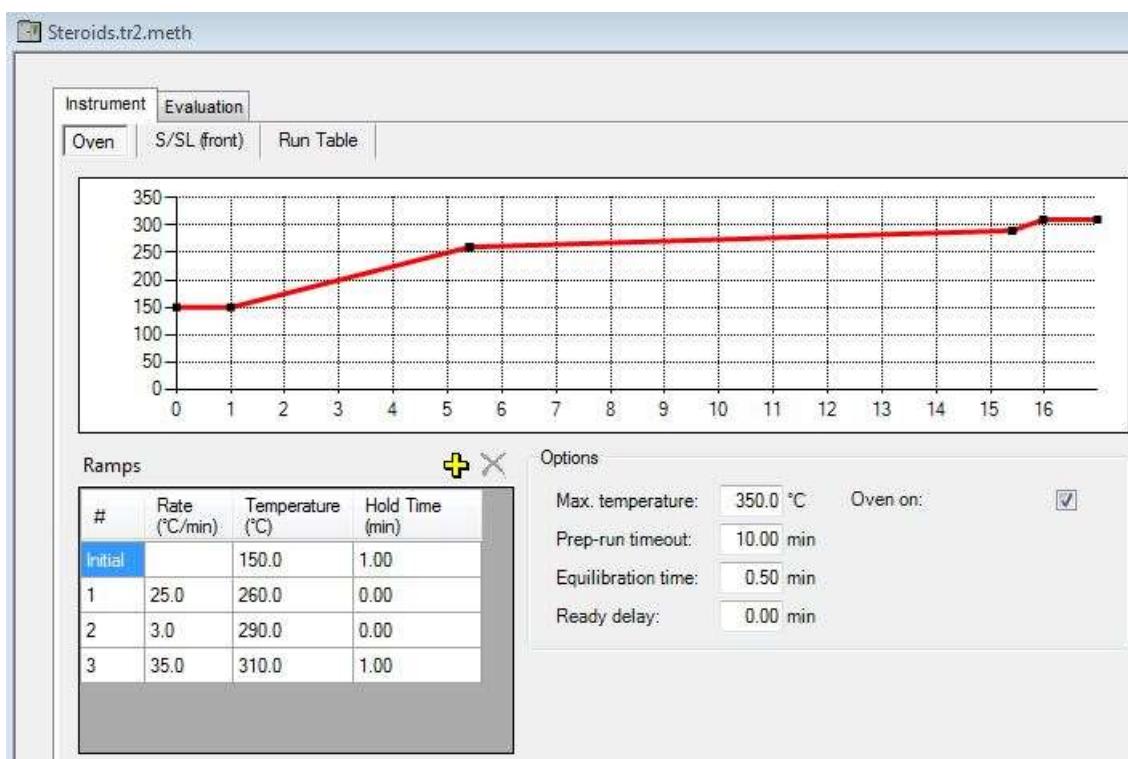
Flow: 1.500 mL/min

Carrier options

Vacuum compensation:
Carrier gas saver:
Gas saver flow: 20.0 mL/min
Gas saver time: 2.00 min



Kuva 2. IRMS-Systemin injektorin parametreja.

Trace 1310 Kaasukromatografिन parametrin metodissa Steroids.tr2.meth



Kuva 1. IRMS-systeemin kaasukromatografिन uunin lämpötilaohjelma.

Delta V Plus IRMS -massa-analysaattorin parametrit metodissa Steroids.met

Experiment	Continuous flow
Configuration	Trace 1300 + RSH
Comment	<input type="text"/>
Gasconfiguration	CO2
Acquisition Script	Acquisition.isf  
Interference Correction	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input type="text"/>
Isotope MS	
Integration Time [ms]	0.200 [s]
Peak Center	
Delay Settings	Cup Selection
Pre center delay [s] 15	Pre Analysis Cup 3
Post center delay [s] 15	
Reference Device for Peak Center	
<input type="checkbox"/> Use Scripts	
Reference Port	Reference Automatic
Auto Dilution	
<input type="radio"/> Dynamic (smartEA only)	- CO2 -
<input checked="" type="radio"/> Fixed	Reference Intensity [mV] 2000.00
	Sample Dilution [%] 0.00

Kuva 1. Yleisiä tietoja Delta V Plus-komponentista.

Instrument	Time Events	Compound Names	Evaluation@CO2	Pe.
Time [s]	Reference Automatic	Backflush	He Valve only	
1		●		
10	●			
30		●		
60	●			
80		●		
110	●			
130		●		
160	●			
180		●		
210	●			
230		●		
260	●			
280		●		
350			●	
800		●		
840	●			
860		●		
890	●			
910		●		
940	●			
960		●		
990	●			
1010		●		

Kuva 2. Massa-analysaattorin metodin aika-ohjelma.

Instrument	Time Events	Compound Names	Evaluation@CO2	Peak Detection@CO2	Printout@CO2
No	Compound Name	Ret [s]	Wnd [s]	Min Height[mV]	
1	rstd	433.0	10.0	50.0	
2	5bDiol	521.0	10.0	50.0	
3	5aDiol	536.0	10.0	50.0	
4	Testo	597.0	10.0	50.0	
5	PD	615.0	10.0	50.0	
6	Etio	518.0	10.0	50.0	
7	And	534.0	10.0	50.0	
8	11OHA	642.0	10.0	50.0	
9	cholestane	699.0	10.0	50.0	
10					

Kuva 3. Detektoitavien yhdisteiden nimet ja tunnistusparametrit (retentioajat voivat olla muuttuneet).

Evaluation Type:

CO2_SSH >>

Ref. Nr.	Ref. Time:	Ref. Name:	d 13C/12C	vs.	d 18O/16O	vs.
1	280.00	CO2 YML	-30.770	VPDB	0.000	VSMOW
2	910.00	CO2 YML	-30.770	VPDB	0.000	VSMOW

Kuva 4. Kalibroitikaasun (hiilidioksidin) tiedot.

Instrument | Time Events | Compound Names | Evaluation@CO2 | Peak Detection@CO2 | Printout@CO2

Peak Detection: Background Detection: Detection on Mass: 44 Spike Filter:

Detection Parameter

Start Slope [mV/s] 0.2

End Slope [mV/s] 0.4

5

Peak Resolution [%] 5

Max Peak Width [s] 40

Background Parameter

Background Type Individual BGD

History [s] 5

Calculation Option

Ampere Calculation Component List

Offset [s] 0

Timeshift

Perform Timeshift (Limit 1 Data Point) Extended Timeshift Max Timeshift [sec] 0.5

Square Pulse Recognition / Timeshift Suppression

Enable Factor 0.55 rArea / Pk Width / Pk Height

Post Evaluation Filter Parameter

Peak Min Height Filter [mV] 100 Max Peak Width Filter [s] 0

Kuva 5. Piikkien havaitsemiseen liittyvät parametrit.

ISQ-kvadrupolimassaspektrometrin parametrit metodissa Steroids.meth

Instrument Method: Steroids.meth

```

ISQ Series Method

Method type: Acquisition - General
MS transfer line temperature: 290 °C
Ion source temperature: 230 °C
Use acquisition threshold: No
Ionization mode: EI
Run completion: Stop after 13 min
Segment #1:
  Start time: 4.5 min
  Filament/multiplier/dynode on: Yes
  Chromatography filter on: Yes
  Chrom. filter peak width time: 1 sec
  Use tune file emission current: Yes
  Use last tuned detector gain: Yes
  Use tune file electron energy: Yes
  Calibration gas: Off
Scan #1
  Tune file: (Last Saved)
  Ion polarity: Positive
  Data type: Centroid
  Start mass: 40 amu
  End mass: 600 amu
  Scan time: 0.2 sec

NOTICE: If this method uses a linked external file in timed mode or is used
for an AutoSIM acquisition run, please see the scan header report in the raw
file for scan event source information.

```

Kuva 1. ISQ-kvadrupolimassan metodin parametreja.

EI Ion Source Type	EI
Polarity	Positive
Electron Lens Voltage	15 V
Electron Energy	70 eV
Emission Current	35 µA
Ion Guide Frequency	1682.9
Q1 Frequency	1087.0
Multiplier Voltage	1249.9 V
Detector Gain	3.8×10^5
MS Transfer Line	289.9 °C
Filament Selection	1
Ion Source Temperature	230.0 °C

Kuva 2. Lisää tietoja ISQ-kvadrupolimassadetektorista.

Validointisarjat

Taulukko 1. Tietoja validointisarjoista 1/2.

Sarja	Näytteet	Uutto (ml)	F1 iutus (µl)	F2 iutus (µl)	F3 iutus (µl)	F4 iutus (µl)	F5 iutus (µl)	F6 iutus (µl)
Validointisarja 1. Sarjan sisäinen toistettavuus 1/2 ja sarjojen välinen toistettavuus 1/5.								
	Mies0-1	15	220	40	115	40	1000	45
	Mies0-2	15	220	40	115	40	1000	45
	Mies0-3	15	220	40	115	40	1000	45
	Mies0-4	15	220	40	115	40	1000	45
	Mies0-5	15	220	40	115	40	1000	45
	PosQC	10	235	60	195	65	1000+2000	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
Validointisarja 1 U								
	Mies0-1	15	240	30	70	30	1000	45
	Mies0-2	15	240	30	70	30	1000	45
	Mies0-3	15	240	30	70	30	1000	45
	Mies0-4	15	240	30	70	30	1000	45
	Mies0-5	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQC	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
Validointisarja 2. Oikeellisuus 1/3 ja sarjojen välinen toistettavuus 2/5.								
	Mies0	15	220	40	115	40	1000	45
	PosQC	10	235	60	195	65	2000	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
	USADA 34-2	20 µl	50	50	50	50	50	50
	USADA 35-1	20 µl	50	50	50	50	50	50
	IRMS Mix 1	50 µl	-	50	-	-	40	40
	IRMS Mix 2	50 µl	40	-	-	-	40	-
Validointisarja 2 Uusinta								
	Mies0	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQC	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
	USADA 34-2	10µl	-	-	-	-	40	25
	USADA 35-1	10µl	-	-	30	30	-	25
	IRMS Mix 1	50µl	-	80	-	-	50	25
	IRMS Mix 2	50µl	80	-	35	35	-	-
Validointisarja 3. Sarjan sisäinen toistettavuus 2/2 ja sarjojen välinen toistettavuus 3/5.								
	Mies0	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQC_1	10	240	120	125	55	2500	20
	PosQC_2	10	240	120	125	55	2500	20
	PosQC_3	10	240	120	125	55	2500	20
	PosQC_4	10	240	120	125	55	2500	20
	PosQC_5	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20

Taulukko 2. Tietoja validointisarjoista 2/2.

Sarja	Näytteet	Uutto (ml)	F1 iuotus (µl)	F2 iuotus (µl)	F3 iuotus (µl)	F4 iuotus (µl)	F5 iuotus (µl)	F6 iuotus (µl)
Validointisarja 4. Spesifisyys/menetelmän toimivuus 1/9 ja sarjojen välinen toistettavuus 4/5.								
	Mies0	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQC	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
	M14	11	75	21	88	20	1515	51
	M15	20	37	20	31	20	480	20
	M16	20	70	20	51	20	1600	80
	M17	20	43	26	71	23	2060	86
	M18	20	87	20	23	20	870	20
Validointisarja 5. Spesifisyys/menetelmän toimivuus 2/9 ja sarjojen välinen toistettavuus 5/5.								
	Mies0	15	15	240	30	70	30	1000
	PosQC	10	10	240	120	125	55	2500
	RBL	10	10	20	20	20	20	20
	UN1	20	129	20	20	20	650	23
	UN2	20	2550	20	26	43	3350	20
	UM1	20	1400	20	30	37	1950	43
	UM2	20	280	20	24	20	670	20
	UM3	10	1650	20	41	28	1750	36
Validointisarja 6. Spesifisyys/menetelmän toimivuus 3/9.								
	Mies0	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQc	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
	UM4	20	41	20	20	20	103	20
	UM5	20	1400	20	35	34	2150	30
	UM6	20	505	20	34	20	1100	27
	UM7	20	1120	20	20	20	290	20
	UM8	20	925	20	21	29	1100	28
Validointisarja 7. Spesifisyys/menetelmän toimivuus 4/9.								
	Mies0	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQc	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
	UM9	20	460	20	25	20	380	20
	UM10	20	460	30	20	20	870	20
	UM11	20	150	20	35	20	750	30
	UM12	20	310	20	20	20	340	20
	UM13	20	225	20	20	20	105	20
Validointisarja 8. Oikeellisuus 2/3 ja spesifisyys/menetelmän toimivuus 5/9.								
	Mies0	15	240	30	70	30	1000	45
	PosQc	10	240	120	125	55	2500	20
	RBL	10	20	20	20	20	20	20
	M02g	20	1000	20	35	20	920	20
	M25e	20	340	20	25	20	740	20
	UN3	20	980	20	75	20	2500	50
	UN4	20	950	20	20	20	1400	40
	UN5	20	370	20	50	20	2700	80