

Virpi Kiiskinen

# GC/EI-MS -menetelmä glyserolin määrittämiseksi virtsasta dopinganalyttisiin tarkoituksiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Opinnäytetyö

16.12.2014

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Virpi Kiiskinen GC/EI-MS -menetelmä glyserolin määrittämiseksi virtsasta dopinganalyttisiin tarkoituksiin 45 sivua 16.12.2014
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	FT Antti Leinonen FL Jukka Niiranen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:ssä huume-, lääkeaine- ja dopingosastolla dopinganalyttisiin tarkoituksiin.</p> <p>Työn tarkoituksena oli saada käyttöön uusi menetelmä glyserolin määrittämiseksi virtsasta. "Glyserolitankkausta" uskotaan käytettävän peiteaineena urheilussa ja se lisättiin vuoden 2013 kiellettyjen aineiden ja menetelmien listalle.</p> <p>Glyserolin määrittämiseksi virtsasta siirrettiin saksalaisen Mario Theviksen ja hänen työryhmänsä julkaisema menetelmä. Määrittämiseen käytettiin GC/EI-MS -laitteita.</p> <p>Siirrettävä menetelmä optimoitiin ja validoitiin WADAn teknisten dokumenttien mukaan. Validoinnissa tutkittiin spesifisyyttä, toistettavuutta, uusittavuutta, matriisinvaikutusta ja systemaattista virhettä. Näytteiden säilyvyys tutkittiin valmiin derivatisoidun näytteen osalta. Mittausepävarmuus arvioitiin "top down" -tekniikalla WADAn teknisen dokumentin mukaan.</p> <p>Opinnäytetyön tuloksena saatiin toimiva varmistusmenetelmä, joka otettiin käyttöön Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n huume-, lääkeaine- ja dopingosastolla. Menetelmän avulla voidaan analysoida kvantitatiivisesti glyserolipitoisuuksia virtsasta.</p>	
Avainsanat	Glyseroli, GC/EI-MS, dopinganalytiikka

Author Title Number of Pages Date	Virpi Kiiskinen GC/EI-MS method for determination of glycerol in human urine for the purpose of doping analysis 45 pages 16.12.2014
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Program	Laboratory Sciences
Specialisation option	Chemical Analytics
Instructors	Antti Leinonen, Ph. D. Jukka Niiranen, Ph.Lic.
<p>This thesis was made for United Medix Laboratories at the Drug-, Medicin-, and Doping Department for the purpose of doping analysis.</p> <p>The main purpose of this thesis was to get new GC/EI-MS method for determination of glycerol in human urine. In sports tanking up on glycerol is believed to be used as a masking substance. Year 2013 it was attached to the WADAs list of prohibited substances and methods.</p> <p>Determination of glycerol in human urine was adapted from M. Thevis and her working groups' method. Glycerol was analyzed with GC/EI-MS –devices. The glycerol method was optimized and validated according to technical documents of WADA.</p> <p>Characteristics researched were specificity, repeatability, intermediate precision, ruggedness and systematic error in validation.</p> <p>A shelf life assay was made for derivative samples in order to guarantee their usability after a weekend.</p> <p>Measurement uncertainty was evaluated with “top down” –method according to WADAs technique documents.</p> <p>As a final result the Laboratories got a working method, which was taken into use at United Medix Laboratory Ltd., Drug-, Medicine- and Doping Department.</p>	
Keywords	Glycerol, GC/EI-MS, doping analysis

## **Alkulause**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:ssä huume-, lääkeaine- ja dopingosastolla.

Haluan kiittää työni ohjaajia FT Antti Leinosta ja FL Jukka Niirasta. Suuri kiitos myös osaston henkilökunnalle opastuksesta ja ohjauksesta laboratoriotöissä. Kiitokset myös perheelle ja ystäville, jotka ovat tukeneet sekä opiskelussa että opinnäytetyön teossa.

Hyvinkäällä 16.12.2014

Virpi Kiiskinen

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	5
2	Dopingvalvonta	5
2.1	Dopingvalvonnan organisointi	5
2.2	Dopingtestauslaboratoriot	6
2.3	Kiellettyjen aineiden ja menetelmien lista	7
2.4	Dopingnäytteenotto käytännössä	9
2.5	Dopingnäytteen laboratorioanalyysi	10
2.6	Dopingaineiden kromatografis/massaspektrometrinen identifiointi	12
2.7	"Threshold" -yhdisteiden kvantitointi	13
2.8	Glyseroli	16
3	Kaasukromatografi/massaspektrometri	18
3.1	Kaasukromatografi	18
3.1.1	Injektointitekniikat	18
3.1.2	Kantajakaasu	19
3.1.3	Kolonnit	19
3.1.4	Uuni	19
3.2	Massaspektrometri	20
3.2.1	Elektroni-ionisaatio	20
3.2.2	Massa-analysaattori	20
3.2.3	Detektori	21
4	Kokeellinen osa	22
4.1	Koejärjestelyt	22
4.1.1	Kemikaalit ja reagenssit	22
4.1.2	Laitteet	22
4.1.3	Näytteet	23
4.1.4	Kaasukromatografi/massaspektrometria	24
4.1.5	Näytteen valmistus	25
4.2	Menetelmän validointi	26
4.2.1	Kalibrointi	26
4.2.2	Spesifisyys	27
4.2.3	Toistettavuus	27

4.2.4	Uusittavuus	27
4.2.5	Matriisinvaikutus	27
4.2.6	Näytteiden säilyvyys	27
4.2.7	Systemaattinen virhe	28
4.2.8	Mittausepävarmuus	28
4.3	Tulokset	28
4.3.1	Menetelmän optimointi	28
4.3.2	Kalibrointi	33
4.3.3	Spesifisyys	34
4.3.4	Toistettavuus	35
4.3.5	Uusittavuus	36
4.3.6	Matriisinvaikutus	37
4.3.7	Näytteiden säilyvyys	38
4.3.8	Systemaattinen virhe	39
4.3.9	Mittausepävarmuus	40
5	Päätelmät	42
	Lähteet	43

## Lyhenteet

ADT	Finnish Antidoping Agency, Suomen Antidopingtoimikunta ADT ry
EI	Electronic-ionization, elektroni-ionisaatio
EQAS	External Quality Assessment Scheme, ulkoinen laadunarviointikierrös
FINAS	Finnish Accreditation Service, suomalainen akkreditointipalvelu
GC/MS	Gaschromatography/mass spectrometry, kaasukromatografi/massaspektrometri
LC/MS	Liquidchromatography/ mass spectrometry, nestekromatografi/massaspektrometri
LC/MS-MS	Liquidchromatography/ tandem mass spectrometry, nestekromatografi/tandemmassaspektrometri
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
SCAN	Massaspektrin keräys
SIM	Selective ion monitoring, selektiivinen ionien monitorointi
WAADS	World Association of Antidoping Scientist, Maailman Antidopingtutkijoiden järjestö
WADA	World Antidoping Agency, Maailman Antidopingtoimisto

## 1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n huume-, lääkeaine-, ja dopingosaston käyttöön dopinganalyttisiin tarkoituksiin syksyn 2013 ja kevään 2014 aikana. Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy on Maailman Antidopingtoimisto WADAn akreditoima kansainvälinen dopingtestauslaboratorio. Se on yksityisessä omistuksessa oleva kliininen keskuslaboratorio. Laboratorio on myös osoittanut päteväytymisensä FINASille. Pätevyystunnus on T070.

Dopinganalytiikkaa ohjaa WADAn kansainvälinen laboratoriostandardi ja kiellettyjen aineiden ja menetelmien lista. Vuonna 2013 kiellettyjen aineiden ja menetelmien listalle lisättiin myös glyseroli. "Glyserolitankkausta" uskotaan voitavan käyttää mm. manipulointi- ja peiteaineena hydroksietyylitärkkelyksen ja muiden plasmavolyymilaajentajien tapaan. Dopingvalvonnassa virtsan glyserolipitoisuuden > 1000 µg/ml katsotaan viittaavan glyserolin dopingkäyttöön (2013). Glyserolia on mitattu biologisista näytteistä sekä kaasukromatografis/massaspektrometrisillä (GC/MS) että nestekromatografis/massaspektrometrisillä (LC/MS) menetelmillä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja validoida uusi menetelmä huume-, lääkeaine ja dopingosaston käyttöön. Menetelmä siirrettiin saksalaisen Mario Theviksen ja hänen tutkimusryhmänsä vuonna 2008 laatiman julkaisun pohjalta. Menetelmän matriisina käytettiin virtsaa ja näytteet analysoitiin kaasukromatografis/massaspektrometrisesti. Validointi toteutettiin WADAn ohjeiden ja suositusten mukaisesti.<sup>1,2,3</sup>

## 2 Dopingvalvonta

### 2.1 Dopingvalvonnan organisointi

Urheilussa kiellettyjen keinojen käyttöä on valvottu jo vuosikymmenten ajan dopingtestien avulla. WADA organisoii dopingtestausta kansainvälisesti. Sen tehtävänä on harmonisoida maailmanlaajuisesti antidopingtyötä ja -sääntöjä, puolustaa urheilun eettisyyttä sekä taata urheilijan oikeusturva. WADA on vastannut vuodesta 1999 alkaen kansainvälisestä dopingvalvonnasta sekä sen yleisperiaatteista. Se ylläpitää maailman-



laajuista antidopingsäännöstöä (World Antidoping Code), jonka tarkoituksena on yhteinäistää ja koordinoida urheilun antidopingsääntöjä ja turvata urheilijoille oikeus osallistua urheiluun, jossa ei käytetä dopingaineita ja näin edistää urheilijoiden terveyttä, oikeudenmukaisuutta ja tasavertaista kohtelua. WADA sekä koordinoi että ohjeistaa myös dopingtestauslaboratorioiden ja käytännön testauksesta vastaavien tahojen toimintaa. Antidopingsäännöstö turvaa tehokkaat menettelytavat dopingin käytön havaitsemiseksi ja ehkäisemiseksi sekä tehokkaat ja oikeudenmukaiset menettelytavat dopingrikkomusten selvittämiseksi ja seuraamusten määräämiseksi. Maailman antidopingsäännöstö perustettiin vuonna 2007 ja sitä myös Suomen antidopingsäännöstö noudattaa.<sup>4,12,13</sup>

Kansallisella tasolla dopingvalvonnasta vastaavat yleensä lajiliitoista riippumattomat kansalliset antidopingorganisaatiot. Suomessa dopingvalvontaa organisoii Suomen Antidopingtoimikunta ADT ry, jonka tehtävänä on testaajaorganisaation ylläpito, dopingtestien suunnittelu, näytteidenotto ja tulosten käsittely. Se myös sekä kouluttaa että valistaa urheilijoita ja urheilun parissa toimivia yhteisöjä puhtaan urheilun puolesta. ADT:n yhteistyökumppaneita ovat urheilujärjestöt ja niiden jäsenet, jotka sitoutuvat noudattamaan sekä Suomen että Maailman antidopingsäännöstön ohjeita ja määräyksiä, joihin kuuluvat myös kiellettyjen aineiden lista ja menetelmät. Dopingvalvontaa ja antidopingtyötä tekevät myös lajiliitot. Esimerkiksi kansainvälisissä suurkilpailuissa dopingvalvontaa organisoivat eri lajien liitot, jotka vastaavat myös positiivisissa dopingtapauksissa urheilijalle asetettavista rangaistuksista.<sup>4,12,13</sup>

## 2.2 Dopingtestauslaboratoriot

Urheilijalta otetut virtsa- ja/tai verinäytteet analysoidaan WADAn hyväksymissä ja akreditoimissa testauslaboratoriossa. Laboratorion tietotaidon, työskentelytapojen ja laitteistojen pitää täyttää WADAn asettaman kansainvälisen laboratoriostandardin laatuvaatimukset ja ISO 17025 -standardin laatuvaatimukset. Laboratoriostandardi ohjeistaa laboratorioita mm. akkreditoinnin pätevyysvaatimuksissa sekä virtsa- että verinäytteiden analysoinnissa ja testauksessa, jolloin tulokset kaikissa laboratorioissa ovat vertailukelpoisia. Laboratorioita ohjeistetaan myös teknisillä dokumenteilla ja suosituksilla. Laboratorioiden luotettavuutta ja laadun tasoa tarkkaillaan säännöllisesti laadunvarmistusnäytteillä. Akkreditointi on voimassa vuoden kerrallaan. WADAn hyväksymiä laboratorioita on tällä hetkellä 33 maailmassa.<sup>4,12,13</sup>

### 2.3 Kiellettyjen aineiden ja menetelmien lista

Osana kansainvälistä laboratoriostandardia julkaistaan urheilussa kielletyistä aineista ja menetelmistä vuosittain päivitetty luettelo, joka luo puitteet dopingvalvonnalle. Kiellettyjen aineiden ja menetelmien listan laatii WADAn nimeämä asiantuntijaryhmä, joka kokoontuu kolmesti vuodessa. Kiellettyjen aineiden ja menetelmien listalle päätyvät aineet, joiden avulla voidaan parantaa suorituskykyä eri urheilulajeissa. Suurin osa listalla olevista aineista on sellaisia, että niiden kvalitatiivinen esiintyminen laboratori-onäytteessä riittää positiivisen tuloksen antamiselle. Listalla on myös yhdisteitä, joille on määritelty niin kutsuttu kynnyksarvo eli ”threshold” -pitoisuus, jonka ylittävät mittaus-tulokset raportoidaan positiivisena. Kooste vuoden 2014 kiellettyjen aineiden listasta ja menetelmistä on taulukossa 1.

Taulukko 1. Kooste WADAn kiellettyjen aineiden listasta 2014.<sup>5</sup>

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

Ryhmän I aineet ja menetelmät on kielletty sekä kilpailun aikana että kilpailun ulkopuo-  
lella. Ryhmään kuuluvat myyntiluvattomat lääkkeet (S0), joilla ei ole minkään valtion

terveysviranomaisen myöntämää voimassa olevaa hyväksyntää tai myyntilupa ja aineet, joita ei ole mainittu muissa ryhmissä.<sup>5</sup>

Anabolisten aineiden ryhmä (S1) on jaettu kolmeen alaryhmään, eksogeenisiin, endogeenisiin anabolis-androgeenisiin steroideihin ja muihin anabolisiin aineisiin. Eksogeeniset yhdisteet ovat aineita, joita ei voi muodostua elimistössä luonnostaan, kuten esimerkiksi trenboloni. Endogeenisiä yhdisteitä sitä vastoin elimistö muodostaa itse, kuten esimerkiksi testosteronia. Muita anabolisia aineita on esimerkiksi klenbuteroli, jolla on voimakas anabolinen vaikutus. Sen on todettu lisäävän poikkijuovaisten lihasten valkuaispitoisuutta samalla kun elimistön glykogeeni ja rasva palavat.<sup>5</sup>

Peptidihormonit, kasvutekijät ja vastaavat aineet on jaoteltu alaryhmään S2. Tähän ryhmään kuuluu esimerkiksi istukkahormoni (hCG), joka lisää miehillä testosteronin muodostumista.<sup>5</sup>

Alaryhmään S3 on jaoteltu  $\beta$ -agonistit. Ne stimuloivat sympaattisen hermoston  $\beta$ -reseptoreita, kuten esimerkiksi salbutamoli.<sup>5</sup>

Alaryhmään S4 on jaoteltu hormonien antagonistit ja modulaattorit. Metaboliset modulaattorit kasvattavat lihaksia ja polttavat rasvaa ja saavat aikaan samanlaisia hyödyllisiä aineenvaihdunnan muutoksia kuin fyysinen rasitus, mutta ilman rasitusta. Tästä esimerkkinä voidaan mainita insuliini.<sup>5</sup>

Alaryhmään S5 on jaoteltu diureetit ja muut peiteaineet. Niiden avulla pyritään poistamaan elimistöstä nesteitä tai laimentamaan dopingnäytteitä muiden dopingaineiden peittämiseksi. Diureetteja on todettu käytettävän myös painoluokkalajeissa painon pudotukseen. Muita peiteaineita ovat mm. plasmavolyymilaajentajat kuten hydroksyylietyylitärkkelys ja glyseroli.<sup>5</sup>

Kilpailun aikana ja kilpailun ulkopuolella kiellettyihin menetelmiin kuuluvat hapenkuljetuksen parantaminen (M1) kuten veritankkaus, kemiallinen ja fysikaalinen manipulaatio (M2), kuten näytteen vaihtaminen, sekä geenidoping (M3), kuten nukleiinihappoanalogien siirto.<sup>5</sup>

Ryhmään II on jaoteltu aineet, jotka ovat kiellettyjä ainoastaan kilpailun aikana. Alaryhmään S6 on jaoteltu piristeet, esimerkiksi efedriini ja amfetamiini, jotka lisäävät vi-

reystilaa. Alaryhmään S7 on jaoteltu huumaavat kipulääkkeet kuten morfiinin kaltaiset yhdisteet, joilla on kipua poistava vaikutus. Alaryhmään S8 on jaoteltu kannabinoidit, jotka ovat joko kasvipärisen kannabiksen vaikuttavia aineita tai niiden synteettisiä johdoksia, kuten JWH-018. Alaryhmään S9 on jaoteltu glukokortikosteroidit.<sup>5</sup>

Ryhmään III on jaoteltu tietyissä urheilulajeissa kielletyt yhdisteet, kuten alkoholi (P1) ja beetasalpaajat (P2). Ryhmään III jaoteltujen aineiden käyttö on kielletty esimerkiksi autourheilussa ja ammunassa, joissa niitä voidaan käyttää vähentämään hermostuneisuutta ja esimerkiksi käden vapinaa sekä parantamaan keskittymistä.<sup>5</sup>

#### 2.4 Dopingnäytteenotto käytännössä

Dopingtestejä urheilijoista tekevät pääasiassa kansalliset antidopingtoimistot ja eri lajien liitot. Testaus perustuu kansainväliseen testausstandardiin, ja näytteitä ottavat yleensä kansallisten antidopingorganisaatioiden kouluttamat testaajat. Dopingvalvontaan sisältyvät testauksen suunnittelu, näytteenotto ja näytteiden käsittely, laboratorioanalyysi, tulosten käsittely ja seuraamusten määrittäminen sekä mahdollinen muutoksen haku.

Näytteitä otetaan joko kilpailutilanteissa tai kilpailukauden ulkopuolella. Kilpailuissa menestyneitä urheilijoita arvotaan tai määrätään sijoituksen perusteella testattavaksi. Kilpailukauden ulkopuolella urheilijat valitaan kohdennetusti tai arpomalla testattavaksi. Jos testin tilannut dopingorganisaatio on nimennyt urheilijan etukäteen testiin, on kyseessä kohdennettu testi. Kohdennettuja testejä tehdään pääasiassa maajoukkueurheilijoille.

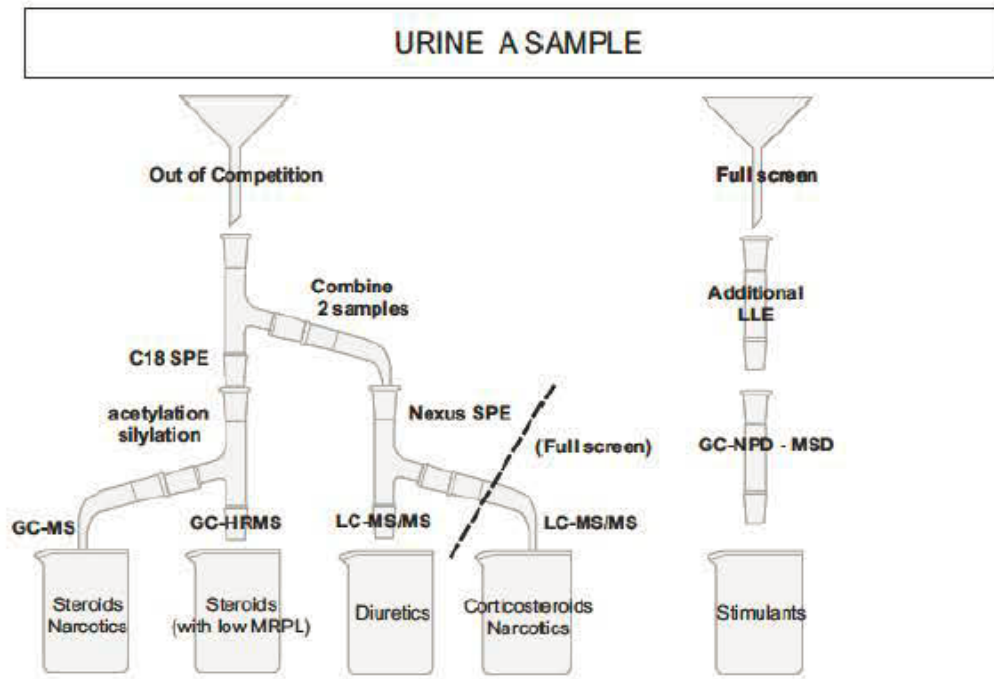
Testauksessa urheilijoilta voidaan ottaa joko verinäyte tai virtsanäyte tai molemmat. Verinäyte ei kuitenkaan korvaa virtsanäytettä. Suurin osa kiellettyjen aineiden ja menetelmien listan aineista tutkitaan virtsanäytteestä. Verinäytteitä tarvitaan tiettyihin erikoisanalyysiin, kuten esimerkiksi kasvuhormonin mittaukseen ja verensiirron toteuttamiseen. Saatuaan testikutsun urheilijan tulee ilmoittautua dopingtestihenkilöstölle testausta varten mahdollisimman pian ja olla heidän valvonnassaan, kunnes testi on suoritettu loppuun. Urheilijan tulee todistaa henkilöllisyytensä ja hänellä saa olla mukanaan yksi oma edustaja. Näytteenotto tapahtuu valvotusti. Näytteenoton jälkeen näyte

jaetaan A- ja B-pulloihin, jotka sinetöidään, koodataan ja toimitetaan mahdollisimman nopeasti laboratorioon.<sup>4,12,13</sup>

## 2.5 Dopingnäytteen laboratorioanalyysi

Dopingnäytteet analysoidaan WADAn akreditoimissa laboratorioissa. Testaushenkilöstö, posti tai kuriiri kuljettaa näytteet laboratorioon sinetöidyissä kasseissa. Näytteen saavuttua laboratorioon sen kulku dokumentoidaan aina vastaanotosta tuloksen kirjaukseen ja näytteen hävitykseen asti. Näytteitä vastaanotettaessa niistä tarkastetaan sinetit ja näytteiden koodit, joiden pitää olla yhteneväiset dokumenttien kanssa.

Dopingnäytteiden analysointi tehdään A-näytteestä ja se alkaa seulontatutkimuksilla. Seulonnan tarkoituksena on löytää mahdollisimman tehokkaasti ja nopeasti kiellettyjä aineita mahdollisesti sisältävät näytteet jatkotutkimuksia varten. Seulontamenetelminä käytetään yleensä kaasu- tai nestekromatografisia menetelmiä, joissa kerralla saadaan seulottua mahdollisimman useita eri aineita tai aineryhmiä. Tyypillisesti laboratorioissa on noin 3 - 5 eri seulontamenetelmää. Kuvassa 1 on esimerkki dopingtestauslaboratorion käyttämistä seulontamenetelmistä. Kilpailun ulkopuolella (out of competition) otettu näyte hydrolysoidaan entsyymaattisesti ja uutetaan kahdella erilaisella kiinteäfaasiuuttomenetelmällä. Toisen uuton (C18 SPE) jälkeen näytteet derivatisoidaan (acetylation, silylation) ja analysoidaan kaasukromatografisesti tavallisella (GC/MS) ja korkean erotuskyvyn (GC/HRMS) massaspektrometrillä. Toisen uuton (Nexus SPE) jälkeen näytteet analysoidaan nestekromatografis/tandemmassaspektrometrisesti (LC/MS-MS). Kilpailukaudella otetuista näytteistä tehdään edellä mainitusta uutoksesta ylimääräinen LC/MS-MS -ajo sekä näytteelle tehdään neste-nesteuutto (LLE), joka analysoidaan kaasukromatografisesti käyttäen ilmaisimina sekä typpifosforidetektoria että massaspektrometriä. (GC-NPD-MSD).<sup>15</sup>



Kuva 1. Esimerkki dopingtestauslaboratorion käyttämästä seulonstrategiasta. <sup>15</sup>

Seulonnassa havaitut, mahdollisesti kiellettyjä aineita sisältävät näytteet varmistetaan niin kutsuttujen varmistusanalyysien avulla. Varmistusanalyysit tehdään lähes poikkeuksetta massaspektrometrillä menetelmillä ja niissä tutkitaan ainoastaan epäilyksen alaista yhdistettä. Varmistusanalyysissä näytteenkäsittely ja mittaus on optimoitu kyseessä olevalle yhdisteelle. Varmistusanalyysissä epäilyttävästä näytteestä saatavaa mittaustietoa verrataan samassa yhteydessä analysoidusta vertailunäytteestä saatuun mittaustietoon. Dopinganalytiikassa yleensä riittää kielletyn yhdisteen kvalitatiivinen osoittaminen. Poikkeuksena on kuitenkin "threshold" -yhdisteet, jotka kvalitatiivisen tunnistuksen lisäksi kvantitoidaan.

Dopinganalyysi tehdään kokonaisuudessaan aina A-näytteestä. Analyysien valmistuttua laboratorio raportoi testin tulokset testin tilanneelle antidopingorganisaatiolle ja WADAlle. Jos näyte osoittautuu positiiviseksi, niin testin tilannut antidopingorganisaatio arvioi alustavasti, onko kyseessä mahdollinen dopingrikkomus. Epäillyltä urheilijalta pyydetään selvitystä tilanteesta ja hänellä on oikeus tulla kuulluksi. Tämän jälkeen tehdään päätös siitä, onko kyseessä dopingrikkomus. Päätöksen jälkeen urheilijalla on oikeus vaatia B-näytteen analysointia. Urheilijalla ja hänen edustajallaan on halutesaan mahdollisuus tulla seuraamaan B-analyysiä. Kyseinen lajiliitto asettaa yleensä mahdolliset rangaistukset.<sup>4,12,13</sup>

## 2.6 Dopingaineiden kromatografis/massaspektrometrinen identifiointi

Dopingnäytteistä kaikki mahdolliset positiiviset dopingainelöydökset on identifioitava ehdottoman luotettavasti ennen raportointia. Positiivisista mittaustuloksista saatetaan rangaista urheilijaa, joten väärä positiivisia mittaustuloksia ei voida sallia. Urheilijalla on oikeus vaatia oikeuskäsittelyä, jos kokee tulleen kaltoin kohdelluksi. Näin ollen tulosten pitää kestää myös mahdollinen oikeuskäsittely.

Näistä edellä mainituista syistä sekä harmonisoidakseen laboratorioden menettelytapoja WADA on ohjeistanut erillisessä teknisessä dokumentissa vaatimukset yhdisteiden kvalitatiiviselle kromatografis/massaspektrometrille tunnistamiselle.<sup>2</sup>

Analyttinen tunnistus perustuu identifioitavan näytteen kromatografis/massaspektrometrinen mittaustiedon vertaamiseen positiivisesta ja negatiivisesta kontrollista saatuun mittaustietoon. Tekninen dokumentti käsittelee laajasti identifioinnin kaikkia osa-alueita: näytteen esikäsittelyä, yhdisteiden kromatografista erottamista sekä niiden massaspektrometristä detektointia ja tunnistusta. Varmistusanalyysissä käytetään yleensä spesifisempää uutomenetelmää kuin seulonnassa. Uuton spesifisyyttä voidaan lisätä joko vaihtamalla uutossa käytetty liuotin tai muuttamalla uuton pH:ta. Tarvittaessa näytteen puhdistamiseen voidaan käyttää erikoistekniikoita kuten esimerkiksi immunoaffiniteettipuhdistusta tai nestekromatografista fraktiointia.

Kromatografinen erotus voidaan tehdä yhdisteestä riippuen joko neste- tai kaasukromatografisesti. Mittausparametreihin kannattaa kiinnittää erityistä huomioita, jotta kromatografinen resoluutio on riittävän hyvä sekä yhdisteet eivät eluoidu liuotinpiikissä että retentiotekijän ( $k'$ ) tulisi olla välillä 3 - 10. Kromatografisessa identifioinnissa tunnistettavan analyytin absoluuttinen retentioaika saa poiketa korkeintaan 2 % tai  $\pm 0,1$  min referenssiyhdisteen retentioajasta. Suhteellisia retentioaikoja käytettäessä ero saa olla korkeintaan  $\pm 1$  %. Lisäksi tunnistettavan analyytin ja vertailuyhdisteen kromatografisten piikkien muotojen tulee olla keskenään yhteneväiset.

Massaspektrometriseen detektointiin ja tunnistukseen voidaan käyttää normaalin tai korkean resoluution massaspektrometrejä tai tandemmassaspektrometrejä. Varmistusmittaukset voidaan tehdä joko massaspektrejä keräten (scan), valittujen ionien seurannalla (SIM) tai tandemmassaspektrometrillä valittujen reaktioiden seurannalla (SRM). Massaspektrien keräämiseen liittyen teknisessä dokumentissa on tarkat ohjeet

mm. spektrin puhtausvaatimuksista ja siitä, kuinka taustaspektri vähennetään. SIM- ja scan-ajoissa on analyysin identifioimiseen käytettävä vähintään kolmea diagnostista ionia ja tandemmassaspektrometrisissä ajoissa vähintään kahta ionia. Taulukossa 2 on esitetty pienten molekyylien (< 800 Da) identifioimisessa sallittu ionisuhteiden vaihteluväli vertailuyhdisteen ionisuhteiden nähden erilaisilla massaspektrometrisillä tekniikoilla. Esimerkiksi jos vertailuaineen diagnostisen ionin suhteellinen intensiteetti intensiivimpään seurattavaan diagnostiseen ioniin nähden on 31 %, niin identifioitavassa analyytissä vastaava ionisuhde saa vaihdella suhteellisesti  $\pm 20$  % eli olla välillä 23.8 – 26.2 %

Taulukko 2. Hyväksymisrajat ionien suhteellisille intensiteeteille vertailuaineen ja tutkittavan analyysin välillä.

Ionin suhteellinen intensiteetti (% intensiivisimmästä ionista))	GC-EI-MS; GC-CI-MS; GC-MS-MS, LC-MS, LC-MS-MS
> 50 %	$\pm 10$ % (absoluuttinen)
25 % - 50 %	$\pm 20$ % (suhteellinen)
5 % - < 20 %	$\pm 5$ % (absoluuttinen)
< 5 %	$\pm 50$ % (suhteellinen)

Dokumentissa on myös ohjeistettu korkean erotuskyvynmassaspektrometrillä tehtävän molekyylin tarkan massan mittaamiseen perustuva tunnistus sekä proteiinien ja proteolyyttisten peptidien analytiikka.

## 2.7 ”Threshold” -yhdisteiden kvantitointi

Osa kiellettyjen aineiden listalla olevista yhdisteistä ovat nk. ”threshold” -yhdisteitä eli kynnyсарvoyhdisteitä. Niille on määritelty pitoisuusraja-arvot, jonka ylittyessä ne raportoidaan – yhdistekohtainen mittausepävarmuus huomioiden – positiivisena laboratoriolöydöksinä. Identifioimiskriteerien tapaan WADA on ohjeistanut erillisessä teknisessä dokumentissa vaatimukset kynnyсарvoyhdisteiden kvantitoinnille. Taulukossa 3 on esitetty kiellettyjen aineiden listalla olevat kynnyсарvoyhdisteet. Osa niistä on sellaisia, joita käytetään yleisesti maailmalla flunssa-, särky- tai astmalääkkeinä, esimerkiksi erilaiset efedriini- ja morfiinijohdannaiset sekä salbutamoli. Joukossa on myös elimistön itsensä tuottamia yhdisteitä, joita on myös lääkkeissä tai muissa valmisteissa, esimerkiksi testosteroni, norandrosteroni ja glyseroli. Kynnyсарvopitoisuudet vaihtelevat yhdis-



teestä riippuen ”ng/ml” -tasosta ”mg/ml” -tasolle. WADA on määritellyt jokaiselle yhdisteelle kynnysarvon lisäksi positiivisen näytteen raportointirajan (decision limit), joka sisältää kynnysarvopitoisuustasolla arvioidun laajennetun yhdistetyn mittausepävarmuuden 95 %:n luotettavuustasolla. Laboratorion tulee arvioida kynnysarvoyhdisteen mittausepävarmuus omalle tulokselleen, joka ei saa olla suurempi kuin mitä WADA ohjeistaa.

Taulukko 3. WADAn kiellettyjen aineiden listan ”Threshold” -yhdisteet.

Yhdiste	Kynnysarvopitoisuus	Suurin sallittu yhdistetty mittausepävarmuus arvo		Raportointiraja
		Absoluuttinen	Suhteellinen	
19-Norandrosteroni	2,0 ng/ml	0,3 ng/ml	15 %	2,5 ng/ml
Karboksyyl-THC	150 ng/ml	15 ng/ml	10 %	175 ng/ml
Salbutamoli	1,0 µg/ml	0,1 ng/ml	10 %	1,2 µg/ml
Formoteroli	40 ng/ml	6,0 ng/ml	15 %	50 ng/ml
Glyseroli *	1 mg/ml	0,15 mg/ml	15 %	1,3 mg/ml
Morfiini	1,0 µg/ml	0,15 µg/ml	15 %	1,3 µg/ml
Katiini	5,0 µg/ml	0,5 µg/ml	10 %	6,0 µg/ml
Efedriini	10 µg/ml	0,5 µg/ml	5 %	11 µg/ml
Metyyliefedriini	10 µg/ml	0,5 µg/ml	5 %	11 µg/ml
Pseudoefedriini	150 µg/ml	7,5 µg/ml	5 %	170 µg/ml

\* 1.9.2014 WADA on muuttanut glyserolin kynnysarvon 4,3 mg/ml:ksi ja raportointirajan 5,3 mg/ml:ksi.

Tekninen dokumentti antaa ohjeita myös mittausepävarmuuden laskemiseen. Mittausepävarmuutta voidaan arvioida usealla eri tavalla, joista yleisimmin käytettyjä ovat ”bottom-up” ja ”top-down” -mallit. ”Bottom-up” -mallissa arvioidaan ensin kaikki menetelmään liittyvät yksittäiset epävarmuuskomponentit esimerkiksi reagenssien, välinei-

den ja mittalaitteiden aiheuttamat mittavirheet erikseen, jotka sitten yhdistetään (kaavat 1 ja 2).

$$y = x_1 \pm x_2 \pm \dots \pm x_n \quad (\text{kaava 1})$$

$$u(y) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots + u(x_n)^2} \quad (\text{kaava 2})$$

$y$  = mittaustulos

$x_1, \dots, x_n$  = mittaustulokseen vaikuttavat, toisistaan riippumattomat, komponentit

$u_c(y)$  = yhdistetty mittausepävarmuus

$u(x_1) \dots u(x_n)$  = mittaustulokseen vaikuttavien yksittäisten komponenttien mittausepävarmuus

$u_c(y)$  = mittaustulosten yhdistetty mittausepävarmuus

"Top-down" -mallissa mittausepävarmuutta puolestaan arvioidaan validoinnissa tehtyjen toistokokeiden ja sertifioidun vertailumateriaalin tai ulkoisen laadunarvioinnin avulla määritetyn systemaattisen virheen avulla (kaavat 3 ja 4).

$$y = m + B + e \quad (\text{kaava 3})$$

$$u_c(y) = \sqrt{u(m)^2 + u(B)^2 + u(e)^2} \quad (\text{kaava 4})$$

$y$  = mittaustulos

$m$  = menetelmän toistettavuus

$B$  = menetelmän systemaattinen virhe

$e$  = satunnaisvirhe

$u(m)$  = menetelmän toistettavuuden mittausepävarmuus

$u(B)$  = menetelmän systemaattisen virheen mittausepävarmuus

$u(e)$  = satunnaisvirheen mittausepävarmuus, esim. säilyvyysaika

$u_c(y)$  = mittaustulosten yhdistetty mittausepävarmuus

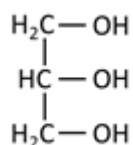
Dokumentissa asetetaan minimivaatimukset menetelmän validoinnille, joita on mittausten lineaarisuus kynnysarvon tuntumassa, sarjan toistettavuus, uusittavuus ja saantopitoisuus. Dokumentti ohjeistaa myös analysoimaan matriisinvaikutusta.<sup>1</sup>

Dokumentti ohjeistaa myös, kuinka positiivinen laboratoriolöydös raportoidaan. Raportissa on ilmoitettava analysoidun yhdisteen nimi, sen pitoisuus sekä sille asetettu raportointiraja. Lisäksi raportissa pitää ilmetä laboratorion arvioima mittausepävarmuus analyysituloksille.<sup>1</sup>

## 2.8 Glyseroli

Glyseroli on kielletty aine sekä harjoituskaudella että kilpailukaudella.<sup>16</sup> Se kuuluu kiellettyjen aineiden listalla ryhmään ”S5 Diureetit ja muut peiteaineet”. Glyserolin katsotaan kuuluvan plasmalaaajentajiin, johon kuuluvat myös dekstraani, hydroksietyylitärkkelys ja mannitoli.<sup>5</sup> Glyseroli lisättiin WADAn kiellettyjen aineiden listalle vuonna 2010 ja se kuuluu WADAn kynnysarvoyhdisteisiin. Glyserolin kynnysarvo on ollut 1 mg/ml, mutta se nostettiin 1.9.2014 tasolle 4.3 mg/ml.<sup>1</sup>

Glyseroli on hajuton, väritön ja viskoosi neste. Se on myös hygroskooppinen, polaari-nen yhdiste ja kolmen arvoinen alkoholi eli trioli.<sup>14</sup> (Kuva 2.) Sitä käytetään monissa teollisuus- ja kuluttajatuotteissa, kuten saippuoissa ja pesuaineissa, lääkkeissä, kosmetiikassa, ruoassa, juomissa, maaleissa, hartseissa ja paperissa.



Kuva 2. Glycerolin rakennekaava.  $M(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3) = 92,09 \text{ g/mol}$ <sup>14</sup>

Elimistössä glyseroli on triglyseridirasvojen perusosa. Yksi triglyseridimolekyyli koostuu yhdestä glyserolista, johon on esteröitynyt kolme rasvahappoa. Rasvahappojen aineenvaihdunnan tuloksena elimistöön syntyy glyserolia. Seerumin glyserolipitoisuus vaihtelee 4,6 – 27,6 µg/ml ihmisillä.<sup>3</sup>

Glyserolia käytetään lääketieteellisyydessä silmäsairauksien hoitoon vähentämään silmänpainetta, suolen toimintaa stimuloivana aineena eli laksatiivina ja osana monia lääkevalmisteita, kuten yskänlääkkeissä ja rasvoissa. Glyserolia käytetään urheilulääketieteessä ylinesteytykseen (hyperhydraatio) nestehukan ennaltaehkäisemiseen ennen urheilusuoritusta. Sitä käytetään myös nesteyttämiseen (rehydraatio) urheilusuorituksen jälkeen nestehukan (dehydraatio) korjaamiseksi.

Urheilussa glyserolia arvellaan käytettävän väärin ”tankkaamalla” sitä kehoon suurina annoksina joko nieltynä tai suonen sisäisesti peittämään kiellettyjen aineiden käyttöä. Glyserolilla pyritään kasvattamaan plasmatilavuutta, jotta mahdollisen erytropoetiinin dopingkäytön johdosta kohonneet veren hemoglobiini- ja hematokriitti arvot saataisiin keinotekoisesti alas. Tuoreen tutkimuksen mukaan koehenkilöille annettu glyserolianos 1 g/kg lisäsi koehenkilöiden plasmatilavuutta ainoastaan 3,3 % ja madalsi hemoglobiiniarvoja ainoastaan 2 g/l. Dekstraanin on puolestaan todettu lisäävän plasmatilavuutta jopa 14 - 28 %. Näin ollen glyserolin sisällyttäminen kiellettyjen aineiden listaan plasmalaajentajiin onkin kyseenalaistettu.<sup>18</sup>

Glyserolia on mitattu virtsasta hyvin erilaisilla menetelmillä. M. Thevis et al. mittasivat glyserolipitoisuutta virtsasta haihduttamalla näytteen kuiviin, jonka jälkeen se derivatoitiin ja injektointiin kaasukromatografisesti elektroni-ionisaatio massaspektrometrille (GC/EI-MS) SIM -monitorointia käyttäen.<sup>3</sup> Glyserolia on analysoitu sekä suoraan derivatisoimalla virtsanäyte bentsyylikloridilla ja mittaamalla LC/MS-MS -tekniikalla sekä entsyymaattisella menetelmällä mittaamalla spektrofotometrisesti.<sup>17,19,21</sup>

Veren glyserolipitoisuudet ovat normaalisti niin pieniä, että glyserolia ei erity virtsaan. Glyserolitasot voivat kuitenkin kohota lisääntyneen rasvahappoaineenvaihdunnan, glyserolin käytön tai glyserolia sisältävien aineiden käytön johdosta niin, että glyseroli on mitattavissa virtsasta. M. Thevis et al. ovat mitanneet glyserolipitoisuudet 1039 eurooppalaisen urheilijan virtsanäytteistä ja todenneet glyserolipitoisuuksien olevan 4,7 – 27,6 µg/ml.<sup>3</sup> B. Kelly et al. puolestaan mittasivat glyserolia 959 pohjoisamerikkalaisesta urheilijasta ja heidän materiaalissaan virtsan normaali glyserolitaso oli 3,7 – 34,1 µg/ml.<sup>19</sup>

### 3 Kaasukromatografi/massaspektrometri

#### 3.1 Kaasukromatografi

Kaasukromatografia perustuu yhdisteiden jakaantumiseen kiinteän ja liikkuvan faasin välillä, mihin vaikuttavat niiden erilaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet. Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina on kaasua ja kiinteänä eli stationääri faasina yleensä viskoosi neste, joka muodostaa erittäin ohuen kerroksen kolonnin sisäpinnalle. Kaasukromatografilla analysoidaan haihtuvia yhdisteitä tai niiden johdoksia ja sitä käytetään yhdisteiden pitoisuuksien määrittämiseen ja identifiointiin. Se toimii myös massaspektrometrille näytteensyöttäjänä.<sup>7</sup>

##### 3.1.1 Injektointitekniikat

Yleisimmin käytössä olevia injektiotekniikoita ovat suoraan kolonniin höyrystävä injektio (splitless) ja jakoinjektio (split). Injektorin pääosat ovat lämmitettävä höyrystyskammio ja jakoventtiili. Höyrystyskammiossa on vaihdettava lasiputki, johon voi olla pakattuna osittain lasivillaa, tasaisen höyrystymisen takaamiseksi. Samalla injektorilla voidaan useimmissa tapauksissa tehdä kummankin tyyppisiä injektioita.

Suoraan höyrystävässä injektiossa näyte johdetaan injektioammioon, jossa näyte höyrystyy ja kulkeutuu kantajakaasun mukana kolonniin. Suorassa höyrystävässä injektiossa jakoventtiili pidetään suljettuna, kunnes injektointi on lopetettu. Lopuksi jakoventtiili avataan injektorin huuhtelemiseksi. Jakamattoman jakson pituus riippuu kantajakaasun virtauksesta ja injektioammion tilavuudesta. Suoraan höyrystyvää injektiota voidaan käyttää pienille ainemäärille esimerkiksi jäämäanalytiikassa.

Jakoinjektiossa näyte injektoidaan injektoriin jakoventtiilin ollessa auki. Jakoinjektiossa jakosuhdetta voidaan säädellä jakoventtiilin avulla, jolloin injektoitaessa vain tietty osa jatkaa höyrystyneenä matkaa kolonniin ja loput näytteestä huuhdellaan jätteisiin. Tämä menetelmä soveltuukin parhaiten suurten ainemäärien analysointiin.<sup>10</sup>

### 3.1.2 Kantajakaasu

Kantajakaasu toimii kaasukromatografiassa liikkuvana faasina, joka kuljettaa näytteen injektorin ja kolonnin lävitse detektorille. Kantajakaasuna voidaan käyttää ainoastaan puhdasta kaasua, esimerkiksi heliumia, typpeä ja vetyä.<sup>10</sup>

### 3.1.3 Kolonnit

Kolonnin valintaan vaikuttavat tutkittavan yhdisteen ominaisuudet, kuten poolisuus. Stationäärifaasin tulee olla - jos mahdollista - kemialliselta luonteeltaan samankaltainen kuin erotettavien analyttien. Yleisimmin käytössä olevia kolonnien stationäärifaaseja ovat polysiloksaani ja polyfenolieetteri.<sup>7</sup> Mitä enemmän poolisia ryhmiä faasi sisältää, sitä alhaisempi on maksimikäyttölämpötila ja sitä helpommin stationäärifaasi vuotaa pois kolonnista. Stationäärifaasin stabiilisuutta voidaan parantaa ristositomalla polymeeriketjuja toisiinsa sopivien reaktioiden avulla siten, että polymeeriketjun liikkuvuus vähenee.

Analyttisen kolonnin pituudella, kolonnin seinämässä olevan stationäärifaasin paksuudella ja kolonnin halkaisijalla voidaan vaikuttaa yhdisteiden erottuvuuteen ja kulkeutumiseen nopeuteen. Yleisimmin käytetään 15 – 30 m ja sisähalkaisijaltaan 0,25 – 0,32 mm mittaisia kolonneja.<sup>7</sup>

### 3.1.4 Uuni

Kaasukromatografiassa näyte höyrystetään injektorissa ja johdetaan kolonniin, joka on sijoitettu uuniin. Uunin tehtävänä on säilyttää kolonnissa stabiilit olosuhteet ja säilyttää näyte höyrystyneenä, jotta se voidaan analysoida. Uunin lämpötilaa voidaan ohjelmoida näytteelle sopivaksi (gradienttiohjelma) tai lämpötila pysyy vakiona koko analysoinnin ajan (isoterminen ohjelma).

## 3.2 Massaspektrometri

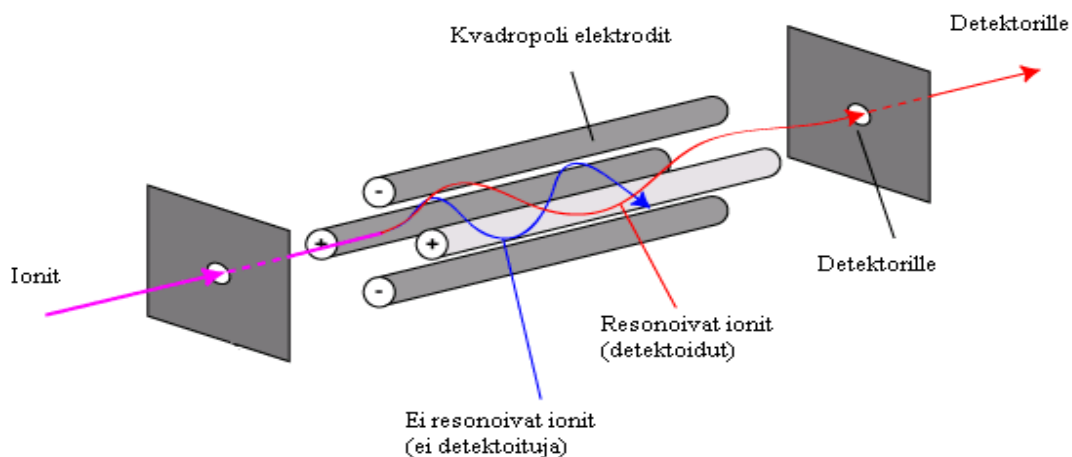
Massaspektrometri koostuu ionisaattorista, massa-analysaattorista ja detektorista. Ionisaattorissa näytemolekyylit aluksi ionisoidaan. Muodostuneet ionit erotellaan toisistaan niiden massan ja varauksen suhteen perusteella massa-analysaattorissa, josta analysoitavat ionit kulkeutuvat detektorille. Massaspektrometrin osat ovat alipaineistetussa tilassa, joka muodostetaan alipainepumppujen avulla.<sup>7</sup>

### 3.2.1 Elektroni-ionisaatio

Elektroni-ionisaatio (EI) on yleisen GC/MS:ssa käytetty ionisointitapa. EI-ionilähde koostuu ionisaatiokammioista, filamentista, keräimestä, repelleristä eli karkottimesta. Kaasumaisen näytteen saavuttua ionisaatiokammioon sitä pommitetaan tunnetun energian ja intensiteetin omaavilla elektroneilla. Elektroneja muodostuu filamenttilangasta, joka on valmistettu joko volframista tai reniumista. Filamenttilangasta muodostuneet elektronit johdetaan potentiaalieron avulla ionisaatiokammion läpi sen vastakkaisella puolella olevaan keräimeen. Yleisesti käytetty potentiaalienergia on 70 eV. Elektronipommituksen ansiosta näytteestä muodostuu positiivisesti varautuneita molekyyli-ioneja  $[M^+]$  eli radikaalikationeita sekä niiden hajoamisen tuloksena syntyneitä fragmentti-ioneja. Muodostuneet ionit ohjataan ionilähteestä positiivisesti varautuneen repellerin avulla massa-analysaattorille.<sup>7</sup>

### 3.2.2 Massa-analysaattori

Ionit johdetaan massa-analysaattoriin erilaisten sähköisten linssien lävitse. Erikokoisten ionien massa/varaus-suhteen mittaamiseen on olemassa useita erilaisia massa-analysaattoreita, joista yleisimmin on käytössä kvadrupolianalyzaattori. Se koostuu neljästä yhdensuuntaisesta sähköä johtavasta sauvasta, joiden väliin muodostetaan sähkökenttä sauvoihin johdetuilla jännitteillä. Metallisauvoihin on kytketty tasajännite siten, että vastakkaisten sauvojen polariteetti on sama eli toiset kytketään negatiiviseen ja toiset positiiviseen potentiaaliin (Kuva 3.).



Kuva 3. Kvadrupolimassaspektrometrin rakenne.<sup>7</sup>

Lisäksi molempiin sauvoihin kytketään vaihtovirtajännite. Muodostuneen sähkökentän vaikutuksesta ionit joutuvat niiden kulkusuunnalle kohtisuoraan värähdysliikkeeseen. Tietyillä jännitteillä vain tietyn massa/varaus –suhteen omaavat ionit pääsevät kulkemaan kvadrupolielektrodien välitse. Jos ionien värähtely on liian laajaa, ne törmäävät elektrodisauvoihin eivätkä pääse detektorille <sup>7</sup>. Sähkökenttää muuttamalla saadaan halutut ionit vuoron perää detektorille ja näin mitattua.

### 3.2.3 Detektori

Detektorin tehtävänä on muuntaa massa-analysaattorilta saapuva ionisuihku käyttökelpoiseksi signaaliksi. Kvadrupoilimassaspektrometrissä käytetään yleisesti detektorina elektronimonistinta, johon ionit fokusoituvat massaluku kerrallaan. Elektronimonistin putkessa ionien virta vahvistetaan emittoimalla elektroneja jännitegradientin avulla. Tyypillisesti elektronimonistimen aikaansaama vahvistus on  $10^4 - 10^8$  A. <sup>7</sup>



## 4 Kokeellinen osa

### 4.1 Koejärjestely

#### 4.1.1 Kemikaalit ja reagenssit

Menetelmässä käytettiin seuraavia reagensseja:

- Glyseroli, CAS No. 56-81-5, Sigma, G5516, pa., (Saint Louis, Missouri, USA)
- Glyseroli-d<sub>5</sub>, CAS No. 62502-71-0, Aldrich, 454524, pa., (Saint Louis, Missouri, USA)
- MSTFA, N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, CAS No 24589-78-4, Bucher GmbH, analyysilaatu, (Waldstetten, Saksa)
- n-Oktaani, CAS 111-65-9, Rathburn, RG2025, HPLC -laatu, (Walkerburn, Skotlanti)
- Helium 5.6, AGA, puhtaus 99,9996 %, (Riihimäki, Suomi)
- Ionivaihdevesi, Millipore (Darmstadt, Saksa)

#### 4.1.2 Laitteet

Menetelmässä käytettiin seuraavia laitteita:

- Kaasukromatografi/massaspektrometri, 6890N/5973N, ("Krisse"), Agilent Technologies<sup>11</sup> ( Kalifornia, USA):
  - 7683 Series automaattinen näytteensyöttäjä
  - 6890N kaasukromatografi (split/splitless -injektor)
  - 5973 Network massaselektiivinen ilmaisim (elektroni-ionisaatio)
  - MSD ChemStation -työasemaohjelmisto (versio E.02.01)
  - HP-1 -kolonni, (16 m x 0,2 mm x 0,11 µm), 19091Z-005

- Kaasukromatografi/massaspektrometri, 7890A/7683A, ("Pasi"), Agilent Technologies<sup>11</sup> (Kalifornia, USA):
  - 7683B Series automaattinen näytteensyöttäjä
  - 7890A kaasukromatografi (split/splitless injektor)
  - 5975C Network massaselektiivinen ilmaisim (elektroni-ionisaatio)
  - MSD ChemStation -työasemaohjelmisto (versio E.02.00)
  - HP-1 -kolonni (16 m x 0,2 mm x 0,11 µm), 19091Z-005
  - Kolonnin vaihtamiseen käytetty "columnsplitter"-järjestelmä (restriktori 3 m x 180 µm)
- Haihdutusjärjestelmä, Turbo Vap LV, Zymark (Basel, Sveitsi)
- Tasoravistelijä, Multitube Vortexer, Lab - tek International Ltd. (Christchurch, Uusi Seelanti)
- Lämpökaappi, Memmert (Büchenbach, Saksa)
- Kuivahaude, Techne Dri-Block DB-3D (Cambridge, UK)
- Vakuumieksikaattori (kuivausaineina silikageeli ja difosforipentoksidi)

#### 4.1.3 Näytteet

Kalibraattoreina ja kalibroinnin testaukseen käytettiin sekä veteen että humaanivirtsan valmistettuja näytteitä pitoisuustasoilla 2,0, 1,5, 1,0, 0,75 ja 0,5 mg/ml. Korkein kalibroitiluuos (2,0 mg/ml) valmistettiin punnitsemalla glyserolia mittapulloon ja täyttämällä merkkiin joko vedellä tai virtsalla. Muut kalibroitiluuokset laimennettiin väkevämmästä pipetoimalla täyspipetillä mittapulloon ja laimentamalla joko vedellä tai virtsalla merk-

kiin. Veteen valmistetut kalibrintiliuokset säilytettiin jääkaappilämpötilassa. Virtsaan tehdyt kalibrintiliuokset jaettiin 250 µl:n eriin ja pakastettiin mittauksia varten.

Toistomittauksia varten valmistettiin kolme tasokontrollia. Korkein pitoisuustaso 1,4 mg/ml valmistettiin punnitsemalla glyserolia mittapulloon ja laimentamalla virtsalla merkkiin. Korkeimmasta kontrollista laimennettiin tasot 1,0 ja 0,6 mg/ml pipetoimalla mittapulloon ja laimentamalla virtsalla merkkiin. Kontrollit jaettiin 250 µl:n eriin ja pakastettiin mittauksia varten.

Kalibraattoreiden ja kontrollien valmistukseen käytetty lääkeainevapaa virtsa oli kerätty viideltä naiselta ja viideltä mieheltä. Kerätyt kertavirtsanäytteet yhdistettiin ja säilytettiin pakastettuna n. 100 ml:n erissä.

Systemaattinen virhe arviointiin käytämällä World Association of Anti-Doping Scientist:n (WAADS) toimittamaa ulkoisen laadunarviointikierroksen (EQAS) näytettä. Eri laboratorioden (n=15) kyseisestä näytteestä mittaamien pitoisuustulosten keskiarvo oli 2,0 mg/ml (SD 0,1 mg/ml). EQAS -näyte jaettiin 250 µl:n eriin ja pakastettiin mittauksia varten.

Spesifisyyskokeiden ja virtsan normaalin fysiologisen glyserolitason määrittämistä varten kerättiin kymmeneltä vapaaehtoiselta naiselta ja kymmeneltä mieheltä lääkeainevapaa kertavirtsa. Näytteet säilytettiin 100 ml:n erissä pakastettuna.

#### 4.1.4 Kaasukromatografi/massaspektrometria

Menetelmän kehitys ja menetelmän optimointi tehtiin Agilent 6890/5973N GC/EI-MS -laitteistoa ("Krisse") käyttäen. Menetelmä validoitiin pääasiassa Agilent 7890A/5975C GC/EI-MS -laitteistolla ("Pasi"). Menetelmä perustui M. Theviksen aiemmin esittämään julkaisuun.<sup>3</sup>

Kaasukromatografinen mittaus tehtiin Agilent HP-1 (16m x 0,2 mm x 0,11 µm) -kolonnilla. Näytettä injektointiin 2 µl 1:200 jakosuhteella ja injektorikammion lämpötila oli asetettu 280 °C:een. Heliumia käytettiin kantokaasuna ja sen virtaus oli asetettu 0,8 ml/min vakiovirtauksella. Uunin lämpötila nostettiin ajon aikana 90 °C:sta 155 °C:seen nopeudella 20 °C/min, jonka jälkeen uunia pidettiin 310 °C:ssa 3,5 min.

Massaspektrometriset mittaukset tehtiin käyttäen 70 eV elektroni-ionisaatiotiota (EI). GC/EI-MS -liitännän (interface) lämpötila oli 310 °C ja ionilähteen lämpötila oli 230 °C. Spektriajoissa spektrit kerättiin m/z 40 - 400 väliltä. Massaspektrometri kalibroitiin perfluorotributyylimiinilla (PFTBA) "normaalispektri" -viritystä (STUNE) käyttäen. Kvantitointi tehtiin selektiivistä ionien monitorointia (SIM) käyttäen. Glycerolille käytettiin ioneja m/z 205,15, 218,15 ja 293,15. Glyceroli-d<sub>5</sub>:n ioneiksi valittiin m/z 208,15, 222,15 ja 298,15. Ionien seuranta-aika (dwell time) oli 5 ms. Massaspektrometri viritettiin ennen SIM-ajoja, "maksimiherkkyys" -viritystä (ATUNE) käyttäen. Massaspektrometrin resoluutio oli SIM-ajoissa 0,7 amu (atomimassayksikköä). Menetelmän optimoinnissa käytetty kaasukromatografi/massaspektrometrilaitteisto on kuvassa 4.

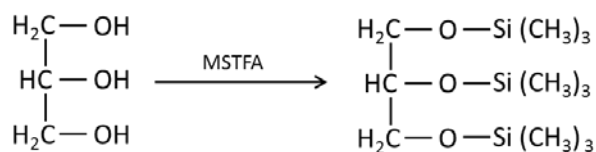


Kuva 4. Kaasukromatografi/massaspektrometri 6890N/5973N, ("Krisse")

#### 4.1.5 Näytteen valmistus

Näytteiden valmistus perustui M. Theviksen aiemmin esittämään julkaisuun.<sup>3</sup> Standardeja, kontroleja ja tutkittavaa virtsaa pipetoitiin 20 µl silyloituihin lasiputkiin, joihin lisättiin sisäiseksi standardiksi 25 µl glyseroli-d<sub>5</sub> pitoisuudeltaan 0,80 mg/ml vedessä. Näytteitä sekoitettiin tasoravistelijassa noin 30 s ajan ja näytteet haihdutettiin Turbo Vap - haihduttimessa 65 °C:ssa (haihdutuskaasuna paineilma) 18 min. Haihduttamisen jälkeen näyteputket kuivattiin lämpökaapissa 80 °C:ssa 10 min. Ennen derivatisointia putkia pidettiin vielä vakuumeiksikaattorissa (kuivausaineena silikageeli ja difosforipentoksidi) 15 min. Kuivauksien jälkeen näyteputkiin lisättiin 100 µl MSTFA:ta, putket korkitettiin ja sekoitettiin varoen tasoravistelijassa noin 30 s ajan. Näytteitä inkuboitiin kuiva-

hauteella 60 °C :ssa 20 min. Inkuboinnin jälkeen näytteet siirrettiin kaasukromatografian näytekuploihin mittausta varten.<sup>8</sup> Silyointireaktio on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Glycerolin silyointireaktio

## 4.2 Menetelmän validointi

Validoinnin tarkoituksena on määrittää tutkittavan menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen.<sup>9</sup> Menetelmä validoitiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n ohjeiden ja WADAn ”threshold” -yhdisteiden pitoisuusmittauksille asettamien vaatimusten mukaisesti.<sup>1</sup>

### 4.2.1 Kalibrointi

Laite kalibroitiin joka analyysisarjan yhteydessä käyttäen viittä eri pitoisuustasoa (0,5 - 2,0 mg/ml). Kalibrointi tehtiin sisäisen standardin menetelmällä. Kromatografisten piikkien intensiteettien laskentaan käytettiin piikkien korkeuksia. Kalibroinnista laadittiin regressiosuora käyttäen pienimmän neliösumman menetelmää. Kvantitoinnissa käytettiin ionia m/z 205,15 glyserolille ja 208,15 glyseroli-d<sub>5</sub>:lle.

Kalibraattoreiden verifiointiin ja kalibroinnin lineaarisuuden arviointiin käytettiin neljää eri kalibrointisarjaa. Kalibrointisarjat oli valmistettu kahdesta eri kantaliuoksesta, joista molemmista valmistettiin kahdet kalibrointisuorat. Lineaarisuustestauksissa jokainen kalibrointitaso analysoitiin neljänä rinnakkaisena. Lineaarisuuden sopivuutta arvioitiin mitattujen kalibrointipisteiden ja pienimmän neliösumman menetelmällä kalibrointisuoran pisteiden erotuksen eli residuaalien avulla ja vertailemalla suoran yhtälöitä.

Kalibroinnin uusittavuutta tutkittiin toistokokeiden yhteydessä vertailemalla eri päivinä tehtyjen kalibrointien (n=10) suoran yhtälöitä. Toistokokeissa ja rutiinisarjoissa kalibraattorit analysoitiin kahtena rinnakkaisena.

#### 4.2.2 Spesifisyys

Menetelmän spesifisyys arvioitiin vertailemalla veteen valmistetun standardiliuoksen 1,0 mg/ml kvalitatiiviseen tunnistukseen käytettävää mittaustietoa virtsamatriisiin valmistetun standardin 0,6 mg/ml tietoon. Käytetty standardiliuos oli valmistettu kolmena rinnakkaisena ja virtsa kahtena rinnakkaisena.

Lisäksi virtsan normaalin fysiologisen glyserolitason arvioimiseksi analysoitiin kymmeneltä naiselta ja kymmeneltä mieheltä kerätyt kertavirtsanäytteet.

#### 4.2.3 Toistettavuus

Menetelmän pitoisuustulosten ja kvalitatiivisen identifioinnin toistettavuutta tutkittiin mittaamalla saman päivän aikana samassa mittaussarjassa ja samalla laitteella kymmenen pitoisuustason 1,0 mg/ml kontrollinäytettä.

#### 4.2.4 Uusittavuus

Menetelmän pitoisuustulosten uusittavuutta tutkittiin analysoimalla kontrollinäytteitä 0,6, 1,0 ja 1,4 mg/ml eri päivinä tehdyissä analyysisarjoissa (n=10). Neljä laboratoriotyöntekijää käsittelivät näytesarjoja. Kontrollinäytteet analysoitiin joka sarjassa kolmena rinnakkaisena.

#### 4.2.5 Matriisinvaikutus

Matriisivaikutus tutkittiin laimennossarjan avulla. Virtsaan tehty näyte 2,0 mg/ml laimennettiin vedellä pitoisuuksiin 1,5, 1,0, 0,75 ja 0,5 mg/ml. Jokainen pitoisuustaso analysoitiin kahtena rinnakkaisena. Mittaustulokset kerrottiin laimennuskertoimien avulla ja tuloksia verrattiin tehdystä näytteestä 2,0 mg/ml saatuun pitoisuuteen.

#### 4.2.6 Näytteiden säilyvyys

Säilyvyyttä testattiin uusittavuuskokeiden yhteydessä mittaamalla yksi analyysisarja uudestaan neljän päivän kuluttua. Uusintamittauksissa saatuja kontrollien mittaustuloksia verrattiin ensimmäisiin mittaustuloksiin. Säilytyksen ajan näytteitä säilytettiin 4 vrk valolta suojattuna huoneenlämmössä.

#### 4.2.7 Systemaattinen virhe

Systemaattinen virhe arvioitiin joka analyysisarjassa (n=10) mukana olleen WAADSin EQAS -näytteen avulla. Näyte analysoitiin joka sarjassa kolmena rinnakkaisena.

#### 4.2.8 Mittausepävarmuus

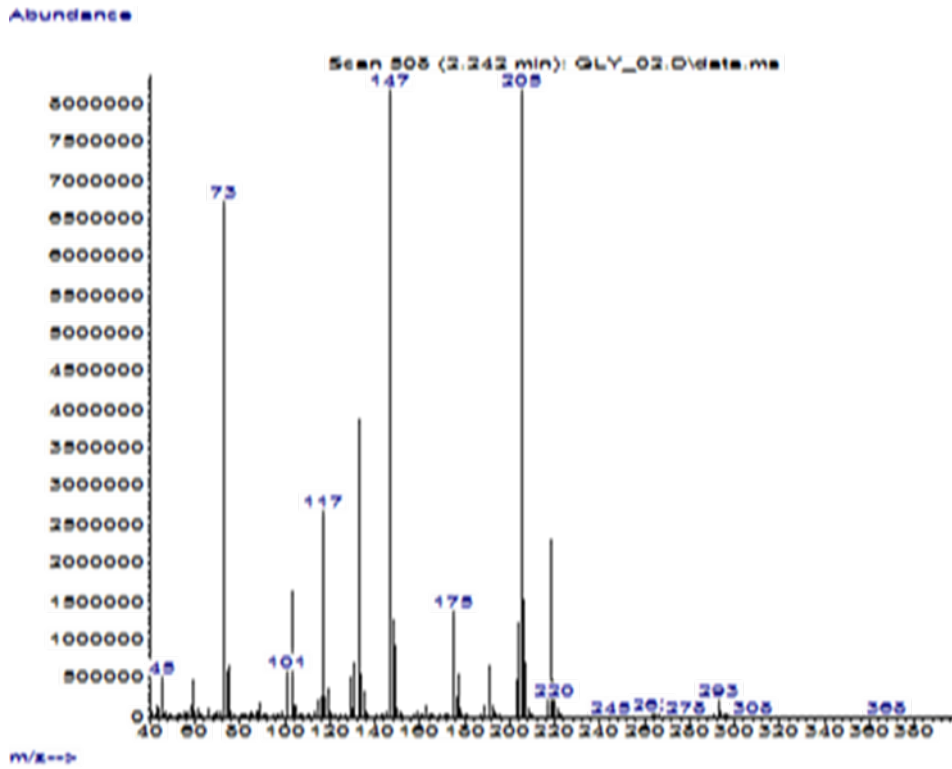
Mittausepävarmuus laskettiin saaduista toistettavuus-, uusittavuus- ja systemaattisen virheen tuloksista WADAn ohjeistuksen mukaisesti käyttäen "top down" lähestymistapaa.<sup>1</sup>

### 4.3 Tulokset

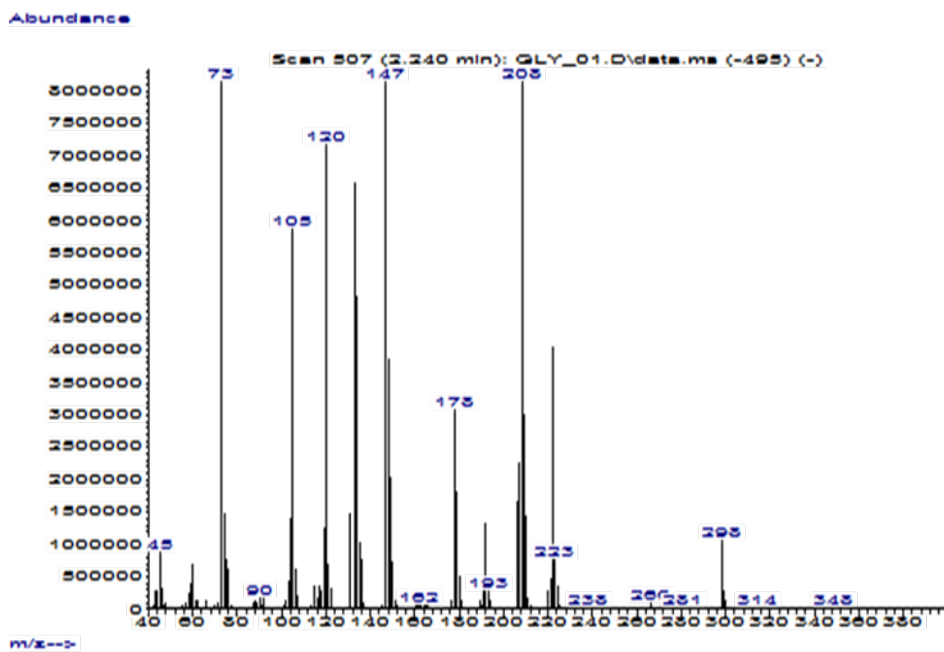
#### 4.3.1 Menetelmän optimointi

M. Theviksen julkaisema menetelmä siirrettiin ja optimoitiin YML:ssä käytössä oleville laitekokonaisuuksille.

Menetelmän kehitys aloitettiin mittaamalla glyserolin ja glyseroli-d<sub>5</sub>:n EI-spektrit. Silyloidun glyserolin massaspektri on esitetty kuvassa 6 ja silyloidun glyseroli-d<sub>5</sub>:n massaspektri kuvassa 7. Spektrit vastasivat hyvin aiemmin julkaistuja spektrejä. Fragmentaatio on voimakasta ja spektreistä on havaittavissa silyloitujen glyserolin ja glyseroli-d<sub>5</sub>:n karakteristisia ioneja (esim. glyseroli: m/z 293, 218, 205, 117 ja 103; glyseroli-d<sub>5</sub>: m/z 298, 222, 208, 120 ja 105) sekä silylointireaktiosta aiheutuvia tunnusomaisia ioneja m/z 147 ja 73. M. Theviksen ehdotus glyserolille spesifisten ionien rakenteista on esitetty kuvassa 8.

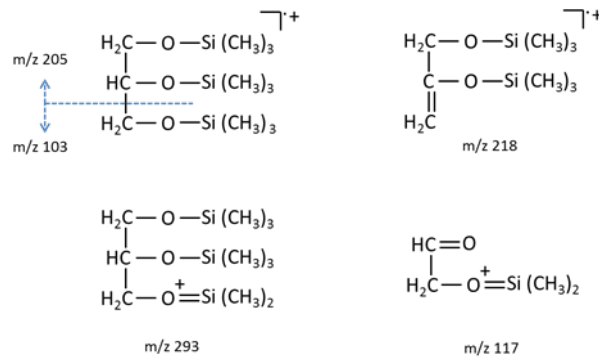


Kuva 6. Silyloidun glyserolin massaspektri.



Kuva 7. Silyloidun glyseroli-d5:n massaspektri.

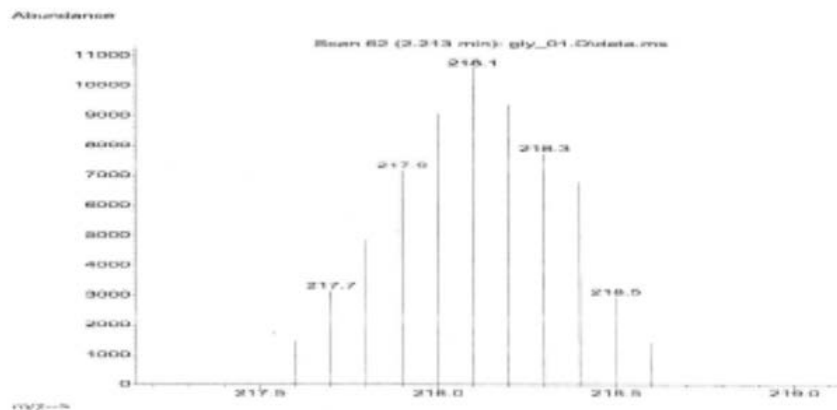




Kuva 8. Ehdotus silyloidun glyserolin diagnostisten ionien rakenteista.<sup>3</sup>

SIM -menetelmään valittiin samat ionit kuin Theviksen julkaisemassa menetelmässä ja niiden ”tarkka massa” optimoitiin dynaamisella massakalibroinnilla. Dynaamisessa massakalibroinnissa silyloitujen glyserolin ja glyseroli- $d_5$ :n karakterististen ionien ”tarkka massa” arvioitiin mittaamalla massa-alueita tutkittavien ionien ympäriltä 0,1 amu - suuruisin muutoksin ja selvittämällä millä massalla on suurin intensiteetti. Suurimman intensiteetin omaavat ionit valittiin SIM-menetelmään, mikä varmistaa laitteen maksimaalisen herkkyyden ja toistettavuuden. Kuvassa 9. on esitetty ionin  $m/z$  218 optimointi dynaamisella massakalibroinnilla.

#### Dynaaminen massakalibrointi

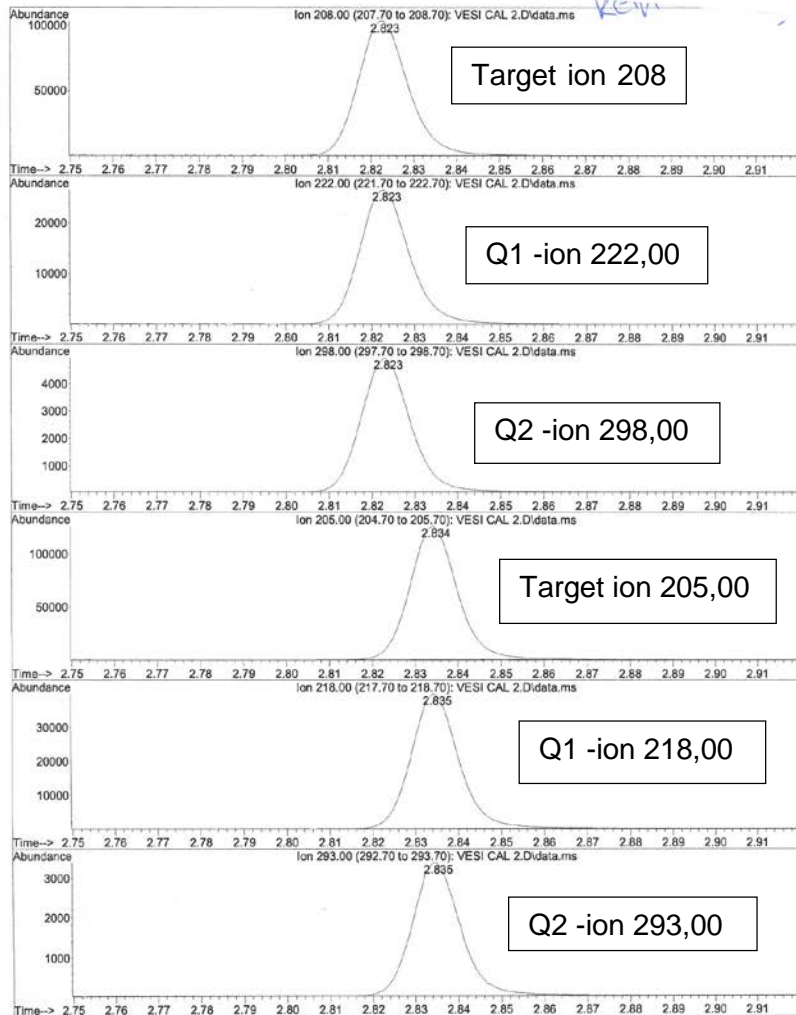


Kuva 9. Glyseroli -ionin  $m/z$  218 optimointi dynaamisella massakalibroinnilla.

Ioniksi valittiin  $m/z$  218,15. Menetelmässä päädyttiin käyttämään ioneille 5 ms:n seuranta-aikaa, jolloin yksittäisiä mittauspisteitä tuli noin 30 kromatografista piikkiä kohden. Määrä on riittävä piikin luotettavaan integrointiin kvantitointia varten.<sup>8</sup>

Kromatografiseen erotukseen käytettiin HP-1 -kolonnia (16 m x 0,2 mm x 0,11  $\mu\text{m}$ ), jota laboratoriossa käytetään kaikissa silyylijohdannaisten yhdisteiden mittauksissa. Kolonni eroaa faasiltaan ja dimensioiltaan M.Theviksen käyttämästä hieman polaarisemmasta HP-5 -kolonnista (17 m x 0,2 mm x 0,2  $\mu\text{m}$ ), mutta näytti soveltuvan hyvin glyserolin ja glyseroli- $d_5$ :n mittaamiseen. Kolonnin erilaisuudesta johtuen valitut ajo-olosuhteet poikkeavat jonkin verran M.Theviksen esittämistä. Käytetyissä ajo-olosuhteissa glyseroli eluoitui retentioajalla 2,83 min ja glyseroli- $d_5$  eluoitui retentioajalla 2,82 min. Kromatografisten piikkien asymmetrisyydeksi saatiin 1, jonka perusteella voitiin todeta piikkien olevan symmetrisiä. Esimerkki optimoidun SIM- menetelmän ionikromatogrammeista on esitetty kuvassa 10.

File : D:\MS DATA\GLY\GLY20140320\VESI CAL 2.D  
 Operator : VIKII  
 Acquired : 20 Mar 2014 22:53 using AcqMethod GLY.M  
 Instrument : PAPI  
 Sample Name: VESICAL 2  
 Misc Info : VESI cal 1.01  
 Vial Number: 27

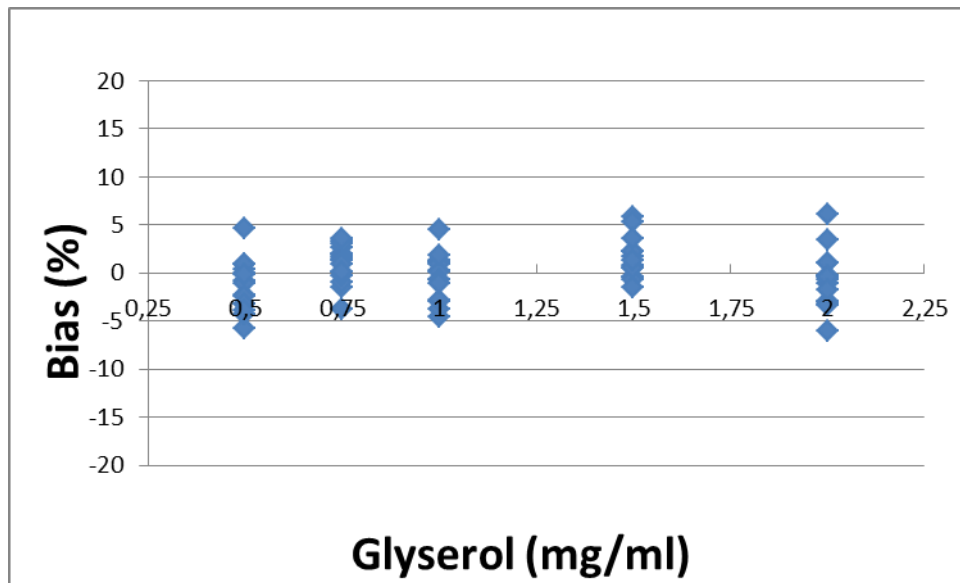


Kuva 10. Kromatogrammi optimoidulla SIM-menetelmällä analysoidusta veteen laimennetusta kalibraattorista 1 mg/ml. Glyceroli-d<sub>5</sub>-ionit ovat m/z 208, 222, 298 ja glyserolin ionit ovat m/z 205, 218 ja 293.

Retentioajat sekä glyserolille että glyseroli-d<sub>5</sub>:lle ovat jokseenkin samat, mutta yhdisteet ovat erotettavissa, kun mittaus tehtiin kummallekin yhdisteelle spesifisillä ioneilla.

#### 4.3.2 Kalibrointi

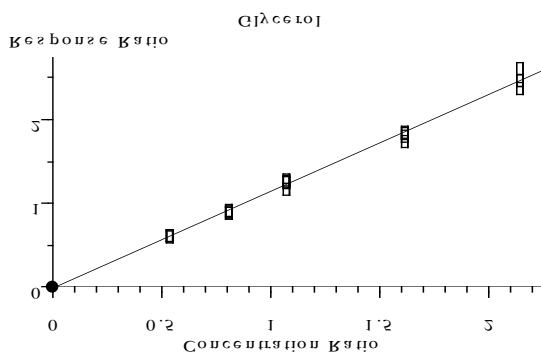
Kalibraattoreiden verifiointiin ja kalibroinnin lineaarisuuden arviointiin käytettiin neljää eri kalibrointisarjaa. Pienemmän neliösumman menetelmällä saadut suorat olivat lineaarisia koko mittausalueella ja keskenään samanlaisia. Selitysasteet  $R^2$  olivat välillä 0,995 - 0,997 ja kulmakertoimien suhteellinen keskihajonta oli 3,3 %. Lineaarisuutta tutkittiin myös residuaalikuvaajan avulla, kuvassa 11. Residuaalikuvaajassa poikkeama on mitattu jokaisen neljän sarjan kustakin mittauspisteestä erikseen.



Kuva 11. Glyserolin lineaarisuusmittausten residuaalikuvaaja. Kuvassa on yhdistettynä kaikkien neljän kalibrointisuoran poikkeamat (Bias-%).

Residuaalikuvaajassa voidaan havaita mittauspisteiden poikkeaman olevan välillä  $\pm 6$  %, eikä kuvaajassa ole havaittavissa pitoisuudesta riippuvaa vinoumaa.

Kalibroinnin suoran yhtälöiden uusittavuutta testattiin toistokokeilla eri päivinä ( $n=10$ ). Saatujen suorien kulmakertoimen keskiarvo oli 1,1 suhteellinen keskihajonta 8 % ja y-akselin leikkauspisteiden keskiarvo -0,008. Suorien selitysasteiden  $R^2$  keskiarvoksi saatiin 0,986. Edellä esitetyn perusteella glyserolimittausten uusittavuus ja lineaarisuus oli hyvä. Esimerkki glyserolin kalibrointikuvaajasta on esitetty kuvassa 11.



$$\text{Response} = 1.16 * -1.72e-002$$

$$R^2 = 0.997$$

Kuva 12. Esimerkki glyserolin kalibrintokuvaajasta.

#### 4.3.3 Spesifisyys

Menetelmän spesifisyyttä arvioitiin vertailemalla veteen valmistetun standardiliuoksen 1,0 mg/ml kvalitatiiviseen tunnistukseen käytettävää mittaustietoa virtsamatriisiin valmistetun standardin 0,6 mg/ml tietoon. Tuloksista voidaan havaita, että glyserolin retentioajat ja suhteelliset ionien osuudet ovat mittauksissa jokseenkin samat (taulukko 4). Virtsamatriisissa ei siis havaittu glyserolin identifiointia häiritseviä komponentteja.

Taulukko 4. Glyserolin identifiointi vesi- ja virtsamatriisista.

Näyte	RT (min.)	Ionin suht. osuus (%)		
		m/z 205,15 (Target)	m/z 218,15 (Q1)	m/z 293,2 (Q2)
Glyseroli std 1,0 mg/ml H <sub>2</sub> O	2,84	100	31,7	2,7
Glyseroli std 0,6 mg/ml virtsa	2,84	100	31,5	2,6

Spesifisyyttä arvioitiin myös mittaamalla virtsan normaalia fysiologista glyserolitasoa kymmeneltä naiselta ja kymmeneltä mieheltä kerätyillä kertavirtsanäytteillä. Mittaustulokset vaihtelivat 1 - 5 µg/ml (n=20). M. Theviksen mittauksissa glyserolin fysiologinen taso vaihteli 4,6 – 27,6 µg/ml (n= 1039).<sup>3</sup> Tasoero voi johtua analysoitujen näytteiden lukumäärästä tai sitten käytetystä populaatiosta. Theviksen menetelmässä näytteet oli kerätty kilpaurheilijoilta, kun tässä työssä glyserolin fysiologista tasoa analysoitiin laboratorion henkilökunnalta.

## 4.3.4 Toistettavuus

Pitoisuuden ja identifiointin toistettavuutta testattiin analysoimalla kontrollinäyte 1 mg/ml 10 kertaa, samassa sarjassa, samalla laitteella ja saman päivän aikana. Toistettavuusmittaukset tehtiin kummallakin laitteistolla ja mittausten tulokset on eritelty taulukossa 5.

Taulukko 5. Pitoisuuksien toistettavuudet eri laitteilla.

Toistettavuus "Pasi" 090114		Toistettavuus "Krisse" 131213	
QC 2; 1 mg/ml		QC 2; 1 mg/ml	
Näyte	Pitoisuus	Näyte	Pitoisuus
1	0,98	1	0,98
2	1,08	2	1,02
3	0,98	3	0,91
4	1,07	4	0,9
5	1,03	5	0,99
6	1,08	6	1,05
7	1,08	7	0,99
8	0,93	8	1,06
9	1,06	9	1,03
10	0,99	10	1,07
ka.	1,028	ka.	1
sd.	0,05	sd	0,06
cv%	5,28	cv%	5,87

Sarjan sisäisen toistettavuuden suhteellinen keskihajonta oli menetelmän kehittelyyn käytetyllä "Krisse" -laitteella 5,9 % ja rutiinajoihin ja validointiin käytetyllä "Pasi" -laitteistolla 5,3 %. Mittaustulosten keskiarvot ovat likimain samat molemmilla mittalaitteilla ja keskihajonnat jäävät pieniksi. M. Theviksen menetelmässä sarjan sisäistä toistettavuutta oli testattu kolmella eri pitoisuustasolla ja pitoisuuksien suhteellinen keskihajonta oli 9 - 17 %. Suurempi suhteellinen keskihajonta johtuu matalammasta kvantitointirajasta ja mittausalueesta. Theviksen menetelmän mittausalue oli 1 - 98 µg/ml ja toistettavuuksia oli mitattu pitoisuuksilla 2,4, 24,0 ja 48,1 µg/ml. Pienemmillä pitoisuuksilla suhteellinen hajonta on herkemmin suurempaa kuin suuremmilla pitoisuuksilla.

Identifioinnin toistettavuutta testattiin samoista näytteistä ja tulokset on eritelty taulukossa 6.

Taulukko 6. Glycerolin identifioinnin toistettavuus.

Näyte	Rt (min.)	Ionisuhteet (%)		
		m/z 205,15	m/z 218,15	m/z 293,15
1	2,86	100	31,4	2,8
2	2,86	100	31,2	2,7
3	2,86	100	31,3	2,7
4	2,86	100	31,2	2,7
5	2,86	100	31,3	2,8
6	2,86	100	31,1	2,7
7	2,86	100	31,5	2,8
8	2,86	100	31,1	2,7
9	2,86	100	31,4	2,8
10	2,86	100	31,1	2,7
		ka.	31,24	2,73
		sd.	0,143	0,052

Ionien retentioajat ja ionisuhteet olivat samaa tasoa kaikilla mittauksilla. Ionin m/z 218 ionisuhteen keskiarvo oli 31,2 %. WADAn sallima vaihteluväli ko. ionisuhteelle on 25 - 37,4 %. Ionin m/z 293 ionisuhteen keskiarvo oli puolestaan 2,7 %. WADAn sallima vaihteluväli ko. ionisuhteelle on 1,35 - 4,05 %. Mitatut tulokset menivät selvästi annettujen toleranssirajojen sisään.

#### 4.3.5 Uusittavuus

Menetelmän pitoisuustason uusittavuutta tutkittiin analysoimalla kontrollinäytteitä 0,6, 1,0 ja 1,4 mg/ml eri päivinä (n=10) kolmena rinnakkaisena tehdyissä analyysisarjoissa. Kontrollien uusittavuusmittaukset ovat taulukossa 7.

Taulukko 7. Glyserolikontrollien uusittavuus eri päivinä.

Analyysisarjan eränumero	Näytteet käsitellyt henkilö	QC 1	QC 2	QC 3
090114	A	0,650	0,983	1,367
170114	B	0,673	1,067	1,453
210114	C	0,623	1,043	1,457
230114	B	0,617	1,023	1,420
270114	A	0,653	1,097	1,523
270114	C	0,677	1,010	1,387
290114	B	0,667	1,143	1,497
290114	A	0,693	1,103	1,483
60214	D	0,623	1,053	1,450
200314	A	0,600	0,977	1,427
ka.		0,65	1,05	1,45
sd		0,03	0,05	0,05
cv%		4,72	5,14	3,34

Suhteellinen keskihajonta oli kontrollilla 0,6 mg/ml 4,7 %, kontrollilla 1,0 mg/ml 5,1 % ja kontrollilla 1,4 mg/ml 3,3 %. M. Theviksen menetelmässä uusittavuutta oli testattu pitoisuustasoilla 2,4, 24,0 ja 48,1 µg/ml. Theviksen menetelmän uusittavuuksien suhteellinen keskihajonta oli 10 - 17 %.

#### 4.3.6 Matriisivaikutus

Matriisivaikutusta tutkittiin laimentamalla virtsapohjaista näytettä 2,0 mg/ml vedellä pitoisuustasoille 1,5, 1,0, 0,75 ja 0,5 mg/ml (näytteet 1 - 5). Mittaustulokset laskettiin takaisin laimennuskertoimien avulla ja tuloksia verrattiin laimentamattomaan näytteeseen. Matriisivaikutuksen mittaustulokset taulukossa 8.



Taulukko 8. Virtsamatriisiin laimentamisen vaikutus pitoisuuteen.

Näyte	Laimennoskerroin	Mitattu pitoisuus (mg/ml)	Korjattu pitoisuus (mg/ml)	Saanto- %
1	1	2,17	2,17	100,0
2	1,33	1,54	2,04	94,0
3	2	1,07	2,01	92,8
4	2,7	0,79	2,12	97,7
5	4	0,47	2,00	92,2

Mittaustuloksista voidaan havaita saantoprosentin olevan 92,2 - 97,7 %. Näin ollen voidaan sanoa, että matriisilla ei ole merkittävää vaikutusta tulostasoon.

#### 4.3.7 Näytteiden säilyvyys

Näytteiden säilyvyyttä testattiin mittaamalla yksi analyysisarja uudelleen neljän vuorokauden kuluttua. Näytteitä säilytettiin huoneenlämmössä valolta suojassa. Säilyvyyskokeiden tulokset on esitetty taulukoissa 9 ja 10.

Taulukko 9. Glycerolikontrollien säilyvyys- ja pitoisuusmittaus.

	Kontrolli	Kontrolli	Kontrolli
	0,6 mg/ml	1,0 mg/ml	1,4 mg/ml
<b>Mittaus A</b>	0,55	0,86	1,38
200314	0,65	1,03	1,5
	0,6	1,04	1,4
ka.	0,60	0,98	1,43
sd	0,050	0,101	0,064
cv%	8,3	10,4	4,5
<b>Mittaus B</b>	0,49	0,78	1,24
240314	0,58	0,91	1,34
	0,54	0,93	1,25
ka	0,54	0,87	1,28
sd	0,045	0,081	0,055
cv%	8,4	9,3	4,3

Kontrollien tulostasojen suhteelliset keskihajonnat olivat ensimmäisen päivän mittauksissa 4 - 10 % ja toisen päivän mittauksissa 4 - 9 %. Pitoisuusmittauksien kontrollien tulostasojen variansseja verrattiin F-testin avulla [0,6 mg/ml;  $F_{\text{lask}} = 1,23 < F_{0,05(2,2)} = 39,00$ ], [1,0 mg/ml;  $F_{\text{lask}} = 1,543 < F_{0,05(2,2)} = 39,00$ ] ja [1,4 mg/ml;  $F_{\text{lask.}} = 1,36 < F_{0,05(2,2)} = 39,00$ ]. F-testin variansseissa ei havaittu merkitsevää eroa, minkä seurauksena verrattiin kontrollin 1,0 mg/ml keskiarvoa kaksisuuntaisella t-testillä [ $t_{\text{lask.}} = 0,217 < t_{0,05(4)} = 2,776$ ]. Laskettu arvo oli pienempi kuin taulukkoarvo, joten keskiarvoilla ei havaittu merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla.

Taulukko 10. Glycerolikontrollien säilyvyys -identifiointi.

Mittaus A		200314		
Näyte	Rt. (min.)	Ionisuhteet (%)		
		m/z 205,15 (Target)	m/z 218,15 (Q1)	m/z 293,2 (Q2)
QC 1,0 mg/ml				
1	2,83	100	31,8	2,7
2	2,84	100	31,7	2,6
3	2,84	100	31,7	2,7
Mittaus B		240314		
Näyte	Rt. (min.)	Ionisuhteet (%)		
		m/z 205,15 (Target)	m/z 218,15 (Q1)	m/z 293,2 (Q2)
QC 1,0 mg/ml				
1	2,83	100	31,7	2,7
2	2,84	100	31,7	2,6
3	2,84	100	31,7	2,7

Retentioajat ja ionisuhteet olivat samat ennen ja jälkeen säilytyksen, joten säilytys ei vaikuttanut yhdisteiden tunnistamiseen.

#### 4.3.8 Systemaattinen virhe

Menetelmän oikeellisuus arvioitiin mittaamalla WAADSn EQAS -näyte 2,0 mg/ml kymmenessä sarjassa kolmena rinnakkaisena eri mittaajien toimesta, tulokset taulukossa 11.

Taulukko 11. EQAS - näytteen 2,0 mg/ml mittaustulokset

PVM	NK	ka. (mg/ml)	bias-%
090114	A	1,99	-0,50
170114	B	1,95	-2,50
210114	C	2,05	2,50
230114	B	2,00	0,00
270114	A	2,07	3,50
270114	C	1,95	-2,50
290114	B	2,21	10,67
290114	A	1,99	-0,50
60214	D	2,07	3,33
200314	A	2,01	0,33
ka.		2,03	1,43
sd		0,078	3,887

Systemaattisen virheen mittauksissa poikkeamien keskiarvo oli 1,43 ja sen neliöllinen keskiarvo (RMS) oli 3,96 %. EQAS -näytteen keskiarvoa verrattiin kaikkien mittauksien suorittaneiden laboratorioiden konsensuskeskiarvoon Studentin t-testin avulla [ $t_{\text{lask.}} = 1,22 < t_{0,05 (9)} = 2,262$ ]. T-testin perusteella voidaan todeta, ettei systemaattista virhettä esiinny 95 % luottamustasolla.

#### 4.3.9 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus laskettiin saaduista toistettavuus-, uusittavuus- ja systemaattisen virheen tuloksista WADAn ohjeistuksen mukaisesti käyttäen ”top down” lähestymistapaa.<sup>1</sup>

$$u(c) = \sqrt{u(\text{prec})^2 + u(\text{accu})^2} \quad (5)$$

$$u(\text{prec}) = \sqrt{S(b - \text{run})^2 + \frac{S(w - \text{run})^2}{n(e)}} \quad (6)$$

$$u(\text{accu}) = \sqrt{\text{bias}(\text{ref})^2 + u(\text{ref})^2} \quad (7)$$

$$u(\text{ref}) = \sqrt{\frac{s(\text{cons})^2}{n(\text{cons})}} \quad (8)$$

$u(c)$  = yhdistetty mittausepävarmuus

$u(\text{prec})$  = satunnaisvirheen mittausepävarmuus

$u(\text{accu})$  = oikeellisuuden mittausepävarmuus (QC 1,0 mg/ml CV%)

$s(\text{b-run})$  = uusittavuuden keskihajonta (%)

$s(\text{w-run})$  = toistettavuuden keskihajonta (%)

$n(e)$  = menetelmässä käytettyjen replikaattien lukumäärä

$\text{bias}(\text{ref})$  = systemaattinen virhe (%)

$u(\text{ref})$  = systemaattisen virheen arvioinnin mittausepävarmuus

$s(\text{cons})$  = EQAS-kierroksen osallistuneiden laboratorioiden mittaustulosten keskihajonta (%)

$n(\text{cons})$  = EQAS-kierrokselle osallistuneiden laboratorioiden lukumäärä

$$u(c) = \sqrt{5,7^2 + 4,16^2} = 7,1 \%$$

$$u(\text{prec}) = \sqrt{5^2 + \frac{5,65^2}{3}} = 5,7\%$$

$$u(\text{accu}) = \sqrt{3,96^2 + 1,29^2} = 4,16 \%$$

$$u(\text{ref}) = \sqrt{\frac{5^2}{15}} = 1,29 \%$$

Menetelmän yhdistetyksi mittausepävarmuudeksi saatiin 7,1 % ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi 14,2 % ( $k=2$ ), jotka ovat alle WADAn antaman maksimimittausepävarmuusrajan (15 %).

## 5 Päätelmät

Opinnäytetyön tavoitteena oli siirtää, optimoida ja validoida glyserolin mittaumenetelmä Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n huume-, lääkeaine- ja dopingosaston käyttöön.

M. Theviksen julkaisema menetelmä siirrettiin ja optimoitiin laboratoriossa käytössä oleville laitekokonaisuuksille.

Validoinnissa arvioitiin optimoidun menetelmän lineaarisuutta, spesifisyyttä, toistettavuutta, matriisivaikutusta, derivatisoidun näytteen säilyvyyttä ja systemaattista virhettä. Mittausepävarmuus arvioitiin WADAn teknisen dokumentin mukaan ”top down”-tekniikalla.

Validointitulosten perusteella menetelmä täyttää hyvin WADAn kynnysarvoyhdisteiden pitoisuusmittauksille ja yhdisteiden identifioinnille asetetut vaatimukset ja sitä voidaan käyttää dopinganalytiikassa glyserolin dopingkäytön osoittamiseen. Menetelmä lisättiin laboratorion akkreditoinnin pätevyysalueeseen keväällä 2014.

## Lähteet

- 1 WADA. 2013. Verkkodokumentti. <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical\\_Documents/WADA-TD2013DL-Decision-Limits-for-the-Confirmatory-Quantification-Threshold-Substances-EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2013DL-Decision-Limits-for-the-Confirmatory-Quantification-Threshold-Substances-EN.pdf)> Luettu 1.3.14.
- 2 WADA. 2010. Verkkodokumentti. <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA\\_TD2010IDCRv1.0\\_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays\\_May%2008%202010\\_EN.doc.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf)> Luettu 8.4.14
- 3 Thevis, Mario et al. 2008. Eur. J. Mass Spectrom. 14. s. 117 - 125. Germany.
- 4 ADT. 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.antidoping.fi/dopingaineryhmat-ja-menetelmat#S0>> Luettu 15.5.15
- 5 WADA. 2014. Verkkodokumentti. <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/2014/WADA-prohibited-list-2014-EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2014/WADA-prohibited-list-2014-EN.pdf)> Luettu 2.3.14.
- 6 ADT. 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.antidoping.fi/taulukko-1#S5>> Luettu 2.3.14.
- 7 Ketola, Raimo, Kostianen, Risto ym. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Hakapaino. Helsinki.
- 8 Suomi, Johanna. 2009. Kemiällisen näytteen esikäsittely. Otava. Helsinki.

- 9 Kemian metrologian opas, 2005. Mikes julkaisu J6/2005. Ehder, Tapio. Helsinki.
- 10 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Edita. Helsinki.
- 11 Agilent. 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/GC-GC-MS-Columns/pages/GCcustomcolumnshop.aspx> . >Luettu 9.3.14.
- 12 WADA. 2009. Verkkodokumentti. <[http://www.wadama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Testing/WADA\\_Int.Standard\\_Testing\\_2009\\_EN.pdf](http://www.wadama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Testing/WADA_Int.Standard_Testing_2009_EN.pdf). >Luettu 27.4.14.
- 13 Kuuranne, Tiia & Leinonen, Antti. 2013. Suomen klinisen kemian jäsenlehti 3/2013 s. 41 - 45. Helsinki.
- 14 TTL. 2006. Verkkodokumentti. <<http://kappa.ttl.fi/kemikaalikortit/khtml/nfin0624.htm>.> Luettu 2.3.14.
- 15 Kolmonen, Marjo. 2011. Accurate mass-based analysis in human sport doping control. Picaset Oy. Helsinki.
- 16 Lambrecht, M., 2013. Acute Topics in Sport Nutrition. Med Sport Sci. vol 59, s. 104-112. Karger.Basel.
- 17 Nelson, Jeff L., Harmon, Molly E., Robergs, Robert A. 2011, Journal of Analytical Toxicology, vol. 35. 11-12/2011. s.617-623.
- 18 Karsten, Koehler. Thevis, Marjo. Schaenzer, Wilhelm. 2013. Drug Test. Analysis. 10/2013. s. 896-899.
- 19 Kelly, Brian N. et al. 2013. Drug Test. Analysis. 9/2013. s. 890-895.

- 20 Gordon V. Givan and Jason J. Diehl,. 2012. Sports Health. vol.4, s.333 -339. Colubus. Ohio.
- 21 Dong, Ying et al. 2014. Journal of Chromatography B., vol. 957. s.30-35.
- 22 Drug Testing and Analysis. 2014. Verkkodokumentti. <[www.drugtestinganalysis.com](http://www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.1701> Luettu 21.11.14