

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGOR NOVAK

UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ANABOLIČNIH STEROIDOV V
PREHRANSKIH DOPOLNILIH NAMENJENIH ŠPORTNIKOM S TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI

DETERMINATION OF THE PRESENCE OF ANABOLIC STEROIDS IN
NUTRITIONAL SUPPLEMENTS FOR ATHLETS BY HPLC

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo (Katedra za farmacevtsko kemijo) pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm. in somentorja doc. dr. Jožka Cesarja.

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. ANAMARIJI ZEGA, mag. farm. Posebna zahvala gre somentorju doc. dr. JOŽKU CESARJU za pomoč in usmerjanje pri analizah. Zahvala gre tudi prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za vzpodbudo ter pomoč pri diplomski nalogi. Zahvalil bi se tudi družini, partnerki Heleni Plavec in prijatelju Primožu Zemljiču, ker so mi stali ob strani v času študija ter me podpirali pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm. in somentorja doc. dr. Jožka Cesarja.

Vsebina

1.	UVOD.....	1
1.1	Prehranska dopolnila v športu	1
1.2	Doping	3
1.2.1	Lista prepovedanih snovi in postopkov za leto 2016	5
1.2.2	Anabolični agensi.....	6
1.3	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	8
1.4	Validacija HPLC metode	11
1.4.1	Linearnost.....	11
1.4.2	Natančnost	11
1.4.3	Točnost	12
1.4.4	Kolona.....	13
2	NAMEN IN POTEK DELA.....	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	Materiali	15
3.1.1	Laboratorijska oprema	15
3.1.2	Aparature	15
3.1.3	Topila.....	15
3.1.4	Standardi AAS.....	16
3.1.5	Vzorci.....	17
3.2	Postopki priprave raztopin standardov.....	19
3.2.1	Raztopine standardov za UV/vis spektroskopijo.....	19
3.2.2	Raztopine standardov za optimizacijo HPLC ločbe.....	19
3.2.3	Raztopine standardov za linearnost.....	19
3.2.4	Raztopine standardov za točnost in natančnost	20
3.3	Postopki priprave raztopin vzorcev.....	21
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
4.1	Razvoj kromatografske metode	23
4.1.1	UV spektri standardov in izbira valovne dolžine detekcije	23
4.1.2	Izbira mobilne faze	24
4.2	Validacija kromatografske metode	26

4.2.1	Linearnost metode	27
4.2.2	Točnost in natančnost metode	29
4.3	Analiza vzorcev	33
5	SKLEP	36
6	LITERATURA.....	37
7	PRILOGE.....	39

Povzetek

Androgeni anabolični steroidi (AAS) so zaradi svojih učinkov, kot je povečanje mišične mase, kljub dokazanim negativnim vplivom na zdravje, med najpogosteje zlorabljenimi snovmi v športu. Antidopinške organizacije jih že od samega začetka uvrščajo na Listo prepovedanih snovi, vendar je njihova uporaba še vedno zelo razširjena tako med vrhunskimi športniki kot rekreativci. Iz literature je znano, da so lahko AAS prisotni tudi v nekaterih prehranskih dopolnilih, kjer pa niso deklarirani, ampak jih proizvajalci namenoma dodajajo, da bi povečali njihovo učinkovitost. To omogočata tudi ohlapna zakonodaja glede kontrole kakovosti prehranskih dopolnil ter močna konkurenca na globalnem trgu. Jemanje takih preparatov pomeni pri športnikih poleg tveganja za zdravje tudi nenamerno tveganje za pozitivno dopinško kontrolo.

Namen diplomske naloge je bil preveriti ali proizvodi na slovenskem trgu, katere prodajalci oglašujejo kot naravne anabolike, oziroma kot pripravke, ki povečujejo moč ter eksplozivnost, vsebujejo AAS. Za raziskavo smo izbrali komercialno dostopne standarde AAS, ki se največkrat pojavljajo na črnem trgu in razvili metodo za njihovo določanje z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Z UV/vis spektroskopijo smo določili optimalne valovne dolžine detekcije ter nato optimizirali pogoje kromatografske ločbe. Končna metoda nam tako z uporabo C18 reverznofazne kolone in mobilne faze, ki je zmes metanol /acetonitril /voda, omogoča določanje devetih AAS v manj kot 7 minutah. Večina AAS (testosteron, 17α -metiltestosteron, androsten-3,17-dion, metandienon, nandrolon in boldenon) dobro absorbira UV svetlobo pri 242 nm in jih lahko v vzorcih določimo tudi v zelo nizkih koncentracijah (okrog 5 ppm glede na maso – število masnih delov snovi v milijonu). Nekoliko višje koncentracije (50 ppm) so potrebne za določanje trans-dehidroepiandrosterona (pri 220 nm), še višje (nad 1000 ppm) pa za trans-androsteron (pri 296 nm) in androstanolon (pri 220 nm). Metodo smo validirali, tako da smo potrdili, da je v svojem območju linearna, točna in natančna.

Vzorci, ki smo jih analizirali, so imeli zelo heterogeno sestavo. Zlasti pri tistih, ki vsebujejo rastlinske ekstrakte, so v kromatogramih vidni številni vrhovi, zato smo si pri identifikaciji pomagali z dodatkom zmesi standardov AAS.

Razveseljivo je, da nobeden izmed 15 analiziranih vzorcev ni vseboval AAS. Smiselno bi bilo omogočiti kontrolo prehranskih dopolnil s strani neodvisnega laboratorija in tako zagotoviti dodatno varnost ozaveščenim športnikom ter ostalim potrošnikom.

Seznam okrajšav

AAS	Anabolični androgeni steroidi
AU	Absorpcijska enota (angl. <i>Absorption Unit</i>)
AUC	Površina pod krivuljo (angl. <i>Area Under Curve</i>)
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i> , oddelek Ameriškega kemijskega društva, ki vsaki novoopisani spojini dodeli enoznačni identifikator, t.i. CAS številko
DHEA	Dehidroepiandrosteron
GC	Plinska kromatografija (angl. <i>Gas chromatography</i>)
HPLC	Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	Mednarodna konferenca za harmonizacijo (angl. <i>International Conference on Harmonization</i>)
LC	Tekočinska kromatografija (angl. <i>Liquid chromatography</i>)
MOK	Mednarodni olimpijski komite
MS	Masna spektrometrija
MWD	Detektor z možnostjo spremljanja večih valovnih dolžin hkrati (angl. <i>Multiple Wavelength Detector</i>)
NAK	Nacionalna antidopinška komisija
UV-vis	Ultravijolični vidni detektor (angl. <i>Ultraviolet visible spectroscopy</i>)
WADA	Svetovna proti dopinška agencija (angl. <i>World Anti Doping Agency</i>)

1. UVOD

Za doseganje odmevnih rezultatov v vrhunskem športu je potrebno veliko časa, odrekanja in potrpežljivosti, zato se vse več posameznikov odloča za lažjo pot do uspeha in sicer s pomočjo uporabe nedovoljenih sredstev. Športne organizacije so v zadnjih nekaj desetletjih naredile velik korak k preprečevanju uporabe teh snovi. Razlog za prepoved uporabe je predvsem tveganje za zdravje, poleg tega pa seveda zagotavljanje enakih možnosti doseganja rezultatov za vse športnike. Prehranskih dodatkov ne uživajo le vrhunski športniki temveč tudi veliko rekreativnih športnikov. Vedno večje ambicije in pomanjkanje časa v sodobnem svetu so pripeljali do tega, da so ljudje za hiter doseg zastavljenega cilja pripravljeni plačati veliko denarja. To je spodbudilo prehransko industrijo, da je začela razvijati različne prehranske dodatke in danes je na trgu veliko različnih pripravkov za doseganje ter izboljšanje športnih rezultatov, ki so dostopni vsakemu posamezniku. Trg ponuja veliko prehranskih dodatkov, ki resnično izboljšajo rezultate, vendar vsebujejo tudi učinkovine, ki so škodljive zdravju in lahko ob nenadzorovani uporabi pripeljejo do različnih zdravstvenih težav, v skrajnem primeru tudi do smrti (1).

1.1 Prehranska dopolnila v športu

Izraz prehransko nadomestilo je potrebno razlikovati od izraza prehransko dopolnilo. Prehranska nadomestila navadno nadomeščajo obrok ali ga celo zamenjajo, medtem ko prehransko dopolnilo dopolnjuje prehrano in ni nadomestilo za uravnoteženo prehrano.

Prehranska dopolnila so lahko namenjena tako bolnikom kot zdravim osebam v smislu dopolnila k osiromašeni prehrani. Nekatere učinkovine (npr. vitamini, glukozamin ipd.) so lahko registrirane kot zdravilo brez recepta ali kot prehransko dopolnilo. Slovenska zakonodaja uvršča prehranska dopolnila med živila in zanje ne veljajo tako stroga pravila kot za zdravila in jih je mogoče kupiti tudi v nekaterih trgovinah z živili. Pri oglaševanju prehranskih dopolnil je z zakonodajo prepovedano oglaševati, da karkoli zdravijo. Vsekakor pa je zelo pomembno, da so vsi proizvodi, ki jih najdemo na tržišču, skladni z vsemi normativi in predpisi, ki jih določa zakonodaja (4).

Prehranska dopolnila ne smejo presegati zakonsko določenih vsebnosti mineralov, vitaminov in oligoelementov. Vsebujejo pa tudi druge substance, ki se v telesu vključujejo v fiziološke procese. Uporaba teh se priporoča osebam, ki imajo povečano potrebo po mineralih, vitaminih ali oligoelementih (športniki, starostniki, nosečnice...).

Prehranska dopolnila največkrat uživajo športniki, ki med fizičnimi napori nimajo dovolj časa, da bi zaužili normalen obrok, vendar njihovo telo potrebuje kakovostna hranila. Nekateri trenerji vrhunskih športnikov so celo mnenja, da običajna hrana za športnike ni najboljša izbira, ker športnika zaradi težje prebavljivosti ovira pri večjih fizičnih obremenitvah (3). Prehrana v obliki koncentratov hranil ali izvlečkov hranil (iztisnjeni sokovi določenih rastlin) športnikom pomaga pri premagovanju velikih naporov. Nedovoljenih snovi ne uporabljajo zgolj profesionalni športniki, pač pa so jih v devetdesetih letih v želji po čim hitrejšem oz. enostavnejšem pridobivanju mišične mase, pričeli množično uporabljati tudi amaterski športniki. Z uporabo teh se pri športnikih umetno izboljša njihova fizična moč, vzdržljivost ter mentalna sposobnost. Glavni razlog za uporabo dopinga je povečanje sposobnosti organizma za vrhunske športne dosežke.

Športniki, ki uživajo prehranska dopolnila, morajo biti zelo previdni pri nakupu in uporabi teh, kajti hitro se lahko zgodi, da je športnik na dopinški kontroli pozitiven ali, da se pojavijo neželeni stranski učinki. Zaradi pomanjkljivo napisanih deklaracij ter navodil za uporabo na izdelkih, ki se tržijo kot prehranski dodatki, lahko prihaja do nenamernega zaužitja prepovedanih snovi, do preodmerjanja in stranskih učinkov pri uporabnikih. Uporabniki prehranskih dopolnil se morajo zavedati, da tudi »naravna« dopolnila lahko vsebujejo prepovedane snovi. Vsa prehranska dopolnila morajo biti označena kot »Prehransko dopolnilo«.

Podatki, ki bi jih morala vsebovati deklaracija, morajo biti skladni s Pravilnikom o splošnem označevanju predpakiranih živil (Ur.l. RS, 50/04, 58/04,43/05, 83/05 in 115/05) in morajo vsebovati (15):

- ime, pod katerim se živilo daje v promet (prodajno ime),
- seznam sestavin in količina sestavin ali kategorije sestavin,
- neto količina,
- rok uporabnosti,
- serija živila,

- posebni pogoji shranjevanja ali pogoji uporabe,
- ime in naslov ter sedež proizvajalca ali tistega, ki živilo pakira, ali prodajalca, ki mora imeti naslov ali sedež v Skupnosti,
- podatek o kraju porekla,
- navodilo za uporabo.

Poleg pogojev iz predpisa, ki ureja splošno označevanje predpakiranih živil, mora označba prehranskega dopolnila vsebovati še naslednje podatke (4):

- imena vrste hranil ali snovi, ki so značilne za prehransko dopolnilo ali podatek o naravi hranil ali snovi,
- priporočeno dnevno količino, oziroma odmerek prehranskega dopolnila,
- opozorilo: »Priporočene dnevne količine, oziroma odmerka, se ne sme prekoračiti«,
- navedbo: »Prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano«,
- opozorilo: »Shranjevati nedosegljivo otrokom«.

1.2 Doping

Doping so nedovoljene snovi in postopki, ki psihično in fizično vplivajo na športnike in njihove dosežke. Beseda doping je prvotno označevala pripravek, ki je vseboval opij in so ga dajali konjem. Od leta 1900 naprej je izraz »dope« pomenil uporabo nedovoljenih snovi za tekmovalne konje (5). Leta 1963 je Svet Evrope definiral doping kot uporabo telesu tujih snovi z namenom nepoštenega načina izboljšanja sposobnosti posameznega športnika na tekmovanjih (5).

V Sloveniji velja za doping vsaka uporaba snovi ali postopkov, ki niso dovoljeni s strani Mednarodnega olimpijskega komiteja (MOK-a) in Nacionalne antidopinške komisije (NAK), ki je bila ustanovljena leta 1996 (8). MOK smatra za doping vnašanje ali vbrizgavanje katerekoli snovi, ki so uvrščene na listo »prepovedanih« substanc s strani medicinske komisije MOK (7). Lista prepovedanih snovi in postopkov je mednarodni standard, ki določa, katere snovi in postopki so prepovedane v športu. Prvič jo je MOK izdal leta 1968. Lista se posodablja letno in sicer 1. januarja, najnovejša različica je vedno

na voljo na spletni strani Svetovne proti dopinške agencije (WADA) (www.wada-ama.org) (2). Te snovi največkrat povečujejo mišično maso, imajo pa tudi veliko neželenih učinkov. Predvsem v kolesarstvu in atletiki se meje vrhunskih rezultatov dvigujejo zelo hitro, saj uporaba dopinga športniku omogoča, da ne čuti fizičnih omejitev, po napornih treningih in tekmovanjih pa si športnik opomore v bistveno krajšem času, kot če ne uživa prepovedanih snovi. Vrhunski rezultati pa so seveda povezani tudi z denarjem in tu se začne začaran krog med industrijo, ki proizvaja prepovedane snovi, ter med uporabniki teh. Višje kot so denarne nagrade, večja je verjetnost, da bodo najboljši tekmovalci pod vplivom nedovoljenih snovi.

Doping se pri tekmovalcih uporablja zelo različno ter v različnih odmerkih, a večina ga uporablja glede na vrsto treninga oziroma tekmovanja:

- v začetni fazi priprav športnika se doping uporablja za povečanje telesne moči ter dvig mišične mase,
- med samimi tekmovanji po dopingu športniki posežejo zaradi večje moči, ki je pogosto posledica povečanega prenosa kisika,
- po končanem tekmovanju pa tega uporabljajo za čim hitrejšo regeneracijo telesa ter obnovitev energijskih zalog.

Športniki se velikokrat poslužujejo dopinga tudi, ker jim primanjkuje časa za doseg določenega športnega rezultata. Športnik izgublja motivacijo za treninge, po uporabi dopinga pa je pot do zelenega dosežka bistveno krajša, kajti rezultati se hitro izboljšajo (6). Spodaj je naštetih nekaj glavnih razlogov, zaradi katerih se športniki poslužujejo dopinga (7):

- povečanje mišične mase in vzdržljivosti,
- zvečanje motoričnih sposobnosti,
- hitrejša regeneracija od običajne,
- povečanje koncentracije,
- slaba psihofizična pripravljenost,
- ohranjanje telesne teže,
- želja po čim večjih uspehih in s tem povezani slavi.

1.2.1 Lista prepovedanih snovi in postopkov za leto 2016

Prepovedane snovi in postopki, ki jih WADA letno objavlja, so razdeljeni v kategorije na podlagi njihovega učinka in uporabe. V prvem sklopu Liste prepovedanih snovi so navedene snovi in postopki, ki so prepovedani na in izven tekmovanja, v drugem delu Liste so navedene snovi in postopki, ki so prepovedani samo na tekmovanju in v zadnjem sklopu so navedene snovi in postopki, ki so prepovedani le v določenih športih (9).

Prvi sklop: snovi in postopki, prepovedani na in izven tekmovanja

Prepovedane snovi:

- anabolični agensi (anabolični androgeni steroidi (AAS), endogeni AAS, kadar so aplicirani eksogeno, ostali anabolični steroidi),
- peptidni hormoni, rastni dejavniki, sorodne snovi in posnemovalci,
- beta-2-agonisti,
- hormoni in metabolični modulatorji,
- diuretiki in maskirni agensi.

Prepovedane metode oziroma postopki

- manipulacija s krvjo in krvnimi komponentami,
- fizična in kemična manipulacija,
- genski doping.

Drugi sklop: snovi in postopki, prepovedani na tekmovanju

- poživila (vsa poživila, vključujoč vse optične izomere),
- narkotiki,
- kanabinoidi,
- glukokortikoidi.

Tretji sklop: snovi in postopki, prepovedani samo v določenih športih

- alkohol (detekcija se opravi z analizo v izdihanem zraku ali v krvi),
- beta blokatorji (prepovedani samo na tekmovanjih v določenih športih, če pa je posebej označeno, pa tudi izven tekmovanj) (9).

Vsaka farmakološka snov, ki ni imenovana v kateremkoli razredu Liste in ni odobrena od nobene regulatorne zdravstvene ustanove za humano uporabo, je prepovedana.

1.2.2 Anabolični agensi

Anabolične agense ločujemo na androgene anabolične steroide ter ostale anabolične steroide. Androgeni anabolični steroidi so derivati moškega spolnega hormona testosterona in imajo anabolične in androgene učinke. Uporabljajo se lahko peroralno ali pa v obliki injekcij. AAS delimo na eksogene in endogene. Eksogeni AAS so snovi, ki v telesu naravno niso prisotne. Med te spadajo androstendion, bolasteron, boldion, danazol, metandriol, nandrolon... Endogeni AAS so naravnega izvora in jih v zmernih količinah najdemo v telesu. Po eksogenem vnosu v telo pa se njihova količina in učinki močno povečajo. Med endogene AAS se uvrščajo androstendiol, dehidroepiandrosteron (DHEA), dihidrotestosteron (DHT), testosteron in njegove izomere ter metaboliti.

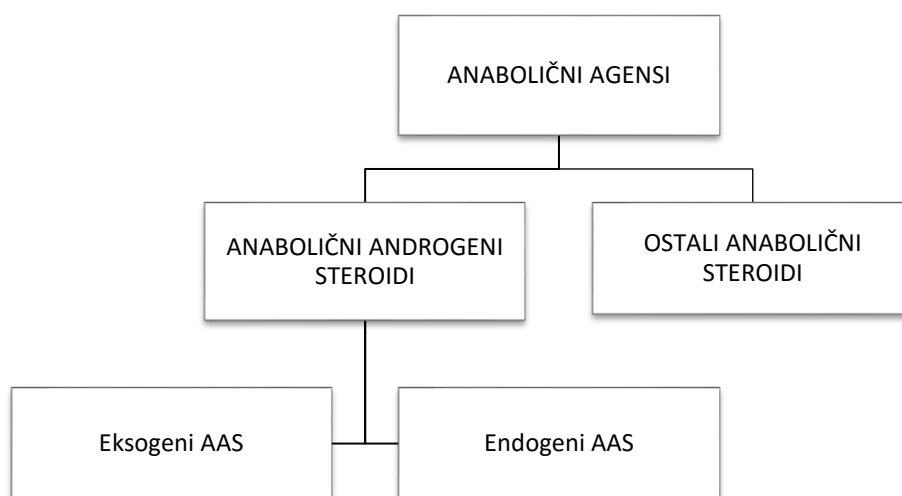
Po uporabi AAS ti povzročijo sintezo proteinov v skeletnih mišicah, okostju, koži ter spolnih organih. AAS okrepijo proteinsko sintezo v celicah in s tem rast mišičnega tkiva. Učinkujejo toliko časa, dokler jih športniki uživajo. Med samim uživanjem ter tudi po prenehanju uživanja pa se pojavi veliko stranskih učinkov, ki lahko vodijo celo do smrti. Stranski učinki med uživanjem se kažejo kot okvara jeter, agresivnost, poškodbe srca, po prenehanju pa se kažejo kot depresija ter čustvena nihanja. Dolgotrajno uživanje AAS lahko pri moških privede do povečanja prsi, plešavosti, zmanjšanja mod, kar povzroči tudi zmanjšanje števila semenčic (neplodnost), pri ženskah pa lahko privede do maskulinizacije, prekomerne poraščenosti, spremembe menstrualnega ciklusa ter tudi do neplodnosti. Uporaba AAS je v športu od leta 1976 prepovedana, saj je povzročila že veliko smrti in resnih zdravstvenih težav, vendar se jih še vedno poslužuje veliko športnikov v želji po vrhunskih športnih dosežkih (10).

Zaradi lahke dostopnosti preko spleta ter črnega trga je zelo razširjena uporaba nelegalnih AAS med rekreativnimi športniki (zlasti pri fitnessu). V teh primerih prihaja do nenamerne dopinga, ker prihaja do kontaminacije prehranskih dopolnil, ki namesto, oziroma poleg sestavin naravnega izvora, vsebujejo tudi farmakološko aktivne snovi, ki jih ne bi smeli.

Anabolični androgeni steroidi (AAS) so sintetične oblike testosterona z anaboličnimi učinki (1). Prve dopinške kontrole je Mednarodni olimpijski komite (MOK) opravil leta 1966, leta 1974 pa so uvedli prvo zanesljivo metodo odkrivanja AAS in od tega leta dalje so AAS na listi prepovedanih snovi pri MOK (2).

E. Lacqueur je prvi, ki je že davnega leta 1935 izoliral testosteron, njegovo strukturo pa je nato določil A. Butenandt. Leta 1939 je L. Ružička testosteron sintetiziral, za kar je prejel tudi Nobelovo nagrado za delo na spolnih hormonih (10).

Anabolične agense delimo kot je prikazano na Sliki 1.



Slika 1: Delitev anaboličnih agensov

Anabolični androgeni steroidi, ki so v letu 2016 na Listi prepovedanih snovi in postopkov, so navedeni v Prilogi I.

Endogeni anabolični androgeni steroidi, kadar so aplicirani eksogeno, so navedeni v Prilogi II, njihovi metaboliti pa v Prilogi III.

Prav tako MOK uvršča v skupino AAS ostale snovi s podobno kemijsko strukturo ali podobnim biološkim učinkom, ki so navedeni v Prilogi IV.

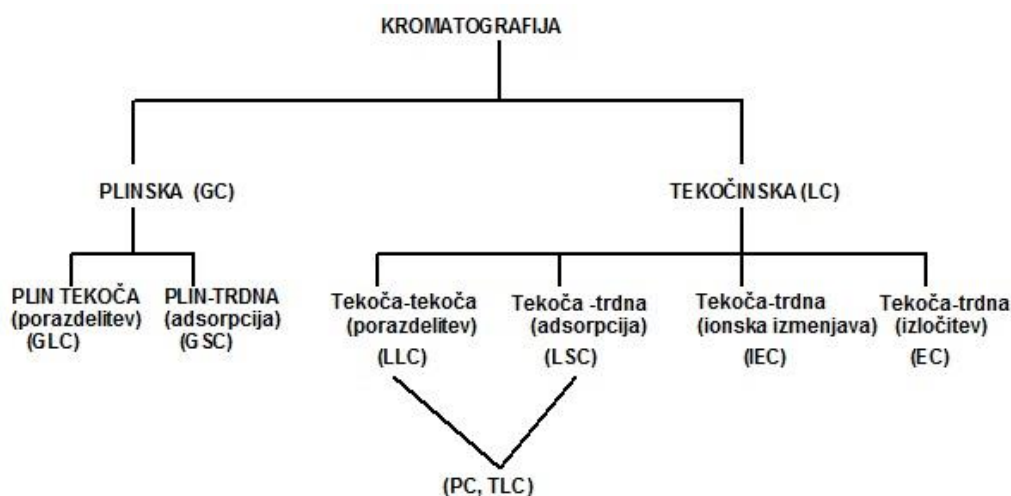
1.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Poznanih je več različnih sistemov in metod kromatografije, vendar sta vsem skupni stacionarna in mobilna faza. V začetku dvajsetega stoletja je ruski botanik M. S. Cvet prvi uporabil kromatografijo za ločitev listnih barvil. Razvoj kromatografije je nato razcvet doživel v času druge svetovne vojne in je do danes močno napredoval, kajti kromatografija je danes ena najpomembnejših tehnik za analizo spojin. Kromatografija omogoča analizo ter ločevanje sestavin zelo kompleksnih vzorcev. S kromatografijo lahko ločimo nukleinske kisline, beljakovine, sintetične polimere, ione, ter celo slabo polarne organske spojine (12). Glede na način izvedbe poznamo dve vrsti kromatografije:

- planarno kromatografijo ter
- kolonsko kromatografijo

Stacionarna faza pri planarni kromatografiji je nanešena na ravno ploščo ali pore papirja, pri kolonski kromatografiji pa je stacionarna faza v ozki koloni. Mobilna faza pri kolonski kromatografiji se premika skozi kolono zaradi gravitacije ali jo potiska tlak, pri planarni kromatografiji pa mobilna faza potuje po stacionarni fazi. Kolonske kromatografije se delijo v tri kategorije glede na vrsto mobilne faze: (Slika 2):

- tekočinska (LC)
- plinska (GC) ter
- kromatografija s superkritičnimi tekočinami (SFC)



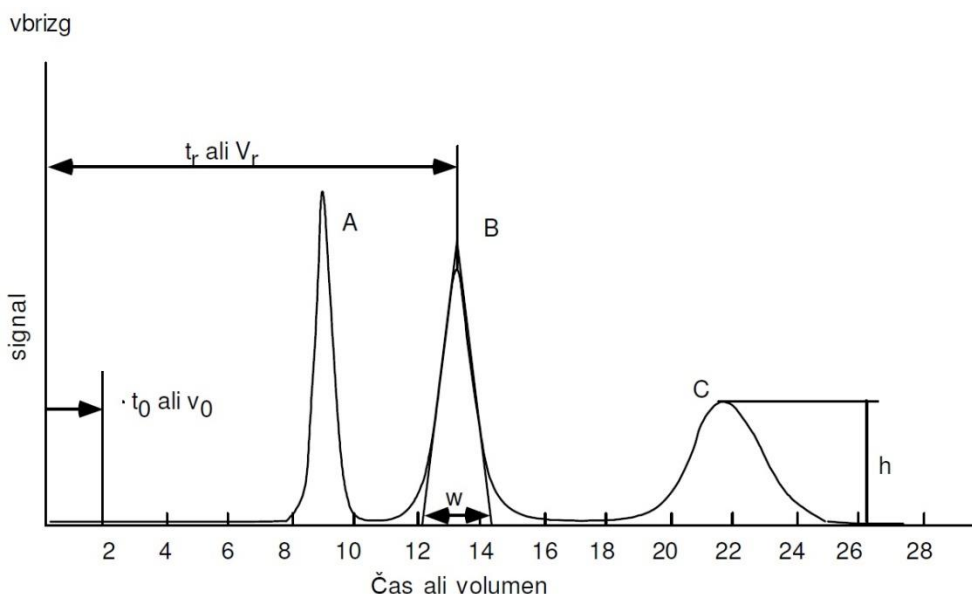
Slika 2: Shematski prikaz kromatografskih metod (21)

Glede na načina ločitve molekul vzorca pa razdelimo tekočinske kromatografije na:

- adsorpcijska kromatografija,
- porazdelitvena (normalno-fazna in reverzno-fazna) kromatografija,
- ionsko izmenjevalna kromatografija,
- izključitvena kromatografija.

Analizo steroidov otežuje njihova številčnost, podobnost v sestavi, temperaturna nestabilnost, nizek UV ekstinkcijski faktor ter njihova nizka hlapnost (18). Najpogostejši metodi za identifikacijo skoraj vseh AAS v prehranskih dopolnilih, ki so v obliki kapsul ali praška, sta presejalni metodi in sicer tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z UV-vis detektorjem (HPLC-UV-vis) in plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS) (19). Pri vseh kromatografskih metodah je pravilo, da je ločevanje (separacija) spojin posledica različnega zadrževanja teh na/v stacionarni fazi. Kvalitativno in kvantitativno določimo posamezne spojine z ustreznim detektorjem. Tekočinska kromatografija je analitična tehnika kromatografije, ki je primerna za ločevanje ionov in molekul, ki so raztopljene v topilu. Če je raztopina vzorca v stiku z drugo raztopino v trdnem ali tekočem stanju, se spojine ločijo zaradi njihovih interakcij s stacionarno fazo zaradi razlike v adsorpciji, ionske izmenjave ali zaradi razlike v velikosti. Te razlike omogočajo sestavnim delom zmesi, da se ločijo druga od druge z različnimi časi prehoda topljencev skozi kolono. Enostavna tekočinska kromatografija je sestavljena iz kolone s prozornim dnom in ima stacionarno fazo v ravnotežju s topilom. Mobilna faza je tekočina, medtem ko je stacionarna faza navadno imobilizirana ali trdna porozna snov (11). Na koloni se ločijo komponente vzorca in se ločeno eluirajo iz kolone. Nato vse sestavine zaznamo z detektorjem in se pojavijo signali kot kromatografski vrhovi, ki jih uporabimo za nadaljnjo obravnavo posamezne snovi. Površina pod kromatografskim vrhom je proporcionalna koncentraciji komponente v vzorcu. Iz vseh teh podatkov potem pridobimo kvantitativno sestavo vzorca.

Primer kromatograma (Slika 3).



Slika 3: Kromatogram večkomponentnega vzorca

Retencijski čas (t_r) je karakteristični čas, ki ga posamezen analit potrebuje, da prepotuje skozi kolono od injiciranja vzorca do detektorja. Ta vrednost je v danem kromatografskem sistemu (mobilna faza, kolona, konstantna temperatura in pretok) značilna za določeno komponento in jo lahko uporabimo za identifikacijo posameznih komponent. (11)

Čas, ki je potreben za prehod mobilne faze po enaki poti, imenujemo mrtvi čas (t_0).

V današnjem času je najbolj razširjena tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), pri kateri so majhni delci stacionarne faze polnjeni v kromatografske kolone. Zaradi majhnih delcev so potrebni visoki tlaki za potiskanje mobilne faze skozi kolono, kar nam omogočajo ustrezno zmogljive črpalke. Namen tekočinske kromatografije je fizična ločitev posameznih komponent vzorca, da jih lahko identificiramo ter izmerimo njihovo koncentracijo. Kakovost ločbe je odvisna od različnih dejavnikov in sicer:

- izbire stacionarne faze,
- sestava mobilne faze,
- dimenzije sistema (kolone) in
- temperature kolone.

1.4 Validacija HPLC metode

Glede na raziskave ter pogostost uporabe metode za identificiranje AAS v drugih laboratorijih smo se odločili, da bomo uporabili HPLC metodo in jo skušali optimizirati. Namen validacije je zagotavljanje kakovosti, zanesljivosti ter doslednosti rezultatov pri HPLC metodi. Validacija je dokumentiran postopek, ki se izvaja sistematično in z visoko stopnjo sigurnosti zagotavlja, da bo določen proces vedno potekal skladno s predpisanimi specifikacijami in ustrezal namenu uporabe (14). Pri izvajanju validacije nam pomagajo številne mednarodne smernice, ki natančno definirajo parametre in metodologijo preizkusov, s katerimi ovrednotimo posamezne parametre. Najbolj poznana smernica je smernica Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH), ki definira osem validacijskih parametrov za analize metode. Ti parametri so specifičnost metode, linearnost metode, delovno območje, točnost, natančnost, meja zaznavnosti, meja določljivosti ter robustnost metode (17).

1.4.1 Linearnost

Linearnost je opredeljena kot zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije iskane snovi v vzorcu. Standarde lahko pripravimo na dva načina in sicer z zatehtanjem ustrezne količine standarda ali z redčenjem začetne raztopine. Za optimalno določitev linearnosti je priporočljivo narediti vsaj pet različnih koncentracij s tremi ponovitvami, ki zavzemajo območje koncentracije od 80 % do 120 % pričakovane koncentracije. Linearnost navadno v poročilu podamo kot koeficient korelacije (R) (13).

1.4.2 Natančnost

Pri postopku validacije je potrebno opraviti in dokazati tudi natančnost meritev. Natančnost pomeni, da isti vzorec analiziramo v več ponovitvah, rezultati pa se po opravljenih analizah ujemajo. Najpogosteje natančnost izražamo z relativno standardno deviacijo (RSD), ki je izražena v odstotkih. Za RSD večje od 2 % je potrebno opraviti šest ponovitev, za $RSD \leq 2\%$ pa pet ponovitev. Mednarodna konferenca za harmonizacijo razlikuje tri vrste podajanja ter merjenja natančnosti (14):

- ponovljivost,
- vmesna natančnost ter
- obnovljivost.

1.4.3 Točnost

Točnost je merilo, kako se pridobljeni rezultati z analizo metodo ujemajo s pravimi vrednostmi. Točnost analizne metode oziroma pravo vrednost pri analizi farmacevtskih izdelkov lahko dobimo na različne načine:

- z uporabo primerljivih rezultatov, ki jih pridobimo z rezultati z že uveljavljeno referenčno metodo,
- analiziramo placebo raztopino, ki ji dodajamo znane količine preiskovane substance in merimo signale,
- če dokažemo, da je metoda natančna, specifična ter linearna v delovnem območju, lahko točnost privzamemo,
- z analizo referenčnih standardov in primerjavo povprečne izračunane vrednosti ter nominalne vrednosti.

Največkrat točnost prikažemo kot standardno deviacijo, njena določitev pa omogoča oceno zanesljivosti ene določitve.

Točnost metode smo izračunali s spodnjimi enačbami:

$$\text{Enačba 1: vsebnost} = \frac{AUC_{vz} \times c_{st} \times V \times f}{AUC_{st}}$$

$$\text{Enačba 2: točnost} = \frac{m_{dol}}{m_{dod}} \times 100\%$$

$\overline{\text{vsebnost}}_t$ = povprečna vsebnost učinkovine v tableti oz. kapsuli

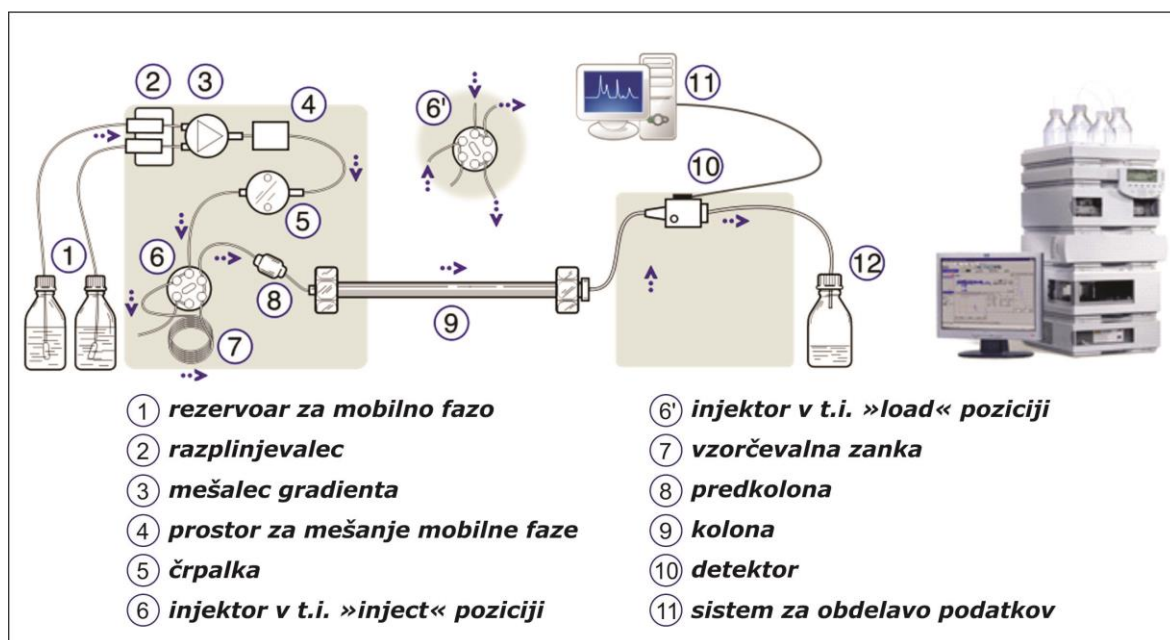
m_{dol} = določena masa standarda

m_{dod} = zatehtana masa standarda

1.4.4 Kolona

Kolona je najbolj zahtevni del HPLC in predstavlja glavni del kromatografskega sistema. Odvisna je tako od kvalitete stacionarne faze kot tehnologije polnjenja. Analitske kolone pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti imajo premer 2-5 mm in so dolge od 5-24 cm. Pomembno je tudi, da so kolone izdelane iz nerjavečega jekla za tiste z visokim tlakom, lahko pa so tudi steklene ali teflonske za tiste z nižjim tlakom (pod 10 barov). V kolikor je potrebno, pa lahko kolono tudi ogrevamo oziroma vzdržujemo stalno temperaturo s posebnimi grelci ter termostati. Stacionarna faza je najpogosteje vezana na silikagel, ki je v obliki drobnih delcev (od 3 do 10 μm). Najbolj je razširjena uporaba nepolarne stacionarne faze v kombinaciji s polarnimi topili, je pa v uporabi tudi več različnih vrst modifikacij, ki imajo različno polarnost in strukturo. Najpomembnejši del ločbe pri tekočinski kromatografiji je izbira mobilne in stacionarne faze, ki nam bosta omogočili optimalno ločbo posameznih komponent vzorca.

Natančnih navodil, ki bi določala točno izbiro stacionarne faze namreč ni. Večina proizvajalcev navaja ločitvene pogoje za določene spojine v različnih vzorcih, kar pa že veliko pripomore in olajša delo pri izbiri stacionarne faze. Slika 4 prikazuje sistem HPLC.



Slika 4: Shema HPLC sistema (16)

2 NAMEN IN POTEK DELA

V literaturi so opisani številni primeri, ko so bili prehranski dodatki za športnike kontaminirani z anaboličnimi androgenimi steroidi. V okviru diplomske naloge bomo preverili, kakšna je situacija pri tovrstnih izdelkih na slovenskem trgu. V ta namen bomo pridobili standarde posameznih AAS, ki so največkrat uporabljeni kot doping in ki so komercialno dostopni. Poizkusili bomo razviti HPLC metodo, ki bo omogočila medsebojno ločbo AAS, s čimer jih bomo lahko identificirali na podlagi retencijskih časov, in njihovo kvantitativno določitev na podlagi primerjave površin vrhov v vzorcu, kakor tudi v standardu. Metodo bomo pred uporabo validirali, da potrdimo njeno ustreznost. Preverili bomo njeno linearnost, točnost in natančnost.

Na koncu bomo analizirali vzorce nekaterih prehranskih dopolnil, zlasti tistih, ki naj bi glede na sestavo ter oglaševanje povečali moč in eksplozivnost pri športnikih in so dostopni v Sloveniji v specializiranih trgovinah s prehranskimi dodatki ali na spletu. Zlasti nas zanimajo izdelki, na katerih že proizvajalci navajajo, da so '*naravni androgeni*', saj je pri teh tveganje za kontaminacijo visoko.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Laboratorijska oprema

- Polnilne bučke in pipete: 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL
- Kvarčne kivete s pokrovčki
- Spatule, čolnički, liji, kapalke, filter papir
- Filtri z regenerirano celulozo (velikosti por 0,45 µm) za enkratno uporabo
- 2 mL viala za HPLC s pokrovčki

3.1.2 Aparature

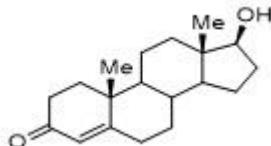
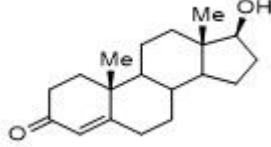
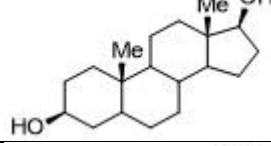
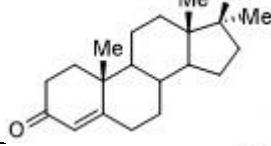
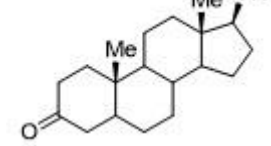
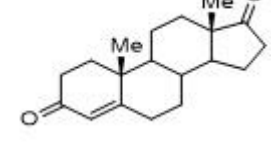
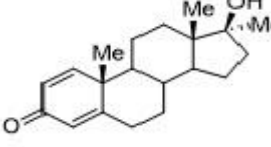
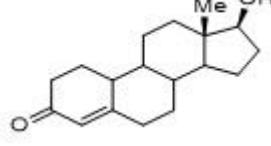
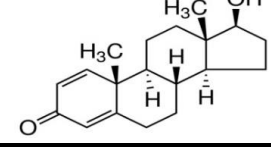
- Analitska tehtnica: AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)
- UV/vis spektrofotometer Varian Cary 50 s programsko opremo WinUV (Varian, CA, ZDA)
- Aparatura za HPLC: Agilent 1100 sistem s 4-kanalno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom in MWD detektorjem ter programsko opremo Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)
- Kromatografske kolone:
 - Eclipse Plus C18, 5µm, 150 mm x 4,6 mm (Agilent, CA, ZDA)
 - Kinetex C18, 2,6µm, 100 x 4,6mm (Phenomenex, CA, ZDA)
- Ultrazvočna kadička: Sonis 4 (Iskra, Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- Centrifuga: Centric 150 (Tehtnica Železniki d.o.o, Železniki, Slovenija)
- Hladilnik in zmrzovalnik: HZS156 RF3183 (Gorenje, Slovenija)

3.1.3 Topila

- Metanol za HPLC (CH₃OH), 99,9% (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Acetonitril za HPLC (CH₃CN), 99,9% (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Ultračista voda, pridobljena na Fakulteti za farmacijo z Mili-Q- Advantage A 10 (Milipore corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)

3.1.4 Standardi AAS

Tabela I: Standardi AAS, ki smo jih uporabili in njihovi proizvajalci. Zaradi različnih poimenovanj in podobnih imen so poleg strukture navedene tudi CAS številke, ki omogočajo nedvoumno identifikacijo posamezne spojine

Št. standarda	Ime (CAS)	Proizvajalec (stopnja čistosti)	MM (g/mol)	Struktura
Standard 1	Testosteron (58-22-0)	Acros Organics (≥ 97,0 %)	288,42	
Standard 2	Trans-dehidroepiandrosteron (DHEA) (53-43-0)	Acros Organics (≥ 99 %)	288,42	
Standard 3	Trans-androsteron (482-29-8)	Fluka Analytical (≥ 97,0 %)	290,45	
Standard 4	17α-metiltestosteron (58-18-4)	Aldrich Chemistry (≥ 97,0 %)	302,45	
Standard 5	Androstanolon (521-18-6)	Fluka Analytical (≥ 99 %)	290,45	
Standard 6	Androsten-3,17-dion (63-05-8)	Fluka Analytical (≥ 99,1 %)	286,41	
Standard 7	Metandienon (72-63-9)	Aldrich Chemistry (≥ 99 %)	300,15	
Standard 8	Nandrolon (434-22-0)	Aldrich Chemistry (≥ 99,0 %)	274,4	
Standard 9	Boldenon (846-48-0)	TCI (≥ 98 %)	286,41	

3.1.5 Vzorci



Vzorec 1



Vzorec 2



Vzorec 3



Vzorec 4



Vzorec 5



Vzorec 6



Vzorec 7



Vzorec 8



Vzorec 9



Vzorec 10



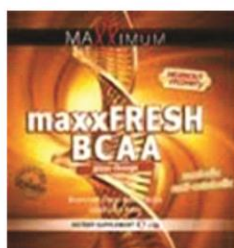
Vzorec 11



Vzorec 12



Vzorec 13



Vzorec 14



Vzorec 15

Slika 5 : Vzorci prehranskih dopolnil (embalaža)

Tabela II : Vzorci prehranskih dopolnil (sestava in proizvajalci)

Št. Vzorca	Ime izdelka	Deklarirana učinkovina	Proizvajalec
Vzorec 1	Creatine pH - x kapsule	Puferski kreatin monohidrat (1,5 g)	BioTech USA
Vzorec 2	Green FIT kapsule	Ekstrakt zelenega čaja (750 mg) Polifenol (210 mg)	Neznan (izdelano na Kitajskem za Maksimum d.o.o.)
Vzorec 3	Stack force kapsule	Kofein (0,27 g) Ekstrakt mate (0,1 g) Ekstrakt zelenega čaja 0,05 g) Ekstrakt ginsenga (0,05 g) Ekstrakt kole (0,04 g) Ekstrakt paprike (0,01 g)	Natures best Europe S.A.
Vzorec 4	ZMA Natural testostosterone kapsule	Magnezij (200 mg) Cink (30 mg)	Bioscience Nutrition - USA
Vzorec 5	Ultra Energy kapsule	Taurin (250 mg) L- karnitin (125 mg) Kofein (100 mg) Inozitol (50 mg) Ekstrakt ginsenga (75 mg) Niacin (8 mg) Biotin (25 µg)	Regis S.p z.o.o. - Poljska
Vzorec 6	L-carnitine – Green tea kapsule	L – karnitin (200 mg) Ekstrakt zelenega čaja (50 mg)	Trec nutrition - UK
Vzorec 7	Creatine – Magna power kapsule	Magnezijev kreatin kelat (1100 mg) Magnezij (88 mg)	Olimp Laboratories, Poljska
Vzorec 8	Malto dextrine prašek	Ogljikovi hidrati (5 g)	My Supps GmbH & Co. KG, Nemčija
Vzorec 9	Kreatin kapsule	Kreatin monohidrat (3 mg)	BodyLab - ZDA
Vzorec 10	Pure protein whey protein prašek	Ogljikovi hidrati (5 g)	Pure Protein - ZDA
Vzorec 11	Aminokislina BCAA prašek	Citrulin malat (1 mg)	Integralmedica, Brazilija
Vzorec 12	Weider pure creatine prašek	Kreatin (88 g)	Weider Global Nutrition, ZDA
Vzorec 13	Elite Whey proteine isolate prašek	Ogljikovi hidrati (2 g)	Dymatize - ZDA
Vzorec 14	Maxx fresh BCAA prašek	Ogljikovi hidrati (1,3 g)	Neznan (izdelano v Nemčiji za Maksimum d.o.o.)
Vzorec 15	Gold standard 100% whey prašek	Ogljikovi hidrati (3 g)	Optimum Nutrition - ZDA

3.2 Postopki priprave raztopin standardov

3.2.1 Raztopine standardov za UV/vis spektroskopijo

Pripravili smo devet 10 mL bučk in v vsako bučko točno zatehtali približno 10,00 mg posameznega standarda. V vsako bučko smo dodali cca. 8 mL 100 % MeOH in standarde raztopili. Da smo resnično dosegli popolno raztapljanje, smo si pomagali z ultrazvokom. Po končanem raztapljanju smo raztopine pustili v laboratoriju toliko časa, da so dosegle sobno temperaturo, nato pa vsako bučko dopolnili do oznake z MeOH in bučko dobro premešali. Končni raztopini (konc. 1 mg/mL) smo nato posneli UV spekter. Kadar je bila absorbanca previsoka (nad 1,5), smo raztopino redčili z MeOH in ponovno posneli UV spekter pri nižji koncentraciji.

3.2.2 Raztopine standardov za optimizacijo HPLC ločbe

Raztopine standardov 1, 4, 6, 7, 8 in 9, ki smo jih pripravili za UV spektroskopijo (1 mg/mL v MeOH), smo redčili 1mL/20mL z 60 % MeOH, da smo dobili raztopine standardov 0,05 mg/mL. Raztopine standardov 2, 3 in 5 smo redčili 1mL/2mL z vodo, da smo dobili standarde koncentracije 0,5 mg/mL. Pripravili smo še zmes vseh standardov skupaj, tako da smo v 20 mL bučko odpipetirali po 1 mL standardov 1, 4, 6, 7, 8 in 9 in po 2 mL standardov 2, 3 in 5 (vsi koncentracije 1 mg/mL) in dopolnili z vodo do oznake.

3.2.3 Raztopine standardov za linearnost

Vzeli smo sedem 20 mL bučk in v vsako točno zatehtali približno 10,0 mg standardov 1, 4, 6, 7, 8 in 9 ter 20,0 mg standarda 2 ter jih raztopili v 100 % MeOH (glej 3.2.1). Nato smo v isto 20 mL bučko zatehtali po 50,0 mg standardov 3 in 5 ter dodali 10 mL MeOH in raztopili. Dodali smo 5,0 mL raztopine standarda 2 ter po 1,0 mL raztopine vsakega izmed standardov 1, 4, 6, 7, 8 in 9. Nato smo dodali 20 mL vode in dopolnili z MeOH do oznake (raztopina LIN 1).

Raztopina LIN 2: odpipetirali smo 10 mL raztopine LIN 1 v 20,0 mL bučko in dopolnili s 60 % MeOH do oznake.

Raztopina LIN 3: odpipetirali smo 10 mL raztopine LIN 2 v 25,0 mL bučko in dopolnili s 60 % MeOH do oznake.

Raztopina LIN 4: odpipetirali smo 10 mL raztopine LIN 3 v 20,0 mL bučko in dopolnili s 60 % MeOH do oznake.

Raztopina LIN 5: odpipetirali smo 10 mL raztopine LIN 4 v 20,0 mL bučko in dopolnili s 60 % MeOH do oznake.

Raztopina LIN 6: odpipetirali smo 10 mL raztopine LIN 5 v 25,0 mL bučko in dopolnili s 60 % MeOH do oznake.

Koncentracije posameznih standardov v posamezni raztopini so prikazane v tabeli III.

Tabela III: *Koncentracija standardov v zmesi za linearnost*

	St. 1 (mg/ml)	St. 2 (mg/ml)	St. 3 (mg/ml)	St. 4 (mg/ml)	St. 5 (mg/ml)	St. 6 (mg/ml)	St. 7 (mg/ml)	St. 8 (mg/ml)	St. 9 (mg/ml)
LIN 1	0,01	0,1	1	0,01	1	0,01	0,01	0,01	0,01
LIN 2	0,005	0,05	0,5	0,005	0,5	0,005	0,005	0,005	0,005
LIN 3	0,002	0,02	0,2	0,002	0,2	0,002	0,002	0,002	0,002
LIN 4	0,001	0,01	0,1	0,001	0,1	0,001	0,001	0,001	0,001
LIN 5	0,0005	0,005	0,05	0,0005	0,05	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
LIN 6	0,0002	0,002	0,02	0,0002	0,02	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002

3.2.4 Raztopine standardov za točnost in natančnost

Najprej smo pripravili raztopino standardov A, tako da smo v 50,0 mL bučko odpipetirali 10 mL raztopine standarda 2 ter po 1,0 mL raztopine vsakega izmed standardov 1, 4, 6, 7, 8 in 9 (vsi koncentracije 1 mg/mL) ter dopolnili z MeOH do oznake.

Raztopina standardov B: točno smo zatehtali po 20,0 mg standardov 3 in 5 v isto 50,0 mL bučko, dodali 25,0 mL raztopine standardov A in dopolnili z MeOH do oznake.

Raztopina standardov C: v 100,00 mL bučko smo odpipetirali 10,0 mL raztopine standardov B in dopolnili z MeOH do oznake.

Za pripravo vzorca točnost 1: v 10,0 mL bučko smo natehtali maso dveh kapsul ter po 10,0 mg standardov 3 in 5 ter dodali 5,0 mL raztopine standardov A in 10 minut raztapljali v ultrazvoku. Nato smo dodali 4,0 mL vode, dopolnili z MeOH do oznake in dali še za 5 minut v ultrazvočno kadičko. Suspenzijo smo nato centrifugirali 5 min pri 5000 obr/min in filtrirali skozi 0,45 µm v HPLC vialo.

Za pripravo vzorca točnost 2: v 10,0 mL bučko smo natehtali maso dveh kapsul, dodali 5,0 mL raztopine standardov B ter nadaljevali postopek kot za pripravo raztopine točnosti 1.

Za pripravo vzorca točnost 3: v 10,0 mL bučko smo natehtali maso dveh kapsul, dodali 5,0 mL raztopine standardov C ter nadaljevali postopek kot za pripravo raztopine točnosti 1.

Vsak vzorec za točnost smo pripravili v treh paralelah. Končne koncentracije posameznih standardov v raztopinah za točnost so prikazane v tabeli IV.

Tabela IV: Koncentracija standardov v zmesi za točnost

	St. 1 (mg/ml)	St. 2 (mg/ml)	St. 3 (mg/ml)	St. 4 (mg/ml)	St. 5 (mg/ml)	St. 6 (mg/ml)	St. 7 (mg/ml)	St. 8 (mg/ml)	St. 9 (mg/ml)
Točnost 1	0,01	0,1	1	0,01	1	0,01	0,01	0,01	0,01
Točnost 2	0,005	0,05	0,2	0,005	0,2	0,005	0,005	0,005	0,005
Točnost 3	0,0005	0,005	0,02	0,0005	0,02	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005

3.3 Postopki priprave raztopin vzorcev

Pri vzorcih, ki so kapsule, smo najprej stehtali 5 kapsul, jih odprli in vsebino združili v vialo. Ovojnice smo sprali z MeOH, posušili in jih stehtali. V dve 10,0 mL bučki smo zatehtali masi dveh kapsul. V eno bučko smo dodali 5,0 mL MeOH, v drugo pa 5,0 mL raztopine standardov C (glej 3.2.4). Postavili smo jih v ultrazvok za 10 minut, nato dodali 4,0 mL vode in dopolnili z MeOH do oznake. Dali smo še za 5 minut v ultrazvok, centrifugirali 5 min pri 5000 obr/min in filtrirali skozi 0,45 µm v HPLC vialo.

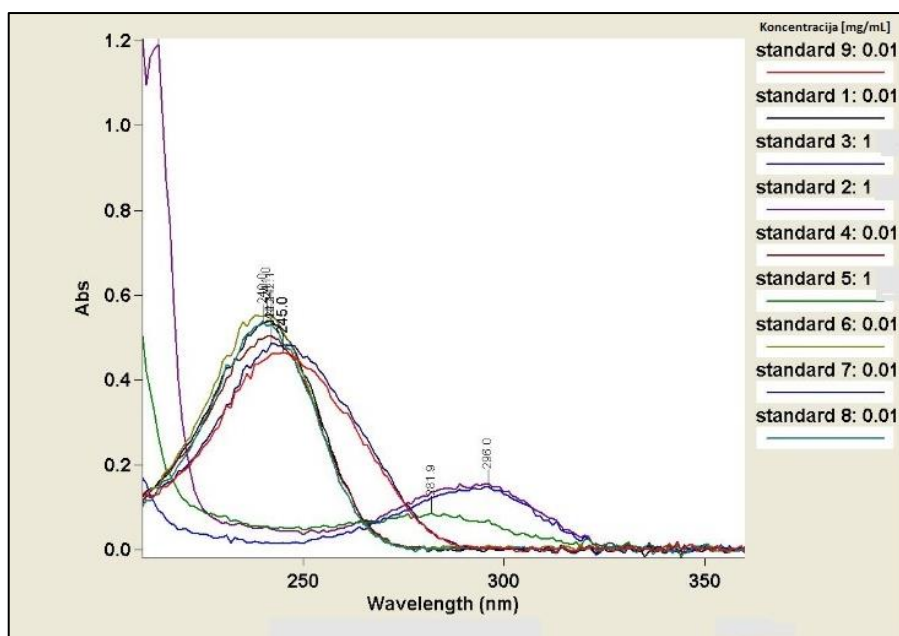
Pri vzorcih, ki so v obliki praškov, smo v dve 10,0 mL bučki zatehtali po 2 g prahu. V eno bučko smo dodali 5,0 mL MeOH, v drugo pa 5,0 mL raztopine standardov C in postopali enako kot zgoraj.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Razvoj kromatografske metode

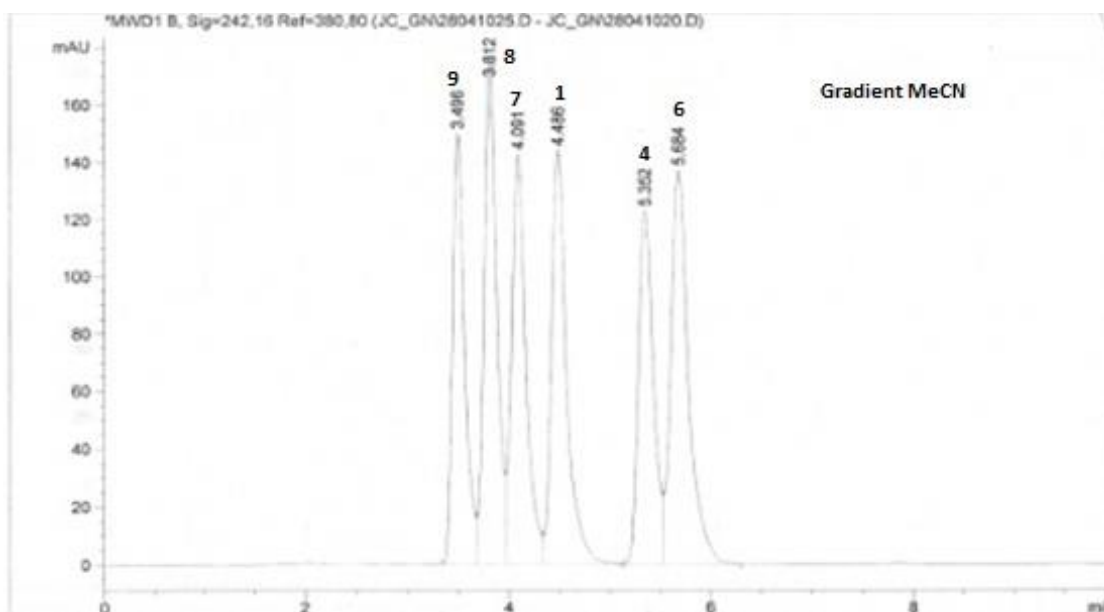
4.1.1 UV spektri standardov in izbira valovne dolžine detekcije

Pri eksperimentalnem delu smo imeli na voljo HPLC sistem z UV/vis detektorjem, ki nam omogoča hkratno merjenje absorbance pri različnih valovnih dolžinah (t.i. MWD). Ker smo imeli standarde z različnimi kemijskimi strukturami, smo najprej pripravili raztopine posameznih standardov v metanolu in posneli UV spekter. Optimalno občutljivost sistema za določen analit dosežemo, kadar je valovna dolžina detekcije enaka valovni dolžini njegovega absorpcijskega maksimuma. UV spektri posameznih standardov so prikazani na Sliki 6. Iz spektrov je razvidno, da imajo standardi 1, 4, 6, 7, 8 in 9 absorpcijski maksimum okrog 242 nm, standard 2 pri 282 nm, standarda 3 in 5 pa pri 296 nm. Ti rezultati se skladajo z njihovo kemijsko strukturo, saj vsebujejo standardi 1, 4, 6, 7 in 8 podoben kromofor (karbonilna skupina na mestu 3, ki je konjugirana z dvojno vezjo na mestu 4). Standard 2, ki vsebuje dvojno vez na mestu 5, ima šibak absorpcijski maksimum pri 282 nm. Standarda 3 in 5 nimata izrazitega kromoforja, zato je za njihovo detekcijo potrebna bistveno višja koncentracija oziroma imajo cca. 250-krat manjšo absorbanco kot standardi 1, 4, 6, 7, 8 in 9 (Slika 6).



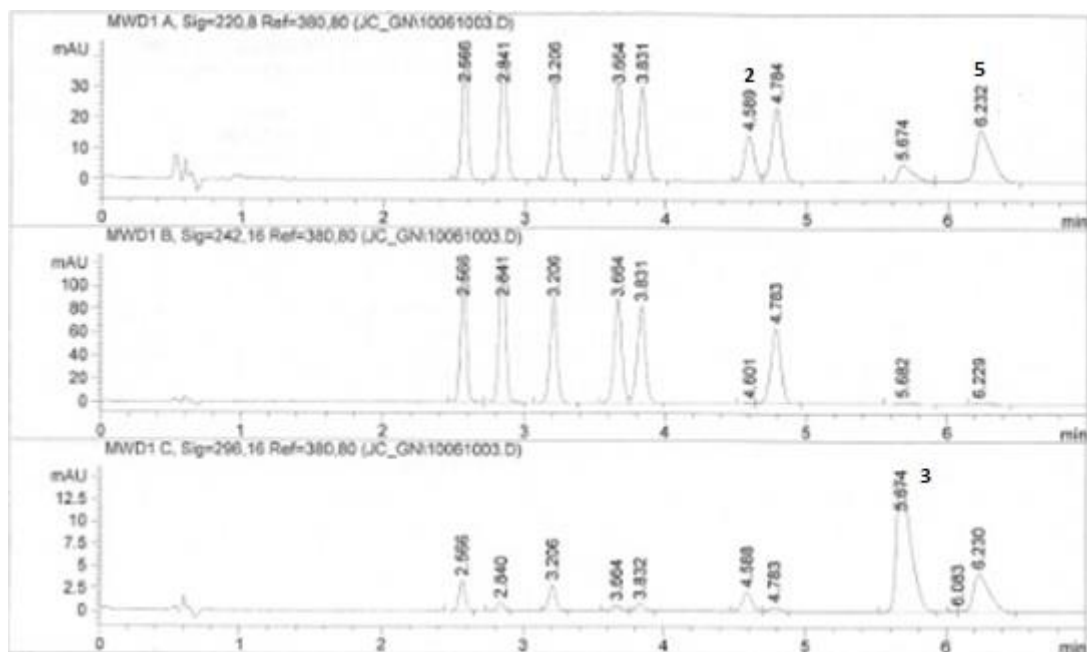
Slika 6: UV spektri raztopin standardov v metanolu. Navedene so tudi približne koncentracije posameznih raztopin.

smo uspeli medsebojno ločiti vse standarde pri 242 nm, vrstni red elucije pa je bil drugačen kot pri metanolu, kar prikazuje Slika 8.



Slika 8: Kromatogram zmesi standardov pri 242 nm za gradient acetonitril / voda. Kromatografski pogoji: gradient: 50 % do 95 % MeCN v 22 minutah, 2 minuti pri 95 % ter nazaj na 50% v 25 minuti; ostali pogoji so enaki kot so navedeni pri Sliki 6.

Kljub obetavnim rezultatom ločbe pa se je tokrat pojavila težava, ko smo hoteli določiti standard 2 pri 220 nm, saj se je njegov vrh prekrival z vrhom standarda 4, ki je pri 220 nm prav tako viden. Ker sta metanol in acetonitril različno ločila posamezne komponente, smo v nadaljevanju preizkusili kombinacije obeh topil, pri čemer smo spreminjali delež vsakega izmed njiju. Poleg tega smo zamenjali kromatografsko kolono in sicer smo vzeli takšno, ki je imela podobno C18 reverzno fazo in hkrati manjšo velikost delcev, kar poveča učinkovitost ločbe (vrhovi so ožji in zato bolje ločeni). Optimalno ločbo smo dosegli, kadar smo za mobilno fazo uporabili zmes MeOH : MeCN : voda v razmerju 25 : 25 : 50. S tem smo se tudi uspeli izogniti gradientu, kar nam je močno skrajšalo metodo. Vseh devet AAS smo tako uspeli izokratsko ločiti v 7 minutah. Največjo občutljivost smo dosegli, kadar smo za detekcijo uporabili 3 različne valovne dolžine: standarda 2 in 5 opazujemo pri 220 nm, standarde 1, 4, 6, 7, 8 in 9 pri 242 nm, standard 3 pa pri 296 nm. Ti kromatogrami so prikazani na Sliki 9.



Slika 9: Kromatogram zmesi standardov, posnet z optimizirano (končno) HPLC metodo pri 220 nm, 242 nm in 296 nm. Kromatografski pogoji: kolona: Kinetex C18, 2,6 μ m, 100 mm x 4,6 mm; pretok: 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μ L; temperatura kolone: 30 oC; mobilna faza: MeOH : MeCN : voda = 25 : 25 : 50.

4.2 Validacija kromatografske metode

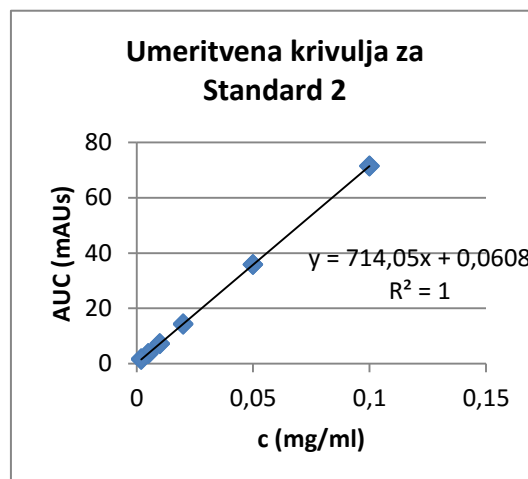
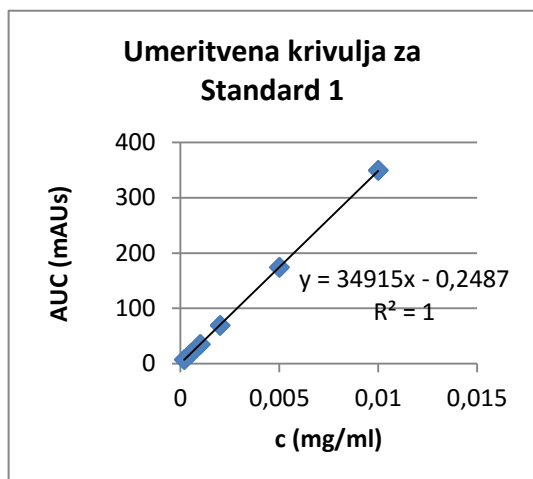
Metodo, ki smo jo opisali v prejšnjem poglavju, smo razvili z namenom, da bi nam omogočala detekcijo (oz. identifikacijo) ter kvantifikacijo morebiti prisotnih AAS v različnih vzorcih prehranskih dopolnil. Identifikacija je možna na osnovi primerjave retencijskih časov vrhov v kromatogramih vzorca in standarda, kvantifikacija pa na osnovi primerjave njihovih površin (AUC). Ker ne vemo, ali so analiti v vzorcih sploh prisotni, in če so, v kakšnih koncentracijah, je zaželeno, da je območje metode čim širše. Na ta način lahko isto umeritveno krivuljo uporabimo za različne vzorce, ne da bi morali vsakič prilagajati postopek priprave vzorca (maso natehte, volumen bučke, redčenje) naši raztopini standarda. Pri izbiri območja metode smo pri najnižjih koncentracijah omejeni z občutljivostjo samega detektorja za posamezen analit, pri najvišjih pa s pričakovano vsebnostjo analitov v vzorcih, njihovo topnostjo in postopkom priprave vzorca.

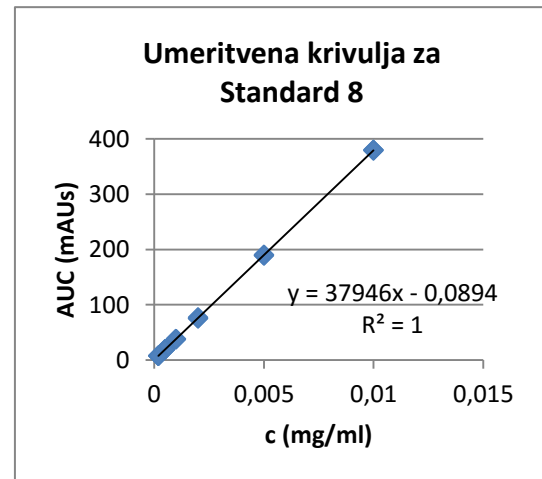
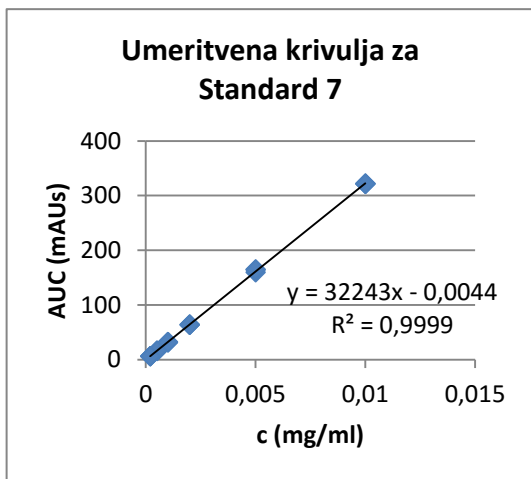
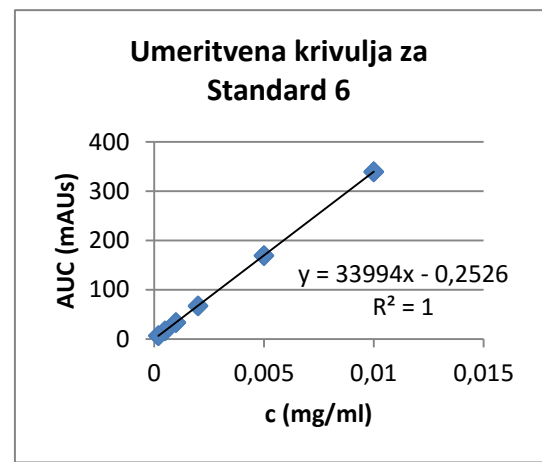
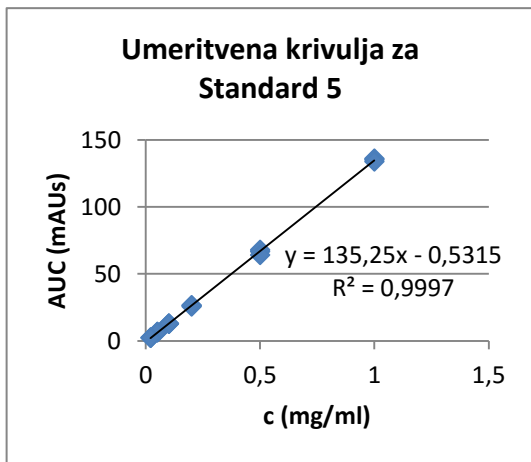
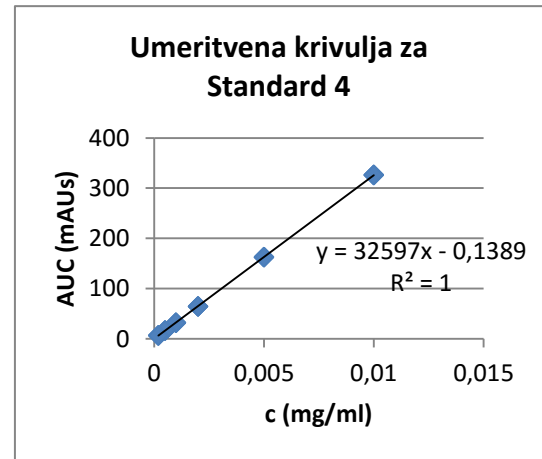
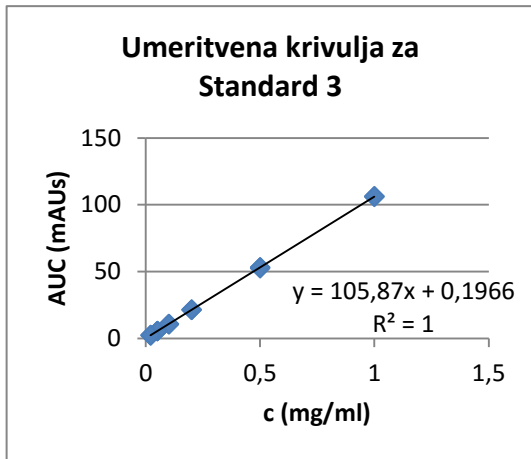
Glede na izkušnje, pridobljene tekom razvoja in optimizacije HPLC metode, opisane v prejšnjem poglavju, smo se odločili, da izberemo različna območja za različne analite, in sicer:

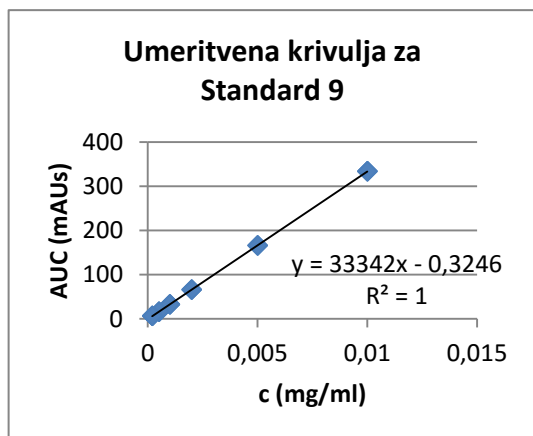
- 0,0005 – 0,01 mg/mL za analite 1, 4, 5, 6, 7 in 9,
- 0,005 – 0,1 mg/mL za analit 2 in
- 0,02 - 1,0 mg/mL za analita 3 in 5.

4.2.1 Linearnost metode

Linearnost metode smo potrdili s pomočjo umeritvenih krivulj za vsak posamezen analit, kjer smo določili odvisnost AUC vrhov od koncentracij. Postopki priprave raztopin standardov in njihove koncentracije so opisani v poglavju 3.2.3. Raztopine smo raztapljali z MeOH zaradi dobrega raztapljanja ter dolgotrajne stabilnosti. Standardne osnovne raztopine pripravljene v MeOH so stabilne vsaj eno leto pri 4 °C, raztopine, ki jih redčimo z MeOH, pa so obstojne vsaj tri mesece pri 4 °C stopinjah (20). Rezultati so spodaj grafično predstavljeni za vsak posamezen analit. Navedene so tudi enačbe premic in determinacijski koeficienti. Metoda je v našem izbranem območju linearna za vse analite.







Slika 10: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za standarde

4.2.2 Točnost in natančnost metode

Za vrednotenje točnosti in natančnosti metode je pomembno, da se pri njihovem določanju čim bolj približamo realnim vzorcem, katerim je metoda namenjena. Ker vzorcev z znano vsebnostjo AAS nismo imeli na voljo, smo jih pripravili tako, da smo našim kapsulam dodajali znane količine standardov in nato pripravili testne raztopine po postopku za pripravo raztopin vzorcev, kot je opisano v poglavju 3.2.4. Ko smo posneli kromatograme, smo odčitali AUC posameznih vrhov analitov in iz njih s pomočjo umeritvenih krivulj, predstavljenih v prejšnjem poglavju, izračunali koncentracije (c določena), ki smo jih nato primerjali z dejanskimi koncentracijami glede na mase dodanih analitov in redčenje. Rezultate točnosti smo podali kot izkoristke (v %). Ker smo za vsako koncentracijsko območje pripravili po 3 paralele, smo iz treh dobljenih rezultatov izračunali še RSD, ki nam služi kot merilo natančnosti metode. Rezultati so zbrani v tabelah V-VII.

Tabela V: Točnost in natančnost metode, izražena z izkoristki in RSD, za posamezne analite na zgornji meji območja

VZOREC 1	AUC (mAUs)	C (določena) (mg/mL)	C dejanska) (mg/mL)	Izkoristek (%)	Povprečen izkoristek (%)	RSD (%)
VZ1 - 1a	406,9689	0,0117	0,00984	118,5	116,6	3,5
VZ1 - 1b	384,0798	0,0110	0,00984	111,9		
VZ1 - 1c	409,5632	0,0117	0,00984	119,3		
VZ1 - 2a	82,2754	0,1151	0,10028	114,8	113,0	3,6
VZ1 - 2b	77,6437	0,1087	0,10028	108,3		
VZ1 - 2c	83,0961	0,1163	0,10028	116,0		
VZ1 - 3a	104,0246	0,9807	1,01	97,1	100,7	3,5
VZ1 - 3b	111,2881	1,0493	1,04	100,9		
VZ1 - 3c	108,5914	1,0238	0,984	104,0		
VZ1 - 4a	381,4221	0,0117	0,009912	118,1	115,9	3,6
VZ1 - 4b	358,8893	0,0110	0,009912	111,1		
VZ1 - 4c	383,09	0,0118	0,009912	118,6		
VZ1 - 5a	144,2436	1,0704	1,058	101,2	104,0	2,4
VZ1 - 5b	140,2768	1,0411	0,983	105,9		
VZ1 - 5c	137,7797	1,0226	0,975	104,9		
VZ1 - 6a	391,8062	0,0115	0,009624	119,8	117,9	3,5
VZ1 - 6b	369,8314	0,0109	0,009624	113,1		
VZ1 - 6c	394,7545	0,0116	0,009624	120,7		
VZ1 - 7a	369,6307	0,0115	0,0103	111,3	109,5	3,5
VZ1 - 7b	349,0402	0,0108	0,0103	105,1		
VZ1 - 7c	371,7798	0,0115	0,0103	111,9		
VZ1 - 8a	443,5043	0,0117	0,010008	116,8	115,3	2,9
VZ1 - 8b	423,5085	0,0112	0,010008	111,5		
VZ1 - 8c	446,6634	0,0118	0,010008	117,6		
VZ1 - 9a	379,0661	0,0114	0,01048	108,6	106,6	3,6
VZ1 - 9b	356,703	0,0107	0,01048	102,2		
VZ1 - 9c	380,3056	0,0114	0,01048	108,9		

Tabela VI: Točnost in natančnost metode, izražena z izkoristki in RSD, za posamezne analite v sredini območja

VZOREC 2	AUC (mAUs)	C (določena) (mg/mL)	C dejanska) (mg/mL)	Izkoristek (%)	Povprečen izkoristek (%)	RSD (%)
VZ2 - 1a	195,365	0,0056	0,00492	113,9	111,5	2,7
VZ2 - 1b	185,5287	0,0053	0,00492	108,1		
VZ2 - 1c	193,1752	0,0055	0,00492	112,6		
VZ2 - 2a	40,0578	0,0560	0,05014	111,7	109,5	3,2
VZ2 - 2b	37,8458	0,0529	0,05014	105,5		
VZ2 - 2c	39,934	0,0558	0,05014	111,4		
VZ2 - 3a	22,235	0,2082	0,202	103,1	103,1	5,0
VZ2 - 3b	21,7801	0,2039	0,208	98,0		
VZ2 - 3c	22,7552	0,2131	0,1968	108,3		
VZ2 - 4a	184,0355	0,0057	0,004956	114,0	111,5	2,6
VZ2 - 4b	174,9253	0,0054	0,004956	108,4		
VZ2 - 4c	181,1149	0,0056	0,004956	112,2		
VZ2 - 5a	30,6295	0,2304	0,2116	108,9	110,8	1,5
VZ2 - 5b	29,2522	0,2202	0,1966	112,0		
VZ2 - 5c	28,9051	0,2176	0,195	111,6		
VZ2 - 6a	188,7998	0,0056	0,004812	115,6	113,3	2,3
VZ2 - 6b	180,4608	0,0053	0,004812	110,5		
VZ2 - 6c	185,8883	0,0055	0,004812	113,8		
VZ2 - 7a	178,8466	0,0055	0,00515	107,7	105,2	2,7
VZ2 - 7b	169,5243	0,0053	0,00515	102,1		
VZ2 - 7c	175,6501	0,0054	0,00515	105,8		
VZ2 - 8a	215,4816	0,0057	0,005004	113,5	110,9	2,5
VZ2 - 8b	205,0098	0,0054	0,005004	108,0		
VZ2 - 8c	211,0056	0,0056	0,005004	111,2		
VZ2 - 9a	183,0766	0,0055	0,00524	105,0	102,5	2,8
VZ2 - 9b	173,2016	0,0052	0,00524	99,3		
VZ2 - 9c	180,2057	0,0054	0,00524	103,3		

Tabela VII: Točnost in natančnost metode, izražena z izkoristki in RSD, za posamezne analite na spodnji meji območja

VZOREC 3	AUC (mAU _s)	C (določena) (mg/mL)	C dejanska) (mg/mL)	Izkoristek (%)	Povprečen izkoristek (%)	RSD (%)
VZ3 - 1a	19,9699	0,0006	0,000492	117,7	117,2	1,1
VZ3 - 1b	19,6275	0,0006	0,000492	115,7		
VZ3 - 1c	20,0633	0,0006	0,000492	118,2		
VZ3 - 2a	3,8425	0,0053	0,005014	105,6	106,4	1,1
VZ3 - 2b	3,9171	0,0054	0,005014	107,7		
VZ3 - 2c	3,8539	0,0053	0,005014	105,9		
VZ3 - 3a	2,6498	0,0232	0,0202	114,7	113,8	5,0
VZ3 - 3b	2,5668	0,0224	0,0208	107,6		
VZ3 - 3c	2,6745	0,0234	0,01968	118,9		
VZ3 - 4a	18,4147	0,0006	0,000496	114,8	114,8	0,0
VZ3 - 4b	18,4003	0,0006	0,000496	114,8		
VZ3 - 4c	18,4169	0,0006	0,000496	114,9		
VZ3 - 5a	3,2131	0,0277	0,02116	130,8	139,6	6,0
VZ3 - 5b	3,2052	0,0276	0,01966	140,5		
VZ3 - 5c	3,3563	0,0287	0,0195	147,4		
VZ3 - 6a	19,3844	0,0006	0,000481	120,0	120,1	0,8
VZ3 - 6b	19,2482	0,0006	0,000481	119,2		
VZ3 - 6c	19,558	0,0006	0,000481	121,1		
VZ3 - 7a	18,4933	0,0006	0,000515	111,4	112,0	3,8
VZ3 - 7b	17,954	0,0006	0,000515	108,1		
VZ3 - 7c	187553	0,0006	0,000515	116,5		
VZ3 - 8a	22,4123	0,0006	0,0005	118,5	118,0	1,2
VZ3 - 8b	22,0175	0,0006	0,0005	116,4		
VZ3 - 8c	22,5023	0,0006	0,0005	119,0		
VZ3 - 9a	18,885	0,0006	0,000524	110,0	109,8	1,7
VZ3 - 9b	18,5085	0,0006	0,000524	107,8		
VZ3 - 9c	19,1712	0,0006	0,000524	111,6		

Iz rezultatov, zbranih v tabelah V-VII, je razvidno, da je metoda dovolj točna in natančna, da nam omogoča kvantitativno določanje AAS v vzorcih, če so ti prisotni. Izkoristki so v glavnem v območju med 80 % in 120 % dodane vrednosti, kar je dovolj točno, zlasti če upoštevamo, da mase dodanih AAS predstavljajo nekje med 0,0005 % in 1 % mase celotnega vzorca. Najslabše rezultate smo dobili na spodnji meji območja za spojino 5, kar je najverjetneje posledica tega, da ravno ta najslabše absorbira v območju UV svetlobe in ima najnižje vrhove, zato so napake pri njenem določanju večje kot pri ostalih.

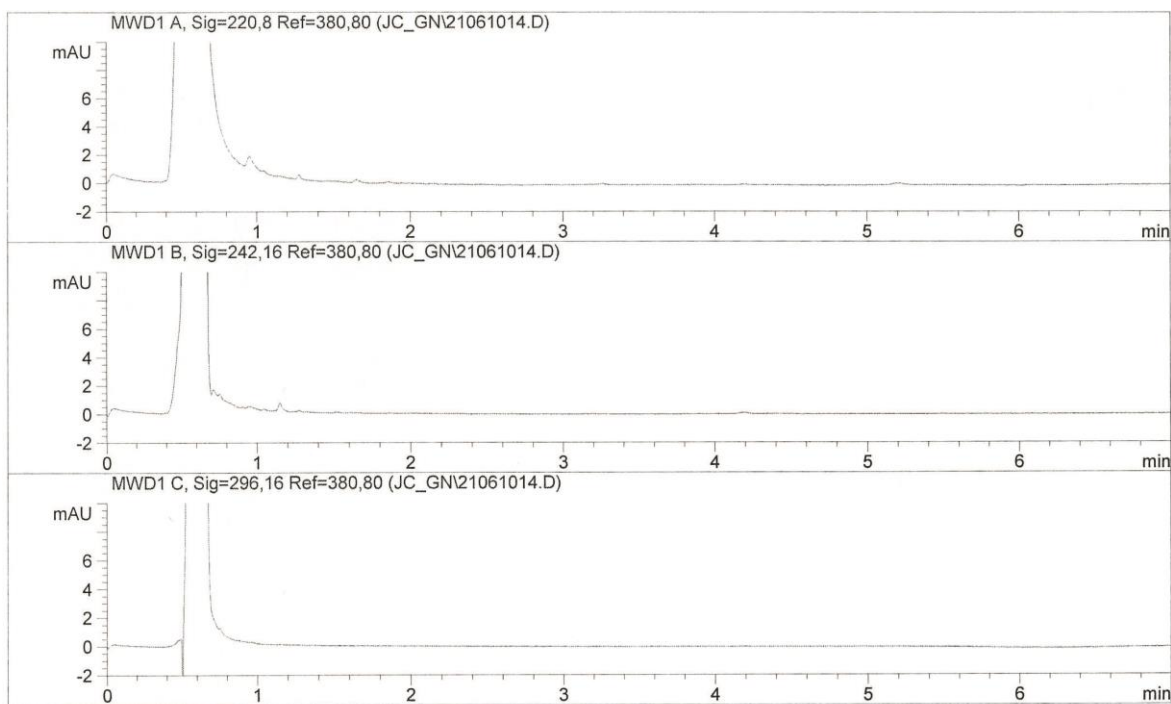
Prav tako je ustrezna tudi natančnost metode, saj so vsi RSD-ji manjši ali enaki 6%. Kljub velikemu številu in majhni količini analitov nam metoda daje ponovljive rezultate.

Pri izbiri in uvedbi metode smo se nanašali na najpogosteje uporabljene metode, ki so opisane v znanstvenih literaturah in so dovolj zanesljive za identifikacijo AAS v prehranskih dopolnilih. Za določanje AAS v prehranskih dopolnilih za športnike smo se odločili za uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Da smo dosegli ustrezno ločljivost za identifikacijo učinkovin v vzorcih, smo HPLC metodo optimizirali in validirali s standardi, ki smo jih imeli na voljo. Glede na navedbe v znanstvenih člankih je metoda, ki smo jo razvili, po karakteristikah podobna ostalim HPLC metodam, ki se že uporabljajo za identifikacijo AAS v drugih laboratorijih (18, 20, 22-25).

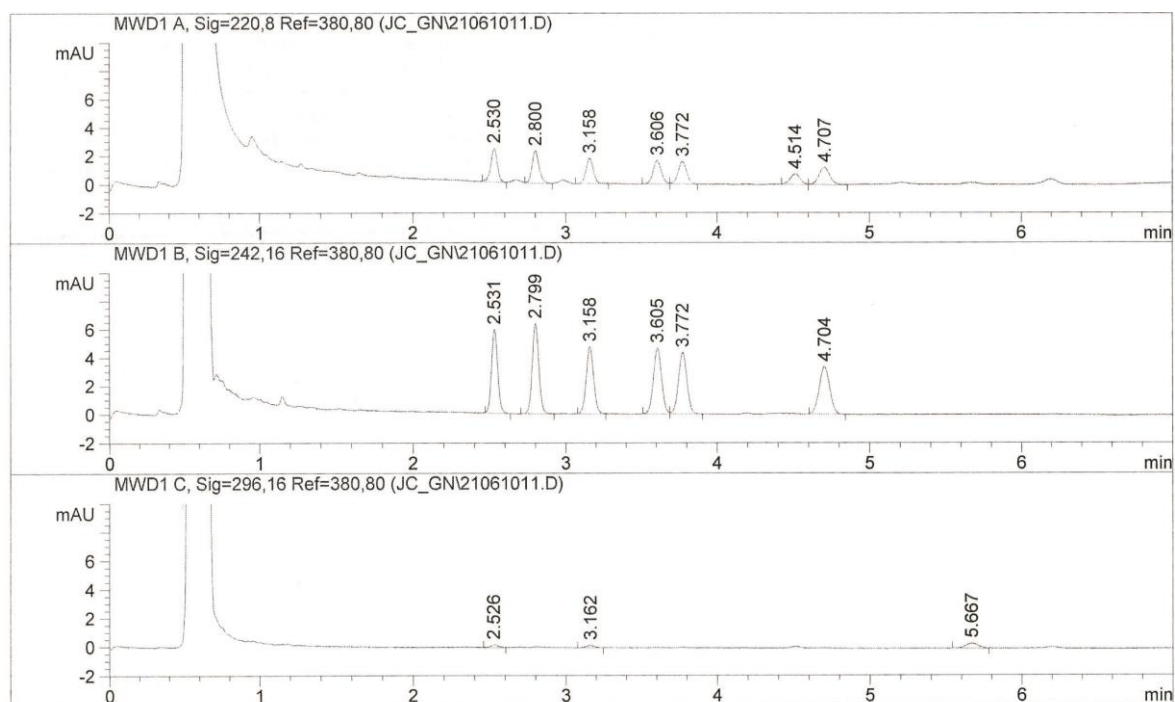
4.3 Analiza vzorcev

Raztopine vzorcev smo pripravili po postopku, ki je opisan v točki 3.3 in jih analizirali z našo kromatografsko metodo. Za vsak vzorec smo posneli dva kromatograma in sicer najprej same raztopine vzorca, nato pa še raztopine vzorca, ki smo ji dodali raztopino standardov C. Na ta način smo želeli preveriti ali kateri izmed vzorcev vsebuje katerega izmed AAS, ki smo jih imeli na voljo. V tem primeru bi v kromatogramih prišlo do prekrivanja vrhov, kar bi pomenilo, da je posamezen AAS lahko prisoten. Če kromatografski vrh v sami raztopini ni prisoten, pa lahko iz tega zaključimo, da posameznega AAS ni v vzorcu (vsaj ne v znatni količini). Kadar smo imeli vzorce z definirano sestavo, večinoma nismo imeli težav. Če pa so bili prisotni rastlinski ekstrakti, je bila identifikacija težavnejša. Zato smo si pomagali z dodatkom nizkih koncentracij standardov, saj na ta način lažje vidimo, ali se retencijski časi vrhov res ujemajo in dobimo en sam vrh s povečano površino.

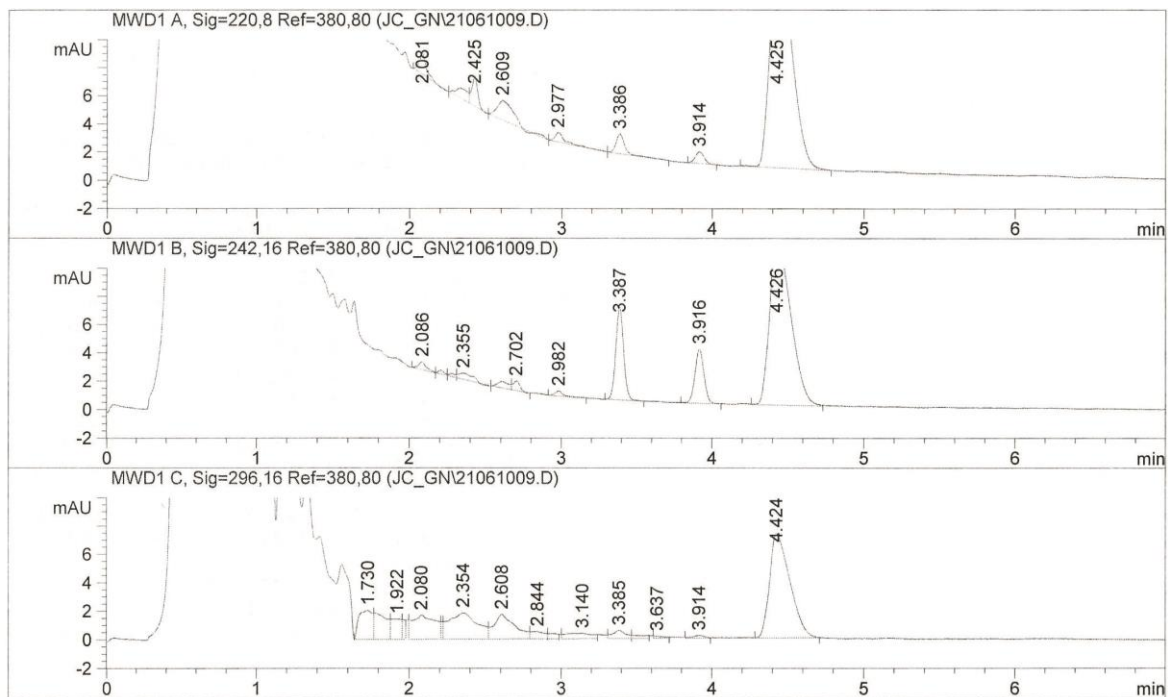
Kot primeri so spodaj na Slikah 11-14 prikazani kromatogrami raztopin za vzorec 4 (kapsule s cinkom in magnezijem) in vzorec 2 (kapsule z ekstraktom zelenega čaja), najprej brez dodatka ter nato z dodatkom standardov.



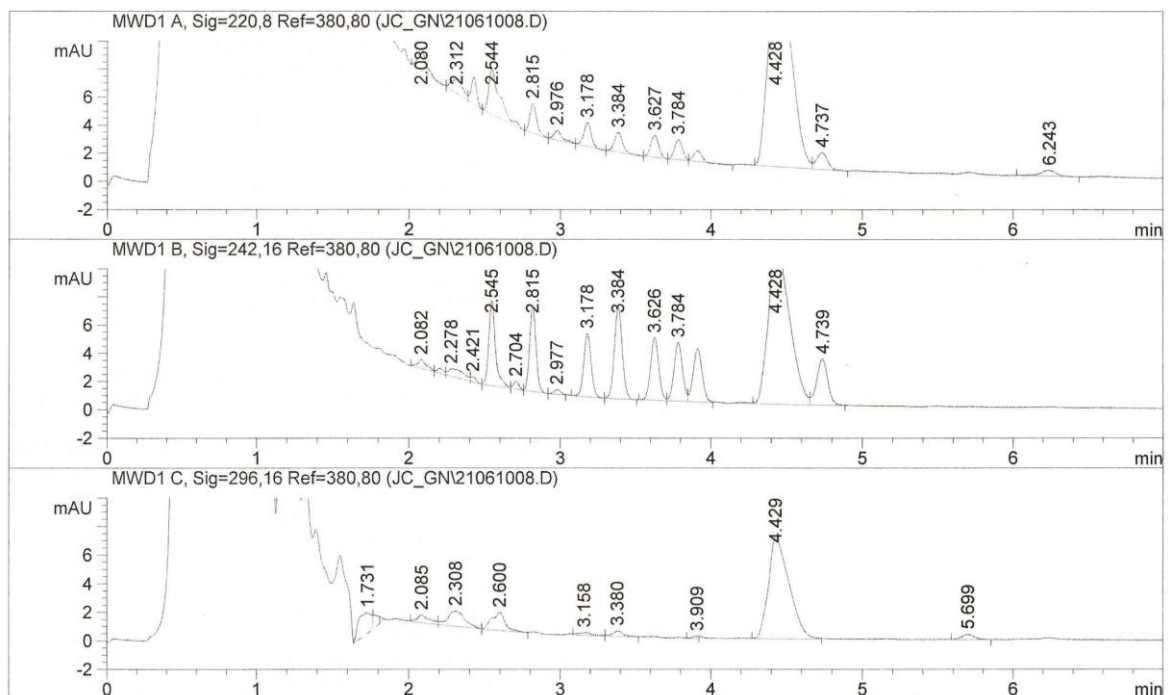
Slika 11: Kromatogram vzorca 4 brez dodatka standardov



Slika 12: Kromatogram vzorca 4 z dodatkom standardov



Slika 13: Kromatogram vzorca 2 brez dodatka standardov



Slika 14: Kromatogram vzorca 2 z dodatkom standardov

Pri nobenemu izmed 15 prehranskih dopolnil, ki smo jih analizirali, nismo ugotovili prisotnosti katerega izmed steroidov, za katere smo imeli standarde.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo želeli razviti metodo, s katero bi lahko preverili morebitno prisotnost devetih androgenih anaboličnih steroidov v prehranskih dopolnilih, namenjenih športnikom. Ob iskanju in naročanju standardov AAS, ki so komercialno dostopni, smo ugotovili, da se številne spojine hkrati pojavljajo pod večimi imeni, zato si je smiselno pomagati s CAS številkami, ki omogočajo enoznačno identifikacijo vsake spojine.

Pri razvoju metode smo najprej posneli UV/vis spektre standardov v metanolu. Posamezni AAS absorbirajo UV/vis svetlobo različno močno in imajo absorpcijske maksimume pri različnih valovnih dolžinah. Ker smo imeli na voljo HPLC z MWD detektorjem, smo kromatograme spremljali pri različnih valovnih dolžinah in sicer pri 220 nm, 242 nm ter 296 nm.

Za ločbo smo uporabili C18 reverznofazno kolono in preizkusili gradiente metanol / voda in acetonitril / voda, ki so dali različno ločbo spojin. Optimizirana končna metoda je bila izokratska z mobilno fazo MeOH : MeCN : voda v razmerju 25 : 25 : 50. Z njo smo uspeli medsebojno popolnoma ločiti 9 podobnih analitov v manj kot 7 minutah. V sklopu validacije metode smo potrdili, da je metoda linearna v širokem koncentracijskem območju in ustrezno točna in natančna.

Na koncu smo analizirali 15 vzorcev prehranskih dopolnil različnih proizvajalcev ter sestave, ki so namenjeni predvsem športnikom. Vzorci, ki so vsebovali rastlinske ekstrakte, so imeli kompleksno sestavo, zato smo za vsakega posneli kromatograme brez in z dodatkom majhne količine zmesi standardov. Nobeden izmed vzorcev ni vseboval katerega izmed AAS, ki smo jih določali.

Glede na široko paleto različnih prehranskih dopolnil, ki so na voljo, bi bila za zaščito zdravja potrošnikov smiselna strožja kontrola, kar se tiče sestave in vsebnosti posameznih sestavin. Zlasti pri športnikih je kakovost dopolnil ključna, saj so lahko nepreverjeni preparati kontaminirani s katero izmed farmakološko aktivnih snovi, ki so prepovedane, in zato obstaja tveganje, da pride do nenamernih pozitivnih dopinških rezultatov.

6 LITERATURA

1. Wikipedija, Doping, URL: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Doping>,html, Dostop avgust 2016.
2. Slovenska antidoping organizacija, Kaj je Lista, URL: www.sloado.si,html, Dostop julij 2016.
3. U.S. Food and Drug Administration, Nutrient content claims-general principles, URL: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm>, html, CFR part 101.13, Dostop julij 2016.
4. Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013, Uradni list RS, št. 0070-30/2013, URL: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV11675>, Dostop avgust 2016.
5. R. K. Müller: History of Doping and Doping Control. V D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010: 1-23.
6. Tušak M, Tušak M: Psihologija športa, Znanstveni inštitut Filozofske fakultete, OHK Knjižnica, Ljubljana, 2003: 55-78.
7. Osredkar J: Doping in šport, Olimpijski komite Slovenije-Združenje športnih zvez: Ministrstvo za šolstvo in šport, Ljubljana, 1997: 4/1-4/32.
8. Informacijski urad Sveta Evrope v Republiki Sloveniji, Evropska konvencija proti doppingu v športu, URL: http://www.svetevrope.si/sl/dokumenti_in_publikacije/konvencije/135/,html, Dostop julij 2016.
9. Olimpijski komite Slovenije, URL: www.olympic.si,html, Dostop avgust 2016.
10. Seznam Nobelovih nagrajencev, URL: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/,html, Dostop avgust 2016.
11. Skoog DA, West DM, Holler FJ: Fundamental of analytical chemistry, 7. Izdaja, Saunders College Publishing, USA, 1996: 460-525.
12. Dolenc D: Vaje iz organske analize, Navodila za laboratorijske vaje, FKKT, Ljubljana 2008.
13. Skoog DA: Principles of instrumental analysis, 5. Izdaja, Saunders College publishing, USA 1998: 725-769.
14. Huber L: Validation of HPLC Methods, LabCompliance, 2001, USA: 18-40.

15. Pravilnik o splošnem označevanju predpakiranih živil, 2014, Uradni list RS, št. 007-183/2014, URL: <https://www.uradni-list.si/1/content?id=117543>,html, Dostop julij 2016.
16. Wikipedija, Shema HPLC sistema, URL: http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg,html, Dostop avgust 2016.
17. ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. November 2015.
18. Mesmer MZ, Satzger RD: Determination of Anabolic Steroids by HPLC with UV-vis Particle Beam Mass Spectrometry, J Chromatogr Sci. 1997; 35 (1): 38-42.
19. Parr MK, Geyer H, Reinhart U, Schänzer W: Analytical strategies for the detection of non-labelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements, Food Addit Contam. 2004; 21 (7): 632-640.
20. Van Poucke C, Detavernier C, Van Cauwenberghe R, Van Peteghem C: Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal Chim Acta. 2007; 586 (1-2): 35-42.
21. Portal Študentski.net, Shematski prikaz kromatografskih metod, URL: http://studentski.net/gradivo/ulj_fkt_bi1_ima_sno_kromatografija_01?r=1,html, Dostop avgust 2016.
22. Cho SH, Park HJ, Lee JH, Do JA, Heo S, Jo JH, Cho S: Determination of anabolic-androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC-MS/MS, J Pharm Biomed Anal. 2015; 111: 138-46
23. Odoardi S, Castrignanò E, Martello S, Chiarotti M, Strano-Rossi S: Determination of anabolic agents in dietary supplements by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2015; 32(5): 635-47
24. Abbate V, Kicman AT, Evans-Brown M, McVeigh J, Cowan DA, Wilson C, Coles SJ, Walker CJ: Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements – a significant risk to public health, Drug Test Anal. 2015; 7(7): 609-18
25. Geyer H, Parr MK, Mareck U, Reinhart U, Schrader Y, Schänzer W: Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids – results of an international study, Int. J. Sports Med. 2004; 25(2): 124-9

7 PRILOGE

Priloga I: Eksogeni anabolični androgeni steroidi (2)

1-Androstendiol (5 α -androst-1-en-3 β ,17 β -diol)
1-Androstendion (5 α -androst-1-en-3,17-dion)
1-Testosteron (17 β -hidroksi-5 α -androst-1-en-3-on)
4-Hidroksitestosteron (4,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on)
19-Norandrostendion (estr-4-en-3,17-dion)
Bolandiol (estr-4-en-3 β ,17 β -diol)
Bolasteron; Boldenon; Boldion (androsta-1,4-dien-3,17-dion)
Danazol ([1,2]oksazolo[4',5':2,3]pregna-4-en-20-in-17 α -ol)
Dehidroklormetiltestosteron (4-kloro-17 β -hidroksi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-on)
Dezoksimetiltestosteron (17 α -metil-5 α -androst-2-en-17 β -ol)
Drostanolon
Etilestrenol (19-norpregna-4-en-17 α -ol)
Fluksimesteron
Formebolon
Furazabol (17 α -metil [1,2,5]oksadiazolo[3',4':2,3]-5 α -androstan-17 β -ol)
Gestrinon
Kalusteron
Klostebol
Mestanolon
Mesterolon
Metandienon (17 β -hidroi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-on)
Metenolon
Metandriol
Metasteron (17 β -hidroksi-2 α ,17 α -dimetil-5 α -androstan-3-on)
Metildienolon (17 β -hidroksi-17 α -metilestra-4,9-dien-3-on)
Metil-1-testosteron (17 β -hidroksi-17 α -metil-5 α -androst-1-en-3-on)
Metilnortestosteron (17 β -hidroksi-17 α -metilestr-4-en-3-on)
Metiltestosteron
Metribolon (metiltrienolon,17 β -hidroksi-17 α -metilestra-4,9,11-trien-3-on)
Miboleron
Nandrolon
Norboleton
Norklostebol
Noretandrolon
Oksabolon
Oksandrolon
Oksimesteron
Oksimetolon
Prostanozol (17 β -[(tetrahidropiran-2-il)oksi]-1'Hpirazolo[3,4:2,3]-5 α -androstan)
Quinbolon
Stanozolol
Stenbolon
Tetrahydrogestrinon (17-hidroksi-18a-homo-19-nor-17 α -pregna-4,9,11-trien-3-on)
Trenbolon (17 β -hidroksiestr-4,9,11-trien-3-on)

Priloga II: Endogeni anabolični androgeni steroidi (2)

Androstendiol (androst-5-en-3 β ,17 β -diol)
Androstendion (androst-4-en-3,17-dion)
Dihidrottestosteron (17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on)
Prasteron (dehidroepiandrosteron, DHEA, 3 β -hidroksiandrost-5-en-17-on)
Testosteron

Priloga III: Metaboliti in izomere endogenih anaboličnih steroidov vključno z, a ne omejeno samo na (2):

3 β -Hidroksi-5 α -androstan-17-n
5 α -Androstan-3 α ,17 α -diol
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol
5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol
5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol
5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol
7 α -Hidroksi-DHEA
7 β -Hidroksi-HEA
4-Androstendiol (androst-4-en-3 β , 17 β -diol)
5-Androstendion (androst-5-en-3,17-dion)
7-Keto-DHEA
19-Norandrosteron
19-Noretioholanolon
Androst-4-en-3 α ,17 α -diol
Androst-4-en-3 α ,17 β -diol
Androst-4-en-3 β ,17 α -diol
Androst-5-en-3 α ,17 α -diol
Androst-5-en-3 α ,17 β -diol
Androst-5-en-3 β ,17 α -diol
Androsteron
Epi-dihidrottestosteron
Epitesteron
Etioholanolon

Priloga IV: Ostali anabolični steroidi (2)

Klenbuterol
Selektivni modulatorji androgenih receptorjev (SARMs)
Tibolon
Zeranol
Zipaterol