

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DUŠA ČAHUK

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DUŠA ČAHUK

**IDENTIFIKACIJA IN MERJENJE VSEBNOSTI
UČINKOVIN V IZDELKIH Z ANABOLIČNIMI STEROIDI**

**IDENTIFICATION AND CONTENT DETERMINATION OF
ACTIVE SUBSTANCES IN PRODUCTS WITH ANABOLIC
STEROIDS**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm in somentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in somentorju doc. dr. Jožku Cesarju za usmerjanje, strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani v času študija ter me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Duša Čahuk

Predsednica komisije za zagovor: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Član komisije za zagovor: doc. dr. Andrej Umek, mag. farm.

Vsebina

Povzetek	III
Seznam okrajšav	IV
1. Uvod	1
1.1. Doping	1
1.1.1. Organizacije za boj proti dopingu	2
1.1.2. Lista prepovedanih snovi in postopkov 2011	3
1.2. Androgeni anabolični steroidi (AAS)	6
1.2.1. Zloraba AAS v športu	6
1.2.2. Farmakologija AAS	11
1.2.3. Odnos med strukturo in delovanjem AAS	14
1.2.4. Klinična uporaba AAS	15
1.2.5. Neželeni učinki AAS	17
1.2.6. Detekcija AAS	20
1.2.7. Legalni status AAS	22
1.3. Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (HPLC)	24
1.3.1. Validacija HPLC metode	25
2. Namen dela	28
3. Materiali in metode	29
3.1. Materiali	29
3.1.1. Standardi	29
3.1.2. Topila	30
3.1.3. Vzorci	30
3.2. Aparature	33
3.3. Metode	33
3.3.1. Postopki priprave raztopin standardov	33
3.3.1.1. Priprava raztopin posameznih standardov za identifikacijo učinkovin	33
3.3.1.2. Priprava raztopin zmesi standardov za preverjanje ločljivosti	33
3.3.1.3. Priprava raztopine standarda 2 za optimizacijo raztapljanja	34
3.3.1.4. Priprava raztopin standardov za test stabilnosti raztopin standardov	34
3.3.1.5. Priprava raztopin standardov za test linearnosti raztopin standardov	35
3.3.1.6. Priprava raztopin standardov za določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih	36
3.3.2. Postopki priprave raztopin vzorcev	36
3.3.2.1. Priprava raztopine vzorca 2 za optimizacijo raztapljanja	36
3.3.2.2. Priprava raztopin vzorcev za identifikacijo učinkovin v vzorcih	37
3.3.2.3. Priprava raztopin vzorcev za določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih	37
3.3.3. Postopki priprave raztopin vzorcev z dodatkom standardov	38
3.3.4. HPLC metode	39
3.3.5. Določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih	40
3.3.6. Točnost metode	41
4. Rezultati in razprava	42
4.1. Optimizacija HPLC metode	42

4.2. Optimizacija priprave raztopin vzorcev	45
4.3. Stabilnost raztopin standardov	46
4.4. Linearnost	47
4.5. Identifikacija učinkovin v vzorcih	55
4.6. Določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih in ponovljivost metode	63
4.6. Ponovljivost injiciranja	69
4.7. Točnost	70
5. Sklep	75
6. Literatura	77

Povzetek

Androgeni anabolični steroidi (AAS) so skupina najpogostejše zlorabljanih snovi v športu. Zaradi številnih neželenih učinkov je njihova uporaba v klinične namene omejena, tako da jih danes najpogostejše srečujemo v povezavi z dopingom. Tako kot v večini držav po svetu tudi v Sloveniji spadajo med nelegalne snovi. V Kazenskem zakoniku je zapisano, da je prepovedano proizvajati, predelovati, prodajati ali ponujati naprodaj, hraniti in prenašati nedovoljene snovi v športu. Kljub temu so AAS relativno lahko dostopni na različnih internetnih straneh. Večina izdelkov, ki vsebujejo AAS in so ponujeni na internetnih straneh, ni proizvedena v skladu z načeli dobre proizvodne prakse (GMP).

V okviru diplomske naloge smo želeli razviti enostavno in hitro metodo, primerno za določanje desetih izmed najpogostejše zlorabljanih AAS. Izdelke, ki naj bi vsebovali AAS, smo analizirali z uporabo visokoločljivostne tekočinske kromatografije (HPLC) z UV detekcijo. Najprej smo optimizirali parametre naše metode ter postopek priprave vzorcev.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, kakšna je dostopnost izdelkov, ki naj bi vsebovali AAS preko svetovnega spleta, ter preveriti njihovo kakovost v smislu istovetnosti in vsebnosti deklarirane učinkovine.

Preizkusili smo 11 vzorcev, ki naj bi vsebovali različne AAS. Metodo smo validirali v skladu z ICH smernicami v smislu točnosti, ponovljivosti, linearnosti, ponovljivosti injiciranja ter stabilnosti raztopin standardov. Pri osmih vzorcih smo ugotovili, da vsebujejo deklarirano učinkovino, dva vzorca sta vsebovala drug AAS od deklariranega, en vzorec pa ni vseboval nobenega AAS izmed tistih, za katere smo imeli standarde. Od enajstih vzorcev je le en vzorec vseboval deklarirano količino učinkovine.

Nekateri vzorci niso imeli deklaracije, na kateri bi bile poleg učinkovine navedene tudi pomožne snovi, kar nam je povzročalo težave pri pripravi raztopin vzorcev. Imeli smo težave pri homogenizaciji in raztapljanju vzorcev. Posledica tega je, da za noben vzorec nismo uspeli dokazati točnosti. Tako za noben vzorec ne moremo potrditi, da je vsebnost učinkovine, ki smo jo določili, pravilna. Zaradi nezadostne količine vzorcev analiz nismo mogli ponoviti.

Dokazali smo, da so izdelki, ki naj bi vsebovali AAS lahko dostopni na spletu. Nad temi izdelki ni nobene kontrole in ni nujno, da sta kvalitativna in kvantitativna sestava takšni, kot je deklarirano. Zato ti izdelki predstavljajo resno grožnjo za zdravje uporabnikov.

Seznam okrajšav

AAS	Anabolični androgeni steroidi
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHT	5 α -dihidrotosteron
E/T	Razmerje epitestosteron/testosteron
FSH	Folikle stimulizirajoči hormon
GC	Plinska kromatografija
GMP	Dobra proizvodna praksa (<i>Good Manufacturing Practice</i>)
HPLC	Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IRMS	Masna spektrometrija razmerja izotopov (<i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>)
LC	Tekočinska kromatografija (<i>Liquid Chromatography</i>)
LH	Luteinizirajoči hormon
MOK	Mednarodni olimpijski komite
MS	Masna spektrometrija
MSTFA	Metilsililtrifluoroocetna kislina
MŠŠ	Ministrstvo za šolstvo in šport
NAK	Nacionalna antidopinška komisija
NDR	Nemška demokratična republika
OI	Olimpijske igre
OKS - ZŠZ	Olimpijski komite Slovenije – Združenje športnih zvez
RIA	Radioimunska analiza
RSD	Relativna standardna deviacija
THG	Tetrahidrogestrinon
TMS	Trimetilsilil
WADA	Svetovna antidopinška agencija (<i>World Anti-Doping Agency</i>)

1. Uvod

V današnjem svetu je šport postal velik posel, v katerem se obrača ogromno denarja. Zaradi teh razlogov je marsikateri športnik zavestno pripravljen tvegati svoje zdravje za uspeh. Anabolični androgeni steroidi (AAS) so snovi, ki povečujejo mišično maso in moč, vendar imajo hkrati tudi veliko nevarnih neželenih učinkov. Na listi prepovedanih snovi Mednarodnega olimpijskega komiteja (MOK) so od aprila 1974 in so skupina najpogostejše zlorabljenih nedovoljenih snovi. (1)

1.1. Doping

Obstaja več definicij dopinga. Prvo je leta 1963 sprejel Svet Evrope, ki definira doping kot uporabo telesu tujih snovi z edinim namenom, da se umetno in na nepošten način izboljša sposobnost športnika na tekmovanju. Poleg tega pomeni doping tudi različne fiziološke ukrepe, ki izboljšajo dosežke športnika. (2)

Uradna slovenska definicija pravi, da je doping uporaba snovi ali postopkov, ki so prepovedani s strani MOK-a in Nacionalne antidopinške komisije (NAK). MOK opredeljuje doping kot uporabo, jemanje in vnašanje ali vbrizgavanje katerekoli snovi ali postopka, prepovedanega s strani medicinske komisije MOK-a. (3) Najnovejšo definicijo dopinga je postavila Svetovna antidopinška agencija (WADA), ki doping definira kot uporabo zvijače, bodisi snovi ali postopka, ki je potencialno nevarna za športnikovo zdravje, oziroma je zmožna izboljšati njegove sposobnosti; ali prisotnost prepovedane snovi v športnikovem telesu ali dokaz o uporabi le-te ali dokaz o uporabi prepovedanega postopka. (4)

Izraz doping je bil prvič omenjen leta 1889 v angleškem slovarju, vendar so prvi poizkusi izboljšanja športnikovih zmoglosti veliko starejši. Prvotno je izraz doping (*dope*) označeval pripravek, ki so ga dajali konjem in je vseboval opij. »Dope« je bil tudi izraz za sredstvo, pripravljeno iz ostankov grozdja, ki so ga uporabljali Zulu vojaki. Sredstvo so uporabljali za povečanje hrabrosti v boju in pri verskih obredih. Po letu 1900 je izraz »dope« pomenil uporabo nedovoljenih sredstev pri tekmovalnih konjih. (2)

Prvi primeri dopinga segajo že 5000 let nazaj. Kitajci so kot poživilo uporabljali Ma Huang (ekstrakt iz efedre). Indijski fizik Sutruta je leta 300 p.n.š. priporočal uživanje testisov pred bitkami za povečanje agresivnosti. Enako so počeli tudi Huni. Znani so

primeri uživanja halucinogenih gob na antičnih olimpijskih igrah. Doping je bil na antičnih olimpijskih igrah strogo prepovedan, vendar so bile sankcije redke.

O primerih dopinga v vmesnem času med antičnimi olimpijskimi igrami in modernim časom je na voljo le malo podatkov. Znano je, da so Inki za izboljšanje športnih dosežkov uživali kokain in kofein. V 19. stoletju so kolesarji in ostali vzdržljivostni športniki za doseganje boljših rezultatov uporabljali strihnin, kofein, kokain, alkohol, nitroglicer in ter heroin. Te snovi so športniki uživali posamezno ali v različnih kombinacijah, kar se je posledično odrazilo tudi v številnih smrtnih primerih. (2)

Leta 1960 je na olimpijskih igrah v Rimu zaradi uživanja amfetaminov umrl danski kolesar Knut Jensen. Prav tako je zaradi uživanja amfetaminov v kombinaciji z alkoholom leta 1967 na Tour de France umrl britanski kolesar Tommy Simpson. Za omenjena športnika so nedvoumno dokazali, da sta umrla zaradi dopinga. (5)

Poznani so številni primeri nenadnih smrti pri športnikih, za katere obstajajo sumi, da so posledica dopinga, vendar jih niso uspeli dokazati. Eden takšnih primerov je nenadna smrt ameriške atletinje Florence Giffith-Joyner leta 1998. Mediji so za njeno smrt okrivili doping, vendar je obdukcija pokazala, da je umrla naravne smrti (intrakranialna krvavitev), kar pa ne izključuje popolnoma možnosti zlorabe dopinga. (2)

1.1.1. Organizacije za boj proti dopingu

Leta 1928 je Mednarodna atletska zveza (IAAF) postala prva mednarodna športna organizacija, ki je prepovedala uporabo poživil v športu. Mnoge športne organizacije so ji sledile, vendar so bile omejitve neučinkovite, saj ni bilo nobene kontrole. Leta 1963 je Svet Evrope ustanovil komisijo za boj proti dopingu v športu. Leta 1965 sta Belgija in Francija sprejeli protidopinško zakonodajo. Leta 1966 sta Mednarodna kolesarska zveza (UCI) in Mednarodna nogometna zveza (FIFA) pričeli z dopinškimi kontrolami. V naslednjih letih so jima sledile še druge mednarodne športne organizacije. Leta 1965 so začeli izvajati dopinške kontrole tudi v Jugoslaviji. Leta 1967 je MOK ustanovil prvo medicinsko komisijo. Dopinške kontrole na olimpijskih igrah so uvedli leta 1968 na zimskih igrah v Grenoblu ter na poletnih igrah v Ciudad de Mexico. (2)

Prvi korak k mednarodni harmonizaciji boja proti dopingu je bila Evropska konvencija proti dopingu v športu, ki jo je leta 1989 sprejel Svet Evrope. To konvencijo je Slovenija ratificirala leta 1992 in se s tem zavezala k boju proti dopingu. Leta 1989 je v Reykjaviku

Ministrski komite Sveta Evrope sprejel resolucijo o uvedbi kontrole dopinga brez opozorila zunaj tekmovanj. Leta 1996 pa je bila v Sloveniji ustanovljena Nacionalna antidopinška komisija (NAK). (6)

Leta 1998 je na Tour de France prišlo do velikega dopinškega škandala. Na francosko-belgijski meji so pri maserju ekipe Festina odkrili ampule z eritropoetinom, ekipo pa so kasneje diskvalificirali. (7) Na podlagi teh dogodkov je od 2. do 4. 2. 1999 v Lozani v Švici potekala Svetovna konferenca o doping u v športu. Sprejeta je bila Lozanska deklaracija o doping u v športu, na podlagi katere je bila 10. 11. 1999 ustanovljena WADA.

(2) Leta 2005 je bila sprejeta Mednarodna konvencija proti uporabi nedovoljenih snovi v športu, ki jo je Slovenija ratificirala leta 2007.

Leta 2005 je NAK sprejela Svetovni kodeks proti doping u, s ciljem, da bi delovala kot neodvisna organizacija proti doping u v Republiki Sloveniji. Leta 2009 sta Ministrstvo za šolstvo in šport (MŠŠ) in Olimpijski komite Slovenije – Združenje športnih zvez (OKS – ZŠZ) na podlagi Mednarodne konvencije proti uporabi nedovoljenih snovi v športu in Svetovnega kodeksa proti doping u sprejela dopolnjeni Protidopinški pravilnik NAK-a, ki v Sloveniji celovito ureja namen, organizacijo in postopke kontrole dopinga na nacionalni ravni. (3)

1.1.2. Lista prepovedanih snovi in postopkov 2011

WADA vsako leto objavi Listo prepovedanih snovi in postopkov. Sestavljena je iz treh delov. V prvem delu so navedene snovi in postopki, ki so prepovedani na in izven tekmovanja, v drugem delu snovi in postopki, ki so prepovedani le na tekmovanju, v tretjem delu pa snovi in postopki, ki so prepovedani le v določenem športu. Spodaj so navedeni razredi snovi in postopkov, ki so objavljeni v Listi prepovedanih snovi in postopkov leta 2011. (3)

Snovi in postopki, ki so prepovedani ves čas (na in izven tekmovanja)

Prepovedane snovi

- anabolični agensi
- peptidni hormoni, rastni dejavniki in sorodne snovi,
- beta-2-agonisti,
- antagonisti hormonov in modulatorji,

- diuretiki in ostali maskirni agensi.

Prepovedani postopki

- povečevanje prenosa kisika,
- kemijska in fizična manipulacija,
- genski doping.

Snovi ki so prepovedane na tekmovanju

- poživila,
- narkotiki,
- kanabinoidi,
- glukokortikosteroidi.

Snovi, ki so prepovedane samo v določenih športih

- alkohol,
- beta-blokatorji. (3)

Spodaj so navedeni anabolični agensi, ki so zajeti v Listi prepovedanih snovi in postopkov v letu 2011.

AAS

Eksogeni AAS, vključno z: 1-androstendiol (5 α -androst-1-en-3 β ,17 β -diol), 1-androstendion (5 α -androst-1-en-3,17-dion), bolandiol (19-norandrostendiol), bolasteron, boldenon, boldion (androsta-1,14-dien-3,17-dion), kalusteron, klostebol, danazol, (17 α -etinil-17 β -hidroksiandrost-4-eno[2,3d]izoksazol), 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-nor-17 α -pregnen-4-en-17-ol), fluoksimesteron, formeolon, furazabol, (17 β -hidroksi-17 α -metil-5 α -androstan-3-on-17 β -ol), gestrinon, 4-hidroksitestosteron, (4,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on), mestanolon, mesterolon, metenolon, metandienon, (17 β -hidroksi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-on), metandriol, metasteron (2 α ,17 α -dimetil-5 α -androstan-3-on-17 β -ol), 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 -metilestra-4-en-3-on), metiltrienolon (17 β -hidroksi-17 α -metilestra-4,9,11-trien-3-on), metiltestosteron, miboleron, nandrolon, 19-

norandrostendion (estr-4-en-3,17-dion), norboleton, norklostebol, oksabolon, oksandrolon, oksimesteron, oksimetolon, prostanazol (17 β -hidroksi-5 α -androstan-3 α -ol-20-one), kinbolon, stanozolol, stenbolon, 1-testosteron (17 β -hidroksi-5 α -androstan-1-en-3-on), tetrahydrogestrinon (18 α -homo-pregna-4,9,11-trien-17 β -ol-3-on), trenbolon in ostale snovi s podobno kemijsko zgradbo ali podobnim biološkim učinkom.

Endogeni AAS, kadar so uporabljeni eksogeno: androstendiol (androstan-5-en-3 β ,17 β -diol), androstendion (androstan-4-en-3,17-dion), dihidrotestosteron (17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on), prasteron (dehidroepiandrosteron-DHEA), testosteron in 5 α -androstan-3 α ,17 α -diol ter naslednji metaboliti in izomeri: 5 α -androstan-3 α ,17 α -diol, 5 α -androstan-3 β ,17 α -diol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol, 5 α -androstan-3 α ,17 α -diol, 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, 4-androstendiol (androstan-4-en-3 β ,17 β -diol), 5-androstendion (androstan-5-en-3,17-dion), epi-dihidrotestosteron, epitestosteron, 3 α -hidroksi-5 α -androstan-17-on, 3 β -hidroksi-5 α -androstan-17-on, 19-norandrosteron, 19-noretioholanon.

Ostali anabolični agensi vključujejo tudi naslednje in ne samo te: klenbuterol, selektivni modulatorji androgenih receptorjev (SARM), tibolon, zeranol, zipaterol. (3)

Ker se nenehno pojavljajo nove snovi in postopki, s katerimi želijo športniki izboljšati svoje dosežke, WADA Listo prepovedanih snovi in postopkov dopolnjuje tako pogosto, kot je potrebno, vendar ne pogosteje kot vsako leto.

Nanjo uvrsti snovi in postopke, za katere obstajajo medicinski ali drugi znanstveni dokazi, da ima neka snov ali postopek vpliv na izboljšanje športnikovih dosežkov, takojšen ali kasnejši škodljiv vpliv na zdravje športnika, krši duh športa, ali pa služi kot kritje za uporabo drugih nedovoljenih snovi in postopkov (t. i. maskirni agensi). Analizne tehnike za dokazovanje zlorabe dopinga se nenehno izpopolnjujejo. Zaradi tega se odvzeti vzorci za dopinška testiranja hranijo in po potrebi testi ponovno izvedejo. Vzorci se hranijo osem let in v tem času je možno kaznovati športnika zaradi kršitve predpisov proti dopingu. (3)

1.2. Androgeni anabolični steroidi (AAS)

Testosteron in njegovi derivati so moški spolni hormoni, ki nastajajo v človeškem telesu in so normalno prisotni pri vseh ljudeh. Višje koncentracije teh hormonov imajo moški. V organizmu spodbujajo rast skeletnih mišic (anabolični učinki) in razvoj moških spolnih znakov (androgeni učinki). (7)

Leta 1886 sta O. Zoth in F. Pregl naredila raziskavo o učinkih ekstrakta testisov na mišice. Vase sta injicirala vodni ekstrakt bikovih testisov ter skozi serijo vaj merila moč sredinca. Njuna raziskava je potrdila, da se je izboljšala moč in vzdržljivost mišic. To je bila prva raziskava, ki je nakazovala, da imajo AAS pozitivne učinke na športne dosežke in možnost uporabe v te namene. (7)

Razvoj sinteznih AAS se je začel v tridesetih letih prejšnjega stoletja, kmalu po izolaciji in določitvi strukture testosterona. Testosteron je leta 1935 izoliral E. Lacqueur, A. Butenandt pa je določil njegovo strukturo. Prvi je testosteron sintetiziral L. Ružička. Leta 1939 je prejel Nobelovo nagrado za kemijo, in sicer za delo na spolnih hormonih. (8)

Že od samega začetka razvoja sinteznih AAS so glavni cilji le-tega usmerjeni v:

- ločitev anaboličnih od androgenih učinkov,
- doseganje čim višje biološke uporabnosti pri peroralni uporabi,
- zmanjšanje toksičnosti (zlasti hepatotoksičnosti) pri peroralni uporabi. (7)

1.2.1. Zloraba AAS v športu

AAS so skupina učinkovin, katere razvoj je že vseskozi tesno povezan z njihovo zlorabo. Žal je že kar nekaj časa eden od ciljev tudi priprava derivatov z anaboličnimi učinki, katerih naj obstoječe metode dopinške kontrole ne bi zaznale. V poznih 40. letih prejšnjega stoletja so AAS pričeli uporabljati body-builderji, kmalu pa se je njihova uporaba razširila še na druge športe (nogomet, plavanje, hokej, atletika, kolesarstvo, wrestling...). Skrb zbujajoča pa je uporaba AAS med športniki v srednjih šolah in na fakultetah. (7)

Leta 1952 so na zimskih olimpijskih igrah (OI) v Oslu v garderobi nekega hitrostnega drsalca našli vialo s testosteronom. Leta 1956 je na svetovnem prvenstvu v dviganju uteži sovjetski zdravnik povedal svojemu ameriškem kolegu dr. Johnu Zieglerju o pozitivnih učinkih testosterona na zmožnost treniranja ter izboljšanja dosežkov športnikov. Takrat se je Ziegler odločil, da bo za svojo ekipo razvil nov anabolični steroid, ki bo imel manj androgenih učinkov. Rezultat tega je bil metandrostenolon, ki ga je razvil s pomočjo

farmacevtskega podjetja Ciba. Ciba je nato še naprej razvijala nove derivate z namenom ločitve anaboličnih in androgenih učinkov. Do leta 1963 so razvili že številne derivate testosterona, med njimi fluoksimesteron, oksimetolon, nandrolon fenpropionat ter stanozolol.

V 60. in 70. letih se je močno povečalo število uporabnikov AAS, prav tako pa tudi nabor komercialno dostopnih AAS. Ameriške in britanske športne organizacije so se nekaj časa upirale priznanju učinkovitosti AAS. Tako je bilo šele v 80. letih sprejeto dejstvo, da so AAS sposobni izboljšati športne dosežke pod določenimi pogoji: športnik mora že pred začetkom jemanja AAS intenzivno trenirati, med jemanjem AAS mora nadaljevati z intenzivnim treningom, njegova prehrana mora vsebovati veliko beljakovin.

Glede na vrsto športa se odmerki AAS razlikujejo. Pri vzdržljivostnih športih se AAS uporabljajo v terapevtskih ali celo nižjih odmerkih, pri športih, pri katerih je zaželjena večja mišična masa, pa se uporabljajo odmerki, ki močno presegajo terapevtske. Športniki uporabljajo AAS za povečano zmožnost treniranja v času, ko ni tekmovanj. Običajno jih uporabljajo v ciklih, ki trajajo od 8-12 tednov. Tako športniki najprej 8-12 tednov jemljejo AAS, temu sledi približno enako dolg cikel brez AAS. S tem naj bi dosegli boljši učinek, hkrati pa naj bi se izognili pozitivnemu rezultatu na doping testu. (7)

Razširjenost uporabe AAS med vrhunskimi športniki

Najpogostejše zlorabljeni AAS pri športnikih so testosteron, nandrolon, stanozolol, metandienon, boldenon, metiltestosteron, metenolon ter drostanolon. Zaradi relativno majhnega števila vrhunskih športnikov in pogostih testiranj je v javnosti pogosto prisotno prepričanje, da je relativno lahko oceniti razširjenost uporabe AAS med vrhunskimi športniki. Vendar pa je to prepričanje zmotno. Športniki nočejo priznati uporabe AAS in jo hočejo na različne načine tudi prikriti. Za športnika in šport, v katerem le-ta nastopa, ima pozitiven rezultat dopinske kontrole številne negativne posledice: prepoved nastopanja, finančne posledice ter načet ugled samega športnika in športne panoge. Obstajajo številni načini za prikritje uporabe nedovoljenih substanc. Nekateri izmed njih so: uporaba maskirnih sredstev (diuretiki, probenecid...), kateterizacija urina, zamenjava vzorca, manipulacija z vzorcem...

Že nakazan problem pri ugotavljanju pogostosti uporabe AAS pri športnikih je režim jemanja: športniki pogosto jemljejo AAS v procesu treninga, z jemanjem pa prekinajo dovolj zgodaj pred tekmovanjem, da je test negativen. To se je spremenilo z uvedbo

testiranje izven tekmovanj. Vendar se je s tem pojavil nov problem: vse države ne izvajajo testiranja izven tekmovanj v enaki meri. Problem je zlasti v državah tretjega sveta ter državah v razvoju, ki imajo omejena finančna sredstva. (7)

Na Norveškem so med letoma 1977 in 1995 izvedli raziskavo o pogostosti uporabe dopinga v športu. Izkazalo se je, da se s pogostostjo doping testov manjša delež pozitivnih vzorcev. (9)

AAS se pogosteje uporabljajo v športih, kjer je najpomembnejša moč (dvigovanje uteži, rokoborba, wrestling..). Med športniki v teh športnih panogah velikokrat velja prepričanje, da brez AAS ne morejo uspeti, vendar pa so AAS razširjeni tudi v drugih športih. Veliko primerov zlorabe AAS je tudi pri plavanju, kolesarstvu, teku na smučeh in atletiki.

Predvideva se, da je uporaba AAS pri vrhunskih športnikih zelo pogosta. Med letoma 1984 in 1988 naj bi vsaj 40 % ženske olimpijske ekipe ZDA za Seul 1988 uporabljale AAS. Ta podatek samo potrjuje pomembnost testiranja izven tekmovanj.

Scarpino je leta 1990 objavil raziskavo o uporabi dopinga med italijanskimi športniki, v katero je bilo vključenih 1015 športnikov ter 216 trenerjev, zdravnikov in menedžerjev. 10 % športnikov je priznalo redno uporabo AAS. 62 % teh športnikov je priznalo, da so začeli z jemanjem AAS po pritiskih trenerjev in menedžerjev za izboljšanje rezultatov. 70 % športnikov je priznalo, da je bil dostop do nedovoljenih substanc enostaven. (7)

Prvi dopinški testi za AAS so bili izvedeni leta 1976 na OI v Montrealu. Prvi športnik, ki je bil ujet pri zlorabi AAS je bil nizozemski deseterbojec *Eduard de Noorlander*, ki je najboljši rezultat v karieri dosegel z 9. mestom na OI leta 1968 v Ciudad de Mexico. Njemu so sledili številni drugi športniki, ki so bili pozitivni na AAS. Verjetno najodmevnejši je primer kanadskega šprinterja *Bena Johnsona*, ki je bil leta 1988 na OI v Seulu pozitiven na AAS. (7) Pred tem je osvojil dve bronasti medalji na OI leta 1984 v Los Angelesu (100 m in štafeta 4 X 100 m). Zaradi pozitivnega testa na stanozolol je bil na OI leta 1988 diskvalificiran, odvzeli so mu tudi svetovna rekorda, ki ju je postavil leta 1987 na svetovnem prvenstvu v Rimu ter na že omenjenih OI 1988. Po pretečeni kazni (dveletni prepovedi nastopanja) se je leta 1991 vrnil na tekmovanja, vendar nikoli več ni dosegel tako odmevnih rezultatov. (10)

Nekateri odmevnejši primeri športnikov, ki so bili pozitivni na AAS so še:

- *Lyudmila Enquist* (atletika): AAS (1993) - svetovna prvakinja leta 1991 in 1993 v teku na 100 m z ovirami, zlata medalja na OI 1996 v Atlanti
- *Vitalij Kličko* (boks): AAS (1996) - trenutni svetovni prvak po verziji WBC v težki kategoriji, bil je tudi že svetovni prvak po verziji WBO,
- *Petr Korda* (tenis): nandrolon (1998) – zmagovalec Odprtega prvenstva Avstralije leta 1998,
- *Dennis Mitchel* (atletika): testosteron (1998), afera BALCO 2003 - dobitnik bronaste medalje v teku na 100 m na OI leta 1992, zlate medalje na OI 1992 v Barceloni (štafeta ZDA 4 x 100 m), ter srebrne medalje na OI 1996 (štafeta ZDA 4 X 100 m),
- *Dieter Baumann* (atletika): nandrolon (1999) – dobitnik zlate medalje na OI 1992 v Barceloni v teku na 5000 m, evropski prvak leta 1994 v teku na 5000 m in dobitnik srebrne medalje na OI 1988 v teku na 5000 m,
- *Linford Christie* (atletika): nandrolon (1999) - dobitnik srebrnih medalj na OI 1988 (100 m in štafeta Velike Britanije 4 X 100 m) ter zlate medalje v teku na 100 m na OI 1992, svetovni prvak v teku na 100 m leta 1993,
- *C. J. Hunter* (atletika): nandrolon (2000), afera BALCO – svetovni prvak leta 1999, dobitnik srebrne medalje v suvanju krogle na OI 2000 v Sydneyu, medaljo so mu kasneje zaradi pozitivnega dopinškega testa odvzeli,
- *Frank de Boer* (nogomet): nandrolon (2001) – nogometaš nizozemske reprezentance, Ajaxa, Barcelone in Galatasaraya,
- *Süreyya Ayhan* (atletika): goljufija pri dopinškem testiranju (2001), stanozolol in metandienon (2007) - doživljenjska prepoved nastopanja zaradi drugega dopinškega prestopka – evropska prvakinja v teku na 1500 m leta 2002,
- *Dwain Chambers* (atletika): tetrahydrogestrinon (THG) (afera BALCO 2003) – dobitnik bronaste medalje v teku na 100 m na evropskem prvenstvu leta 1999,
- *Marion Jones* (atletika): THG (afera BALCO 2003) – na OI v Sydneyu je zmagala v treh disciplinah (tek na 100 m, 200 m, štafeta ZDA 4 X 400 m), v dveh disciplinah je osvojila tretje mesto (skok v daljino, štafeta 4 X 100 m), vendar je bila nato zaradi dopinga diskvalificirana

- Floyd Landis (kolesarstvo): testosteron (2006) – zmagovalec Tour de France 2006, a so mu zmago kasneje odvzeli zaradi pozitivnega dopinškega testa. (10)

Na žalost je doping prisoten tudi med slovenskimi športniki. Slovenija je v svetovnem vrhu po številu pozitivnih dopinških primerov na število vrhunskih športnikov. Kljub temu, da so AAS skupina najpogostejše zlorabljanih snovi v športu, pa so bili do sedaj slovenski športniki, ki so padli na dopinškem testu, v večini primerov pozitivni na druge snovi. Na AAS so bili pozitivni naslednji slovenski športniki:

- Hedvika Korošak (atletika): testosteron (1994) – državna dvoranska prvakinja v troskoku 1994,
- Igor Majcen (plavanje): nandrolon (1999) – 6. Mesto na 1500 m kravl na OI 1992, 3. na evropskem prvenstvu na 1500 m kravl leta 1999,
- Sandi Papež (kolesarstvo): testosteron (2000) – 15. mesto na OI 1988 v kronometru,
- Rusmin Dedić (nogomet): testosteron (2003) – nogometaš NK Rudar Velenje,
- Saša Prokofjev (atletika): testosteron (2003) – članica štafete 4 X 400 m na OI 2000,
- Primož Skerbinek (alpsko smučanje): stanozolol (2003) – nekdanji slovenski reprezentant v hitrih disciplinah,
- Boštjan Šimunič (atletika): drostanolon (2006) – 37. mesto na OI 2004 v Atenah,
- Tomaž Nose (kolesarstvo): testosteron (2007) – državni prvak v cestni dirki 2006. (10, 11)

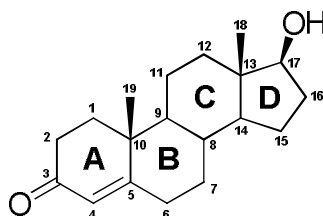
Dopinški program v Nemški demokratični republiki (NDR)

Po združitvi Nemčije leta 1989 so na dan prišli dokumenti, ki so razkrili, da so v Nemški demokratični republiki (NDR) v 70. in 80. letih prejšnjega stoletja izvajali sistematičen dopinški program. Vanj so bili vključeni politiki, visoki športni funkcionarji, trenerji, zdravniki, farmacevti in ostali strokovnjaki ter farmacevtsko podjetje Jenapharm. V program je bilo vključenih preko 10000 športnikov, med katerimi so posebno pozornost namenjali mladim športnicam, za tajnost projekta pa so skrbeli tudi vohuni. Program so začeli izvajati leta 1966, s ciljem, da bi svojo državo najboljše promovirali z doseganjem vrhunskih rezultatov v športu. V ta namen so ustanovili posebne športne šole za mlade talente, kjer so izvajali dopinške programe. Tako so nekaterim športnicam že pri enajstih

letih začeli dajati injekcije AAS pod pretvezo, da gre za vitamine. Zaradi izboljšanja metod za kontrolo nedovoljenih snovi so leta 1974 uvedli še sistematično kontrolo dopinga, da bi se izognili pozitivnim rezultatom dopinških testov. Tako se je pogosto dogajalo, da so športniki v zadnjem trenutku odpovedali nastop na tekmovanju. Zaradi takšnega sistema od leta 1977 na dopinških testih ni bilo nobenega pozitivnega športnika iz NDR. Po razkritju dokumentov so se oglasili številni športniki, ki so bili vključeni v program. Večina jih je priznala, da so uporabljali doping. Mnogi izmed teh športnikov imajo še danes težave z zdravjem, predvsem zaradi uporabe AAS. Najbolj znan je primer tekmovalke v suvanju krogle Heidi Krieger. Pri njej je zaradi sistematičnega jemanja AAS prišlo do ireverzibilnih sprememb sekundarnih spolnih znakov (maskulinizacije). Zaradi tega je leta 1997 operativno spremenila spol in se danes imenuje Andreas Krieger. (12)

1.2.2. Farmakologija AAS

Učinki AAS so podobni učinkom testosterona. Testosteron in ostali androgeni hormoni so lipofilne spojine z značilnim steroidnim skeletom, ki je sestavljen iz treh šestčlenskih in enega petčlenskega ogljikovega obroča. (Slika 1).



Slika 1: Struktura testosterona, prikazano je oštevilčenje steroidnega skeleta

Biosinteza androgenih hormonov poteka v skorji nadledvične žleze ter v testisih (pri moških) in jajčnikih (pri ženskah). Pri moških je normalna koncentracija testosterona v krvi 3-10 ng/ml, pri ženskah pa pod 0,1 ng/ml. Androgeni hormoni uravnavajo številne procese v telesu. Delujejo na mišice, kosti, jetra, možgane, ledvice, lasne folikle, ter eritropoezni, imunski in centralni živčni sistem. Njihove učinke v grobem delimo na androgene in anabolične. Androgeni učinki so odgovorni za maskulinizacijo (razvoj moških spolnih znakov), anabolični učinki pa so odgovorni za sintezo proteinov v mišicah in kosteh ter retencijo (zastajanje) dušika v telesu. (7, 13)

Androgeni učinki so:

- razširitev grla (posledica je globlji glas),
- poraščenost po telesu,
- povečana aktivnost lojnic (lahko se pojavijo akne),
- učinki na centralni živčni sistem (libido in agresivnost).

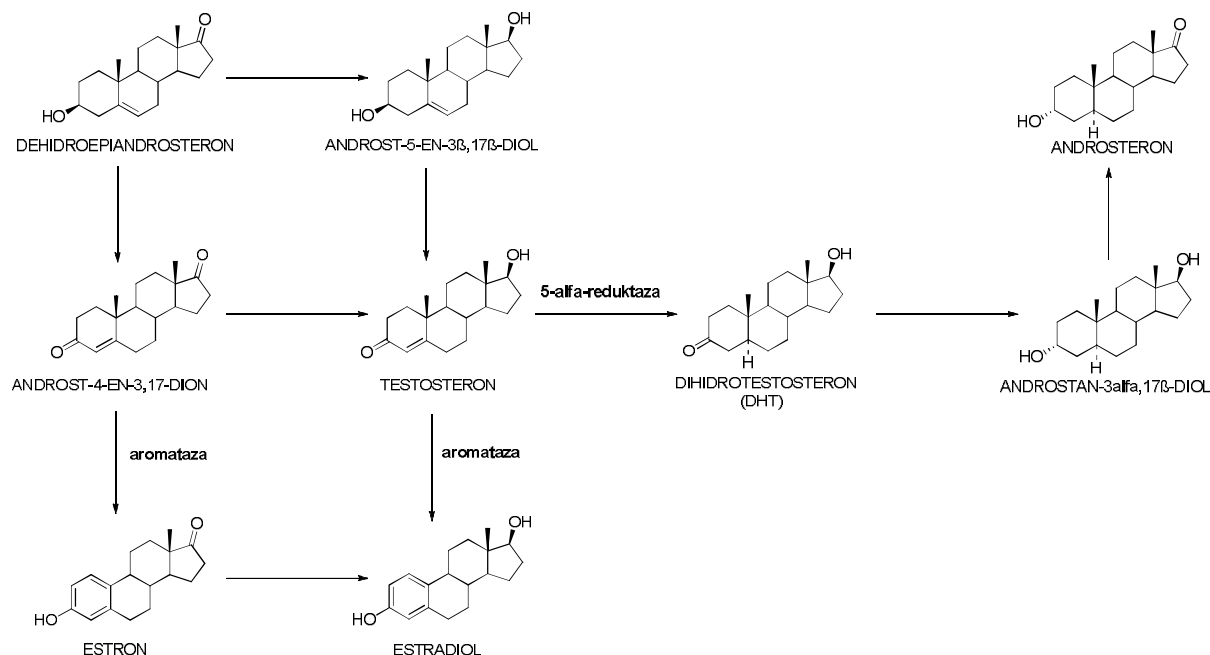
Anabolični učinki so:

- rast skeletnih mišic in kosti,
- stimulacija eritropoeze,
- povečana količina 2,3-difosfoglicerata v eritrocitih,
- rast telesa v višino se ustavi.

Pri moškem v puberteti pride do povečane steroidogeneze oz. tvorbe moških spolnih hormonov, ki so ključni za reprodukcijo, pomembni pa so tudi pri ohranjanju mišične in kostne mase, imajo kognitivno funkcijo in dajejo občutek dobrega počutja. (7)

Najpomembnejši androgeni hormon je testosteron. Biosintezo testosterona stimulira luteinizirajoči hormon (LH), ki ga izloča hipofiza. 95 % testosterona nastane v Leydigovih celicah testisov. V skorji nadledvične žleze se sintetizira zelo majhna količina testosterona, pač pa tam nastajajo njegovi prekurzorji – prohormoni, ki imajo sami po sebi le šibko androgeno delovanje in se v nadaljevanju pretvorijo do močnejših androgenov (npr. testosterona ter 5α -dihidrotestosterona (DHT)) (Slika 2). Najpomembnejša prohormona sta dehidroepiandrosteron (DHEA) ter androstendion. Pomemben pa je tudi androstendiol, ki se lahko veže tudi na estrogenski receptor.

Metabolizem testosterona služi kot osnova za vse sintetične AAS. Encimi, ki sodelujejo v procesu inaktivacije testosterona, so prav tako aktivni tudi pri ostalih AAS, seveda če gre za podobno strukturo. Glavni izločeni metaboliti testosterona so: androsteron, etioholanolon, epiandrosteron, DHT, 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol, ki sestavljajo osnovni profil pri dopinškem testiranju. Testosteron se poleg tega lahko s pomočjo aromataze metabolizira do estradiola. (Slika 2) (14)



Slika 2: Glavne biotransformacije steroidnih spolnih hormonov (poenostavljen prikaz, nekatere pretvorbe so reverzibilne)

Učinki testosterona so na celični ravni kontrolirani tudi s pomočjo encimov, ki ga metabolizirajo. Testosteron se v tarčnih tkivih (v kosteh, mišicah, centralnem živčnem sistemu) lahko direktno veže na androgenski receptor, v drugih (npr. reproduktivnih organih) je testosteron prohormon, ki se s pomočjo 5 α -reduktaze pretvori v močnejši androgen DHT. V adipoznem tkivu in možganih se testosteron s pomočjo aromataze pretvori v estrogen estradiol. (15)

V kosteh androgeni stimulirajo proliferacijo osteoblastov, sintezo proteinov matriksa ter rastnega faktorja in citokinov, pomembna pa naj bi bila tudi aromatizacija do estrogenov.

V skeletnih mišicah ni zaznane 5 α -reduktazne aktivnosti, torej je tam pomembna direktna vezava testosterona na androgenski receptor. V mišičnem tkivu je zaznana aromatazna aktivnost, vendar zaenkrat še ni znano, ali je pretvorba androgenov do estrogenov v mišičnem tkivu fiziološko pomembna za njihove miotropne učinke. Pri suprafizioloških koncentracijah androgenov je za njihove anabolične učinke poleg vezave na androgenske receptorje pomembna tudi vezava na glukokortikoidne receptorje. Slednja povzroči zmanjšan katabolizem proteinov.

Androgeni stimulirajo eritropoezo direktno in indirektno preko stimuliranja produkcije eritropoetina. Poleg tega pa androgeni povečujejo količino 2,3-difosfoglicerata v

eritrocitih, kar ima za posledico povečano sproščanje kisika v tkiva, s čimer lahko dosežemo večjo vzdržljivost. (16)

Učinke jemanja AAS lahko razdelimo na akutne in kronične. Akutni učinki so: razvoj sekundarnih spolnih znakov in dozorevanje spolnih organov (pri moških v puberteti), povečanje mišične mase, retencija soli in vode, tanjšanje in potemnitev kože, aknavost, poraščenost po telesu, glas postane globlji, občutek dobrega počutja, povečanje libida, povečanje agresivnosti, v visokih odmerkih maskulinizacija pri ženskah. Kronični učinki AAS so: neplodnost, edemi, ki so posledica retencije soli in vode, adenokarcinomi, hipertenzija, ateroskleroza, povečana nevarnost nastanka krvnih strdkov, zlatenica, neoplazme in karcinomi jeter, ledvično popuščanje, glomerulonefritis. (17)

1.2.3. Odnos med strukturo in delovanjem AAS

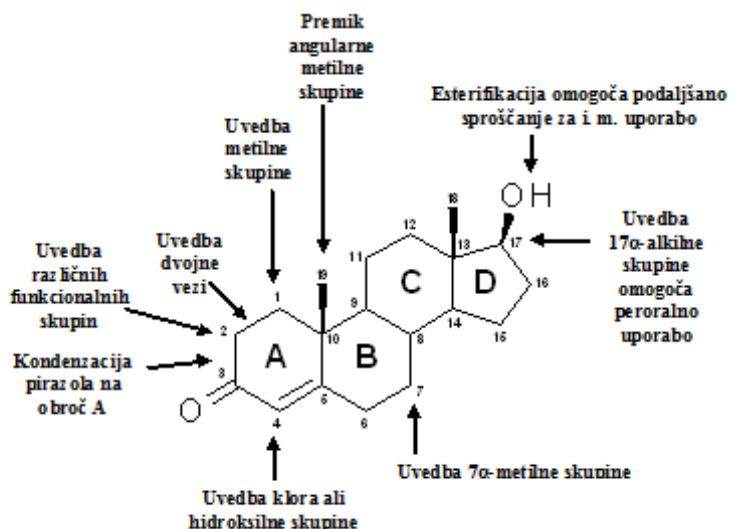
Namen strukturnih modifikacij testosterona, ki so predstavljene na sliki 3, je ločitev androgenih in anaboličnih učinkov AAS, izboljšanje biološke uporabnosti pri peroralni uporabi, zmanjšanje toksičnosti ter podaljšanje delovanja.

Za ločevanje androgenih od anaboličnih učinkov je zlasti pomembno, ali je molekula substrat za 5α -reduktazo ali ne. To je posledica dejstva, da je 5α -reduktazna aktivnost pomembna v reprodukcijskih organih, v mišičnem tkivu pa te aktivnosti praktično ni.

Peroralno aktivnost AAS dosežemo z uvedbo 17α -alkilne skupine, s katero preprečimo metabolizem prvega prehoda. Ta skupina sterično prepreči oksidacijo 17β -OH skupine. Peroralno aktivnost AAS pa omogoči tudi uvedba metilne skupine na mesto C-1.

AAS, ki so namenjeni parenteralni uporabi, imajo pogosto 17β -OH skupino zaestreno. S tem preprečimo hitro absorpcijo iz oljnega vehikla. Ko pride takšna spojina v krvni obtok, hitro nastopi hidroliza estrov s pomočjo esteraz. S tem dobimo aktivno učinkovino.

S substitucijo C-19 metilne skupine z vodikom dobimo 19-nortestosteron (nandrolon). Nandrolon se močneje veže na androgenski receptor kot testosteron. Po pretvorbi s 5α -reduktazo pa dobimo spojino, ki se šibkeje veže na androgenski receptor kot metabolit testosterona DHT. Posledica tega je, da ima nandrolon močnejšo anabolično ter šibkejšo androgeno aktivnost kot testosteron. Ločitev androgenih in anaboličnih učinkov pa lahko dosežemo tudi z redukcijo 4-5 dvojne vezi. (15)

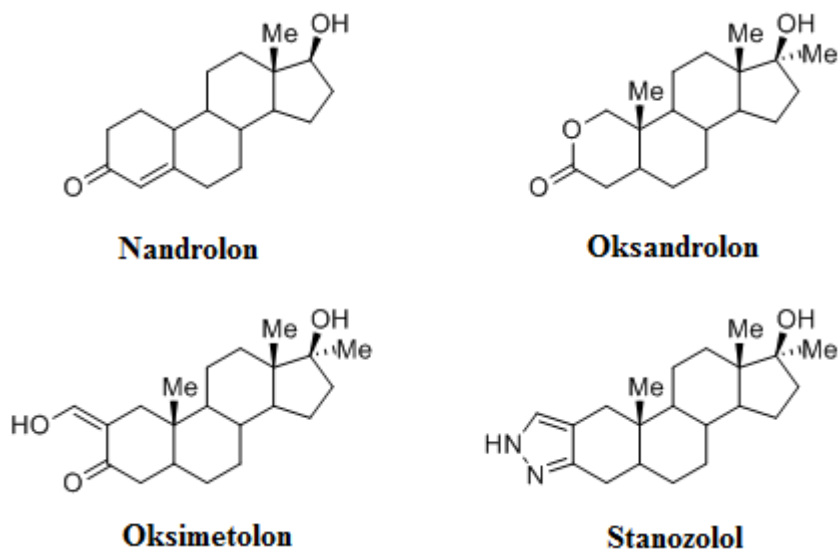


Slika 3: Strukturna modifikacija testosterona za povečanje anabolične aktivnosti (povzeto po 15)

1.2.4. Klinična uporaba AAS

Prva uporaba AAS sega v čas pred 2. svetovno vojno. Uporabljali naj bi jih nemški vojaki za povečanje vzdržljivosti in agresivnosti. V 30. letih prejšnjega stoletja so AAS uporabljali za zdravljenje hormonskih nepravilnosti pri moških in ženskah, kardiovaskularnih obolenj in kot obliko antiestrogenega zdravljenja raka dojke. V tistem času so testosteron dajali homoseksualnim moškim v prepričanju, da imajo previsoko raven ženskih hormonov. (7)

Danes so klinično najpogosteje uporabljani AAS nandrolon, oksandrolon, oksimetolon in stanozolol (slika 4). Vsi ti imajo močnejše anabolično in šibkejšo androgeno delovanje. Peroralno se uporabljajo oksandrolon, oksimetolon ter stanozolol, medtem ko se nandrolon praviloma uporablja parenteralno, najpogosteje zaestren kot dekanolat in fenpropionat v obliki oljnih injekcij. (16)



Slika 4: Strukture klinično najpogosteje uporabljanih AAS

AAS se uporabljajo za različne terapevtske namene. Lahko se uporabljajo za spreminjanje ravni hormonov, lahko pa je namen njihove uporabe povečana sinteza proteinov. Tekom njihove uporabe v terapevtske namene smo veliko izvedeli o njihovih učinkih in neželenih učinkih. Iz tega razloga se AAS ne uporabljajo več za zdravljenje nekaterih bolezni (npr. psihičnih bolezni). Ker danes veliko vemo o njihovih neželenih učinkih, vedno pretehtamo razmerje škoda/korist za vsakega bolnika posebej. Danes se AAS uporabljajo za zdravljenje napredovalih bolezni, pri katerih bolniki izgubljajo mišično maso ter pri bolnikih, pri katerih ostale terapije niso bile uspešne. AAS se uporabljajo pri naslednjih bolezenskih stanjih:

- aplastična anemija,
- metastatski rak dojk,
- hereditarni angioedem,
- stimulacija sinteze plazmina z namenom znižanja koncentracije fibrina (prevelika koncentracija le-tega lahko povzroči trombozo),
- Reynaud-ov sindrom ter nekatera druga kardiovaskularna obolenja,
- povečanje sinteze proteinov po operacijah in dolgotrajnih porodih,
- v nizkih odmerkih v kombinaciji z estrogeni za odpravljanje težav v menopavzi,
- ohranjanje sekundarnih spolnih znakov pri moških, ki so jim odstranili testise,
- zdravljenje zapoznele pubertete pri moških,
- zdravljenje impotence pri moških,

- ciroza,
- opekline,
- povečanje telesne mase pri bolnikih, ki so okuženi s HIV,
- osteoporoza,
- kronična ledvična bolezen,
- v oftalmoloških pripravkih za zdravljenje roženice. (7)

V Sloveniji sta registrirani dve zdravili z AAS: Androtop[®] gel v blazinici 25 mg in gel v blazinici 50 mg ter Nebido[®] raztopina za injiciranje 1000mg/4 ml. Zdravili vsebujeta testosteron in se uporabljata za nadomestno zdravljenje moškega hipogonadizma.(18)

1.2.5. Neželeni učinki AAS

AAS se zaradi številnih neželenih učinkov relativno redko uporabljajo v klinične namene. AAS izkazujejo učinke na številne organe. Najpogostejši neželeni učinki AAS so:

- reproduktivni,
- hepatični,
- kardiovaskularni,
- hematološki,
- cerebrovaskularni,
- muskuloskeletni,
- endokrinološki,
- renalni,
- imunološki,
- psihološki.

Neželeni učinki so odvisni od trajanja jemanja ter odmerkov. Pri dolgotrajnem jemanju visokih odmerkov AAS lahko pride do resnih in včasih tudi ireverzibilnih neželenih učinkov. Pri moških sta najpogostejša neželena učinka zmanjšana plodnost in ginekomastija, pri ženskah in otrocih pa maskulinizacija. (19)

Neželeni učinki na reproduktivne organe

Pri moških uporaba AAS povzroči zmanjšanje koncentracije LH in folikle stimulizirajočega hormona (FSH). Posledica tega je zmanjšana produkcija endogenega testosterona, zmanjšana spermatogeneza ter atrofija testisov. Ginekomastija je posledica pretvorbe AAS do estradiola in estrona. Ostali neželeni učinki na moške reproduktivne organe so oligospermija ali azospermija, hipertrofija prostate, karcinomi prostate, impotenca, ter priapizem. Pri ženskah AAS povzročajo motnje menstrualnega ciklusa ter maskulinizacijo. Maskulinizacija se kaže kot hirsutizem, pojav aken, globlji glas, hipertrofija klitorisa ter plešavost. Nekateri od teh učinkov so ireverzibilni. AAS povzročijo tudi atrofijo maternice in dojk. Posebno nevarni so za nosečnice, saj so **teratogeni**. (19)

Neželeni učinki na jetra

Pri športnikih, ki jemljejo AAS, se pogosto pojavijo povišane koncentracije jetrnih encimov (aspartat-aminotransferaze (AST)), alanin-aminotransferaze (ALT), laktat-dehidrogenaze (LDH)). Pogosto imajo povišane te encime tudi dvigovalci uteži, ki naj ne bi jemali AAS. Zaradi tega dejstva ne moremo z gotovostjo trditi, da so povišane koncentracije teh encimov posledica AAS. Jetrna disfunkcija se pogosteje pojavi pri jemanju 17 α - alkiliranih AAS. Ostali neželeni učinki AAS na jetra soolestazna zlatenica, benigni in maligni tumorji ter hepatitis. Karcinomi na jetrih se pogosteje pojavljajo pri ljudeh, ki so jemali oksimetolon ali metiltestosteron. (19)

Neželeni učinki na kardiovaskularni, cerebrovaskularni in hematološki sistem

AAS vplivajo na profil lipidov v serumu. Lahko povzročajo trombozo in zaplete, ki so povezani s tem (kap, miokardni infarkt, izguba udov). Pogosto se pojavijo povišane koncentracije lipoproteina majhne gostote (LDL) ter znižane koncentracije lipoproteina visoke gostote (HDL). To pomeni povišano tveganje za koronarno arterijsko bolezen. Te spremembe so lahko reverzibilne, ob dolgotrajnem jemanju AAS pa te spremembe postanejo ireverzibilne. AAS zvišujejo število in maso eritrocitov ter hematokrit. Zaznana je tudi povečana fibrinolitična aktivnost ter povišana koncentracija faktorjev koagulacije. Smrtno nevaren neželeni učinek AAS je lahko možganski edem. Jemanje AAS lahko povzroči hipertenzijo, miokardni infarkt ter ireverzibilne spremembe miokarda, najpogosteje hipertrofijo levega ventrikla. (19)

Neželeni učinki na mišice in kosti

AAS pri otrocih in pubertetnikih povzročijo prezgodnje prenehanje rasti v višino in posameznik ne doseže takšne višine, kot bi jo sicer. Pri športnikih, ki jemljejo AAS, obstaja večja nevarnost za poškodbe kit. Kita se ne okrepi toliko, kot se lahko mišica. Zaradi jemanja AAS lahko športnik trenira več in bolj intenzivno. Ker se mišice okrepijo, le-te takšen način treninga lahko zdržijo, pri kitah pa velikokrat pride do poškodb. Čeprav je nevarnost za poškodbe kit veliko večja, pa pri športnikih, ki jemljejo AAS, obstaja tudi povečana možnost za preobremenitve mišic ter s tem povezane poškodbe (nateg, natrganje ter strganje mišic). (19)

Neželeni učinki na endokrinološki sistem

Pri moških pred in med puberteto dolgotrajno jemanje AAS lahko povzroči pospešeno dozorevanje ter kasneje nenormalnosti pri razvoju sekundarnih spolnih znakov. Jemanje AAS povzroči aknavost (posledica androgene stimulacije lojnic), zmanjšano toleranco za glukozo z inzulinsko rezistenco, znižanje koncentracije ščitničnih hormonov, alopecijo ter že omenjeno ireverzibilno maskulinizacijo pri ženskah. (19)

Neželeni učinki na ledvica

Dvigovalci uteži, ki ne jemljejo AAS, imajo zaradi pridobivanja mišične mase povišano koncentracijo kreatinina v serumu. Enak učinek imajo tudi AAS, le-ti pa zvišujejo še koncentracijo sečninskega dušika v krvi (BUN) in koncentracijo sečne kisline v serumu. Vsi ti učinki so reverzibilni. Pri športnikih, ki jemljejo AAS, lahko pride do ledvičnega popuščanja, ki je posledica rabdomiolize, poznani pa so tudi primeri glomerulonefritisa. AAS pospešijo razvoj karcinomov, pogosti so Wilm-ovi tumorji. (19)

Imunološki neželeni učinki ter infekcije povezane z jemanjem AAS

Znani so primeri okužb s hepatitisom B in C ter virusom HIV, ker si je več uporabnikov injiciralo AAS z isto iglo. Problem pri AAS, ki se uporabljajo parenteralno, so tudi infekcije, ki nastanejo zaradi večkratne uporabe iste igle, pa čeprav jo uporablja samo en uporabnik. Zaradi črnega trga z AAS pripravki pogosto niso izdelani v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP) in niso podvrženi kontroli kakovosti. Zaradi tega lahko pride do infekcij. (19)

Psihološki neželeni učinki

Psihološki neželeni učinki AAS so razdražljivost, agresivnost, evforija, depresija, nihanja razpoloženja, spremenjen libido ter včasih celo psihoze. AAS lahko povzročajo odvisnost, pri nenadnem prenehanju jemanja pa abstinenčni sindrom. Pri abstinenčnem sindromu se pojavijo znaki centralne noradrenergične hiperaktivnosti: anksioznost, razdražljivost, nespečnost, vročinski oblivi, potenje, mrzlica, anoreksija, mialgija, slabost, bruhanje, piloerekcija, tahikardija ter hipertenzija. Lahko se pojavi tudi depresija in hrepenenje po AAS. Za neželene učinke so še posebej dovzetni pubertetniki. (19)

1.2.6. Detekcija AAS

Testosteron ter ostali AAS se izločajo pretežno z urinom in sicer v veliki večini v obliki glukuronidov. Le majhen delež AAS se izloči v prosti obliki ali v obliki sulfata. Zaradi tega ter enostavnega in neinvazivnega pridobivanja vzorca, se doping testi na AAS izvajajo na urinskih vzorcih. Pri doping kontrolah se vzorci razdelijo na dva enaka dela: vzorec A in vzorec B. Testira se vzorec A. Če je vzorec A pozitiven, ima športnik pravico zahtevati še analizo vzorca B.

Pri doping testih dokazujemo AAS v prosti obliki. Ker je v urinu velika večina AAS v obliki glukuronidov, uporabimo za dekonjugacijo β -glukuronidazo. Dekonjugirani steroid nato ekstrahiramo z ekstrakcijo tekoče-tekoče ali ekstrakcijo trdno-tekoče. Ekstrakciji sledi analiza vzorca s sklopljeno metodo tekočinske kromatografije in tandemске masne spektrometrije (LC-MS/MS) ali s sklopljeno metodo plinske kromatografije in tandemске masne spektroskopije (GC-MS/MS). Za doseganje hlapnosti in izboljšanj občutljivosti moramo pred GC analizo spojine derivatizirati. Običajno tvorimo trimetilsililne (TMS) derivate AAS. Kot reagent za derivatizacijo se največkrat uporablja metilsililtrifluoroocetna kislina (MSTFA). (20)

Endogeni steroidi

Povišana koncentracija testosterona ter eksogeni vnos AAS povzroči zmanjšano produkcijo LH v telesu. V 70. letih prejšnjega stoletja je Raymond Brooks na podlagi tega poizkušal razviti indirektno metodo za ugotavljanje zlorabe AAS pri športnikih. V ta namen je izvedel posebno raziskavo. Pri desetih moških prostovoljcih je preučeval vpliv testosterona na razmerje testosteron/LH. Prostovoljcem so injicirali 250 mg zaestrenega testosterona ter jim nato izmerili koncentracijo prostega testosterona ter celotni testosteron po hidrolizi z β -glukuronidazo. Pri vseh prostovoljcih se je razmerje testosteron/LH močno povešalo. Ta metoda se kasneje zaradi prevelikih individualnih razlik ni več uporabljala za indirektno ugotavljanje zlorabe AAS pri športnikih. (21)

V začetku 80. let prejšnjega stoletja je Manfred Donike razvil metodo za ugotavljanje zlorabe AAS, pri kateri je za detekcijo uporabil sklopljeno metodo plinske kromatografije in masne spektrometrije (GC/MS). Metoda temelji na merjenju razmerja glukuroniziran testosteron v urinu/epitestosteron (T/E). Ta metoda je izpodrinila radioimunska analizo (RIA-o) in je v rutinski uporabi še danes.

Epitestosteron je naravno prisoten epimer testosterona. Pri človeku nastaja iz testosterona ter androstendiona. Eksogeni testosteron se ne pretvori v epitestosteron, kar izkoriščajo za dokazovanje zlorabe testosterona pri športnikih.

Za človeka je značilno konstantno razmerje T/E v urinu. Referenčna vrednost za to razmerje je 1,1-1,5. V zgodnjih 80. letih prejšnjega stoletja je Medicinska komisija MOK-a sprejela, da je vrednost T/E nad 6 rezultat eksogenega vnosa testosterona. Leta 1992 je Medicinska komisija MOK-a spremenila definicijo. Vrednost T/E nad 6 je rezultat eksogenega vnosa testosterona, razen če ni dokazano, da je razmerje povešano zaradi fizioloških in patofizioloških sprememb. Ni pa bilo natančno določeno, katere so spremembe, zaradi katerih se razmerje lahko poveša. Športniki, osumljeni zlorabe testosterona, so navajali najrazličnejše razloge za povešano razmerje T/E. Naslednji problem tega razmerja je ta, da so športniki začeli zlorabljati tudi druge AAS, posluževali pa so se tudi testosterona s podaljšanim sproščanjem, pri katerem so koncentracije testosterona v krvi in urinu mnogo nižje. Zaradi teh dejstev so sklenili, da povešano razmerje T/E ni dovolj, da bi nekoga obtožili zlorabe dopinga. Poleg merjenja razmerja T/E so uvedli še merjenje razmerja androsteron/etioholanolon, androsteron/testosteron, 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol/ 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol ter epitestosterona, androsterona, etioholanolona ter DHEA. Za vse parametre so določili referenčne vrednosti.

Konec 90. let prejšnjega stoletja je WADA za dokazovanje eksogenega vnosa AAS pri športnikih uvedla masno spektrometrijo razmerja izotopov (IRMS), s katero detektiramo izvor AAS v urinu. Detekcija temelji na različnem razmerju $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v endogenih in eksogenih AAS. Danes WADA zahteva, da se pri vseh vzorcih, pri katerih je vrednost T/E nad 4, koncentracija testosterona ali epitestosterona nad 200 ng/ml, koncentracija androsterona ali etioholanolona nad 10000 ng/ml ali koncentracija DHEA nad 100 ng/ml, izvede še analiza z GC, sklopljena s sežigno masno spektrometrijo razmerja izotopov (GC/C/IRMS). Pri vseh vrednostih se upošteva ekvivalent glukuronizirane oblike steroida, ter specifična teža 1,020.

V vzorcu najprej hidroliziramo glukuronid s pomočjo β -glukuronidaze, sledi separacija s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ter derivatizacija z MSTFA. Sledi GC/C/IRMS analiza vzorca. Poleg razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pa se za odkrivanje izvora AAS uporablja tudi analiza razmerja $^2\text{H}/^1\text{H}$. (22)

Eksogeni AAS

Za detekcijo eksogenih steroidov se uporabljata metodi GC-MS/MS ter LC-MS/MS. Zahtevana meja detekcije za AAS in njihove metabolite je 10 ng/ml, razen za metandienon, metiltestosteron ter stanozolol in njihove metabolite, kjer je meja detekcije 2 ng/ml. Kot dodatek zgoraj omenjenim metodam ter za odkrivanje novih, še nepoznatih AAS, se uporablja celični sistem transferiran s plazmidom, ki nosi gen za ekspresijo androgenega receptorja (androgen receptor reporter gene sistem). Metoda prepozna vse molekule, ki imajo afiniteto do androgenega receptorja. Prednost te metode je, da nam ni treba poznati strukture AAS. (21)

1.2.7. Legalni status AAS

Legalni status AAS se razlikuje od države do države. V Sloveniji status AAS opredeljuje Kazenski zakonik. Zakonik se dotakne AAS v 186. In 187. členu. Tam je zapisano, da je prepovedano proizvajati, predelovati, prodajati ali ponujati naprodaj, hraniti in prenašati nedovoljene snovi v športu. (23)

V razvitih državah (Avstralija, Argentina, Brazilija, Kanada, Velika Britanija, ZDA, Slovenija,...) so AAS kontrolirane snovi, ki spadajo med ilegalne snovi, razen če se uporabljajo v zdravstvene namene. V nekaterih državah, npr. v Mehiki in na Tajskem pa so

AAS legalni. V državah, kjer so AAS ilegalne snovi, je razvit črni trg. Večina AAS v Evropi izvira iz držav Evropske unije in Rusije, AAS pa pridejo v Evropo tudi iz Tajske, Turčije, Egipta, Indije in Pakistana. V ZDA pa večina AAS na črnem trgu izvira iz Mehike, Rusije, Romunije in Grčije. (15)

V ZDA so bili od leta 1996 do leta 2005 prohormoni testosterona in nandrolona na voljo na trgu prehranskih dopolnil. Leta 2005 je Akt o kontroli AAS tudi prohormone uvrstil v razred III kontroliranih snovi. Snovi v tem razredu je prepovedano proizvajati, predelovati, prodajati, ponujati na prodaj, hraniti in prenašati. Za posedovanje snovi iz tega razreda je zagrožena kazen do sedem let zapor. (24)

V Veliki Britaniji je legalni status AAS opredeljen v Aktu o zlorabi drog. AAS spadajo v razred IV, skupino 2 kontroliranih snovi. V isto skupino spadata še klenbuterol in humani rastni hormon. AAS so dovoljeni, če se uporabljajo v medicinske namene. Prepovedano je posedovati, predelovati, prodajati, ponujati na prodaj, hraniti in prenašati AAS v nemedicinske namene. (15)

Čeprav je prodaja in proizvodnja AAS v nemedicinske namene prepovedana v mnogih državah po svetu, pa so AAS relativno lahko dostopni na internetu. Obstaja zelo veliko internetnih strani, ki ponujajo AAS. Na nekaterih internetnih straneh so objavljena INN imena učinkovin, največkrat pa so imena učinkovin »zamaskirana« in je težje prepoznati, da gre za AAS. Velikokrat so v opisih pripravkov napisane netočne in zavajajoče informacije o učinkovanju pripravkov. Problem teh internetnih pripravkov je tudi, da niso izdelani v skladu z GMP. Pripravkov, ponujenih na internetnih straneh, navadno nihče ne kontrolira. Vprašljiva je vsebnost učinkovine in njena čistota, zgodi pa se tudi, da pripravek sploh ne vsebuje deklarirane učinkovine, ali pa vsebuje kakšno drugo učinkovino, ki ni deklarirana. Danes se za identifikacijo in določanje vsebnosti učinkovin v izdelkih, ki vsebujejo AAS, najpogosteje uporablja HPLC. (5)

1.3. Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (HPLC)

Kromatografija je separacijski proces. Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem s ciljem kvalitativne in/ali kvantitativne določitve. V praksi želimo z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema doseči čim boljšo ločljivost v čim krajšem času. Posamezne sestavine vzorca se ločijo med seboj na osnovi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij s stacionarno in mobilno fazo. Molekule stalno prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi, v stacionarni fazi pa (skoraj) mirujejo.

Pri tekočinski kromatografiji je mobilna faza tekočina, stacionarna faza je običajno trdna porozna ali imobilizirana snov. Komponente vzorca se ločijo na koloni in se nato ločeno eluirajo iz kolone. Tam jih zaznamo z detektorjem. Signali so podani kot kromatografski vrhovi. Površina pod kromatografskim vrhom je proporcionalna koncentraciji komponente v vzorcu. Na ta način dobimo podatke o kvantitativni sestavi vzorca.

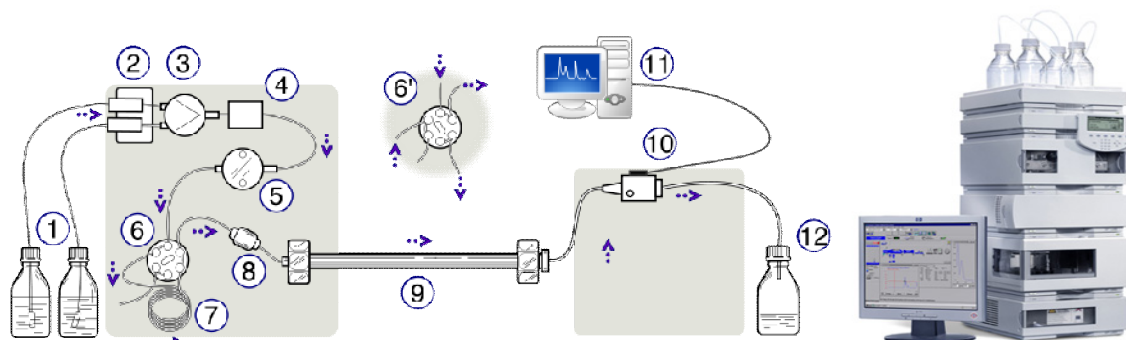
HPLC je kolonska kromatografija, pri kateri za stacionarno fazo uporabimo zelo majhne delce (od 2,7 μm do 10 μm). Če želimo, da bo pretok skozi kolono od 0,5 do 5 ml/min, moramo mobilno fazo potiskati skozi kolono z visokotlačno črpalko. Značilnost HPLC je hitra in dobra ločljivost. Shema HPLC sistema je prikazana na sliki 5.

Pri HPLC lahko na koloni potekajo različni separacijski procesi:

- adsorpcija (npr. na silikagel pri normalnofazni kromatografiji),
- porazdelitev (npr. med C18 reverzno in mobilno fazo),
- ionska izmenjava,
- ločitev na podlagi velikosti molekul (gelska filtracija).

Pri normalnofazni kromatografiji imamo polarno stacionarno fazo in nepolarno mobilno fazo. Tu imamo velike težave zaradi hlapnosti topil, ki sestavljajo mobilno fazo. Zaradi tega se sestava mobilne faze med delom spreminja, kar vodi v slabšo ponovljivost. Na ločljivost pri tej metodi veliko bolj vpliva izbira stacionarne faze kot mobilne faze. Uporaba te metode je običajno omejena na zelo nepolarne spojine, velikokrat pa se uporablja tudi za kiralno kromatografijo. Za bolj polarne spojine je bolje uporabiti reverznofazno HPLC.

Pri reverznofazni HPLC imamo nepolarno stacionarno fazo in polarno stacionarno fazo. Vrstni red eluiranja komponent je obraten kot pri normalnofazni HPLC. Za reverznofazno HPLC je značilna večja specifičnost kot pri normalnofazni HPLC. (25)



1-rezervoar za mobilno fazo, 2-razplinjevalec, 3-mešalec gradienta, 4-prostor za mešanje mobilne faze, 5-črpalka, 6-injektor v t.i. »inject« poziciji, 6'-injektor v t.i. »load« poziciji, 7-vzorčevalna zanka, 8-predkolona, 9-kolona, 10- detektor, 11-sistem za obdelavo podatkov

Slika 5: Shema HPLC sistema (26)

1.3.1. Validacija HPLC metode

Validacija je sistematičen, dokumentiran postopek, ki z visoko stopnjo sigurnosti zagotavlja, da bo specifičen proces stalno potekal v skladu s predpisanimi specifikacijami in tako ustrezal namenu uporabe. Z validacijo zagotovimo kakovost, zanesljivost in doslednost rezultatov HPLC metode. (27) ICH določa naslednje parametre validacije: točnost, natančnost, selektivnost oz. specifičnost, linearnost, območje metode, mejo detekcije, mejo kvantifikacije, robustnost.

Točnost

Točnost je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne (točne) rezultate. Izražamo jo lahko kot % prekrivanja (*recovery*) med količino standarda izračunano iz rezultatov testa in znano dodano količino standarda ali pa kot % odstopanja dobljene od dodane vrednosti (*bias*). (28)

Natančnost

Natančnost je ujemanje rezultatov analize opravljenih na več paralelkah istega vzorca. Običajno se izraža z relativno standardno deviacijo (RSD). Če se zahteva, da je $RSD \leq 2 \%$ je potrebnih pet ponovitev, za RSD, ki so večje od 2 %, pa je potrebnih šest ponovitev. (28)

Selektivnost

Selektivnost metode določimo s primerjavo rezultatov analize konkretnih vzorcev (vsebujejo pomožne snovi, sorodne snovi, razpadne produkte) ter rezultatov analize čiste substance brez matriksa. Izraža se kot razlika v rezultatih med obema vrstama vzorcev. (28)

Linearnost

Z metodo najmanjših kvadratov določimo regresijsko premico odvisnosti testnih rezultatov od koncentracije preiskovane snovi. Naklon regresijske premice in njegova varianca sta matematična parametra linearnosti, medtem ko je odsek na y-osi merilo za morebitno sistematično napako metode. Linearnost običajno določamo v intervalu 50 % do 150 % nominalne koncentracije analita. Interval obsega vsaj 5 točk. (28)

Območje metode

Območje je definirano z intervalom med spodnjo in zgornjo koncentracijo preiskovane snovi, ki je smiselno in za katerega dokažemo ustrezno točnost, natančnost in linearnost. Izraža se v istih enotah kot rezultat. (28)

Meja detekcije

Meja detekcije je parameter limitnih testov. To je najmanjša koncentracija analizirane snovi v vzorcu, ki se z določeno metodo še lahko zazna, vendar ne nujno tudi kvantificira. Izraža se kot koncentracija analizirane snovi v vzorcu. (28)

Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije je najmanjša koncentracija analizirane snovi v vzorcu, ki jo z določeno metodo še lahko kvantificiramo z ustrezno točnostjo in natančnostjo. Izraža se kot koncentracija analizirane snovi v vzorcu. (28)

Robustnost

Robustnost je definirana s stopnjo reproducibilnosti rezultatov dobljenih z analizo istih vzorcev pri različnih pogojih (različnih laboratorijih). Izrazi se kot odsotnost vpliva instrumenta in okolja na analitske rezultate. Robustnost metode določamo z izvajanjem analize homogenih vzorcev pri različnih laboratorijskih pogojih, na različnih aparaturah, v različnih laboratorijih, ki pa so še vedno v okviru specificiranih pogojev za to metodo ter medsebojno primerjavo tako dobljenih rezultatov. (28)

2. Namen dela

AAS so skupina zelo pogosto zlorabljenih snovi v športu. Z razvojem analitskih tehnik za detekcijo AAS se je njihova uporaba sicer zmanjšala, vendar so še zmeraj med največkrat zlorabljenimi snovmi pri vrhunskih športnikih. Najbolj pogosto se jih poslužujejo športniki, ki se ukvarjajo s športi, v katerih pride do izraza moč (bodybuilding, dvigovanje uteži, rokoborba). Zelo pogosto pa jih zlorablajo tudi atleti ter kolesarji.

Na žalost AAS ne uprablja samo vrhunski športniki. V želji po »čim lepšem« telesu jih pogosto zlorablja tudi rekreativni uporabniki fitnesa. Ker so AAS nelegalne snovi, se je razvil črni trg za njihovo distribucijo. Obstaja pa tudi zelo veliko internetnih strani, kjer ponujajo AAS. Problem internetnih ponudnikov je ta, da največkrat ne upoštevajo pravil dobre proizvodnje prakse. Tako nikoli ne vemo, ali izdelek, ki je naprodaj na internetni strani, resnično vsebuje učinkovino, ki je deklarirana, vsebuje deklarirani odmerek in ali ne vsebuje še kakšnih nečistot. Problem interneta pa je tudi ta, da so AAS zelo lahko dostopni. Izdelke ponujene na različnih internetnih straneh lahko kupi vsak ne glede na starost in zdravstveno stanje.

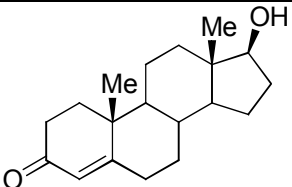
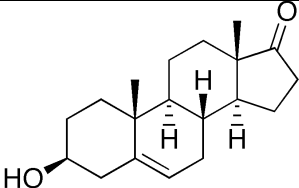
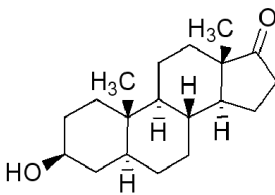
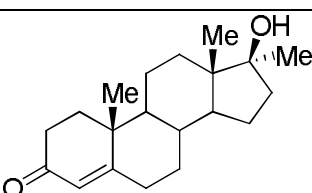
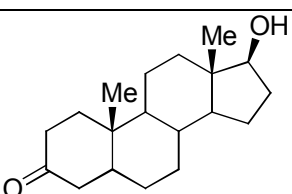
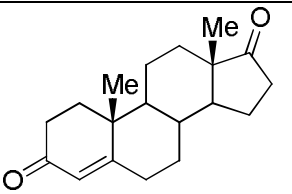
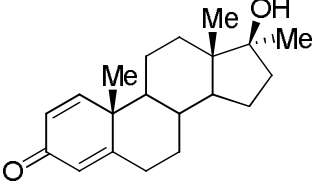
V okviru diplomske naloge bomo razvili (enostavno) HPLC metodo, ki bo omogočila identifikacijo in določitev vsebnosti nekaterih najpogostejše uporabljenih AAS. Metodo bomo validirali in z njo preverili, v kolikšni meri izdelki, ki jih na različnih internetnih straneh ponujajo kot AAS, ustrezajo deklaracijam v smislu kvalitativne in kvantitativne sestave.

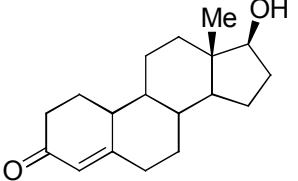
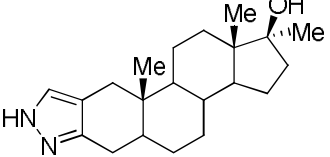
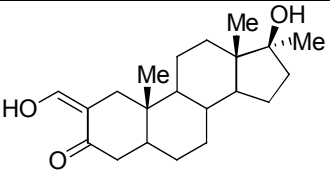
3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Standardi

Tabela I: Standardi

Št. standarda	Ime (CAS)	Priozvajalec (stopnja čistote)	MM (g/mol)	Struktura
Standard 1	Testosteron (58-22-0)	Acros Organics ($\geq 97,0\%$)	288,42	
Standard 2	Trans-dehidroepiandrosteron (DHEA) (53-43-0)	Acros Organics ($\geq 99\%$)	288,42	
Standard 3	Trans-androsteron (482-29-8)	Fluka Analytical ($\geq 97,0\%$)	290,45	
Standard 4	17 α -metiltestosteron (58-18-4)	Aldrich Chemistry ($\geq 97,0\%$)	302,45	
Standard 5	Androstanolon (521-18-6)	Fluka Analytical ($\geq 99\%$)	290,45	
Standard 6	Androsten-3,17-dion (63-05-8)	Fluka Analytical ($\geq 99,1\%$)	286,41	
Standard 7	Metandienon (63-05-8)	Aldrich Chemistry ($\geq 99\%$)	300,15	

Standard 8	Nandrolon (434-22-0)	Aldrich Chemistry ($\geq 99,0\%$)	274,4	
Standard 9	Stanozolol (10418-03-8)	TCI ($\geq 98\%$)	328,49	
Standard 10	Oksimetolon (434-07-1)	TCI ($\geq 98\%$)	332,48	

3.1.2. Topila

- bidestilirana voda: ultra čista voda pridobljena z aparatom Milli Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA) na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana
- metanol: CH₃OH, HPLC Gradient Grade, J.T. Baker
- acetonitril: CH₃CN, HPLC Gradient Grade, Fisher Scientific

3.1.3. Vzorci

Tabela II: Vzorci

Št. Vzorca	Ime izdelka	Deklarirana učinkovina	(domneven) Proizvajalec	Slika
Vzorec 1	DHEA kapsule	DHEA (100 mg)	Ultimate Nutrition	

Vzorec 2	DHEA tablete	DHEA (50 mg)	Natrol	
Vzorec 3	Formadrol Extreme kapsule	Trans-androsteron (deklaracija nejasna)	LG Sciences	
Vzorec 4	Methycaps kapsule	17 α -metiltestosteron (25 mg)	Extreme Pharmaceuticals	
Vzorec 5	Methacaps kapsule	Metandienon (10 mg)	Extreme Pharmaceuticals	
Vzorec 6	Anabol tablete	Metandienon (5 mg)	British Dispensary	

Vzorec 7	Danabol tablete	Metandienon (10 mg)	British Dispensary	
Vzorec 8	Stanocaps kapsule	Stanozolol (10 mg)	Extreme Pharmaceuticals	
Vzorec 9	Azolol tablete	Stanozolol (5 mg)	British Dispensary	
Vzorec 10	Oxycaps kapsule	Oksimetolon (25 mg)	Extreme Pharmaceuticals	
Vzorec 11	Androlic tablete	Oksimetolon (50 mg)	Body Research	

* Slike s spletne strani prodajalca (www.steroidshop.eu)

3.2. Aparature

- Aparatura za HPLC: Agilent 1100 sistem s 4-kanalno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom in MWD (Multi Wavelength Detector) detektorjem (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)
- Kolona: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 μm , 100 $\times$ 4,6 mm (Phenomenex inc., Torrance, ZDA)
- Ultrazvočna kadička: Sonis 4 (Iskra, Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- Analitska tehtnica: AG 245 (Mettler Toledo International inc., Greifensee, Švica)
- Centrifuga: Centric 150 (Tehtnica Železniki d.o.o, Železniki, Slovenija)

3.3. Metode

3.3.1. Postopki priprave raztopin standardov

3.3.1.1. Priprava raztopin posameznih standardov za identifikacijo učinkovin

Natančno zatehtamo ustrezno količino standarda, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v ustrezno volumetrično bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljeno raztopino kvantitativno redčimo do želene koncentracije s 60 % MeOH.

Standardi 1, 2, 4, 6, 7 in 8

Pripravimo raztopine standardov s koncentracijami 0,1 mg/ml v 60 % MeOH.

Standarda 3 in 5

Pripravimo raztopini standardov s koncentracijo 1 mg/ml v 60 % MeOH.

Standarda 9 in 10

Pripravimo raztopini standardov s koncentracijo 0,05 mg/ml v 60 % MeOH.

3.3.1.2. Priprava raztopin zmesi standardov za preverjanje ločljivosti

Pripravimo štiri zmesi standardov v 60 % MeOH. Koncentracije posameznih standardov so podane v tabeli III.

Tabela III: *Koncentracija standardov v zmesi*

	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)	St. 10 (mg/ml)
Zmes 1	0,1	0,1	1	0,1	1	0,1	0,1	0,1	0	0
Zmes 2	0,01	0,01	0,1	0,01	0,1	0,01	0,01	0,01	0	0
Zmes 3	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0
Zmes 4	0,1	0,1	1	0,1	1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05

3.3.1.3. Priprava raztopine standarda 2 za optimizacijo raztapljanja

Natančno zatehtamo približno 25 mg standarda 2, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v 50,0 ml bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljeno raztopino kvantitativno redčimo s 50 % MeOH do koncentracije 0,1 /ml.

3.3.1.4. Priprava raztopin standardov za test stabilnosti raztopin standardov

Preverjamo stabilnost standardov po 24 h. Po 24 urah pripravimo sveže standarde in z njimi določimo koncentracijo v raztopinah prejšnjega dne. Natančno zatehtamo ustrezno količino standarda, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v ustrezno volumetrično bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljeno raztopino kvantitativno redčimo do želene koncentracije s 60 % MeOH.

Koncentracija standardov 1, 2, 4, 6, 7 in 8 je bila 0,1 mg/ml, standardov 3 in 5 0,5 mg/ml, standardov 9 in 10 pa 0,05 mg/ml.

3.3.1.5 Priprava raztopin standardov za test linearnosti raztopin standardov**Standardi 1, 2, 4, 6, 7, 8**

Natančno zatehtamo 25 mg standarda, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v 25,0 ml bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljene raztopine kvantitativno redčimo do želene koncentracije s 60 % MeOH kot je opisano v tabeli IV.

Standarda 3 in 5

Natančno zatehtamo 125 mg standarda, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v 25,0 ml bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljene raztopine kvantitativno redčimo do zelenih koncentracij s 60 % MeOH kot je opisano v tabeli IV.

Standarda 9 in 10

Natančno zatehtamo 25 mg standarda, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v 50,0 ml bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljene raztopine kvantitativno redčimo do zelenih koncentracij s 60 % MeOH kot je opisano v tabeli IV.

Tabela IV: Redčenje osnovne raztopine za preizkus linearnosti

Raztopina	Redčenje osnovne raztopine
Linearnost 1	1 ml/20 ml
Linearnost 2	4 ml/ 50 ml
Linearnost 3	2 ml/ 20 ml
Linearnost 4	6 ml/ 50 ml
Linearnost 5	3 ml/ 20 ml

3.3.1.6. Priprava raztopin standardov za določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih

Natančno zatehtamo ustrezno količino standarda, ga s pomočjo 100 % MeOH kvantitativno prenesemo v ustrezno volumetrično bučko, dodamo cca. 3/4 volumna 100 % MeOH in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 100 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljeno raztopino kvantitativno redčimo do želene koncentracije s 60 % MeOH. Koncentracija raztopin standarda **3** je bila 0,5 mg/ml, standardov **4** in **7** 0,1 mg/ml, standardov **9** in **10** pa 0,05 mg/ml.

3.3.2. Postopki priprave raztopin vzorcev

3.3.2.1. Priprava raztopine vzorca 2 za optimizacijo raztapljanja

Stehtamo, zdrobimo in homogeniziramo 2 tableti vzorca **2**. Natančno zatehtamo 10 mg tabletnega prahu, ga s pomočjo začetnega topila prenesemo v 20,0 ml bučko, dodamo cca. 3/4 volumna začetnega topila in raztopimo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo z začetnim topilom do oznake in dobro premešamo. Tako pripravljeno raztopino s topilom za redčenje kvantitativno redčimo do koncentracije 0,1 mg/ml. Topila in čas raztapljanja v ultrazvočni kadički so navedeni v tabeli V.

Tabela V: Topila in čas raztapljanja pri pripravi raztopin vzorcev za kontrolo raztapljanja

	Začetno topilo	Topilo za redčenje	Čas raztapljanja v ultrazvočni kadički
Postopek 1	60 % MeOH	60% MeOH	10 min
Postopek 2	60 % MeOH	60% MeOH	20 min
Postopek 3	100 % MeOH	50% MeOH	20 min
Postopek 4	100 % MeOH	50% MeOH	10 min

3.3.2.2. Priprava raztopin vzorcev za identifikacijo učinkovin v vzorcih***Vzorci 1, 2, 4, 10 in 11***

Vsebino 1 kapsule vzorcev **1, 4 in 10** ter 1 tableto vzorcev **2 in 11** damo v 100,0 ml bučko, dodamo približno 90 ml 60% MeOH in 20 minut raztapljamo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 60 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Nato raztopino 5 min centrifugiramo pri 5000 obratih/ minuto. To raztopino nato redčimo 5,0 ml /50,0 ml.

Vzorci 5, 6, 7, 8 in 9

Delamo enako kot zgoraj, le da na začetku kapsule vzorca **5 in 8** ter tablete vzorca **6, 7 in 9** raztapljamo v 50,0 ml bučki namesto v 100,0 ml bučki.

Vzorec 3

Vsebino 1 kapsule vzorca **3** damo v 25,0 ml bučko, dodamo približno 20 ml 60% MeOH in 20 minut raztapljamo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 60 % MeOH do oznake in dobro premešamo. Nato raztopino 5 min centrifugiramo pri 5000 obratih/ minuto.

3.3.2.3. Priprava raztopin vzorcev za določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih***Vzorci 1, 4, 5, 8 in 10***

Stehtamo ustrezno število kapsul, jih spraznimo, speremo z MeOH, posušimo ter stehtamo. V bučko nato dodamo ustrezno količino homogenizirane vsebine kapsul in pripravimo raztopine ustreznih koncentracij v 60% MeOH. Vzorce raztapljamo 20 min s pomočjo ultrazvoka ter jih nato 5 min centrifugiramo pri 5000 obratih/min. Število uporabljenih kapsul in končne koncentracije raztopin vzorcev so podane v tabeli VI. Delamo v treh paralelah.

Tabela VI: Priprava raztopin vzorcev 1, 4, 5, 8, in 10

	Vzorec 1	Vzorec 4	Vzorec 5	Vzorec 8	Vzorec 10
Št. kapsul	3	5	6	9	8
Koncentracija raztopine	0,5 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml

Vzorci 2, 6, 7, 9 in 11

Stehtamo, zdrobimo in homogeniziramo ustrezno število tablet. V ustrezno volumetrično bučko natehtamo ustrezno količino tabletnega prahu ter dodamo 2 ml vode ter počakamo 5 min, da prah tablet nabrekne. Nato dodamo 3/4 volumna 60 % MeOH in 20 min raztapljamo s pomočjo ultrazvoka. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo s 60 % MeOH do oznake in 5 min centrifugiramo pri 5000 obratih/min. Število uporabljenih tablet in koncentracije raztopin vzorcev so podane v Tabeli VII. Delamo v treh paralelah.

Tabela VII: Priprava raztopin vzorcev 2, 6, 7, 9, in 11

	Vzorec 2	Vzorec 6	Vzorec 7	Vzorec 9	Vzorec 11
Št. tablet	3	5	5	5	2
Koncentracija raztopine	0,5 mg/ml	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml

3.3.3. Postopki priprave raztopin vzorcev z dodatkom standardov***Vzorec 1***

Pripravimo raztopino standarda **2** v 60 % MeOH s koncentracijo 1,25 mg/ml. 5,0 ml in 10,0 ml te raztopine dodamo ustrezni količini vsebine kapsul vzorca **1** in raztopino pripravimo po enakem postopku kot za določanje vsebnosti. Delamo v treh paralelah.

Vzorec 4

Pripravimo raztopino standarda **4** v 60 % MeOH s koncentracijo 1 mg/ml. 2,0 ml in 5,0 ml te raztopine dodamo ustrezni količini vsebine kapsul vzorca **4** in raztopino pripravimo po enakem postopku kot za določanje vsebnosti. Delamo v treh paralelah.

Vzorec 5

Pripravimo raztopino standarda **7** v 60 % MeOH s koncentracijo 0,5 mg/ml. 2,0 ml in 5,0 ml te raztopine dodamo ustrezni količini vsebine kapsul vzorca **5** in raztopino pripravimo po enakem postopku kot za določanje vsebnosti. Delamo v treh paralelah.

Vzorec 11

K ustrezni količini tabletnega prahu vzorca **11** dodamo približno 5 mg in 10 mg natančno natehtanega standarda **10** in raztopino pripravimo po enakem postopku kot za določanje vsebnosti. Delamo v treh paralelah.

3.3.4. HPLC metode***HPLC metoda A (izokratska)***

Kolona: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 μ m, 100 x 4,6 mm

Mobilna faza: 25 % MeOH, 25 % MeCN, 50 % H₂O

Pretok mobilne faze: 1,6 ml/min

Volumen injiciranja 20 μ l

Temperatura kolone: 30°C

Valovne dolžine detekcije: 220 nm, 242 nm, 296 nm

To metodo smo uporabili za analizo standardov **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**, in **8** ter analizo vzorcev **1, 2, 3, 4, 5, 6** in **7**.

HPLC metoda B (gradientna)

Kolona: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 μ m, 100 x 4,6 mm

Volumen injiciranja 20 μ l

Temperatura kolone: 30°C

Valovne dolžine detekcije: 220 nm, 242 nm, 296 nm

Tabela VIII: Sestava mobilne faze in pretok pri HPLC metodi B

Čas (min)	% MeOH	% MeCN	% H ₂ O	Pretok (ml/min)
0	25	25	50	1,6
6,0	25	25	50	1,6
6,5	35	35	30	1,6
15,0	35	35	30	1,6

HPLC metoda C (gradientna)

Mobilna faza MeOH in H₂O; gradient iz 40 % na 100 % MeOH v 15 min

Kolona: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 µm, 100 X 4,6 mm

Volu men injiciranja 20 µl

Temperatura kolone: 30°C

Valovne dolžine detekcije: 220 nm, 242 nm, 296 nm

HPLC metoda D (gradientna)

Mobilna faza MeCN in H₂O; gradient iz 40 % na 100 % MeCN v 15 min

Kolona: Phenomenex Kinetex C18, 2.6 µm, 100 X 4,6 mm

Volu men injiciranja 20 µl

Temperatura kolone: 30°C

Valovne dolžine detekcije: 220 nm, 242 nm, 296 nm

3.3.5. Določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih

Vsebnost učinkovin v vzorcih [mg/tableto oz. mg/kapsulo] smo izračunali s pomočjo enačb 1, 2 in 3.

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

AUC_{vz} = površina pod krivuljo raztopine vzorca [mAU]

AUC_{st} = površina pod krivuljo raztopine vzorca [mAU]

c_{st} = koncentracija standarda [mg/ml]

$\overline{m}_t$ = povprečna masa tablete oz. kapsule [mg]

m_{vz} = masa vzorca [mg]

V = volumen končne raztopine vzorca [ml]

f = faktor redčenja

$$\text{Enačba 2: } c_{st} = \frac{m_{st} \times w_{st}}{V \times f}$$

m_{st} = masa standarda [mg]

w_{st} = stopnja čistote standarda

$$\text{Enačba 3: } \% \text{ vsebnosti} = \frac{\overline{vsebnost}_{izmerjena}}{vsebnost_{deklarirana}}$$

3.3.6. Točnost metode

Točnost metode smo izračunali s pomočjo enačb 4, 5 in 6.

Enačba 4: vsebnost = $\frac{AUC_{vz} \times c_{st} \times V \times f}{AUC_{st}}$

Enačba 5: $m_{dol} = \text{vsebnost} - \frac{m_{vz} \times \overline{\text{vsebnost}_t}}{\overline{m}_t}$

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

m_{dol} = določena masa standarda

m_{dod} = masa zatehte standarda

m_{vz} = masa zatehte vzorca

Enačba 6: točnost = $\frac{m_{dol}}{m_{dod}}$

4. Rezultati in razprava

4.1. Optimizacija HPLC metode

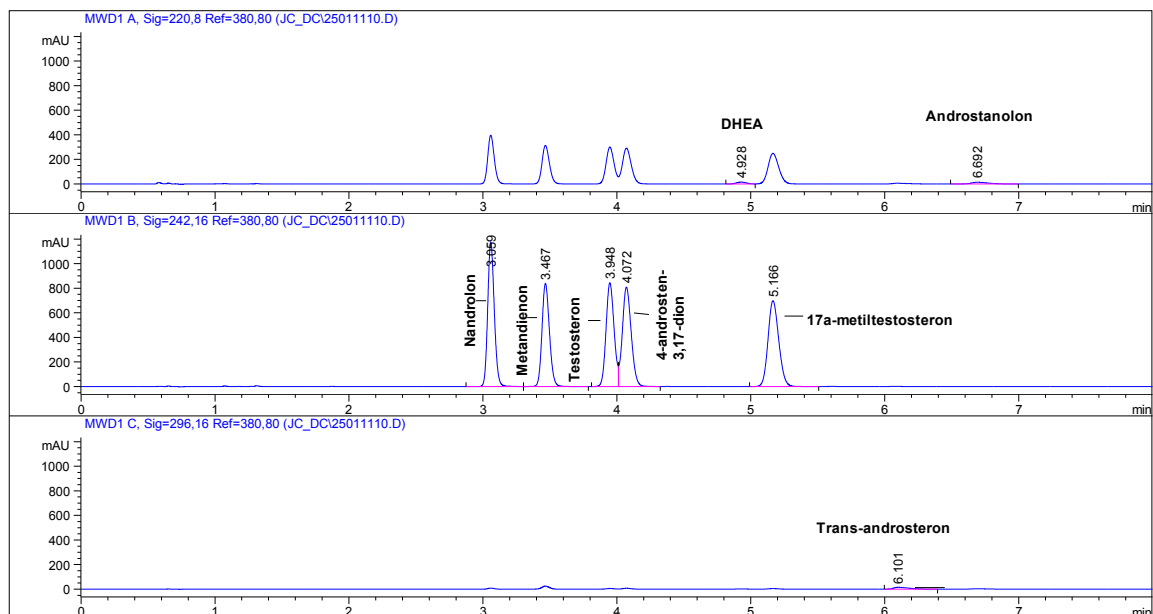
V začetnem delu eksperimentalnega dela smo imeli na voljo standarde **1-8**. Kasneje smo imeli na voljo še standarda **9** in **10**. V prvem delu našega dela smo tako preizkusili več metod, z namenom doseči čim boljšo ločljivost. Pri tem smo izhajali iz rezultatov, predhodno pridobljenih na Katedri za farmacevtsko kemijo na FFA (diplomsko delo Gregorja Novaka, rezultati še niso objavljeni). Ti rezultati kažejo, da je optimalna kombinacija za medsebojno ločbo standardov **1-8** sestava mobilne faze 25 % MeOH, 25 % MeCN in 50 % H₂O ter kolona Kinetex (Phenomenex inc.) z 2,6 µm C-18 delci.

Na začetku smo spreminjali volumen injiciranja in temperaturo kolone. Volumen injiciranja je sorazmeren s površino pod krivuljo. Število teoretskih podov in simetričnost sta nekoliko boljša pri manjših volumnih injiciranja, vendar takrat za kvantitativno analizo potrebujemo višje koncentracije analita. Na ločljivost pa volumen injiciranja ne vpliva bistveno. Pri našem delu smo uporabili relativno visoke koncentracije nekaterih spojin, saj le-te slabo absorbirajo v UV območju (standardi **2, 3** in **5**; vzorca **1** in **2**). Zaradi tega smo izbrali metodo z večjim volumnom injiciranja (20 µl).

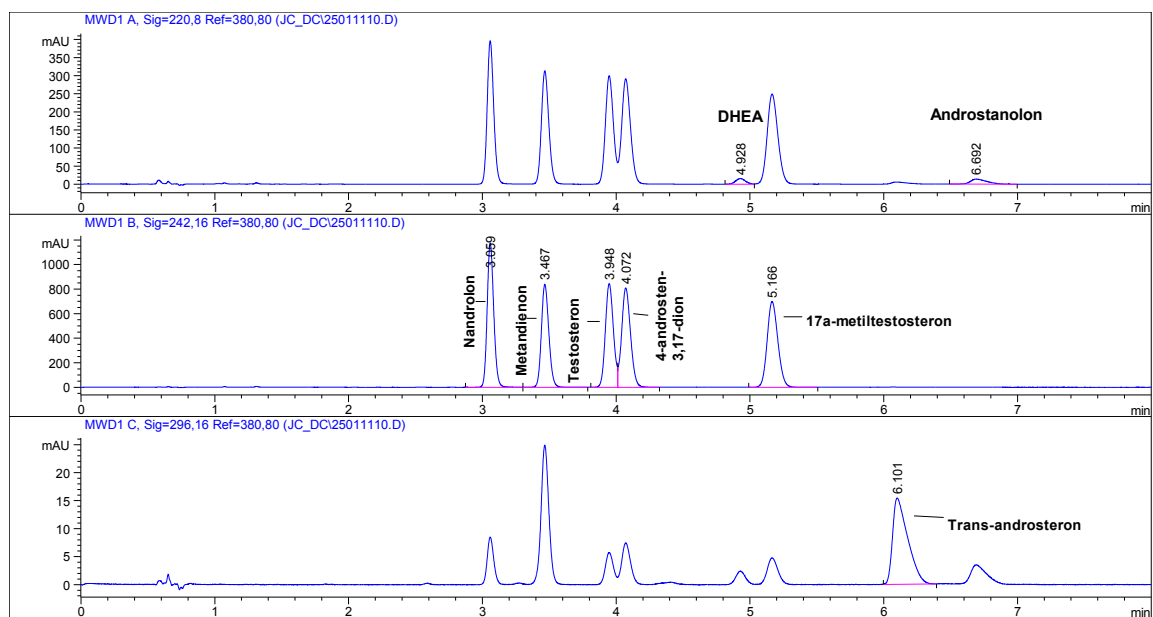
S poviševanjem temperature na koloni (do 40° C) se retencijski časi skrajšajo, zmanjša se število teoretskih podov, simetričnost je večja, ločljivost pa slabša. Zaradi slabše učinkovitosti in ločljivosti smo se odločili, da bomo vzorce analizirali z metodo, ki bo imela nižjo temperaturo na koloni (30°C).

Po teh preizkusih smo se odločili za HPLC metodo A. Na sliki 6 so prikazani kromatogrami zmesi **1** pri valovnih dolžinah 220 nm, 242 nm in 296 nm. Iz slik je razvidno, pri katerih valovnih dolžinah posamezne spojine najbolj absorbirajo. Kromatograme posameznih raztopin standardov in raztopin vzorcev smo nato snemali pri valovni dolžini, pri kateri najbolj absorbirajo.

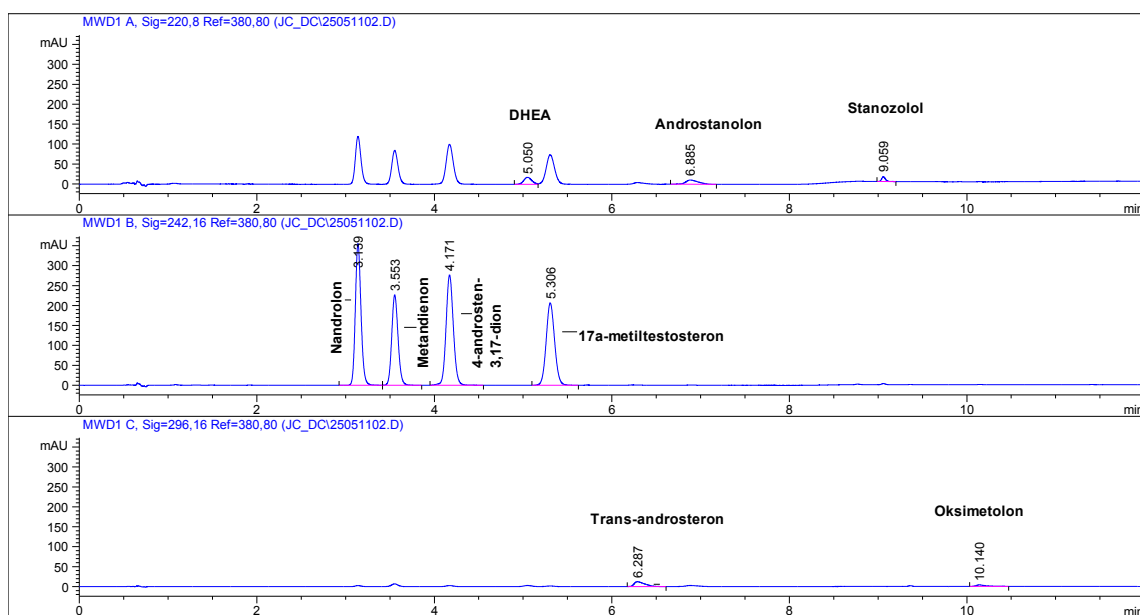
Kasneje, ko smo dobili še standarda **9** in **10** smo preizkusili še tri dodatne metode z višjim deležem organskih topil. Ker sta obe spojini izrazito bolj nepolarni kot ostale že prej uporabljene učinkovine, smo se odločili, da namesto izokratske metode uporabimo gradientno metodo, ter na ta način skrajšamo čas analize. Po preizkušanju več metod z različno sestavo mobilne faze smo se odločili za HPLC metodo B. Na sliki 7 so prikazani kromatogrami zmesi **4** pri valovnih dolžinah 220 nm, 242 nm in 296 nm



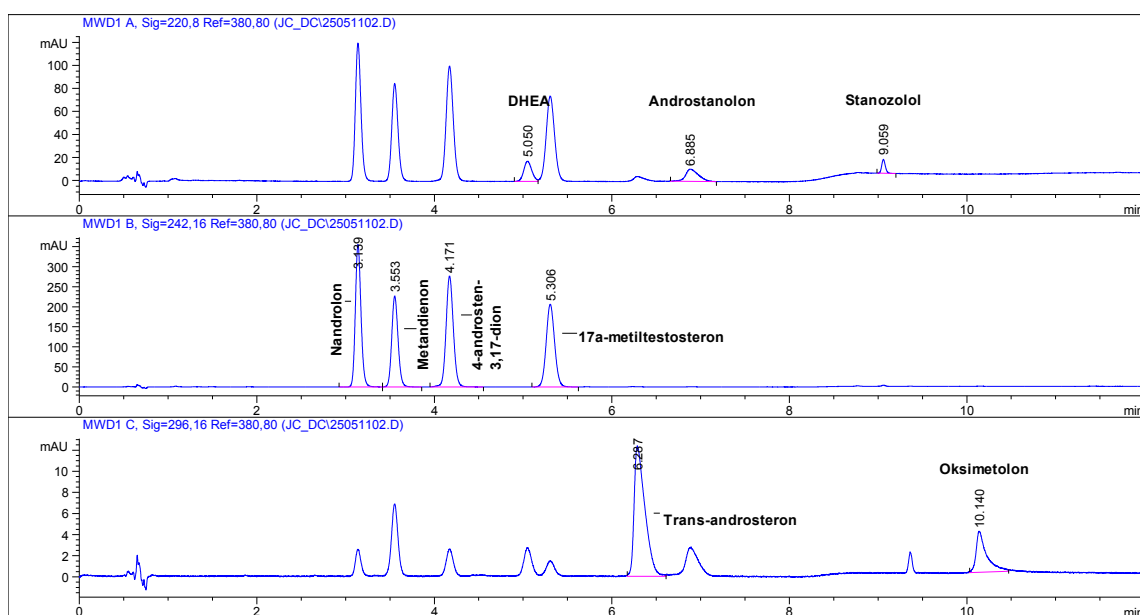
Slika 6 a: Kromatogrami zmesi **1** posneti pri 220 nm (zgoraj, 242 nm (na sredini) in 296 nm (spodaj). Vsi kromatogrami so prikazani v istem merilu.



Slika 6 b: Kromatogrami zmesi **1** posneti pri 220 nm (zgoraj, 242 nm (na sredini) in 296 nm (spodaj). Vsak kromatogram je prikazan v polni povečavi.



Slika 7 a: Kromatogrami zmesi 4 posneti pri 220 nm (zgoraj, 242 nm (na sredini) in 296 nm (spodaj). Vsi kromatogrami so prikazani v istem merilu.



Slika 7 b: Kromatogrami zmesi 4 posneti pri 220 nm (zgoraj, 242 nm (na sredini) in 296 nm (spodaj). Vsak kromatogram je prikazan v polni povečavi.

4.2. Optimizacija priprave raztopin vzorcev

Pri pripravi raztopin vzorcev se je pojavil problem raztapljanja vzorcev. Na raztopini vzorca **2** smo preizkusili vpliv topila (100% MeOH ali 60 % MeOH) in časa raztapljanja v ultrazvočni kadički na raztapljanje vzorcev. Opis postopkov je podan v tabeli V na strani 36. Vsebnost DHEA v vzorcu smo izračunali s pomočjo enačb **1** in **2**. Rezultati so podani v tabeli IX.

Tabela IX: Vsebnost DHEA v vzorcu 2

Postopek	Vsebnost (mg)
Postopek 1	45,55
Postopek 2	46,20
Postopek 3	45,09
Postopek 4	44,29

Iz rezultatov je razvidno, da je bolje, da kot topilo uporabimo 60 % MeOH in da je čas raztapljanja v ultrazvočni kadički daljši (20 min). Takšne pogoje smo uporabili pri pripravi raztopin vseh vzorcev.

4.3. Stabilnost raztopin standardov

Stabilnost raztopin standardov po 24 h pri sobni temperaturi smo dokazali za vse raztopine standardov, saj je razlika vsebnosti med začetno vrednostjo in vrednostjo po 24 h $\leq 2,0$ %. Rezultati so podani v tabeli X.

Tabela X: Stabilnost raztopin standardov po 24 urah

Standard	% učinkovine v raztopini standarda relativno glede na začetno vrednost (t=0h)	% učinkovine v raztopini standarda relativno glede na začetno vrednost (t=24h)	razlika med začetno in končno vrednostjo (%)
Standard 1	100,0	98,66	1,34
Standard 2	100,0	98,45	1,55
Standard 3	100,0	101,27	1,27
Standard 4	100,0	100,56	0,56
Standard 5	100,0	98,51	1,49
Standard 6	100,0	100,35	0,35
Standard 7	100,0	101,39	1,39
Standard 8	100,0	101,99	1,99
Standard 9	100,0	101,99	1,99
Standard 10	100,0	101,30	1,30

4.4. Linearnost

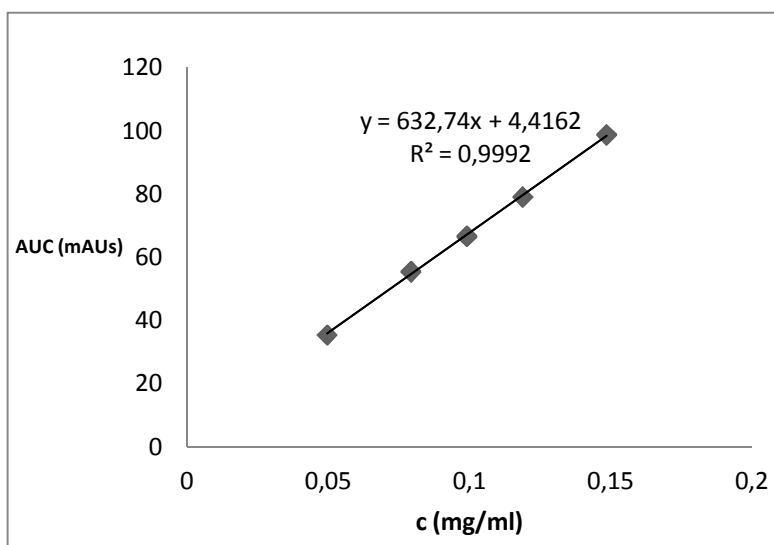
Preverjali smo odvisnost površine pod krivuljo (AUC) od koncentracije. Preizkus smo naredili s petimi standardnimi raztopinami v območju med 50 % in 150 % delovne koncentracije.

Raztopina standarda 2

Delovna koncentracija = 0,1 mg/ ml.

Tabela XI: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 2

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0495	35,390
0,0495	35,408
0,0792	55,650
0,0792	55,468
0,0792	55,173
0,0990	66,732
0,0990	66,436
0,0990	66,550
0,1188	79,173
0,1188	78,885
0,1188	79,076
0,1485	98,884
0,1485	98,590
0,1485	98,717



Slika 8: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 2

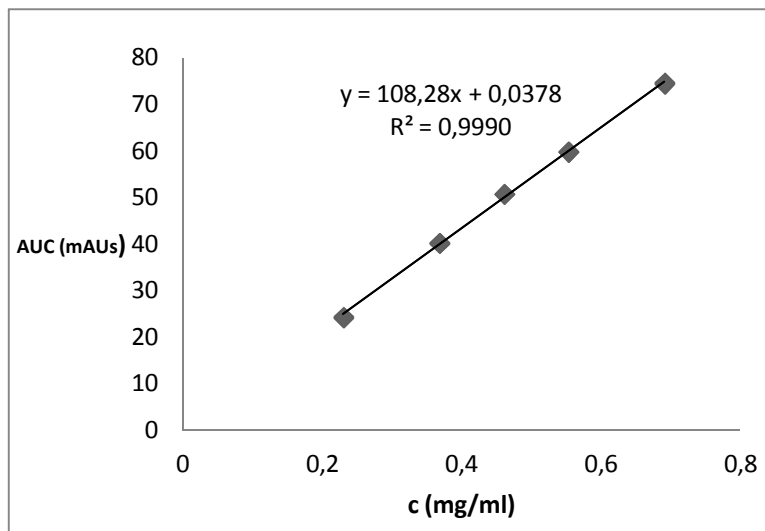
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0495 mg/ml do 0,1485 mg/ml (49,5 do 148,5 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti DHEA v vzorcih.

Raztopina standarda 3

Delovna koncentracija = 0,5 mg/ ml.

Tabela XII: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 3

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,230	24,077
0,230	24,294
0,368	40,116
0,368	40,120
0,368	40,196
0,461	50,746
0,461	50,624
0,461	50,702
0,553	59,700
0,553	59,806
0,553	59,792
0,691	74,319
0,691	74,671
0,691	74,561



Slika 9: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 3

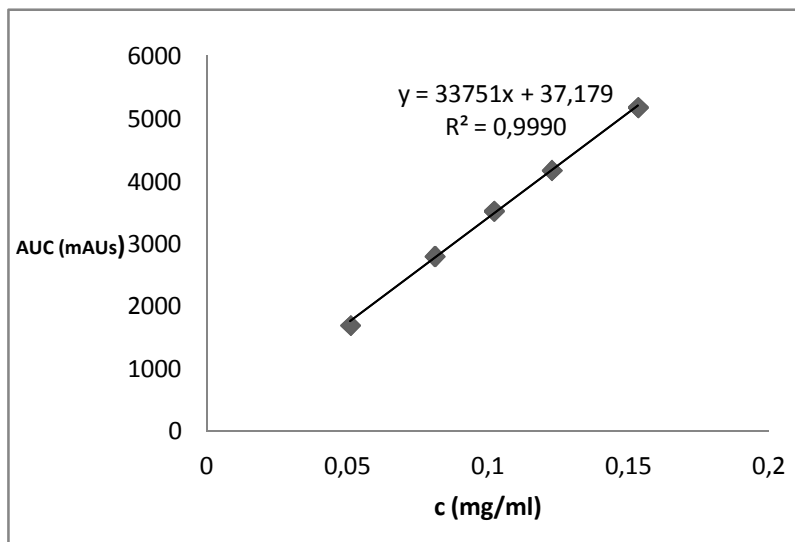
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,230 mg/ml do 0,691 mg/ml (46,0 do 138,2 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti trans-androsterona v vzorcih.

Raztopina standarda 4

Delovna koncentracija = 0,1 mg/ ml.

Tabela XIII: Podatki za preizkus
linearnosti raztopine standarda 4

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0511	1701,372
0,0511	1698,948
0,0811	2802,028
0,0811	2809,395
0,0811	2799,10
0,1022	3524,707
0,1022	3531,972
0,1022	3524,561
0,1227	4184,548
0,1227	4175,316
0,1227	4177,781
0,1534	5182,435
0,1534	5189,732
0,1534	5183,649



Slika 10: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 4

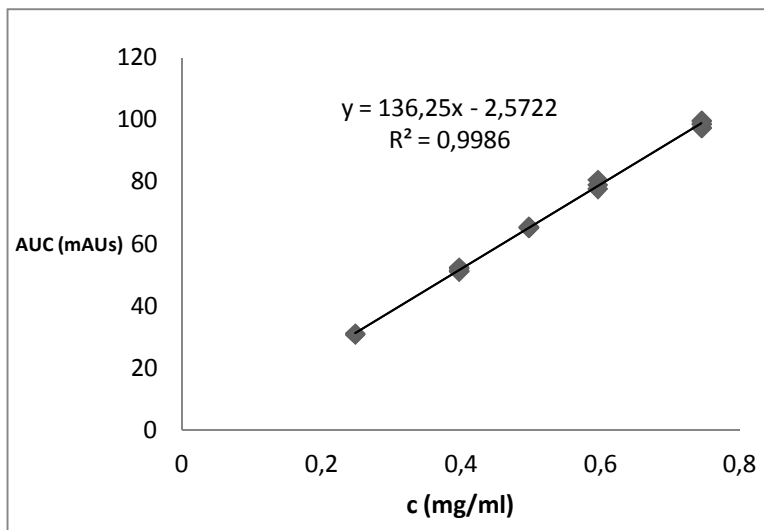
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0511 mg/ml do 0,1534 mg/ml (51,1 do 153,4 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti 17 α -metiltestosterona v vzorcih.

Raztopina standarda 5

Delovna koncentracija = 0,5 mg/ ml

Tabela XIV: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 5

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,248	30,978
0,248	30,735
0,397	51,056
0,397	51,359
0,397	52,249
0,497	65,333
0,497	65,433
0,497	65,132
0,596	78,989
0,596	80,568
0,596	77,685
0,745	99,63
0,745	97,32
0,745	98,624



Slika 11: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 5

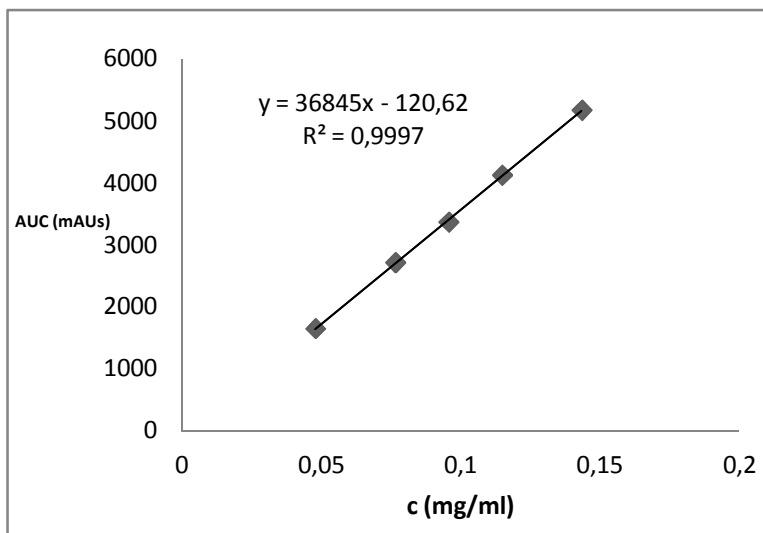
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,248 mg/ml do 0,745 mg/ml (49,6 do 149,0 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti androstanolona v vzorcih.

Raztopina standarda 6

Delovna koncentracija = 0,1 mg/ ml.

Tabela XV: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 6

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0478	1648,897
0,0478	1647,278
0,0765	2713,794
0,0765	2714,617
0,0765	2709,656
0,0956	3367,009
0,0956	3364,207
0,0956	3362,087
0,1148	4128,527
0,1148	4119,180
0,1148	4114,125
0,1434	5175,712
0,1434	5161,610
0,1434	5170,463



Slika 12: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 6

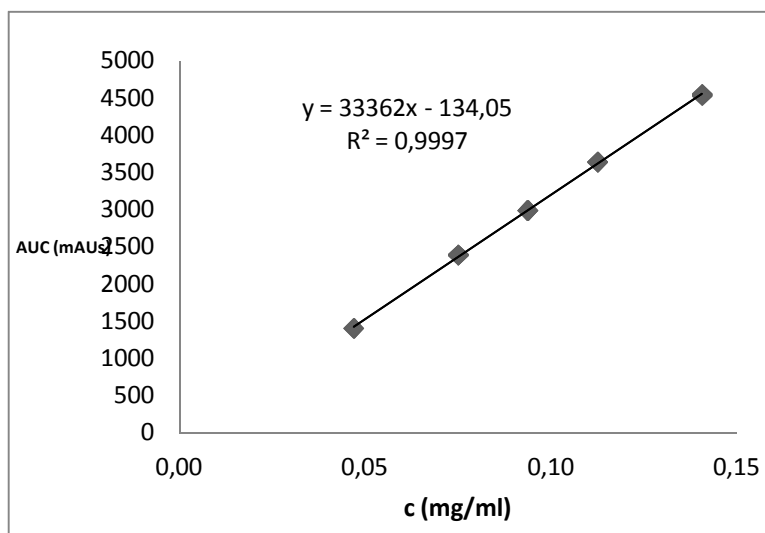
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0478 mg/ml do 0,1434 mg/ml (47,8 do 143,4,0 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti androsten-3,17-diona v vzorcih.

Raztopina standarda 7

Delovna koncentracija = 0,1 mg/ ml.

Tabela XVI: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 7

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0469	1403,479
0,0469	1404,185
0,0750	2388,463
0,0750	2390,649
0,0750	2388,933
0,0937	2988,083
0,0937	2987,439
0,0937	2985,510
0,1125	3640,304
0,1125	3635,031
0,1125	3636,977
0,1406	4545,538
0,1406	4546,251
0,1406	4528,163



Slika 13: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 7

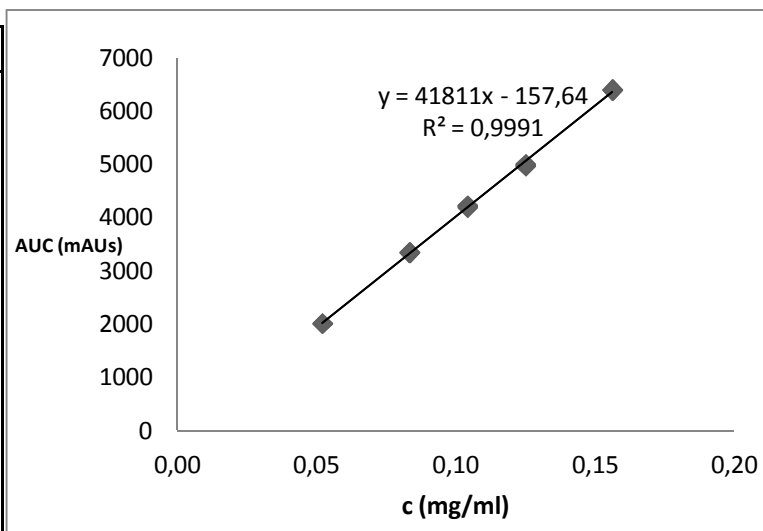
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0469 mg/ml do 0,1406 mg/ml (46,9 do 140,6 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti metandienona v vzorcih.

Raztopina standarda 8

Delovna koncentracija = 0,1 mg/ ml.

Tabela XVII: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 8

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0520	2011,972
0,0520	2011,306
0,0833	3350,432
0,0833	3349,775
0,0833	3344,439
0,1041	4229,16
0,1041	4220,116
0,1041	4193,01
0,1249	4975,011
0,1249	4984,781
0,1249	5009,664
0,1561	6417,07
0,1561	6401,225
0,1561	6396,384



Slika 14: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 8

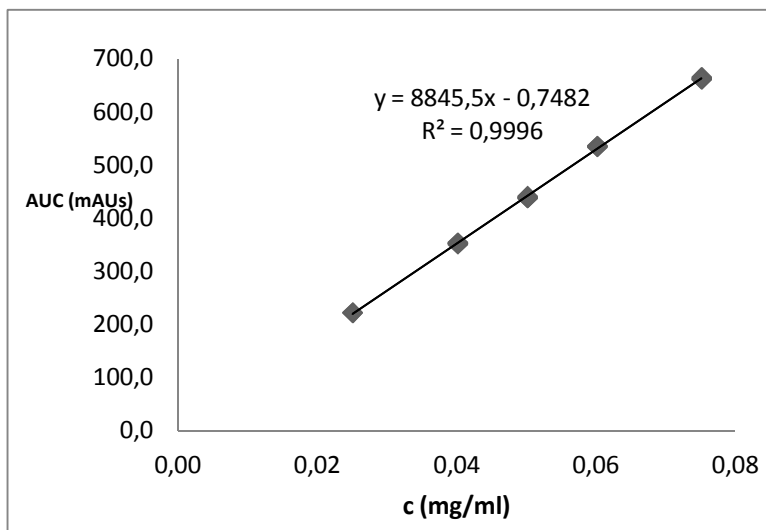
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0520 mg/ml do 0,1561 mg/ml (52,0 do 156,1 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti nandrolona v vzorcih.

Raztopina standarda 9

Delovna koncentracija = 0,05 mg/ ml.

Tabela XVIII: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 9

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0250	221,888
0,0250	222,370
0,0401	353,743
0,0401	353,241
0,0401	351,297
0,0501	441,422
0,0501	437,899
0,0501	438,742
0,0601	535,623
0,0601	534,710
0,0601	534,320
0,0751	664,917
0,0751	661,909
0,0751	661,061



Slika 15: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 9

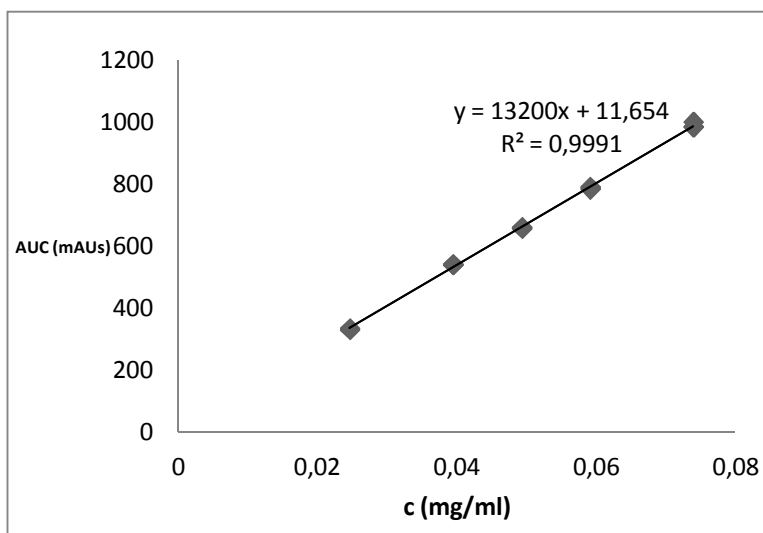
Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0250 mg/ml do 0,0751 mg/ml (50,0 do 150,2 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti stanazolola v vzorcih.

Raztopina standarda 10

Delovna koncentracija = 0,05 mg/ ml.

Tabela XIX: Podatki za preizkus linearnosti raztopine standarda 10

c[mg/ml]	AUC[mAUs]
0,0246	334,262
0,0246	330,059
0,0394	540,716
0,0394	539,488
0,0394	540,173
0,0493	660,842
0,0493	660,055
0,0493	656,392
0,0591	788,187
0,0591	790,352
0,0591	782,853
0,0739	985,658
0,0739	983,194
0,0739	999,801



Slika 16: Grafični prikaz linearnosti za raztopino standarda 10

Korelacijski koeficient je $\geq 0,99$. Dokazali smo linearnost v koncentracijskem območju od 0,0246 mg/ml do 0,0739 mg/ml (49,2 do 147,8 % delovne koncentracije). Metoda je linearna in primerna za določanje vsebnosti oksimetolona v vzorcih.

4.5. Identifikacija učinkovin v vzorcih

Na internetnih straneh smo iskali izdelke, ki imajo deklarirane AAS. Na mnogih straneh ponujajo tovrstne izdelke, vendar je velikokrat težko prepoznati, katero učinkovino vsebujejo, saj so imena AAS »zamaskirana«. Naročili smo enajst izdelkov, ki naj bi vsebovali AAS. Vzorci 1, 2 in 3 so prispeli v embalaži, kakršna je prikazana na internetnih straneh. Na vseh je bila označeno ime pripravka ter vsebinska sestava in ime učinkovine, imena pomožnih snovi, proizvajalec, datum proizvodnje in rok uporabnosti. Podatki so se ujemali s tistimi na internetnih straneh v primeru vzorcev 1 in 2. Za vzorec 3 je bilo na internetni strani www.proteini.si navedeno, da naj bi vseboval trans-androsteron. Izdelek je prispel v embalaži, katere slika je objavljena na omenjeni strani in je imel deklaracijo, na kateri pa ni bilo navedeno, da vsebuje trans-androsteron.

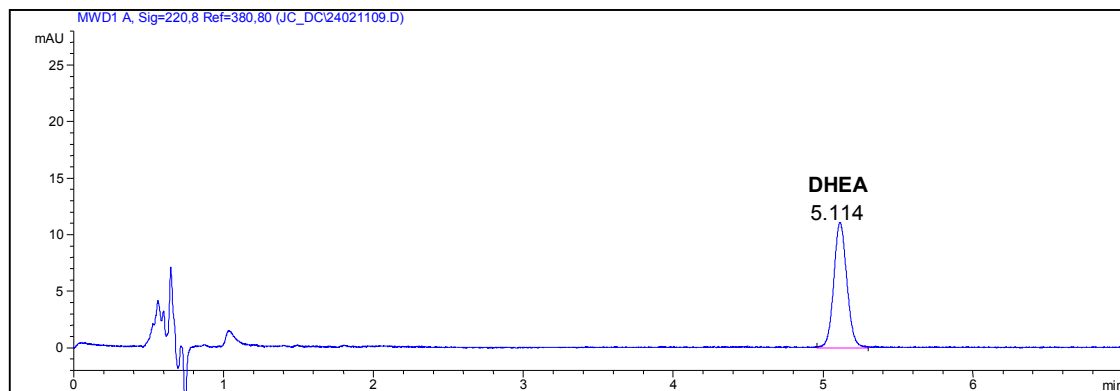
Vzorci **4, 5, 6, 7, 8, 9, 10** in **11** smo naročili na internetni strani www.steroidshop.eu. Izdelki niso prispeli v embalaži, kakršna je objavljena na omenjeni strani. Tam je bilo mogoče naročiti poljubno število tablet oz. kapsul. Na internetni strani je bila poleg imena izdelka in učinkovine, ki naj bi jo izdelek vseboval, objavljena tudi slika pripravka v embalaži. Kljub temu smo vzorce prejeli v plastičnih vrečkah, na katerih je bilo navedeno ime vzorca, število kapsul oz. tablet ter rok uporabe. Nismo pa prejeli nobene deklaracije z imenom in količinsko sestavo učinkovin in pomožnih snovi. Prav tako ni bil nikjer naveden proizvajalec in datum proizvodnje.

Tablete so bile živih barv (rumene, modre, roza, vijolične in zelene) ter različnih oblik (krogci, trikotnički, srčki), nekatere so imele na hrbtni strani motiv morskega konjička. Iz tega lahko sklepamo, da naročeni tablete niso bile proizvedene v farmacevtskem podjetju, ampak jih je nekdo naredil na »domači« tabletirki. Tablete so močno spominjale na tablete, ki jih najdemo na brošurah, ki opozarjajo na prepovedane droge (npr. ecstasy). Kapsule vseh vzorcev so bile na videz enake (želatinske kapsule- en del je bil moder, drugi bel). Na škatli, v kateri so naši vzorci prispeli, pa je bil kot pošiljatelj naveden neki moški iz Bratislave in ne farmacevtsko podjetje ali ime internetne strani, kjer smo vzorce naročili. Iz vsega tega lahko sklepamo na to, da izdelki, naročeni na tej internetni strani niso proizvedeni v skladu z GMP in da ni nujno, da vsebujejo deklarirane učinkovine v ustreznih odmerkih.

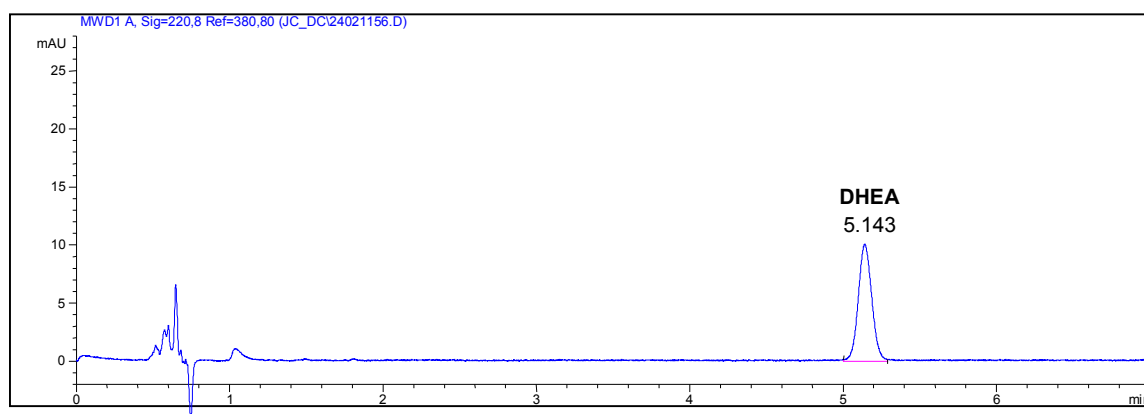
Najprej smo s pomočjo HPLC-ja izvedli identifikacijo učinkovin v vzorcih. Posneli smo kromatograme raztopin standardov deklariranih učinkovin, nato pa še kromatograme raztopin vzorcev ter jih primerjali. Identifikacijo učinkovin v vzorcih **1, 2, 3, 4, 5, 6** in **7** smo izvedli s pomočjo HPLC metode **A**, v vzorcih **8, 9, 10** in **11** s pomočjo HPLC metode **B**, identifikacijo učinkovine v vzorcu **3** pa smo izvedli s pomočjo HPLC metod **B, C** in **D**.

DHEA

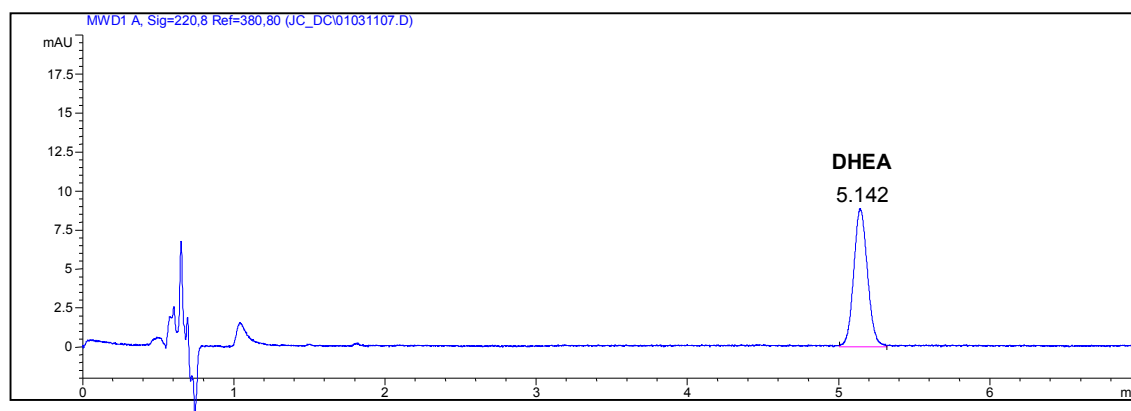
DHEA naj bi vsebovala vzorca **1** in **2**. To smo potrdili s HPLC metodo **A**. (slika 17)



Slika 17 a: Kromatogram raztopine standarda 2 ($c=0,1$ mg/ml)



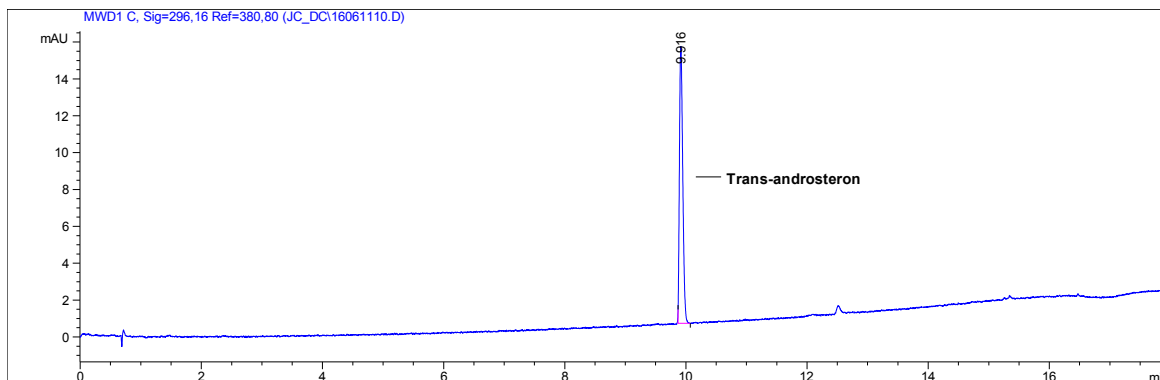
Slika 17 b: Kromatogram raztopine vzorca 1 ($c=0,1$ mg/ml)



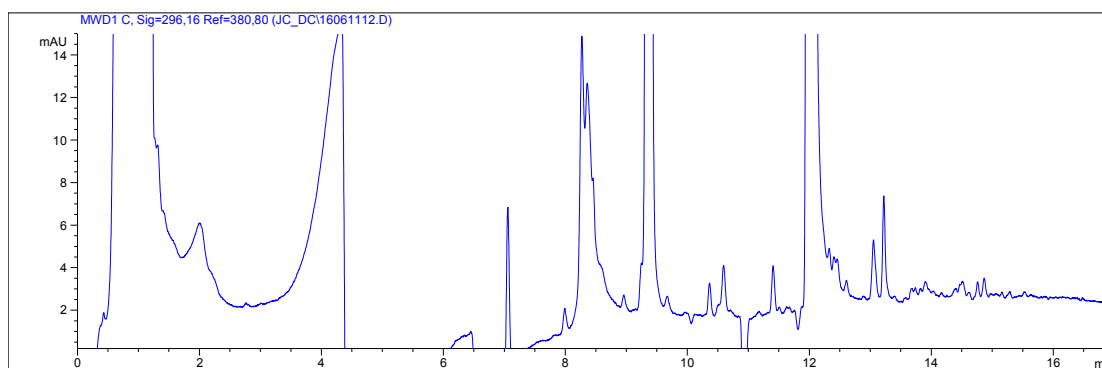
Slika 17 c: Kromatogram raztopine vzorca 2 ($c=0,1$ mg/ml)

Trans-androsteron

Na internetni strani (www.proteini.si) je bilo navedeno, da vzorec **3** vsebuje trans-androsteron. Ko smo prejeli naročene kapsule, na deklaraciji ni bilo navedeno, da izdelek vsebuje to učinkovino. Najprej smo posneli kromatogram raztopine standarda **3** in raztopine vzorca **3** s pomočjo HPLC metode **B**. Vzorec **3** vsebuje rastlinske ekstrakte in na kromatogramu raztopine vzorca **3** je bilo prisotno veliko število kromatografskih vrhov, kar je oteževalo samo identifikacijo učinkovine v vzorcu. S pomočjo HPLC metode **B** nismo mogli nedvoumno potrditi, da vzorec vsebuje trans-androsteron, zato smo raztopino vzorca analizirali še s pomočjo HPLC metod **C** in **D**. S pomočjo HPLC metode **C** smo nedvoumno dokazali, da vzorec ne vsebuje trans-androsterona. (slika 18)



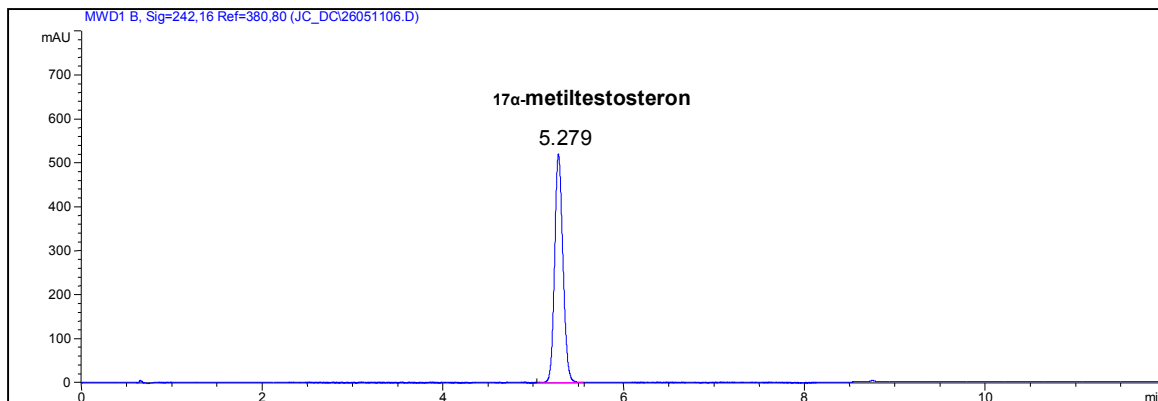
Slika 18 a: Kromatogram raztopine standarda **3** ($c=0,1$ mg/ml) (HPLC metoda **C**)



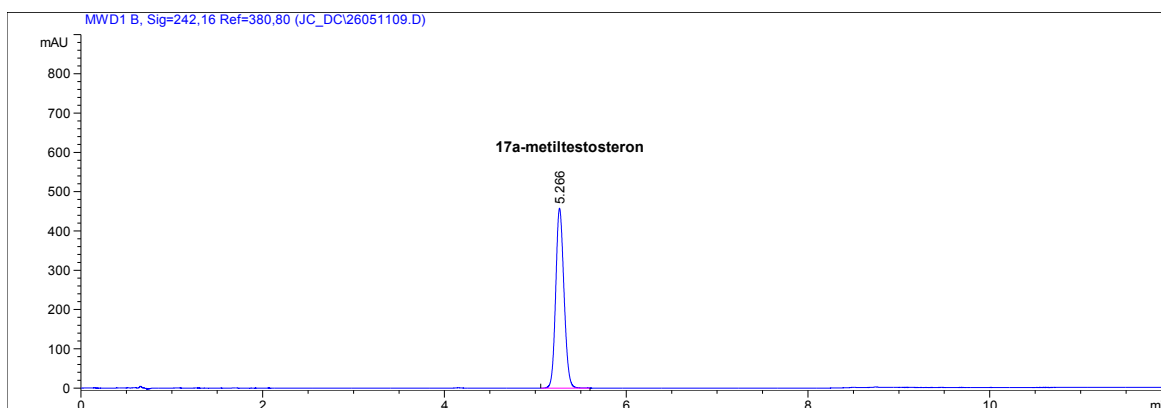
Slika 18 b : Kromatogram raztopine vzorca **3** (HPLC metoda **C**)

17 α -metiltestosteron

17 α -metiltestosteron naj bi vseboval vzorec **4**. To smo s HPLC metodo **A** tudi potrdili. (slika 19)



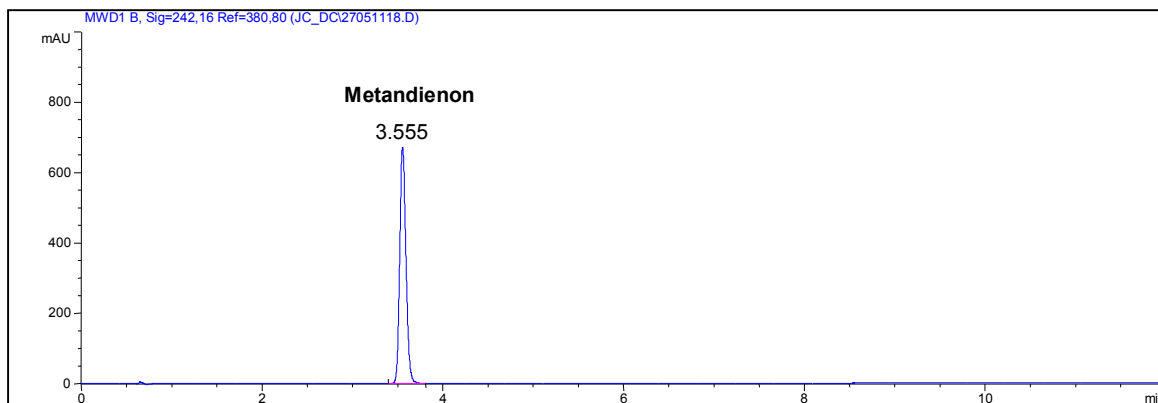
Slika 19 a: Kromatogram raztopine standarda **4** ($c=0,1\text{ mg/ml}$)



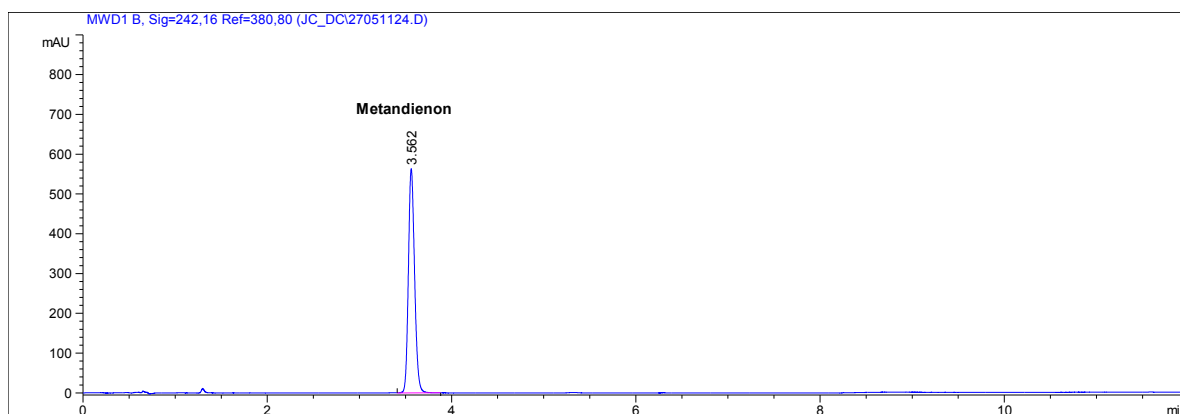
Slika 19 b: Kromatogram raztopine vzorca **4** ($c=0,1\text{ mg/ml}$)

Metandienon

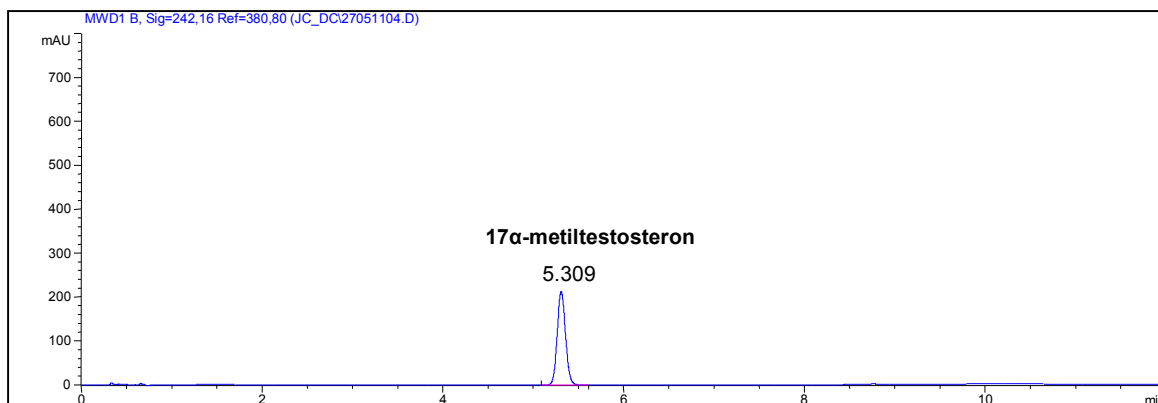
Metandienon naj bi vsebovali vzorci **5**, **6** in **7**. Z našo metodo smo potrdili, da vzorec **5** vsebuje metandienon, vzorca **6** in **7** pa ne. Dokazali smo, da tablete vzorcev **6** in **7** vsebujejo 17α -metiltestosteron. (slika 20)



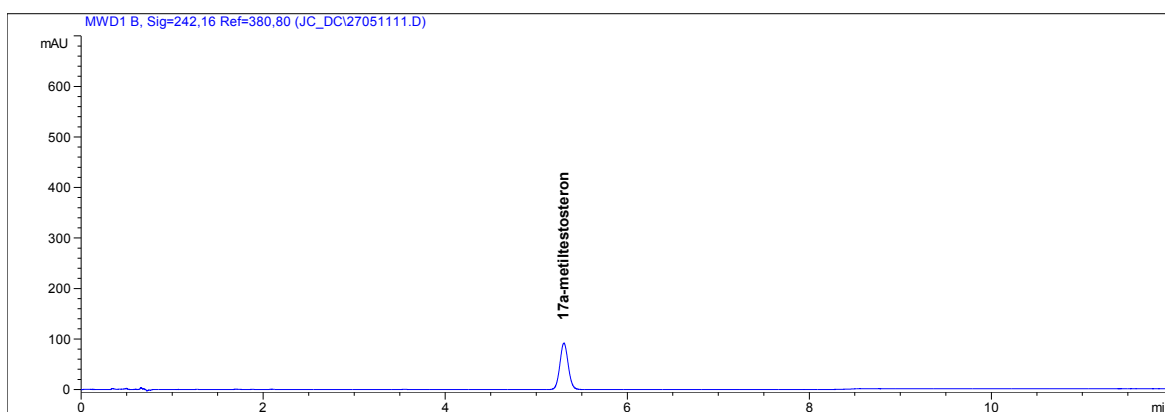
Slika 20 a: Kromatogram raztopine standarda **7** ($c=0,1$ mg/ml)



Slika 20 b : Kromatogram raztopine vzorca **5** ($c=0,1$ mg/ml)



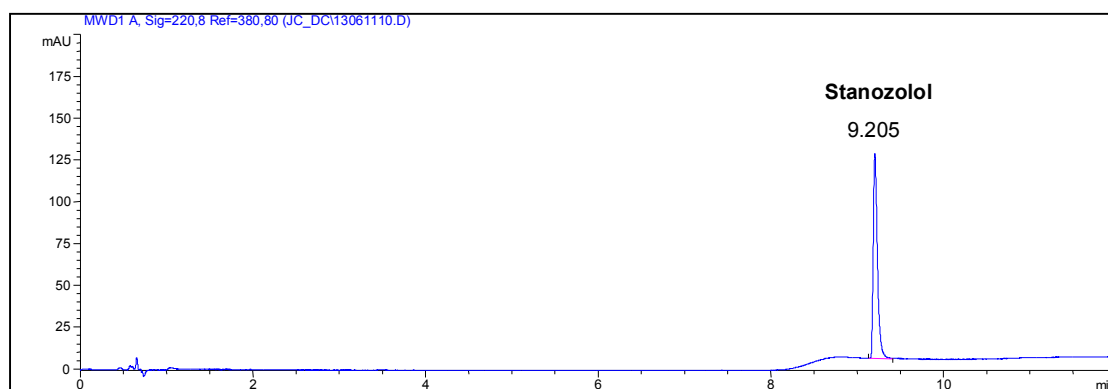
Slika 20 c: Kromatogram raztopine vzorca **6** ($c=0,1$ mg/ml)



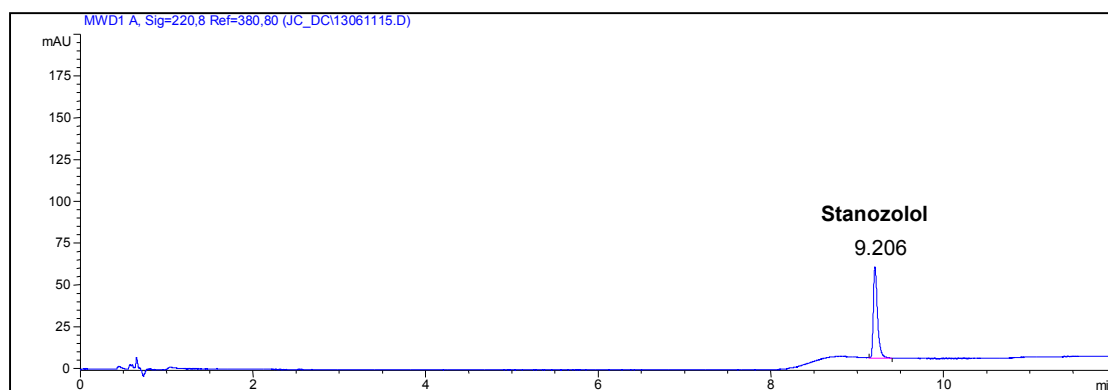
Slika 20 d: Kromatogram raztopine vzorca 7 ($c=0,1$ mg/ml)

Stanozolol

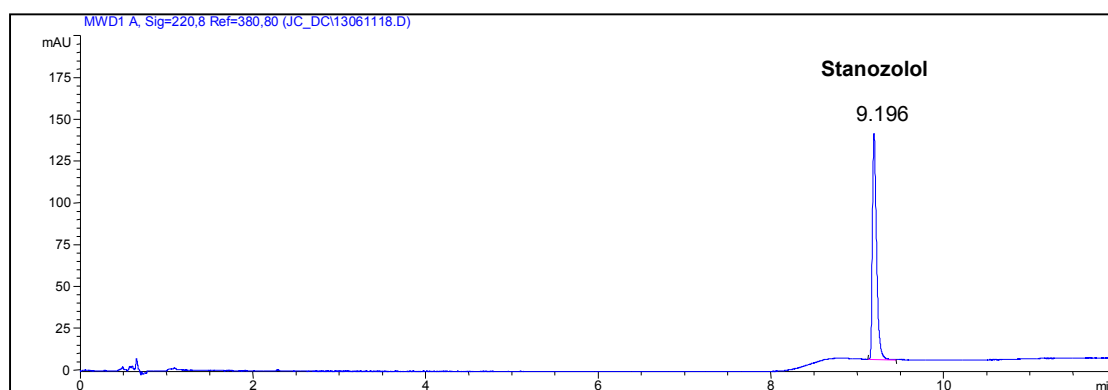
Stanozolol naj bi vsebovala vzorca 8 in 9. To smo potrdili s HPLC metodo B. (slika 21)



Slika 21 a: Kromatogram raztopine standarda 9 ($c=0,05$ mg/ml)



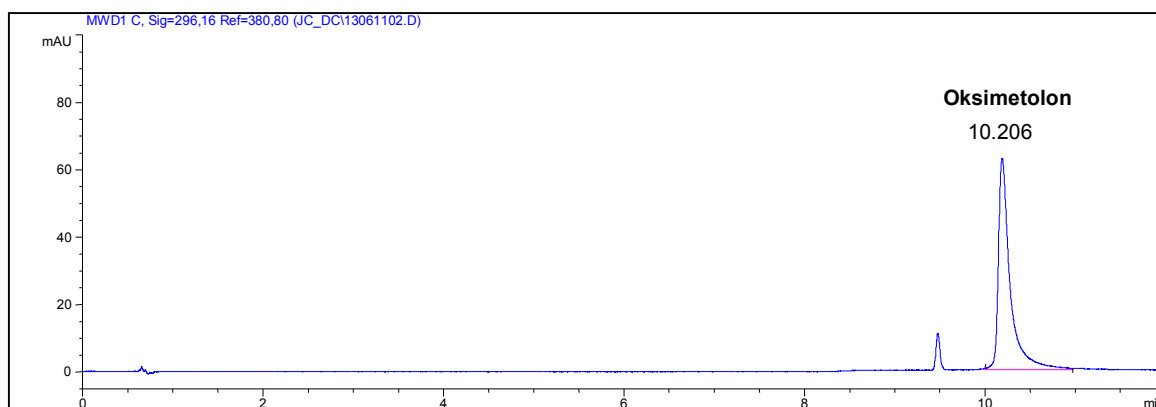
Slika 21 b: Kromatogram raztopine vzorca 8 ($c = 0,05$ mg/ml)



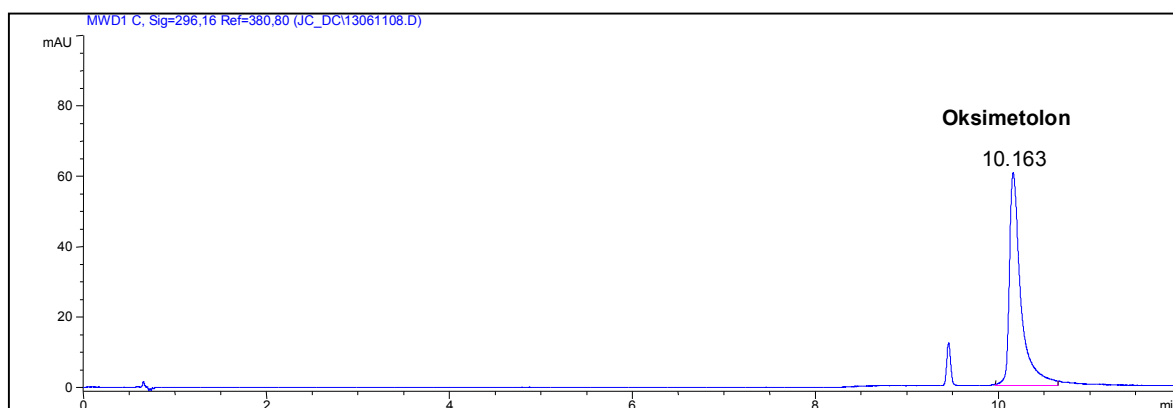
***Slika 21 c:** Kromatogram raztopine vzorca **9** ($c=0,05$ mg/ml)*

Oksimetolon

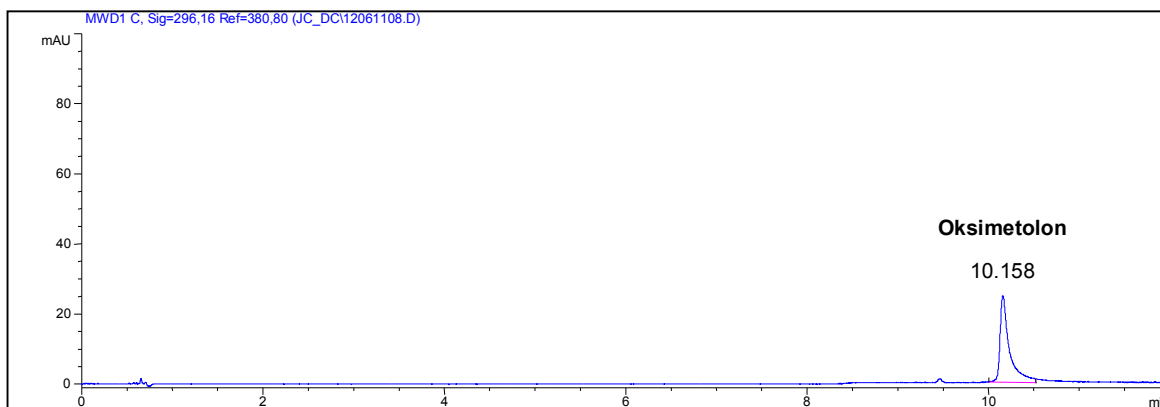
Oksimetolon naj bi vsebovala vzorca **10** in **11**. To smo potrdili s HPLC metodo **B**. (slika 22)



***Slika 22 a:** Kromatogram raztopine standarda **10** ($c=0,05$ mg/ml)*



***Slika 22 b:** Kromatogram raztopine vzorca **10** ($c=0,05$ mg/ml)*



Slika 22 c: Kromatogram raztopine vzorca **11** ($c = 0,05$ g/ml)

4.6. Določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih in ponovljivost metode

Vzorec 1

Pripravili smo 3 raztopine vzorca **1** z delovno koncentracijo 0,1 mg/ml in jih injicirali trikrat zapored. S pomočjo HPLC metode **A** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost DHEA v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode. S pomočjo *Enačbe 3* smo izračunali % vsebnosti DHEA v vzorcu **1** glede na deklarirano vsebnost.

Tabela XX: Vzorec **1**- vsebnost DHEA in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
1 a	87,54
1 b	90,79
1	89,26
$\overline{\text{vsebnost}}$	89,20
s	1,626
RSD %	1,823
% vsebnosti	89,20

Ponovljivost metode je ustrezna ($\text{RSD} \leq 2\%$). Vsebnost DHEA ni ustrezna ($< 95,0\%$).

Vzorec 2

Pripravili smo 2 raztopini vzorca **2** z delovno koncentracijo 0,1 mg/ml in ju injicirali dvakrat zapored. S pomočjo HPLC metode **A** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost DHEA v vzorcu. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti DHEA v vzorcu **2** glede na deklarirano vsebnost.

Tabela XXI: Vzorec 2-vsebnost DHEA

Vzorec	Vsebnost (mg)
2 a	47,81
2 b	44,59
$\overline{\text{vsebnost}}$	46,20
% vsebnosti	92,40

Vsebnost DHEA ni ustrezna ($\leq 95,0 \%$).

Vzorec 4

Pripravili smo 3 raztopine vzorca **4** z delovno koncentracijo 0,1 mg/ml in jih injicirali trikrat zapored. S pomočjo HPLC metode **A** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost 17α -metiltestosterona v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti 17α -metiltestosterona v vzorcu **4** glede na deklarirano vsebnost.

Tabela XXI: Vzorec 4-vsebnost 17α -metiltestosterona in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
4 a	21,15
4 b	23,59
4 c	22,34
$\overline{\text{vsebnost}}$	22,36
s	1,220
RSD %	5,457
% vsebnosti	89,44

Ponovljivost metode ni ustrezna ($\text{RSD} \geq 2 \%$). Vsebnost 17α -metiltestosterona ni ustrezna ($< 95,0 \%$).

Vzorec 5

Pripravili smo 3 raztopine vzorca **5** z delovno koncentracijo 0,1 mg/ml in jih injicirali trikrat zapored. S pomočjo HPLC metode **A** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost metandienona v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti metandienona v vzorcu **5** glede na deklarirano vsebnost.

Tabela XXII: Vzorec 5 - vsebnost metandienona in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
5 a	8,24
5 b	9,68
5 c	8,63
$\overline{\text{vsebnost}}$	8,85
s	0,745
RSD %	8,42
% vsebnosti	88,50

Ponovljivost metode ni zadostna ($\text{RSD} > 2 \%$). Vsebnost metandienona ni ustrezna ($< 95,0 \%$).

Vzorec 6

Pripravili smo 3 raztopine vzorca 6 z delovno koncentracijo 0,1 mg/ml in jih injicirali trikrat zapored. S pomočjo HPLC metode A ter enačbe 1 in enačbe 2 smo določili vsebnost 17 α -metiltestosterona v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode.

Tabela XXIII: Vzorec 6 - vsebnost 17 α -metiltestosterona in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
6 a	1,92
6 b	1,94
6 c	1,88
$\overline{\text{vsebnost}}$	1,91
s	0,031
RSD %	1,60

Ponovljivost metode je ustrezna ($\text{RSD} \leq 2 \%$). Vzorec ne vsebuje deklarirane učinkovine (metandienona), temveč 17 α -metiltestosteron.

Vzorec 7

Pripravili smo 3 raztopine vzorca **7** z delovno koncentracijo 0,1 mg/ml in jih injicirali trikrat zapored. S pomočjo HPLC metode **A** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost 17 α -metiltestosterona v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode.

Tabela XXIV: Vzorec 7 - vsebnost 17 α -metiltestosterona in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
1	1,68
2	1,65
3	1,69
$\overline{\text{vsebnost}}$	1,67
s	0,021
RSD %	1,24

Ponovljivost metode je ustrezna ($\text{RSD} \leq 2 \%$). Vzorec ne vsebuje deklarirane učinkovine (metandienona), temveč 17 α -metiltestosteron.

Vzorec 8

Pripravili smo raztopino vzorca **8** z delovno koncentracijo 0,05 mg/ml in jo injicirali dvakrat zapored. S pomočjo HPLC metode **B** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost stanozolola v vzorcu. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti stanozolola v vzorcu **8** glede na deklarirano vsebnost.

Vsebnost = 8,35 mg

% vsebnosti = 83,50 %

Vsebnost stanozolola ni ustrezna ($< 95 \%$).

Vzorec 9

Pripravili smo 3 raztopine vzorca **9** z delovno koncentracijo 0,05 mg/ml in jih injicirali dvakrat zapored. S pomočjo HPLC metode **B** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost stanozolola v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti stanozolola v vzorcu **9** glede na deklarirano vsebnost.

Tabela XXV: Vzorec 9 - vsebnost stanazolola in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
1	5,26
2	5,29
3	5,11
$\overline{\text{vsebnost}}$	5,22
s	0,096
RSD %	1,85
% vsebnosti	104,40

Ponovljivost metode je ustrezna ($\text{RSD} \leq 2 \%$). Vsebnost stanazolola je ustrezna (med 95,0 % in 105,0 %).

Vzorec 10

Pripravili smo raztopino vzorca **10** z delovno koncentracijo 0,05 mg/ml in jo injicirali dvakrat zapored. S pomočjo HPLC metode **B** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost oksimetolona v vzorcu. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti oksimetolona v vzorcu **10** glede na deklarirano vsebnost.

Vsebnost=21,85 mg

% vsebnosti=87,40

Vsebnost oksimetolona ni ustrezna ($< 95 \%$).

Vzorec 11

Pripravili smo 3 raztopine vzorca **11** z delovno koncentracijo 0,05 mg/ml in jih injicirali dvakrat zapored. S pomočjo HPLC metode **B** ter enačbe **1** in enačbe **2** smo določili vsebnost oksimetolona v vzorcu. Izračunali smo tudi RSD, ki je merilo ponovljivosti metode. S pomočjo enačbe **3** smo izračunali % vsebnosti oksimetolona v vzorcu **11** glede na deklarirano vsebnost.

Tabela XXVI: Vzorec 1- vsebnost oksimetolona in ponovljivost metode

Vzorec	Vsebnost (mg)
1	15,47
2	15,31
3	15,40
$\overline{\text{vsebnost}}$	15,40
s	0,0800
RSD %	0,521
% vsebnosti	30,79

Ponovljivost metode je ustrezna ($\text{RSD} \leq 2 \%$). Vsebnost oksimetolona ni ustrezna ($< 95,0 \%$).

Vsebnost učinkovine smo določali v vzorcih **1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 in 11**. Vzorca **6 in 7** sta namesto metandienona, ki je bil deklariran, vsebovala 17α -metiltestosteron. Pri teh dveh vzorcih smo s pomočjo HPLC metode **A** določili vsebnost 17α -metiltestosterona v vzorcu, nismo pa mogli določiti % vsebnosti, saj vzorca vsebujeta učinkovino, ki ni deklarirana. Vsebnost učinkovine je bila ustrezna (med $95,0 \%$ in $105,0 \%$) le v vzorcu **9**, v vseh ostalih vzorcih je bila vsebnost učinkovine prenizka.

Ponovljivost metode ni bila ustrezna pri raztopinah vzorcev **4 in 5**. Razlog za to je lahko nezadostna homogenizacija prahu iz kapsul. Pred začetkom priprave raztopin vzorcev smo predpostavili, da je v kapsulah homogen prah, vsebnost učinkovine pa je enaka v vseh kapsulah. Zaradi tega prahu iz kapsul nismo stresli v terilnico in ga homogenizirali, temveč smo kapsule le spraznili v steklene viala in nato iz njih natehtali ustrezno količino prahu. Drugi (manj verjeten) vzrok bi lahko bilo nepopolno raztapljanje učinkovine pri pripravi raztopin vzorcev.

4.6. Ponovljivost injiciranja

Pripravili smo raztopine standardov z delovnimi koncentracijami enakimi kot pri določanju vsebnosti učinkovin v vzorcih in jih injicirali šestkrat zapored. Izračunali smo RSD. Rezultati so podani v tabeli XVII.

Tabela XXVII: Rezultati testiranja ponovljivosti injiciranja za raztopine standardov

Raztopina standarda	AUC (mAU s)						$\overline{AUC}$ (mAU s)	s	RSD (%)
	1.inj.	2. inj.	3. inj	4. inj	5. inj.	6.inj.			
Standard 2	62,443	62,022	62,168	62,031	62,828	62,677	62,362	0,34	0,549
Standard 4	3314,3	3320,7	3314,8	3318,2	3315,7	3326,9	3318,4	4,79	0,144
Standard 7	3214,4	3214,5	3216,7	3210,8	3269,1	3271,9	3232,9	29,2	0,903
Standard 9	416,98	418,22	416,85	417,56	417,23	417,54	417,23	0,65	0,157
Standard 10	559,32	570,45	566,96	566,766	568,33	577,33	568,33	6,54	1,150

Ponovljivost sistema za vse raztopine standardov je ustrezna ($RSD \leq 2\%$). Kromatografski sistem je natančen.

4.7. Točnost

Raztopina vzorca 1

Raztopini vzorca 1 smo dodali približno 25 % in 50 % standarda 2 glede na delovno koncentracijo raztopine vzorca (0,1 mg/ml). Pripravili smo po tri vzorce z enako koncentracijo in jih injicirali trikrat. Izračunali smo točnost s pomočjo enačbe 3, enačbe 4 ter enačbe 5 in RSD.

Tabela XXXII: Točnost raztopine vzorca 1 (dodatek 25% standarda 2)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
1 c	6,26	6,11	102,5
1 d	6,10	6,11	99,8
1 e	6,35	6,13	103,6
$\overline{\text{Točnost}}$			102,0
S			1,93
RSD %			1,89

Tabela XXIII: Točnost raztopine vzorca 1 (dodatek 50% standarda 2)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
1 f	12,58	12,28	102,4
1 g	11,10	12,10	91,7
1 h	11,96	12,22	97,9
$\overline{\text{Točnost}}$			97,4
s			5,37
RSD %			5,52

Metoda ni točna. Odstotki prekrivanja (*recovery*) niso znotraj mej $100\% \pm 2\%$.

Raztopina vzorca 4

Raztopini vzorca 4 smo dodali približno 20 % in 50 % standarda 4 glede na delovno koncentracijo raztopine vzorca (0,1 mg/ml). Pripravili smo po tri vzorce z enako koncentracijo in jih injicirali trikrat. Izračunali smo točnost s pomočjo enačbe 3, enačbe 4 ter enačbe 5 in RSD.

Tabela XXXIV: Točnost raztopine vzorca 4 (dodatek 20% standarda 4)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
4 c	1,95	1,99	98,0
4 d	2,14	1,99	107,5
4 e	1,31	2,49	52,6
$\overline{\text{Točnost}}$			86,0
s			29,35
RSD %			34,11

Tabela XXXV: Točnost raztopine vzorca 4 (dodatek 50% standarda 4)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
4 f	4,90	4,98	98,4
4 g	5,20	4,98	104,4
4 h	5,08	4,98	102,0
$\overline{\text{Točnost}}$			101,6
s			3,03
RSD %			2,98

Metoda ni točna. Odstotki prekrivanja (*recovery*) niso znotraj mej $100\% \pm 2\%$.

Raztopina vzorca 5

Raztopini vzorca 5 smo dodali približno 20 % in 50 % standarda 7 glede na delovno koncentracijo raztopine vzorca (0,1 mg/ml) Pripravili smo po tri vzorce z enako koncentracijo in jih injicirali trikrat. Izračunali smo točnost s pomočjo enačbe 3, enačbe 4 ter enačbe 5 in RSD .

Tabela XXXVI: Točnost raztopine vzorca 5 (dodatek 20% standarda 7)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
1	1,69	1	169,0
2	0,96	1	96,0
3	1,42	1	142,0
$\overline{\text{Točnost}}$			135,7
s			36,91
RSD %			27,21

Tabela XXXVII: Točnost raztopine vzorca 5 (dodatek 50% standarda 7)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
1	2,81	2,49	112,9
2	2,89	2,49	116,1
3	3,73	2,49	149,8
$\overline{\text{Točnost}}$			126,2
s			20,47
RSD %			16,21

Metoda ni točna. Odstotki prekrivanja(*recovery*) niso znotraj mej 100% $\pm$ 2%.

Raztopina vzorca 11

Raztopini vzorca **11** smo dodali približno 25 % in 50 % standarda **10** glede na delovno koncentracijo raztopine vzorca (0,05 mg/ml). Pripravili smo po tri vzorce z enako koncentracijo in jih injicirali dvakrat. Izračunali smo točnost s pomočjo enačbe **3**, enačbe **4** ter enačbe **5** in RSD.

Tabela XXXVIII: Točnost raztopine vzorca **11** (dodatek 25% standarda **10**)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
11 d	4,26	5,01	85,0
11 e	4,66	4,82	96,7
11 f	4,82	4,63	104,1
$\overline{\text{Točnost}}$			95,3
s			9,62
RSD %			10,09

Tabela XXXIX: Točnost raztopine vzorca **11** (dodatek 50% standarda **10**)

Vzorec	m _{dol} (mg)	m _{dod} (mg)	Točnost (%)
1	9,91	9,78	101,33
2	9,46	10,25	92,30
3	10,25	9,77	104,91
$\overline{\text{Točnost}}$			99,51
s			6,50
RSD %			6,54

Metoda ni točna. Odstotki prekrivanja (*recovery*) niso znotraj mej $100\% \pm 2\%$.

Iz rezultatov eksperimentalnega dela je razvidno, da metoda ni točna. Razloge za to lahko iščemo predvsem v neustrezni homogenizaciji vzorcev ali pa v nepopolnem raztapljanju učinkovine v topilu. Glede na to, da smo v okviru eksperimentalnega dela optimizirali raztapljanje, je bolj verjeten razlog za neustrezno točnost nezadostna homogenizacija vzorca. Ker točnosti metode nismo uspeli potrditi, ne moremo trditi, da so vsebnosti

učinkovin v vzorcih, ki smo jih določili, prave. Analize bi bilo smiselno ponoviti, vendar nam je za to žal zmanjkalo vzorcev.

5. Sklep

Na internetnih straneh smo pregledali ponudbo izdelkov, ki vsebujejo AAS. Ker so AAS v večini držav nelegalne snovi, so na internetnih straneh velikokrat uporabljena »zamaskirana« imena učinkovin. Na različnih internetnih straneh smo naročili 11 izdelkov, ki so imeli kot učinkovine deklarirane najpogosteje zlorabljane AAS.

Preden smo se s pomočjo HPLC-ja lotili analize vzorcev smo izvedli optimizacijo in validacijo metode s standardi. Za doseg čim boljše ločljivosti, smo spreminjali volumen injiciranja in temperaturo kolone. Izkazalo se je, da je najboljša ločljivost pri metodi, pri kateri je volumen injiciranja 20 µl, temperatura kolone pa 30° C. Ločljivost je bila ustrezna za identifikacijo učinkovin v vzorcih. Ker sta bila standarda **9** in **10** izrazito bolj nopolarna kot ostali standardi, smo za analizo vzorcev, ki vsebujejo stanozolol in oksimetolon (vzorci **8**, **9**, **10** in **11**), uporabili gradientno metodo in s tem skrajšali čas analize.

V okviru validacije HPLC metode smo izvedli test stabilnosti raztopin standardov po 24 h, preizkus linearnosti raztopin standardov in ponovljivost injiciranja za raztopine standardov. Za vse raztopine standardov smo dokazali stabilnost po 24 h in linearnost od 50 do 150 % delovne koncentracije ter ponovljivost injiciranja. Pred analizo vzorcev smo preizkusili več različnih postopkov priprave raztopin vzorcev. Za najboljšega se je izkazal postopek, pri katerem smo vzorec 20 minut raztapljali s pomočjo ultrazvoka v 60 % MeOH.

Z izbrano metodo smo izvedli identifikacijo in določanje vsebnosti učinkovin v vzorcih. Preizkusili smo tudi ponovljivost in točnost metode. Dokazali smo, da dva vzorca nista vsebovala deklarirane učinkovine (namesto deklariranega metandienona sta vsebovala 17α-metiltestosteron), ostalih devet vzorcev pa je vsebovalo deklarirano učinkovino. Vsebnost učinkovine je bila ustrezna le pri enem vzorcu. Težave smo imeli s ponovljivostjo in točnostjo metode. Ponovljivost metode ni bila ustrezna pri treh raztopinah vzorcev, točnost pa ni bila ustrezna pri nobeni raztopini vzorca. Najverjetnejši vzrok je bila neustrezna homogenizacija vzorcev. Žal tega nismo mogli potrditi s ponovitvijo analiz, saj nismo imeli zadostne količine vzorcev. Tako ne moremo z gotovostjo trditi, da so vsebnosti učinkovin, ki smo jih določili, pravilne.

V okviru diplomske naloge smo dokazali, da so izdelki, ki vsebujejo AAS, lahko dostopni na internetnih straneh, kljub temu, da so v večini držav nelegalni. Izdelki ponujeni na internetnih straneh velikokrat ne ustrezajo deklaracijam. Lahko se zgodi, da naročnik ne dobi izdelka proizvajalca, ki je naveden, ampak izdelek »domače« proizvodnje. Dokazali

smo tudi, da je HPLC primerna metoda za identifikacijo AAS v izdelkih, ki imajo deklarirane AAS.

6. Literatura

1. R. Kazlauskas: Designer Steroids. V V D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010: 156-185.
2. 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.
3. Olimpijski komite slovenije: www.olympic.si. Dostop september 2011
4. Svetovna antidopinška agencija: www.wada-ama.org/. Dostop september 2011.
5. B. Houlihan: Dying to win. Doping in sport and the development o fanti-doping policy. Council of Europe, Strasbourg, ISBN 92-871-3589-4.
6. Evropska konvencija proti dopingu v športu:
http://www.svetevrope.si/sl/dokumenti_in_publikacije/konvencije/135/. Dostop september 2011.
7. P. Lenehan: Anabolic Steroids and Other Performance Enhancing Drugs, Taylor & Francis, London and New York.
8. Seznam Nobelovih nagrajencev: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/. Dostop september 2011.
9. R. Bahr in M. Tjornhom: Prevalence of doping in sports: doping control in Norway 1977-1995. Clinical Journal of Sport Medicine 8 (1), 1998, 32-7.
10. Seznam pozitivnih dopinških primerov v športu:
http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_doping_cases_in_sport. Dostop september 2011
11. A. Stare: Doping, kuga današnjega časa in nenadna srčna smrt,
<http://245.gvs.arnes.si/gimjes/moodle/file.php/1/Doping.pdf>. Dostop september 2011.
12. J. Osredkar: Doping, kaj je to in kdaj?, Medicinski razgledi 2003; 42: 369-399
13. A. T. Kicman: Biochemical and Physiological Aspects of Endogenous Androgens. V D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010: 25-64.

14. J. Osredkar: Anabolični androgeni steroidi. V Doping in šport, Olimpijski komite slovenije-Združenje športnih zvez: Ministrstvo za šolstvo in šport, Ljubljana 1997: 4/1-4/32.
15. A.T. Kicman: Pharmacology of Anabolic Steroids: British Journal of Pharmacology (2008) 154: 502-521.
16. N. T. Shahidi: A Review of the Chemistry, Biological Action and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids, Clinical Therapeutics/vol. 23, NO. 9, 2001: 1355-1390.
17. Rang HP, Dale MM , Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, 6th Edition, Churchill, Livingstone, Edinburgh, 2007: 451-452.
18. Baza podatkov o zdravilih: www.zdravila.net
19. C. Maravelias, A. Dona, M. Stefanidou, C. Spilioulou: Adverse Effects of Anabolic Steroids in Athletes. A constant threat: Toxicology Letters 158 (2005): 167-175.
20. M. K. Parr, W. Schänzer: Detection of the Misuse of Steroids in Doping Control, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 121 (2010): 528-537.
21. C. Shackleton: Steroid Analysis and Doping Control 1960-1980: Scientific Developments and Personal Anecdotes, Steroids 74 (2009): 288-295
22. C. Ayotte: Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. V D. Thieme and P. Hemmersbach (eds.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010: 77-98.
23. Kazenski zakonik RS: <http://zakonodaja.gov.si>
24. M. K. Parr, U. Flenker, W. Schänzer: Sports-Related Issues and Biochemistry of Natural and Synthetic Anabolic Substances, Hormones and the Science of Athletic Performance, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 39 (2009): 45-57.
25. M. Žorž: HPLC, Samozaložba, Ljubljana 1991
26. Shema HPLC sistema: http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg. Dostop september 2011.
27. L. Huber: Validation of HPLC Methods, LabCompliance 2001.
28. ICH Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures, Text and Metodology, november 2005.