

Χρήση Φασματομετρίας Μαζών για Προσδιορισμό Απαγορευμένων Ουσιών σε Αθλητές (Anti-Doping)

Φίλιππος Παντελεήμων Χατζηπιερής, Στυλιανή Ντιμτσούδη, Κωνσταντίνος Γεωργακόπουλος*
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:
φασματομετρία μάζας,
αναλύσεις αντι-ντόπινγκ,
ανδρογόνα στεροειδή
φάρμακα, βιολογικά
δείγματα, συμπληρώματα
διατροφής, αναλύσεις σε
τρίχες.

ARTICLE INFO:

Received : September 27, 2023

Revised: February 8, 2024

Accepted: April 18, 2024

Available on line: June 4, 2024

* CORRESPONDING

AUTHOR:

Κωνσταντίνος

Γεωργακόπουλος

Email: konsgeo@pharm.uoa.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο προσδιορισμός των απαγορευμένων ουσιών και των μεταβολιτών τους που έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντιντόπινγκ (WADA, wada-ama.org) σε αθλητές, πραγματοποιείται με αναλυτικές μεθόδους που έχουν ως βάση τη Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry, MS). Η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα κατά τον αρχικό έλεγχο των αντιντόπινγκ τεστ ("screening"), ενώ παράλληλα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και στον κλάδο της μεταβολομικής. Ο φασματογράφος μάζας, ως τελικός αναλυτής, είναι συνήθως συνδεδεμένος με σύστημα διαχωρισμού είτε αέριας (GC) είτε υγρής χρωματογραφίας (LC). Τελευταία, πολλά υποσχόμενη είναι η σύνδεση με την χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC, Supercritical Fluid Chromatography), η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των μεταβολιτών των στεροειδών, που βρίσκονται υπό την μορφή γλυκουρονιδίων.

Το συνηθέστερο βιολογικό υγρό που χρησιμοποιείται στις αναλύσεις αντι-ντόπινγκ είναι τα ούρα, ωστόσο τα τελευταία χρόνια αναλύσεις σε σάλιο και σε τρίχες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον. Τέλος, με την τεχνική LC-MS/MS είναι δυνατή η ανακάλυψη νέων μεταβολιτών με διαγνωστική σημασία, ο εντοπισμός χρόνιας χρήσης ναρκωτικών και αναβολικών ουσιών, καθώς και η διάκριση μεταξύ του ντόπινγκ και άλλων χρήσεων/καταχρήσεων ενός φαρμάκου, ενώ με την τεχνική GC-MS είναι δυνατή η ανάλυση σε συμπληρώματα διατροφής που μπορεί να εκθέσουν αθλητές αλλά και το ευρύτερο κοινό σε απαγορευμένες ουσίες χωρίς την επίγνωσή τους.

1. Εισαγωγή

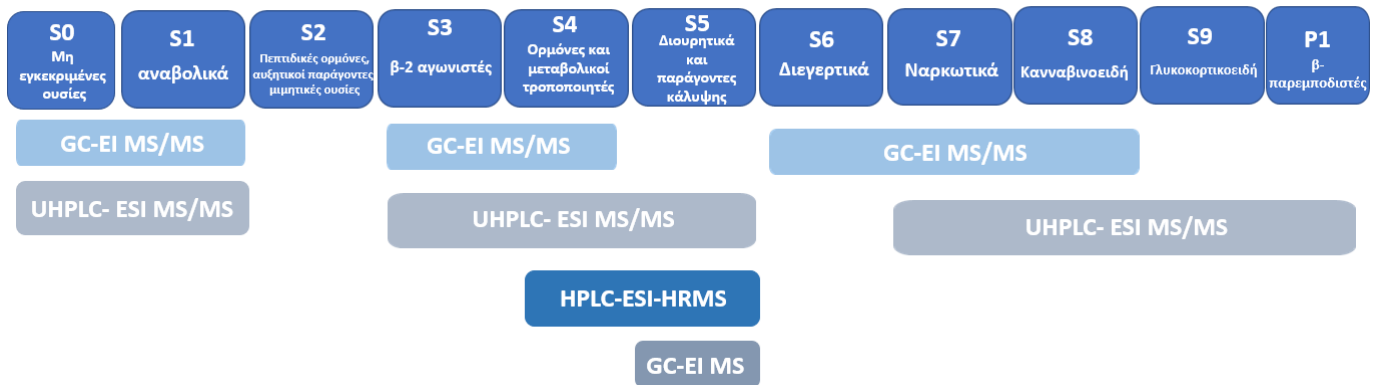
Η διεξαγωγή των αντιντόπινγκ τεστ σε αθλητές περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων σε βιολογικά δείγματα, που παραλαμβάνονται από τους αθλητές εντός και εκτός αγώνων. Οι ουσίες αυτές, οι οποίες είναι περίπου 250, συμπεριλαμβάνονται στη λίστα που έχει συνταχθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) και έχουν κατηγοριοποιηθεί στις κατηγορίες ουσιών (S0-S9) και μεθόδων (M1-M3) ανάλογα με τη φαρμακολογική τους δράση. Σε αυτές τις ουσίες συμπεριλαμβάνονται και οι β-παραμποδιστές (P1), οι οποίες όμως απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα. Ακόμη, οι ουσίες διαχωρίζονται σε μη-καθορισμένες, δηλαδή ουσίες για τις οποίες η ταυτοποίηση είναι απλή, χωρίς την ύπαρξη ενός κατώτατου ορίου και σε καθορισμένες ουσίες, των οποίων η παρουσία χαρακτηρίζεται θετική σε ντόπινγκ από ένα όριο και πάνω.¹ Το συνηθέστερο βιολογικό υγρό που συλλέγεται για αναλύσεις ρουτίνας είναι τα ούρα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται το ολικό αίμα, ο ορός ή το πλάσμα.^{2,3} Η συλλογή ούρων ενέχει περισσότερα πλεονεκτήματα, καθώς αποτελεί μία μη επεμβατική τεχνική και μπορούν να συλλεχθούν μεγάλες ποσότητες δείγματος¹. Στη διαδικασία του αντιντόπινγκ αρχικά πραγματοποιείται ένας προληπτικός έλεγχος ή αλλιώς “screening”, ο οποίος ακολουθείται από τη διαδικασία επιβεβαίωσης. Στην περίπτωση που το δείγμα ενός αθλητή βρεθεί θετικό στον πρώτο έλεγχο, πρέπει στη συνέχεια να γίνει η ταυτοποίηση της απαγορευμένης ουσίας και των μεταβολιτών της.^{1,3} Για να μπορέσει να επιτευχθεί η ορθή ταυτοποίηση, ανάμεσα στις πολλές διαφορετικές ουσίες που βρίσκονται στη λίστα της WADA (μικρού μοριακού βάρους ξеноβιοτικά, μικρά πεπτίδια, δείκτες προφίλ στεροειδών των ούρων), χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν πολλές αναλυτικές μέθοδοι με βάση τη Φασματομετρία Μαζών Υψηλής Διαχωριστικότητας (High Resolution Mass Spectrometry). Τέτοιες τεχνικές αποτελούν η GC-MS/MS και η LC-MS/MS και προτιμώνται λόγω υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας.¹

2. Η συνεισφορά του κλάδου της μεταβολομικής και η χρησιμότητα της φασματομετρίας μάζας στις αναλύσεις αντι-ντόπινγκ

Η μεταβολομική είναι ένας κλάδος που εστιάζει στον προσδιορισμό μεταβολιτών που εκκρίνονται ή προϋπάρχουν σε ένα δείγμα συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου ή ιστού. Πρόκειται συνήθως για μικρά οργανικά μόρια (<2kDa), όπως αμινοξέα και νουκλεοτίδια. Η μεταβολομική μπορεί είτε να στοχεύσει σε μία συγκεκριμένη ομάδα ουσιών ή ένα μεταβολικό μονοπάτι ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μη στοχευμένα για ένα ακαθόριστο αριθμό διαφορετικών ουσιών. Η μη στοχευμένη ανάλυση έχει σκοπό να ανιχνεύει οποιαδήποτε σημαντική αλλαγή στο μεταβόλομα, επομένως μέσω αυτής είναι δυνατή η ανίχνευση ενώσεων που μπορούν να αποτελέσουν διαγνωστικούς βιοδείκτες για τους οποίους στη συνέχεια μία στοχευμένη μέθοδος μπορεί να αναπτυχθεί. Είναι φανερό λοιπόν, πως η μη στοχευμένη ανάλυση είναι διαδικασία παρόμοια με αυτή του “screening” των αναλύσεων αντι-ντόπινγκ που αναφέρθηκε προηγουμένως, ενώ η στοχευμένη ανάλυση αποσκοπεί και αυτή στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων ουσιών ή ομάδων. Η κύρια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιεί η μεταβολομική για τον προσδιορισμό αλλαγών στον μεταβολισμό είναι η Φασματομετρία Μαζών. Στηρίζεται στους συνηθέστερους τύπους θραυσμάτων που προκύπτουν έπειτα από ιονισμό του δείγματος. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα από τη μη στοχευμένη ανάλυση με MS χαρακτηρίζονται με βάση τον λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) και την αφθονία ή ένταση του ανιχνευόμενου ιόντος. Σε μεθόδους που αξιοποιούν την MS, ο αριθμός των μεταβολιτών που ανιχνεύονται με τη χρήση στοχευμένης ανάλυσης εξαρτάται από την προκατεργασία των δειγμάτων, από τις ιδιότητες της στατικής φάσης (όταν προηγείται διαχωρισμός με χρωματογραφία) καθώς και από την τεχνική ιονισμού που χρησιμοποιείται.³

3. Προκατεργασία δειγμάτων για αναλύσεις αντιντόπινγκ

Οι κύριες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων ού-



Σχήμα 1: Η κατηγοριοποίηση των απαγορευμένων ουσιών για αθλητές και οι τεχνικές που εφαρμόζονται για το αρχικό screening σε δείγματα ούρων με χρήση φασματομετρίας μαζών (προσαρμοσμένο από την παραπομπή¹)

ρων που πρόκειται να αναλυθούν για αντιντόπινγκ, γενικά περιλαμβάνουν την απλή διαλυτοποίηση και στη συνέχεια την ένεση του δείγματος, την καθίζηση πρωτεϊνών, την εκχύλιση υγρού υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και την εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Όσον αφορά στα δείγματα αίματος, μπορεί να χρειαστεί περαιτέρω προκατεργασία (απομάκρυνση των λιπιδίων). Ακόμη, για μεταβολίτες της φάσης II, δηλαδή για ουσίες οι οποίες προκύπτουν έπειτα από σύζευξη με συστατικά του οργανισμού, συνήθως απαιτείται υδρόλυση προκειμένου να προσδιοριστούν τα μη υδατανθρακικά τμήματα γλυκοζιτών. Οι τεχνικές της απλής διαλυτοποίησης και στη συνέχεια ένεσης του δείγματος καθώς και της καθίζησης πρωτεϊνών αποτελούν φθηνές, γρήγορες και απλές μεθόδους, ενώ η LLE και SPE επιτυγχάνουν την προσυγκέντρωση και τον καθαρισμό του αναλύτη αποφεύγοντας έτσι φαινόμενα επίδρασης μήτρας.²

4. Αναλυτικές τεχνικές και αντιντόπινγκ

4.1 Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασμα-

τογράφο μαζών προσθήκη (GC-MS), προσφέρει εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα ενώ παράλληλα επιτρέπει την έκλυση ουσιών σε ικανοποιητικούς χρόνους κατακράτησης. Η πιο συνηθισμένη τεχνική ιοντισμού για τη GC είναι ο ιοντισμός ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI). Γενικότερα, οι ουσίες που πρόκειται να αναλυθούν με GC υφίστανται χημική τροποποίηση. Ωστόσο, οι παράγωγες ενώσεις που προκύπτουν από αυτήν την τροποποίηση εμφανίζουν περιορισμένη σταθερότητα. Έτσι λοιπόν, γίνεται ανάπτυξη μεθόδων χρησιμοποιώντας ενέργειες μικρότερες των 70 eV, παρέχοντας νέες δυνατότητες στην τεχνική GS-MS για την ανίχνευση μεταβολιτών σε αναλύσεις αντιντόπινγκ, λόγω των διαθέσιμων φασματικών βιβλιοθηκών για την ταυτοποίηση βιοδεικτών.³

4.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών (HPLC-MS)

Τη δεκαετία του 1990 αναπτύχθηκε η αναλυτική τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μάζας, για να επιτευχθεί η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός ευρύτερης ποικιλίας ενώσεων, συγκεκριμένα μικρών πολικών ενώσεων που δεν είναι πτητικές και δεν μπορούν να προσδιο-

ριστούν με GC-MS. Η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) είναι η επικρατέστερη για LC-MS, ενώ για μη πολικά ή μικρού μοριακού βάρους μόρια χρησιμοποιείται ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI). Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια εμπλουτισμού των βιβλιοθηκών για LC-MS, καθώς η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για τον προσδιορισμό μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά.³

4.3 Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών Υψηλής Διαχωριστικότητας (LC-HRMS)

Η βελτιωμένη αναλυτική ευαισθησία αποτελεί σημαντική παράμετρο για την εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών τα τελευταία χρόνια, με προσδιορισμούς να μπορούν να πραγματοποιούνται μέχρι και στην τάξη του πικογραμμαρίου ανά mL (pg/mL). Από το 2000 και μετά, μεγάλη εφαρμογή για τη μεταβολομική και την ανάλυση αντιντόπινγκ είχε η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διαχωριστικότητας (High Resolution Mass Spectrometry, LC-HRMS). Οι αναλυτές QTOF (Quadrupole time-of-flight), στους οποίους η διάκριση των ιοντικών θραυσμάτων βασίζεται στον χρόνο πτήσης ισοενεργειακών ιοντικών θραυσμάτων με διαφορετικό λόγο m/z , είναι πολλά υποσχόμενοι, γιατί προσφέρουν δυνατότητα πλήρους σάρωσης, υψηλής ταχύτητας σάρωσης, ακριβή προσδιορισμό μάζας και υψηλή διαχωριστικότητα. Τα δεδομένα πλήρους σάρωσης επιτρέπουν την ανακάλυψη νέων ουσιών, όπως ουσιών με ψυχοδραστικές ιδιότητες (New Psychoactive Substances, NPS), που εμπεριέχονται στο πλαίσιο των απαγορευμένων ουσιών και έτσι διευκολύνουν τη διαδικασία του screening σε ένα μεγάλο εύρος οργανικών ενώσεων.³

4.4 Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Ρευστού συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών (SFC-MS/MS)

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού

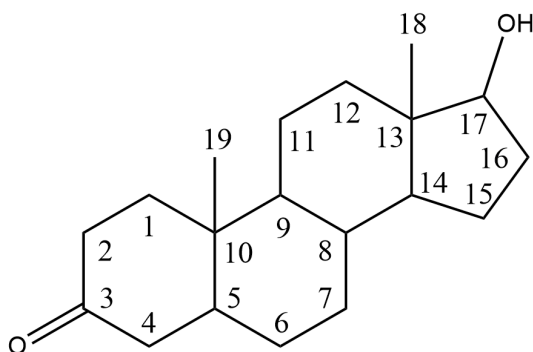
(Supercritical Fluid Chromatography, SFC) συζευγμένη με MS, ως μέθοδος για τον διαχωρισμό ουσιών, χρησιμοποιεί υπερκρίσιμα ρευστά ως κινητές φάσεις, όπως για παράδειγμα CO_2 . Τα υπερκρίσιμα ρευστά διαθέτουν φυσικές ιδιότητες όπως χαμηλό ιξώδες, μεγάλη ικανότητα διάχυσης και υψηλή διαλυτική ικανότητα, προσφέροντας έτσι πιο γρήγορους χρόνους ανάλυσης, υψηλή διαχωριστικότητα και εκλεκτικότητα.

Με βάση τα αποτελέσματα των *Parr et al.*, παρ'όλο που η μη απαγορευμένη ουσία φαινυλεφρίνη (phenylephrine) και η απαγορευμένη ουσία οξυλοφρίνη (oxilofrine), που είναι συμπαθομιμητική συνεκλούνται σε στήλη C18, μπορούν να διαχωριστούν χάρη στις κορυφές των πρόδρομων ιόντων στο MS. Όμως, τα ισομερή οκτοπαμίνη (octopamine) και νορφενεφρίνη (norfenefrine) δεν μπορούν να διαχωριστούν ούτε με HPLC, ούτε από τα πρόδρομα ιόντα τους στο MS. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την τεχνική SFC-MS/MS καθώς εμφανίζονται σε διαφορετικούς χρόνους έκλυσης με $\Delta RT=0,45$ min. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 5mM και εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση. Επίσης, από τα πρόδρομα ιόντα τους στο MS μπορούν να διαχωριστούν και η νορφενεφρίνη και η τυραμίνη που συνεκλούνται στην τεχνική SFC-MS. Τέλος, ως τεχνική ιοντισμού συνηθέστερα χρησιμοποιείται η ESI (Electrospray Ionization) που οδηγεί στο σχηματισμό είτε θετικών είτε αρνητικών ιόντων.⁴

5. Η χρήση νέων βιολογικών υλικών για τον προσδιορισμό αναβολικών στεροειδών και διεγερτικών

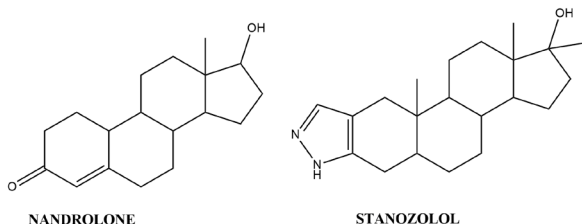
Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (Anabolic androgenic steroids, AASs) είναι συνθετικά παράγωγα της ενδογενώς παραγόμενης ανδρικής σεξουαλικής ορμόνης τεστοστερόνης (Σχήμα 2), τα οποία παρουσιάζουν τόσο αναβολικά (πρωτεϊνοσύνθεση) όσο και ανδρογόνα (αρρενοποιητικά) αποτελέσματα. Τα AASs είναι μια από τις πιο ισχυρές και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ουσίες που βελτιώνουν την απόδοση των αθλητών (Performance Enhancing

Drugs, PEDs)



Σχήμα 2: Η χημική δομή της τεστοστερόνης.

και έτσι συμπεριλήφθηκαν στον κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (International Olympic Committee, IOC) από τα μέσα της δεκαετίας του 1970. Παρ'όλους τους περιορισμούς, τα AASs εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται συχνά από αθλητές, ιδιαίτερα η νανδρολόνη (nandrolone) και η στανοζολόλη (stanozolol), όπως αποκαλύπτεται από πολυάριθμα αναλυτικά ευρήματα τα τελευταία χρόνια (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Χημικές δομές νανδρολόνης

και στανοζολόλης.

Η ανάλυση ούρων που πραγματοποιείται σε διαπιστευμένα εργαστήρια θεωρείται γενικά ως τυπική τεχνική για την ανίχνευση ουσιών που χρησιμοποιούνται για ντόπινγκ (doping). Το κύριο μειονέκτημα της ανάλυσης ούρων είναι ότι παρέχει μόνο βραχυπρόθεσμες πληροφορίες για τη κατανάλωση PEDs

από το άτομο και δεν καθορίζει τη συνεχή κατάχρησή τους. Έτσι, δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στον εντοπισμό αθλητών που λαμβάνουν μακροχρόνια στεροειδή κατά τη διάρκεια των περιόδων προπόνησης και σταματούν να τα παίρνουν πριν από τον αγώνα. Αυτό οδηγεί σε μια επαρκή περίοδο χωρίς φάρμακα των αθλητών, παρέχοντας έτσι ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Η ανάλυση μαλλιών έχει χρησιμοποιηθεί τις τελευταίες τρεις δεκαετίες για τον εντοπισμό χρόνιας χρήσης ναρκωτικών και μπορεί να επεκταθεί στους ελέγχους ντόπινγκ. Τα αναβολικά στεροειδή βρίσκονται σε πικογραμμάρια ανά χιλιοστόγραμμα (pg/mg) στα μαλλιά και γενικά ενσωματώνονται στη μήτρα της τρίχας με διάφορους τρόπους:

(i) ενδογενής οδός: παθητική διάχυση του μορίου του φαρμάκου από τη συστηματική κυκλοφορία στα αναπτυσσόμενα μαλλιά και

(ii) ενδογενής-εξωγενής οδός: απορρόφηση ή μεταφορά μορίων φαρμάκου στο στέλεχος της τρίχας από διαδερμική απέκκριση, ιδρώτα και σμήγμα.

Τα μαλλιά έχουν ισοηλεκτρικό pH κοντά στο 6 και έτσι ευνοούν την ενσωμάτωση αδιάσπαστων βασικών φαρμάκων. Μεταξύ των αναβολικών στεροειδών, η στανοζολόλη κατανέμεται κατά προτίμηση σε μελαγχρωματικές τρίχες λόγω της βασικής φύσης του δακτυλίου πυραζόλης που υπάρχει στη χημική της δομή. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι η ανίχνευση των μητρικών φαρμάκων γίνεται κυρίως στα μαλλιά, ενώ των μεταβολιτών τους στα ούρα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μητρικά φάρμακα είναι λιγότερο πολικά και ως εκ τούτου η ενσωμάτωσή τους στη μήτρα κερατίνης ευνοείται.

Το τεστ μαλλιών είναι μη επεμβατικό και αποτελεί την πιο βολική τεχνική για τον εντοπισμό και τον έλεγχο του ντόπινγκ σε σύγκριση με την ανάλυση ούρων και τις εξετάσεις αίματος. Αν και οι αναλύσεις μαλλιών μπορεί να μην αντικαταστήσουν πλήρως την ανάλυση ούρων, μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ειδικές περιπτώσεις για να παρέχουν πληροφορίες συμπληρωματικές με αυτές που λαμβάνονται από εξετάσεις ούρων και αίματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να επιβεβαιώσουν την επαναλαμβανόμενη λήψη φαρμάκων ανιχνεύοντας άμεσα τα μητρικά φάρμακα.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε από τους *Deshmukh et al.* για την ανίχνευση των στεροειδών ήταν η φασματομετρία μάζας συζευγμένη με υγρή χρωματογραφία (LC-MS/MS). Τα στεροειδή ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση τους χρόνους κατακράτησης και τη σχετική αφθονία των αντίστοιχων ιοντικών προϊόντων τους. Οι δοκιμασίες ήταν ικανές να ανιχνεύσουν 0,5 pg στανοζολόλης και 3,0 pg νανδρολόνης ανά mg τρίχας. Περίπου 20 mg ανθρώπινης τρίχας επεξεργάστηκαν στα πειράματα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι μέθοδοι είναι αποτελεσματικές στην ανίχνευση στεροειδών στα μαλλιά ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα όταν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία μόνο περίπου 20 mg μαλλιών. Λιγότερες τρίχες που απαιτούνται για ανάλυση καθιστούν τη μέθοδο πιο βολική για τον έλεγχο ουσιών.⁶

Ένα άλλο βιολογικό υλικό το οποίο έχει λάβει αυξημένη προσοχή είναι το σάλιο, καθώς διαθέτει ορισμένα αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά: το σάλιο είναι πράγματι ένα αρκετά σταθερό υλικό και η συλλογή, η μεταφορά και η αποθήκευσή του μπορούν εύκολα να τυποποιηθούν. Ταυτόχρονα, έχει γίνει συσχέτιση μεταξύ της διάθεσης των φαρμάκων/μεταβολιτών στο πλάσμα και τα στοματικά υγρά και ο αντίστοιχος χρόνος εμφάνισης/εξαφάνισης έχουν μελετηθεί διεξοδικά για πολλές κατηγορίες φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων από τα πιο κοινά φάρμακα κατάχρησης, λαμβάνοντας επίσης υπόψη τη συγκέντρωσή τους και στα δύο υγρά. Ως εκ τούτου, το σάλιο μπορεί να θεωρηθεί κατ' αρχήν, ένα βιολογικό υγρό κατάλληλο για μια αξιόπιστη παρέκταση της διάθεσης των φαρμάκων στο πλάσμα, όσον αφορά τη συγκέντρωση, την ενεργότητα και την αποβολή τους.

Τα διάφορα διεγερτικά και μεταβολίτες στο στοματικό υγρό και στα ούρα, αναλύθηκαν από τους *Strano-Rossi et al.* με αέριο χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC/MS).⁷ Πραγματοποιήθηκαν παράλληλες μελέτες απέκκρισης στα ούρα και το σάλιο με τη συλλογή δειγμάτων σάλιου και ούρων για 1 και 3 ημέρες, αντίστοιχα, μετά την από του στόματος χορήγηση εφάπαξ δόσεων των ακόλουθων φαρμάκων: Μοδαφινίλη (Modafinil), 100 mg (Provigil), Σελεγιλίνη (Selegiline), 10 mg (Jumex), Κροτεταμίδη/Κροπροπαμίδη (Crotetamide/Cropropamide) 50 mg το καθένα (Micoren), Πεντετραζόλη (Pentetrazol), 100

mg και διυδροκωδεΐνη (Cardiazol-Paracodina), εφεδρίνη (ephedrine), 12 mg (Fienamina), σιμπουτραμίνη (sibutramine), 10 mg (Reductil), mate de coca, μια δόση που περιέχει περίπου 3 mg κοκαΐνη. Η μητρική ένωση και/ή οι μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με GC/MS μετά από υγρό-υγρό εκχύλιση σε αλκαλικό μέσο (αποτελεί μέθοδο που χρησιμοποιείται γενικά για την ανάλυση διεγερτικών στη ρουτίνα αντιντόπινγκ).

Σε κάθε μελέτη ένα δείγμα ούρων και ένα σάλιο συλλέχθηκαν αμέσως πριν από τη λήψη κάποιας από τις ουσίες που προαναφέρθηκαν. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν δείγματα ούρων για τις επόμενες 3 ημέρες, ενώ δείγματα σάλιου συλλέγονταν κάθε 1,5 ώρα για 24-48 ώρες, εκτός από τη νύχτα. Ο ανιχνευτής μάζας λειτουργούσε με ιονισμό ηλεκτρονίων στα 70 eV σε επιλεγμένη λειτουργία παρακολούθησης ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM) και σε λειτουργία σάρωσης (εύρος σάρωσης από 50 έως 450) για αναλύσεις ούρων. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν την ιδέα ότι, σε πολλές περιπτώσεις, στον τομέα της ανάλυσης αντιντόπινγκ το αποτέλεσμα ενός «παραδοσιακού» αναλυτικού ευρήματος στα ούρα μπορεί να συμπληρωθεί επιτυχώς από τα στοιχεία που λαμβάνονται από την ανάλυση του στοματικού υγρού. Η συνδυασμένη ανασκόπηση των τιμών συγκέντρωσης σάλιου και ούρων βοηθάει στην ευκολότερη διάκριση μεταξύ του ντόπινγκ και άλλων χρήσεων/καταχρήσεων του φαρμάκου. Αυτή η προσέγγιση έχει ακολουθηθεί με επιτυχία σε άλλους τομείς, ειδικά στον τομέα της κατάχρησης ναρκωτικών, εντοπίζοντας επίσης τις παραμέτρους που οδηγούν σε προβληματική συσχέτιση μεταξύ των τιμών ούρων, σάλιου και αίματος/πλάσματος.⁷

6. Ταυτόχρονη ανίχνευση 93 αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών σε συμπληρώματα διατροφής χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

Έχουν υπάρξει πολλές θετικές περιπτώσεις εμφάνισης αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών (Anabolic Androgenic Steroids, AASs) σε συμπληρώματα διατροφής κατά τη διάρκεια των ετών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Τα συμπληρώματα διατροφής που είναι

μολυσμένα με AASs είναι ο πιο πιθανός τρόπος για να εισέλθει το ντόπινγκ στο σώμα των αθλητών. Επιπλέον, τα νέα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή συνεχίζουν να έχουν παρουσία στην αγορά συμπληρωμάτων διατροφής, γεγονός που φέρνει μεγάλες προκλήσεις στην ανίχνευσή τους.

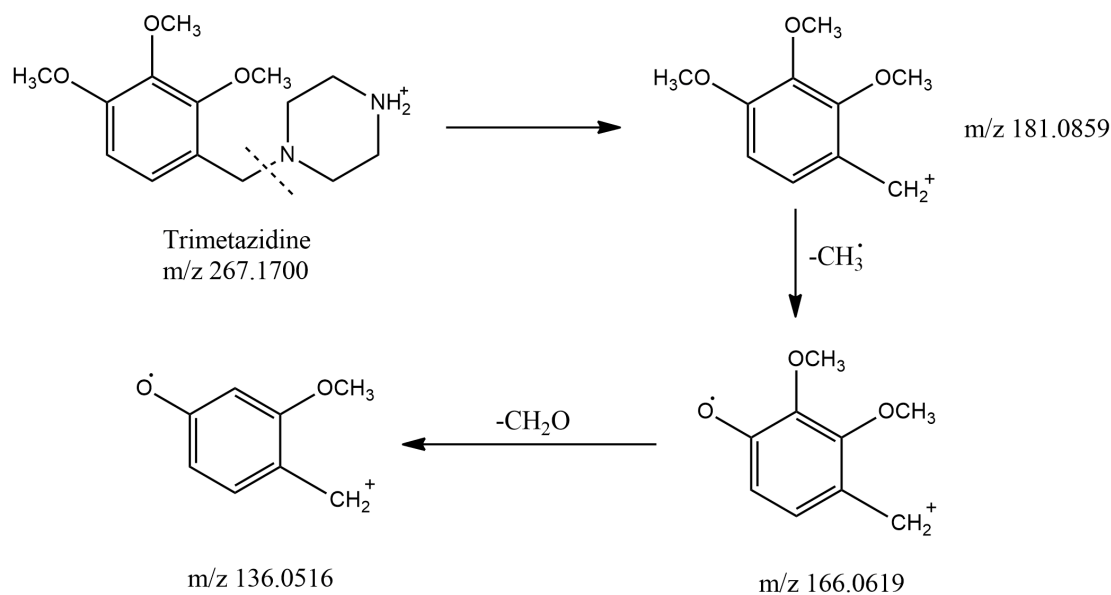
Η αέριο χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) θεωρείται ότι είναι η προτιμώμενη τεχνική για στεροειδή χωρίς ή με ασθενή συγγένεια πρωτονίων. Λόγω της πολυπλοκότητας των συστατικών στα συμπληρώματα διατροφής, η προκατεργασία του δείγματος έχει μεγάλη σημασία για την επακόλουθη ενόργανη ανάλυση. Η εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) χρησιμοποιείται ευρέως ως η προτιμώμενη μέθοδος καθαρισμού λόγω της απλής λειτουργίας και της χρονικής αποδοτικότητάς της. Ως εκ τούτου, στη μελέτη των *Zhang et al.* προτιμήθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού με χαμηλό κόστος και καλή αναπαραγωγικότητα. Ο ιονισμός ηλεκτρονίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ενέργεια ηλεκτρονίων 70 eV.

Όλοι οι αναλύτες απομονώθηκαν μεταξύ τους με καλό σχήμα κορυφής για παράγοντες διαχωρισμού. Η συνολική ανάλυση πραγματοποιήθηκε εντός των 23 λεπτών. Η ανάλυση ρουτίνας για περισσότερα από 300 υγρά και στερεά συμπληρώματα διατροφής που στάλθηκαν από τους κατασκευαστές για ανάλυση, έδειξε ότι ένα μόνο δείγμα ρουτίνας βρέθηκε θετικό στην τεστοστερόνη. Τρία συμπληρώματα διατροφής που αγοράστηκαν από ιστοσελίδες του διαδικτύου εντοπίστηκαν επίσης ότι περιέχουν 4-υδροξυ-ανδροστενεδιόνη (4-hydroxy-androstenedione), DHEA και 6-Br-ανδροστενεδιόνη (6-Br-androstenedione). Μέχρι στιγμής, περισσότερα από 300 συμπληρώματα διατροφής από κατασκευαστές αναλύθηκαν με τη μέθοδο GC-MS-MS και ο αριθμός των στεροειδών που εντοπίστηκαν ήταν επίσης ο υψηλότερος στα 93. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο εύρεσης των αθλητών που χρησιμοποιούν συμπληρώματα διατροφής ως θετικούς σε στεροειδή, χάρη στην ανίχνευση τόσων απαγορευμένων στεροειδών. Παρακολουθώντας τα συστατικά των συμπληρωμάτων και τους πιθανούς κινδύνους τους, θα μπορούσαμε να κατανοήσουμε καλύτερα την αγορά προϊόντων υγειονομικής περιθάλψης.⁸

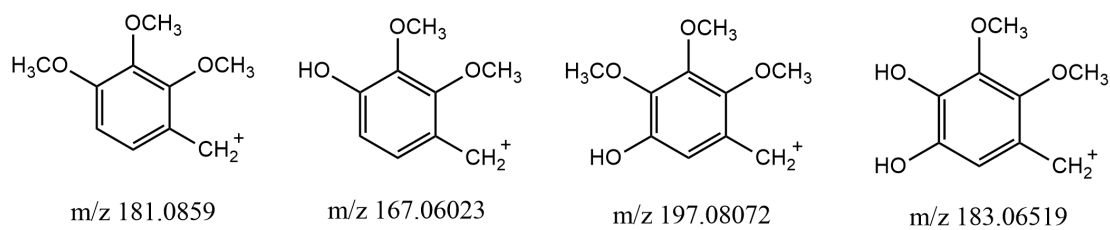
7. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των μεταβολιτών της τριμεταζιδίνης (trimetazidine, TMZ) σε ανθρώπινα ούρα με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διαχωριστικότητας (LC-MS/MS) για τον έλεγχο anti-doping

Η τριμεταζιδίνη είναι μία δραστική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως για την καταπολέμηση του πόνου στο στήθος και τον περιορισμό των συμπτωμάτων της ισχαιμίας του μυοκαρδίου σε ασθενείς με καρδιακά προβλήματα. Έχει χαρακτηριστεί ως μεταβολικός τροποποιητής, καθώς με την παρουσία της αυξάνονται τα επίπεδα αδενοσίνης στο πλάσμα του αίματος, γεγονός που οδηγεί στην βελτίωση της άντλησης αίματος από την καρδιά και στην ομαλή λειτουργία του μυοκαρδίου⁵. Η χρήση της είναι συχνή από αθλητές με σκοπό τη βελτίωση της αθλητικής απόδοσης, καθώς μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια και την αποτελεσματικότητα της σωματικής άσκησης. Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθεί πως μεγάλες δόσεις τριμεταζιδίνης μπορούν να οδηγήσουν σε συμπτώματα όπως υπερευαισθησία, πονοκέφαλο, ναυτία, εμετό, κοιλιακό πόνο και κούραση. Συγκεκριμένα, από τον Ιανουάριο του 2014 είχε απαγορευτεί για χρήση εντός-αγώνων και είχε χαρακτηριστεί ως διεγερτικό (S6) από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντιντόπινγκ (WADA), ενώ στη συνέχεια, το 2015 κατατάχθηκε ως καρδιακός μεταβολικός τροποποιητής (S4.5C) και απαγορεύτηκε η χρήση της του εντός και εκτός αγώνων.⁵

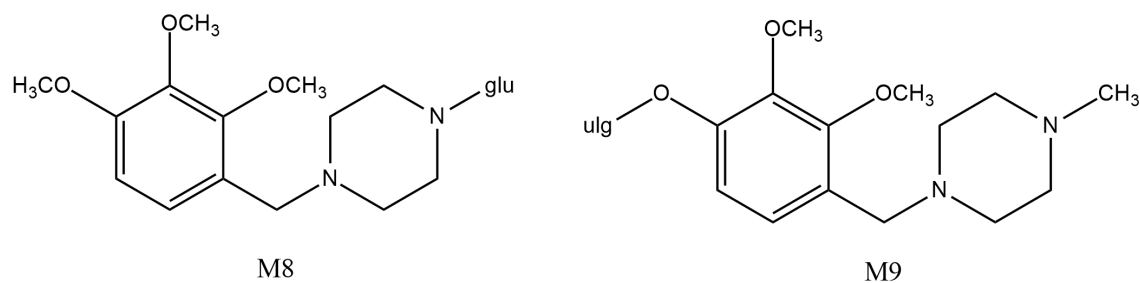
Οι κύριες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της TMZ είναι η φασματομετρία μάζας, συζευγμένη είτε με αέρια χρωματογραφία (GC-MS) είτε με υγρή χρωματογραφία (LC-MS/MS). Ειδικότερα, λόγω της ύπαρξης του ατόμου αζώτου στη μητρική ένωση αλλά και στους μεταβολίτες της, στο MS προκύπτουν θετικά φορτισμένα ιόντα. Τα μεταβολικά μονοπάτια της TMZ περιλαμβάνουν αντιδράσεις απομεθυλίωσης, N-ακετυλίωσης, N-φορμυλίωσης και διάνοιξης πιπεραζινικού δακτυλίου. Βέβαια, η μητρική μορφή είναι αυτή που παρατηρείται κυρίως στα ούρα και στο πλάσμα. Έτσι λοιπόν, μέχρι σήμερα, οι μεταβολίτες οι οποίοι ανιχνεύονται είναι κυρίως μεταβολίτες φάσης I, δηλαδή μεταβολίτες που προκύ-



Σχήμα 4: Κύρια θραύσματα της τριμεταζιδίνης που προκύπτουν από θετικό ιοντισμό.⁵



Σχήμα 5: Κύρια θραύσματα της τριμεταζιδίνης με χρήση πλήρους σάρωσης MS/MS τα οποία είναι παράγωγα βενζοϊκού δακτυλίου.⁵



Σχήμα 6: Οι νέοι μεταβολίτες M8 και M9 πάνω και κάτω αντίστοιχα.⁵

πτουν από αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης και τρεις της φάσης II, που προκύπτουν από αντιδράσεις σύζευξης (N-ακετυλιωμένο παράγωγο, N-φορμυλιωμένο παράγωγο, παράγωγο σουλφιδίου). Συγκεκριμένα, το μεταβολικό μονοπάτι της τριμεταζιδίνης στα ούρα μελετήθηκε από τους *Yuan et al.* με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένης με Φασματομετρία Μαζών Τετραπόλου και Παγίδας Ιόντων (Quadrupole-Orbitrap LC-MS/MS)⁵. Η προκατεργασία των ούρων έγινε με SPE χωρίς ενζυματική υδρόλυση, προκειμένου να ανιχνευτούν περισσότεροι μεταβολίτες φάσης II, καθώς και νέοι βιοδείκτες για την κατάχρηση τριμεταζιδίνης. Η τεχνική ιοντισμού ήταν ο ηλεκτροσπασκός (ESI) και το όργανο ήταν ρυθμισμένο σε πλήρη σάρωση όλων των ιόντων του αναλύτη (full MS-mode), με σφάλμα μάζας μικρότερο των 5 ppm και οι μάζες περιελάμβαναν ιόντα με m/z από 100 έως 1200. Τα κύρια θραύσματα που προέκυψαν έδωσαν τιμές m/z 181,0859, 166,0619 και 136,0516, τα οποία προέκυψαν από την αφαίρεση πιπεραζινικού δακτυλίου, μέθυλο-ομάδας και τμήματος φορμαλδεϋδης (Σχήμα 4).

Από την άλλη, τα θραύσματα που μπορούν να προκύψουν από πλήρη σάρωση με χρήση MS/MS αποτελούνται από μεταβολίτες με έναν βενζοϊκό δακτύλιο και διαφορετική υποκατάσταση αυτού ανάλογα με το μεταβολικό μονοπάτι (Σχήμα 5).

Μπορεί λοιπόν, να συμβεί απομεθυλίωση ή υδροξυλίωση ή και τα δύο και τα θεωρητικά θραύσματα που προκύπτουν είναι m/z 181,08571 (C₁₀H₁₃O₃, 2,3,4-trimethoxybenzyl, χωρίς απομεθυλίωση), 167,06229 (C₉H₁₁O₃, 2,3-dimethoxy-4-hydroxybenzyl, απομεθυλίωση) και 197,08072 (C₁₀H₁₃O₄, 2,3,4-trimethoxy-5-hydroxybenzyl, υδρόλυση).

Τέλος, για την ευκολότερη ανίχνευση της κατάχρησης της τριμεταζιδίνης, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των χρόνων έκλουσης 29 νέων μεταβολιτών φάσης II. Συγκεκριμένα, οι M8 και M9 καθώς και η αρχική ένωση μπόρεσαν να ανιχνευτούν έως και το χρονικό διάστημα 30 ημερών, ενώ επίσης οι νέοι μεταβολίτες M8 και M9 μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες για την κατάχρηση τριμεταζιδίνης (Σχήμα 6).⁵

Συμπεράσματα

Κατ'αρχάς, γίνεται εμφανής ο τρόπος με τον οποίο

ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) θεσμοθετεί τους κανονισμούς του και αναγνωρίζει ορισμένες ουσίες, όπως το αλκοόλ, ως απαγορευμένες. Αξιοσημείωτη είναι η χρήση νέων τύπων βιολογικών δειγμάτων που λαμβάνονται, όπως το σάλιο και οι τρίχες από τα μαλλιά, λόγω της ευκολίας δειγματοληψίας τους και της μη επεμβατικής φύσης της μεθόδου δειγματοληψίας. Για να μπορέσει να επιτευχθεί η ορθή ταυτοποίηση, ανάμεσα στις πολλές διαφορετικές ουσίες που βρίσκονται στη λίστα της WADA, χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές αναλυτικές μέθοδοι με βάση τη Φασματομετρία Μαζών Υψηλής Διαχωριστικότητας (High Resolution Mass Spectrometry). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια ανέρχεται μια πολλά υποσχόμενη τεχνική: η Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Ρευστού συζευγμένη με Φασματομετρία Μαζών (SFC-MS/MS), η οποία εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών και πετυχαίνει αυξημένη ευαισθησία και γρήγορους χρόνους ανάλυσης.

Από τις εφαρμογές που προαναφέρθηκαν, συμπεραίνουμε πως η ανακάλυψη καθώς και η ανίχνευση νέων μεταβολιτών αποτελούν το κλειδί για να μπορέσουν να οριστούν βιοδείκτες που θα υποδεικνύουν την κατάχρηση απαγορευμένων ουσιών. Ειδικότερα, δοκιμασίες στις αναλύσεις μαλλιών ήταν ικανές να ανιχνεύσουν 0,5 pg στανοζολόλης και 3,0 pg νανδρολόνης ανά mg τρίχας. Περίπου 20 mg ανθρώπινης τρίχας επεξεργάστηκαν στα πειράματα. Αυτά τα αποτελέσματα, υποδεικνύουν ότι οι μέθοδοι είναι αποτελεσματικές στην ανίχνευση στεροειδών στα μαλλιά ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Λιγότερες τρίχες που απαιτούνται για ανάλυση καθιστούν τη μέθοδο πιο βολική για τον έλεγχο ουσιών. Η παράλληλη ανάλυση διεγερτικών στο σάλιο και στα ούρα με GC/MS έδειξε ότι η συνδυασμένη ανασκόπηση των τιμών συγκέντρωσης σάλιου και ούρων βοηθάει στην ευκολότερη διάκριση μεταξύ του ντόπινγκ και άλλων χρήσεων/καταχρήσεων του φαρμάκου, ενώ η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση 93 αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών σε συμπληρώματα διατροφής με χρήση GC-MS, αποτελεί μια μέθοδο υψηλής απόδοσης για τον έλεγχο και την παρακολούθηση των συστατικών των συμπληρωμάτων διατροφής και της επακόλουθης βλάβης τους στη δημόσια υγεία. □

Use of Mass Spectrometry for the Determination of Prohibited Substances in Athletes (Anti-Doping)

Filippos Panteleimon Chatzipieris, Styliani Ntimtsoudi, Konstantinos Georgakopoulos*
Department of Medicinal Chemistry, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, NKUA

KEY WORDS:

mass spectrometry,
anti-doping analyses,
androgenic steroid drugs,
biological samples,
nutritional supplements,
hair analyses

* CORRESPONDING AUTHOR:

konsgeo@pharm.uoa.gr

ABSTRACT

The determination of prohibited substances and their metabolites as defined by the World Anti-Doping Agency (WADA) in athletes is carried out by analytical methods based on Mass Spectrometry (MS). This technique is suitable for determining changes in metabolism during the initial control of anti-doping tests ("screening"), while at the same time it is also useful in the field of metabolomics. The mass spectrometer is often combined by some chromatographic technique for the separation of substances, usually gas or liquid chromatography (GC-MS, HPLC-MS, LC-HRMS). Apart from them, a very promising technique is supercritical fluid chromatography (SFC-MS/MS), which is used for the separation of steroids' metabolites in their glucuronide form. Finally, the LC-MS/MS technique enables the discovery of new metabolites of diagnostic importance, helps to detect chronic drug and anabolic substance use, while also distinguish between doping and other uses/abuses of a drug. The GC-MS technique can help to prevent the potential finding of athletes who use nutritional supplements as positive for steroids and in eliminating risks from the purchase of health care products by the general public.

REFERENCES

1. Protti M., Mandrioli R., Mercolini L., Perspectives and strategies for anti-doping analysis, *Bioanalysis*, 11(3), 149–152, 2019. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0290>,
2. Parr M. K., Botrè F., Supercritical fluid chromatography mass spectrometry as an emerging technique in doping control analysis. *Trends Analyt.Chem.* 147, 1-12, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116517>,
3. Keen B., Cawley A., Reedy B., Fu S., Metabolomics in clinical and forensic toxicology, sports anti-doping and veterinary residues, *Drug Test. Anal.* 14(5), 794–807, 2022. <https://doi.org/10.1002/dta.3245>,
4. Parr M. K., Wuest B., Naegele E., Joseph J. F., Wenzel M., Schmidt A. H., Stanic M., de la Torre X., Botrè F., SFC-MS/MS as an orthogonal technique for improved screening of polar analytes in anti-doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 408(24), 6789–6797, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9805-4>,
5. Yuan Y., Zhao X., Wei H., Fei Q., Xu Y., Lu J., Identification and characterization of the human urinary metabolites of trimetazidine using liquid chromatography high resolution mass spectrometry, an anti-doping perspective. *Microchem.J.* 171, 106872, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106872>
6. Nawed Deshmukh, Iltaf Hussain, James Barker, Andrea Petroczi, Declan P. Naughton, Analysis of anabolic steroids in human hair using LC-MS/MS. *Steroids*, 75(10), 710-714, 2010. doi: 10.1016/j.steroids.2010.04.007,
7. Strano-Rossi S., Colamonici C., Botrè F. Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: Perspectives for "in competition" anti-doping analysis. *Anal. Chim. Acta.* 606(2), 217-222, 2008. doi: 10.1016/j.aca.2007.10.053
8. Zhang Y., Wu X., Wang W., Huo J., Luo J., Xu Y., Lu J. Simultaneous detection of 93 anabolic androgenic steroids in dietary supplements using gas chromatography tandem mass spectrometry, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 211(7), 1-6, 2022. doi: 10.1016/j.jpba.2022.114619.