

Anita A. Nygård, Ingrid E. B. Jenssen og Målfrid Roset

## **LC-MSMS- og GC-MS(MS)-metoder for analyse av anabole steroider i urin - En litteraturstudie**

### **LC-MSMS- and GC-MS(MS)-methods for analysis of anabolic steroids in urine - A literature review**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Margareth Nupen, Trine N. Andreassen og Marija Tomic

Mai 2020



Anita A. Nygård, Ingrid E. B. Jenssen og Målfrid Roset

# **LC-MSMS- og GC-MS(MS)-metoder for analyse av anabole steroider i urin - En litteraturstudie**

## **LC-MSMS- and GC-MS(MS)-methods for analysis of anabolic steroids in urine - A literature review**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Margareth Nupen, Trine N. Andreassen og Marija Tomic

Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

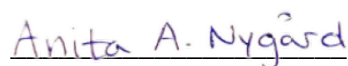
Oppgaven er gitt av Avdeling for Klinisk Farmakologi. Avdelingen er en av seks avdelinger ved Laboratoriemedisinsk klinikk ved St. Olavs Hospital, Universitetssykehuset i Trondheim. Laboratoriet utfører analyser med tilhørende fortolkninger innenfor områdene terapikontroll, rusmiddeldiagnostikk, klinisk toksikologi og retts toksikologi. Hovedinnholdet i denne oppgaven er kartlegging og anbefaling av metoder knyttet til analyse av et utvalg anabole steroider. Dette som et utgangspunkt for laboratoriet i deres videre planlegging for analyse av anabole steroider.

Oppgaven ble utført i perioden 19.03.20 – 20.05.20, og var en avsluttende oppgave ved Bioingeniørutdanningen, Institutt for bioingeniørfag, Fakultetet for naturvitenskap, Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim.

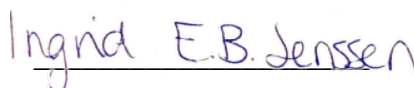
Vi vil rette en takk til våre faglige veiledere, kjemiker Trine Naalsund Andreassen og kjemiker Marija Tomic for god veiledning og hjelp til tross for slik situasjonen ble med tanke på covid-19. Vi vil også takke vår prosessveileder, førstelektor Margareth Nupen for god veiledning og retting av oppgaven underveis i skriveprosessen.

Tusen takk!

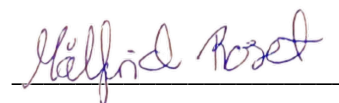
Trondheim, 19.05.2020



Anita A. Nygård



Ingrid E. B. Jenssen



Målfrid Roset

## Sammendrag

Metodeartikler for analyse av anabole steroider i urin ved bruk av LC-MSMS og GC-MS(MS) har blitt studert. Kilder fra litteraturstudiet ble hentet fra Google Scholar, PubMed, Medline og ORIA. Aktuelle artikler fra søket er: Jeon B.W mfl. (2011), Pozo O.J mfl. (2007), Rzeppa S. mfl. (2015), Balcells G. mfl (2015), Marcos J. mfl. (2002), Cha E. mfl (2015) og Kala S.V mfl. (2007). Disse analyserte 8 – 20 steroider hver.

Metodene med trinnene prøveopparbeidelse, kromatografisk separasjon og massespektrometrisk deteksjon av anabole steroider ble vurdert og sammenlignet med hensyn til metodenes utførelse og oppgitte valideringsparametrene som LOD og presisjon.

LC-MSMS og GC-MSMS metodene beskrevet av Cha E. mfl. (2015) analyserte 20 anabole steroider (boldenon,  $5\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-on,  $1\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, metandienon, epimetendiol, 4-dehydroklormetyltestosteron, metenolon, 1-metylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, nandrolon, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, oksandrolon, 17 $\beta$ -epi-oksandrolon, oksymesteron, oksymetolon,  $17\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, stanozolol, 3-OH stanozolol, trenbolon og  $17\alpha$ -trenbolon). Disse metodene anbefales på grunnlag av deres lave LOD  $\leq 2,5$  ng/mL for 15 av 20 steroider.

LC-MSMS metoden beskrevet av Rzeppa S. mfl. (2015) analyserte 9 anabole steroider (boldenon,  $2\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on,  $1\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, metenolon, 1-metylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, trenbolon og  $17\alpha$ -trenbolon). Metoden skilte seg ut ved at den analyserte sulfat-konjugat som forenklet prøveopparbeidelsen og ioniseringen av steroidene. Sulfat-konjugat kan også gi forlenget deteksjonsvindu. Dette, samt dens lave LOD  $\leq 1,0$  ng/mL og reproducerbarhet  $\leq 15\%$  gjør at metoden anbefales. I tillegg står det skrevet i artikkelen at det forventes at flere steroider kan analyseres med lignende valideringsresultat. Dette danner et godt utgangspunkt for videreutvikling av denne metoden.

## Abstract

Articles including methods for analyzing anabolic steroids in urine using LC-MSMS and GC-MS(MS) have been studied. Sources for the literature study were obtained from Google Scholar, PUBMED and ORIA. Relevant articles are: Jeon B.W et al. (2011), Pozo O.J et al. (2007), Rzeppa S. et al. (2015), Balcells G. et al. (2015), Marcos J. et al. (2002), Cha E. et al. (2015) and Kala S.V et al. (2007). Each of these articles present the analysis of 8 – 20 steroids.

The methods of sample preparation, chromatographic separation and mass spectrometric detection of anabolic steroids were evaluated and compared with consideration to the method's performance and given validation results, such as LOD and precision.

The LC-MSMS and GC-MSMS methods described by Cha E. et al. (2015) analyzed 20 anabolic steroids (boldenone, 5 $\beta$ -androst-1-ene-17 $\beta$ -ol-3-one, 1 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one, methandienone, epimethendiol, 4-dehydrochlormethyltestosterone, methenolone, 1-methylene-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one, nandrolone, 19-norandrosterone, 19-norethiocholanolone, oxandrolone, 17 $\beta$ -epi-oxandrolone, oxymesterone, oxymetholone, 17 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, stanozolol, 3-OH stanozolol, trenbolone and 17 $\alpha$ -trenbolone). Because of their low LOD  $\leq$  2,5 ng/mL for 15 of 20 steroids, these methods are recommended.

The LC-MSMS methods described by Rzeppa S. et al. (2015) analyzed 9 anabolic steroids (boldenone, 2 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one, 1 $\alpha$ -methyl-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one, methenolone, 1-methylene-5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-17-one, 19-norandrosterone, 19-norethiocholanolone, trenbolone and 17 $\alpha$ -trenbolone). The method analyzed sulphate conjugate, which made it stand out. Sulphate conjugates simplified sample preparation, ionization of steroids and may also provide extended window of detection. This, as well as its low LOD  $\leq$  1,0 ng/mL and reproducibility  $\leq$  15%, makes the method recommended. In addition, it is written in the article that it is expected that several steroids can be analyzed with similar validation results. This provides a good basis for further development of this method.

## INNHALDSFORTEGNELSE

---

Forord .....	i
Sammendrag .....	ii
Abstract .....	iii
1 Innledning .....	1
1.1 Hensikten for oppgaven .....	1
1.2 Anabole steroider og doping .....	3
1.3 Analyse av anabole steroider .....	5
1.3.1 Gasskromatografi .....	5
1.3.2 Væskekromatografi .....	5
1.3.3 Massespektrometri .....	6
1.4 Internstandard .....	7
1.5 Standard .....	8
1.6 Prøveopparbeidelse .....	9
1.6.1 Væske-væske ekstraksjon .....	10
1.6.2 Fast-fase ekstraksjon .....	10
1.6.3 Hydrolyse .....	11
1.7 Derivatisering .....	11
1.8 Akkreditering .....	12
1.9 Validering og verifisering .....	12
1.10 Valideringsparametre .....	13
1.10.1 Måleområde og linearitet .....	13
1.10.2 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense .....	13
1.10.3 Sensitivitet og spesifisitet .....	14
1.10.4 Presisjon .....	14
1.10.5 Nøyaktighet .....	15
1.10.6 Utbytte .....	15
2 Problemstilling .....	16
3 Materialer og metode .....	17
3.1 Materialer .....	17
3.2 Metode .....	18
4 Resultat og diskusjon .....	20
4.1 Prøveopparbeidelse og derivatisering .....	20
4.1.1 Forbehandling .....	20



4.1.2	Hydrolyse .....	20
4.1.3	Ekstraksjon .....	21
4.1.4	Derivatisering .....	21
4.2	Kromatografiseparasjon.....	23
4.2.1	Væskrokromatografi .....	23
4.2.2	Gasskromatografi .....	24
4.3	Massespektrometri.....	26
4.4	Vurdering av metodene .....	27
4.4.1	Metode A (38) .....	28
4.4.2	Metode B (39) .....	29
4.4.3	Metode C (40) .....	29
4.4.4	Metode D (18) .....	30
4.4.5	Metode E (41).....	30
4.4.6	Metode F1-F5 (42) .....	31
4.4.7	Metode G (43) .....	32
4.5	Holdbarhet og oppbevaring .....	32
5	Konklusjon.....	33
5.1.1	Klasse I – anbefalte metoder .....	33
5.1.2	Klasse II – brukbare metoder .....	34
5.1.3	Klasse III – ikke anbefalte metoder.....	35
6	Referanser .....	36
	Vedlegg .....	40

# 1 Innledning

## 1.1 Hensikten for oppgaven

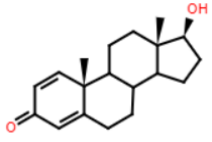
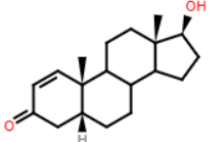
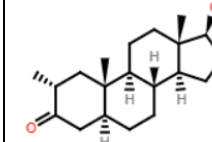
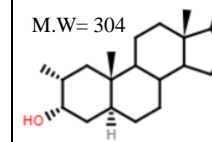
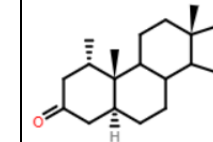
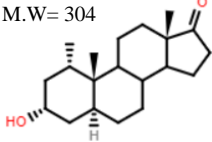
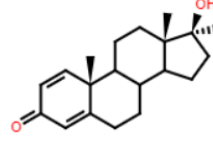
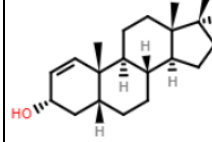
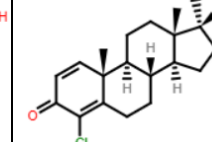
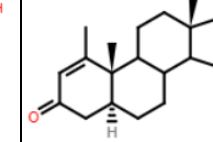
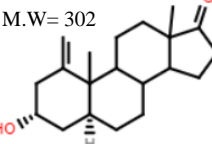
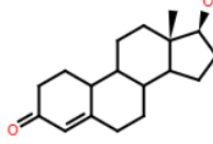
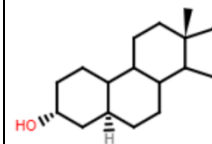
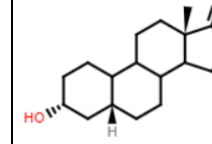
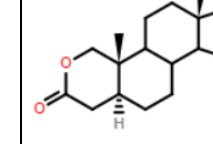
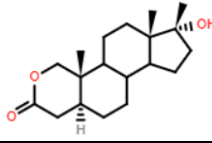
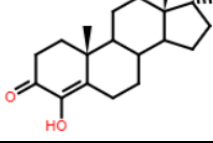
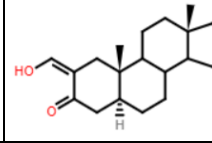
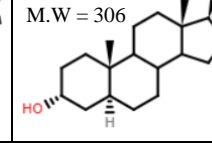
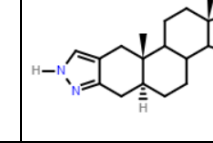
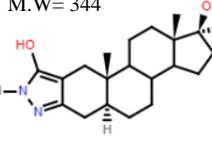
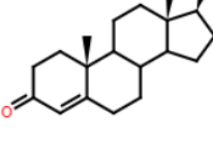
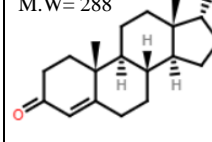
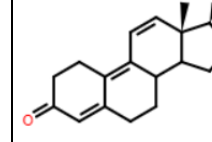
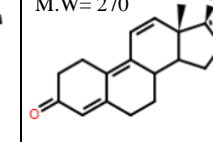
Avdeling for Klinisk Farmakologi (AKF) ved St. Olavs Hospital i Trondheim analyserer hovedsakelig legemidler og rusmidler i ulike matrikser. Dette kan være urin, serum, fullblod og hår. De fleste analyser er basert på kromatografiske metoder med massespektrometrisk deteksjon. AKF har også metoder for å identifisere ukjente stoff i for eksempel tabletter, pulver eller andre løsninger (1).

AKF planlegger å utvikle en metode for analyse av anabole steroider i human urin. Anabole steroider skal analyseres med tanke på doping og prestasjonsfremmende bruk. AKF er i første omgang interessert i til sammen 25 anabole steroider og metabolitter, som er vist i tabell 1. Disse anabole steroidene står på Verdens antidopingbyrå (WADA) sin dopingliste i klasse «S1 Anabole steroider». Steroidene er forbudt i alle tilfeller når de er tilført eksogent, altså utenfor kroppen (2).

Litteraturstudiet omhandler metoder for å påvise anabole steroider i urin. Metodene inkluderer prøveopparbeidelse og kromatografisk analyse av anabole steroider og metabolitter. Aktuelle prøveopparbeidelser er væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE). Den kromatografiske analysen består av væskrokromatografi (LC) med tandem massespektrometri (MSMS) og gasskromatografi (GC) med massespektrometri (MS)/MSMS.

Det gjøres en vurdering av ulike metoder med tanke på hvordan metoden utføres. I tillegg vurderes valideringsparametrene deteksjonsgrense (LOD), kvantifiseringsgrense (LOQ), presisjon, nøyaktighet, utbytte, sensitivitet og spesifisitet. Til slutt gjøres en sammenfatning og vurdering av helheten, for så å kunne trekke en konklusjon på hvilke metoder som anbefales.

Tabell 1: Steroider inkludert i denne oppgaven med navn og forkortelse i parentes, struktur og molekylvekt (M.W) oppgitt i g/mol.

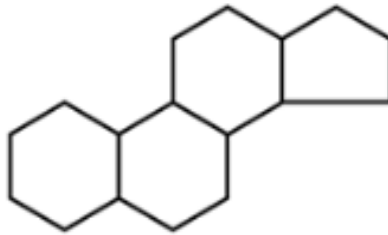
<p><b>Boldenon (BOLD)</b> M.W = 286</p> 	<p><b>5β-androst-1-en-17β-ol-3-on (BOLDm)</b> M.W = 288</p> 	<p><b>Drostanolon (DROST)</b> M.W = 302</p> 	<p><b>2α-metyl-5α-androstan-3α-ol-17-on (DROSTm)</b> M.W = 304</p> 	<p><b>Mesterolol (MEST)</b> M.W = 304</p> 
<p><b>1α-metyl-5α-androstan-3α-ol-17-on (MESTm)</b> M.W = 304</p> 	<p><b>Metandienon (METAN)</b> M.W = 300</p> 	<p><b>Epimetendiol (METANm)</b> M.W = 304</p> 	<p><b>4-dehydroklormetyltestosteron (METANd)</b> M.W = 335</p> 	<p><b>Metenolon (METEN)</b> M.W = 302</p> 
<p><b>1-metylen-5α-androstan-3α-ol-17-on (METENm)</b> M.W = 302</p> 	<p><b>Nandrolon (NAND)</b> M.W = 274</p> 	<p><b>19-norandosteron (NANDm)</b> M.W = 276</p> 	<p><b>19-noretiocholanolon (NANDme)</b> M.W = 276</p> 	<p><b>Oksandrolon (OKSAN)</b> M.W = 306</p> 
<p><b>17epi-oksandrolon (OKSANm)</b> M.W = 306</p> 	<p><b>Oksymesteron (OKSYMES)</b> M.W = 318</p> 	<p><b>Oksymetolon (OKSYMET)</b> M.W = 332</p> 	<p><b>17α-metyl-5α-androstan-3α,17β-diol (OKSYMETm)</b> M.W = 306</p> 	<p><b>Stanozolol (STAN)</b> M.W = 328</p> 
<p><b>3-OH Stanozolol (STANm)</b> M.W = 344</p> 	<p><b>Testosteron (TEST)</b> M.W = 288</p> 	<p><b>Epitestosteron (TESTm)</b> M.W = 288</p> 	<p><b>Trenbolon (TREN)</b> M.W = 270</p> 	<p><b>17α-trenbolon (TRENm)</b> M.W = 270</p> 

## 1.2 Anabole steroider og doping

Steroider er lipider som er avledet fra en mettet forbindelse kalt

«cyclopentanoperhydrophenanthrene» bestående av en kjerne med fire ringer, se figur 1.

Noen av de viktigste steroidderivatene er steroler (kolesterol), gallsyrer, kjønnshormoner (østrogener og androgener), vitamin D og kortikosteroider (3).



Figur 1: Grunnstrukturen til et steroid.

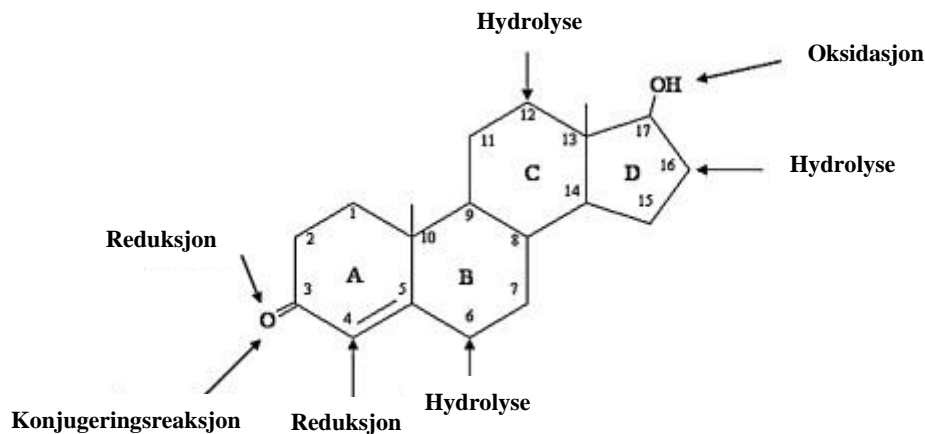
Anabole steroider er syntetiske varianter av det mannlige kjønnshormonet testosteron. De betegnes ofte som «anabole androgene steroider» (AAS), hvor anabol refererer til muskelvekst og androgen refererer til økt mannlige kjønnskarakteristika (4). Kroppens mannlige kjønnshormoner blir kalt androgener og disse produseres i testiklene, binyrebarken og ovariene (5). Det finnes mange ulike AAS og metabolitter av disse. AAS blir i all hovedsak benyttet som ulovlige prestasjonsfremmende midler, men brukes også som medisin (6). Testosteron har blitt benyttet som doping fra ca. 1950-tallet (7). Ved doping blir AAS tatt i såkalte «suprafysiologiske doser», som vil si at inntatt dose overstiger mengden testosteron kroppen selv produserer (8).

Steroid er fettløselig og blir derfor fraktet i blodet bundet til globuliner eller albumin (9). AAS virker ved at de diffunderer gjennom cellemembranen og inn i målcellens cytoplasma. Her binder de seg til spesifikke reseptorer, androgenreseptorer, som fører til økt transkripsjon og proteinsyntese. Dette vil for eksempel kunne gi økt muskelmasse (5). Androgenreseptorene finnes i de fleste vev i kroppen, og funksjonen til AAS er avhengig av målorganet, hvor de spesifikke reseptorene befinner seg (7).

Modifisering av testosteron gjøres for å bedre spesifikke effekter av AAS og fremheve den effekten som er ønskelig (10). Effektiviteten til AAS er relatert til absorpsjonshastigheten som vil si hvor raskt et legemiddel blir tatt opp i blodet, som igjen avhenger av hvordan steroidet er inntatt. AAS er blant annet tilgjengelig i kapsler, tabletter, gel, lapper og injeksjoner.

Steroider tatt oralt er den mest konvensjonelle metoden, mens injeksjoner er den mest effektive (11).

Etter absorpsjon og distribusjon blir steroidene fraktet til leveren hvor de blir metabolisert. Metabolittene dannes ved metabolske reaksjoner, klassifisert som fase I og fase II metabolisme. Ved fase I skjer det enzymatiske reaksjoner som oksidasjon, reduksjon og hydrolyse, se figur 2. Det dannes da små polare grupper som gjør steroidet mer polart. Siden steroider er store upolare molekyler, blir de ikke tilstrekkelig vannløselige for utskillelse i urin etter fase I metabolisme og går derfor gjennom en fase II metabolisme (12). Ved fase II metabolisme skjer det en konjugeringsreaksjon med anabole steroider (eller deres metabolitter) og polare grupper, som glukuronsyre eller sulfat (9). Dette gjør steroidene tilstrekkelig vannløselige for utskillelse i urin (12).



Figur 2: Et anabolt steroid, hvor pilene viser ulike områder på steroidet der det skjer metabolske reaksjoner (13).

AAS finnes naturlig i kroppen og er da endogene. Når de blir dannet utenfor kroppen kalles de eksogene, og inntak av disse er forbudt. Det kan være vanskelig å skille mellom eksogene og endogene steroider, siden noen steroider også produseres normalt i kroppen, som for eksempel testosteron. For å skille mellom endogent og eksogent testosteron brukes forholdet mellom testosteron og epitestosteron. Epitestosteron finnes normalt i kroppen i samme mengde som testosteron. Dette er en epimer av testosteron som mangler evnen til å binde seg til androgenreseptorer, og er derfor ikke anabolt. Ved eksogent inntak av testosteron blir ikke epitestosteronmengden påvirket. Dermed kan testosteron/epitestosteron ratioen brukes til å skille mellom endogent og eksogent testosteron. Epitestosteron kan brukes i tillegg til testosteron, som et maskeringsstoff, for å skjule det eksogene inntaket av testosteron (13,14).

### 1.3 Analyse av anabole steroider

AAS har blitt analysert siden 1970-tallet. I starten var det hovedsakelig immunologiske metoder som ble benyttet. GC tok etter hvert over den største delen av disse analysene. Etersom AAS er upolare var GC den enkleste kromatografiske metoden å analysere de på (15). GC har vært brukt for screening, og er sensitiv og robust. GC er tidskrevende med tanke på prøveopparbeidelse som inkluderer derivatisering (13). LC-MS(MS) ble etter hvert mer aktuell for bruk, med tanke på kvantitering av steroider og metabolitter (15,16). LC har en enklere og mer effektiv prøveopparbeidelse, da den ikke krever derivatisering for å få steroidene flyktige. Likevel skaper LC utfordringer i forhold til ionisering av steroidene og identifikasjon av disse. LC er også mer sensitiv for matrikseffekter (15). Videre forbedringer som rask og effektiv separasjon er blitt oppnådd ved bruk av «Ultra High Performance Liquid Chromatography» (13,17). De siste årene er det også blitt utviklet metoder for direkte påvisning av fase II metabolitter (18).

#### 1.3.1 Gasskromatografi

I GC vil mobilfasen alltid være en gass, mens stasjonærfasen kan være et fast stoff eller en ikke flyktig væske. Den sist nevnte er den vanligste formen å benytte. For at stoff skal kunne analyseres ved hjelp av GC må stoffet være stabilt og flyktig ved temperaturen som brukes (19). AAS er i utgangspunktet ikke flyktige og de må derfor derivatiseres før separasjonen, som forklart i kapittel 1.7.

Mobilfasen frakter analyttene gjennom kolonnen og separasjonen skjer basert på affinitet til stasjonærfasen og flyktighet. Valg av gass er avhengig av kolonnetype og detektortype. Gassene som brukes er lite reaktive, som for eksempel helium eller nitrogen. Det er viktig at forholdene i kolonnen er stabile, nøye regulert, og at det er en konstant strøm gjennom kolonnen (20). Dette er for at retensjonstidene til stoffene skal være reproducerbare og tilnærmet konstante. Forholdene som utgjør separasjonen i GC er kolonnetype, bæregass, gassflow og temperatur. Nøyaktig regulering av temperatur er viktig, ettersom gassen endrer viskositet avhengig av temperaturen (20).

#### 1.3.2 Væskekromatografi

Ved LC er mobilfasen en væske og stasjonærfasen en kolonne som inneholder små partikler. Separasjonen er basert på fordelingen av stoff mellom stasjonærfasen (SF) og mobilfasen (MF) (20). LC kan deles i normal-fase- og omvendt-fase kromatografi. I normal-fase er SF polar og MF upolar. Dermed vil analyttene bli separert etter polaritet. I omvendt-fase vil SF

og MF ha motsatt egenskap, og analyttene separeres etter hydrofobisitet. AAS er upolare stoff og separeres etter hydrofobisitet. I LC kan væskeprøver brukes direkte, som kan være en fordel i forhold til GC (20).

Stoffene i LC som passerer gjennom kolonnen vil kunne påvirkes av både sammensetningen til mobil- og stasjonærfasen, som skiller LC fra GC. Det er derfor viktig å ta hensyn til sammensetningen av MF ved justering av retensjonen i LC. Styrken til MF handler om evnen til å forflytte analytten, og egenskapen vil være avhengig av metoden som brukes. En sterk MF vil gi kortere retensjonstid enn en svak, fordi MF da har stor evne til å forflytte analytten gjennom kolonnen, og analytten holdes lite igjen av den stasjonære fasen. Dermed fraktes analytten raskt gjennom kolonnen (21).

### 1.3.3 Massespektrometri

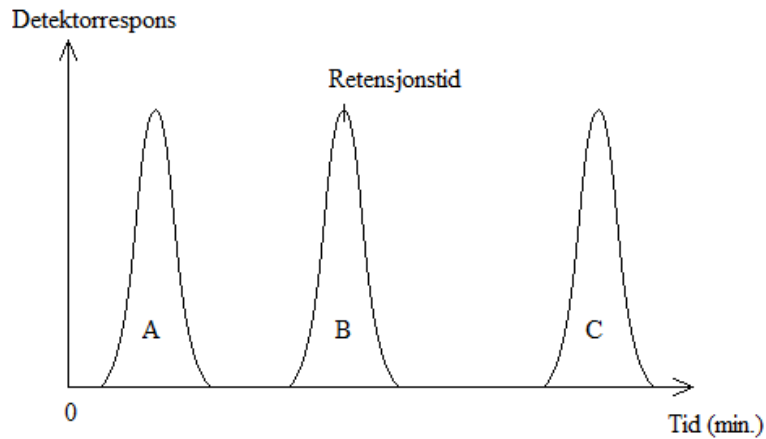
MS brukes til å detektere analyttene, og kan være koblet til GC eller LC (20).

Masseanalysatoren i MS er alltid under vakuum. Dette er helt essensielt slik at ionene ikke kolliderer med hverandre eller andre molekyler i løpet av interaksjonen med det magnetiske feltet. For å oppnå vakuum kreves et lavt trykk. Det er ikke mulig å oppnå et slikt trykk med væske, og analyttene må derfor være i gassfase (19,22). GC kombinert med MS er derfor en enkel metode fordi analyttene er lettflyktige og allerede i gassfase (22). LC kombinert med MS vil være mer utfordrende da det oppstår et kritisk punkt med fordampning av løsemidlene ettersom at væske ikke kan føres direkte inn i vakuum (19,23).

Analyseteknikken baseres på at molekylene fra kolonnen i kromatografienheten blir ionisert og fragmentert i ionekilden. En ionekilde sørger for dannelse av molekylioner. Graden av fragmentering avhenger av molekylets struktur og energien som tilføres ved ioniseringen. De ioniserte molekylene og fragmentene blir deretter separert i en masseanalysator etter masse/ladning forhold ( $m/z$ ). Tilslutt blir de utvalgte ionene detektert av en detektor (22).

Masseanalysatoren kan være innstilt til å separere ut ulike  $m/z$ -verdier, enten over et område av  $m/z$ -verdier som prøven inneholder eller ved å velge ut spesifikke  $m/z$ -verdier. Dette gjøres ved å endre styrken på magnetfeltet i masseanalytoren. Når MS er programmert til å detektere et område av  $m/z$ -verdier kalles det et «scan». Dette gir mer informasjon om hva som befinner seg i prøven. Når det velges ut spesifikke  $m/z$ -verdier, heter det «single ion monitoring» (SIM) ved bruk av MS og «multiple reaction monitoring» (MRM) ved bruk av MS/MS. Ved en slik innstilling blir bare den aktuelle  $m/z$ -verdien detektert, men det gir en lavere deteksjonsgrense (23).

Resultatet fra en kromatografisk analyse presenteres som funksjon av tid eller volum, se figur 3 for illustrasjon. Dette gir informasjon om separasjonen i kolonnen, som kan brukes til identifikasjon og kvantifikasjon av stoff i løsningen (19,20).



Figur 3: Kromatogram av stoffene A, B og C med ulik retensjonstid.

Kvantitative kromatografiske analyser baseres på sammenhengen mellom retensjonstiden til stoffene og detektorens respons av stoffmengden. Konsentrasjonen av stoff i prøven blir beregnet ved bruk av standarder ved å sammenligne areal/høyde til kurvene (22).

#### 1.4 Internstandard

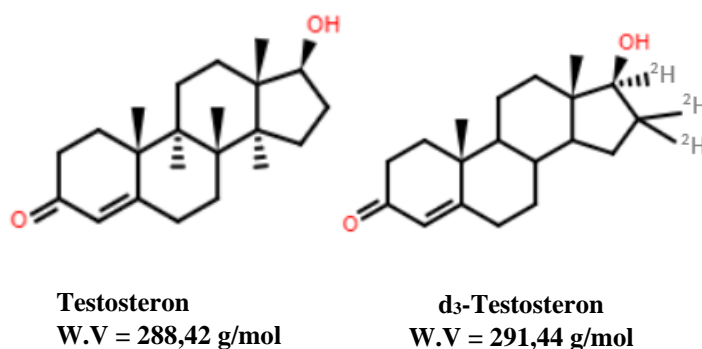
Internstandard (IS) består av en kjent komponent som blir tilsatt i en kjent mengde til hver prøve, før annen behandling av prøven settes i gang. IS tilsettes ofte i en mengde som gir en respons tilsvarende midten av kalibreringskurven. Hensikten med å ha internstandard er å kunne korrigere for mengde mistet stoff under prøveopparbeidelsen og endringer i analysebetingelsene, som for eksempel endringer i injeksjonsvolum eller ionisering under selve analysen (19).

Det stilles krav til en internstandard for at den skal være godkjent for bruk. IS må ikke være til stede i prøven fra før, den må være stabil og ikke reagere med komponenter som er til stede under analysen. Det er svært viktig at IS har kjemisk like egenskaper som analytten, men fortsatt kan skilles fra analytten og andre stoff i prøven. Kjemisk like egenskaper er nødvendig for å oppnå et likt utbytte for analytt og IS under prøveopparbeidelse. Når IS har lik polaritet som analytten, vil IS og analytten fordeles likt i LLE, se kapittel 1.6.1. Ratioen analytt/IS, som brukes til å beregne konsentrasjonen, vil dermed forbli konstant uansett hva som skjer med prøven.



Dersom IS har en annen polaritet enn analytten, vil stoffene fordele seg ulikt i væskene, og dermed oppstår en annen analytt/IS ratio. Dette vil resultere i feil konsentrasjon (19).

En vanlig måte å fremstille IS på er ved å bruke deuterium( $^2\text{H}$ ). Dette er en isotop av hydrogen som inneholder et ekstra nøytron, og vil derfor være noe tyngre enn hydrogen. Ved å bytte ut noen av hydrogenatomene på analytten med deuterium, vil molekylmassen bli ulik den opprinnelige analytten, men fortsatt ha kjemisk like egenskaper (19). IS kan på bakgrunn av den ulike molekylmassen skilles fra analytten, som for eksempel testosteron og  $d_3$ -testosteron som vist i figur 4.

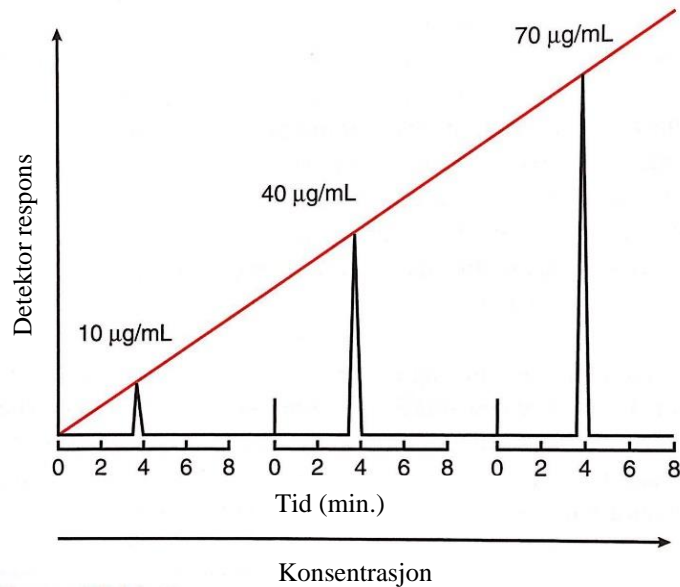


Figur 4: Sammenlikning av steroidet testosteron og IS  $d_3$ -Testosteron

WADA anbefaler  $^2\text{H}$ - eller  $^{13}\text{C}$ -merket endogent steroid som IS for AAS. Når  $^2\text{H}$  eller  $^{13}\text{C}$  blir brukt bør IS helst inneholde tre isotoper av disse for å kunne skille mellom massen til steroidet og massen til IS. Steroidet  $17\alpha$ -metyltestosteron eller andre eksogene steroider kan også brukes, men disse vil omdannes til metabolitter av eksogene steroider og kan interferere med metabolitter i urinprøven. WADA anbefaler derfor ikke bruk av eksogene steroider. Det vil likevel ikke være optimalt å benytte isotopmerkede endogene steroider ved analyse av testosteron og epitestosteron. Dette er fordi lave endogene konsentrasjoner kan interferere med IS. Av WADA blir det også anbefalt å gjøre en ekstraksjon, SPE, før hydrolyse for å vaske prøven for å hindre uønskede reaksjoner med IS (24).

## 1.5 Standard

En kalibreringsfunksjon er forholdet mellom instrumentets signal og konsentrasjonen av analytten. Forholdet etableres ved å måle kjente konsentrasjonsløsninger kalt kalibratorer. Innen kromatografi blir kalibratorer ofte kalt for standarder. Standardkurver kan være lineære eller kurvede (20). Se figur 5 for eksempel på lineær standardkurve.



Figur 5: En lineær sammenheng med proporsjonalitet mellom detektorens respons ( $y$ ) og konsentrasjon ( $x$ ) (20)

Standardene blir analysert på samme måte som prøven, og responsen for hver standard plottes som funksjon av konsentrasjon. Mengden av en komponent i en prøve bestemmes ut fra standardkurven (22). Ved kromatografiske analyser er det vanlig å kalibrere ved hver analyseserie, i motsetning til andre automatiserte instrumenter der forholdet mellom analytt, konsentrasjon og signal ofte er stabilt over lengre tid (20).

## 1.6 Prøveopparbeidelse

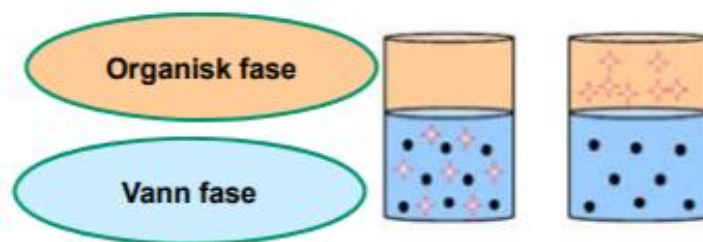
Før AAS blir analysert, vil det være gunstig å gjøre en prøveopparbeidelse av prøvematerialet. Ved prøveopparbeidelsen vil aktuelle komponenter i kompleks urin bli selektert ut, mens interfererende substanser og komponenter som kan ødelegge kolonnen i GC/LC blir fjernet, som for eksempel protein og salter. På denne måten vil analysekolonnen forbli ren over lengre tid som vil bidra til redusert vedlikehold og utskiftning av kolonnen, som igjen gir en økonomisk fordel (25). Prøveopparbeidelsen gjør også at små mengder av aktuelt stoff kommer bedre frem, slik at det blir detektert (22). Som et alternativ til prøveopparbeidelse kan urinen fortynnes før analysen, men prøvene vil ikke bli like rene. Prøvekomponenter som salter kan for eksempel endre ioniseringseffektiviteten i massespektrometeret (25). Prøveopparbeidelse kan utføres ved fortynning, proteinfelling med/eller uten fjerning av fosfolipider, LLE eller SPE (26).

Når det velges ekstraksjonsmetode, må polariteten til steroidet vurderes. Ekstraksjonen skal ekstrahere ut og skille de aktuelle steroidene fra andre steroid og interfererende substanser.

AAS er svært like, i struktur og polaritet, og det er utfordrende å skille ut de steroidene som er av interesse. I praksis vil alle steroider med lik polaritet bli ekstrahert. Dette kan føre til at interfererende steroider er til stede i prøven (9). De viktigste metodene for å rense, isolere og konsentrere stoff fra væsker er LLE og SPE (22). Begge metodene kan også automatiseres der LLE er en enkel teknikk som benytter rimelige reagenser. Ved SPE derimot trengs det mindre løsemiddel enn ved LLE (27).

### 1.6.1 Væske-væske ekstraksjon

LLE har lenge vært en effektiv metode for å separere stoff med forskjellig løselighet i to ikke blandbare væsker. Den ene løsningen er ofte en vandig løsning, mens den andre er et ikke-polart organisk løsningsmiddel som for eksempel etylacetat. Vanligvis foretrekker polare stoff det vandige laget, mens upolare stoff ekstraheres i det organiske laget, se figur 6. Ettersom AAS er upolare stoff vil de fordele seg i det organiske laget (28). For å klare å ekstrahere ut stoffet fra den ene væskefasen er det viktig med optimale betingelser. Dette blir oppnådd ved valg av løsningsmiddel, temperatur, pH og ionestyrke (22).



Figur 6: Skisse av prinsippet for LLE. Sort runding er polart stoff og stjerne er upolart stoff (27).

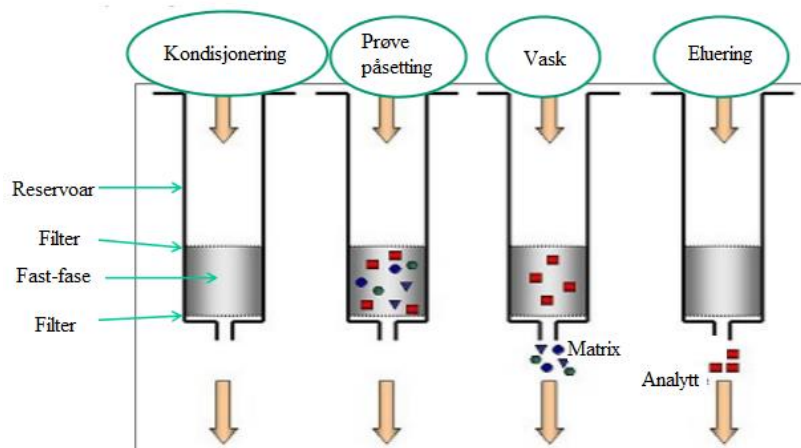
### 1.6.2 Fast-fase ekstraksjon

SPE er en av de mer brukte prøveopparbeidelsene for væsker eller faste prøver som har blitt gjort flytende ved hjelp av oppløsning eller ekstraksjon. SPE kan også benyttes for gassprøver ved å fange dem på en overflate til et fast materiale kalt sorbent (28).

Ekstraksjonen baserer seg på stoff sin fordeling mellom væske og sorbent, i en kolonne. På overflaten av den faste fasen er det kjemiske grupper som har affinitet til analytten. Det er ønskelig at den faste fasen har god interaksjon med analytten, og liten interaksjon med eventuelle forurensninger i prøven. På denne måten vaskes uønskede substanser vekk fra matriksen, som figur 7 viser. Det er vanlig å benytte silikagrupper i den faste fasen.

Dette er et fast materiale som ikke sveller eller krymper i ulike løsningsmidler, som gjør at det lett kan brukes for mange ulike løsningsmidler (22). SPE består av fire trinn: kondisjonering,

prøve-påsetting, vask og eluering, som figur 7 illustrerer. Først kondisjoneres kolonnen med et passende løsemiddel. Dersom omvendt-fase prinsipp benyttes, blir ofte metanol eller acetonitril brukt (25). Løsemiddelet vil renne gjennom kolonnen slik at eventuelle forurensninger blir fjernet og sorbenten ikke tørker ut. Dersom sorbenten tørker ut kan dette resultere i en redusert ekstraksjon av upolare analytter (28). Videre tilsettes prøven og interaksjoner mellom analytt og sorbent oppstår. AAS er upolare og det bør brukes en kolonne som dermed er upolar ved omvendt-fase prinsipp.



Figur 7: Illustrasjon av fast-fase ekstraksjon (26).

Ved dette tilfellet vil en polar vaskeløsning benyttes, og denne blir ofte tilført flere ganger slik at ønskede matriksstoffer blir filtrert ut. Til slutt tilsettes et løsemiddel (upolart for steroider) slik at de ønskede analyttene blir eluert (25).

### 1.6.3 Hydrolyse

Hydrolyse er en kjemisk nedbryting av stoff ved hjelp av vann. Hydrolysen avhenger av den kjemiske strukturen til stoffet, løselighet, pH og oksidasjonsreduksjonspotensialet (29). Steroidene og metabolittene som er i urin finnes både i ukonjugert og konjugert form, da med glukuronsyre, sulfat eller cystein. For mange av metodene må de konjugerte metabolittene frigjøres for å kunne detektere dem. Dette kan gjøres ved hjelp av hydrolyse. Ved hydrolyse av steroid-konjugat med glukuronsyre blir ofte enzymet  $\beta$ -glukuronidase brukt, men det kan også gjøres ved hjelp av oksidering. For å bryte opp binding med sulfat blir det ofte gjort en solvolyse med etylacetat (30).

### 1.7 Derivatisering

Derivatisering er en teknikk som gjør at den kjemiske strukturen til stoffet endres til et produkt med lignende kjemisk struktur. Dette gjøres ofte ved å omdanne protoniske grupper

til upolare grupper, ved hjelp av derivatiserende reagenser som for eksempel trimetylsilyl (TMS). GC krever flyktige stoff, men AAS er i utgangspunktet ikke flyktige. Ved hjelp av derivatisering omdannes AAS til flyktige og termisk stabile stoff, slik at de kan analyseres med GC. Derivatiseringen gjøres også for å øke deteksjonen. For stoff som reagerer raskt kan derivatiseringen gjøres under injeksjonen. For stoff som er lite reaktive må derivatiseringen gjøres før injeksjonen (22).

## 1.8 Akkreditering

«Akkreditering er en offisiell anerkjennelse av en organisasjons kompetanse og evne til å utføre angitte oppgaver i samsvar med gitte krav fra et internasjonalt anerkjent akkrediteringsorgan» (31). Akkreditering har som hensikt å sikre at brukerne ved laboratoriet velger testmetoder og utgir analyseresultater som holder optimal standard. For å være akkreditert må aktiviteten som blir utført fylle internasjonale krav som stilles til både kunnskap og kvalitet innenfor fagområdet. Det må også finnes dokumentasjon over aktiviteten som er utført, samt at valideringen er tilfredsstillende. Akkrediteringen er et kvalitetsstempel og en formell anerkjennelse som viser at laboratoriet er kompetent til å utføre bestemte oppgaver (31–33).

Laboratorier som utfører dopinganalyser må være akkreditert etter ISO/IEC 17025-kravene (34). AKF ved St. Olavs Hospital, Trondheim er akkreditert av Norsk Akkreditering etter NS-EN ISO 15189:2012 (1). Denne akkrediteringsstandarden har flere like krav som 17025, men er mer tilpasset medisinske laboratorier (32). AKF har vært akkreditert innen området klinisk farmakologi (M04) og prøvetaking (M30) siden 2006. I 2015 ble akkrediteringen utvidet til fleksibelt akkrediteringsomfang (M31).

## 1.9 Validering og verifisering

Validering er en del av kvalitetssikringen som blir utført i medisinske laboratorier. Dette handler om å dokumentere og skaffe bevis på at en metode oppfyller de krav som er satt for analysen. Hensikten er å teste om metoden er egnet for sitt formål. Før testingen starter og utføres er det viktig at kravene er satt. Dette for at vurderingen skal være objektiv (35).

Validering skal gjøres når nye analyser skal innføres i laboratoriet dersom det ikke er tilstrekkelig valideringsdokumentasjon fra leverandør. Det skal også utføres ved endring av metode eller utstyr i forhold til hva som er oppgitt å bruke (35).

Verifisering kommer etter den eventuelle valideringen. Dette går ut på å dokumentere at metoden fungerer som den skal i laboratoriet. Det skal gjøres en verifisering ved innføring eller endring av metode der valideringen allerede er dokumentert, eller etter valideringen som er gjort (35).

## 1.10 Valideringsparametre

AKF har en rekke valideringsparametre som undersøkes ved implementering av en ny analysemetode i rutinebruk (36). I denne litteraturstudien er det valgt å fokusere på valideringsparametrene måleområde og linearitet, deteksjons- og kvantifiseringsgrense, sensitivitet og spesifisitet, presisjon, nøyaktighet og utbytte.

### 1.10.1 Måleområde og linearitet

Måleområdet vil si det området som er ønsket å måle konsentrasjoner i.

Analyttkonsentrasjonen i dette området er innenfor erklærte verdier for presisjon og riktighet (21). Det er ønskelig at kalibreringskurven skal være lineær innenfor måleområdet.

Linearitet handler om hvilket området analysen kan gi et signal som er direkte proporsjonal med analytten (35). Lineariteten til standardkurven bestemmes ved bruk av korrelasjonskoeffisienten  $r^2$ .  $r^2$  bør være  $\geq 0,985$  (36).

### 1.10.2 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

LOD er den laveste verdien som kan måles og skiller seg signifikant fra blankprøven (20).

Ved AKF må kurven i kromatogrammet være minst tre ganger høyere enn støylinjen, som tilsvarer signal til støy forhold ( $S/N$ )  $> 3$ , for kvalifiseringsioner (36). WADA har laget en nedre grense for deteksjon og identifikasjon av AAS og metabolitter kalt «Minimum Required Performance Level» (MRPL). Alle laboratorier som skal analysere dopingprøver må ha LOD tilsvarende minimum 50% av MRPL. Grensene for MRPL for AAS er 5 ng/mL, unntatt for METAN, STAN, STANm, NAND, NANDm, NANDme der grensen er 2 ng/mL (37).

LOQ er den nedre grensen som kan brukes til å kvantifisere stoff og må fylle kravene som er satt for presisjon og riktighet for analysen (20). LOQ skal ved AFK ha  $S/N > 10$  for kvalifiseringsioner og  $S/N > 30$  for kvantifiseringsion. Nøyaktigheten skal være innenfor sann verdi  $\pm 20\%$  (36).

### 1.10.3 Sensitivitet og spesifisitet

Analytisk sensitivitet er evnen den analytiske metoden har til å vurdere små variasjoner i konsentrasjonen av analytten. Sensitivitet uttrykkes som helningen (slope) på standardkurven. I tillegg til helningen, bør også tilfeldig variasjon tas i betraktning. Jo mindre tilfeldige feil i instrumentets respons og brattere helning, desto bedre skille mellom små forskjeller i analyttkonsentrasjonen. På denne måten vil sensitiviteten avhenge av presisjonen til metoden (20).

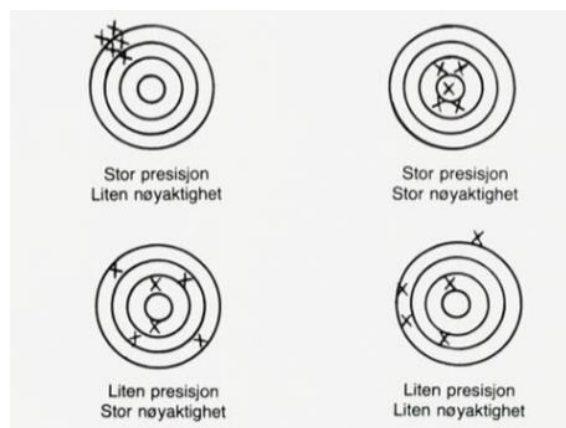
Analytisk spesifisitet er analysemetodens evne til å kun måle den ønskede analytten i nærvær av potensielt interfererende stoff eller faktorer i prøven (20). For å finne spesifisiteten gjøres en undersøkelse av matrikseffekten (ME). Det gir et uttrykk for hvor god metoden er til å skille analytt fra andre endogene forbindelser som vil kunne skape interferens for analysen under ioniseringen. ME bør ifølge AKF ligge mellom 75% og 125%, der >100% indikerer økt ionisering av analytt og <100% indikerer tap av analytt i matriks (36).

### 1.10.4 Presisjon

Presisjon er et mål for hvor like uavhengige resultat som er analysert under faste bestigelser er, og er et spredningsmål. Dette blir som oftest uttrykt som de statistiske parameterne standard avvik (SD) og variasjonskoeffisient (CV), se formel under.

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} * 100$$

Presisjon baserer seg på tilfeldige feil og har ikke sammenheng med riktigheten til målingene. En analyse kan dermed ha god presisjon, men dårlig riktighet, se figur 8. Det skilles mellom to typer presisjon: repeterbarhet og reproduserbarhet (20).



Figur 8: Illustrasjon av forskjellen mellom presisjon og nøyaktighet (19)

Repetierbarhet, også kalt innen-serie presisjon, er et mål for presisjon på spredningen mellom vellykkede målinger utført under de samme forholdene og betingelsene (20). Akseptkriteriene ved AKF er  $CV \leq 10,0\%$  (36).

Reproduserbarhet, også kalt dag-til-dag presisjon, er spredningen mellom analysesvar av det samme prøvematerialet utført i ulike måleserier (20). Akseptkriteriene ved AKF er  $CV \leq 15,0\%$  (36).

#### 1.10.5 Nøyaktighet

Nøyaktighet, som er et riktighetsmål for en analyse, er beskrevet som overensstemmelse mellom den gjennomsnittlige verdien fra en større måleserie og sann verdi, se figur 8.

Nøyaktighet kan uttrykkes som bias eller avvik fra sann verdi, se formel under (20).

$$\% \text{BIAS} = \% \text{avvik fra sann verdi} = \frac{(\bar{x} - x_{sann})}{x_{sann}} * 100$$

Akseptkriteriet for nøyaktighet er avvik fra teoretisk verdi  $\leq 15,0\%$  ved AKF (36).

#### 1.10.6 Utbytte

Utbytte, også kalt recovery, handler om hvor stor mengde av stoffet i prøven som faktisk blir analysert og detektert i analysen, i forhold til den totale mengden av stoffet i prøven. Utbyttet i kromatografiske analyser handler om hvor mye analytt som er igjen etter

prøveopparbeidelsen og dermed blir detektert. Det anbefales å ha et utbytte  $> 70\%$ , men lavere utbytte kan aksepteres dersom metoden viser god presisjon (36).



## 2 Problemstilling

Oppgavens hovedmålsetting er å gi en anbefaling av en metode for å analysere anabole steroider i urin. Litteraturstudie bygger på artikler som beskriver bruk av LC-MSMS og GC-MS(MS) for å analysere aktuelle anabole steroider. Studiet er knyttet til sammenligning og vurdering av prøveopparbeidelse, kromatografisk separasjon og massespektrometrisk deteksjon, samt metodenes valideringsresultater.

Problemstillingen er satt opp ut fra metodebeskrivelser i aktuelle artikler (18,38–43) som analyserer opptil 20 ulike anabole steroider fra de 25 aktuelle (boldenon, 5 $\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-on, drostanolon, 2 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, mesterolone, 1 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, metandienon, epimetendiol, 4-dehydroklormetyltestosteron, metenolon, 1-metylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, nandrolon, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, oksandrolon, 17 $\beta$ -epi-oksandrolon, oksymesteron, oksymetolon, 17 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, stanozolol, 3-OH stanozolol, testosteron, epitestosteron, trenbolon og 17 $\alpha$ -trenbolon).

«Hvordan kan metodene rangeres i klasse I – anbefalt metoder, II – brukbare metoder og III – ikke anbefalte metoder med tanke på LOD, presisjon, anbefalinger fra WADA og hvordan metoden utføres (prøveopparbeidelse, kromatografisk separasjon og massespektrometrisk deteksjon)?»

## 3 Materialer og metode

### 3.1 Materialer

Aktuelle artikler brukt i litteraturstudiet som analyserer anabole steroider ved bruk av LC-MSMS og GC-MS(MS) er satt opp i tabell 2.

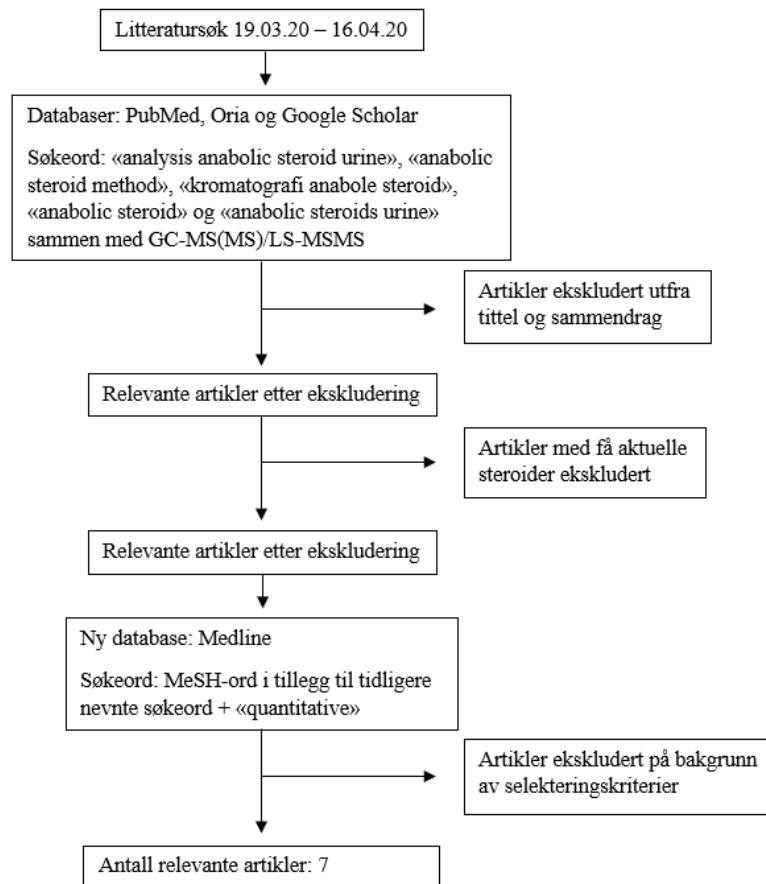
For å forenkle henvisninger i oppgaven er metodene navngitt alfabetisk. Metode F har fem metoder og navngitt som «F1, F2, osv..».

Tabell 2: Artikler med forfattere, utgivelsesår, steroider aktuelle for AKF, metode benyttet, alfabetisk navngivelse av metodene og referanse.

Artikkel	Forfattere	Utgivelsesår	Steroider	Metode	Navngivelse av metodene	Referanse
LC-ESI/MS/MS method for rapid screening and confirmation of 44 exogenous anabolic steroids in human urine	Byoung Wook Jeon, Hye Hyun Yoo, Eun Sook Jeong, Ho Jun Kim, Changbae Jin, Dong Hyun Kim, Jaeick Lee	2011	BOLD, BOLDm, DROSTm, MESTm, METAN, METEN, NAND, NANDm, OKSAN, OKSANm, OKSYMES, STAN, STANm, TREN, TRENm	LC-ESI-MSMS	A	(38)
Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Oscar J. Pozo, Peter Van Eenoo, Koen Deventer, Frans T. Delbeke	2007	BOLD, BOLDm, DROSTm, MEST, MESTm, METENm, NANDm, NANDme, OKSAN, OKSYMES, STANm, TRENm	LC-ESI-MSMS	B	(39)
Analysis of anabolic androgenic steroids as sulfate conjugates using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	S. Rzeppa, G. Heinrich, P. Hemmersbach	2015	BOLD-sulfat, DROSTm-sulfat, MESTm-sulfat, METEN-sulfat, METENm-sulfat, NANDm-sulfat, NANDme-sulfat, TREN, TRENm-sulfat	LC-ESI-MSMS	C	(40)
Screening for anabolic steroids in sports: Analytical strategy based on the detection of phase I and phase II intact urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry	Georgina Balcells, Oscar J. Pozo, Argitxu Esquivel, Aristotelis Kotronoulas, Jesús Joglar, Jordi Segura, Rosa Ventura	2015	BOLD-glukuronsyre, BOLD-sulfat, BOLDm-glukuronsyre, DROSTm-glukuronsyre, MESTm-glukuronsyre, METENm-glukuronsyre, NAND-glukuronsyre, NAND-sulfat, NANDm-sulfat, NANDm-glukuronsyre, NANDme, glukuronsyre, NANDme-sulfat, OKSAN, OKSANm, OKSYMETm-glukuronsyre, STANm-glukuronsyre	LC-ESI-MSMS	D	(18)
Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry	J. Marcos, J.A.Pascual, X. de la Torre, J. Segura	2002	BOLD, BOLDm, DROSTm, MESTm, METEN, METENm, NAND, NANDme, OKSAN, OKSANm, OKSYMES, OKSYMETm, STANm	GC -MSMS	E	(41)
Sensitivity of GC-EI/MS, GC-EIMSMS, LC-ESI-MSMS, LC-Ag+-CIS/MSMS, and GC-ESI-MSMS for analysis of anabolic steroids in doping control	Eunju Cha, Sohee Kim, Ho Jun Kim, Kang Mi Lee, Ki Hun Kim, Oh-Seung Kwon, Jaeick Lee	2015	BOLD, BOLDm, MESTm, METAN, METANm, METANd, METEN, METENm, NAND, NANDm, NANDme, OKSAN, OKSANm, OKSYMES, OKSYMET, OKSYMETm, STAN, STANm, TREN, TRENm	LC-ESI-MSMS	F1	(42)
				LC-Ag <sup>+</sup> -CIS-MSMS	F2	(42)
				GC-EI-MS	F3	(42)
				GC-EI-MSMS	F4	(42)
				GC-ESI-MSMS	F5	(42)
Detection and Quantitation of Anabolic Steroids by LC/MS/MS	Sabbarao V. Kala, Steve E. Harris, Tom D. Freijo, Stan Gerlich	2007	BOLD, MEST, METAN, METEN, NAND, STAN, TEST, TESTm	LC-ESI-MSMS	G	(43)

### 3.2 Metode

Flytskjema over litteratursøk er vist i figur 9. Etter hovedsøket ble det utført et utvidet søk på grunn av manglende litteratur og for å inkludere kvantitative metoder. Nettstedet «mesh.uia.no» ble benyttet til å finne «Medical Subject Headings» (MeSH)-ord. «Anabole steroider» ga MeSH-ordet «anabolic agents», «væskekromatografi» ga MeSH-ordet «chromatography, liquid» og «gasskromatografi» ga MeSH-ordet «chromatography, gas». MeSH-ordene og søkeord oppgitt i figur 9 ble kombinert med «or» og/eller «and» i databasen Medline.



Figur 9: Flytskjema over litteratursøket.

Selekteringskriterier for artiklene:

- Minimum 6 aktuelle steroider
- Grad av opplysninger angående metodeutførelse
- Grad av validering
- Grad av metodediskusjon

Av de syv utvalgte artiklene var det kun én artikkel som inneholdt en kvantitativ metode, mens de resterende var kvalitative. De utvalgte artiklene inkluderte elleve metoder og alle steroidene er vist i tabell 1. Aktuelle artikler som ble valgt er satt opp i tabell 2.

## 4 Resultat og diskusjon

### 4.1 Prøveopparbeidelse og derivatisering

Hovedtrekkene i prøveopparbeidelse og derivatisering er presentert i tabell 3. Likheter mellom metodene er trukket ut og diskutert.

#### 4.1.1 Forbehandling

Noen av metodene utførte forbehandling av prøvematerialet før prøveopparbeidelse. Forbehandlingen omhandlet tilsetning av IS, fortynning, oppkonsentrering av prøvematerialet og SPE. For metode A (38) og F1 – F5 (42) ble det gjort en SPE av prøvematerialet. Dette ble utført med en PAD1-kolonne. WADA anbefaler laboratorier å inkorporere SPE for å rense prøven før enzymatisk hydrolyse. Dette gjøres for å unngå at eventuelle mikrober i urinen induserer enzymatiske konverteringer (44). Metode E (41) gjorde en fast-væske-ekstraksjon for å oppkonsentrere prøven med bruk av XAD-2-kolonne.

#### 4.1.2 Hydrolyse

Hydrolyse gjøres for å frigjøre konjugerte metabolitter i prøvemateriale (30). Hydrolyse ble utført i metode A (38), B (39), E (41), F1 – F5 (42) og G (43). I metode C (40) og D (18) ble det ikke utført hydrolyse, da disse metodene analyserte konjugerte AAS. Alle metodene som utførte hydrolyse benyttet seg av  $\beta$ -glukuronidase. Metode B (39) og E (41) brukte  $\beta$ -glukuronidase fra *Escherichia coli* (*E. coli*), mens metode G (43) brukte  $\beta$ -glukuronidase fra *Helix pomatia* (*H. pomatia*). I metode A (38) og F1 – F5 (42) ble ikke enzym oppgitt. WADA sier at hydrolyse skal gjøres med  $\beta$ -glukuronidase fra *E. coli* og spesifiserer at  $\beta$ -glukuronidase fra *H. pomatia* ikke er akseptabelt (45). Enzymaktiviteten er avhengig av pH, og for  $\beta$ -glukuronidase fra *E. coli* er optimal pH 6 – 7 (46). Når hydrolyse blir utført med  $\beta$ -glukuronidase blir bare glukuronsyre-konjugatene frigjort. Andre fase II metabolitter som sulfat-konjugater blir ikke hydrolysert ved denne metoden (40). Det er også blitt oppdaget at glukuronsyre-konjugat kan være lite hydrolyserbart og ufullstendig hydrolyse kan dermed føre til underestimering av noen metabolitter (18). Likevel virker det ikke som dette er et problem siden hydrolyse brukes i de fleste analyser av AAS.

I metode A (38), B (39) og F1 – F5 (42) ble det benyttet en fosfatbuffer (pH 7/7,2). De andre metodene oppga ikke om det ble benyttet buffer. Inkuberingstiden for hydrolysen varierte fra 1 time til 2,5 timer og temperaturen var 55 – 75°C for alle metodene utenom metode E (41), der det ikke ble oppgitt.

### 4.1.3 Ekstraksjon

Ekstraksjon gjøres for å rense prøvematerialet og selektere ut de ønskede komponentene i urinprøven. Dette kan utføres med LLE eller SPE (25). Hos AKF er det mer ønskelig å bruke LLE, grunnet kostnader. Metode A (38), B (39), F1 – F5 (42) og G (43) brukte LLE. Metode A (38), B og F1 – F5 (42) hadde tilnærmet lik LLE, hvor de benyttet det samme løsemiddelet dietyleter (5 mL) ved basisk pH. For å få basisk pH ble kaliumkarbonat benyttet i metode A (38), B (39) og F1 – F5 (42), der metode B (39) benyttet dette i blanding med natriumhydrogenkarbonat. Prøvene ble fordampet under nitrogen ved 40 – 50°C. Metode G (43) skilte seg ut ved at løsemiddelet var heksan og etylacetat. Heksan er både helseskadelig, miljøskadelig og meget brannfarlig (47).

Metode C (40), D (18) og E (41) brukte SPE. Det ble brukt ulike kolonner og løsemiddel som vist i tabell 3. Metode C (40) testet ut ulike kolonnetyper. Kolonner som bare inneholdt C18, viste lavere utbytte og ekstraktene inneholdt en betydelig høyere mengde interfererende stoff, som resulterte i høyere LOD (40). Metode D (18) brukte en C18 kolonne mens metode C (40) brukte en Oasis WAX kolonne. LOD for metode C (40) var betraktelig bedre i forhold til LOD for metode D (18), se vedlegg 2.

### 4.1.4 Derivatisering

For de metodene som benyttet seg av GC, ble det utført en derivatisering. Dette er fordi GC krever flyktige stoff, noe AAS ikke er (22). Metodene dette gjelder for er E (41) og F3 – F5 (42). TMS-derivater ble dannet i disse metodene. Det er i utgangspunktet ikke ønskelig å benytte seg av derivatisering da dette gjør at prøveopparbeidelsen tar lengre tid, blir mer kompleks og kan være en kilde for flere eventuelle feil. I tillegg kan det føre til forurensning av uønskede komponenter fra derivatiseringen, for eksempel reaksjonsbiprodukter fra analytter eller matriksen (28).

Det er ikke alle steroider som klarer å danne gode derivater (18,42). Metode F (42) hadde observert dette ved 4,9,11-trien struktur (42). Av de aktuelle steroidene i denne oppgaven gjelder dette TREN og TRENm.

Tabell 3: Prøveopparbeidelse av urinprøver og derivatisering for kromatografisk analyse av anabole steroider i studerte metoder, samt steroider og internstandarder for metodene.

Metode	Steroider	Internstandard	Forbehandling	Hydrolyse	Væske-væske ekstraksjon (LLE)	Fast-fase ekstraksjon (SPE)		Derivatisering	Referanse
				Enzym	Organisk løsemiddel	Kolonne	Løsemiddel		
A: LC-ESI-MSMS	15 <sup>a</sup>	d <sub>3</sub> -testosteron	SPE Kolonne: PAD-1 Løsemiddel: metanol	β- glukuronidase (pH 7,2)	Dietyleter (pH 11,7)	-	-	-	(38)
B: LC-ESI-MSMS	12 <sup>b</sup>	Oxymetolon	-	β- glukuronidase (pH 7)	Dietyleter	-	-	-	(39)
C: LC-ESI-MSMS	9 <sup>c</sup>	19- norandrosteron-d <sub>4</sub> sulfat	Fortynning 1:4 (m/vann)	-	-	Oasis WAX kolonne	Mettet vandig ammoniakk-løsning i metanol (5%)	-	(40)
D: LC-ESI-MSMS	12 <sup>d</sup>	Androsteron-d <sub>4</sub> - 3-glukuronsyre, Metylttestosteron, Nandrolon-d <sub>3</sub> -17- sulfat, Testosteron-d <sub>3</sub> - 17-glukuronsyre	-	-	-	C18 kolonne	Metanol	-	(18)
E: GC-MSMS	13 <sup>e</sup>	Metylttestosteron	Fast-væske- ekstraksjon Kolonne: XAD-2	β- glukuronidase	-	-	tert-butylmetyleter	TMS-derivater	(41)
F1: LC-ESI-MSMS, F2: LC-Ag <sup>+</sup> -CIS-MSMS, F3: GC-EI-MS, F4: GC-EI-MSMS, F5: GC-ESI-MSMS	20 <sup>f</sup>	-	SPE Kolonne: PAD-1, Løsemiddel: metanol	β- glukuronidase (pH 7,2)	Dietyleter (pH 11,7)	-	-	TMS- derivater <sup>g</sup>	(42)
G - LC-ESI-MSMS	8 <sup>h</sup>	d <sub>3</sub> -stanozolol	-	β- glukuronidase	Heksan og etylacetat (7:1) (alkalisk pH)	-	-	-	(43)

<sup>a</sup> Steroider: BOLD, BOLDm, DROSTm, MESTm, METAN, METEN, NAND, NANDm, OKSAN, OKSANm, OKSYMES, STAN, STANm, TREN, TRENm

<sup>b</sup> Steroider: BOLD, BOLDm, DROSTm, MEST, MESTm, METENm, NANDm, NANDme, OKSAN, OKSYMES, STANm, TRENm

<sup>c</sup> Steroider: BOLD-sulfat, DROSTm-sulfat, MESTm-sulfat, METEN-sulfat, METENm-sulfat, NANDm-sulfat, NANDme-sulfat, TREN, TRENm-sulfat

<sup>d</sup> Steroider: BOLD-glukuronsyre, BOLD-sulfat, BOLDm-glukuronsyre, DROSTm-glukuronsyre, MESTm-glukuronsyre, METENm-glukuronsyre, NAND-glukuronsyre, NAND-sulfat, NANDm-sulfat, NANDm-glukuronsyre, NANDme, glukuronsyre, NANDme-sulfat, OKSAN, OKSANm, OKSYMETm-glukuronsyre, STANm-glukuronsyre

<sup>e</sup> Steroider: BOLD, BOLDm, DROSTm, MESTm, METEN, METENm, NAND, NANDme, OKSAN, OKSANm, OKSYMES, OKSYMETm, STANm

<sup>f</sup> Steroider: BOLD, BOLDm, MESTm, METAN, METANm, METANd, METEN, METENm, NAND, NANDm, NANDme, OKSAN, OKSANm, OKSYMES, OKSYMET, OKSYMETm, STAN, STANm, TREN, TRENm

<sup>g</sup> Gjelder GC-metoder

<sup>h</sup> Steroider: BOLD, MEST, METAN, METEN, NAND, STAN, TEST, TESTm

## 4.2 Kromatografiseparasjon

Separasjonen handler om hvordan de ulike analyttene kan elueres ut til ulik tid. For å få til dette er det viktig å ta hensyn til blant annet kolonne type og mobilfase (22). Tradisjonelt har GC-MS metoder blitt mye brukt, men i dag blir også LC-MSMS metoder benyttet (38,42,43). LC-metoder kan gjøre analysetiden kortere, gi økt sensitivitet og spesifisitet, og analysere steroider som er vanskelig å analysere ved GC. GC-metoder krever i tillegg derivatisering som er tidskrevende (38,42).

Kromatografi-separasjonen for metodene i denne oppgaven utføres med LC eller GC. Syv metoder benyttet LC og fire benyttet GC. For å sammenlikne metodene ble den viktigste informasjonen trukket ut av artiklene og presentert i tabell 4 for LC og tabell 5 for GC.

### 4.2.1 Væskrokromatografi

Alle LC-metodene benyttet en C18-kolonne med ulik størrelse. En kolonne med lengde på 100 mm, indre diameter på 2,0 mm og partikkelstørrelse på 3µm gikk igjen for metode A (38), B (39) og F1 (42). Injeksjonsvolumet varierte fra 10 µL – 20 µL for metodene (18,38–40,42,43). For to av metodene (18,40) ble kolonnetemperaturen oppgitt til å være 40 – 45 °C. Mobilfasen bestod av to løsninger, MF A og MF B. MF A var en vandig løsning og MF B en organisk løsning. Det ble laget en gradient ut ifra den organiske løsningen. Se tabell 4 for sammensetning av MF og gradient. Seks av metodene brukte en flow rate mellom 300 – 400 µL/min., mens metode G (43) benyttet en flow rate på 1000 µL/min. Analysetiden var mellom 5 – 20 min., unntatt for metode F2 (42) som brukte ca. 46 min.

I noen av metodene ble ulike MF og sammensetninger av denne testet ut. Metode B (39) testet ut ammoniumformat og ammoniumacetat som mobilfase. Ammoniumacetat ble foretrukket som mobilfase ettersom bruk av ammoniumformat ga et lavere signal som resulterte i mer interferens i form av bakgrunnsstøy. Ammoniumacetat var også nødvendig for å ionisere og fragmentere noen av steroidene, særlig de med konjugert keto-gruppe, for å få et optimalisert MS signal og kromatografisk separasjon (39). Metode D (18) testet ut ulike mengder av metanol og acetonitril sammen med ammoniumformat. Ammoniumformat gjorde det mulig å danne  $[M+NH_4]^+$ -addukter. Dette hjelper for ionisering av metabolitter uten keto-funksjon ved positiv ionisering. På den andre siden førte bruk av ammoniumformat til et lavere signal ved negativ ionisering (BOLDm-, DROSTm-, MESTm-, METENm-, NANDm-, NANDme-, STANm-konjugat). MF med metanol forebygde en ytterligere ionisering, mens bruk av acetonitril ga et høyere S/N-forhold, mindre interfererende topper og en bedre kromatografisk



separasjon for isomerer. Derfor ble MF med acetonitril valgt (18). Fra metode A (38) ble det vist at maursyre som syremodifikator i metanol fikk en høyere  $[M+H]^+$ -ioniseringseffektivitet og en bedre kromatografisk separasjon sammenliknet med eddiksyre i metanol, eddiksyre i acetonitril eller maursyre i acetonitril (38).

For å skille mellom isomerene, med like  $m/z$ -verdier, NANDm og NANDme og isomerene 1-testosterone og BOLDm i metode B (39), ble det benyttet en isokratisk metode hvor den organiske MF ikke ble endret mellom 2 – 10,5 min. På denne måten ble det oppnådd en tilfredsstillende kromatografisk separasjon mellom disse isomerene. Med denne metoden ble det ikke en vellykket kromatografisk separasjon av STAN-metabolittene, som for eksempel STANm, da metabolittene interfererte med hverandre. Metoden kunne derfor bare påvise STAN uten å spesifisere hvilken metabolitt som ble detektert. En bedre separasjon for å skille metabolittene kan oppnås under sure forhold (39).

Med tanke på kolonnetype undersøkte metode A (38) flere kommersielt tilgjengelige C18-kolonner for å optimalisere den kromatografiske kurven, toppbredden og separasjonen. Det ble blant annet testet ut en Kinetex-kolonne, bestående av en partikkelstørrelse på 2,6  $\mu\text{m}$ . Denne ga høy oppløsningsevne og smale topper, men det ble observert en alvorlig «tailing» på steroider som hadde en hydroxylgruppe på karbonatom 4, som OKSYMES. Kolonnen som ble valgt i analysen var en Gemini-NX kolonne, ettersom denne ga en bedre kurve med smal toppbredde og optimal separasjon (38). Metode C (40) benyttet seg av en C18-PFP-kolonne som viste en bedre reproducerbarhet for de testede sulfat-konjugatene, sammenliknet med en ren C18-kolonne (40).

#### 4.2.2 Gasskromatografi

Kolonnene som ble brukt i metodene hadde lik bredde og filmtykkelse, men ulik lengde, se tabell 5. Injeksjonsvolumet var 2 – 3  $\mu\text{L}$  og injeksjonstemperaturen var 280 °C (ikke oppgitt for F3 og F4 (42)). Injeksjonen for metode E (41), F3 og F4 (42) ble gjort ved «split mode» (1:10), mens metode F5 (42) benyttet seg av «splittless mode». Alle metodene benyttet seg av bæregassen helium med en konstant flow mellom 0,8 – 1,2 mL/min. Analysetiden for metode E (41) var 7,4 min. Analysetid var ikke oppgitt for de andre metodene.

Tabell 4: Væskekromatografiske betingelser for metodene A – G.

Metode	Kolonne	Analysetid (min.)	Mobilfase		Lineær gradient		Flow rate (µL/min)	Referanse
			A	B	Tid (min)	B <sup>a</sup> (%)		
A	Gemini-NX C18 kolonne (100 mm × 2.0 mm, 3 µm)	15	0.1 % maursyre i vann	0.1 % maursyre i metanol	0	45	300	(38)
					12.50	75		
					13.00	95		
					14.00	95		
					14.01	45		
					15.00	45		
B	Varian Omnispher C18 kolonne (100 mm × 2 mm, 3 µm)	≈ 20 <sup>b</sup>	1 mM vandig ammoniumacetat	1 mM metanolsk ammoniumacetat	0	20	300	(39)
					0.5	20		
					2	55		
					10.5	55		
					17	85		
					17.5	85		
					18	20		
					20	20		
C	C18-PFP kolonne (150 x 2.1mm, 3µm)	15	0.05 % eddiksyre i vann	0.05 % eddiksyre i metanol	0	5	350	(40)
					0.2	5		
					10	50		
					10.1	90		
					12	90		
D	Acquity UPLC® BEH C18 kolonne (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm)	≈ 20 <sup>b</sup>	0.01 % maursyre og 1mM ammonium-format i vann	0.01 % maursyre og 1.0 mM ammonium-format i acetonitril: vann (95:5, v/v)	0	20	300	(18)
					2	20		
					15	40		
					16	70		
					17	95		
					18	95		
					18.5	20		
					20	20		
F1	Gemini-NX C18 kolonne (100 mm x 2.0 mm, 3 µm)	≈ 20 <sup>b</sup>	0.1 % maursyre i deionisert vann	0.1 % maursyre i metanol	0	45	300	(42)
					12.50	75		
					13.00	98		
					18	98		
					18.01	45		
					20	45		
F2	Capcell core C18 kolonne (150 mm x 2.1 mm, 2.7 µm)	≈ 46 <sup>b</sup>	0.1 % maursyre i deionisert vann	0.1 % maursyre i metanol	0	45	400	(42)
					25	70		
					34	90		
					38	90		
					38.1	98		
					42	98		
					46	45		
G	C18 kolonne (4.6 x 50 mm, 3 µ)	5	0.5 mM ammoniumacetat med 0.1 % maursyre	100 % metanol	-	75 til 100	1000	(43)

Tabell 5: GC-betingelser som var brukt i metode E og F3 – F5.

Metode	Kolonne	Analysetid (min)	Injeksjons-temperatur (°C)	Operating mode	Bæregass med konstant flow (mL/min)	GC ovn			Referanse
						Rate (°C/min)	Target value (°C)	Hold time (min)	
E	Ultra-1 cross-linked methylsilicone (25 m x 0.2 mm, 0.11 µm)	7.4	280	Split mode (1:10)	Helium 1.2	-	180	1	(41)
						25	310	2.3	
F3 <sup>c</sup> F4 <sup>d</sup>	Ultra-1 @ kapillær kolonne (17 m x 0.2 mm, 0.11 µm)	-	-	Split mode (1:10)	Helium 0.8	-	180	-	(42)
						4	240	-	
F5 <sup>e</sup>	Ultra-1 @ kapillær kolonne (17 m x 0.2 mm, 0.11 µm)	-	280	Splittless mode	Helium 1.0	-	180	-	(42)
						10	320	-	

<sup>a</sup> Den lineære gradienten ble endret etter mobilfase B

<sup>b</sup> Siste tid i den lineære gradienten

<sup>c</sup> Analysemetode: GC-EI-MS

<sup>d</sup> Analysemetode: GC-EI-MSMS

<sup>e</sup> Analysemetode: GC-ESI-MSMS

### 4.3 Massespektrometri

I metodene var det brukt både MS og MSMS, hvor MSMS ble mest brukt. Bruk av MSMS gjør metoden mer spesifikk, letter elimineringen av bakgrunnsinterferenser og det oppnås lavere deteksjonsgrenser (41,42). Massespektrometri består av ionisering og deteksjon. I tabell 6 er ioniseringsteknikk for metode A – G presentert. Addukt, molekylion, produksjon, kollisjonsenergi, retensjonstid og deteksjon for de ulike steroidene i metode A – G er oppgitt i vedlegg 1.

Tabell 6: Ioniseringsteknikk for metode A - G

Metode	A: LC-MSMS	B: LC-MSMS	C: LC-MSMS	D: LC-MSMS	E: GC-MSMS	F1: LC-MSMS	F2: LC-MSMS	F3: GC-MS	F4: GC-MSMS	F5: GC-MSMS	G: LC-MSMS
Ionisering	ESI +	ESI +	ESI -	ESI +/-	-	ESI +	Ag <sup>+</sup> CIS	EI	EI	ESI +	ESI +
Referanse	(38)	(39)	(40)	(18)	(41)	(42)	(42)	(42)	(42)	(42)	(43)

En utfordring ved å bruke LC-MSMS er å få ionisert steroidene til  $[M + H]^+ / [M + H]^-$  (38,39,42). Dette er fordi de mangler protoniserende, sure eller basiske, grupper i deres kjemiske struktur. I noen tilfeller har dette blitt løst ved å benytte andre addukter, som for eksempel  $[M + NH_4]^+$  og  $[M + H + MeOH]^+$ . Disse kan være mindre reproducerbare og vanskeligere å identifisere enn  $[M + H]^+$  (38,39).

En utfordring ved deteksjon av steroider er at endogene komponenter kan dele samme overgang, og dermed interferere med steroidene. For å unngå dette kan det brukes mer spesifikke overganger eller mer spesifikke molekylioner (39).

Til tross for at ESI kan ha dårlig ioniseringseffekt for noen AAS, kan ioniseringsteknikken brukes ved analysering av konjugerte steroider med glukuronsyre, sulfat eller cystein. Dette er fordi konjugatene forbedrer ioniseringseffekten (40).

Alle steroidene som ble undersøkt i metode A (38) viste tilstrekkelig ionisering og deteksjon ved adduktet  $[M + H]^+$ , bortsett fra DROSTm. Dette resulterte i at  $[M + H - H_2O]^+$  ble valgt som addukt for dette steroidet. Metoden klarte å separere isomerene OKSAN og OKSANm, til tross for at de hadde samme overgang ( $m/z$  307  $\rightarrow$  229), ved hjelp av retensjonstid på henholdsvis 7,6 min. og 10,4 min. Isomerene TREN og TRENm med overgang  $m/z$  271  $\rightarrow$  199 ble også separert. Disse hadde en retensjonstid på henholdsvis 6,8 min. og 7,3 min.

For metode B (39) ble adduktet  $[M + NH_4]^+$  valgt for steroidene uten konjugert keto-gruppe på karbonatom 3 på grunn av deres lave protonaffinitet. Dette gjaldt DROSTm, MESTm,

METENm, NANDm og NANDme.  $[M + H + MeOH]^+$ -adduktet viste økt spesifisitet for steroidene OKSAN, BOLDm og MEST og dette adduktet ble derfor valgt for disse.

De resterende steroidene benyttet adduktet  $[M + H]^+$ . Steroidene viste ulik sensitivitet på grunn av forskjeller i ionisering og fragmenteringseffektivitet. Det ble derfor valgt lengre scan tid for steroidene med lav sensitivitet, som for eksempel NANDm og NANDme, for å kompensere for sensitivitetsvariasjonen.

Sulfat-konjugat av AAS viste uspesifikk fragmentering i LC-ESI-MSMS ved at det samme produktionet med  $m/z$  97 ble dannet. Dette kommer fra sulfatdelen av konjugatet som dannet adduktet  $[M - H]^-$ . Metoden klarte likevel å detektere alle steroidene fordi molekylionet viste høy stabilitet under fragmentering og steroidene hadde ulik retensjonstid. BOLD derimot viste i tillegg en karakteristisk overgang ( $m/z$  365  $\rightarrow$  350). Denne overgangen ble valgt ettersom den muliggjorde deteksjon ved lav konsentrasjon, samt at det ble observert interfererende topper ved  $m/z$  97 (18,40).

Ved analyse av MEST, i metode C (40), ble det observert to topper med en forskjell i retensjonstid på 0,2 min. Det ble funnet ut at den ene toppen var MESTm ( $1\alpha$ -metyl- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol-17-one), mens den andre toppen var  $\beta$ -epimeren ( $1\alpha$ -metyl- $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol-17-one) til MESTm.  $\beta$ -epimeren ga et høyere signal enn MESTm og kan derfor være interessant som en langtidsmetabolitt. Strukturell likhet mellom MEST og DROST gjør at det også kan forventes  $\beta$ -epimer for DROST. I tillegg viste METENm lignende oppførsel etter sulfatering (40).

Steroidene som ble testet i metode D (18), viste god ionisering. Steroidene dannet  $[M + H]^+$  og  $[M - H]^-$  addukter, utenom glukuronsyre-konjugatene METENm og NANDme. Disse dannet adduktet  $[M + NH_4]^+$ . På samme måte som sulfat-konjugat, viste også glukuronsyre-konjugat uspesifikk fragmentering. Glukuronsyre-konjugatene viste produktion med  $m/z$  75, 85 og 113 ved negativ ionisering, som ga best signal. STANm-glukuronsyre skilte seg ut ved at det ble dannet produktion  $m/z$  343 ved negativ ionisering.

#### 4.4 Vurdering av metodene

Det gjøres en vurdering av valideringen til metode A – G. Tabell over valideringsresultatene er presentert i vedlegg 2. Valideringen for de aktuelle steroidene for AKF er trukket ut og vurdert. Metoden kan ha klart å detektere og validere flere steroider, men disse er ikke tatt

med i vurderingen i denne oppgaven. Krav og ønsker til valideringsparametrene er presentert i tabell 7.

Tabell 7: AKF<sup>a</sup> sine krav og ønsker for valideringsparametrene, samt WADA<sup>b</sup> sine krav for MRPL<sup>c</sup>.

	Nøyaktighet	Repeterbarhet	Reproduserbarhet	Utbytte	Korrelasjonskoeffisient R	Matrikseffekt	MRPL <sup>d</sup>
<b>AKF</b>	≤ 15%	≤ 10%	≤ 15%	> 70% <sup>e</sup>	> 0,985	75 – 125 %	-
<b>WADA</b>	-	-	-	-	-	-	5 ng/mL 2 ng/mL <sup>f</sup>

#### 4.4.1 Metode A (38)

Metode A (38) hadde både en screening- og bekreftelsesmetode som inkluderte 15 steroider. Validering ble utført for screeningmetoden. I tillegg ble LOD undersøkt for bekreftelsesmetoden. LOD for screeningmetoden var i området 0,1 – 10 ng/mL og LOD for bekreftelsesmetoden var i området 1 – 10 ng/mL. Steroidene DROSTm (10 ng/mL), MESTm (10 ng/mL), BOLDm (5 ng/mL), OKSAN (5 ng/mL) og OKSANm (5 ng/mL) i screeningmetoden oppnår ikke MRPL kravene. De resterende steroidene oppnår dette kravet. I bekreftelsesmetoden oppnår 7 steroider LOD innenfor WADA sine MRPL kravene. BOLDm (5 ng/mL), DROSTm (10 ng/mL), MESTm (10 ng/mL), NANDm (5 ng/mL), OKSAN (10 ng/mL), OKSANm (5 ng/mL), OKSYMES (5 ng/mL), og STANm (5 ng/mL) oppnår ikke kravet. Steroidene som ble analysert og er relevante for AKF hadde en repeterbarhet i området 2,5 – 9,2%. Dette er innenfor kravet til AKF. DROSTm og STAN viste en repeterbarhet på henholdsvis 13,9 ng/mL og 10,9 ng/mL og er utenfor AKF sitt krav. Alle steroidene hadde en reproduserbarhet fra 3,0 – 14,7 %, som er innenfor AKF sitt krav. Utbytte, ME, nøyaktighet og linearitet ble ikke oppgitt.

Det ble ikke observert noen signifikante interfererende ioner fra urinmatriks ved retensjonstidene til steroidene. På bakgrunn av resultatene til metoden, oppga artikkelen at sensitiviteten og spesifisiteten for den kvalitative metoden var god. Artikkelen konkluderte med at metoden som ble utviklet var rask og sensitiv for screening og bekreftelse, og var nyttig for kvalitativ analyse av de 44 (15 aktuelle) undersøkte steroidene – utenom DROSTm og STAN. Resultatene indikerer at screeningmetoden var akseptabel for testing, med en

<sup>a</sup> AKF = Avdeling for Klinisk Farmakologi

<sup>b</sup> WADA = World Anti-Doping Agency

<sup>c</sup> MRPL = Minimum required performance level

<sup>d</sup> LOD skal være minimum 50% av MRPL krav

<sup>e</sup> Anbefalt utbytte. Ved god presisjon kan lavere utbytte godkjennes.

<sup>f</sup> Gjelder METAN, STAN, STANm, NAND, NANDm, NANDme

analysetid på 15 min. Steroidene i screeningmetoden kan bli bekreftet med retensjonstid og karakteristisk produksjon i bekreftelsesmetoden.

#### 4.4.2 Metode B (39)

De 12 aktuelle steroidene som ble analysert i metode B (39) viste LOD fra 1 – 40 ng/mL. Steroidene som er innenfor MRPL kravene til WADA er BOLDm, OKSAN, OKSYMES, STANm og TRENm. Metoden ble derfor godkjent som screeningmetode for disse steroidene. LOD til de resterende steroidene tilfredsstillende ikke MRPL: BOLD (5 ng/mL), DROSTm (40ng/mL), MESTm (40 ng/mL), METENm (20 ng/mL), NANDm (8 ng/mL), NANDme (20 ng/mL) og MEST (10ng/mL). Disse steroidene, bortsett fra BOLD og MEST, viste derimot ikke problemer i den tradisjonelle GC-MS-metoden. Dette kan vise til at en kombinasjon av GC og LC kan være nødvendig for å få detektert alle ønskede steroider. Utbyttet varierte fra 68 – 98 %, hvor MEST var det eneste steroidet med utbytte på 68 %. De resterende steroidene hadde utbytte innenfor ønsket til AKF.

ME til steroidene var i området 31 – 75 %, hvor kun DROSTm tilfredsstillende ønsket fra AKF. ME til steroidene OKSAN og OKSYMES, på henholdsvis 70 % og 74 %, er rett under ønsket. LOD måtte heves som følge av stor ME for enkelte steroider. Nøyaktighet og linearitet ble ikke oppgitt.

#### 4.4.3 Metode C (40)

De 9 aktuelle steroidene fra metode C (40) hadde LOD på 0,5 – 1 ng/mL, med en S/N-ratio på ca. 3. Dette er innenfor WADA sine grenser for MRPL. Reproduserbarheten varierte fra 9 – 15% ved en konsentrasjon på 2,5 ng/mL, 5 – 10% ved en konsentrasjon på 5 ng/mL og 9 – 12% ved en konsentrasjon på 12,5 ng/mL. Dette er innenfor AKF sine krav. DROSTm-sulfat ved konsentrasjonen 5 ng/mL fikk en reproduserbarhet på 17% som er utenfor AKF sitt krav. Steroidene hadde et utbytte i området 102 – 114 %, som er innenfor ønsket til AKF. ME for metoden var i området 84 – 112 % som også er innenfor AKF sitt ønske. Nøyaktighet og linearitet ble ikke oppgitt. I tillegg til de konjugerte steroidene som det var utført validering for, mente artikkelen at det kunne forventes samme resultat for TREN og NANDme på grunnlag av deres lignende oppførsel som TRENm og NANDm. Ved analyse av blanke urinprøver, ble ingen relevante signaler av interfererende stoffer observert ved retensjonstiden til sulfat-konjugatene. Variasjonen av signalintensiteter etter intern standard korreksjon var veldig lav, som tilsier at dette var en god metode.

Artikkelen oppga at metoden var rask og enkel, og at valideringen var innenfor WADA sine krav. Dermed konkluderte artikkelen med at denne metoden kunne brukes til å analysere urin i doping kontroll. For påvisning av andre sulfat-konjugater enn de som er studert i artikkelen, antok artikkelen lignende utbytte, ME og lav LOD.

#### 4.4.4 Metode D (18)

Metode D (18) analyserte 10 av de aktuelle steroidene for AKF. LOD varierte der BOLDm-glukuronsyre hadde LOD på 16 ng/mL og MESTm-glukuronsyre LOD på 8 ng/mL.

METENm-glukuronsyre og NANDm-glukuronsyre hadde LOD på 4 ng/mL. Dette er over MRPL kravene til WADA. De resterende steroidene hadde LOD i området 0,5 – 2 ng/mL, som tilfredsstillter MRPL kravene. BOLDm-glukuronsyre viste dårlig LOD, men siden metoden klarte å detektere andre metabolitter av BOLD kunne resultatet godkjennes.

Repeterbarheten varierte fra 1,6 – 20,2 %. Flere av steroidene er utenfor AKF sitt krav om repetbarhet, men artikkelen sa at metoden viste god repetbarhet med resultat innenfor sine krav på < 15 % for lave konsentrasjoner og < 25 % for høye konsentrasjoner. Utbytte for de aktuelle steroidene var 77,1 – 109,9 %. Dette er innenfor ønsket til AKF, og tilsvarer en god nok prøveopparbeidelse for å analysere både frie og konjugerte metabolitter. ME lå i området 104 – 147 %. METENm-glukuronsyre, NANDm-glukuronsyre, NANDm-sulfat, NANDme-glukuronsyre og MESTm-glukuronsyre hadde moderat forhøyet ME i forhold til AKF sitt ønske. Nøyaktighet og linearitet ble ikke oppgitt.

Artikkelen vurderte metoden som godkjent for de fleste steroidene ut ifra WADA sine anbefalinger. Metoden ble også vurdert til å være enkel og rask.

#### 4.4.5 Metode E (41)

Metoden E (41) analyserte 13 aktuelle steroider. Metoden testet LOD ved kravet fra «Den internasjonale olympiske komité» (IOC) på 10 ng/mL for steroidene, utenom OKSYMETm, NANDm, NANDme og STANm hvor kravet var 2 ng/mL. Ved konsentrasjon på 10 ng/mL ble det oppnådd god S/N-ratio som kunne tilsi at lavere konsentrasjoner kunne detekteres.

Steroidene BOLD, DROSTm, MESTm, METENm, OKSYMES og STANm hadde en repetbarhet på 4,4 – 10,0 %. Dette er innenfor kravet til AKF. De resterende steroidene hadde en repetbarhet på 13,6 – 36,1 %, som er over kravet til AFK. Artikkelen sa at dette kunne skyldes lavt utbytte, deres kromatografiske oppførsel og/eller ustabilitet av deres derivater som for eksempel OKSANm. Utbytte, ME, nøyaktighet og linearitet ble ikke oppgitt. Metoden viste lite interfererende toppe ved retensjonstiden til steroidene, som tilsier

god spesifisitet. For METEN sin retensjonstid ble det observert bakgrunnsstøy, men ettersom denne hadde andre metabolitter kunne utgangsstoffet detekteres ved hjelp av disse.

#### 4.4.6 Metode F1-F5 (42)

I metode F (42) ble det analysert 20 av de aktuelle steroidene for AKF. Metoden testet ut ulike ioniseringsteknikker ved LC og GC. Målet var å finne ut hvilken ionisering og separasjonsmetode som viste best sensitivitet ved hjelp av LOD ( $S/N \geq 3$ ).

F1 (42) – LC-ESI-MSMS dekker MRPL kravene fra WADA med LOD i området 0,2 – 2,5 ng/mL. METENm (5,0 ng/mL), NANDme (2,0 ng/mL), BOLDm (20,0 ng/mL), OKSYMET (10,0 ng/mL) og OKSYMETm (20,0 ng/mL) har LOD utenfor MRPL kravene.

F2 (42) – LC-Ag<sup>+</sup>CIS-MSMS dekker MRPL kravene fra WADA med LOD i området 0,04 – 1,0 ng/mL. BOLDm (10,0 ng/mL) og STANm (20,0 ng/mL) har LOD utenfor MRPL kravene. OKSYMET ble ikke detektert.

F3 (42) – GC-EI-MS dekker MRPL kravene fra WADA med LOD fra 0,5 – 2,5 ng/mL. METANd (5,0 ng/mL), STANm (5,0 ng/mL), TREN (100,0 ng/mL), OKSAN (200,0 ng/mL), OKSANm (200,0 ng/mL) og STAN (200,0 ng/mL) har LOD utenfor MRPL kravene. OKSYMET ble ikke detektert.

F4 (42) – GC-EI-MSMS dekker MRPL kravene fra WADA med LOD fra 0,05 – 2,5 ng/mL. OKSANm (5,0 ng/mL), STAN (2,0 ng/mL), TREN (10,0 ng/mL) og OKSAN (20,0 ng/mL) har LOD utenfor MRPL kravene. OKSYMET ble ikke detektert.

F5 (42) – GC-ESI-MSMS dekker MRPL kravene fra WADA med LOD fra 0,5 – 2,5 ng/mL. METAN (5,0 ng/mL), METANm (20,0 ng/mL), METANd (5,0 ng/mL), NAND (5,0 ng/mL), NANDm (5,0 ng/mL), MESTm (5,0 ng/mL), OKSAN (5,0 ng/mL), TREN (5,0 ng/mL), BOLD (10,0 ng/mL), STAN (10,0 ng/mL), OKSANm (20,0 ng/mL), METENm (20,0 ng/mL), OKSYMETm (20,0 ng/mL), STAN (100,0 ng/mL) og OKSYMET (100,0 ng/mL) har LOD utenfor MRPL kravene. TRENm ble ikke detektert.

BOLDm hadde dårlig LOD ved LC-ESI-MSMS og LC-Ag<sup>+</sup>CIS-MSMS på grunn av interferens fra endogene stoffer. OKSYMET ble ikke detektert ved bruk av GC-baserte metoder på grunn av endogen interferens. Det ble ikke oppgitt andre valideringsparametre for metode F.



#### 4.4.7 Metode G (43)

Metode G (43) analyserte 8 av de aktuelle steroidene for AKF. LOD ved  $S/N > 3$  var 0,25 ng/mL utenom for MEST som hadde LOD 2,0 ng/mL. De aktuelle steroidene tilfredsstillt dermed MRPL kravene til WADA. LOQ for steroidene, med  $S/N > 10$ , var 0,5 ng/mL utenom for MEST som hadde LOQ 5,0 ng/mL. Presisjonen var  $< 10\%$  og nøyaktigheten  $> 90\%$  for alle steroidene, som er innenfor AKF sine krav. Utbytte ble ikke oppgitt. Metoden viste gode resultater med tanke på ME. Lineariteten er innenfor AKF sitt krav med verdier  $> 0,995$ .

Metoden skrev at de også klarte å utvide deteksjonen og dermed kvantitere andre metabolitter. Dette var blant annet TREN og OKSAN. Artikkelen sa det var en rask og enkel metode for kvantifisering og deteksjon av AAS i urin med analysetid på 5 min.

#### 4.5 Holdbarhet og oppbevaring

Bakterieaktiviteten i urinen påvirker steroidenes degenerasjon (48). Bakterier kan starte reaksjoner som fører til dannelse av metabolitter som normalt ikke ville blitt dannet. Bakterieaktiviteten påvirkes av pH og temperatur. Dersom urinprøvene blir fryst, vil steroider og deres metabolitter være stabile. De kan dermed detekteres etter oppbevaring over lenger tid. Det er viktig at urinprøvene er tatt i deteksjonsvinduet. Steroider blir brutt ned i leveren og skilles raskt ut i urin. Det varierer hvor lenge AAS kan detekteres i urin. Tatt oralt er deteksjonsvinduet noen få dager, men tatt ved injeksjon kan det detekteres opptil noen måneder. Metabolittene blir funnet i større grad enn selve dopingmidlet (49). Metode D (18) fryste ned urinprøver ved  $-20\text{ °C}$  og kunne oppbevare dem slik inntil 31 dager før analysering. (18).

Sulfat-konjugater med steroid skilles ut i urinen i mindre konsentrasjoner enn glukuronsyre-konjugater og frie steroid, men de har potensiale til å være langtidsmetabolitter. Studier har vist at det oppnås en utvidet deteksjonstid ved direkte analyse av glukuronsyre-konjugater og det forventes lignende resultater for sulfat-konjugater. Sulfat-konjugat av METAN- og metyltestosteronmetabolitter er allerede identifisert som langsiktige metabolitter. Sulfat-konjugatene var ikke kommersielt tilgjengelig, og referansestandarder måtte syntetiseres (18,40).

## 5 Konklusjon

Ut fra litteraturen som er gjennomgått, har vi valgt å gruppere metodene i tre klasser. I klasse I har vi plassert anbefalte metoder. I klasse II har vi plassert brukbare metoder og i klasse III har vi plassert ikke anbefalte metoder. For å rangere de ulike metodene har vi vektlagt LOD, presisjon, anbefalinger fra WADA og hvordan metoden utføres.

### 5.1.1 Klasse I – anbefalte metoder

Metode C (40): LC-MSMS metoden beskrevet av Rzeppa S. mfl. (2015) (40) analyserte 9 anabole steroider i sulfat-konjugat (boldenon,  $2\alpha$ -metyl- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol-17-on,  $1\alpha$ -metyl- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol-17-on, metenolon, 1-metylen- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol-17-on, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, trenbolon og  $17\alpha$ -trenbolon), men det står skrevet i artikkelen at det forventes lignende valideringsresultat for flere steroider. LOD (0,5 – 1,0 ng/mL) er innenfor MRPL kravene for alle steroidene. Reproduserbarheten ( $\leq 15\%$ ) er innenfor AKF sitt krav (utenom ett steroid). Analyse av konjugat har enkel prøveopparbeidelse, forenkler ioniseringen i LC og kan gi forlenget deteksjonsvindu.

Metode F1 (42): LC-MSMS metoden beskrevet av Cha E. mfl. (2015) (42) analyserte 20 anabole steroider (boldenon,  $5\beta$ -androst-1-en- $17\beta$ -ol-3-on,  $1\alpha$ -metyl- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol-17-on, metandienon, epimetendiol, 4-dehydroklormetyltestosteron, metenolon, 1-metylen- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol-17-on, nandrolon, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, oksandrolon,  $17\text{epi}$ -oksandrolone, oksymesteron, oksymetolon,  $17\alpha$ -metyl- $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol, stanozolol, 3-OH stanozolol, trenbolon og  $17\alpha$ -trenbolon). LOD er innenfor MRPL kravene for 15/20 steroider med LOD i området 0,1 – 2,5 ng/mL. Til tross for en kompleks prøveopparbeidelse med SPE før hydrolyse, ble metoden plassert i klasse I på grunn av lav LOD for 15 steroider. SPE før hydrolyse er anbefalt av WADA.

Metode F4 (42): GC-MSMS metoden beskrevet av Cha E. mfl. (2015) (42) analyserte 20 anabole steroider (se metode F1 for hvilke). LOD er innenfor MRPL kravene for 15/20 steroider med LOD i området 0,05 – 2,5 ng/mL. Til tross for en kompleks prøveopparbeidelse, med SPE før hydrolyse og derivatisering, ble metoden plassert i denne klassen på grunn av lav LOD for 15 steroider.

### 5.1.2 Klasse II – brukbare metoder

Metode A (38): LC-MSMS metoden beskrevet av Jeon, B.W. mfl. (2011) (38) analyserte 15 anabole steroider (boldenon, 5 $\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-on, 2 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 1 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, metandienon, metenolon, nandrolon, 19-norandrosteron, oksandrolon, 17epi-oksandrolone, oksymesteron, stanozolol, 3-OH stanozolol, trenbolon og 17 $\alpha$ -trenbolon). LOD er innenfor MRPL kravene for 10/15 steroider i screeningmetoden og for 7/15 steroider i bekreftelsesmetoden. Disse hadde LOD i området 0,1 – 2,0 ng/mL. Repeterbarheten var  $\leq 9,2\%$  utenom for 2 steroider, og reproducerbarheten var  $\leq 14,7\%$  for alle steroidene. Dette er innenfor kravene til AKF. SPE før hydrolyse ble utført og er anbefalt av WADA.

Metode D (18): LC-MSMS metoden beskrevet av Balcells G. mfl. (2015) analyserte 12 anabole steroider (5 $\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-on, 2 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 1 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 1-metylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, oksandrolon, 17epi-oksandrolone, 3-OH stanozolol). LOD er innenfor MRPL kravene for 9/11 (ett steroid hadde ikke validering) steroider med verdier fra 0,25 – 2 ng/mL. Repeterbarheten varierte fra 1,6 – 21,4 %, som resulterte i at de fleste steroidene er over AKF sitt krav. Prøveopparbeidelsen bestod kun av SPE da metoden analyserte frie steroider og konjugat. Analyse av konjugat forenkler ioniseringen i LC og kan gi forlenget deteksjonsvindu.

Metode E (41): GC-MSMS metoden beskrevet av Marcos J. mfl. (2002) analyserte 13 anabole steroider (boldenon, 5 $\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-on, 2 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 1 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, metenolon, 1-metylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, nandrolon, 19-norethiocholanolon, oksandrolon, 17epi-oksandrolone, oksymesteron, 17 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 3-OH stanozolol). LOD ble ikke bestemt, men ved konsentrasjon på 10 ng/mL var S/N-ratioen høy. Repeterbarheten varierte fra 4,4 – 36,1 %, der 6 steroider er innenfor AKF sitt krav.

Metode F2 (42): LC-MSMS metoden beskrevet av Cha E. mfl. (2015) (42) analyserte 20 anabole steroider (se metode F1 for hvilke). LOD er innenfor MRPL kravene for 17/20 steroider med verdier fra 0,04 – 1,0 ng/mL. På grunn av den lange analysetiden (46 min.) ble denne metoden plassert i klasse II.

Metode F3 (42): GC-MS metoden beskrevet av Cha E. mfl. (2015) (42) analyserte 20 anabole steroider (se metode F1 for hvilke). LOD er innenfor MRPL kravene for 13/20 steroider med verdier fra 0,5 – 2,5 ng/mL. Til tross for lav LOD for flere av steroidene, hadde de resterende steroidene høy LOD (opptil 200 ng/mL). Metoden er derfor plassert i klasse II.

### 5.1.3 Klasse III – ikke anbefalte metoder

Metode B (39): LC-MSMS metoden beskrevet av Pozo O.J. mfl., 2007 (39) analyserte 12 anabole steroider (boldenon, 5 $\beta$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ol-3-on, 2 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, mesterolone, 1 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 1-metylen-5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on, 19-norandrosteron, 19-norethiocholanolon, oksandrolon, oksymesteron, 3-OH stanozolol, 17 $\alpha$ -trenbolon). LOD er innenfor MRPL kravene for 5/12 steroider med verdier fra 1,0 – 2 ng/mL. De resterende steroidene hadde LOD opptil 40 ng/mL.

Metode F5 (42): GC-MSMS metoden beskrevet av Cha E. mfl., 2015 (42) analyserte 20 anabole steroider (se metode F1 for hvilke). Den kombinerte GC med ESI, som resulterte i LOD over MRPL kravene for 16/20 steroider.

Metode G (43): LC-MSMS metoden beskrevet av Kala S.V. mfl., 2007 analyserte 8 anabole steroider (boldenon, mesterolone, metandienon, metenolon, nandrolon, stanozolol, testosteron, epitestosteron). LOD er innenfor MRPL kravene for 8/8 steroider med verdier fra 0,25 – 2,0 ng/mL. Presisjon var < 10% er innenfor AKF sitt krav. Hydrolyse med  $\beta$ -glukuronidase fra H. Pomatia er ikke akseptert av WADA. Bruk av heksan som løsemiddel i ekstraksjonen er uheldig fordi det er helseskadelig. Dette var den eneste kvantitative metoden og valideringen var god for alle steroidene, men på grunnlag av benyttet enzym og løsemiddel kan ikke denne metoden anbefales.

## 6 Referanser

1. Avdeling for klinisk farmakologi [Internett]. St. Olavs hospital. 2020 [sitert 20. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/avdeling-for-klinisk-farmakologi>
2. What is Prohibited [Internett]. World Anti-Doping Agency. 2017 [sitert 9. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited>
3. Martin E, Hine R. steroid. I: Martin E, Hine R, redaktører. A Dictionary of Biology [Internett]. Oxford University Press; 2015 [sitert 30. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780198714378.001.0001/acref-9780198714378-e-4229>
4. Anabolic Steroids [Internett]. Drugabuse. 2018 [sitert 22. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/anabolic-steroids>
5. Oslo universitetssykehus. Håndbok, Anabole-androgene steroider. 2019.
6. Fakta om anabole androgene steroider (AAS) og dopingmidler [Internett]. Rustelefonen. [sitert 22. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.rustelefonen.no/fakta-om-anabole-steroider-og-dopingmidler/>
7. Bakgrunn [Internett]. Antidoping Norge. [sitert 31. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.antidoping.no/kunnskap-og-ressurser/anabole-androgene-steroider/bakgrunn>
8. Overdosering på AAS [Internett]. Rustelefonen. [sitert 30. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.rustelefonen.no/fakta-om-anabole-steroider-og-dopingmidler/overdosering-pa-aas/>
9. Makin HLJ, Honour JW, Shackleton CHL, Griffiths WJ. General Methods for the Extraction, Purification, and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. I: Makin HLJ, Gower DB, redaktører. Steroid Analysis [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010 [sitert 13. april 2020]. s. 163–282. Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1023/b135931\\_3](https://doi.org/10.1023/b135931_3)
10. Kjemisk modifisering av testosteron [Internett]. Antidoping Norge. [sitert 15. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.antidoping.no/kunnskap-og-ressurser/anabole-androgene-steroider/kjemisk-modifisering-av-testosteron>
11. Khan JI, Kennedy TJ, Christian Jr. DR. Basic Principles of Forensic Chemistry [Internett]. Totowa, NJ: Humana Press; [sitert 15. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-59745-437-7>
12. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. I: Clinical Chemistry [Internett]. 1996. s. 1001–20. Tilgjengelig på: <https://academic.oup.com/clinchem/article/42/7/1001/5646221>
13. Gosetti F, Mazzucco E, Gennaro MC, Marengo E. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited

- steroids in human biological matrices. A review. *J Chromatogr B*. 15. mai 2013;927:22–36.
14. Stárka L. Epitestosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1. oktober 2003;87(1):27–34.
  15. Thevis M, Thomas A, Schänzer W. Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal Bioanal Chem*. 1. august 2011;401(2):405–20.
  16. Andersen DW, Linnet K. Screening for Anabolic Steroids in Urine of Forensic Cases Using Fully Automated Solid Phase Extraction and LC–MS-MS. *J Anal Toxicol*. 1. november 2014;38(9):637–44.
  17. Guo F, Shao J, Liu Q, Shi J, Jiang G. Automated and sensitive determination of four anabolic androgenic steroids in urine by online turbulent flow solid-phase extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel approach for clinical monitoring and doping control. *Talanta*. 1. juni 2014;125:432–8.
  18. Balcells G, Pozo OJ, Esquivel A, Kotronoulas A, Joglar J, Segura J, mfl. Screening for anabolic steroids in sports: Analytical strategy based on the detection of phase I and phase II intact urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 10. april 2015;1389:65–75.
  19. Greibrokk T, Karlsen J, Rasmussen KE. Kromatografi [Internett]. Universitetsforlaget; 1987 [sitert 20. mars 2020]. Tilgjengelig på: [https://www.nb.no/items/URN:NBN:no-nb\\_digibok\\_2008060304092?page=192](https://www.nb.no/items/URN:NBN:no-nb_digibok_2008060304092?page=192)
  20. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7. utg. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2015.
  21. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 8. utg. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
  22. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE. Kromatografi: separasjon og deteksjon [Internett]. 3. utg. Universitetsforlaget; 1994 [sitert 20. mars 2020]. Tilgjengelig på: [https://www.nb.no/items/URN:NBN:no-nb\\_digibok\\_2007122100022?page=239](https://www.nb.no/items/URN:NBN:no-nb_digibok_2007122100022?page=239)
  23. Øiestad ÅML. LC-MS/MS-gjennomgang av hele instrumentet [Internett]. 2018 mai 25 [sitert 28. april 2020]; Trondheim. Tilgjengelig på: <https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/kromatografi/05-lc-ms---gjennomgang-av-hele-instrumentet-ase-marit-leere-oiestad.pdf>
  24. WADA Technical Letter - TL08 [Internett]. World Anti-Doping Agency. 2019 [sitert 7. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/tl08>
  25. Sander LC. Solid Phase Extraction [Internett]. [sitert 15. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.nist.gov/video/solid-phase-extraction>
  26. Michelsen LS. Prøveopparbeidelse for komatografiske analyser [Internett]. 2018; Trondheim. Tilgjengelig på: <https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/kromatografi/02-tillaging-av-kalibratorer-lisebth-solem-michelsen.pdf>

27. Roland KR. Prøveopparbeidelse - kromatografiske analyser [Internett]. 2020 feb 3; Trondheim. Tilgjengelig på: <https://www.nito.no/contentassets/8a57887007aa4e7cb6b98b4123b572f8/kromatografi/proveopparbeidelse-hva-skjer-med-proven-under-de-ulike-typene-opparbeidelse-karen-raaen-roland.pdf>
28. Majors RE. Sample preparation fundamentals for chromatography [Internett]. Agilent Technologies; Tilgjengelig på: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf)
29. Katyal A, Morrison RD. Forensic applications of contaminant transport models in the subsurface. I: Introduction to Environmental Forensics [Internett]. 2. utg. 2007 [sitert 19. april 2020]. s. 513–75. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123695222500129>
30. Makin HLJ, Gower DB, redaktører. Steroid Analysis [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010 [sitert 23. mars 2020]. Tilgjengelig på: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-9775-1>
31. Sjølie KT. Hva er akkreditering [Internett]. Norsk akkreditering. 2015 [sitert 22. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.akkreditert.no/nn/hva-er-akkreditering/>
32. Sjølie TK. Hva vi akkrediterer [Internett]. Norsk akkreditering. 2015 [sitert 22. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.akkreditert.no/nn/hva-er-akkreditering/hva-vi-akkrediterer/>
33. Åsprang AF, Jenum PA. Hva betyr akkreditering av medisinsk-mikrobiologiske laboratorier for pasientene? Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 6. november 2003 [sitert 22. mars 2020]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2003/11/aktuelt/hva-betyr-akkreditering-av-medisinsk-mikrobiologiske-laboratorier-pasientene>
34. International Standard for Laboratories [Internett]. World Anti-Doping Agency. 2014 [sitert 7. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl>
35. Validering/verifisering av klinisk kjemiske analyser [Internett]. Noklus; 2002. Tilgjengelig på: [http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val\\_NKK.pdf](http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf)
36. Avdeling for klinisk farmakologi, St. Olavs Hospital. Dokument 23000 «Valideringsplan MAL - AKF» ver. 1.18 EQS.
37. WADA Technical Document - TD2019MRPL [Internett]. World Anti-Doping Agency. 2014 [sitert 3. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2019mrpl>
38. Jeon BW, Yoo HH, Jeong ES, Kim HJ, Jin C, Kim DH, mfl. LC-ESI/MS/MS method for rapid screening and confirmation of 44 exogenous anabolic steroids in human urine. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(4):1353.
39. Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Delbeke FT. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by

liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 1. oktober 2007;389(4):1209–24.

40. Rzeppa S, Heinrich G, Hemmersbach P. Analysis of anabolic androgenic steroids as sulfate conjugates using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2015;7(11–12):1030–9.
41. Marcos J, Pascual JA, Torre X de la, Segura J. Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2002;37(10):1059–73.
42. Cha E, Kim S, Kim HJ, Lee KM, Kim KH, Kwon O-S, mfl. Sensitivity of GC-EI/MS, GC-EI/MS/MS, LC-ESI/MS/MS, LC-Ag+CIS/MS/MS, and GC-ESI/MS/MS for analysis of anabolic steroids in doping control. *Drug Test Anal.* 2015;7(11–12):1040–9.
43. Kala SV, Harris SE, Freijo TD, Gerlich S, Kala SV. Detection and Quantitation of Anabolic Steroids by LC/MS/MS. Tilgjengelig på:  
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.608.1716&rep=rep1&type=pdf>
44. WADA Technical Letter - TL10 - [Internett]. World Anti-Doping Agency. 2019 [sitert 7. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/tl10>
45. WADA Laboratory Expert Group. Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. 2018;17.
46.  $\beta$ -Glucuronidase (beta-Glucuronidase) [Internett]. Sigma-Aldrich. [sitert 1. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=15846734>
47. Sikkerhetsdatablade [Internett]. ROTH; 2019. Tilgjengelig på:  
<https://www.carlroth.com/medias/SDB-7339-NO-NO.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyODQ0NTV8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oMjcvaGNmLzg5NzEwMDEyMDA2NzAucGRmfGQyY2Q5MTIyZWUzMWZkMGRjZTg3MmQ5YmM5ODcxYjRmN2M0MTE3OWYzOTA0OTE0N2RhOThjYTA5NTI2MGU2M2E>
48. Mazzarino M, Abate MG, Alocci R, Rossi F, Stinchelli R, Molaioni F, mfl. Urine stability and steroid profile: Towards a screening index of urine sample degradation for anti-doping purpose. *Anal Chim Acta.* 10. januar 2011;683(2):221–6.
49. Rivier L. Techniques for analytical testing of unconventional samples. I: *Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internett]. 2000 [sitert 17. april 2020]. s. 147–65. Tilgjengelig på:  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1521690X00900605?token=3E305B1E33B2B894F126D6A79EBCF770C92234A5BC2075FECBD10B886F436705F2EB6AA04D6989B4AE305E53F7D4A5ED>



## Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over molekyl- og produktion, kollisjonsenergi og retensjonstid fra metodene A – G.....	41 – 45
Vedlegg 2: Valideringsresultat oppgitt for metodene i artiklene A – G.....	46 – 51

Vedlegg 1: Oversikt over molekyl- og produktion, kollisjonsenergi og retensjonstid fra metodene A – G.

Metode	Steroid	Addukt	Molekylion (m/z)	Produktion (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)	Retensjonstid (min.)
A	BOLD	$[M + H]^+$	287.2	121 <sup>a</sup> , (121, 135, 173) <sup>b</sup>	24 <sup>a</sup> , 23 <sup>b</sup>	7.2
	BOLDm	$[M + H]^+$	289.2	253 <sup>a</sup> , (105, 187, 201) <sup>b</sup>	14 <sup>a</sup> , 22 <sup>b</sup>	9.9
	DROSTm	$[M + H - H_2O]^+$	305.2	287 <sup>a</sup> , (79, 91, 105) <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup> , 46 <sup>b</sup>	13.8
	MESTm	$[M + H]^+$	305.2	287 <sup>a</sup> , (91, 105, 119) <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup> , 42 <sup>b</sup>	12.8
	METAN	$[M + H]^+$	301.2	121 <sup>a</sup> , (107, 121, 149) <sup>b</sup>	30 <sup>a</sup> , 25 <sup>b</sup>	8
	METEN	$[M + H]^+$	303.2	187 <sup>a</sup> , (83, 145, 171) <sup>b</sup>	20 <sup>a</sup> , 22 <sup>b</sup>	9.9
	NAND	$[M + H]^+$	275.2	109 <sup>a</sup> , (107, 109, 145) <sup>b</sup>	26 <sup>a</sup> , 28 <sup>b</sup>	7.7
	NANDm	$[M + H]^+$	277.2	241 <sup>a</sup> , (145, 185, 241) <sup>b</sup>	14 <sup>a</sup> , 18 <sup>b</sup>	11
	OKSAN	$[M + H]^+$	307.2	229 <sup>a</sup> , (149, 175, 229) <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup> , 20 <sup>b</sup>	7.6
	OKSANm	$[M + H]^+$	307.2	229 <sup>a</sup> , (135, 229, 289) <sup>b</sup>	18 <sup>a</sup> , 20 <sup>b</sup>	10.4
	OKSYMES	$[M + H]^+$	319.2	125 <sup>a</sup> , (95, 113, 125) <sup>b</sup>	30 <sup>a</sup> , 34 <sup>b</sup>	9.6
	STAN	$[M + H]^+$	329.3	81 <sup>a</sup> , (81, 95, 107) <sup>b</sup>	42 <sup>a</sup> , 44 <sup>b</sup>	10.3
	STANm	$[M + H]^+$	345.3	97 <sup>a</sup> , (81, 95, 107) <sup>b</sup>	43 <sup>a</sup> , 47 <sup>b</sup>	7.5
	TREN	$[M + H]^+$	271.2	199 <sup>a</sup> , (107, 157, 199) <sup>b</sup>	23 <sup>a</sup> , 31 <sup>b</sup>	6.8
TRENm	$[M + H]^+$	271.2	199 <sup>a</sup> , (107, 159, 199) <sup>b</sup>	24 <sup>a</sup> , 32 <sup>b</sup>	7.3	
B	BOLD	$[M + H]^+$	287	121, 135	33, 21	7
	BOLDm	$[M + H + MeOH]^+$	321	187, 271	25, 18	12.2
	DROSTm	$[M + NH_4]^+$	322	269, 287	25, 1	16.9
	MEST	$[M + H + MeOH]^+$	337	269, 229	20, 24	14.4
	MESTm	$[M + NH_4]^+$	322	287, 269	10, 25	16
	METENm	$[M + NH_4]^+$	320	267, 227	23, 19	15.1
	NANDm	$[M + NH_4]^+$	294	241, 259	20, 12	14.1
	NANDme	$[M + NH_4]^+$	294	241, 259	20, 12	13.7
	OKSAN	$[M + H + MeOH]^+$	339	289, 135	20, 3	7.5
	OKSYMES	$[M + H]^+$	319	125, 113	34, 3	11.1
	STANm	$[M + H]^+$	345	97, 107	44, 43	9.4
TRENm	$[M + H]^+$	271	178, 253	30, 22	7.3	
C	BOLD-sulfat	$[M - H]^-$	365,1	350.1, 97.1	50, 50, 25	7.24
	DROSTm-sulfat	$[M - H]^-$	383.1	97.1	45, 25	9.09
	MESTm-sulfat	$[M - H]^-$	383,1	97.1	45, 25,45	8.89
	METENm-sulfat	$[M - H]^-$	383.1	97.1	35, 25	8.52
	METEN-sulfat	$[M - H]^-$	381.1	97.1	35, 25, 35	8.01
	NANDme-sulfat	$[M - H]^-$	355.1	97.1	40, 25	8.09
	NANDm-sulfat	$[M - H]^-$	355.1	97.1	40, 25	8.17
	TREN/TRENm-sulfat	$[M - H]^-$	349,1	97.1, 211.1	35, 25, 25	6.88

<sup>a</sup> Screeningmetode

<sup>b</sup> Bekreftelsesmetode

Metode	Steroid	Addukt	Molekylion (m/z)	Produksjon (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)	Retensjonstid (min.)
D	BOLD-glukuronsyre	$[M + H]^+$	463	121	25	6.16
				135	20	
	BOLD-sulfat	$[M - H]^-$	365	350	30	6.61
				177	40	
	BOLDm-glukuronsyre	$[M - H]^-$	463	85	40	9.65
		$[M + H]^+$	465	187	25	
	DROSTm-glukuronsyre	$[M - H]^-$	479	85	35	14.79
				75	35	
	MESTm-glukuronsyre	$[M - H]^-$	479	85	35	12.95
				75	35	
	METENm-glukuronsyre	$[M - H]^-$	477	75	35	11.47
		$[M + NH_4]^+$	496	285	15	
	NAND-glukuronsyre	$[M + H]^+$	451	85	30	5.91
		$[M - H]^-$	449	113	30	
	NAND-sulfat	$[M - H]^-$	353	97	35	6.04
	NANDm-glukuronsyre	$[M - H]^-$	451	85	35	10.68
				75	35	
	NANDm-sulfat	$[M - H]^-$	355	97	35	9.67
NANDme-glukuronsyre	$[M + NH_4]^+$	470	241	25	10.2	
			259	20		
NANDme-sulfat	$[M - H]^-$	355	97	35	9.70	
OKSAN	$[M + H]^+$	307	93	30	12.68	
			289	10		
OKSANm	$[M + H]^+$	307	93	30	16.22	
			289	10		
OKSYMETm-glukuron	$[M - H]^-$	481	75	35	10.01	
			85	35		
STANm-3-glukuronsyre	$[M + H - \text{glukuronsyre}]^+$	345	97	45	9.22	
	$[M - H]^-$	519	343	30		
E	BOLD	-	206	206	0.0V	5.14
	BOLDm	-	417	327, 237, 417	1.2V	6.04
	DROSTm	-	433	253, 343, 433	1.1V	5.55
	MESTm	-	433	253, 343, 433	1.0V	5.31
	METEN	-	446	446	0.0V	4.96
	METENm	-	431	251	1.1V	5.42
	NANDm	-	405	225, 315, 405	1.1V	6.12
	NANDme	-	405	225, 315, 405	1.2V	5.87
	OKSAN	-	363	213, 273, 263	0.8V	4.55
	OKSANm	-	363	213, 273, 363	0.8V	4.96
	OKSYMES	-	534	389, 444, 534	1.4V	4.27
	OKSYMETm	-	435	255, 345	1.3V	5.29
	STANm	-	545	455, 545	1.7V	3.68
F1	BOLD	$[M + H]^+$	287	121	27	-
	BOLDm	$[M + H]^+$	289	253	14	-
	MESTm	$[M + H - H_2O]^+$ eller $[M + H - 2H_2O]^+$	287	161	20	-
	METAN	$[M + H]^+$	301	121	30	-

Metode	Steroid	Addukt	Molekylion (m/z)	Produktion (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)	Retensjonstid (min.)
	METANm	$[M + H - H_2O]^+$ eller $[M + H - 2H_2O]^+$	269	105	40	-
	METANd	$[M + H]^+$	335	155	30	-
	METEN	$[M + H]^+$	303	187	20	-
	METENm	$[M + H - H_2O]^+$ eller $[M + H - 2H_2O]^+$	285	267	10	-
	NAND	$[M + H]^+$	275	109	26	-
	NANDm	$[M + H - H_2O]^+$ eller $[M + H - 2H_2O]^+$	259	241	10	-
	NANDme	$[M + H - H_2O]^+$ eller $[M + H - 2H_2O]^+$	259	241	10	-
	OKSAN	$[M + H]^+$	307	229	12	-
	OKSANm	$[M + H]^+$	307	229	18	-
	OKSYMES	$[M + H]^+$	319	125	30	-
	OKSYMES	$[M + H]^+$	333	99	30	-
	OKSYMETm	$[M + H]^+$	271	161	20	-
	STAN	$[M + H]^+$	329	81	42	-
	STANm	$[M + H]^+$	345	97	43	-
	TREN	$[M + H]^+$	271	199	23	-
	TRENm	$[M + H]^+$	271	199	24	-
F2	BOLD	-	393	121	49	-
	BOLDm	-	395	107	45	-
	MESTm	-	411	107	53	-
	METAN	-	407	387	35	-
	METANm	-	411	149	41	-
	METANd	-	441	158	67	-
	METEN	-	409	107	47	-
	METENm	-	409	107	53	-
	NAND	-	381	107	45	-
	NANDm	-	383	107	39	-
	NANDme	-	383	107	41	-
	OKSAN	-	415	351	35	-
	OKSANm	-	413	351	33	-
	OKSYMES	-	425	107	55	-
	OKSYMES	-	333	99	30	-
	OKSYMETm	-	413	125	31	-
	STAN	-	435	417	37	-
	STANm	-	451	107	61	-
	TREN	-	377	107	39	-
TRENm	-	377	107	45	-	
F3	BOLD	-	206	430	-	-
	BOLDm	-	194	432	-	-
	MESTm	-	433	448	-	-
	METAN	-	206	244	-	-
	METANm	-	216	358	-	-
	METANd	-	478	373	-	-
	METEN	-	195	208	-	-
	METENm	-	431	446	-	-
	NAND	-	418	194	-	-
	NANDm	-	405	420	-	-

Metode	Steroid	Addukt	Molekylion (m/z)	Produksjon (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)	Retensjonstid (min.)
	NANDme	-	405	420	-	-
	OKSAN	-	308	363	-	-
	OKSANm	-	308	363	-	-
	OKSYMES	-	534	389	-	-
	OKSYMET	-	411	321	-	-
	OKSYMETm	-	435	255	-	-
	STAN	-	143	472	-	-
	STANm	-	254	560	-	-
	TREN	-	307	412	-	-
	TRENm	-	307	412	-	-
F4	BOLD	-	430	206	15	-
	BOLDm	-	432	194	15	-
	MESTm	-	448	433	10	-
	METAN	-	444	206	15	-
	METANm	-	358	301	15	-
	METANd	-	478	225	25	-
	METEN	-	446	208	15	-
	METENm	-	446	431	10	-
	NAND	-	418	194	20	-
	NANDm	-	405	225	10	-
	NANDme	-	405	225	10	-
	OKSAN	-	308	176	10	-
	OKSANm	-	308	176	10	-
	OKSYMES	-	534	389	30	-
	OKSYMET	-	548	147	45	-
	OKSYMETm	-	435	255	15	-
	STAN	-	472	168	15	-
	STANm	-	545	455	40	-
	TREN	-	412	296	5	-
	TRENm	-	307	296	15	-
F5	BOLD	-	431	293	20	-
	BOLDm	-	361	187	20	-
	MESTm	-	297	269	10	-
	METAN	-	355	245	30	-
	METANm	-	269	105	30	-
	METANd	-	407	155	30	-
	METEN	-	375	187	20	-
	METENm	-	285	267	20	-
	NAND	-	347	257	20	-
	NANDm	-	259	91	40	-
	NANDme	-	421	241	20	-
	OKSAN	-	379	289	10	-
	OKSANm	-	379	289	10	-
	OKSYMES	-	535	181	50	-
	OKSYMES	-	549	243	50	-
	OKSYMETm	-	271	161	20	-
	STAN	-	473	153	40	-

Metode	Steroid	Addukt	Molekylion (m/z)	Produktion (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)	Retensjonstid (min.)
	STANm	-	561	73	60	-
	TREN	-	415	281	30	-
	TRENm	-	-	-	-	-
G	BOLD	-	287	121, 77	29,69	1.19
	MEST	-	395	269	21	205
	METAN	-	301	121, 149	33,21	1.31
	METEN	-	303	82, 91	37,69	1.7
	NAND	-	275	109, 107	35,37	1.28
	STAN	-	329	81, 95	65,53	2.41
	TEST	-	289	109	31	1.43
	TESTm	-	289	109	31	1.67

Vedlegg 2: Valideringsresultat oppgitt for metodene i artiklene A – G. Konsentrasjon brukt for valideringen, der det er oppgitt, står i parentes.

Metode	Steroid	Nøyaktighet (%)	Presisjon (%)		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Utbytte (%)	Linearitet – Korrelasjonsfaktor (r <sup>2</sup> )	Spesifisitet – Matriks effekt (%)
			Repetierbarhet (%)	Reproduserbarhet (%)					
A	BOLD	-	2.5 (10ng/mL) <sup>a</sup>	4.8 (10ng/mL) <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	BOLDm	-	4.5 (10ng/mL) <sup>a</sup>	6.1 (10ng/mL) <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup> , 5.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	DROSTm	-	13.9 (10ng/mL) <sup>a</sup>	8.2 (10ng/mL) <sup>a</sup>	10.0 <sup>a</sup> , 10.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	MESTm	-	8.1 (10ng/mL) <sup>a</sup>	9.4 (10ng/mL) <sup>a</sup>	10.0 <sup>a</sup> , 10.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	METAN	-	9.2 (2ng/mL) <sup>a</sup>	9.6 (2ng/mL) <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	METEN	-	1.7 (10ng/mL) <sup>a</sup>	8.2 (10ng/mL) <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	NAND	-	3.7 (10ng/mL) <sup>a</sup>	3.0 (10ng/mL) <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	NANDm	-	2.5 (10ng/mL) <sup>a</sup>	3.7 (10ng/mL) <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup> , 5.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	OKSAN	-	9.2 (10ng/mL) <sup>a</sup>	7.0 (10ng/mL) <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup> , 10.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	OKSANm	-	6.4 (10ng/mL) <sup>a</sup>	10.0 (10ng/mL) <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup> , 5.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	OKSYMES	-	6.9 (10ng/mL) <sup>a</sup>	3.1 (10ng/mL) <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup> , 5.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	STAN	-	10.9 (2ng/mL) <sup>a</sup>	11.0 (2ng/mL) <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	STANm	-	7.3 (2ng/mL) <sup>a</sup>	14.7 (2ng/mL) <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup> , 5.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
	TREN	-	6.3 (10ng/mL) <sup>a</sup>	3.0 (10ng/mL) <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup> , 2.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-
TRENm	-	3.5 (10ng/mL) <sup>a</sup>	3.4 (10ng/mL) <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup> , 1.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-	
B	BOLD	-	-	-	5.0	-	85 (50 ng/mL)	-	35 (10 ng/mL)
	BOLDm	-	-	-	2.0	-	78 (50 ng/mL)	-	48 (10 ng/mL)
	DROSTm	-	-	-	40.0	-	78 (50 ng/mL)	-	75 (10 ng/mL)
	MEST	-	-	-	10.0	-	68 (50 ng/mL)	-	40 (10 ng/mL)
	MESTm	-	-	-	40.0	-	86 (50 ng/mL)	-	53 (10 ng/mL)
	METENm	-	-	-	20.0	-	90 (50 ng/mL)	-	39 (10 ng/mL)
	NANDm	-	-	-	8.0	-	75 (50 ng/mL)	-	44 (2 ng/mL)
	NANDme	-	-	-	20	-	84 (50 ng/mL)	-	48 (10 ng/mL)
	OKSAN	-	-	-	2.0	-	98 (50 ng/mL)	-	7 (10 ng/mL)
	OKSYMES	-	-	-	2.0	-	92 (50 ng/mL)	-	74 (10 ng/mL)
	STANm	-	-	-	1.0	-	89 (50 ng/mL)	-	31 (2 ng/mL)
	TRENm	-	-	-	2.0	-	97 (50 ng/mL)	-	52 (10 ng/mL)

<sup>a</sup> Screeningmetode

<sup>b</sup> Bekreftelsesmetode

Metode	Steroid	Nøyaktighet (%)	Presisjon (%)		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Utbytte (%)	Linearitet – Korrelasjonsfaktor (r <sup>2</sup> )	Spesifisitet – Matriks effekt (%)
			Repeterbarhet (%)	Reproduserbarhet (%)					
C	BOLD-sulfat	-	-	9 (2,5 ng/mL), 8 (5 ng/mL), 13 (12,5 ng/mL)	0.5 (5 ng/mL)	-	114 (5 ng/mL)	-	96 (5 ng/mL)
	DROSTm-sulfat	-	-	15 (2,5 ng/mL), 17 (5 ng/mL), 10 (12,5 ng/mL)	0.5 (5 ng/mL)	-	111 (5 ng/mL)	-	109 (5 ng/mL)
	MESTm-sulfat	-	-	14 (2,5 ng/mL), 10 (5 ng/mL), 10 (12,5 ng/mL)	0.5 (5 ng/mL)	-	110 (5 ng/mL)	-	112 (5 ng/mL)
	METENm-sulfat	-	-	11 (2,5 ng/mL), 9 (5 ng/mL), 12 (12,5 ng/mL)	0.5 (5 ng/mL)	-	112 (5 ng/mL)	-	94 (5 ng/mL)
	METEN-sulfat	-	-	14 (2,5 ng/mL), 7 (5 ng/mL), 9 (12,5 ng/mL)	1.0 (5 ng/mL)	-	110 (5 ng/mL)	-	114 (5 ng/mL)
	NANDm-sulfat	-	-	12 (2,5 ng/mL), 5 (5 ng/mL), 11 (12,5 ng/mL)	1.0 (5 ng/mL)	-	114 (5 ng/mL)	-	101 (5 ng/mL)
	TRENm-sulfat	-	-	13 (2,5 ng/mL), 14 (5 ng/mL), 13 (12,5 ng/mL)	0.5 (5 ng/mL)	-	102 (5 ng/mL)	-	84 (5 ng/mL)
D	BOLD-glukuronsyre	-	21.4 (0.5 ng/mL) 7.7 (5 ng/mL)	-	0.5	-	93.6 (5 ng/mL)	-	123
	BOLD-sulfat	-	4.5 (0.25 ng/mL) 9.6 (2.5 ng/mL)	-	0.25	-	93.2 (2.5 ng/mL)	-	118
	BOLDm-glukuronsyre	-	10.6 (16ng/mL) 8.5 (40ng/mL)	-	16.0	-	94.9 (40ng/mL)	-	112
	DROSTm-glukuronsyre	-	7.8 (2ng/mL) 1.6 (10ng/mL)	-	2.0	-	86.8 (10ng/mL)	-	104
	MESTm-glukuronsyre	-	13.1 (8ng/mL) 3.8 (20ng/mL)	-	8.0	-	88.7 (20ng/mL)	-	132
	METENm-glukuronsyre	-	18.0 (4ng/mL) 2.1 (20ng/mL)	-	4.0	-	82.8 (20ng/mL)	-	144
	NAND-glukuronsyre	-	17.8 (10 ng/mL) 5.8 (50 ng/mL)	-	10.0	-	96.0 (50 ng/mL)	-	115
	NAND-sulfat	-	12.9 (0.25 ng/mL) 7.2 (2.5 ng/mL)	-	0.25	-	96.2 (2.5 ng/mL)	-	125
	NANDm-glukuronsyre	-	10.7 (4ng/mL) 9.1 (20ng/mL)	-	4.0	-	95 (20ng/mL)	-	147
	NANDm-sulfat	-	10.8 (0,5ng/mL) 3.8 (5ng/mL)	-	0.5	-	93.8 (5ng/mL)	-	141
	NANDme-glukuronsyre	-	19.8 (0,5ng/mL) 18.9 (5ng/mL)	-	0.5	-	77.1 (5ng/mL)	-	141
	NANDme-sulfat	-	8.3 (0,5ng/mL) 12.7 (5ng/mL)	-	0.5	-	92.3 (5ng/mL)	-	114
	OKSAN	-	20.2 (1ng/mL) 13.7 (5ng/mL)	-	1.0	-	123.9 (5ng/mL)	-	116
OKSANm	-	15.7 (1ng/mL) 8.2 (5ng/mL)	-	1.0	-	109.9 (5ng/mL)	-	109	



Metode	Steroid	Nøyaktighet (%)	Presisjon (%)		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Utbytte (%)	Linearitet – Korrelasjonsfaktor (r <sup>2</sup> )	Spesifisitet – Matriks effekt (%)
			Repetierbarhet (%)	Reproduserbarhet (%)					
	OKSYMETm-glukuronosyre	-	-	-	-	-	-	-	-
	STANm-glukuronosyre	-	9.9 (0,5ng/mL) 5.7 (5ng/mL)	-	0.5	-	87.6 (5ng/mL)	-	120
E	BOLD	-	7.8	-	-	-	-	-	-
	BOLDm	-	-	-	-	-	-	-	-
	DROSTm	-	5.5	-	-	-	-	-	-
	MESTm	-	10.0	-	-	-	-	-	-
	METEN	-	14.5	-	-	-	-	-	-
	METENm	-	6.9	-	-	-	-	-	-
	NANDm	-	13.6	-	-	-	-	-	-
	NANDme	-	15.5	-	-	-	-	-	-
	OKSAN	-	23.9	-	-	-	-	-	-
	OKSANm	-	36.1	-	-	-	-	-	-
	OKSYMES	-	4.4	-	-	-	-	-	-
F1	OKSYMETm	-	17.1	-	-	-	-	-	-
	STANm	-	5.3	-	-	-	-	-	-
	BOLD	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	BOLDm	-	-	-	20.0	-	-	-	-
	MESTm	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	METAN	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	METANm	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	METAND	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	METEN	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	METENm	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	NAND	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	NANDm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	NANDme	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	OKSAN	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	OKSANm	-	-	-	2.0	-	-	-	-
OKSYMES	-	-	-	0.5	-	-	-	-	
OKSYMET	-	-	-	10.0	-	-	-	-	
OKSYMETm	-	-	-	20.0	-	-	-	-	
STAN	-	-	-	0.5	-	-	-	-	
STANm	-	-	-	0.5	-	-	-	-	

Metode	Steroid	Nøyaktighet (%)	Presisjon (%)		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Utbytte (%)	Linearitet – Korrelasjonsfaktor (r <sup>2</sup> )	Spesifisitet – Matriks effekt (%)
			Repeterbarhet (%)	Reproduserbarhet (%)					
	TREN	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	TRENm	-	-	-	0.5	-	-	-	-
F2	BOLD	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	BOLDm	-	-	-	10.0	-	-	-	-
	MESTm	-	-	-	0.25	-	-	-	-
	METAN	-	-	-	0.04	-	-	-	-
	METANm	-	-	-	0.04	-	-	-	-
	METANd	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	METEN	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	METENm	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	NAND	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	NANDm	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	NANDme	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	OKSAN	-	-	-	1.25	-	-	-	-
	OKSANm	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	OKSYMES	-	-	-	2.5	-	-	-	-
	OKSYMET	-	-	-	Ikke detektert	-	-	-	-
	OKSYMETm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	STAN	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	STANm	-	-	-	20.0	-	-	-	-
TREN	-	-	-	0.1	-	-	-	-	
TRENm	-	-	-	0.1	-	-	-	-	
F3	BOLD	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	BOLDm	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	MESTm	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	METAN	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	METANm	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	METANd	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	METEN	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	METENm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	NAND	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	NANDm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	NANDme	-	-	-	1.0	-	-	-	-
OKSAN	-	-	-	200	-	-	-	-	

Metode	Steroid	Nøyaktighet (%)	Presisjon (%)		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Utbytte (%)	Linearitet – Korrelasjonsfaktor (r <sup>2</sup> )	Spesifisitet – Matriks effekt (%)
			Repetierbarhet (%)	Reproduserbarhet (%)					
	OKSANm	-	-	-	200	-	-	-	-
	OKSYMES	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	OKSYMET	-	-	-	Ikke detektert	-	-	-	-
	OKSYMETm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
	STAN	-	-	-	200	-	-	-	-
	STANm	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	TREN	-	-	-	100	-	-	-	-
	TRENm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
F4	BOLD	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	BOLDm	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	MESTm	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	METAN	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	METANm	-	-	-	0.05	-	-	-	-
	METANd	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	METEN	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	METENm	-	-	-	0.2	-	-	-	-
	NAND	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	NANDm	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	NANDme	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	OKSAN	-	-	-	20	-	-	-	-
	OKSANm	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	OKSYMES	-	-	-	0.05	-	-	-	-
	OKSYMET	-	-	-	Ikke detektert	-	-	-	-
	OKSYMETm	-	-	-	0.1	-	-	-	-
	STAN	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	STANm	-	-	-	1.0	-	-	-	-
TREN	-	-	-	10	-	-	-	-	
TRENm	-	-	-	0.5	-	-	-	-	
F5	BOLD	-	-	-	10	-	-	-	-
	BOLDm	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	MESTm	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	METAN	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	METANm	-	-	-	20.0	-	-	-	-
	METANd	-	-	-	5.0	-	-	-	-

Metode	Steroid	Nøyaktighet (%)	Presisjon (%)		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Utbytte (%)	Linearitet – Korrelasjonsfaktor (r <sup>2</sup> )	Spesifisitet – Matriks effekt (%)
			Repeterbarhet (%)	Reproduserbarhet (%)					
	METEN	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	METENm	-	-	-	20	-	-	-	-
	NAND	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	NANDm	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	NANDme	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	OKSAN	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	OKSANm	-	-	-	20	-	-	-	-
	OKSYMES	-	-	-	0.5	-	-	-	-
	OKSYMET	-	-	-	100	-	-	-	-
	OKSYMETm	-	-	-	20	-	-	-	-
	STAN	-	-	-	100	-	-	-	-
	STANm	-	-	-	10	-	-	-	-
	TREN	-	-	-	5.0	-	-	-	-
TRENm	-	-	-	Ikke detektert	-	-	-	-	
G	BOLD	94	6,9	6,9	0.25	0,5	-	> 0,995	-
	MEST	98	7,5	7,5	2.0	5	-	> 0,995	-
	METAN	90	9,9	9,9	0.25	0,5	-	> 0,995	-
	METEN	98	7,2	7,2	0.25	0,5	-	> 0,995	-
	NAND	96	9,4	9,4	0.25	0,5	-	> 0,995	-
	STAN	98	3,7	3,7	0.25	0,5	-	> 0,995	-
	TEST	93	8,6	8,6	0.25	0,5	-	> 0,995	-
TESTm	98	9,2	9,2	0.25	0,5	-	> 0,995	-	

