

# Analitičke metode za određivanje dopinga

---

Šego, Leonarda

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:372271>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Leonarda Šego

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DOPINGA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zagreb, 2019.



Datum predaje prve verzije Završnog rada: 20. rujna 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 24. rujna 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>2</b>
<b>§ 2. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DOPINGA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. SREDSTVA ZA DOPING .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>NEODREĐENE TVARI.....</i>	6
2.1.2. <i>ANABOLIČKA SREDSTVA.....</i>	7
2.1.3. <i>PEPTIDNI HORMONI, ČIMBENICI RASTA, SLIČNE TVARI I TVARI KOJE IH OPONAŠAJU .....</i>	9
2.1.4. <i>BETA-2 AGONISTI.....</i>	9
2.1.5. <i>HORMONI I MODULATORI METABOLIZMA.....</i>	10
2.1.6. <i>DIURETICI I MASKIRNA SREDSTVA.....</i>	11
2.1.7. <i>STIMULANSI.....</i>	13
2.1.8. <i>NARKOTICI.....</i>	14
2.1.9. <i>KANABINOIDI.....</i>	14
2.1.10. <i>GLUKOKORTIKOIDI.....</i>	15
2.1.11. <i>β-BLOKATORI.....</i>	16
2.1.12. <i>MANIPULACIJA KRVLJU I KRVNIM PRIPRAVCIMA .....</i>	17
2.1.13. <i>KEMIJSKA I FIZIČKA MANIPULACIJA.....</i>	18
2.1.14. <i>GENETSKI I STANIČNI DOPING.....</i>	18
<b>2.2. ANALITIČKI POSTUPAK.....</b>	<b>18</b>
2.2.1. <i>POSTUPAK.....</i>	18
<b>2.3. ANALITIČKE METODE KOJE SE KORISTE ZA ODREĐIVANJE DOPINGA .....</b>	<b>22</b>
2.3.1. <i>PRIPRAVA UZORKA U DOPING KONTROLI.....</i>	22
2.3.2. <i>ANALITIČKE METODE U KONTROLI DOPINGA .....</i>	23
2.3.3. <i>KROMATOGRAFIJA.....</i>	24
2.3.4. <i>SPEKTROMETRIJA MASA.....</i>	25
2.3.5. <i>ELEKTROFOREZA .....</i>	26
<b>2.4. Zaključak .....</b>	<b>27</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXVIII</b>



## § Sažetak

U želji da postignu bolje rezultate, neki sportaši riskiraju zdravlje konzumirajući tvari za poboljšanje izdržljivosti i pojačanje snage i brzine. Tvari koje poboljšavaju učinak sportaša i loše djeluju na zdravlje nazivaju se doping sredstvima. Takve supstance suprotstavljaju se sportskom duhu i zabranjene su na sportskim natjecanjima, a neka i izvan njih. U raznim oblicima koriste se još odavnina, a borba protiv njih započela je u drugoj polovici prošlog stoljeća, kada je došlo do nekoliko smrtnih slučajeva uzrokovanih korištenjem tvari neistraženog djelovanja.

U okviru ovog završnog rada dan je pregled najvažnijih suvremenih analitičkih metoda za određivanje doping sredstava koje se koriste u borbi protiv nesportskog i za zdravlje štetnog ponašanja. Osim analitičkih metoda za određivanje nedopuštenih tvari i načina pripreme uzoraka za analizu, dana je i njihova klasifikacija, učinak na zdravlje i nuspojave.



## § 1. UVOD

Doping prema definiciji znači podizanje psihofizičkih sposobnosti i odgađanje umora unošenjem u organizam farmakoloških sredstava ili fizioloških supstanci u neprirodnim količinama ili onih koja su posve zabranjena, radi postizanja iznimnih sportskih rezultata. Uzimati doping znači uzimati sredstvo ili tvar s tim ciljem.

Kako bi postali jači, brži i izdržljiviji na sportskim natjecanjima ljudi od davnina koriste razne namirnice i napitke, kao što su sirova jaja, alkohol, kofein i sl. Sportaši tako ugrožavaju *fair-play* i svoje zdravlje. Testiranje na doping uvedeno je prvi puta 1968. godine, kada započinje borba protiv korištenja nedopuštenih sredstava u sportu, a potaknulo ju je nekoliko smrtnih slučajeva. Na Olimpijskim igrama u Münchenu 1972. godine za detekciju stimulansa u 2000 uzorka mokraće prvi puta je korištena metoda plinske kromatografije, nakon čega je uslijedio razvoj analitičkih metoda za određivanje nedopuštenih sredstava u sportu.<sup>2</sup>

Doping kontrola prema definiciji uključuje analizu mokraće (rijeđe krvi), uglavnom primjenom plinske kromatografije i spektrometrije masa, radi otkrivanja kemijskih supstancija ili njihovih metabolita što se uzimaju radi povećanja sportske (radne) sposobnosti. Godine 1966. Međunarodno biciklističko udruženje (*Union Cycliste Internationale*, UCI) i Međunarodna svjetska nogometna organizacija (*Fédération Internationale de Football Association*, FIFA) uvode doping kontrole na svojim natjecanjima, a ubrzo nakon toga sastavljen je i prvi popis zabranjenih sredstva, kojeg objavljuje Međunarodni olimpijski odbor (MOO). 1970-ih godina na listu se stavljaju i anabolički steroidi, što je dovelo do velikog broja diskvalifikacija sportaša, osobito u sportovima koji zahtijevaju snagu. Osobito se za 80-te godine vežu veliki skandali kada se osnivaju organizacije sa svrhom analize i sankcioniranja onih za koje se uspostavi da su konzumirali zabranjene i nedopuštene tvari. Godine 1999. osnovana je Svjetska agencija za borbu protiv dopinga u sportu (engl. *World Anti-Doping Agency*, WADA).

Prema MOO definicija dopinga je korištenje, uzimanje i davanje ljudskom organizmu stranih tvari ili većih količina tvari koje organizam sadrži, s ciljem da na umjetan način stimuliraju, odnosno povećaju natjecateljske sposobnosti sportaša, što je u suprotnosti sa sportskom etikom i fizičkim i mentalnim integritetom sportaša.<sup>3</sup> Testiranja sportaša na doping provode se u akreditiranim laboratorijima u skladu sa svjetskim kodeksom borbe protiv dopinga i međunarodnim standardom o testiranju koje preporuča WADA. Laboratoriji moraju

ispunjavati posebne uvjete za provođenje analitičkih određivanja zabranjenih i nedopuštenih tvari propisane Međunarodnim standardom za laboratorije.

Za analizu koriste se većinom uzorci mokraće, a ponekad i krvi. Danas postoje različiti analitički postupci za otkrivanje velikog broja dosad poznatih nedopuštenih i zabranjenih tvari, no stalno se sintetiziraju nove, dizajnerske molekule koje se ponekad ne mogu detektirati klasičnim analitičkim metodama. U takvim se slučajevima rezultati analize uspoređuju s biološkom putovnicom (ABP, *athlete biological passport*), koja sadrži definirane biološke parametre, hematološke biomarkere i steroidne module, broj eritrocita, hemoglobin, testosteron, androsteron itd. Bilo kakava promjena u biološkim parametrima ukazuje na moguće korištenje doping sredstava.

Na Listi zabranjenih tvari mogu se naći i pojedini lijekovi koje sportaši koriste u slučaju bolesti ili neke zdravstvene tegobe ali je propisana doza i načina uzimanja potrebnog lijeka. Postupak za odobrenje lijeka je vrlo dugotrajan i kompliciran, a razmatra ga posebno vijeće.

Osim lijekova, sportaši moraju paziti i pri konzumiranju prehrambenih dodataka, koji često sadrže zabranjene tvari, bez da su posebno naznačene. Osim toga, većina takvih prehrambenih dodataka se ne kontrolira strogo kao lijekovi, pa se često niti ne zna što sadrže.

Većina zabranjenih sredstava klasificirana je u pojedine klase i već postoje preporučene i referentne metode za njihovu analizu. Najveći problem pri analizi uzorka s doping tvarima su novosintetizirane i još neistražene tvari za čiju analizu tek treba pronaći odgovarajući analitički postupak. U okviru ovog rada navedene su klase zabranjenih doping sredstava i najvažnije metode njihove analize.

## § 2. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DOPINGA

### 2.1. SREDSTVA ZA DOPING

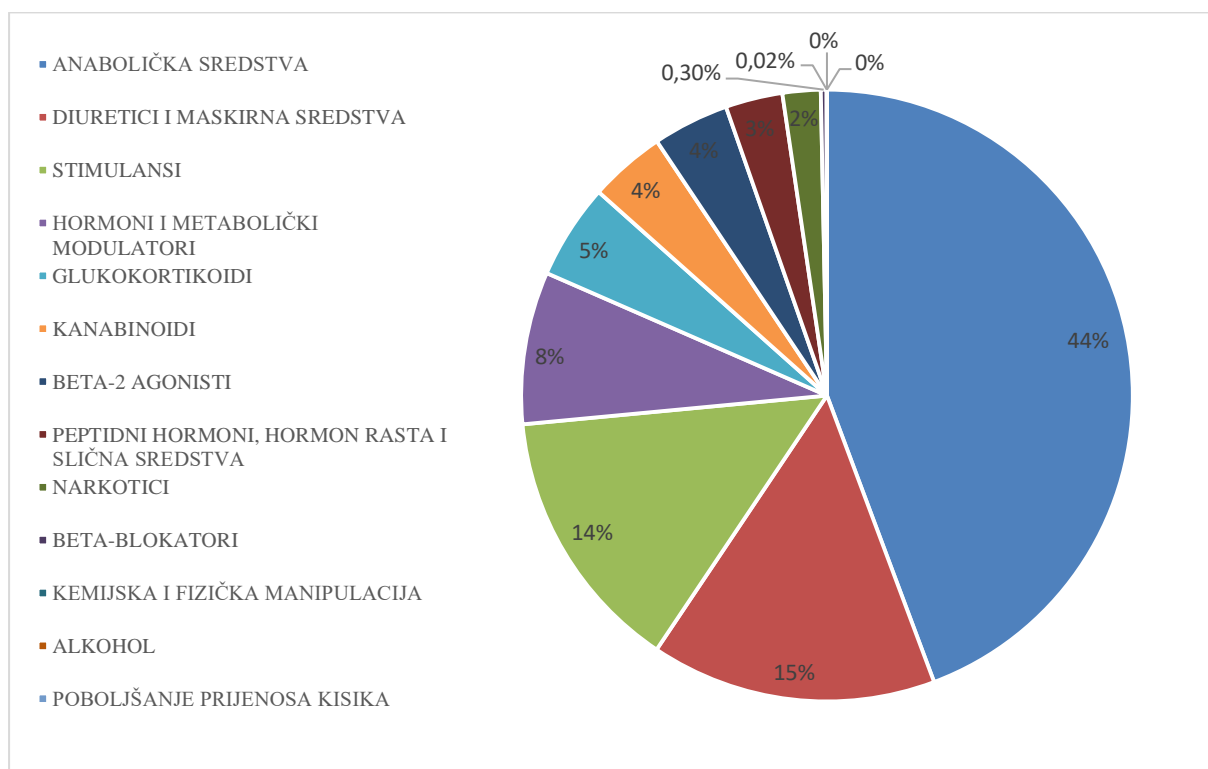
Doping je korištenje, uzimanje i davanje ljudskom organizmu stranih tvari ili većih količina tvari koje organizam sadrži, s ciljem povećanja natjecateljske sposobnosti sportaša na nesportski način.

Postoji jedanaest klasa zabranjenih tvari i tri zabranjene metode za poboljšanje učinka. Neke tvari zabranjene su samo u vrijeme natjecanja, za neke je određena koncentracija koja se ne smije prekoračiti, neke su zabranjene u samo određenim sportovima, a neke su zabranjene uvijek. Da bi se određena tvar našla na listi zabranjenih tvari mora zadovoljavati barem dva od tri kriterija: tvar poboljšava učinak sportaša, tvar je opasna po zdravlje sportaša i uzimanje tvari narušava sportski duh. Sredstva za doping dijele se u četrnaest kategorija prikazanih u Tablici 1 po klasama.

Tablica 1. Podjela sredstva za doping po klasama spojeva<sup>7</sup>

KLASA		PODGRUPA	
<b>S0</b>	<b>Neodređene tvari</b>		
<b>S1</b>	<b>Anabolička sredstva</b>	1	Anabolički androgeni steroidi (AAS) a) egzogeni AAS b) endogeni AAS i njihovi metaboliti i izomeri kad su primijenjeni egzogeno
		2	Druge anaboličke tvari
<b>S2</b>	<b>Peptidni hormoni, čimbenici rasta, slične tvari i tvari koje ih oponašaju</b>	1	Eritropoetini (EPO) i tvari koje utječu na eritropoezu (agonisti eritropoetinskih receptora, aktivatori hipoksijom inducibilnih čimbenika (HIF), Gata inhibitori, inhibitori transformirajućeg faktora rasta-β (TGF-beta), agonisti nespecifičnih receptora cjeljenja tkiva)
		2	Peptidni hormoni i čimbenici koji djeluju na njihovo otpuštanje (korionski gonadotropin (CG) i lutenizirajući hormon (LH) i čimbenici koji djeluju na njihovo opuštanje (samo kod muških), kortikotropini i čimbenici koji djeluju na njihovo otpuštanje, hormon rasta (GH), njegovi fragmenti i čimbenici koji djeluju na njegovo otpuštanje)
		3	Čimbenici rasta i modulatori čimbenika rasta
<b>S3</b>	<b>Beta-2-Agonisti</b>		
<b>S4</b>	<b>Hormoni i modulatori metabolizma</b>	1	Inhibitori aromataze
		2	Selektivni modulatori estrogenih receptora (SERMs)
		3	Druge antiestrogene tvari
		4	Tvari koje sprječavaju aktivaciju aktivinskog receptora IIB
		5	Modulatori metabolizma
<b>S5</b>	<b>Diuretici i maskirna sredstva</b>	1	Maskirajući agensi
		2	Diuretici
<b>S6</b>	<b>Stimulansi</b>	1	Nespecificirani stimulansi
		2	Specificirani stimulansi
<b>S7</b>	<b>Narkotici</b>		
<b>S8</b>	<b>Kanabinoidi</b>		
<b>S9</b>	<b>Glukokortikoidi</b>		
<b>M1</b>	<b>Manipulacija krvlju i krvnim pripravcima</b>	1	Primjena ili ponovno uvođenje u tijelo bilo koje količine autologne, alogene (homologne) ili heterologne krvi ili pripravaka eritrocita bilo kojeg porijekla u krvožilni sustav
		2	Umjetno povećanje unosa, prijenosa ili opskrbe kisikom
		3	Bilo koji oblik intravaskularne manipulacije krvlju ili sastavnim dijelovima krvi fizikalnim ili kemijskim sredstvima
<b>M2</b>	<b>Kemijska i fizikčka manipulacija</b>	1	Neovlašteno manipuliranje ili pokušaj neovlaštenog manipuliranja uzorcima sakupljenim tijekom dopinške kontrole s ciljem promjene njihove intaktnosti i valjanosti
		2	Intravenske nifuzije i/ili injekcije volumena većeg od 100 mL u razdoblju od 12 sati, osim ako se opravdano daju tijekom bolničkog liječenja, kirurških ili kliničkih dijagnostičkih postupaka
<b>M3</b>	<b>Genski i stanični doping</b>	1	Korištenje polimera nukleinskih kiselina ili analoga nukleinskih kiselina
		2	Korištenje tvari koje imaju utjecaj na gene, dizajnirane da mijenjaju genomsku sekvencu i/ili transkripcijsku, postranskripcijsku ili epigenetsku regulaciju ekspresije gena
		3	Korištenje normalnih ili genski modificiranih stanica
<b>P1</b>	<b>Beta-blokatori</b>		

Za većinu spojeva sa liste zabranjenih sredstava nije dokazano da imaju pozitivan učinak na sportaša. Slika 1. prikazuje raspodjelu učestalosti detektiranih sredstava po klasama. Najčešće detektirana sredstva kod sportaša su anabolička sredstva, diuretici te ostala maskirajuća sredstva i stimulansi. Anabolička sredstva koriste se za rast mišića i snage, diuretici i maskirajuća sredstva obično za prikrivanje drugih doping sredstava, a stimulansi olakšavaju napore.



Slika 1. Prikaz učestalosti detektiranih doping sredstava po klasama u 2017. godini.<sup>8</sup>

Svaka klasa zabranjenih spojeva sadrži podgrupu spojeva, koji svaki na određen način djeluje na organizam i izaziva nuspojave. Tvari koje su zabranjene za vrijeme i izvan natjecanja su: neodređene tvari, anabolička sredstva, peptidni hormoni, čimbenici rasta, slične tvari i tvari koje ih oponašaju, beta-2 agonisti, hormoni i modulatori metabolizma, diuretici i maskirajuća sredstva.

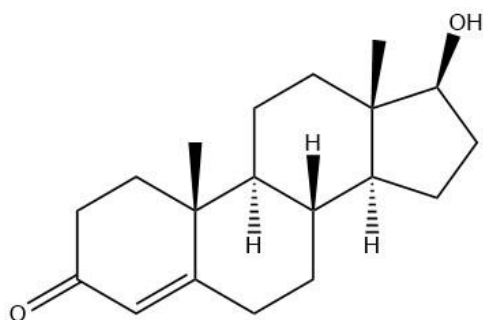
### 2.1.1. NEODREĐENE TVARI

Ova skupina obuhvaća sve farmakološke tvari koje nisu odobrene za terapijsku upotrebu kod ljudi od niti jednog državnog regulatornog zdravstvenog tijela. Sadrži različite tvari kao što su

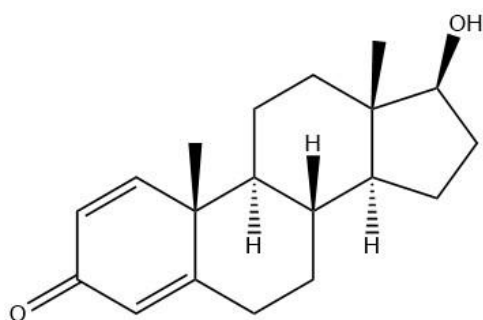
lijekovi u prekliničkoj ili kliničkoj fazi razvoja, dizajnerske droge, tvari koje koriste veterinari i slično. Za te spojeve ne postoji dokaz da općenito imaju pozitivan učinak na ljude, pa tako niti na sportaše.

### 2.1.2. ANABOLIČKA SREDSTVA

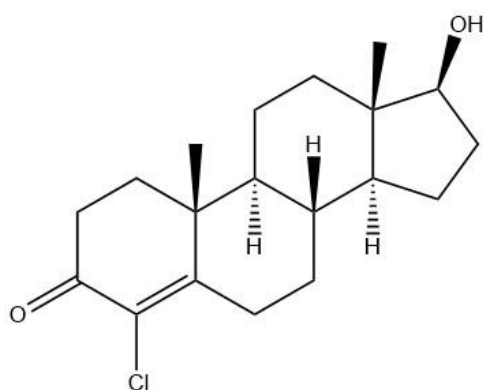
Anabolička sredstva najčešće su korištena sredstva za doping, a dijele se na anaboličke androgene steroide (AAS) i ostale anaboličke tvari. Anabolički androgeni steroidi mogu biti egzogeni i endogeni. Egzogeni su oni koje tijelo ne proizvodi prirodnim putem, dok endogene tijelo može samo proizvesti. Neka od zabranjenih anaboličkih sredstava su androsteron, testosteron, boldenon, zeranol, itd. Njihov anabolički utjecaj zbog kojeg dolazi do povećane apsorpcije proteina rezultiraju rastom mišića, porastom snage, ubrzani oporavak, pa nije čudno da su najčešće detektirani spojevi u doping analizi. Međutim, ova vrsta spojeva može biti izuzetno štetna za zdravlje sportaša. Tako prekomjernom konzumacijom testosterona, jednog od najpoznatijih anaboličkih androgenih steroida, može doći do nuspojava kao što su retencija natrija, kalija, sulfata, fosfata i vode, agresivnost i povećani libido. Struktura testosterona i ostalih anaboličkih androgenih steroida prikazana je na Slici 2.



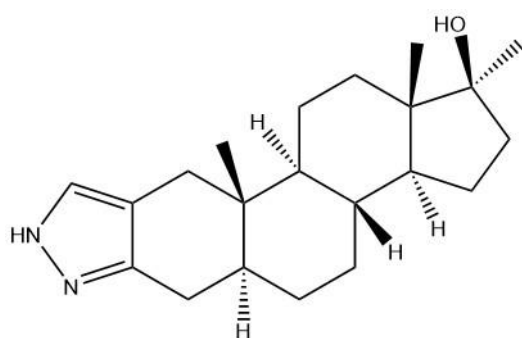
(a)



(b)



(c)



(d)

Slika 2. Molekularna struktura endogenih anaboličkih steroida (a) testosterona i (b) boldenona te egzogenih anaboličkih sredstava (c) klostebola i (d) stanozolola

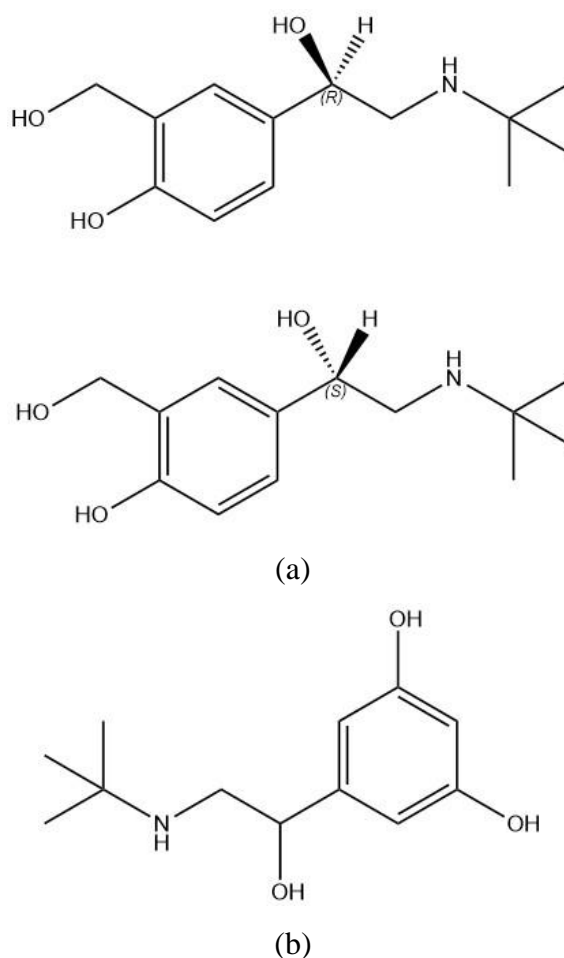
### 2.1.3. PEPTIDNI HORMONI, ČIMBENICI RASTA, SLIČNE TVARI I TVARI KOJE IH OPONAŠAJU

U ovu grupu spojeva ubrajaju se eritropoetini (EPO) i tvari koje utječu na eritropezu (aktivatori hipoksijom inducibilnih čimbenika (HIF), GATA inhibitori, inhibitori transformirajućeg faktora rasta- $\beta$  (TGF-beta), agonisti nespecifičnih receptora cijeljenja tkiva), peptidni hormoni i čimbenici koji djeluju na njihovo otpuštanje (korionski gonadotropin i lutenizirajući hormon i čimbenici koji djeluju na njegovo izlučivanje, hormon rasta, njegovi metaboliti i čimbenici koji djeluju na njegovo izlučivanje) te čimbenici rasta i modulatori čimbenika rasta. Najpoznatiji predstavnici ove skupine su eritropoetini (EPO), korionski gonadotropin (CG), lutenizirajući hormon (LH) i hormon rasta. EPO inducira proizvodnju crvenih krvnih stanica, što dovodi po povećanja volumena crvenih krvnih stanica, time raste kapacitet prijenosa kisika i povećava sposobnost tijela da se opire umoru, no bez uvjerljivih dokaza da poboljšava učinak sportaša. CG i LH povećavaju količinu testosterona u krvi, pa se pretpostavlja da imaju sličan učinak kao i anabolički steroidi. Konzumiranjem hormona rasta, bez pouzdanog dokaza, očekuje se smanjenje udjela masnog tkiva, a povećanje mišićnog, maksimalna potrošnja kisika i izvrsna kardiovaskularna funkcija te smanjenje vremena oporavka. Nuspojave obuhvaćaju niz poremećaja, ovisno o tome koja se tvar uzima. Eritropoetin može uzrokovati visok krvni tlak, infarkt ili moždani udar, a hormon rasta akromegaliju i razne metaboličke poremećaje.

### 2.1.4. BETA-2 AGONISTI

Ova skupina spojeva obično se koristi pri liječenju astme zbog svojeg opuštajućeg učinka na glatke mišiće pluća preko beta-2 receptora. Za njih je dokazano da poboljšavaju sportske rezultate, ali samo u određenim disciplinama. U ovoj skupini su salbutamol i tertbutanil, za koje je definirana dopuštena terapijska koncentracija koja se može naći u urinu kod sportaša koji imaju problema s astmom. Analiza ovih spojeva ponekad je zahtjevna jer dokazano može doći do neslaganja inhalirane i detektirane koncentracije ovih tvari u urinu zbog fizičke aktivnosti koja povećava koncentraciju tih tvari. U slučaju da se u urinu nađe prekomjerna količina ovih spojeva, provode se dodatne analize uzorka urina. Nuspojave se javljaju u obliku tremora i tahikardije.

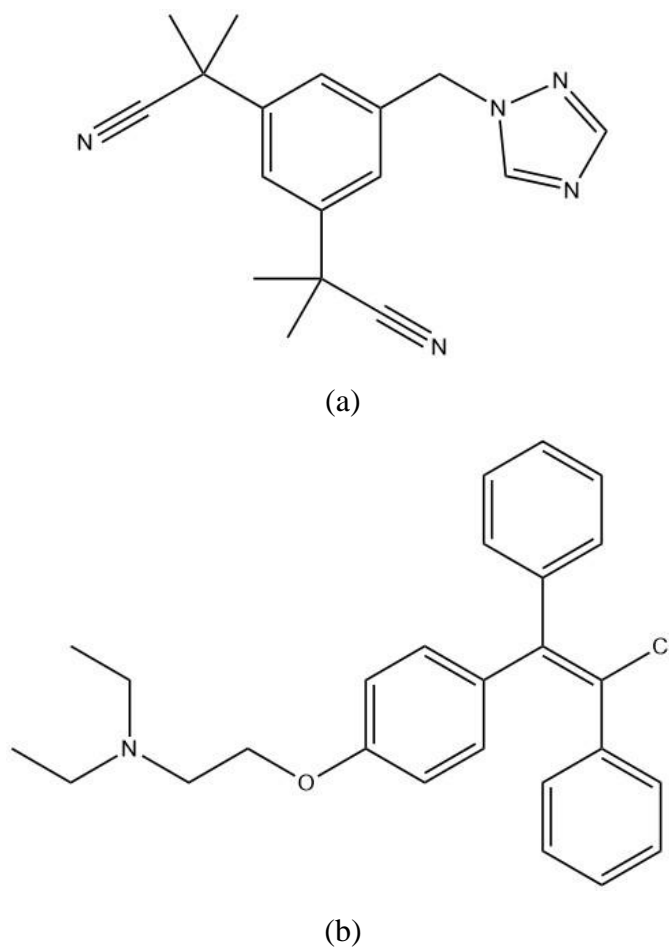




Slika 3. Molekularna struktura beta-2 agonista (a) *R*- i *S*-sabutamola i (b) tertbutalina

### 2.1.5. HORMONI I MODULATORI METABOLIZMA

Inhibitori aromataze, selektivni modulatori estrogenih receptora (SERMs), druge antiestrogene tvari, tvari koje sprječavaju aktivaciju aktivinskog receptora IIB i modulatori metabolizma čine četvrtu skupinu zabranjenih spojeva. Većina tvari iz ove skupine indirektno povećava koncentraciju testosterona u krvi, tako da smanjuje koncentraciju estrogena. Pozitivan učinak ovih spojeva još nije dokazan, a nuspojave su povezane s narušenom koncentracijom hormona u krvi.

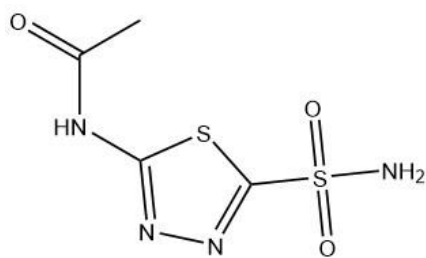


Slika 4. Molekularne strukture (a) inhibitora aromataza anastrozola i (b) antiestrogenog klomifena

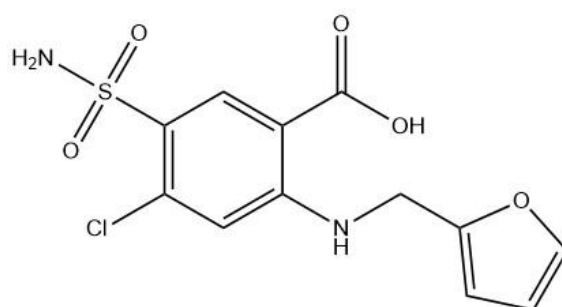
#### 2.1.6. DIURETICI I MASKIRNA SREDSTVA

Skupina spojeva sadrži lijekove koji uzorkuju povećano izlučivanje tekućine iz tijela, a obično se koriste za liječenje hipertenzija i ostalih kardiovaskularnih poremećaja. Vrlo često se detektiraju u uzorcima urina sportaša. Dije se prema mehanizmu djelovanja: inhibitori ugljične anhidraze, inhibitori  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  simportera, osmotski diuretici, inhibitori kanala  $\text{Na}^+$  bubrežnog epitela i agonisti mineralokortikoidnog receptora. Krajnji rezultat korištenja ovih spojeva, bez obzira na mehanizam, je prekomjerno lučenje tekućine iz tijela, zbog čega se mogu koristiti u svrhu smanjenja težine ili maskiranja drugih zabranjenih supstanci. Najčešće nuspojave su poremećena ravnoteža elektrolita u krvi i dehidracija. Teško se otkrivaju u urinskim uzorcima jer se u organizmu zadržavaju samo 24-48 sati nakon uzimanja, a stvaraju probleme i pri analizi ostalih sredstva jer povećavaju volumen urina, čime se smanjuje

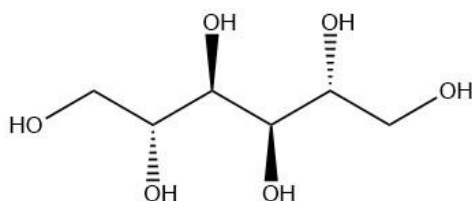
koncentracija ostalih doping sredstava te se tako otežava njihova detekcija klasičnim analitičkim metodama.



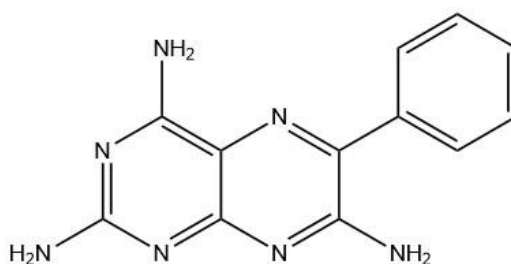
(a)



(b)



(c)



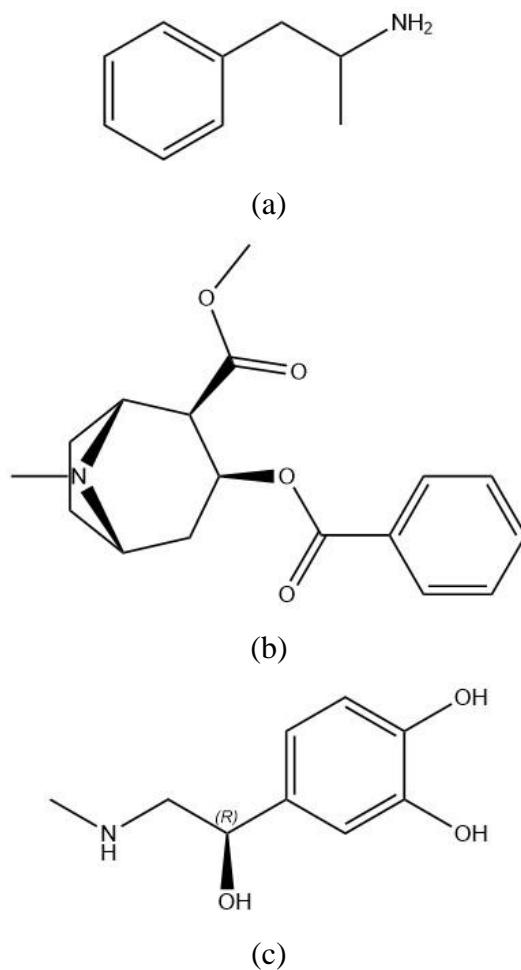
(d)

Slika 5. Molekularne strukture diuretika: (a) acetazolamid, (b) furosemid, (c) manitol i (d) triamteren

Kategorije spojeva zabranjenih samo za vrijeme natjecanja čine stimulansi, narkotici, kanabinoidi i glukokortikoidi.

### 2.1.7. STIMULANSI

Treća najkorištenija skupina na WADA-inoj listi dijeli se na nespecificirane i specificirane stimulanse, a neki od njih prikazani su na slici 6.



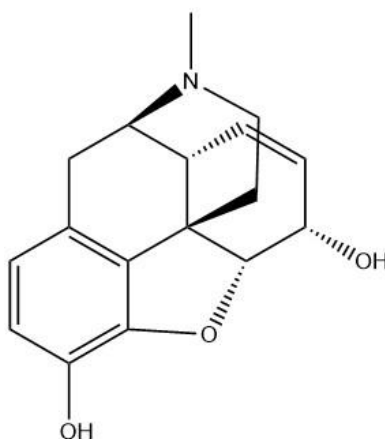
Slika 6. Molekularna struktura nespecificiranih stimulansa (a) amfetamina, (b) kokaina i specificiranog stimulansa(c) *R*-adrenalina

U ovu grupu spojeva spadaju neka od najstarijih sredstava za doping, a najpoznatiji od njih je kokain. Djeluju tako da prividno smanjuju bol i glad te tako olakšavaju sportašu napor tijekom dugih i iscrpljujućih sportskih disciplina. Stimulansi djeluju na središnji živčani sustav tako da utječu na koncentraciju neurotransmitera u mozgu, pretežno na dopamin i noradrenalin. Nije sa

sigurnošću dokazano djeluju li stimulansi pozitivno ili ne, kojim mehanizmom, a dokazano je samo da velike količine imaju značajan utjecaj na zdravlje.

### 2.1.8. NARKOTICI

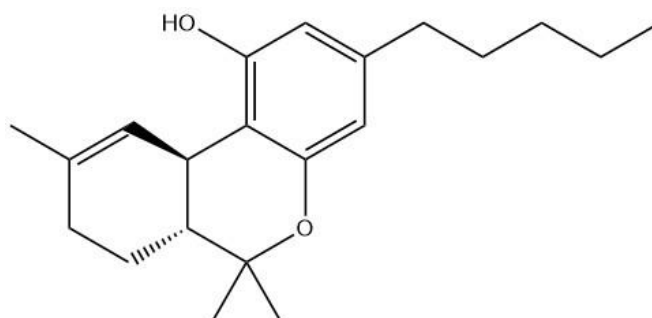
U ovu skupinu ubrajaju se snažni analgetici, od kojih je najpoznatiji morfin i njegovi analozi. Djeluju na središnji živčani sustav stimuliranjem opioidnih receptora, pa dolazi do smanjenja osjećaja boli. Za narkotike vezane su česte nuspojave poput mučnine i umirenja, koje poništavaju svaki mogući pozitivan učinak ove klase spojeva.



Slika 7. Molekularna struktura morfina, jednog od zabranjenih narkotika

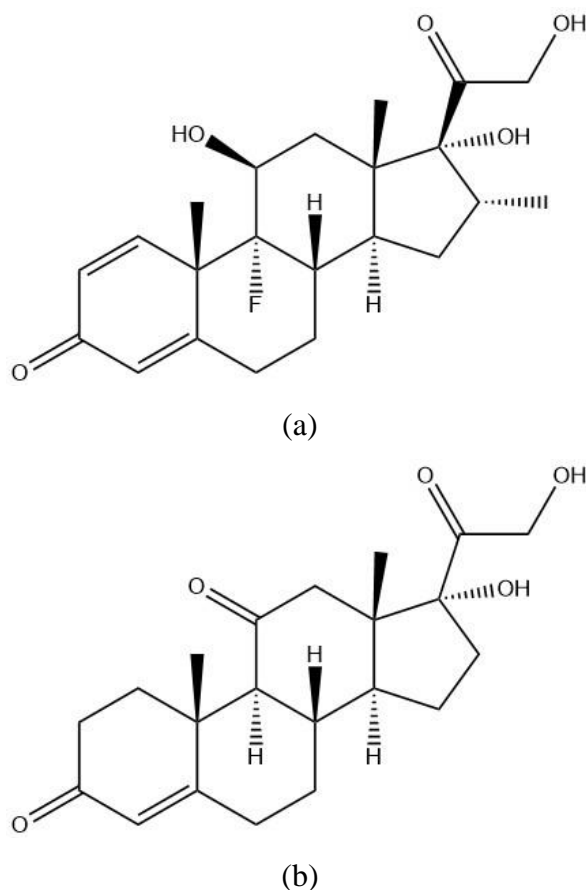
### 2.1.9. KANABINOIDI

Uključuju prirodne (npr. hašiš, kanabis i marihuana) i sintetičke kanabinoide (npr.  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol, naftoilindoli itd.). Većina ovih spojeva poznati su kao rekreacijska droga koja ima umirujuće djelovanje, smanjuju stres i anksioznost, no i koncentraciju te zadržavanje pozornosti, što je nepoželjno za sportaša. Međutim, neki od efekata kanabinoida mogu biti vrlo korisni u nekim sportovima gdje je važna opuštenost mišića, pa se o djelovanju i korištenju ovih spojeva na sportaša i dalje raspravlja. Ipak, smatra se da su štetni za zdravlje, što je jedan od razloga zašto se nalaze na WADA-inoj listi zabranjenih tvari.

Slika 8. Molekularna struktura  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC)

### 2.1.10. GLUKOKORTIKOIDI

Glukokortikoidi povećavaju otpuštanje dopamina, čime se povećava dostupnost metaboličkih supstrata koji mišićima daju energiju. Ovakva ergogena aktivnost glukokortikoida podrazumijeva ublažavanje iscrpljenosti, povećanje izdržljivosti, smanjenje umora, pozitivan utjecaj na raspoloženje, brži oporavak, što bi uvelike moglo pomoći sportašima. Međutim dugotrajno korištenje ovih spojeva dovodi do osteoporoze, otpornosti na inzulin, hipertenzije, arteroskleroze, itd. Neki od glukokortikoida prikazani su na Slici 9.

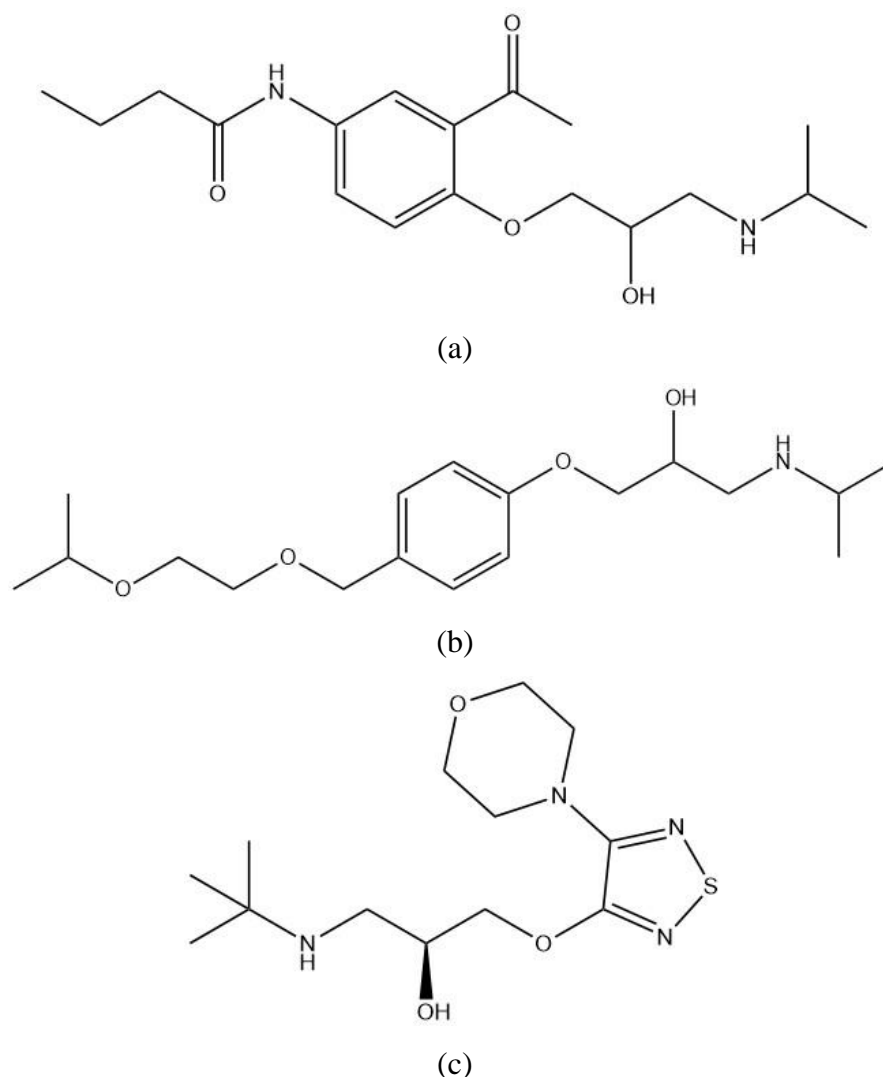


Slika 9. Molekularna struktura glukokortikoida (a) deksametazona i (b) kortizona

Tvari zabranjene samo u pojedinim sportovima su beta-blokatori.

### 2.1.11. $\beta$ -BLOKATORI

Ovi spojevi blokiraju norepinefrin i epinefrin i tako smanjuju broj otkucaja srca, dolazi do širenja krvnih žila, čime se smanjuje tlak, djeluju opuštajuće na mišiće i ublažavaju tremor. Zbog toga su zabranjeni u sportovima kao što su automobilizam, biljar, golf, pikado, streličarstvo i slično.<sup>7</sup> Ovi spojevi dokazano poboljšavaju učinak, no mogu imati i loše učinke, npr. niski krvni tlak, oslabljena cirkulacija, zastoj srca, itd.



Slika 10. Beta-blokatori (a) acebutolol, (b) bisoprolol i (c) timolol

Tri metode su zabranjene za i izvan natjecanja: Manipulacija krvlju i krvnim pripravcima, Kemijska i fizička manipulacija i Genetski i stanični doping:

#### 2.1.12. MANIPULACIJA KRVLJU I KRVNIM PRIPRAVCIMA

Zabranjena je primjena ili ponovno uvođenje u tijelo bilo koje količine autologne, alogene ili heterogene krvi ili pripravaka eritrocita bilo kojeg podrijetla na krvožilni sustav, zatim umjetno povećanje unosa, prijenosa ili opskrbe kisikom te bilo koji oblik intravaskularne manipulacije krvlju ili sastavnim dijelovima krvi fizikalnim ili kemijskim sredstvima. Analiza manipulacije krvi provodi se uz pomoć biološke putovnice koja sadrži biološke parametre, koji se mijenjaju korištenjem gore navedenih metoda.



### 2.1.13. KEMIJSKA I FIZIČKA MANIPULACIJA

Ove metode obuhvaćaju neovlašteno manipuliranje ili pokušaj neovlaštenog manipuliranja uzorcima sakupljenim tijekom dopinške kontrole s ciljem promjene njihove intaktnosti i valjanosti te intravenske infuzije i/ili injekcije volumena većeg od 100 mL u razdoblju od 12 sati, osim ako se opravdano daju tijekom bolničkog liječenja, kirurških ili kliničkih dijagnostičkih postupaka.<sup>7</sup> Ove metode ponekad se detektiraju i prikupljanjem dokaza izvan laboratorija.

### 2.1.14. GENETSKI I STANIČNI DOPING

Od 2016. zabranjeno je korištenje polimera nukleinskih kiselina ili analoga nukleinskih kiselina, korištenje tvari koje imaju učinak na gene, dizajnirane da mijenjaju genomsku sekvencu i/ili transkripciju, posttranskripciju ili epigenetsku regulaciju ekspresije gena te korištenje normalnih ili genski modificiranih stanica. Genski doping razvio se unatrag zadnjih 20 godina, razvija se izuzetno brzo, a djeluje na razne proteine – potiče se rast kostiju, keratocita, krvnih žila itd. Detektira se analizom uzoraka krvi.<sup>13</sup>

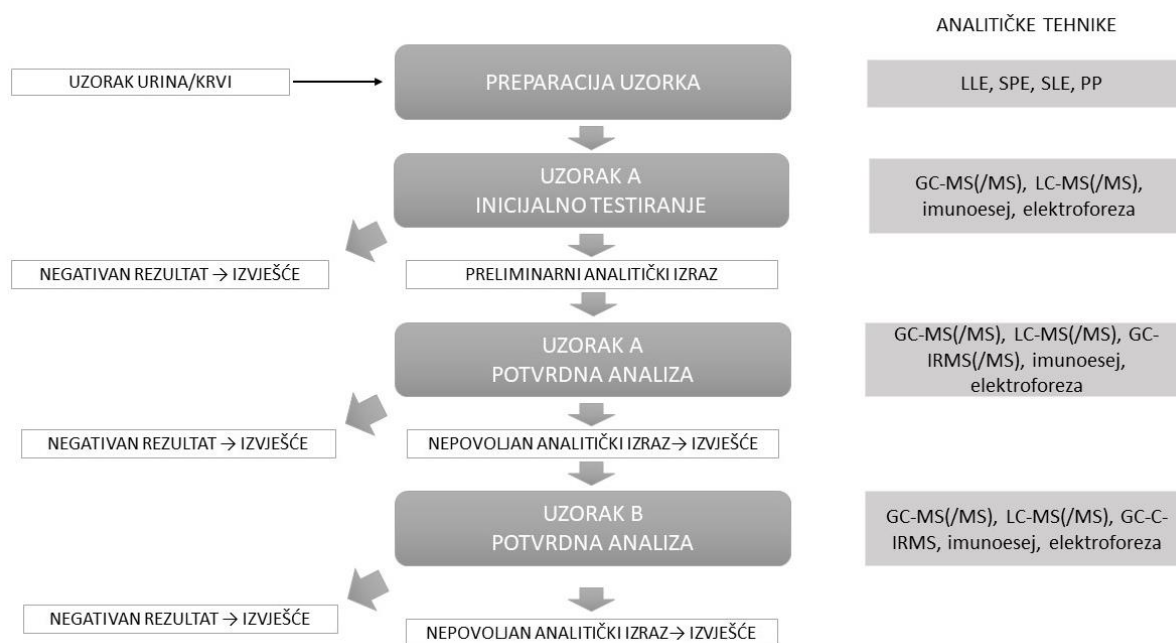
## 2.2. ANALITIČKI POSTUPAK

U kontroli dopinga sam analitički postupak je vrlo zahtjevan. Analit je u kompleksnoj matrici uzorka, najčešće urina ili krvi, koji se sastoje od spojeva s različitim fizičko-kemijskim svojstvima. Analitičke metode moraju biti specifične, selektivne i osjetljive, količina uzoraka je ograničena. Analitički postupak obuhvaća probir i potvrdu analize. U prvom dijelu postupka koriste se metode za detekciju što većeg broja tvari u uzorku. Važno je da se u ovom dijelu ne detektiraju lažno-pozitivni rezultati. Ako se detektira sumnjiva tvar, koriste se specifičnije i preciznije analitičke metode potvrde.

### 2.2.1. POSTUPAK

Uzorak se prikuplja na stanicama za doping kontrolu i razdvoji na dva dijela, otprilike 2/3 u bočicu A i ostatak u bočicu B. Poželjno je ohladiti uzorak na temperaturu manju od 5 °C i spremiti u hladan spremnik s ledom, zatim u električni frižider, u kojem se održava niska

temperatura kako ne bi došlo do razvoja mikroorganizama, za koje je urin vrlo pogodan medij.<sup>9</sup> Nepažljivo postupanje s prikupljenim uzorkom može, kasnije u analizi, donijeti krive rezultate. Prikupljeni uzorak može se pravilnim skladištenjem čuvati i do 10 godina, što pomaže u detekciji tvari poput dizajnerskih molekula koje su u trenutku analize nepoznate, ali razvojem analitičkih tehnika analiziraju se novim analitičkim postupcima. Postupak analitičke strategije za analizu doping sredstava koja se provodi u antidopinškom laboratoriju prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Prikaz analitičke strategije za analizu doping sredstava koja se provodi u antidopinškom laboratoriju<sup>3</sup>

Kada stigne u akreditirani antidopinški laboratorij, uzorak iz bočice A se pripravlja za daljnju analizu instrumentnim analitičkim metodama (ekstrahira, razrjeđuje ili taloži), a ukoliko se žele detektirati neki peptid ili protein, koriste se imunokemijske metode.

Slijedi probir, u kojem je cilj detektirati što više tvari sa zabranjene liste. Uglavnom se koriste imunokemijske metode ili spregnute tehnike, plinska ili tekućinska kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom. Može se reći da je ovaj dio analize najvažniji jer tvari koje se ne pronađu u ovoj fazi često ostanu nedetektirane.

Ukoliko se u prvom dijelu analize detektira zabranjena tvar provodi se potvrđna analiza uzorka u kojoj se koriste analitičke metode ciljano za detektirane zabranjene tvari. Analiza se provodi na uzorku iz bočice A. Ovisno o kemijskoj strukturi, metabolizmu i izlučivanju detektirane tvari određuje se strategija za ponovnu analizu uzorka. Tekućinska i plinska

kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom (eng. *Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS; *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) ili tandemski spektrometrija masa (MS/MS) te matricom potpomognuta laserska ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem spektrometrija masa (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI-MS) koristi se za analizu različitih molekula (proteini, ugljikohidrati, peptidi...), a za analizu ciljanih proteina i peptida koriste se imunokemijske metode i izoelektrično fokusiranje. Ukoliko se i u ovom koraku analize detektira zabranjena tvar, analiza se ponavlja, no ovaj put na uzorku iz bočice B. Analitičke metode i metode pripreve uzorka za analizu dopinga po klasama spojeva prikazane su u Tablici 2.

Ekstrakcijske tehnike koriste se u pripremi uzorka za detekciju većine zabranjenih klasa: anaboličkih sredstava, beta-2-agonista, hormonskih antagonista i modulatora, diuretika i ostalih maskirajućih sredstava, stimulansa, narkotika, kanabinoida, glukokortikoida i beta-blokatora. Imunoafinitetna kromatografija koristi se u pripremi uzorka za detekciju pojedinih peptidnih hormona, korionskog gonadotropina i lutenizirajućeg hormona, inzulina i kortikotropina. Izoelektrično fokusiranje može se koristiti za u pripremi uzorka za detekciju sredstava koja stimuliraju eritropoezu. Razrijeđenje uzorka se koristi pri analizi manjih molekula: beta-2-agonista, hormonskih antagonista i modulatora, stimulansa i narkotika te beta-blokatora. Beta-blokatori, narkotici, hormonski antagonisti i modulatori, beta-2 agonisti i anaboličke tvari za analizu se mogu pripremiti hidrolizom uzorka.

Tablica 2. Analitičke metode i metode pripreme uzorka za analizu dopinga<sup>3</sup>

	KLASA	PRIPREMA UZORKA	ANALITIČKE METODE
<b>S0</b>	<b>Neodređene tvari</b>		
<b>S1</b>	<b>Anabolička sredstva</b>	LE, SPE, H	
1.	Anabolički androgeni steroidi (AAS)	LLE, SPE, H	GC-MS, GC-MS(/MS), LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS), MALDI-TOF-MS
	Egzogeni AAS	LLE, SPE, H	GC-MS, GC-MS(/MS), LC-MS(/MS), GC-C-IRMS
	Endogeni AAS		UHPLC-MS-MS(/MS), MALDI-TOF-MS, IAFC, CE
2.	Druga analitička sredstva		GC-MS, LC-MS(/MS)
<b>S2</b>	<b>Peptidni hormoni, čimbenici rasta, slične tvari i tvari koje ih oponašaju</b>		
1.	Sredstva koja stimuliraju eritropoezu	IAF, IEF	CE-ESI-TOF/MS, MALDI-TOF
2.	Korionski gonadotropin i lutenizirajući hormon za muškarce	IAF	
3.	Inzulin		IAS
4.	Kortikotropini	IAF	LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS), nano-UHPLC-LTQ-Orbitrap
5.	Hormon rasta, čimbenik rasta nalik inzulinu-1	IAF	nano-UHPLC-LTQ-Orbitrap, IAS
<b>S3</b>	<b>Beta-2 agonisti</b>	LLE, SPE, H, DS	GC-MS, LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS)
<b>S4</b>	<b>Hormoni i modulatori metabolizma</b>		
1.	Inhibitori aromataze	LLE, DS, H	LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS)
2.	Selektivni modulatori estrogenskih receptora	LLE, DS, H	LC-MS(/MS)
3.	Druga antiestrogenska sredstva	LLE, DS, H	GC-MS, UHPLC-MS(/MS)
4.	Tvari koje modificiraju funkciju miostatina		
<b>S5</b>	<b>Diuretici i maskirna sredstva</b>	LLE, SPE, DS	GC-MS, LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS), MALDI-TOF
<b>S6</b>	<b>Stimulansi</b>		
	Nespecificirani	LLE, SPE, DS	GC-MS, LC-MS(/MS), LC-MS(/MS)
	Specificirani	LLE, SPE, DS	GC-MS, LC-MS(/MS), LC-MS(/MS)
<b>S7</b>	<b>Narkotici</b>	LLE, SPE, DS, H	GC-MS, LC-MS(/MS), LC-MS(/MS)
<b>S8</b>	<b>Kanabinoidi</b>	LLE, SPE, IAS	GC-MS, LC-MS(/MS), LC-MS(/MS)
<b>S9</b>	<b>Glukokortikoidi</b>	LLE, SPE, H	LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS)
<b>M1</b>	<b>Manipulacija krvlju i krvnim pripravcima</b>		
1.	Krvni doping		FC
2.	Umjetno povećanje unosa, prijena ili opskrbe kisikom		GC-MS, UHPLC-MS(/MS), CE-ESI-TOF
3.	Bilo koji oblik intravaskularne manipulacije krvlju ili sastavnim dijelovima krvi fizikalnim ili kemijskim sredstvima		
<b>M2</b>	<b>Kemijska i fizička manipulacija</b>		
<b>M3</b>	<b>Genski i stanični doping</b>		
<b>P1</b>	<b>Beta-blokatori</b>	LLE, SPE, DS, H	GC-MS, LC-MS(/MS), UHPLC-MS(/MS)

## 2.3. ANALITIČKE METODE KOJE SE KORISTE ZA ODREĐIVANJE DOPINGA

### 2.3.1. PRIPRAVA UZORKA U DOPING KONTROLI

Priprava uzorka vrlo je važna za uspješnu analizu. Kada je uzorak urin najčešće se koriste tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (*eng. Liquid-liquid extraction, LLE*), ekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng. Solid-phase extraction, SPE*), razrjeđenje (*eng. Dilute-and-shoot, DS*) i taloženje proteina (*eng. Protein purification, PP*). U slučaju uzoraka krvi, koriste se kolone za afinitetnu kromatografiju i uređaji za razdvajanje proteina. Često se kod pripreve seruma i krvne plazme proteini talože uz dodatak acetonitrila.

Ekstrakcija je analitička metoda odvajanja koja se temelji na različitoj topljivosti tvari između dvije faze koja se međusobno ne miješaju. U tekućinsko-tekućinskoj kromatografiji analit se otapa najčešće u organskom otapalu. Otapalo se ne smije miješati s vodom da ne dođe stvaranja emulzije. Učinkovitost odvajanja povećava se višestrukim izvođenjem postupka. U doping kontroli se zbog svoje jednostavnosti, učinkovitosti i male cijene često koristi. Nedostaci LLE su velike količine volumena uzorka, ne može se automatizirati i ponekad nije dovoljno učinkovita i selektivna. U kromatografiji na čvrstoj fazi analit se propušta kroz čvrstu fazu na membrani ili u koloni, na kojoj se veže i zatim ispere s drugim otapalom. Prednosti ove metode obzirom na ekstrakciju tekuće-tekuće je veća selektivnost, mogućnost automatizacije i manji volumen uzorka.

Za izolaciju proteina koriste se imunokemijske metode koje se temelje na reakciji antigena i antitijela. Vrlo su jednostavne, specifične i osjetljive. Imunoafinitetna kromatografija temelji se na propuštanju uzorka kroz kolonu sa specifičnim antitijelima za neki protein. Prolaskom kroz kolonu željeni protein se veže na antitijelo, zaostaje u koloni, dok ostale tvari prolaze kroz kolonu. Prednosti ove metode su to što se ne mijenja strukturu analita, a problem može biti otežano eluiranje vezanog proteina s kolone zbog velike specifičnosti vezanja antitijela i proteina. Ova metoda se u doping analizi krvi, plazme ili urina najviše koristi za detektiranje peptidnih hormona i sličnih analita.

Izoelektrično fokusiranje vrsta je elektroforeze koja se koristi za odjeljivanje proteina, a temelji se na različitim vrijednostima izoelektričnih točaka proteina u gradijentu pH. Proteini imaju i pozitivno i negativno nabijene skupine (amfoliti), čiji naboj ovisi o pH. Izoelektrična točka je ona pri kojoj je neto-naboj amfolita jednak nuli. Protein će se u gradijentu pH gibati do

one točke u kojoj je pH jednak izoelektričnoj točki i tako dolazi do razdvajanja komponenti smjese. Nepoznate tvari se zatim detektiraju pomoću referentnih spojeva.

### 2.3.2. ANALITIČKE METODE U KONTROLI DOPINGA

U laboratorijima za antidoping metoda za analizu često se dijele na dvije vrste metoda, kemijske i biološke. Kemijske metode analize podrazumijevaju tehnike razdvajanja i analize, a biološke imunološke testove.

U Tablici 2. prikazane su tehnike korištene za analizu za različite klase spojeva. Kromatografske metode spregnute s masenom spektrometrijom uglavnom se koriste za određivanje malih do srednjih molekula – anaboličkih sredstava,<sup>1,3,12</sup> inzulina,<sup>16</sup> hormona rasta,<sup>16,17</sup> čimbenika rasta nalik inzulinu-1,<sup>16</sup> beta-2 agonista,<sup>27</sup> hormonskih antagonista i modulatora,<sup>25</sup> diuretika i drugih maskirajućih sredstava,<sup>11,13,26</sup> krvnog dopinga,<sup>3</sup> stimulansa,<sup>13,18,24,26,27</sup> narkotika,<sup>24,27</sup> kanabinoida,<sup>19,20,21</sup> glukokortikoida<sup>22,23</sup> i beta-blokatora<sup>27</sup>. Imunokemijske metode koriste se za određivanje većih molekula proteina i peptida koja vežu na specifičan način.<sup>1,3</sup> Imunoesej koristi se za detektiranje korionski gonadotropin i lutenizirajući hormon za muškarce, hormon rasta, čimbenik rasta nalik na inzulin-1.<sup>1,3</sup>

Za molekule manje mase obično se koriste plinska ili tekućinska kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom, a imunološki testovi kao što su: imunoafinitet (*eng. Immunoaffinity*, IAF) i imunoesej (*eng. Immunoassay*, IAS) i izoelektrično fokusiranje (*eng. Isoelectric focusing*, IEF) koriste se za analizu većih molekula, peptida i proteina.

Za otkrivanje prisutnosti ili koncentracije pojedinačnih antitijela u biološkim tekućinama metode koje se temelje na hemaglutinacijskim reakcijama, imunodifuziji i ponekad imunofluorescenciji, zamjenjuju se manje zahtjevnim testovima temeljenim na tehnikama imunoblota ili enzimskom imunotestu (*engl. Enzyme Immunoassay*, EIA), koji ima široku primjenu. Imunokemijske metode koriste se za pročišćavanje uzoraka u određivanju peptidnih hormona.<sup>30</sup>

Neke od analitičkih metoda koje se koriste za detekciju dopinga u uzorcima urina ili krvi su: plinska kromatografija, masena spektrometrija (*eng. Gas chromatography-mass spectroscopy*, GC-MS); – tekućinska kromatografija s dvojnou spektrometrijom masa (*eng. Liquid chromatography-mass spectroscopy*, LC-MS(/MS)); matricom pomognuta laserska desorpcija/ionizacija uz analizator vremena leta (*eng. Matrix-assisted laser desorption/ionisation-Time of flight*, MALDI-TOF); kapilarna elektroforeza – ionizacija

raspršenjem uz analizator vremena leta s masenom spektrometrijom (*eng. Capillary electrophoresis-Electrospry ionisation-Time of flight/Mass spectrometry, CE-ESI-TOF/MS*); tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s dvojnou spektrometrijom masa (*eng. Ultra-high-pressure liquid chromatography-Mass spectrometry, UHPLC-MS(/MS)*).

### 2.3.3. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je metoda odjeljivanja u kojoj se tvari smjese razdvajaju na svoje komponente između dvije faze, od kojih je jedna pokretna (mobilna), druga nepokretna (stacionarna). Temelj razdiobe je različita brzina gibanja analita u mobilnoj fazi kroz stacionarnu fazu. Koristi se za odjeljivanje sastojaka smjese, identifikaciju i kvantitativnu analizu. Ovisno o tome u kojim su agregatnim stanjima mobilna i stacionarna faza, razlikujemo nekoliko vrsta kromatografije. Za doping analizu najvažnije su: plinska kromatografija (*eng. Gas chromatography, GC*), tekućinska kromatografija (*eng. Liquid chromatography, LC*) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. Ultra-high-pressure liquid chromatography, UHPLC*).

Plinska kromatografija je tehnika u kojoj je mobilna faza plin. Koristi se pri kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi hlapljivih spojeva. Analit se upari i miješa s plinom nosiocem te prenosi kroz kolonu. Ako je mobilna faza tekućina, govorimo o tekućinskoj kromatografiji, koja se koristi u analizi nehlapljivih spojeva. Kod metode UHPLC za odjeljivanje se koriste stupci s visokim razlučivanjem, a vrijeme trajanja postupka kromatografskog razdvajanja smjese je puno kraće. Tekuća mobilna faza se prolazi kroz uske, dugačke kolone ispunjene matriksom od vrlo finih zrna koja se ne sabijaju pod utjecajem visokog tlaka. Primjenom vrlo visokog tlaka, čak i do 35 MPa, uvelike se smanjuje vrijeme odjeljivanja. Prednosti ove tehnike su visoko razlučivanje, brzina, visoka osjetljivost i mogućnost automatizacije.

Jedna od prvih metoda za analizu dopinga bila je plinska kromatografija sa spektrometrom masa i ionizacijom brzim elektronima ili kemijskom ionizacijom. Kod navedenih metoda ionizacije proces ionizacije obično uključuje prijenos velike količine energije molekuli, pri čemu dolazi do fragmentacije što se u nekim slučajevima pokazalo kao nedostatak metode. Metode u kojima se predaje više energije, jače fragmentiraju molekulu, pa se takve metode neće koristiti kod molekula koje se vrlo lako raspadaju ili u slučajevima kada je potreban signal molekulskog iona. Bez obzira na to i dalje se koriste za detektiranje određenih molekulskih iona ili fragmenata, kao standardi se koriste izotopski analozi, što metodu čini

osjetljivom i dobrom za kvantitativno određivanje spojeva. Problemi nastaju pri određivanju termički nestabilnih i konjugiranih spojeva, za koje je potrebno provesti dodatne metode dekonjugacije kako bi se osigurala ciljana analiza pojedinih spojeva. Za povećanje rezolucije određenih analita i uklanjanje interferentnih spojeva koriste se dvije kolone za plinsku kromatografiju (GC/GC) od kojih je prva duža i uglavnom sadrži manje polarnu stacionarnu fazu od druge, kraće kolone. Ova metoda često se spreže s analizatorom vremena leta (engl. *Time-of-flight*, TOF) koji ubrzava ione električnim pulsevima. Ovakva metoda odlična je za drugi korak analize, potvrdu, međutim loša je za određivanje količine detektiranih spojeva. Selektivnost plinske kromatografije može se povećati sprežanjem sa spektrometrom masa visoke rezolucije ili korištenjem tandemске spektrometrije masa MS/MS. Takve metode imaju široku uporabu u doping analizi.

Tekućinska kromatografija uglavnom se spreže s tandemskom spektrometrijom masa, a kao tehnike ionizacije koriste se ionizacija brzim elektronima, kemijska ionizacija atmosferskim tlakom i fotoionizacija atmosferskim tlakom. Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) najčešća je metoda ionizacije zbog toga što je visoko osjetljiva i omogućuje ionizaciju polarnih spojeva. Pri ionizaciji ESI mogu nastati problemi uzrokovani efektom matriksa, pa dolazi do gubitka analita. Prednost ove metode je brza i jednostavna priprema uzorka, direktno određivanje s polarnim i nehlapljivim analitima bez potrebe za uklanjanjem vode, soli, dekonjugacije i derivatizacije. Koristi se za analizu većine klasa spojeva. Ova metoda je bolja od plinske zato što ne zahtjeva komplicirane pripreme uzorka i kraće traje. Vrlo je važna u detekciji metabolita doping sredstva, gdje se koriste polarnije stacionarne faze i polarne organske mobilne faze.

Još bolju rezoluciju ima UHPLC. Najveća prednost ove metode je brzina, što je vrlo bitno u doping analizi gdje se rezultati očekuju 24-48 sati nakon prikupljanja uzorka. Spreže se uglavnom s analizatorom vremena leta (eng. *Time of flight*, TOF).

#### 2.3.4. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrijom masa molekule analita se ioniziraju, nastali ioni razdvajaju i detektiraju na temelju njihove mase i naboja (omjer  $m/z$ ). Ionizacija brzim elektronima (eng. *Electron ionisation*, EI), ionizacija elektroraspršenjem (eng. *Electrospray ionisation*, ESI) i ionizacija potpomognuta matricom uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *Matrix-assisted laser desorption/ionisation*, MALDI) su tehnike ionizacije u kojima se analit prevodi u plinsku fazu.



Za lako hlapljive i termostabilne molekule, koristi se ionizacija brzim elektronima. Blage tehnike ESI i MALDI su izvrsne tehnike za analizu biomolekula, što uvelike koristi u doping analizi. Ionizacija elektroraspršenjem jedna je od najblažih tehnika za prijenos iona iz otopine u plinsku fazu, a od posebne je važnosti za određivanje velikih biomolekula. Ionizacija potpomognuta matricom uz desorpciju laserskim zračenjem koristi se za prevođenje čvrste u plinsku fazu, što uglavnom daje jednostruko nabijene ione. Problem ovih metoda je matriks koji onečišćava analit. Analizator vremena leta (*eng. Time of flight*, TOF) se koristi za analizu mase, a temelji se na različitoj brzini iona kroz cijev bez utjecaja magnetskog polja. Ioni se ubrzavaju elektropulsevima, tako da svi imaju istu kinetičku energiju, pa lakše čestice prije dolaze do detektora. Temelji se na različitom vremenu leta čestica kroz cijev. Problem ove metode je slabija rezolucija.

Maseni spektrometri koji se koriste u doping analizi mogu se podijeliti na one niske i visoke rezolucije. Niskorezolutni kvadrupol (*eng. Quadrupole mass analyser*, Q), linearna ionska stupica (*eng. Linear ion trap*, LIT) i kvadrupolna ionska stupica (*eng. Quadrupole ion trap*, QIT) se često koriste u doping analizi. Brži, osjetljiviji analizator vremena leta (TOF), kvadrupol i analizator vremena leta (*eng. Quadrupole and time of flight analyser*, QTOF) i Fourier transformirajuća-ion ciklotron rezonancija (*eng. Fourier-transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR). Postoje razne referentne molekule i identifikacijski kriteriji. Sprezanjem UHPLC-a s metodama visoke rezolucije dobiju se točne i precizne metode.

Proteini i peptidi uglavnom se analiziraju metodom izoelektričnog fokusiranja. Ovo je vrlo osjetljiva i selektivna metoda za određivanje velikih molekula koje se nalaze u vrlo malim količinama u urinskim uzorcima. Koriste se referentni uzorci i uspoređuju se mase. Korisne metode su i *nano*-UHPLC-MS/MS i kapilarna elektroforeza spregnuta s analizatorom vremena leta i spektrometrijom masa (*eng. Capillary zone electrophoresis-time of flight analyser-mass spectrometry*, CZE-TOF-MS).

### 2.3.5. ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza je tehnika za odjeljivanje koja se temelji na različitoj brzini čestica koje se gibaju kroz otapalo pod djelovanjem električnog polja. Provodi se u vrlo tankim kapilarnim cjevčicama, vrlo je brza, može se automatizirati i oštro odjeljuje komponente smjese. Koristi se uglavnom u analitičke smjese za odjeljivanje malih količina uzoraka.

## 2.4. Zaključak

Prema literaturnim navodima doping uključuje: prisutnost zabranjenih sredstava ili njihovih markera ili metabolita u uzorku krvi ili urina sportaša, korištenje ili spremnost na korištenje zabranjene metode, pokušaj varanja ili krivotvorenje bilo kojeg dijela procesa u kontroli dopinga, posjedovanje i prometovanje s bilo kojom zabranjenom supstancijom ili zabranjenom metodom, propisivanje ili pokušaj propisivanja zabranjene supstance bilo kojem sportašu, pomaganje, ohrabrivanje, asistiranje, prikrivanje ili bilo koji drugi način koji uključuje povredu antidoping-pravila ili pokušaj povrede pravila.<sup>4</sup>

Popis zabranjenih sredstava podijeljen je u jedanaest klasa zabranjenih spojeva i tri metode koje se koriste za poboljšanje učinka sportaša. Male molekule uglavnom se pročišćavaju i analiziraju kromatografskim metodama sa spektrometrom masa kao detektorom. Proteini i peptidi se najčešće detektiraju imunokemijskim metodama, koje su vrlo specifične i učinkovite u doping analizi.

U cijelom postupku doping kontrole vrlo je važno čuvanje uzorka. Naime nove, dizajnerske molekule stalno se sintetiziraju, pa je bitno da analitičke metode prate, obično ilegalan razvoj takvih spojeva i traže najbolje analitičke postupke za njihovu detekciju. Očuvanjem uzorka moguće je detektirati molekule za koje nisu postojale metode u vrijeme analize.

Razvoj znanosti i konstanto unaprjeđivanje analitičkih metoda mogu detektirati sve više doping sredstava i na taj način štite sportaša od štetnih utjecaja najčešće beskorisnih doping sredstava i od varanja na sportskim natjecanjima, na kojima je ipak najbitniji *fair-play*.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. Thevis, T. Kuuranne, H. Geyer, *Drug Testing and Analysis* **11** (2019) 8-26
2. F. Badoud, D. Guillarme, J. Boccard, E. Grata, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *Forensic Science International* **213** (2011) 49-61
3. E. Topić, Draga Primorac, Stipan Janković, Mario Štefanović i sur., *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*, 2. dopunjeno i izmijenjeno izdanje, Medicinska naklada, str. 716-729
4. <https://www.wada-ama.org/> (datum pristupa 15. svibnja 2019.)
5. <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-prohibited-list> (datum pristupa 15. svibnja 2019.)
6. <https://www.antidoping-hzta.hr/> (datum pristupa 15. svibnja 2019.)
7. HZTA, *Popis zabranjenih sredstava na hrvatskom jeziku* (2019)
8. [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en\\_0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017_anti-doping_testing_figures_en_0.pdf) ( datum pristupa 20. svibnja 2019.)
9. J. Gijs Kuenen, W. N. Konings, *Accreditation and Quality Assurance* **15** (2010), 133-136
10. D. Hughes, *Australian Prescriber* **38** (2015) 167-170
11. A. B. Cadwallader, X. de la Torre, A. Tieri, F. Botre, *British Journal of Pharmacology*, **161** (2010) 1-16
12. H. Geyer, W. Schänzer, M. Thevis, *British Journal of Sports Medicine* **48** (2014) 820-826
13. A. Pokrywka, P. Kaliszewki, E. Majorczyk, A. Zembroń-Łacny, *Biology of Sport* **30** (2013) 155-161
14. P. Novak. T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara, Varaždin, 2013.
15. N. Galić, M. Cindrić, *Kemija u industriji* **57** (2008), 231-243
16. M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer, *Forensic Science International* **213** (2011) 35-41
17. A. D. Rogol, *Pediatric Endocrinology Reviews* **16** (2018)
18. A. Kojima, Y. Nishitani, M. Sato, S. Kageyama, M. Dohi, M. Okano, *Drug Tesing and Analysis* (2015)
19. R. Kronstrand, L. Brinkhagen, C. Birath-Karlsson, M. Roman, M. Josefsson, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406** (2014) 3599-3609

20. Chebbah, O. J. Pozo, K. Deventer, P. Van Eenoo, F. T. Debeke, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **24** (2010) 1133-1141
21. R. Heltsley, M. K. Shelby, D. J. Crouch, T. A. Robert, L. Marshall, Chantel L. Bender, A. Z. DePriest, M. A. Colello, *Journal of Analytical Toxicology* **36** (2012) 588-593
22. X. de la Torre, D. Curcio, C. Colamonic, F. Molaioni, M. Cilia, F. Botre, *Drug Testing and Analysis* **7** (2015) 1071-1078
23. M. Duclos, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **39** (2010) 107-126
24. S. Dubey, C. P. Shinade T. Kaur, S. P. Singh, M. Chakraborty, A. Beotra, S. Jain, *AACAIJ* **16(6)** 2016 237-250
25. E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, N. Baume, *Forensic Science International* **213** (2011) 104-108
26. A. Jiménez Girón, K. Deventer, K. Roles, P. Van Eenoo, *Analytica Chimica Acta* **721** (2012) 137-146
27. M. Mazzarino, I. Fiaco, X. de la Torre, F. Botrè, *Journal of Chromatography A* **1218** (2011) 8156-8167
28. K. Fitch, *Drug Testing and Analysis* **11** 2019 194-199
29. M. Polet, W. Van Gansbeke, P. Van Eenoo, *Analytica Chimica Acta* **1042** (2018) 52-59
30. A. Thomas, W. Schnäzer, P. Delahaut, M. Thevis, *Methods* **56** (2012) 230-235