

# ερευνητική εργασία - μετάφραση

ΑΘΛΗΤΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ  
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΑΞΗ  
Τ3, Νο 2, σελ. 79-112, 1988  
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΘΛΗΤΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

## ΑΝΑΛΥΣΗ DOPING

M. DONIKE, H. GEYER, A. GOTZMANN, M. KRAFT, F. MANDEL, E.  
NOLTEERNSTING, G. OPFERMANN, G. SIGMUND, W. SCHAENZER KAI  
J. ZIMMERMANN

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
ΓΕΡΜΑΝΙΚΗ ΑΝΩΤΑΤΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ ΚΟΛΩΝΙΑ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: Α. ΝΤΑΝΗΣ - Γ. ΝΕΔΕΛΚΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάλυση doping παίζει έναν σπουδαίο ρόλο στο σύστημα ελέγχου doping. Τα διάφορα στάδια της χαρακτηρίζονται από τα παρακάτω σημεία:

1. Επιλογή των αθλητών
2. Διαδικασία λήψης του δείγματος
3. Ανάλυση του δείγματος Α
4. Τήρηση της νομικής διαδικασίας και ανάλυση του δείγματος Β
5. Κυρώσεις.

Η συνεισφορά του εργαστηρίου στον έλεγχο doping προσδιορίζεται ξεκάθαρα: Λήψη του δείγματος, έλεγχος του κωδικού του δείγματος και του σφραγίσματος, ανάλυση του δείγματος Α, ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του δείγματος Α, ανάλυση ενδεχομένων του δείγματος Β.

Αρχίζοντας γύρω στο 1960, οι μοντέρνες τεχνικές της αναλυτικής χημείας, ιδιαίτερα η χρωματογραφία, μας παρείχαν τη δυνατότητα ανίχνευσης όλο και περισσότερων ουσιών doping ή μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά του οργανισμού, κατά προτίμηση στα ούρα (1-4). Η πρώτη φορά που πραγματοποιήθηκε ανάλυση doping σ' ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων ούρων ήταν οι ολυμπιακοί αγώνες του 1972 στο Μόναχο, όταν 2.079 δείγματα αναλύθηκαν μέσα σε 14 μέρες.

Αφού δείχτηκε ότι είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί ανάλυση με αξιοπιστία σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, ο έλεγχος doping μ' όλες τις τις επιπτώσεις έγινε αποδεκτός από τις Διεθνείς Αθλητικές Ομοσπονδίες και Αρχές και εισήχθηκε στις μεγαλύτερες αθλητικές διοργανώσεις και άλλους σπουδαίους αγώνες.

### 1. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DOPING

Εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης από τις Εθνικές και Διεθνείς Ομοσπονδίες για έλεγχο doping (και συνεπώς για ανάλυση doping) ένας μεγάλος αριθμός

εργαστηρίων έχει αρχίσει ν' ασχολείται με την ανάλυση δειγμάτων ούρων. Μερικές φορές εργαστήρια έχουν ανακοινώσει θετικά αποτελέσματα που βασίζονταν σε ελλιπή ή ακόμη σε ανακριβή αναλυτικά δεδομένα με συνέπεια την αδικαιολόγητη κατηγορία κάποιου αθώου αθλητή. Τέτοια αποτελέσματα λέγονται «λάθος θετικά». Από την άλλη έχουν ανακοινωθεί σε Ιατρικές Επιτροπές αρνητικά αποτελέσματα» δειγμάτων ούρων που προέρχονταν από γνωστούς αθλητές. Τα λάθος αρνητικά αποτελέσματα δεν είναι τόσο επιζήμια για κάποιον αθώο αθλητή όπως τα λάθος θετικά, αλλά συμβάλλουν εξίσου όπως τα λάθος θετικά στο να διακινδυνεύουν το σύστημα ελέγχου doping.

Για τη βελτίωση της ανεπαρκούς κατάστασης η «Υποεπιτροπή doping» της Ιατρικής Επιτροπής της IAAF (Διεθνής Ομοσπονδία Ερασιτεχνικού Αθλητισμού) σύνταξαν το 1978 έναν κανονισμό με τον τίτλο «Requirements for Accreditation — Standardisation of Analytical Procedures and Quality Tests for Doping Control Laboratories» (Απαιτήσεις για Αναγνώριση — Τυποποίηση των Αναλυτικών Διαδικασιών και Ποιοτικών Δοκιμασιών για Εργαστήρια Ελέγχου Doping).

Οι δεσμευτικοί κανόνες στις αναλυτικές διαδικασίες και στις ποιοτικές δοκιμασίες έγιναν αποδεκτοί από την Ιατρική Επιτροπή της IAAF στην ετήσια συνεδρίασή της τον Μάρτιο του 1979 στο Βερολίνο (Α. Γερμανία) και από το Συμβούλιο της IAAF τον Απρίλιο του 1979 στο Ντακάρ. Το 1980 η Ιατρική Επιτροπή της IOC (Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή) υιοθέτησε αυτές τις απαιτήσεις, ειδικά με την ίδεα της δημιουργίας ενός συστήματος ανάλυσης doping στον αθλητισμό ανοικτό και προσιτό για όλες τις Διεθνείς Ομοσπονδίες (παράρτημα 1).

#### **Οι απαιτήσεις για Αναγνώριση Εργαστηρίων χωρίσθηκαν σε τρία μέρη:**

1. Εξοπλισμός ανάλυσης
2. Διαδικασία ανάλυσης
3. Αναγνώριση εργαστηρίων

Στο πρώτο μέρος, τα όργανα ανάλυσης, αναγκαία σαν ένας βασικός εξοπλισμός του εργαστηρίου, είναι εξειδικευμένα. Εξοπλισμός για τη πραγματοποίηση αεριοχρωματογραφίας (GLC), χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος (TLC), φασματομετρίας μάζας (MS) σε σύνδεση με αεριοχρωματογράφο και Η/Υ είναι επιτακτικός για την λήψη της επιζητούμενης ευαισθησίας, εξειδίκευσης και ικανότητας ταυτοποίησης.

Στο δεύτερο μέρος των απαιτήσεων για Αναγνώριση Εργαστηρίων οι αναλυτικοί μέθοδοι είναι εξειδικευμένοι για χρήση διερεύνησης και ταυτοποίησης. Είναι φανερό ότι υπάρχει μια στενή σχέση ανάμεσα στον αναλυτικό εξοπλισμό που αναφέρθηκε πριν και στις αναλυτικές μεθόδους που μπορούν να εφαρμοστούν. Σ' αυτή την παράγραφο λοιπόν γίνονται νύξεις για την προπαρασκευή του δείγματος, καθ' ότι η προπαρασκευή του δείγματος είναι ένα ουσιαστικό και σπουδαίο μέρος της αναλυτικής μεθόδου.

Αρχικά, υπήρχαν κάποιες αντιρρήσεις στην ίδεα της ακριβούς διάταξης των αναλυτικών μεθόδων γιατί μια τέτοια ρύθμιση των αναλυτικών διαδικασιών μπορούσε να σημαίνει ακαμψία στην παρακολούθηση της επιστημονικής πρόσδου. Άλλα το ισχυρότερο επιχείρημα ήταν η παροχή αποτελεσμάτων με αξιοπιστία, με ακρίβεια, με λεπτομέρειες, επαναληπτικότητα και αναλυτικών αποτελεσμάτων για τις αθλητικές αρχές και — εδώ πρέπει να δοθεί έμφαση — για τους αθλητές.

Στο τρίτο μέρος των απαιτήσεων για Αναγνώριση Εργαστηρίων περιγράφεται με λεπτομέρειες η διαδικασία της εξέτασης των προσόντων για εργαστήρια που αιτούνται την αναγνώριση. Μετά την αναγνώριση μια επανάληψη της κάθε δύο χρόνια είναι μέρος της διαδικασίας αναγνώρισης διαρκείας. Η πρώτη Επαναληπτική Αναγνώριση πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο του 1985. Το αποτέλεσμα της δεύτερης Επαναληπτικής Αναγνώρισης που πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο του 1987 συνοψίζεται στον πίνακα 1.

Όχι σταθερά σαν δεσμευτικός κανόνας στις απαιτήσεις για αναγνώριση, αλλά σαν μέρος του ποιοτικού ελέγχου της ικανότητας των εργαστηρίων (και πολύ περισσότερο της αξιοπιστίας ολόκληρης της διαδικασίας ελέγχου doping ) είναι η

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 1.

Διάρθρωση της Επαναληπτικής Αναγνώρισης το 1987 για τα αναγνωρισμένα εργαστήρια της IOC: κατάλογος των ουσιών κατανεμημένων σε σειρές των 8 δειγμάτων για κάθε εργαστήριο και αποτελέσματα στην πρώτη δοκιμασία α) ανά ουσία και β) ανά εργαστήριο.

#### α) Ουσίες Dop

#### Δείγματα

	N εστάλησαν	N ευρέθηκαν	N θετικά	N δεν ευρέθηκαν
caffeine	18	18		
dimethylamphetamine	4	4		
methylephedrine	4	4		
pemoline	18	16	2	
phendimetrazine	4	4		
piradol	6	6		
methadone	6	6		
morphine	12	10	2	
boldenone	3	2	1	
chlorodehydromethyltestosterone	3	2	1	
clostebol	3	3		
metenolone	3	3		
norethandrolone	3	3		
oxandolone	3	3		
stanazolol	18	15	3	
testosterone	18	17	1	
atenolol	4	4		
nadolol	4	3	1	
oxprenolol	4	4		
propranolol	6	6		
	144	133	11	

β)

N εργαστηρίων	N σωστής διόγγνωσης ουσιών
13	8
3	7
2	4

εισαγωγή των μη αναγγελόμενων (τυφλών) δειγμάτων στους περισσότερους αγώνες σαν τους Ολυμπιακούς, Παγκόσμια πρωταθλήματα, Αγώνες περιοχών κ.λπ., χορηγουμένων από την υπεύθυνη Ιατρική Επιτροπή. Θετικά αποτελέσματα που ανακοινώνονται με τα ακριβή αναλυτικά δεδομένα στον ακριβή κωδικό αριθμό δείχνουν την αποτελεσματικότητα της οργάνωσης ελέγχου των doping σ' έναν ειδικό αγώνα ή από μια Διεθνή Ομοσπονδία.

## 2. ΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Το πρόγραμμα ενάς εργαστηρίου έχει καθοριστεί σύμφωνα με τον ορισμό doping από την Ιατρική Επιτροπή της IOC και τις Ιατρικές Επιτροπές των Διεθνών Ομοσπονδιών. Η IAAF όπως και οι περισσότερες Διεθνείς Αθλητικές Ομοσπονδίες ακολουθούν τον ορισμό doping της Ιατρικής Επιτροπής της IOC απαγορεύοντας μέχρι το 1987 τη χρήση διεγερτικών, ναρκωτικών και αναθολικών στεροειδών (πίνακας 2). Η Ιατρική Επιτροπή της IOC πρόσθεσε για τους χειμερινούς και θερινούς ολυμπιακούς αγώνες του 1988 (Κάλγκαρι και Σεούλ) τις φαρμακολογικές ομάδες των β-αναστολέων και των διουρητικών (σύγκρινε παράρτημα 2).

Παίρνοντας υπόψη τις χημικές και βιοχημικές ιδιότητες, οι ουσίες που παρουσιάζονται σαν παράδειγμα σε κάθε ονομασία των διαφόρων φαρμακολογικών ομάδων μπορούν να ταξινομηθούν:

### ΠΙΝΑΚΑΣ 2.

Καθορισμένες ουσίες doping κατά τον κανόνα 144 της IAAF

#### A. ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΑ

amfepramone	ephedrine	morazone
amfetaminil	etafedrine	nikethamide
amiphenazole	etamivan	pemoline
amphetamine	ethylamphetamine	pentetrazol
benzphetamine	fencamfamin	phendimetrazine
caffeine*	fenetylline	phenmetrazine
cathine	fenproporex	phentermine
chlorphentermine	furfenorex	phenylpropanolamine
clobenzorex	mefenorex	piradrol
clorrenaline	methamphetamine	prolintane
cocaine	methoxyphenamine	propylhexedrine
cropopamide**	methyleneephedrine	pyrovalerone
crotethamide**	methylphenidate	strychnine
dimetamphetamine		
και συγγενείς ενώσεις		

\* Για την καφεΐνη ο ορισμός του θετικού καθορίζεται ως εξής: εάν η συγκέντρωση στα ούρα ξεπερνά τα 12 μg/ml

\*\* Ενώσεις του «micoren-R»

**Β. ΝΑΡΚΩΤΙΚΑ ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΑ**

alphaprodine	dihydrocodeine	nalbuphine
anileridine	dipipanone	pentazocine
buprenorphine	ethoheptazine	pethidine
codeine	ethylmorphine	phenazocine
dextromoramide	levorphanol	trimeperidine
dextropropoxyphene	methadone	
diamorphine (heroin)	morphine	
και συγγενείς ενώσεις		

**Γ. ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ**

bolasterone	mesterolone	oxandrolone
boldenone	metandienone	oxymesterone
clostebol	metenolone	oxymetholone
dehydrochlor-	methyltestosterone	stanozolol
methyltestosterone	nandrolone	testosteron*
fluoxymesterone	norethandrolone	
και συγγενείς ενώσεις		

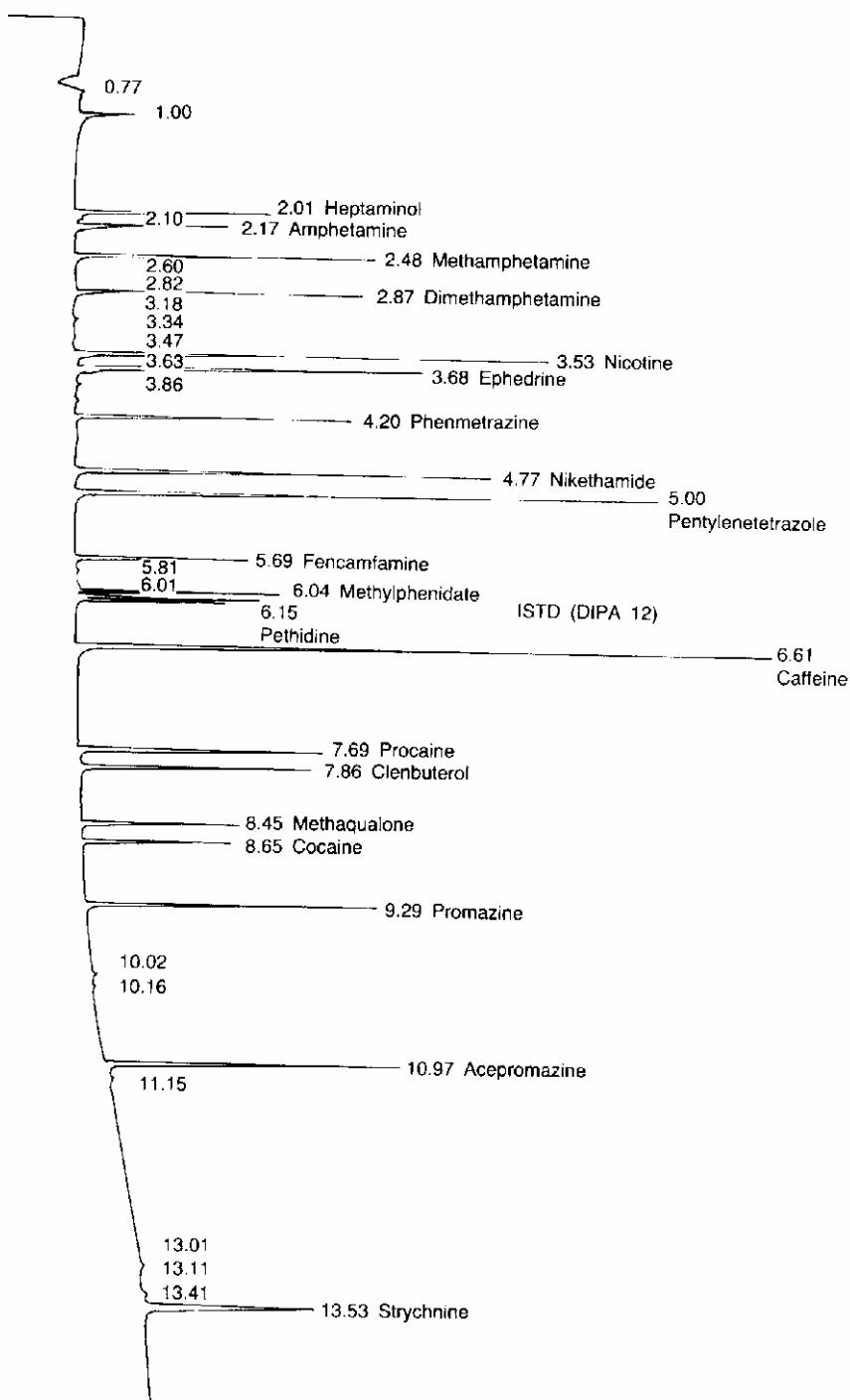
\* Για την τεστοστερόνη ο ορισμός του θετικού καθορίζεται ως εξής: η χορήγηση τεστοστερόνης ή η χρήση κάθε άλλου παρασκευάσματος που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου τεστοστερόνης/επιτεστοστερόνης πάνω από το 6.

1. «Αζωτούχες ενώσεις» που απεκκρίνονται ελεύθερες στα ούρα, π.χ. amphetamine, ephedrine, nikethamide.
2. «Αζωτούχες ενώσεις που απεκκρίνονται σαν Συζυγή» με θεϊκό ή γλυκουρονικό οξύ και μπορούν ν' ανιχνευθούν με GC μόνο μετά από υδρόλυτική κατεργασία, π.χ. para-hydroxyamphetamine, etilefrine, morphine.
3. «Διεγερτικά με ειδική χημική δομή και ιδιότητες», π.χ. pemoline, caffeine.
4. «Αναβολικά στεροειδή»
  - a) σ' ελεύθερα κλάσματα, π.χ. metandienone, oxandrolone.
  - b) σε συζυγή κλάσματα, π.χ. nandrolone, clostebol, metenolone.
5. «Ενώσεις που απεκκρίνονται σαν οξέα ή τα συζυγή τους», π.χ. διουρητικά όπως furosemide.

Εφ' όσον δεν είναι πραγματοποιήσιμο ή προσιτό, και είναι αδύνατη η διερεύνηση όλων των ουσιών με ατομικά τεστ από μια σχετικά μικρή ποσότητα ούρων, περίπου 50 ml η συνοπτική διερευνητική διαδικασία, σύμφωνα με την παραπάνω ταξινόμηση, είναι η λύση του προβλήματος, δηλ. η ανίχνευση περισσότερων μέσων doping σε μια αναλυτική πορεία.

## 2.1. Η θεώρηση μιας συνοπτικής διερευνητικής διαδικασίας για ουσίες doping

Το πρώτο παράδειγμα μιας συνοπτικής διερευνητικής διαδικασίας για ουσίες doping που περιέχουν άζωτο και απεκκρίνονται ελεύθερα στα ούρα, εκπροσωπή-



**ΣΧΗΜΑ 1.** Χρωματόγραμμα της διερευνητικής διαδικασίας I. Πτητικές αζωτούχες ουσίες doping (και άλλες φαρμακευτικές ουσίες) που απεκκρίνονται σ' ελεύθερη μορφή στα ούρα. Το αλκαλικό εκχύλισμα μ' αιθέρα εκχύνεται απευθείας σε μια SE 54 (cross-linked) τριχοειδή στήλη που συνδέεται μ' ένα ειδικό ανιχνευτή αζώτου (N-FID).

θηκε το 1970 χρησιμοποιώντας αεριοχρωματογραφία προγραμματισμένης θερμοκρασίας και ειδική ανίχνευση αζώτου (3,4) (παράρτημα 3.1.). Στο σχήμα 1 το χρωματόγραμμα της διερευνητικής διαδικασίας 1, με τη χρήση μιας μοντέρνας τριχοειδούς στήλης (cross-linked) με υγρή φάση, δείχνει την δύψη μιας τέτοιας συνοπτικής αναλυτικής διαδικασίας. Από τις heptaminol και amphetamine, πολύ πτητικές ενώσεις, μέχρι την strychnine, μία σχετικά βαρειά πτητική ουσία doping, μια ποικιλία από αζωτούχα φάρμακα doping μπορεί να διερευνηθεί. Είναι άξιο να σημειωθεί ότι η ευαισθησία είναι τόσο μεγάλη ώστε μπορούν να προσδιοριστούν εύκολα ουσίες στα ούρα σε συγκεντρώσεις των nanogram ανά χιλιοστόλιτρο (ng/ml).

Αλλά χρειάζεται αρκετός κόπος για να δημιουργηθεί μια συνοπτική διερευνητική διαδικασία, καθώς οι χημικές και βιοχημικές ιδιότητες για κάθε ουσία doping πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά. Πριν συμπεριληφθεί στο πρόγραμμα ανάλυσης διερευνητικών διαδικασιών, προαπαιτούνται οι παρακάτω βαθμιαίες εκτιμήσεις:

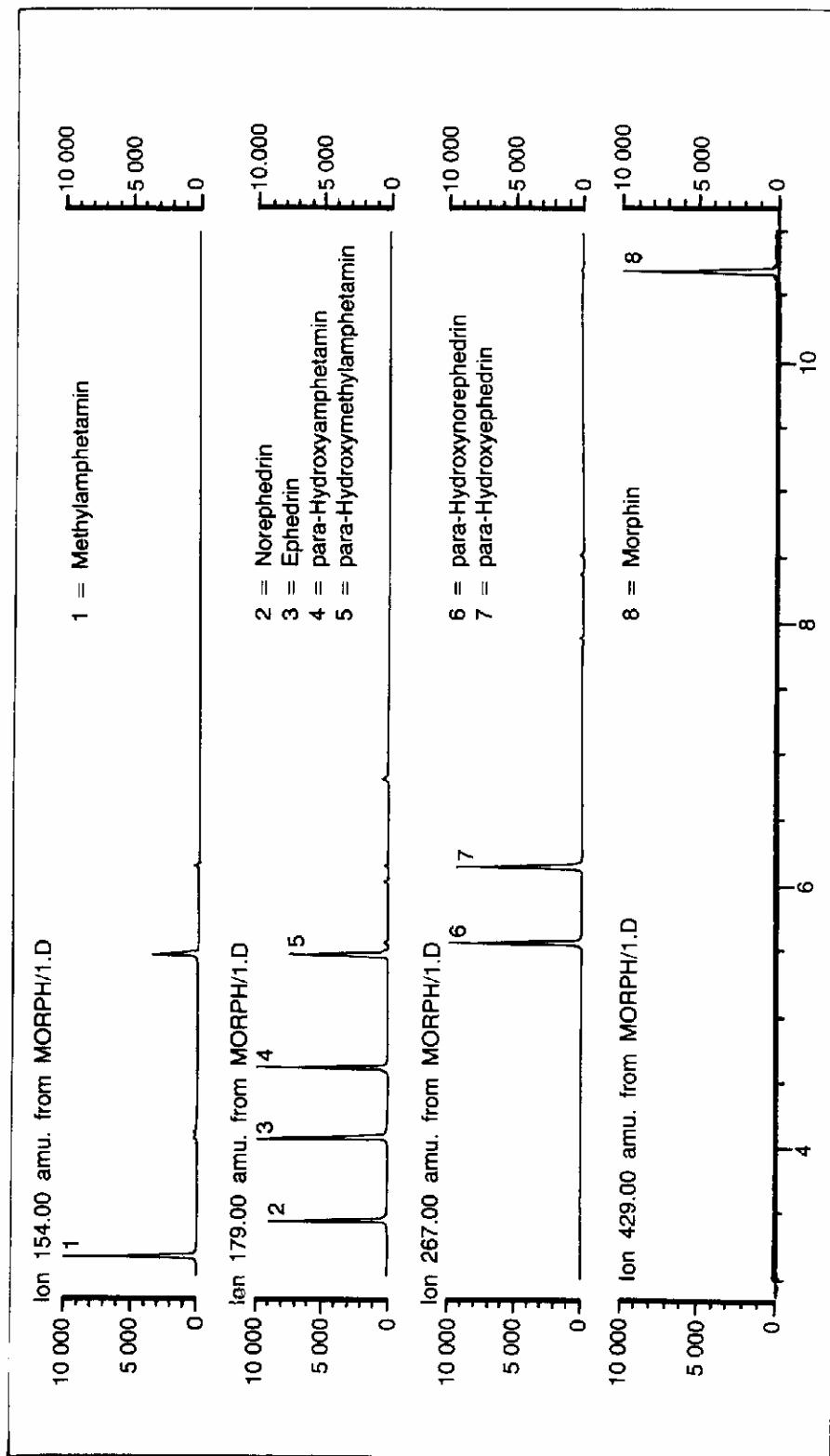
1. Εξέταση των χημικών και βιοχημικών ιδιοτήτων.
2. Ανάλυση διαλύματος της καθαρής πρότυπης ένωσης.
3. Ενδεχομένων παρασκευή παραγώγου της ένωσης.
4. Ανάλυση σε ούρα για την εξέταση της απομόνωσης ουσιών και τον προσδιορισμό τής ποσοστιαίας απόδωσης τής εκχύλισης.
5. Πειραματική διερεύνηση απέκκρισης εφαρμόζοντας φαρμακολογική δόση σε εθελοντές με συγκέντρωση δειγμάτων ούρων (αίματος) σε διάφορα χρονικά διαστήματα.
6. Ανάλυση επί μέρους δειγμάτων από τις μελέτες απέκκρισης με την υπάρχουσα διερευνητική διαδικασία για την εξέταση της ευαισθησίας για αρχικές ενώσεις και μεταβολίτες.

Ανάλογα προς την διερευνητική διαδικασία I για αζωτούχες ουσίες doping, που απεκρίνονται ελεύθερα στα ούρα, αναπτύχθηκε η διερευνητική διαδικασία για αζωτούχες ενώσεις που απεκρίνονται σε μορφή συζυγών, π.χ. phenolalkylamines, morphine κ.λπ. (διερευνητική διαδικασία II, παράρτημα 3.2.). Μετά από υδρόλυση και απομόνωση σ' ένα μέτρια αλκαλικό pH, τα υπολείμματα πρέπει πριν την αεριοχρωματογραφία ν' αναχθούν σε παράγωγα (5). Ανάμεσα στις θεωρητικά δυνατές τεχνικές παραγώγου ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα N-trifluoro-O-trimethylsilyl παράγωγα γι' αυτού του είδους τις ενώσεις, διότι:

1. Μπορούν να παρασκευάζονται με επαναληπτικότητα κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.
2. Έχουν καλές αεριοχρωματογραφικές ιδιότητες.
3. Παρέχουν αξιόλογα διαγνωστικά ίόντα στην φασματομετρία μάζας.

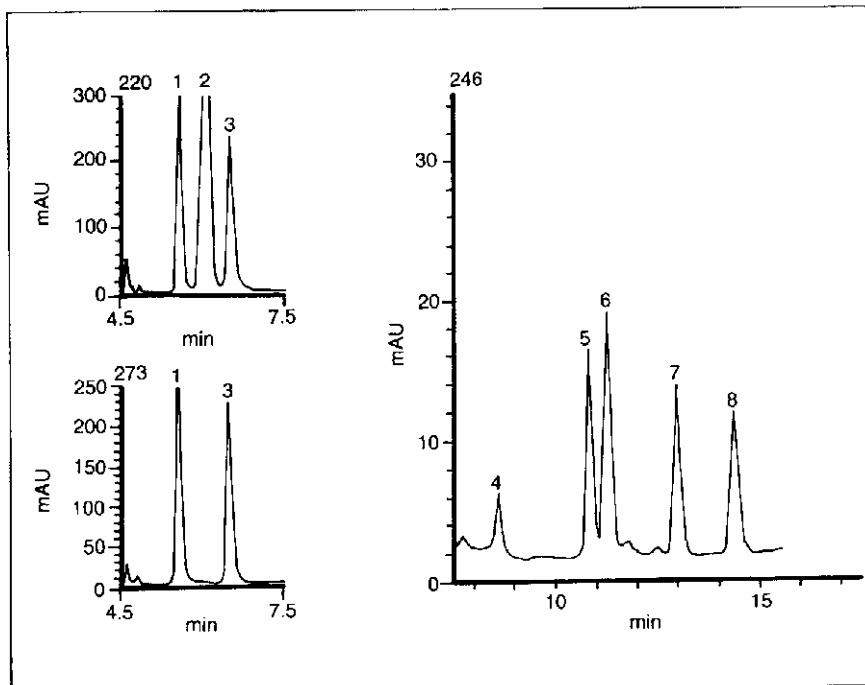
Το ονομαζόμενο SIM-χρωματόγραμμα ιόντων, χαρακτηριστικό για ενώσεις της φαινόλης (m/e 179 και 267), παρουσιάζεται στο σχήμα 2. Σ' αυτή την διαδικασία διερεύνησης μπορεί να συμπεριληφθεί η ανίχνευση και των όχι σπουδαίων γι' αγώνες της IAAF β-αναστολέων (σύγκρινε παράρτημα 2).

Και οι δύο διερευνητικές διαδικασίες I και II δοκιμάστηκαν μ' επιτυχία στους Ολυμπιακούς Αγώνες του 1972 και χρησιμοποιούνται με κάποιες τροποποιήσεις ακόμα και σήμερα (6).



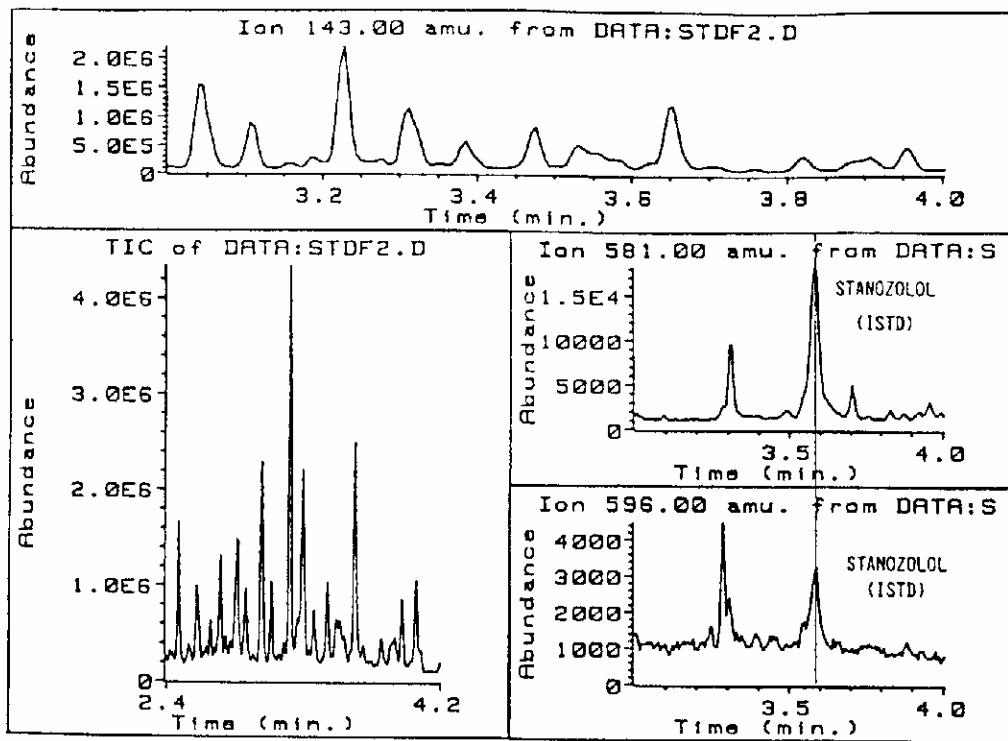
**ΣΧΗΜΑ 2.** Χρωματόγραμμα ενός προτύπου μεγίματος από υδροξυφαινολαιθυλαμίνες, φαινολακυλαμίνες και μορφίνη. Η μεθυλαμφεταμίνη προστίθεται σαν μια εσωτερική σταθερά ( $m/z = 154$ ). Τα ιέντα  $m/z$  179 και  $m/z$  267 είναι οι διατικές κορυφές (peaks) των μανο-καδιυδροξυ-ενώσεων, των οποίων το  $m/z$  429 αντιστοιχεί στο μαριακό ίων της bis-TMS-μορφίνης. Αυτή η διαδικασία μπορεί λοιπόν να χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση 8-υδροξυ-φαινολαιθυλαμίνων, δηλας παρα-υδροξυαμφεταμίνη, μια ουσία doping και ένας πιθανός μεταθολίτης της αμφεταμίνης.

Η διερευνητική διαδικασία III εφαρμόζεται χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) σε ουδέτερο ή ελαφρά αλκαλικό εκχύλισμα. Ο κυριότερος λόγος για την εισαγωγή αυτής της αναλυτικής τεχνικής στις αρχές του 70, ήταν ότι η pemoline, ένα διεγερτικό, δεν μπορούσε να ανιχνευθεί. Εξαιτίας της πολύ πολικής δομής της η ένωση αυτή έχει πολύ φτωχές αεριοχρωματογραφικές ιδιότητες. Επιπλέον είναι σχεδόν αδύνατο να τροποποιηθούν οι λειτουργικές της ομάδες και να προκύψει ένα σταθερό παράγωγο για αεριοχρωματογραφία (7). Σαν συνέπεια εισήχθηκε μια άλλη τεχνική ανάλυσης — η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) — για την ανίχνευση της pemoline. Στην ίδια αναλυτική πορεία μπορούν να διερευνηθούν ψηλές συγκεντρώσεις καφεΐνης, μεγαλύτερες των 12 µg/ml (σχήμα 3) χρησιμοποιώντας μια κατάλληλη προπαρασκευή του δείγματος (παράρτημα 3.3.). Αυτή η τεχνική είναι επίσης χρήσιμη για να παρακολουθεί ενδογενή και συνθετικά κορτικοστεροειδή που χρησιμοποιούνται κακώς μερικές φορές στον αθλητισμό.

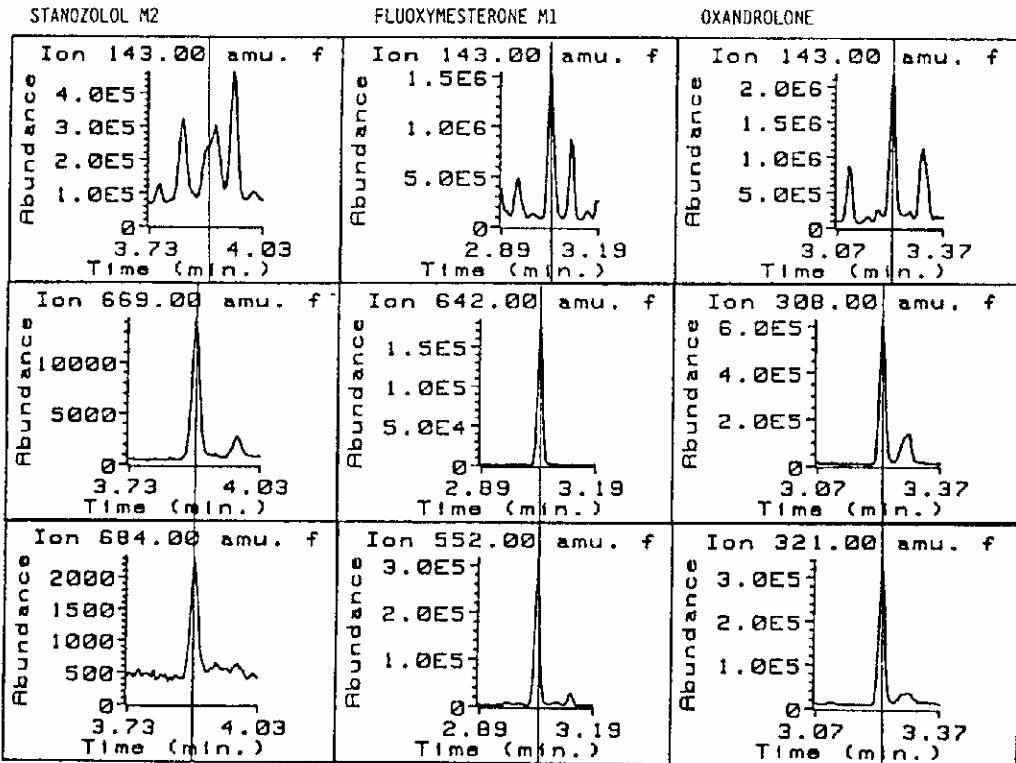


**ΣΧΗΜΑ 3.** Χρωματόγραμμα (υγρή χρωματογραφία ψηλής πίεσης) μερικών ισχυρά πολικών ουσιών doping και κορτικοστεροειδών.

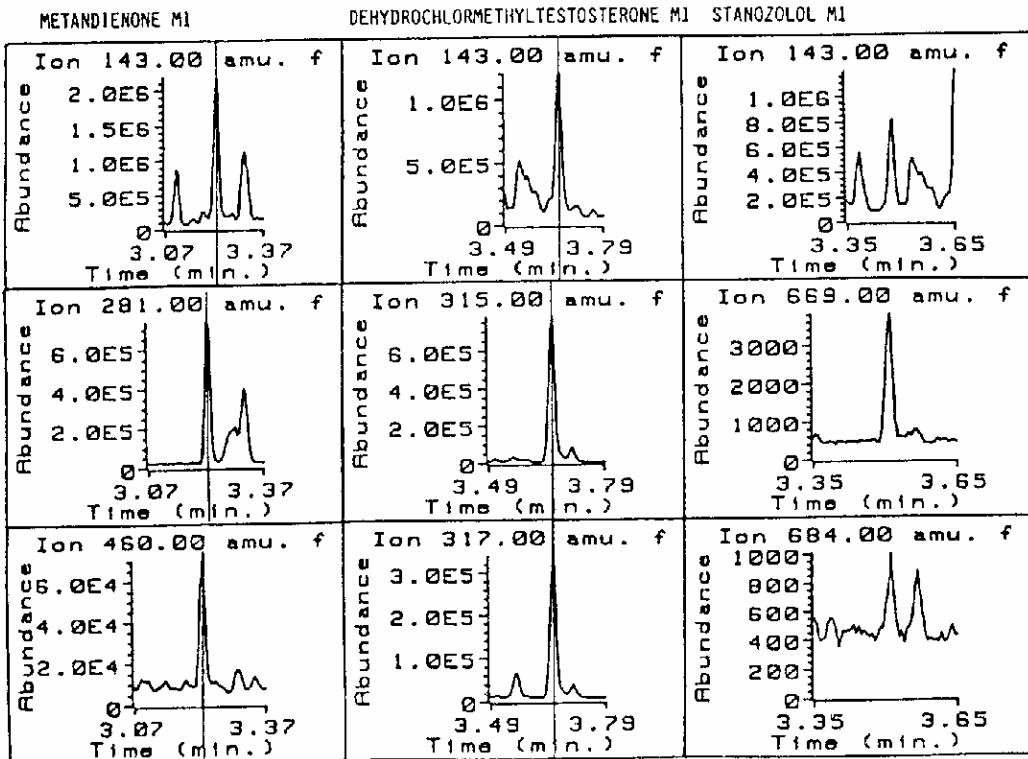
Νο Κορυφής	Χρόνος Παραμονής	Ουσία
1	5.473	caffeine
2	5.973	pemoline
3	6.361	ethyltheophylline (ISTD)
4	8.581	triamcinolone
5	10.785	cortisol (hydrocortisone)
6	11.205	cortisone
7	12.905	betamethasone (ISTD)
8	14.302	triamcinolone acetoneide



ΣΧΗΜΑ 4α



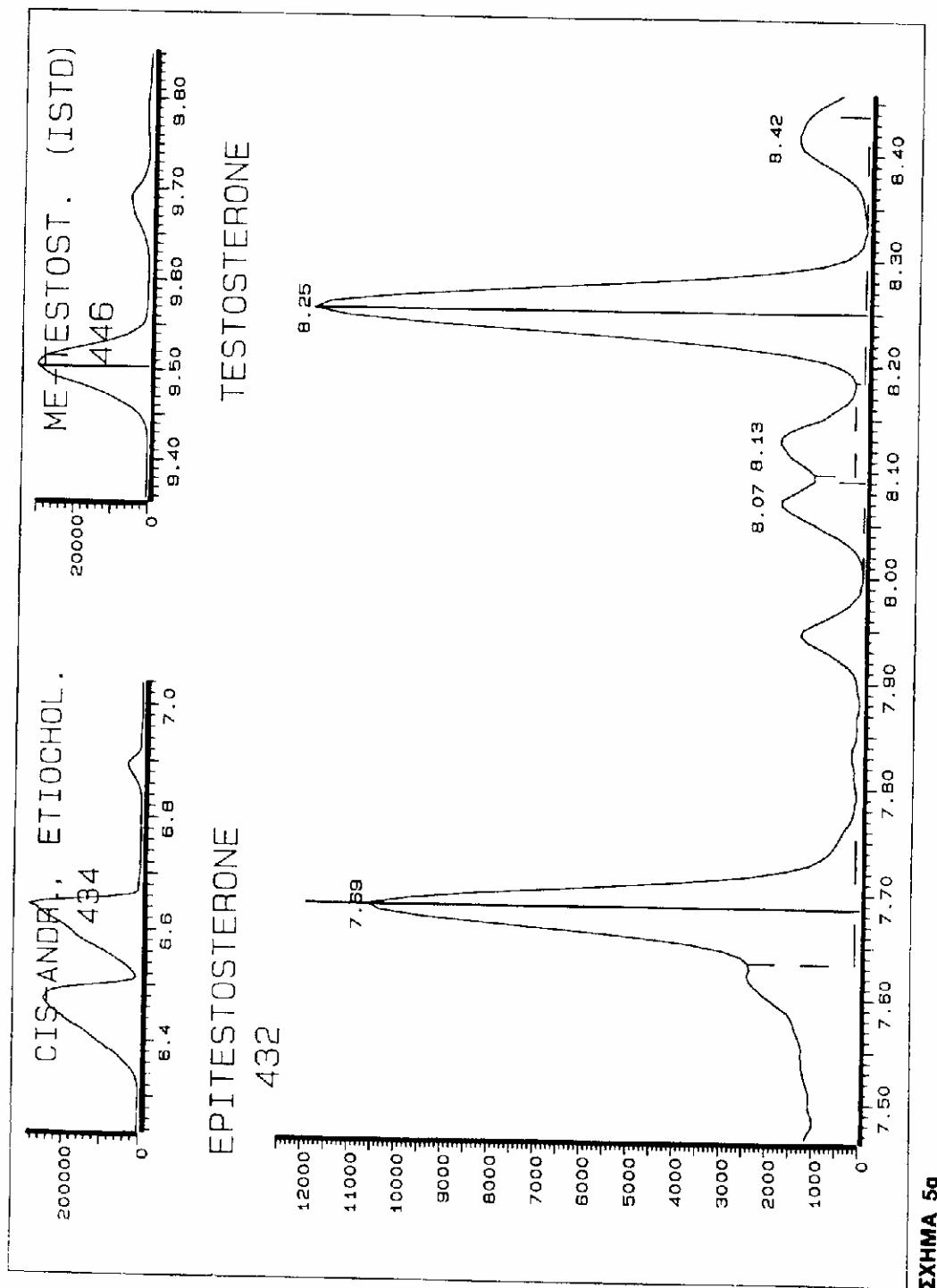
ΣΧΗΜΑ 4β

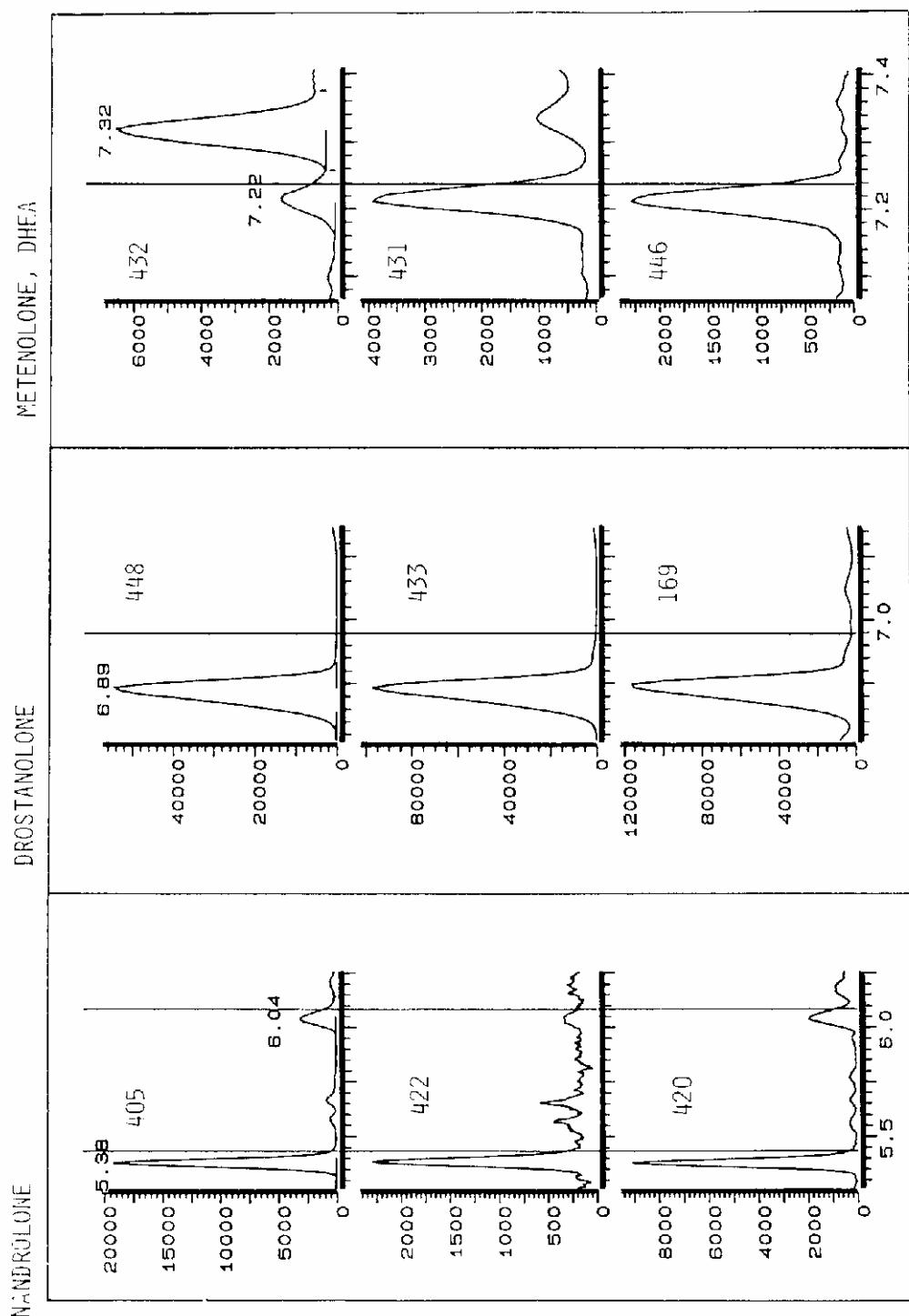


ΣΧΗΜΑ 4γ

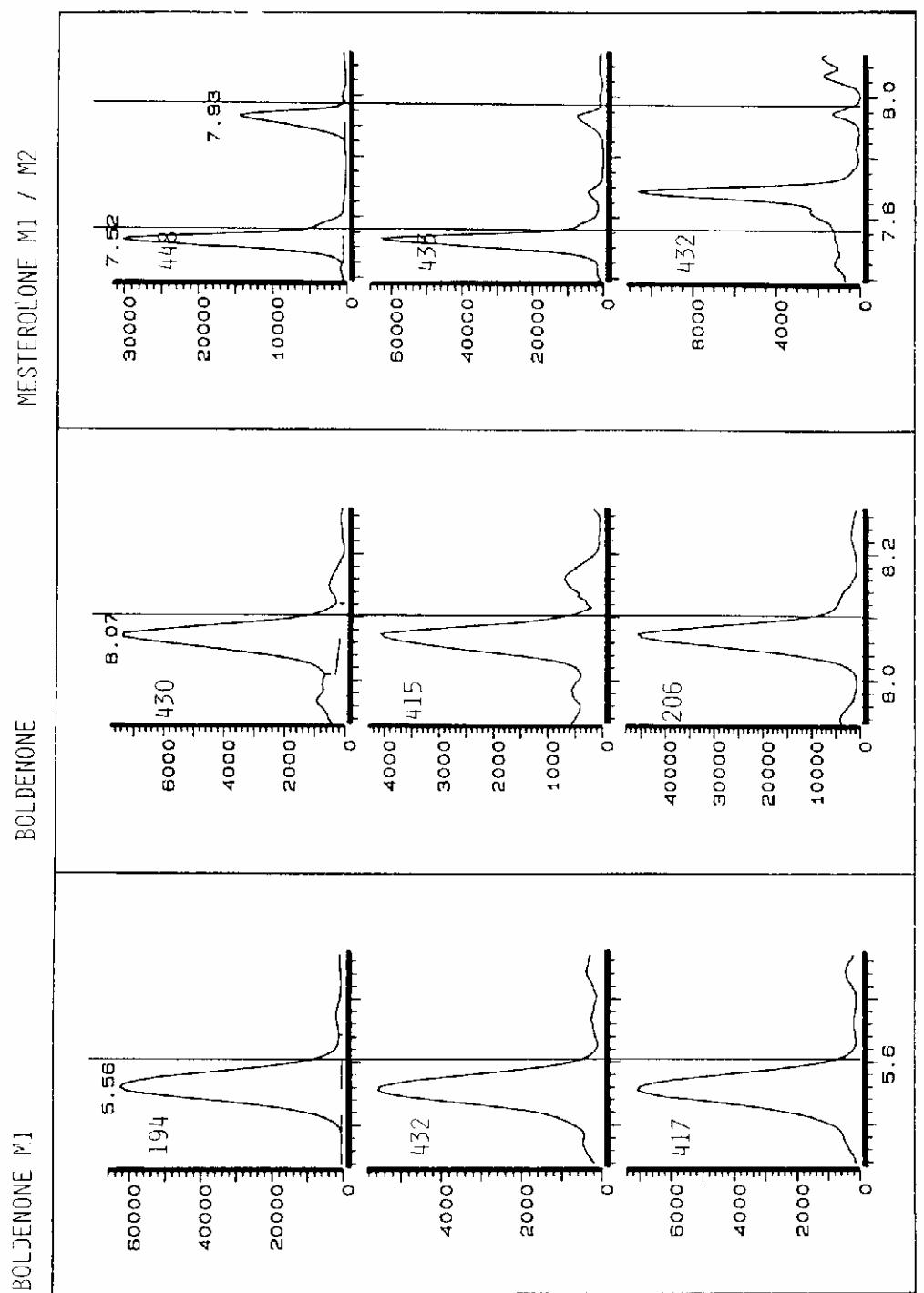
**ΣΧΗΜΑ 4(α,β,γ).** Ειδική ανίχνευση ιόντων των αναθολικών στεροειδών που απεκκρίνονται στο ελεύθερο κλάσμα. Το παράγωγο N-HFB-O-TMS τής stanozolol (1) (10 ng/ml ούρων) χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο ουσίας. Εδώ αναλύθηκε ένα μείγμα ούρων, που ελήφθη σε δοκιμαστικές μελέτες απέκκρισης με: metandienone, dehydrochlormethyltestosterone, stanozolol, fluoxymesterone και oxandrolone. Οι μεταβολίτες των στεροειδών δείχνονται με M1, M2....., όπου η ένδειξη αντιστοιχεί στη σειρά διαχωρισμού τής έκπλυσης.

Πάρα πολύ μεγάλες προσπάθειες έχουν γίνει για την διαμόρφωση των διερευνητικών διαδικασιών για ανίχνευση ρουτίνας των αναθολικών στεροειδών, καθώς ο μεταβολισμός των περισσοτέρων απ' αυτά δεν ήταν γνωστός ή αρκετά γνωστός ούτε ήταν διαθέσιμοι ειδικοί και ευαίσθητοι αναλυτικοί μέθοδοι (9-12). Αναθολικά στεροειδή παίρνονται τώρα κυρίως στην περίοδο της προπόνησης. Η χρήση τους σταματά λίγο χρόνο πριν την μέρα των αγώνων, έτσι που μόνο πολύ μικρές συγκεντρώσεις (ng/ml ή μικρότερες) απεκκρίνονται στα ούρα. Η θεώρηση της συνοπτικής αναλυτικής διαδικασίας βασίζεται σε επαρκή προπαρασκευή του δείγματος και η αεριοχρωματογραφία και η φασματομετρία μάζας παρέχει μια πρακτική λύση για την ανάλυση των αναθολικών στεροειδών (13). Στα σχήματα 4 και 5 παρουσιάζονται οι αρχές της GC-MS ανίχνευσης των αναθολικών στεροειδών (για την προπαρασκευή του δείγματος σύγκρινε παράρτημα 3.4).

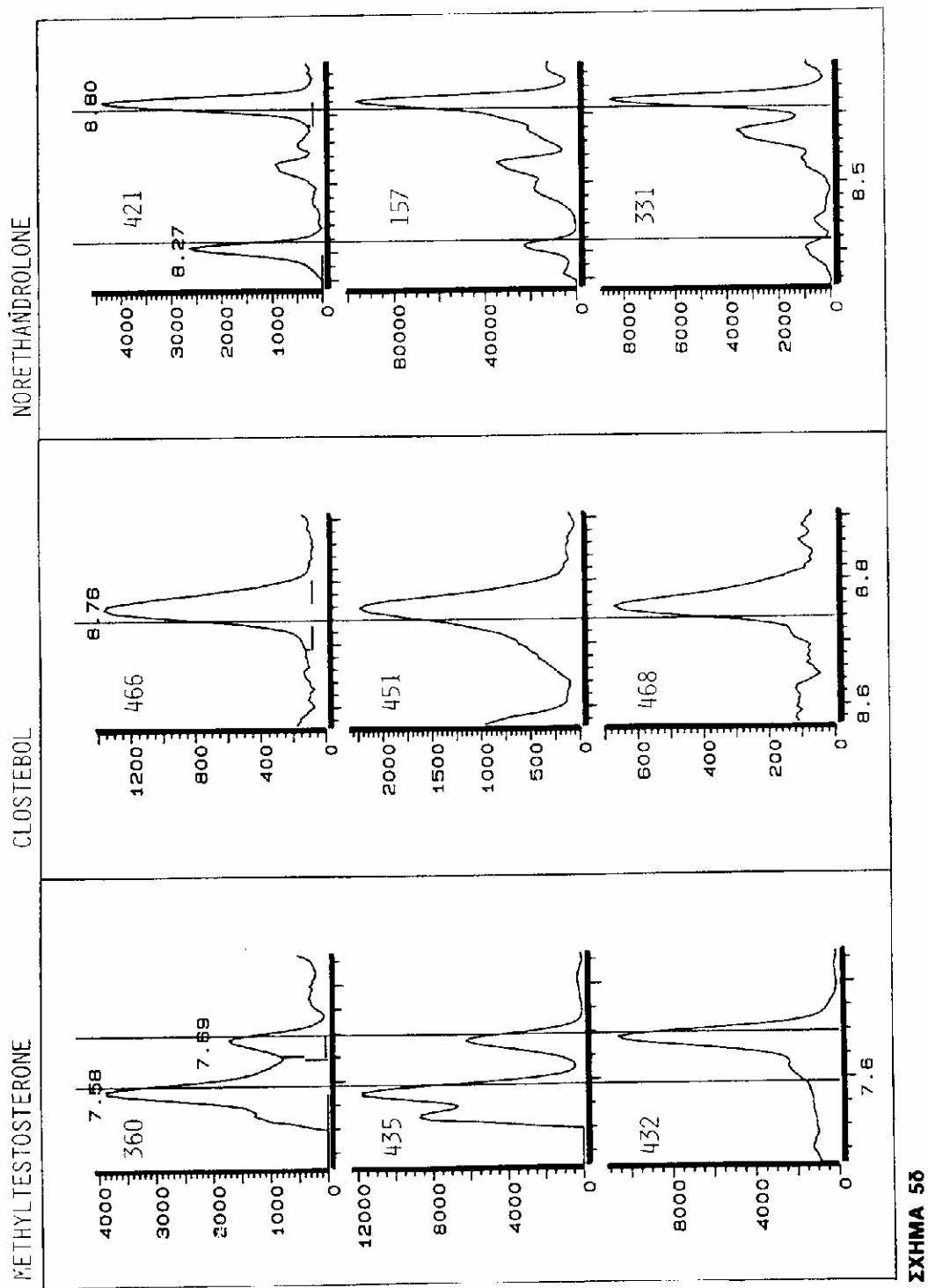


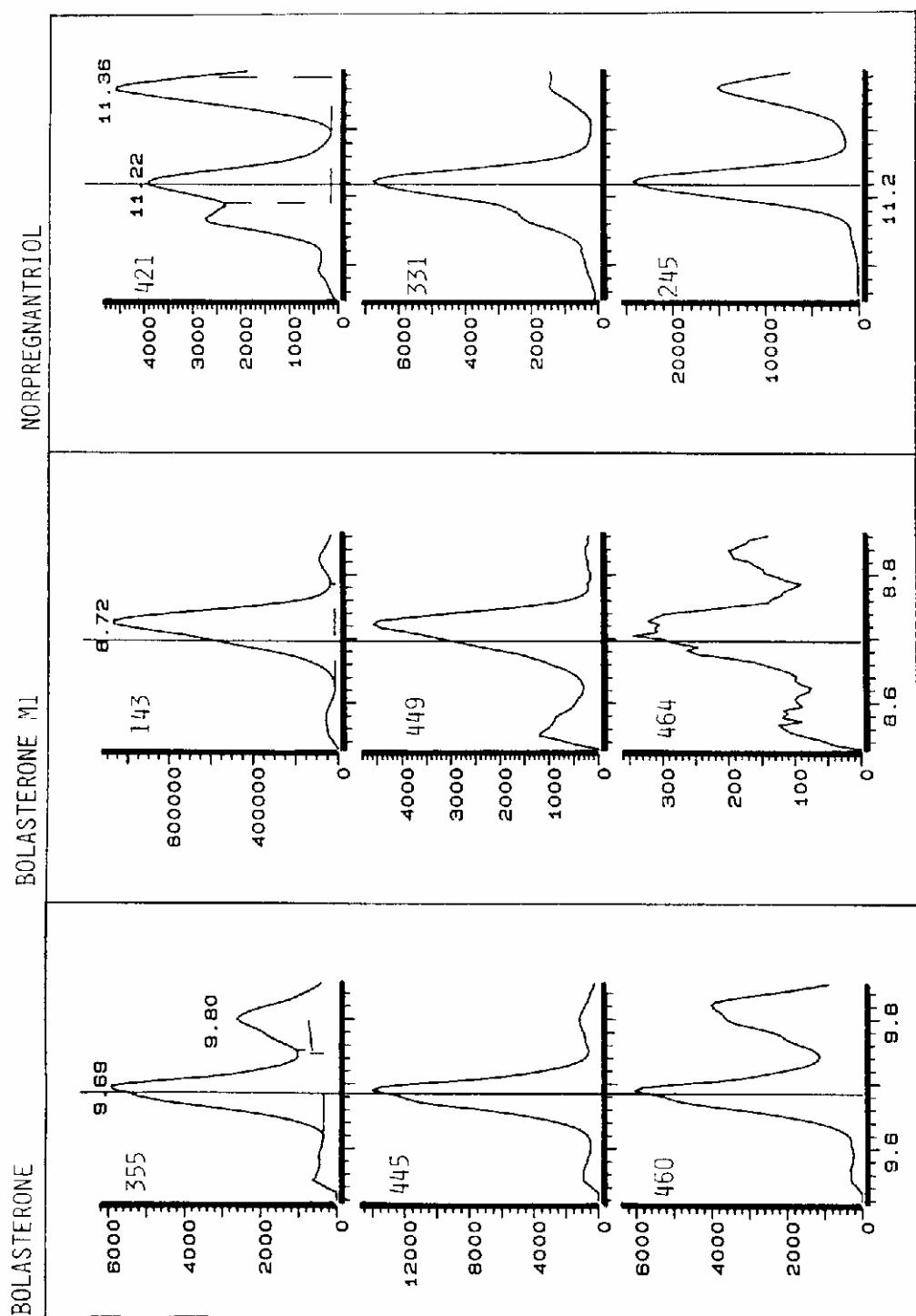


ΣΧΗΜΑ 56

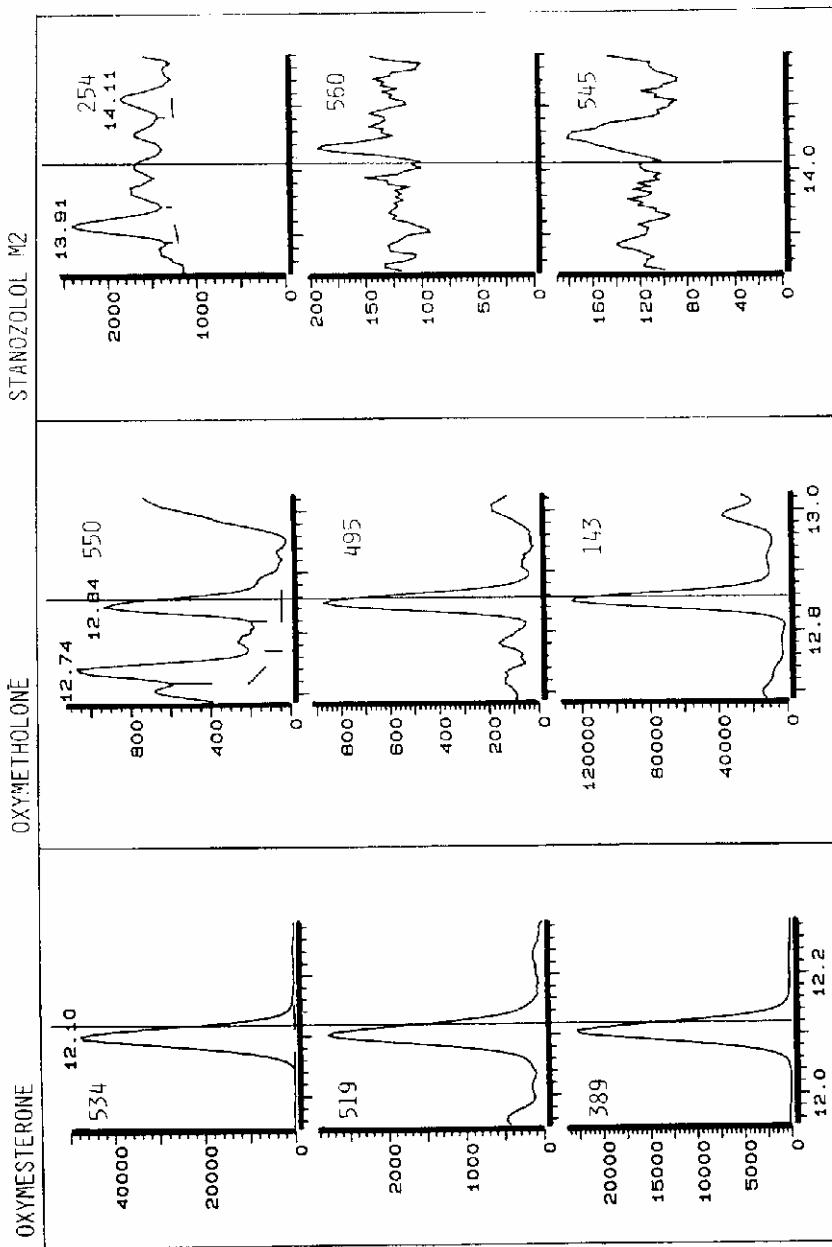


ΣΧΗΜΑ 5γ





ΣΧΗΜΑ 5ε



ΣΧΗΜΑ 5,

**ΣΧΗΜΑ 5 (α, β, γ, δ, ε, ζ).** Εδική ανίχνευση τόντων των αναβολικών στεροειδών που απεκκρίνονται σε μορφή συζυγών στεροειδών. Σ' αυτή τη διερευνητική διαδικασία περικλείονται επίσης ίχνη ιώντων  $m/e$  432 για ερι-testosterone και  $m/e$  434 για cis-androsterone και etiocholanolone. 200 ng/ml methyltestosterone προσθέτονται σαν εσωτερικό πρότυπο. Εδώ αναλύθηκε ένα μείγμα αυρων, που ελήφθη σε δοκιμαστικές μελάτες με: nandrolone, metenolone, boldenone, mestranolone, diostenolone, methandrostenolone, oxymetholone και stanozolol. Οι μεταβολίτες των στεροειδών δείχνονται με M1, M2..., όπου η ένδειξη αντιστοιχεί στη σειρά διαχωρισμού της έκπλασης.

## 2.2. Η ταυτοποίηση των ουσιών doping

Βασισμένη στην πείρα περισσοτέρων από 15 χρόνων η Ιατρική Επιτροπή της IOC δεν περιορίζεται στην χρήση μόνο χρωματογραφικών διαδικασιών για την ταυτοποίηση. Μερικές παρεξηγήσεις, όπου αρνητικά δείγματα ανακοινώθηκαν σαν θετικά — τα καλούμενα λάθος θετικά — έγιναν αιτία αναζήτησης δεδομένων φασματομετρίας μάζας σαν απόδειξη της ταυτοποίησης.

Είναι φανερό ότι μια ειδική και ευαίσθητη διερευνητική διαδικασία θα διευκόλυνε την εφαρμοζόμενη διαδικασία ταυτοποίησης. Στην πρώτη αναλυτική πορεία μπορεί να πραγματοποιηθεί μια προκαταρκτική εξακρίβωση μέσω των παραμέτρων τού «χρόνου παραμονής». Είναι ξεκάθαρο ότι η ποιότητα της χρωματογραφικής πορείας — επαναληπτικότητα του χρόνου παραμονής, συμμετρικό σχήμα της κορυφής και διαχωρισμός της, θα προσδιορίζει την ακρίβεια της πρώτης προκαταρκτικής ταυτοποίησης. Για να οδηγηθούμε αναμφισβήτητα σε αποδεικτικά στοιχεία ότι τα δείγματα ούρων παρέχουν ύποπτες ενδείξεις σχετικά με κάποια ουσία doping, θα πρέπει οι μεταβολίτες του ή κάποια σχετιζόμενη ουσία να έχουν αναλυθεί με τις σχολαστικότερες αναλυτικές μεθόδους. Μέρος της ολοκλήρωσης της διαδικασίας ταυτοποίησης είναι η επανάληψη της εκχύλισης σ' ένα νέο επί μέρους δείγμα των ούρων που παίρνονται από το ύποπτο δείγμα και η εκτέλεση των παραπέρα ή εναλλακτικών σταδίων προπαρασκευής του δείγματος.

Σ' αυτό το στάδιο, με τα αποτελέσματα της πρώτης ανάλυσης, η προπαρασκευή του δείγματος μπορεί να τροποποιηθεί με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας. Η τελική ταυτοποίηση θα πρέπει να γίνει συγκρίνοντας τα αναλυτικά δεδομένα των ουσιών με εκείνα των αυθεντικών ουσιών προτύπων. Αυτές μπορεί να είναι καθαρές ενώσεις ή διαθέσιμοι στο εμπόριο μεταβολίτες. Αν οι μεταβολίτες δεν είναι διαθέσιμοι, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπος ουσία ούρα εθελοντών που έχουν πάρει την απαγορευμένη ουσία doping.

Τα ευρήματα στα ύποπτα δείγματα και τα πρότυπα δείγματα θα πρέπει να συμφωνούν:

1. στη συμπεριφορά κατά την προπαρασκευή του δείγματος (χημεία της υγρής φάσεως).
2. στις παραμέτρους της αεριοχρωματογραφίας.
3. στα δεδομένα της φασματομετρίας μάζας — ολικό φάσμα ή σειρά επιλεγμένων ιόντων.

## ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την ανάλυση doping η ουσιαστικότερη πρόδοση στην ανάλυση με όργανα ήταν κατ' αρχήν η εισαγωγή του ειδικού για άζωτο θερμικού ιονικού ανιχνευτή το 1970, και κατόπιν η διαθεσιμότητα του συνδυασμού αεριοχρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας/H/Y, επίσης το 1970. Αυτές οι τεχνικές ενθάρρυναν προόδους στην χημεία της υγρής φάσεως, όπως διαδικασίες εκχύλισης μιας βαθμίδας ή απομόνωσης με προσροφητικές ουσίες, όπως ρητίνες polystyrene ή τροποποιημένη γέλη πυριτικών. Επιπρόσθετα αναπτύχθηκαν κατάλληλες τεχνικές λήψης παραγώγου για πολικές ενώσεις. Λεπτομέρειες βλέπε στην πρωτότυ-

πη θιθλιογραφία (5,14-18). Στις μέρες μας δταν η αναλυτική χημεία παρουσιάζεται σαν «μαύρο κουτί» ή «χημεία με κουμπάκια», θα πρέπει να τονιστεί ακόμα μια φορά ότι η χημεία τής υγρής φάσεως είναι ένα ουσιαστικό, απαραίτητο μέρος της ανάλυσης doping. Μέρος της χημείας της υγρής φάσεως είναι η γνώση του θιοχημικού προορισμού — απέκκριση σ' ελεύθερη μορφή, συζυγές ή μεταβολής της του φαρμάκου — και του χρονοδιαγράμματος της απέκκρισης..

Η λογική και επιτυχής εφαρμογή των μοντέρνων τεχνικών ανάλυσης που περιγράφονται στις απαιτήσεις για αναγνώριση θα οδηγήσει τόσο στην αποφυγή λάθος θετικών αποτελεσμάτων όσο και πολλών λάθος αρνητικών.

Είναι αξιομνημόνευτο ότι η θεώρηση της συνοπτικής διερευνητικής διαδικασίας για ουσίες doping παρέχει ένα τρόπο αποτελεσματικής σε κόστος ανάλυσης σ' ένα δείγμα ούρων μπορεί να εξεταστεί η παρουσία μιας ποικιλίας ουσιών.

Μέχρι το 1980 ο έλεγχος doping βασιζόταν αποκλειστικά σε ποιοτικά αποτελέσματα, με την αρχή της ναι/όχι απόφασης. Το 1982 με την εισαγωγή του ανωτάτου ορίου συγκέντρωσης της καφεΐνης στα ούρα (εκείνο το χρόνο 15 µg/ml) και του λόγου τεστοστερόνης/επιτεστοστερόνης (όριο 6, καθορισμένο από την Ιατρική Επιτροπή της IOC) άνοιξε ένας νέος ορίζοντας στην ανάλυση doping, η περιοχή του ποσοτικού προσδιορισμού. Για τη λήψη αξιόπιστων ποσοτικών αποτελεσμάτων πρέπει να εδραιωθούν η επαναληπτικότητα και η ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου. Είναι καλά γνωστό ότι η διασπορά των ποσοτικών αποτελεσμάτων από εργαστήριο σε εργαστήριο είναι σχετικά μεγάλη και ότι σχολαστικά προγράμματα ελέγχου είναι αναγκαία για την παροχή αποδεκτών ποσοτικών αποτελεσμάτων.

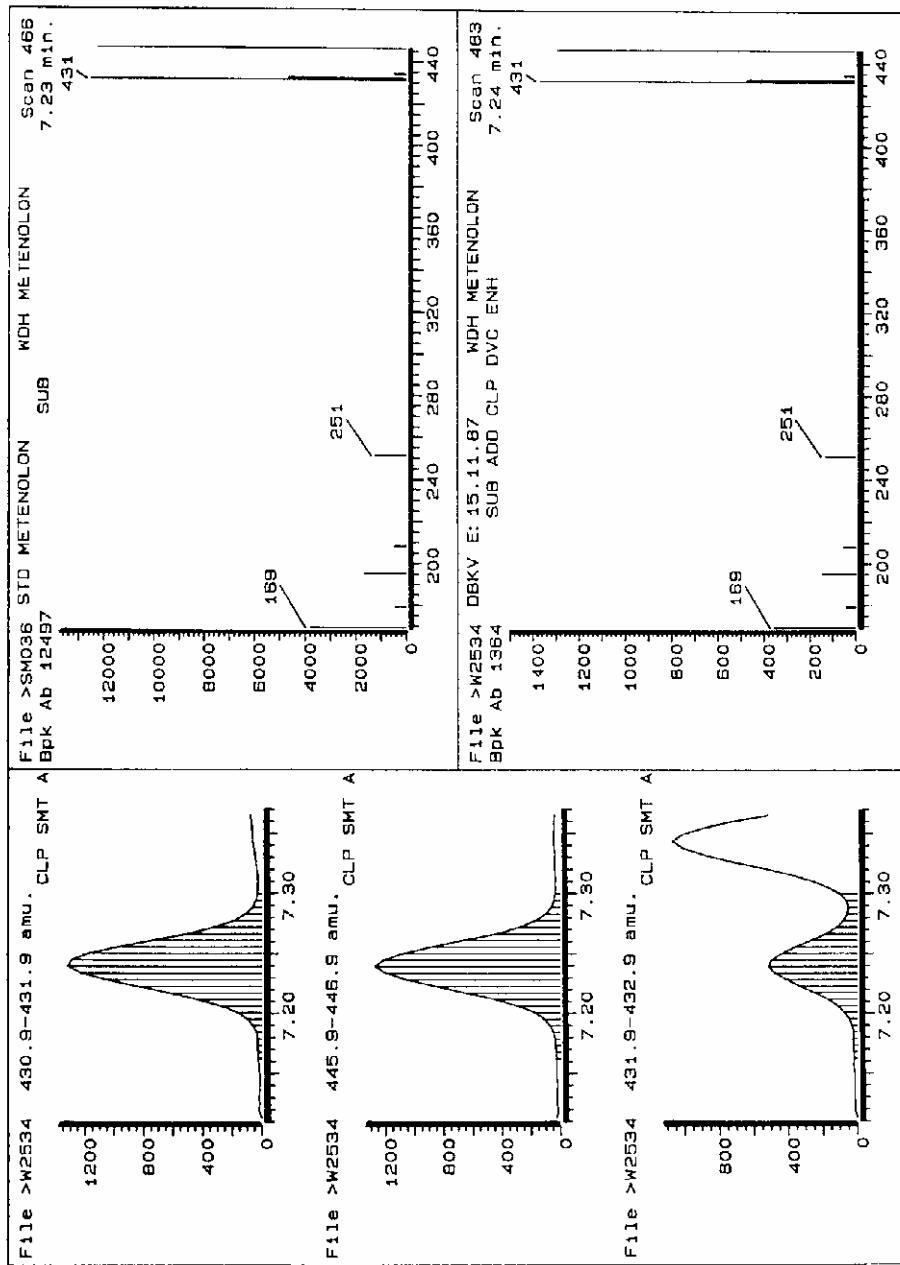
Παρά το γεγονός ότι νέες προκλήσεις φάνηκαν στον ορίζοντα — π.χ. η χρήση των πεπτιδικών ορμονών, όπως η σωματοτρόπος και η χωριονική γοναδοτρόπος ορμόνη στον αθλητισμό — για το κοντύτερο μέλλον το κύριο πρόβλημα είναι η ανίχνευση των αναθολικών στεροειδών, όπως προέκυψε από τη στατιστική του 1986 των αναγνωρισμένων από την IOC εργαστηρίων (πίνακας 3). Τα δύο τρίτα των ουσιών doping που ανιχνεύτηκαν ήταν αναθολικά στεροειδή. Όπως είναι γνωστό αναθολικά στεροειδή που δρουν για μικρό διάστημα μπορούν ν' ανιχνευτούν μόνο μέσα στο διάστημα των 8 με 14 ημερών, η υπερβολική χρήση όμως μπορεί να προσδιορισθεί σε πολύ μεγαλύτερο διάστημα απ' αυτό που δείχνουν τα σχήματα. Μια σωστή αντιμετώπιση των αθλητικών αρχών είναι και πρέπει να είναι η εισαγωγή του ελέγχου doping εκτός αγώνων και η αντιμετώπιση των εργαστηρίων η αύξηση της ευαισθησίας στο να επεκτείνονται αναδρομικά στην ανίχνευση των αναθολικών στεροειδών. Ένας σπουδαίος παράγοντας όχι μόνο για τη δημιουργία καλύτερων διερευνητικών διαδικασιών, αλλά και για την προμήθεια περισσότερων αποδείξεων στην εξακρίβωση της υπερβολικής χρήσης των αναθολικών στεροειδών είναι η διαθεσιμότητα των μεταβολιτών τους, όπως παρουσιάζεται στη σύνθεση της 3-hydroxy-stanozolol (σχήμα 6).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.**

Μέθοδοι ανάλυσης και ταξινόμησης ουσιών.

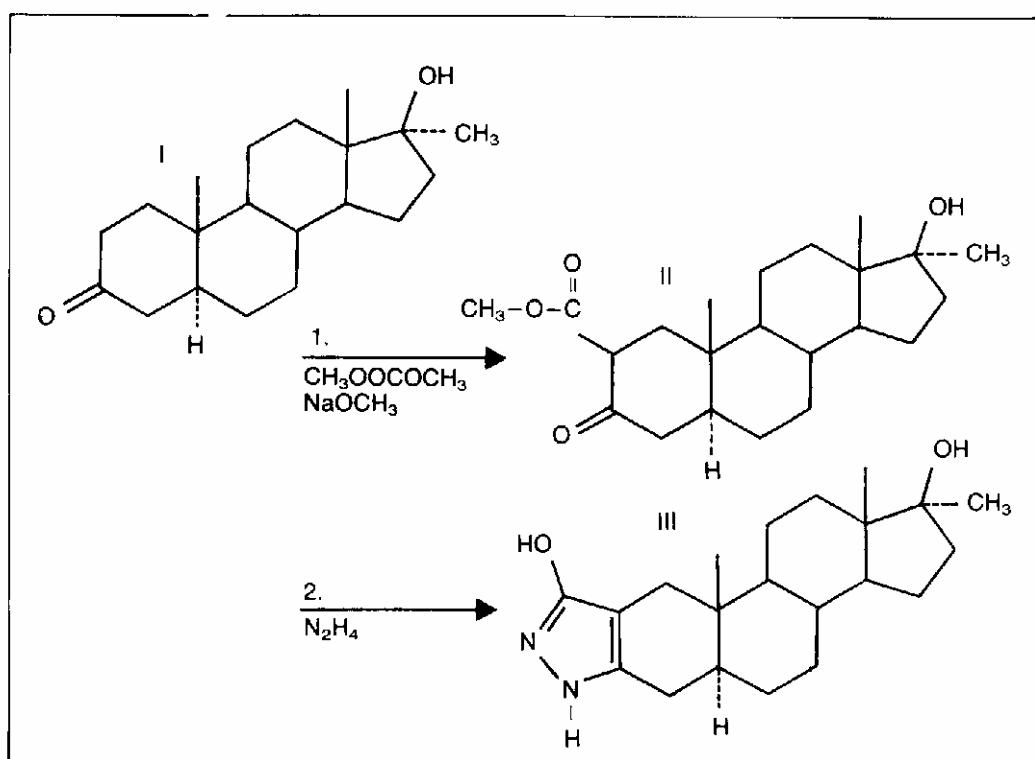
Χημική/Βιοχημική Ταξινόμηση	Προετοιμασία Δείγματος			Αναλυτικές Μέθοδοι		
	Υδρόλυση	Εκχύλιση	Λήψη Παραγώγου ουσίας	Τεχνική Διαχωρισμού	Τεχνική ανίχνευσης	Ευαισθησία (ng/ml)
1. Ουσίες, που περιέχουν άζωτο, εκρινόμενες ελεύθερες στα ούρα, π.χ. amphetamine, ephedrine	όχι	αιθέρας pH>12	όχι	GLC	N-FID	100
2. Ουσίες, που περιέχουν άζωτο, εκρινόμενες σαν συζυγή με θειικά ή γλυκούρονικό οξύ π.χ. phenolalkylamines, β-αναστολείς, morphine	ναι	αιθέρας αλκοόλη	TMS/TFA TFA	GLC	N-FID/MS	10
3. Διεγερτικά με ειδική χημική δομή και ιδιότητες π.χ. pemoline, caffeine	όχι	οξικός αιθυλ. εστέρας	όχι	HPLC	UV/VIS MS	100
4. Αναθολικά στεροειδή	ναι	XAD <sub>2</sub>	TMS	GLC	MS	1
a) εκρινόμενα ελεύθερα: metandienone, oxandrolone	όχι	αιθέρας	TMS/HFB	GLC	MS	1
b) εκρινόμενα ως συζυγή: nandrolone, mesterolone, testosterone	ναι	αιθέρας/ XAD <sub>2</sub>	TMS	GLC	MS	1
5. Όξινες ουσίες όπως τα περισσότερα διουρητικά: furosemide, etacrynic acid	όχι	αιθέρας pH<2	CH <sub>3</sub> J	GLC/HPLC	UV/VIS MS	10

ΑΝΑΛΥΣΗ DOPING

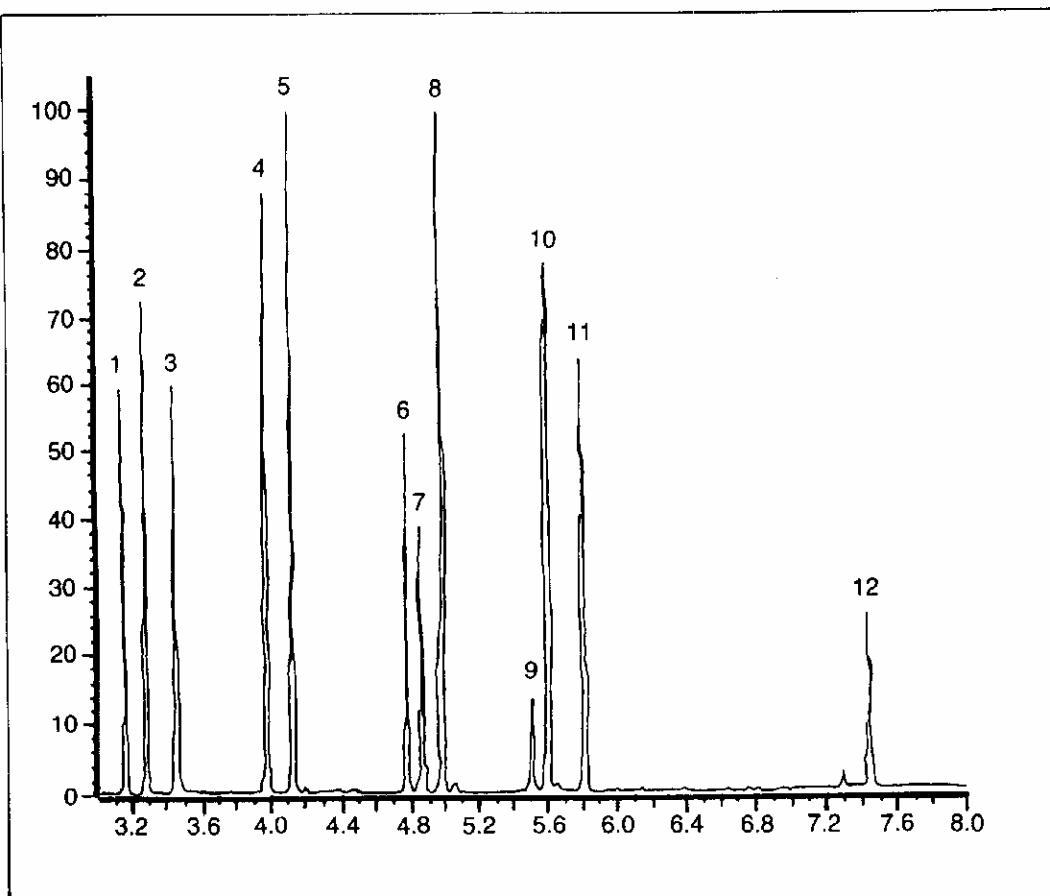


**ΣΧΗΜΑ 6.** Σύγκριση του φάσματος μόδως SIM του μεταβολίτη του methenolone (1-methylene-5α-androstan-3α-ol-17-one) και του θετικού δείγματος (εργαστηριακός κώδικας 2534).

Ο χρόνος παραμονής του μεταβολίτη σε ούρα και το θετικό δείγμα διαφέρουν μόνο κατά 0.01 min (7.24 με 7.23 min). Η εγκάρσια συσχέτιση των σχετικών εντόσθιων για τα τέσσερα ιόντα 446, 431, 251 και 169 παρουσιάζει με 0.999 μα τέλεια συμφωνία.



**ΣΧΗΜΑ 7.** Σύνθεση του 3'-hydroxy - stanozolol: 17α-methyl-androstanolone (I). Συμπυκνώνεται με dimethylcarbonate καταλυόμενο με sodium methylate σαν καταλύτη στη 2-methoxycarbonyl - 17α-methyl- androstanolone. Η αντίδραση με hydrazine hydrate δίνει 3'-hydroxy-stanozolol (III), μεταβολίτης του stanozolol που απομονώθηκε και αναγνωρίστηκε σε δοκιμαστικές μελέτες απέκκρισης.



**ΣΧΗΜΑ 8.** Χρωματόγραμμα ενός σταθερού μείγματος των β-αναστολέων. Απεικονίζονται το όθροισμα των εντάσεων των ιόντων  $m/z$  86 και  $m/z$  284.

- 1 Toliprolol, N, TFA, O-TMS
- 2 Bupranolol, O-TMS
- 3 Bunitrolol, O-TMS
- 4 Oxprenolol, N-TFA, O-TMS
- 5 Penbutolol, O-TMS
- 6 Timolol, O-TMS
- 7 Pindolol, bis-N-TFA, O-TMS
- 8 Propranolol, N-TFA, O-TMS
- 9 Pindolol, N-TFA, O-TMS
- 10 Nadolol, tris-O-TMS
- 11 Pindolol, N-TFA, bis-N, O-TMS
- 12 Acebutolol, N-TFA, O-TMS

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.**

Σύνοψη των αναλυμένων δειγμάτων το 1986 από τα αναγνωρισμένα εργαστήρια της IOC. Απαντήσεις από 18 εργαστήρια.

	Αριθμός των δειγμάτων	Αριθμός των αρνητικών δειγμάτων	Αριθμός των αναλυτικά <sup>θετικών δειγμάτων</sup>	Ποσοστό <sup>A-δείγματα</sup> %
Αγώνες με αγωνιζόμενους μόνο εθνικού επιπέδου	15.553	15.272	261	1.68
Αγώνες με αγωνιζόμενους διεθνούς επιπέδου	5.227	5.148	79	1.51
Τα σπουδαιότερα διεθνή πρωταθλήματα	4.449	4.338	111	2.49
Συγκεντρωμένα δείγματα εκτός αγώνων*	6.505	6.368	137	2.11
Έλεγχος αγωνιζόμενων πριν τα σπουδαιότερα πρωταθλήματα**	1.268	1.233	35	2.76
Σύνολο	32.982	32.359	623	1.89

\* 14 εργαστήρια που κάνουν έλεγχο εκτός αγώνων.

\*\* 11 εργαστήρια που κάνουν αναλύσεις πριν τους σπουδαιότερους αγώνες.

Συχνότητα των ανιχνευμένων ουσιών, κατανεμημένων στις ομάδες των ουσιών doping.

Ομάδες των μέσων doping	N
A. Διεγερτικά	177
B. Ναρκωτικά	23
Γ. Αναβολικά στεροειδή	439
Δ. Β-αναστολείς	31
Ε. Διουρητικά	2
ΣΤ. Καταπραϋντικά	15
Σύνολο	687

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1****ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΗΣ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΟΛΥΜΠΙΑΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ****ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ****ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ DOPING**

Η Ιατρική Επιτροπή της IOC θεωρεί ουσιώδη την εξέταση της εργασίας των εργαστηρίων ελέγχου doping. Η Επιτροπή προτείνει γι' αυτό τους παρακάτω κανόνες για αναλυτικές διαδικασίες και ποιοτικές δοκιμασίες, που απαιτούνται για το πρόγραμμα αναγνώρισης.

**1. Βασικός εξοπλισμός:**

1. Αεριοχρωματογραφία (GLC)
2. Υγρή χρωματογραφία ψηλής πίεσης (HPLC)
3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC)
4. Φασματογραφία μάζας (MS) σε σύνδεση με αεριοχρωματογράφο (GC) και μονάδα Η/Υ (COM)

**II. Αναλυτικές διαδικασίες**

Για την διερεύνηση, η Ιατρική Επιτροπή της IOC απαιτεί την παρακάτω διαδικασία:

1. Για «πτητικές ουσίες doping» — διερεύνηση GC μ' ένα ειδικό ανιχνευτή αζώτου (N-FID) και τριχοειδή στήλη (cross-linked) με μέτρια πολική φάση π.χ. SE 54. Εναλλακτικά συστήματα GLC μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.
2. Για «βαριές πτητικές ουσίες doping» διερεύνηση μετά από υδρόλυση με οξύ και απομόνωση σε pH 9.5, παραγώγου ουσίας σε τριχοειδή στήλη (cross-linked) και ανιχνευση μ' ένα ειδικό ανιχνευτή αζώτου (N-FID) ή θραυσματογραφία μάζας (ειδική ανιχνευση μάζας).
3. Διερευνητική διαδικασία για αναθολικά στεροειδή
  - 3.1 Ελεύθερα στεροειδή:
 

Μετά από εκχύλιση σε pH 8.0-9.0, τριμεθυλο-σιλυλίωση και ανιχνευση με θραυσματογραφία μάζας (ειδική ανιχνευση μάζας).
  - 3.2 Συζυγή στεροειδή:
 

Μετά από ενζυματική υδρόλυση, εκχύλιση, τριμεθυλο-σιλυλίωση και ανιχνευση με θραυσματογραφία μάζας (ειδική ανιχνευση μάζας). Εναλλακτικά μπορεί να πραγματοποιηθεί μια απομόνωση του ελεύθερου και συζυγούς κλάσματος π.χ. με XAD-2, ακολουθούμενη από διαχωρισμό των δύο κλασμάτων, όπως επεξεργάστηκε και αναλύεται παραπάνω.

**Σημείωση:** Οριστική ταυτοποίηση των ουσιών doping απαιτεί ανάλυση με φασματομετρία μάζας.

**III. Αναγνώριση των εργαστηρίων ανάλυσης**

Εργαστήρια ανάλυσης που αιτούνται αναγνώριση πρέπει να εκπληρώνουν τις παρακάτω απαιτήσεις και ν' απαντούν στις συνοδευόμενες ερωτήσεις:

1. Κατάλογος των ουσιών προτεινόμενος από την Ιατρική Υποεπιτροπή της IOC για doping και βιοχημεία στον αθλητισμό, που θα πρέπει να μπορούν ν' αναγνωρισθούν στην ανάλυση του εργαστηρίου (μέσα doping και μεταθολίτες).
 

Πρότυπες ουσίες θα πρέπει να είναι διαθέσιμες.
2. Ελάχιστη συγκέντρωση που μπορεί να προσδιορισθεί (ανιχνευτεί) μετά από χρήση doping σε ανθρώπους.
3. Ο μέγιστος χρόνος που απαιτείται για να ανακοινωθεί το αποτέλεσμα μετά την παραλαβή του δείγματος για ανάλυση:
  - α) για αναθολικά στεροειδή
  - β) για άλλες ουσίες doping

4. Τα δείγματα ελέγχου θ' αναλύονται παρουσία ενός μέλους της Ιατρικής Υποεπιτροπής της IOC για doping και βιοχημεία στον αθλητισμό ή ενός οριζόμενου ειδικού («εκπροσώπου»). Τα δείγματα ελέγχου θα διατείθονται από την διεύθυνση της παραπάνω Υποεπιτροπής.
5. Το εργαστήριο που αιτείται την αναγνώριση θα πρέπει να αναλύσει και ν' ανακοινώσει τ' αποτελέσματα 10 δείγμάτων ελέγχου στην Ιατρική Υποεπιτροπή της IOC για doping και βιοχημεία στον αθλητισμό.  
Τα αποτελέσματα, των οποίων έξη αντίγραφα θα πρέπει να σταλούν στη γραμματεία της Υποεπιτροπής για doping και βιοχημεία στον αθλητισμό, μέσα σε τρεις θδομάδες μετά την ολοκλήρωση της αναγνώρισης, πρέπει να περιλαμβάνουν:  
 1) Ολοκληρωμένη περιγραφή της αναλυτικής διαδικασίας.  
 2) Αντίγραφα των πρωτοκόλων GC, MS και COM.  
 Μετά τη μελέτη των αποτελεσμάτων η παραπάνω Υποεπιτροπή αναγγέλει την απόφασή της.
6. Παρουσία του εκπροσώπου, το εργαστήριο που αιτείται την αναγνώριση πρέπει ν' αναγνωρίσει σωστά τα θετικά δείγματα μέσα σε διάστημα τριών ημερών. Στο εργαστήριο χορηγείται ακόμα ένα διάστημα οχτώ ημερών για να συγκεντρώσει τις λεπτομερείς πληροφορίες και να τις υποβάλλει γραπτά σχετικά με τη σαφή αναγνώριση των ουσιών doping που περιέχονται στα θετικά δείγματα.
7. Τα δείγματα ελέγχου θα περιέχουν μέχρι 6 στεροειδή, μέχρι 6 διεγερτικά, μέχρι 3 θ-αναστολείς, μέχρι 2 ναρκωτικά και μέχρι 2 διουρητικά.
8. Πριν την επίσκεψη του στο εργαστήριο, ο εκπρόσωπος θα έχει προμηθευτεί όλα τα έγγραφα για τα δείγματα που χρησιμοποιούνται όσον αφορά την αναγνώριση του εργαστηρίου. Αν το εργαστήριο ανακοινώσει σωστά αποτελέσματα μέσα σε τρεις μέρες από την επίσκεψη του εκπροσώπου, ο εκπρόσωπος θα συζητήσει τότε τα αποτελέσματα με το επιτελείο του εργαστηρίου. Μαζί με το έγγραφο των επισήμων αποτελεσμάτων, ο εκπρόσωπος παρουσιάζει στην Υποεπιτροπή μια τυπική γραπτή έκθεση.
9. Κάθε δύο χρόνια αναγνωρισμένα εργαστήρια υποβάλλονται σε ανάλυση μέχρι 10 νέων δείγμάτων ελέγχου σαν μέρος του διαρκούς προγράμματος αναγνώρισης και ανακοινώνουν τ' αποτελέσματά τους στη γραμματεία της Υποεπιτροπής της IOC για doping και βιοχημεία στον αθλητισμό. Οι λεπτομέρειες της διαδικασίας της επαναληπτικής αναγνώρισης θα στέλνονται στο αντίστοιχο εργαστήριο 3 μήνες πριν απ' το έλεγχο.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

- 2.1. Ορισμός doping της Ιατρικής Επιτροπής της IOC για τους Ολυμπιακούς Χειμερινούς και Θερινούς αγώνες 1988 (Κάλγκαρι και Σεούλ).

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ DOPING

### I. Ομάδες ουσιών doping

- A. Διεγερτικά
- B. Ναρκωτικά
- Γ. Αναβολικά στεροειδή
- Δ. Βήτα-αναστολείς
- Ε. Διουρητικά

### II. Μέθοδοι doping

- A. Doping με αίμα
- Β. Φαρμακευτικές, χημικές και φυσικές μέθοδοι.

**III. Ομάδες ουσιών περιορισμένης χρήσης**

- A. Οινόπνευμα  
 B. Τοπικά αναισθητικά  
 Γ. Κορτικοστεροειδή

**Σημείωση:** Ο ορισμός του doping της Ιατρικής Επιτροπής της IOC θασίζεται στην απαγόρευση φαρμακολογικών ομάδων ουσιών.

Αυτός ο ορισμός έχει το πλεονέκτημα ότι απαγορεύονται και νέες ουσίες, μερικές από τις οποίες μπορεί να παρασκευάζονται στοχεύοντας ειδικά σε doping.

Ο παρακάτω κατάλογος παρουσιάζει παραδείγματα διαφορετικών ομάδων doping διευκρινιστικά στον ορισμό των doping. Και αν ακόμα συμβουλεύεται, όλες οι ουσίες που περιέχονται στις απαγορευμένες ομάδες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιατρική περιθαλψή, ακόμα και όταν δεν περιέχονται στον κατάλογο σαν παραδείγματα. Αν ουσίες των απαγορευμένων ομάδων ανιχνευθούν στο εργαστήριο τότε επεμβαίνει η Ιατρική Επιτροπή της IOC. Ας σημειωθεί ότι η παρουσία ουσιών doping στα ούρα αποτελεί αδίκημα, ασχέτως από τον τρόπο χορήγησης.

**2.2. Παραδείγματα στις ομάδες ουσιών doping****A. Διεγερτικά π.χ.**

amfepramone	ephedrine	morazone
amfetaminil	etafedrine	nikethamide
amiphenazole	etamiivan	pemoline
amphetamine	etilamfetamine	pentetrazol
benzphetamine	fencamfamin	phendimetrazine
caffeine*	fenetylline	phenmetrazine
cathine	fenproporex	phentermine
chlorphentermine	furfenorex	phenylpropanolamine
clobenzorex	mefenorex	piradrol
clorprenaline	methamphetamine	prolintane
cocaine	methoxyphenamine	propylhexedrine
cropropamide**	methylephedrine	pyrovalerone
crotethamide**	methylphenidate	strychnine
dimetamfetamine		
και συγγενείς ενώσεις		

\* Για την καφεΐνη ο ορισμός του θετικού καθορίζεται ως εξής: — αν η συγκέντρωση στα ούρα ξεπερνά τα 12 µg/ml.

\*\*Ενώσεις του «micoren-R»

**B. Ναρκωτικά αναλγητικά π.χ.**

alphaprodine	dihydrocodeine	nalbuphine
anileridine	dipipanone	pentazocine
buprenorphine	ethoheptazine	pethidine
codeine	ethylmorphine	phenazocine
dextromoramide	levorphanol	trimeperidine
dextropropoxyphen	methadone	
diamorphine (heroin)	morphine	
και συγγενείς ενώσεις		

**Γ. Αναβολικά στεροειδή π.χ.**

bolasterone	mesterolone	oxandrolone
boldenone	metandienone	oxymesterone
clostebol	metenolone	oxymetholone
dehydrochlor-	methyltestosterone	stanazolol
methyltestosterone	nandrolone	testosterone*
fluoxymesterone	norethandrolone	
και συγγενείς ενώσεις		

\* Για την τεστοστερόνη ο αρισμός του θετικού καθορίζεται ως εξής: — η χρήση της τεστοστερόνης ή η χρήση κάθε άλλου παρασκευάσματος που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του δείκτη τεστοστερόνης/επιτεστοστερόνης στα ούρα πάνω από 6.

**Δ. Βήτα-αναστολείς π.χ.**

acebutolol	labetalol	oxprenolol
alprenolol	metoprolol	propranolol
atenolol	nadolol	sotalol
και συγγενείς ενώσεις		

**Ε. Διουρητικά**

acetazolamide	canrenone	furosemide
amiloride	chlormerodrin	hydrochlorothiazide
bendroflumethiazide	chlortalidone	mersalyl
benzthiazide	diclofenamide	spironolactone
bumetanide	ethacrynic acid	triamterene
και συγγενείς ενώσεις.		

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3**

Στο παράρτημα 3 περιγράφονται οι διερευνητικές διαδικασίες οι οποίες σήμερα χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο της Κολωνίας. Αυτές οι διερευνητικές διαδικασίες εφαρμόζονται — μερικές φορές με μικρές τροποποιήσεις — σ' όλα τα αναγνωρισμένα εργαστήρια απ' την IOC.

Όλα τα στάδια εκχύλισης και η λήψη παράγωγου ουσίας πραγματοποιούνται σε γυάλινους (δοκιμαστικούς) σωλήνες, 18-20 ml, αρκετά ανθεκτικούς για ν' αντέχουν σε φυγοκέντριση.

Η έκχυση στη GC γίνεται αυτόματα μ' έναν κατάλληλο εκχυτή.

Η εξάτμιση των οργανικών διαλυτικών μέσων πραγματοποιείται πάντα σ' έναν περιστρεφόμενο εξατμιστή, χρησιμοποιώντας ειδικούς συνδέσμους για τους γυάλινους (δοκιμαστικούς) σωλήνες. Τα υπολείμματα ξηραίνονται κι άλλο πριν την λήψη παράγωγου ουσίας σ' έναν αποξηραντή κενού με κόκκους πεντοξειδίου του φωσφόρου και υδροξειδίου του καλίου.

Σ' όλες τις διερευνητικές διαδικασίες χρησιμοποιείται και από μια κατάλληλη εσωτερική πρότυπη ουσία (ISTD). Η συγκέντρωση της πρότυπης ουσίας καθορίζεται σύμφωνα με τα δρια της συγκέντρωσης των ουσιών doping και των μεταβολιτών τους όπως προσδιορίζονται από μελέτες απέκκρισης σε δοκιμαζόμενους.

**3.1 Διερευνητική διαδικασία I:**

Πτητικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο

σε 5 ml ούρων προσθέτονται:

+0.5 μl 5N potassium hydroxide  
+2 ml diethylether (peroxidfree)  
+25 μg ISTD (DIPA — 12 — alkane)  
+3 g sodium sulfate

ανακάτεμα για 20 min, φυγοκέντριση  
έκχυση 1-2 ml της φάσης του αιθέρα

GC-παράμετροι:

GC/N-FID HP 5880A

στήλη: SE 54 cross linked, 16 m, 0.2 mm i.D., 0.33 μm πάχος επικάλυψης

μεταφέρον αέριο: περίπου 1 ml ήλιον στους 180°C

split: περίπου 1:10

πρόγραμμα θερμοκρασίας: 100°C, 20° C/min, 5 min στους 300°C, 320°C τελική θερμοκρασία.

**3.2. Διερευνητική διαδικασία II:**

Βαριές πτητικές ενώσεις αζώτου

σε 5 ml ούρων προσθέτονται:

+10 μg pseudo-ephedrine σαν ISTD  
+1 ml 6 N HCl  
+100 mg cysteine

θέρμανση για 30 λεπτά στους 100°C

αφού κρυώσει προσθέτονται:

+5 ml diethylether (peroxidfree)  
ανακάτωμα για 10 λεπτά

φυγοκέντριση

απομάκρυνση της στιβάδας τού αιθέρα

στην υδάτινη φάση προσθέτονται αλκάλι και ρυθμιστικό διάλυμα Βορικών 1 M  
μέχρι να επιτευχθεί ένα pH 9.6

Μετά προσθέτονται:

+1 ml tert-butanol  
+5 ml diethylether  
+3.2 g sodium sulfate

ανακάτεμα για 20 λεπτά

μεταφορά της οργανικής στιβάδας σε γυάλινο (δοκιμαστικό) σωλήνα

+1 σταγόνα TMCS στην αιθερική στιβάδα

περιστρεφόμενη εξάτμιση μέχρι ξήρανσης.

Για GC/MS: Εκλεκτική λήψη παραγώγου: TFAOH/MSTFA/MBTFA

Σχόλιο: Αυτό το κλάσμα μπορεί ν' αναλυθεί επίσης με TLC, αλλά με μικρότερη ευαισθησία.

GC/MS παράμετροι:

GC/MSD HP 5880A/HP 5970

μεταφέρον αέριο: 1 ml ήλιο στους 180°C

split: 1:10

στήλη: SE-54 cross-linked, 16 m, 0.2 mm i.D., 0.33 μm πάχος επικάλυψης

πρόγραμμα θερμοκρασίας: 100°C, 15° C/min, 2 min στους 300°C τελική θερμοκρασία

Χαρακτηριστικά ίχνη ιόντων, καταγραφόμενα στην SID:

1) Ολικά ιόντα

2) m/z 179 (mono-hydroxylated phenyl nucleus)

3) m/z 267 (bis-hydroxylated phenyl nucleus).

4) μοριακά ιόντα και μοριακά ιόντα — 15 για ναρκωτικά.

**3.3. Διερευνητική διαδικασία II:**

Τροποποίηση για την ανίχνευση των β-αναστολέων

σε 5 ml ούρων προσθέτονται:

+0.5 μg toliprolol και 0.5 μg bupranolol σαν ISTD

+1 ml 1 N ρυθμιστικό διάλυμα acetate μέχρι pH 5.2

+50 μl β-glucuronidase/arylsulfatase από την Helix Pomatia  
θέρμανση για 3 ώρες στους 55°C

αφού κρυώσει προσθέτονται:

+5 ml diethylether (peroxidfree)

ανακάτωμα για 20 min, φυγοκέντριση

Υδάτινη φάση: NaHCO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2:1) μέχρι pH 9.6

1 ml tert-butanol

+5 ml diethylether

+3 g sodium sulfate

ανακάτωμα για 20 λεπτά, φυγοκέντριση

παίρνεται η οργανική φάση σ' ένα (δοκιμαστικό) σωλήνα για ξήρανση  
(βασικό κλάσμα της δίξινου υδρόλυσης)

GC/MS: + 100 μl MSTFA + 30 μl MBTFA (εκλεκτική λήψη παραγώγου)

Σχόλιο: Αυτό το κλάσμα μπορεί ν' αναλυθεί επίσης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος  
αλλά με μικρότερη ευαισθησία.

GC/MS παράμετροι:

GC/MS HP 5996B

στήλη: SE 54 cross-linked, 16 m, 0.2 mm i.D., 0.33 mm πάχος επικάλυψης

μεταφέρον αέριο: περίπου 1 ml υδρογόνο στους 180°C

split: 1:10

πρόγραμμα θερμοκρασίας: 140°C, 20° C/min, 2 min στους 320°C τελική θερμοκρασία

Χαρακτηριστικά ίχνη:

86 δείχνει μια ομάδα tert-butylamino

284 δείχνει μια ομάδα 2-hydroxypropyl-isopropyl-amino

224 δείχνει Nifenalol

344 δείχνει Sotalol

292 δείχνει Labetalol

235 δείχνει Carteolol

**3.4. Διερευνητική διαδικασία III:**

pemoline, caffeine και corticosteroids

σε 5 ml ούρων προσθέτονται:

+25 μg ethyltheophyllin και 2 μg betamethasone σαν ISTD

+NaHCO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2:1, WW.) solid buffer, pH 9.6

+5 ml n-pentane

ανάδευση, φυγοκέντριση, απομάκρυνση στιβάδας n-pentane

+7 ml diethylether, ανάδευση, φυγοκέντριση

ξήρανση της οργανικής φάσης

υπόλειμμα + 50 ml CH<sub>3</sub>OH

έκχυση 20 μl  
στήλη: RP 18, 7 μm, 10 cm με προστήλη  
στάδια 0-2.2 min: 100% H<sub>2</sub>O/0 % CH<sub>3</sub>CN  
-3.0 min: 80% H<sub>2</sub>O/20% CH<sub>3</sub>CN  
3.0 min: ενεργοποίηση στήλης  
-16.5 min: 30% H<sub>2</sub>O/70% CH<sub>3</sub>CN  
μήκος κύματος: 220 nm/273 nm/245 nm  
ροή: 1 ml/min

### 3.5. Αναθολικά στεροειδή - σύντομη περιγραφή IV:

σε 5 ml ούρων προσθέτονται:  
+50 ng stanozolol σαν ISTD για ελεύθερα στεροειδή  
προσρόφηση σε XAD-2- pasteur pipette, γυάλινη σφαίρα  
ξεπλένουμε με νερό  
έκπλυση 3 φορές με 0.5 ml methanol

**1) απομόνωση του κλάσματος των ελεύθερων στεροειδών:**  
παίρνεται το XAD-2, έκπλυμα μέχρι ξήρανσης  
+1 ml sodium phosphate buffer 0.2 M, pH7  
+5 ml αιθέρας  
ανακάτωμα, 5 min, φυγακέντριση  
παίρνεται το εκχύλισμα του αιθέρα για ξήρανση:ελεύθερα στεροειδή  
ξηρό υπόλειμμα:  
+0.025-0.1 ml MSHFB: TMS-IMIDAZOL. TMSCl (100:2:5, V:V:V)  
θέρμανση για 5 min στους 80°C  
+0.01 ml MBHFB, θέρμανση για 20 min στους 80°C

GC/MS παράμετροι:  
GD/MSD HP 5890/HP 5970  
μεταφέρον αέριο: 1 ml ήλιο σε 180°C.  
split: 1:10  
στήλη: περίπου 15 m FS-cap OV 1 ή SE 54 resp., 0.2 mm i.D., 0.11 ή 0.33 mm φιλμ  
επικάλυψης resp.  
πρόγραμμα θερμοκρασίας: 200°C, 40° C/min, 3 min 320°C τελική θερμοκρασία  
SIM απόκτηση:  
1 ομάδα 15 ιόντων στα m/z 209, 281, 308, 315, 317, 321, 460, 552, 581, 594,  
596, 642, 669, 684  
χρόνος διαμονής (dwell): 20 msec το καθένα  
χρόνος απόκτησης: 2.7 με 5.2 min

### 2. απομόνωση του συζυγούς κλάσματος:

υδάτινη φάση, προσθέτονται 200-1.000 ng methyltestosterone σαν ISTD  
+0.025 ml beta-glucuronidase από E. coli  
υδρόλυση 1 h σε 50°C  
+potassium carbonate (pH 9-10)  
+5 ml αιθέρα  
+1 g sodium sulfate προστιθέμενο κατά την ανάδευση  
μετά παραμονή 10 min φυγακέντριση  
απομακρύνεται η φάση αιθέρα και παίρνεται για ξήρανση

Ειρό υπόλειμμα:

a) enol-TMS-ether

+0.025-0.1 ml MSTFA:TMSJ (1000:2) + 1% cysteine ή dithioerythritol  
θέρμανση για 15 min στους 60°C

6) TMS-ether

+0.025-0.1 ml MSTFA:TMSCL (100:1, V:V)  
θέρμανση για 5 min στους 60°C

GC/MS παράμετροι:

GC/MS HP 5996B

μεταφέρων αέριο: 1 ml υδρογόνο σε 180°C

split 1:10

στήλη: 15 M FS-cap. OV-101 cross-linked, 0.2 mm i.D., 0.11 mm πάχος  
επικάλυψης

πρόγραμμα θερμοκρασίας: 180°C, 4° C/min, 224° C, 15° C/min, 300°C

Οι συνθήκες της GC/MS συνιστάται να προσαρμόζονται στην εκάστοτε απόδοση της στήλης.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cartoni, G.P., F. de Stefano «Determination of amphetamines by gas chromatography. Urinary excretion of amphetamines in rat and man» Ital. J. Biochem. 12 (1963) 296.
2. Beckett, A., G.T. Tucker and A.C. Moffat «Routine detection and identification in urine of stimulants and other drugs, some of which may be used to modify performance in sport» J. Pharm. Pharmacol 19 (1967) 273.
3. Donike, M. «Stickstoffdetektor und temperaturprogrammierte Gas-Chromatographie, ein Fortschritt für die routinemäßige Dopingkontrolle» Sportarzt und Sportmedizin, 21 (1970) 27.
4. Donike, M., L. Jaenicke, D. Stratmann und W. Hollmann «Gas-chromatographischer Nachweis von stickstoffhaltigen Pharmaka in wässrigen Lösungen mit dem Stickstoffdetektor» J. Chromatogr., 52 (1970) 237.
5. Donike, M. «N-Trifluoracetyl-O-trimethylsilyl-phenolalkylamine: Darstellung und massenspezifischer gas-chromatographischer Nachweis im Femtomol-Bereich» J. Chromatogr., 103 (1975), 91.
6. Donike, M., K. -R. Bärwald, V. Christ, G. Opfermann, G. Sigmund, J. Zimmermann und W. Schänzer «Screening Procedure in Doping Control» in: Ljungqvist, A., P. Peltokallio, H. Tikkanen (Eds.): «Sports Medicine in Track & Field Athletics». Lehtikanta Oy, Kouvola (1985) 117-130.
7. Donike, M. und W. Giedsdorf «Die quantitative Mandelsäure-Bestimmung als Indikator für den Pemolin-Mißbrauch» Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 29 (1978) 4.
8. Cartoni, G.P., M. Ciardi, A. Giarrusso, F. Rosati «Reversed-phase high-performance liquid chromatographic detection of pemoline in dope control» J. Chromatogr., 202 (1980) 131-133.
9. Donike, M. «Zum Problem des Nachweises der anabolen Steroide: Gas-chromatographische und massenspezifische Möglichkeiten» Sportarzt und Sportmedizin, 1 (1975) 1.
10. Brooks, R. V., R.G. Firth and N.A. Summer «Detection of anabolic steroids by radio immuno assay» Brit. J. Sports Med., 9 (1975) 89.
11. Dugal, R., R. Massé and M. Bertrand «GC-MS approach for the detection and characterisation of anabolic steroids and their metabolites in biological fluids at major international sporting events» in: P. Nijs (Ed.): Sport en Doping. Farmaceutisch Tijdschrift voor België, 55 (1978), 55-83.
12. Rogozkin, V. «Anabolic steroids and sports» in: P. Nijs (Ed.): Sport en Doping. Farmaceutisch Tijdschrift voor België, 55 (1978) 151-162.

13. Donike, M., J. Zimmermann, K.-R. Bärwald, W. Schänzer, V. Christ, K. Klostermann und G. Opfermann «Routinebestimmung von Anabolika in Harn» Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 35 (1984) 14-24.
14. Donike, M. «N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide» J. Chromatogr., 42 (1969) 103.
15. Donike, M. «Acylierung mit Bis (Acylamiden) N-Methyl-bis (trifluoracetamid) und Bis (trifluoracetamid), zwei neue Reagenzien zur Trifluoracetylierung» J. Chromatogr., 78 (1973) 273.
16. Donike, M. «Flüchtige Carbonsäuren als Lösungsmittel für die Trimethylsilylierung von polaren Verbindungen» J. Chromatogr., 85 (1973) 1.
17. Donike, M. «Control of trimethylsilylation potential and trimethylsilylation capacity by the use of colour indicators» J. Chromatogr., 115 (1975) 591.
18. Donike, M. und J. Zimmermann «Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl-, und tert. - Butyldimethylsilyl-enolethern von KetostEROiden für gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen» J. Chromatogr., 202 (1980) 483.
19. Schänzer, W. et al. «Stanozolol - Identification of Urinary Metabolites». (in press).

\* Η παρούσα εργασία μεταφράστηκε από το πρωτότυπο κείμενο του συγγραφέως που παρουσιάστηκε από τον E. Nolteernsing, στο Συμπόσιο Αθλητικής Επιστήμης στις 31/10/87 στην Κολωνία και είναι αδημοσίευτη. Η ίδια εργασία παρουσιάστηκε από τον καθηγητή M. Donike στο Παγκόσμιο Συμπόσιο για Doping στον Αθλητισμό στις 10-12 Μαΐου 1987 στη Φλωρεντία.

---

**ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ:** Α. ΝΤΑΝΗΣ  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ  
ΕΡΓΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ,  
ΤΕΦΑΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΟΛΓΑΣ 41, ΔΑΦΝΗ  
172 37 ΑΘΗΝΑ

---

---

**ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ:** Prof. MANFRED DONIKE  
D.S.H.S INSTITUTE FOR BIOCHEMISTRY  
CARL-DIEM-WEG 6  
P.O BOX 450 327  
5000 COLOGNE 41  
FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

---