VALITTUJEN ANABOLISTEN STEROIDIEN FAASIN I METABOLIAN JÄLJITTELY TITAANIDIOKSIDIVALOKATALYYTTISILLÄ HAPETUSREAKTIOILLA

Minna Valkonen
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmaseuttisen kemian osasto

Toukokuu 2013

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty	Laitos/Institution– Department	
Farmasian tiedekunta	Farmaseuttisen kemian osasto	
Tekijä/Författare – Author		
Minna Valkonen		
Työn nimi / Arbetets titel – Title		
Valittujen anabolisten steroidien faasin I metabolian jäljittely titaanidioksidivalokatalyyttisillä hapetusreaktioilla		
Oppiaine /Läroämne – Subject		
Farmaseuttinen kemia		
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Pro gradu	Toukokuu 2013	80 + lyhenneluettelo + liitteet (5)

Tiivistelmä/Referat – Abstract

Erikoistyön tarkoituksena oli tutkia, voidaanko titaanidioksidivalokatalyyttisillä (TiO_2) hapetusreaktioilla jäljitellä valittujen anabolisten steroidien faasin I metaboliaa. Lisäksi tutkittiin liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutusta lähtöaineen vähenemiseen ja hapetustuotteiden muodostumiseen. Muutamissa lääkeaineita koskevissa tutkimuksissa on TiO_2-valokatalysoiduissa reaktioissa osoitettu tapahtuvan pääosin samoja reaktioita kuin faasin I metaboliassa *in vitro* ja *in vivo*. Tässä työssä tutkittavat yhdisteet olivat testosteroni, metyylitestosteroni, metandienoni, nandroloni ja stanotsololi. TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneitä tuotteita verrattiin humaanimikrosomi-inkubaatioissa (HLM) muodostuneisiin tuotteisiin niiden massojen, retentioaikojen ja tuoteionispektrien avulla. Näytteet analysoitiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (UPLC) ja kvadrupoli-lentoaikamassaspektrometrillä (Q-TOF). Ionisaatiomenetelmänä oli kaasuvirtausavusteinen sähkösumutusionisaatio (ESI) positiivi-ionimoodissa ja tuoteionispektrit ajettiin kahdella eri törmäysenergialla.

TiO_2-valokatalyyttinen reaktio on yksinkertainen ja nopea menetelmä. Kaikilla tutkituilla steroideilla tapahtui sekä HLM-inkubaatioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa samoja reaktioita, joista tärkeimmät olivat dehydrogenaatio, hydroksylaatio sekä näiden yhdistelmä. Yleensä syntyi useita samanmassaisia isomeerejä, joista osalla oli sama retentioaika molemmissa reaktioissa. Stanotsololin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi lisäksi dihydroksylaatio- ja dihydroksylaatio + dehydrogenaatiotuotteita mutta eri isomeereinä. Samaan aikaan eluoituneiden isomeerien tuoteionispektrit olivat pääosin samanlaisia mutta toisinaan tuoteionispektrin heikko intensiteetti aiheutti piikkien intensiteettisuhteissa vaihtelua ja lisäsi näin ollen tulkinnan epävarmuutta.

TiO_2-valokatalyysi sopisi mahdollisesti mikrosirulle sovellettuna nopeaan, seulontatyyppiseen tutkimukseen. HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyvien hydroksylaatiotuotteiden stereokemiassa on kuitenkin eroja, jonka vuoksi TiO_2-valokatalyysin soveltuvuutta metabolian jäljittelemiseen olisi tutkittava lisää ja mahdollisuuksia kehittää TiO_2-valokatalyyttisen reaktion selektiivisyyttä stereokemian suhteen olisi myös tutkittava. Mikäli TiO_2-valokatalyysissä syntyviä tuotteita voitaisiin tuottaa suurempia määriä, voitaisiin menetelmän avulla tuottaa standardiyhdisteitä eri käyttötarkoituksiin, esimerkiksi dopinglaboratorioiden käyttöön.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Anabolinen steroidi, titaanidioksidivalokatalyysi, faasin I metabolia, testosteroni, metyylitestosteroni, metandienoni, nandroloni, stanotsololi

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Farmaseuttisen kemian osasto

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

Ohjaaja: Miina Ruokolainen

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty	Laitos/Institution– Department	
Faculty of Pharmacy	Division of Pharmaceutical Chemistry	
Tekijä/Författare – Author		
Minna Valkonen		
Työn nimi / Arbetets titel – Title		
Imitation of phase I metabolism of selected anabolic steroids by titaniumdioxide photocatalysis		
Oppiaine /Läroämne – Subject		
Pharmaceutical Chemistry		
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Pro gradu	May 2013	80 + abbreviations + appendix (5)

Tiivistelmä/Referat – Abstract

The aim of this work was to investigate the feasibility of titanium dioxide (TiO_2) photocatalysis for imitation of phase I metabolism of selected anabolic steroids. The role of the solvent composition and the time of UV exposure in the TiO_2 photocatalysis were also investigated.

TiO_2 photocatalysis has been reported to produce mainly the same phase I reaction types formed in drug metabolism *in vitro* and *in vivo*. The selected anabolic steroids were testosterone, methyltestosterone, metandienone, nandrolone and stanozolol. Products from TiO_2 photocatalysis were compared to products formed in microsomal incubations (HLM). Comparison was made on the basis of same mass, retention time and similarity of the product ion spectra. The samples were analyzed with ultra performance liquid chromatography (UPLC) and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF). Electrospray ionization (ESI) in positive ion mode was used for ionization and product ion scan with two different collision energy was used for collision induced dissociation of the steroids and the reaction products.

TiO_2 photocatalysis is a simple and fast method. For all the steroids studied, the main reactions observed both in TiO_2 photocatalysis and microsomal incubations were dehydrogenation, hydroxylation and combination of these two. Several isomers with same mass and retention time were formed. In addition, dihydroxylation and dihydroxylation+dehydrogenation products of stanozolol were observed both in TiO_2 photocatalysis, but these were different isomers in different systems. In most cases the product ion spectra of isomers with same retention time were similar but the weak intensity of some peaks caused uncertainty in the interpretation of spectra.

TiO_2 photocatalysis might be useful in fast screening of possible drug metabolites. However the feasibility of TiO_2 photocatalysis needs to be further studied because the differences in stereochemistry in TiO_2 photocatalysis and microsomal incubations. If TiO_2 photocatalytic reactions can be scaled up, it might be possible to produce standard compounds for example for doping laboratories.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords
Anabolic steroid, titanium dioxide photocatalysis, phase I metabolism, testosterone, methyltestosterone, metandienone, nandrolone, stanozolol

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited
Division of Pharmaceutical Chemistry

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information
Supervisor: Miina Ruokolainen

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENNELUETTELO

1 JOHDANTO 1
1.1 Anaboliset androgeeniset steroidit 1
1.1.1 Anabolisten steroidien faasin I metabolia *in vivo* 3
1.1.2 Anabolisten steroidien faasin I metabolian tutkiminen *in vitro* 11
1.2 Titaanidioksidivalokatalyysi 14
1.2.1 Titaanidioksidivalokatalyysin periaate 14
1.2.2 Titaanidioksidivalokatalyysin sovelluksia 17
1.2.3 Titaanidioksidivalokatalyysi lääkeaineiden faasin I metabolian tutkimisessa 18
1.3 Erikoistyön tarkoitus 19
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT 21
2.1 Aineet ja reagenssit 21
2.2 Näytteiden valmistus ja esikäsittely 22
2.2.1 Titaanidioksidinäytteiden valmistus 22
2.2.2 Humaanimikrosominäytteiden valmistus 22
2.2.3 Kiinteäfaasiuutto 23
2.3 Laitteistot 24
2.3.1 Nestekromatografia 24
2.3.2 Massaspektrometria 26
3 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU 27
3.1 Liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutus titaanidioksidivalokatalyyttiseen reaktioon 27
3.2 Titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa ja mirkosomi-inkubaatioissa syntyvät tuotteet ja niiden vertailu 30
3.2.1 Testosteroni 32
3.2.2. Metyylitestosteroni 37
3.2.3 Metandienoni 44
3.2.4 Nandroloni 49
3.2.5 Stanotsololi 53
3.2.6 Yhteenveto tutkittujen steroidien titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa ja mikrosomi-inkubaatioissa syntyneistä tuotteista ja niiden vertailusta 58
3.3 Käytettyjen menetelmien toimivuus 61
3.3.1 Kiinteäfaasiuutto 61
3.3.2 Nestekromatografisen menetelmän toistettavuus 62
3.3.3 Samanmassaisten reaktiotuotteiden isomeerien resoluutio 66
3.3.4 Lukkomassan vaikutus tarkkaan massaan 68
3.3.5 Tuoteionien intensiteettisuhteiden vaihtelu tuoteionispektreissä 69
4 JOHTOPÄÄTÖKSET 72
5 KIRJALLISUUSLUETTELO 74

LIITTEET

LIITE 1: Testosteronin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa

LIITE 2: Metyylitestosteronin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa

LIITE 3: Metandienonin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa

LIITE 4: Nandrolonin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa

LIITE 5: Stanotsololin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa

LYHENNELUETTELO

AAS	anabolinen androgeeninen steroidi
ACN	asetonitriili
CB	johtuvuusvyö
CE	törmäysenergia
C=O	karbonyyliryhmä
CO_2	hiilidioksidi
CYP-entsyymi	sytokromi P450-entsyymi
e^-	elektroni
EC	elektrokemiallinen reaktio
EC-Fenton	elektrokemiallisesti avustettu Fenton-reaktio
E. coli	*Escherischia coli*
ESI	kaasuvirtausavusteinen sähkösumutuionisaatio
GC	kaasukromatografia
h^+	virittyneen elektronin jättämä elektronivaje, aukko
H^+	protoni
H_2	vetykaasu
HLM	ihmisen maksan mikrosomi
H_2O	vesimolekyyli
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
Ka	keskiarvo
LC	nestekromatografia
LLE	neste-neste –uutto
mDa	millidalton
MS	massaspektrometria
MS/MS	tandemmassaspektrometria
m/z	massan ja varauksen suhde
NADPH	nikotiinihappoamidiadeniinidinukleotidivetyfosfaatti
$NADP^+$	hapettunut nikotiinihappoamidiadeniinidinukleotidivety-fosfaatti
O_2	happimolekyyli

$\cdot O_2^-$	superoksidianioni
OH^-	hydroksidi-ioni
·OH	hydroksyyliradikaali
ppm	miljoonasosa (parts per million)
Q-TOF	kvadrupoli-lentoaikamassaspektrometri
RH	substraatti
ROH	hapettunut substraatti
Rs	resoluutio
RDS	suhteellinen keskihajonta
SD	keskihajonta
SPE	kiinteäfaasiuutto
SRM	valittujen reaktioiden seuranta
TI	tuoteioni
TIC	kokonaisionikromatogrammi
TiO_2	titaanidioksidi
TOF	lentoaikamassaspektrometri
t_R	retentioaika minuutteina
UPLC	erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia
UV	ultravioletti
VB	valenssivyö
WADA	Maailman antidopingtoimisto(World Anti-Doping Agency)
wb_1, wb_2	piikin kannan leveys kromatogrammissa
WO_3	volframioksidi
XIC	eristetty ionikromatogrammi
ZnO	sinkkioksidi

STEROIDIEN LYHENTEITÄ

T	testosteroni, (17β-hydroksiandrost-4-een-3-oni)
MT	metyylitestosteroni,(17β-hydroksi-17α-metyyliandrost-4-een-3-oni)
MDN	metandienoni, (17β-hydroksi-17α-metyyliandrosta-1,4-dieen-3-oni)
NAN	nandroloni, 17β-hydroksiestr-4-een-3-oni
STZ	stanotsololi, 17β-hydroksi-17α-metyyli-5α-androst-2-eno[3,2-*c*]pyratsoli
androsteenidioni	4-androsteeni-3,17-dioni
androsteroni	3α-hydroksi-5α-androstaani-17-oni
epiandrosteroni	3β-hydroksi-5α-androstaani-17-oni
etiokolanoloni	3α-hydroksi-5β-androstaani-17-oni
5α-dihydrotestosteroni	17β-hydroksi-5α-androstaani-3-oni
5β-dihydrotestosteroni	17β-hydroksi-5β-androstaani-3-oni

1 JOHDANTO

1.1 Anaboliset androgeeniset steroidit

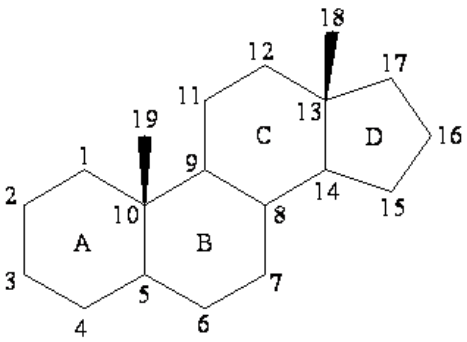
Testosteroni on elimistön pääasiallinen anabolinen steroidi ja sitä muodostuu ihmiskehossa kolesterolista.[1] Testosteronin biosynteesi tapahtuu miehillä pääasiassa kivesten Leydingin soluissa kun taas naisilla lisämunuais- ja munasarjaperäiset androgeenit ovat ainoa testosteronin lähde.[2] Anaboliset, androgeeniset steroidit (AAS) ovat testosteronin synteettisiä johdannaisia, joiden avulla on pyritty lisäämään anabolisia ja vähentämään androgeenisia vaikutuksia.[1] Anabolisia steroideja voidaan käyttää tiettyjen sairauksien hoitoon, kuten eri syistä johtuvan testosteronin vajaatuotannon, vaikeiden katabolisten tilojen tai joidenkin anemioiden hoitoon. Anabolisia steroideja käytetään myös urheilussa dopingaineena, siitäkin huolimatta, että ne ovat Maailman antidopingtoimiston (WADA) kiellettyjen aineiden listalla.[3]

Anabolisten steroidien reseptoreita on ympäri kehoa, joten steroidien vaikutuksetkin ulottuvat laajalle alueelle.[4] Toivottuja anabolisia vaikutuksia ovat muun muassa fyysisen suorituskyvyn ja erityisesti lihaskunnon kohentaminen. Anabolisten steroidien käyttöön liittyy kuitenkin lukuisia haittoja. Hormonaaliset häiriöt ovat tavallinen seuraus elimistön oman hormonituotannon heikkenemisestä.[1] Lisäksi hormoneja tuottavissa rauhasissa ja elimissä, kuten kiveksissä, tapahtuu rakenteellista surkastumista ja seurauksena voi olla hedelmättömyyttä ja seksuaalitoimintojen heikkenemistä.[1,4] Naisille testosteroni ja anaboliset steroidit aiheuttavat runsaasti sukupuoliominaisuuksiin ja -hormoneihin liittyviä sivuvaikutuksia kuten maskuliinisia piirteitä, iho-ongelmia sekä kuukautiskierron häiriöitä.[1] Kasvuikäisillä nuorilla kasvu saattaa pysähtyä, josta voi seurata lyhytkasvuisuutta.

Anabolisten steroidien käyttö voi aiheuttaa myös vakavia sairauksia ja mielialahäiriöitä. Jatkuva steroidien käyttö lisää muun muassa sydän- ja verisuonitautien riskiä sekä altistaa rytmihäiriöille ja äkkikuolemalle.[5] Steroidien käyttö lisää myös diabetesriskiä sekä muun muassa maksavaurioiden riskiä.[4] Anabolisilla steroideilla on vaikutuksia myös keskushermostoon. Steroidien vaikutuskohdat aivoissa ovat läheisessä yhteydessä muun

muassa mielialaa säätteleviin keskuksiin ja steroidien käyttäjillä on havaittu esiintyvän enemmän poikkeavia persoonallisuuden piirteitä, kuten masentuneisuutta ja aggressiivista käytöstä.[6-7]

Steroidin rakenne on helppo tunnistaa sen poolittomasta nelirenkaisesta rungosta, perhydrosyklopentenofenantreenista (Kuva 1).[8] Kaikki luonnolliset ja synteettiset steroidit ovat tämän rengasrakenteen johdoksia.[9] Steroideilla ei yleensä ole rakenteessaan kovin emäksistä tai hapanta osaa, mutta lähes kaikilla luonnollisilla steroideilla on happea sisältävä funktionaalinen ryhmä hiilessä C3.[9-10] Funktionaalinen ryhmä on tavallisesti joko hydroksyyliryhmä (OH) α- tai β-asemassa, karbonyyli (C=O) tai fenoli, kuten estrogeeneillä. Lisäksi anabolisilla steroideilla on tavallisesti hiilessä C17 hydroksyyli- tai karbonyyliryhmä.[9] Myös muissa hiilissä voi olla jokin funktionaalinen ryhmä.

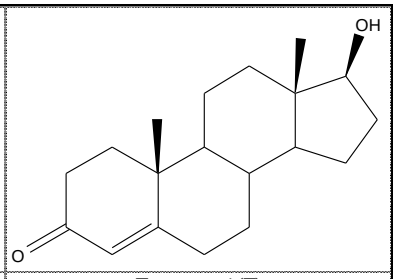
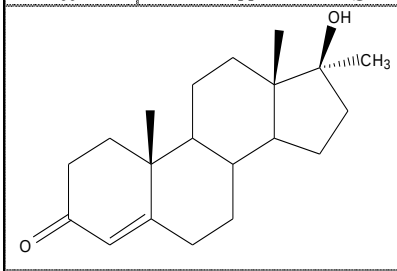
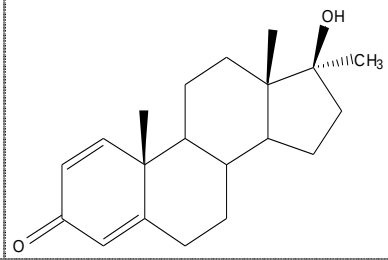
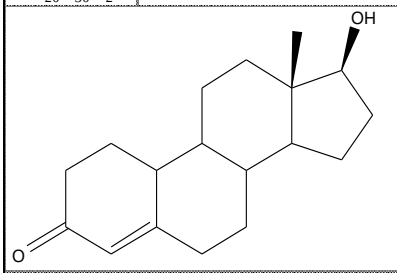
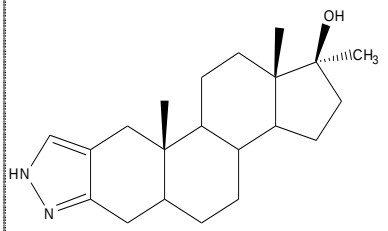


Kuva 1. Steroidin runkorakenne

Testosteroni ei oraalisesti tai parenteraalisesti annosteltuna ole tehokas vaan se metaboloituu elimistössä nopeasti.[8] Anabolisten steroidien oraalista aktiivisuutta onkin pyritty parantamaan annostelemalla ne estereinä tai kemiallisesti muokattuina. Esimerkiksi hiilen C17 α-asemaan voidaan lisätä metyyli- tai etyyliryhmä.[8,11] Tällaisia steroideja ovat muun muassa metyylitestosteroni, metandienoni ja stanotsololi. Metandienonin kaksoissidos hiilien C1 ja C2 välissä, nandrolonilla metyyliryhmän korvaaminen vedyllä hiilessä C19 tai stanotsololilla typpeä sisältävän pyratsolirenkaan liittäminen steroidin A-renkaaseen ovat muita esimerkkejä tavoista, joilla on hidastettu steroidien metaboliaa elimistössä.[8] Tässä erikoistyössä tutkittavat yhdisteet ovat testosteroni, metyylitestosteroni, metandienoni, nandroloni ja stanotsololi, joiden

rakennekaavat, triviaalinimet, erikoistyössä käytetyt lyhenteet, molekyylikaavat ja monoisotooppiset massat on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Testosteronin, metyylitestosteronin, metandienonin, nandrolonin ja stanotsololin rakennekaavat, triviaalinimet, erikoistyössä käytetyt lyhenteet, molekyylikaavat sekä monoisotooppiset massat.

Rakennekaava			
Tutkittava yhdiste (käytetty lyhenne)		Testosteroni (T)	
Molekyylikaava	Monoisotooppinen massa (g/mol)	$C_{19}H_{28}O_2$	288,2089
			
Metyylitestosteroni (MT)		Metandienoni (MDN)	
$C_{20}H_{30}O_2$	302,2246	$C_{20}H_{28}O_2$	300,2089
			
Nandroloni (NAN)		Stanotsololi (STZ)	
$C_{18}H_{26}O_2$	274,1933	$C_{21}H_{32}N_2O$	328,2514

1.1.1 Anabolisten steroidien faasin I metabolia *in vivo*

Useimmat anaboliset steroidit metaboloituvat elimistössä runsaasti ja metaboloitumatonta lähtöainetta tavataan harvoin erittyneenä virtsasta ja silloinkin erittäin lyhyen aikaa annostelun jälkeen.[8] Siksi esimerkiksi dopinglaboratorioissa steroidien käytön havaitsemiseksi pyritään tunnistamaan metaboliitteja.

Metabolia jaetaan pääsääntöisesti faasin I ja faasin II metaboliaan. Faasin I reaktiot ovat entsymaattisesti katalysoituja reaktioita, jotka yleensä muuttavat yhdistettä polaarisemmaksi ja funktionalisoivat sen faasin II reaktioita varten.[8] Yleisimmät faasin I reaktiot ovat hapetus, pelkistys ja hydrolyysi. Elimistössä näitä reaktioita katalysoivat suurelta osin sytokromi P450- entsyymit.

Sytokromi P450-entsyymit (CYP-entsyymit) ovat metabolian kannalta keskeisiä, koska ne katalysoivat muun muassa lääkeaineiden, kemikaalien ja endogeenisten aineiden hapetus- ja pelkistysreaktioita.[12] Kaikki CYP-entsyymit ovat mono-oksigenaaseja eli ne katalysoivat yhden happiatomin siirtymistä molekulaarisesta hapesta (O_2) substraattiin.[13] Toisen happiatomin pelkistämiseen vedeksi tarvitaan kaksi elektronia, jotka saadaan koentsyymiltä, nikotiinihappoamidiadeniinidinukleotidivetyfosfaatilta (NADPH). CYP-entsyymien katalysoiman hapettumisen perusreaktio on esitetty yhtälössä 1, missä RH on substraatti ja ROH hapettunut substraatti.

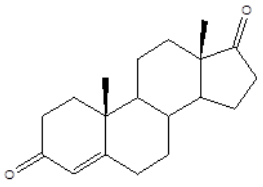
$$NADPH + H^+ + O_2 + RH \rightarrow NADP^+ + H_2O + ROH \qquad (1)$$

Nisäkkäillä lähes joka kudoksesta löytyy CYP-entsyymejä mutta eniten niitä on maksassa, missä pääosa anabolisten steroidienkin metaboliasta tapahtuu.[12] Yli 500 CYP-entsyymiä on jaoteltu 74 perheeseen. Ihmisessä esiintyy 14 entsyymiperhettä, joista ainakin CYP1A, CYP2C ja CYP3A katalysoivat sekä endogeenisten että eksogeenisten steroidien hydroksylaatioita eri asemiin.[14-15] CYP2C ja CYP3A4 kattavat noin 50 % kaikista CYP-entsyymeistä, joita maksan mikrosomeissa esiintyy ja steroidien katabolian kannalta eräs tärkein CYP-entsyymi on CYP3A4.[12]

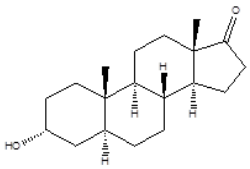
Faasin II metaboliareaktioissa steroidin tai sen metaboliitin funktionaaliseen ryhmään liittyy toinen molekyyli, yleensä glukuronihappo tai sulfonaattiryhmä.[8] Siksi faasin II reaktioita kutsutaan myös konjugaatioreaktioiksi ja myös ne ovat entsymaattisesti kontrolloituja. Glukuronihappo- ja sulfaattikonjugaatti ovat hyvin polaarisia yhdisteitä, jotka erittyvät elimistöstä helposti. Useat steroidit erittyvät konjugaatteina mutta esimerkiksi monet metandienonin metaboliitit erittyvät konjugoitumattomina, ns. vapaina, yhdisteinä.

Testosteroni

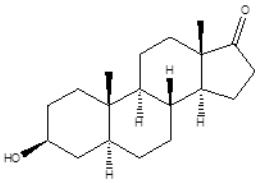
Testosteronin faasin I metabolia on laaja ja tärkeimmät testosteronin metaboliareitit ovat hiilen C17 hapettuminen, A-renkaan kaksoissidoksen pelkistyminen sekä hiilen C3 pelkistyminen.[8] Suurin osa tunnetuista metaboliiteista muodostuu näitä reittejä tai näiden yhdistelmiä pitkin. Testosteronin, kuten muidenkin 17β-OH-steroidien eräs hyvin tunnettu metaboliareitti on entsymaattinen hapettuminen 17β-OH-steroidi-dehydrogenaasin avulla. Reaktiossa muodostuvat 17-ketosteroidit, esimerkiksi androsteenidioni, ovat testosteronin päämetaboliitteja. Androsteenidioni ja testosteronin muita ihmisellä esiintyviä metaboliitteja on esitetty kuvassa 2 (I-XII).



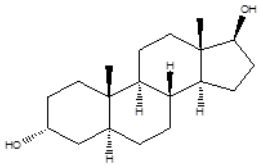
androsteenidioni
(I)



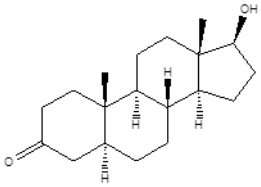
androsteroni
(II)



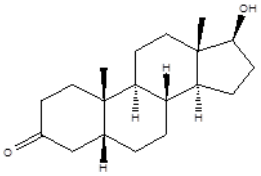
epiandrosteroni
(III)



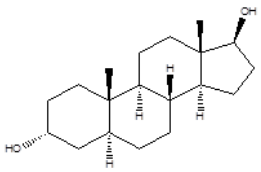
5α-androstaani-
3α,17β-dioli (IV)



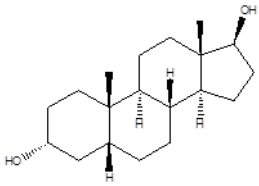
5α-dihydrotestosteroni
(V)



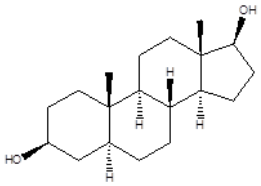
5β-dihydrotestosteroni
(VI)



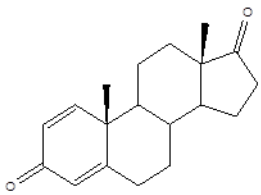
5α-androstaani-
3α,17β-dioli (VII)



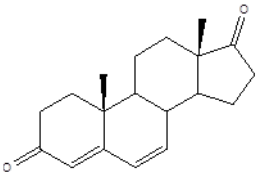
5 β-androstaani-
3α,17β-dioli (VIII)



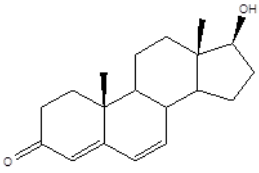
5α-androstaani-
3β,17β-dioli (IX)



1,4-androstadieeni-
3,17,dioni (X)



4,6-androstadieeni-
3,17,dioni (XI)



17b-hydroksi-4,6-
androstadieeni-3-oni (XII)

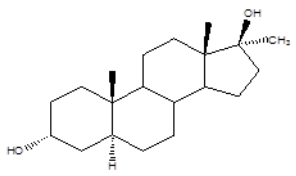
Kuva 2. Testosteronin metaboliitteja.

Testosteronin metaboliassa on havaittu tapahtuvan myös muun muassa hydroksylaatioita eri kohtiin mutta näitä yhdisteitä erittyy virtsaan vain vähäisiä määriä.[8] Analyysimenetelmien kehittymisen myötä myös uusia, aiemmin raportoimattomia metaboliitteja on löydetty *in vivo* (Kuva 2, X-XII).[16]

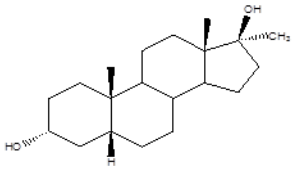
Metyylitestosteroni

Metyylitestosteronin faasin I päämetaboliareitit ovat A-renkaan kaksoissidoksen pelkistyminen ja hiilen C3 karbonyyliryhmän pelkistyminen.[8] Ihmisellä esiintyy kaksi päämetaboliittia (Kuva 3), joista β-isomeeriä erittyy virtsaan enemmän.[17] Vastaavia epimeerejä syntyy myös mutta niiden määrät ovat vähäisiä.[8] Neste- ja kaasukromatografisia menetelmiä massaspektrometriaan yhdistettynä (LC-MS/MS, GC-MS) on hyödynnetty ja detektoitu myös kaksi muuta metyylitestosteronin metaboliittia, joista toinen on hapetustuote, dehydrogenoitunut yhdiste, joka syntetisoidun vertailuyhdisteen avulla varmistettiin 6-eeni-epimetyylitestosteroniksi.[18]

Hevosilla on metyylitestosteronin metaboliassa todettu A-renkaan kaksoissidoksen pelkistymisen ja hiilen C3 karbonyyliryhmän pelkistymisen lisäksi tapahtuvan hiilen C17 epimerisaatio, hiilien C15 ja C16 hydroksylaatiot ja lisäksi hydroksylaatiot todennäköisesti hiiliin C6 ja C11.[19] Metyylitestosteronin hydroksyloituneita metaboliatuotteita on löydetty useilta muiltakin eläinlajeilta kuten esimerkiksi hiehoilta.[20-22]



17α-metyyli-
5α-androstaani-3α,17β-dioli



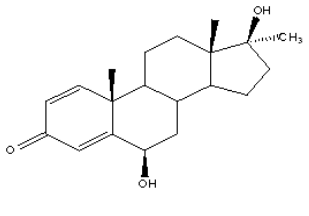
17α-metyyli-
5β-androstaani-3α,17β-dioli

Kuva 3. Metyylitestosteronin päämetaboliitit.

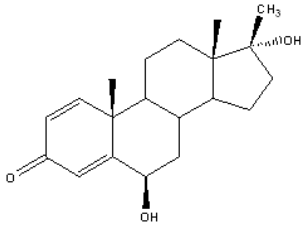
Metandienoni

Steroideilla, joilla A-renkaan metabolia on hidastunut tai estynyt esimerkiksi ylimääräisen kaksoissidoksen vuoksi, 6β-hydroksylaatio on tärkeä metaboliareitti. Näin on myös metandienonilla, jonka päämetaboliitti on 6β-OH-metandienoni (Kuva 4, I).[8] Metaboliitti erittyy konjugoitumattomana mutta hydroksyloituu ilmeisesti edelleen hiilistä C12 ja C16, jolloin syntyy dihydroksylaatiotuotteita (Kuva 4, III-VI). [23] 16-OH-metandienoni esiintyy sekä α- että β-muodossa (IV-VI) kun taas hiilen C12 hydroksylaation stereokemiaa ei tunneta (III).[8]

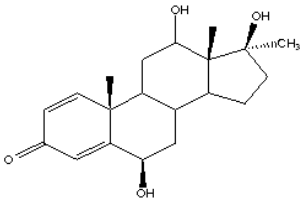
6β-OH-metandienonin lisäksi useat muutkin metandienonin metaboliitit erittyvät konjugoitumattomina, esimerkiksi 17-epimetandienoni (Kuva 4, VII), joka syntyy 17β-sulfaattimetaboliitin (VIII) uudelleenjärjestäytymisen kautta.[8,17] Myös useita A-renkaan pelkistymisen seurauksena syntyneitä metaboliitteja on tunnistettu (IX-XI).[23] Joitakin metaboliitteja on mahdollista havaita pitkän ajan kuluttua annostelusta (XII-XIII).[8]



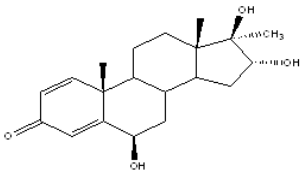
6β-hydroksimetandienoni
(I)



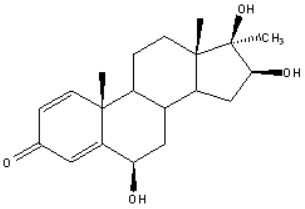
6β-hydroksi-
17-epimetandienoni (II)



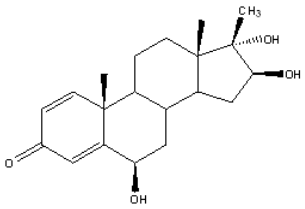
6β, 12-dihydroksimetandienoni
(III)



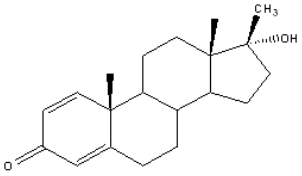
6β,16α-dihydroksimetandienoni
(IV)



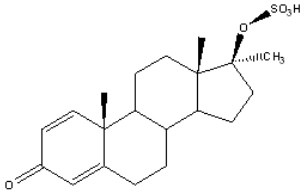
6β,16β-dihydroksimetandienoni
(V)



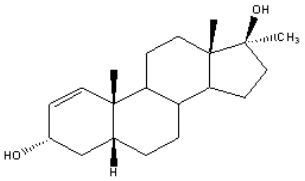
6β,16β-dihydroksi-
17-epimetandienoni (VI)



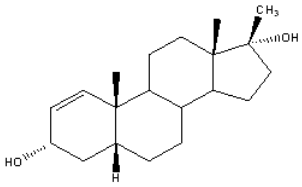
17-epimetandienoni
(VII)



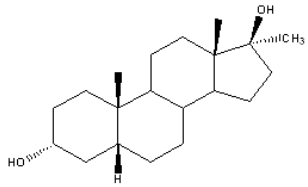
metandienoni-17β-sulfaatti
(VIII)



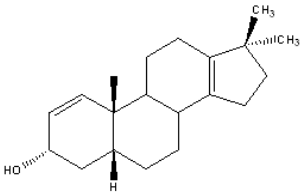
17β-metyyli-5β-androst-
1-eeni-3α,17α-dioli (IX)



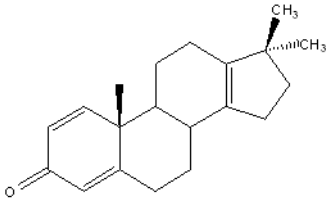
17α-metyyli-5β-androst-
1-eeni-3α,17β-dioli
(X)



17α-metyyli-5β-
androstane-3α,17β-dioli
(XI)



18-nor-17,17-dimetyyli-
5β-androst-1,13-dieeni-3α-oli
(XII)

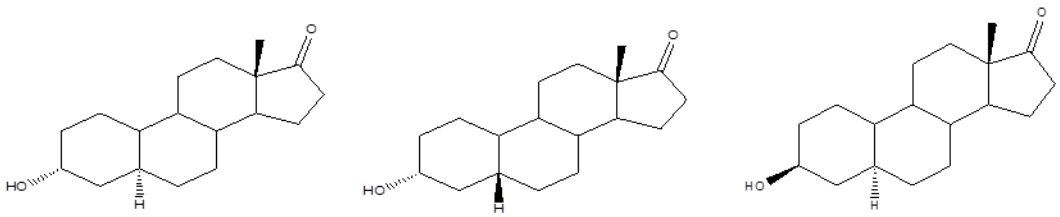


18-nor-17,17-dimetyyli-
androsta-
1,4,13-trieeni-3-oni (XIII)

Kuva 4. Metandienonin päämetaboliitit

Nandroloni

Nandroloni on synteettinen anabolinen steroidi, joka on johdettu testosteronista korvaamalla hiilen C19 metyyliryhmä vedyllä.[8] Tämä yksinkertainen modifikaatio lisää anabolisia vaikutuksia. Nandrolonin metabolia noudattaa pitkälti testosteronin metaboliaa ja päämetaboliitteja on kolme (Kuva 5). Koska nandrolonin rakenteesta puuttuu hiilestä C17 metyyliryhmä, hapettuu sekundäärinen hydroksyyliryhmä hiilessä C17 ketoniksi muodostaen 17-ketosteroidin.

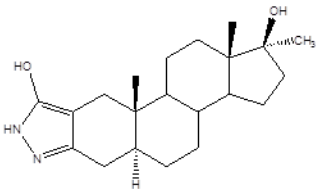


3α-hydroksi-5α-estran-17-oni 3α-hydroksi-5β-estran-17-oni 3β-hydroksi-5α-estran-17-oni

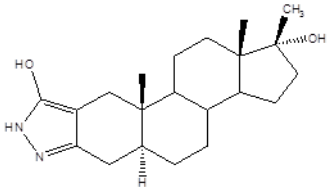
Kuva 5. Nandrolonin päämetaboliitit

Stanotsololi

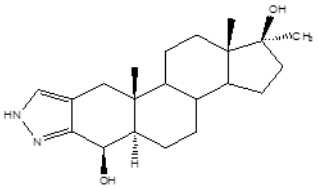
Stanotsololin metaboliitteja tunnistettiin kaasukromatografian avulla virtsasta jo 1980-luvulla[24] ja Schänzer puolestaan on tutkinut stanotsololin metaboliaa intensiivisesti 1990-luvulta lähtien,[8] jolloin GS-MS-menetelmällä tunnistettiin yksitoista stanotsololin metaboliittia HPLC-erotuksen jälkeen (Kuva 6). Päämetaboliitit (I-V) erittyivät kaikki konjugoituneina, mutta joitakin pienempiä metaboliitteja erittyi konjugoitumattomina.[8] Myös monia muita metaboliitteja, kuten dihydroksyloituneita tai hiilestä C17 epimerisoituneita metaboliitteja on löydetty ihmisen virtsasta (VI-XI).[24-25]



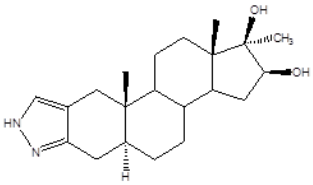
3'-hydroksistanotsololi
(I)



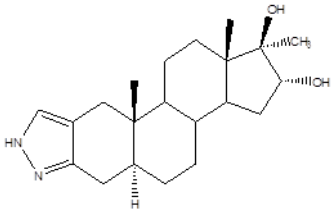
3'-hydroksi-17-epistanotsololi
(II)



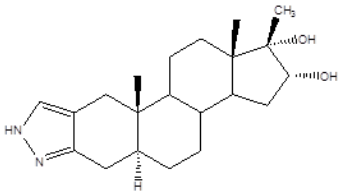
4β-hydroksistanotsololi
(III)



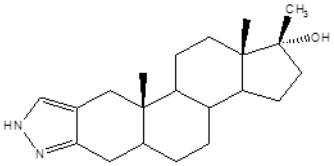
16β-hydroksistanotsololi
(IV)



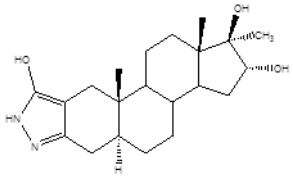
16α-hydroksistanotsololi
(V)



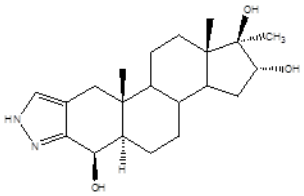
16α-hydroksi-17-epistanotsololi
(VI)



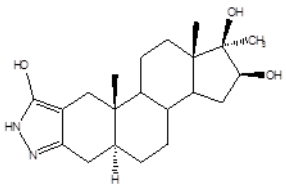
17-epistanotsololi
(VII)



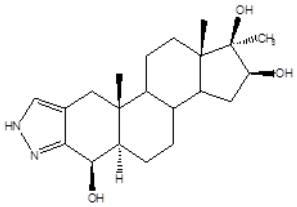
3', 16α-dihydroksistanotsololi
(VIII)



4β, 16α-dihydroksistanotsololi
(IX)



3', 16β-dihydroksistanotsololi
(X)



4β, 16β-dihydroksistanotsololi
(XI)

Kuva 6. Stanotsololin metaboliitteja

Pozo työryhmineen (2009) havaitsi 15 stanotsololin metaboliittia analysoimalla positiivista dopingnäytettä LC-MS/MS menetelmällä.[26] Lisäksi löydettiin kimeerisellä hiirellä tehdyssä tutkimuksessa vielä neljä metaboliittia, jotka valittujen reaktioiden seurannan (SRM) avulla löydettiin myöhemmin myös ihmisestä. Tuotteet olivat pääosin joko hydroksyloituneita, dihydroksyloituneita tai hydroksylaatioiden ja dehydrogenaation yhdistelmiä. Ilman standardiyhdisteitä kaikkien tuotteiden yksityiskohtaisia rakenteita ei kuitenkaan pystytty selvittämään.

1.1.2 Anabolisten steroidien faasin I metabolian tutkiminen *in vitro*

Metaboliaa voidaan tutkia *in vivo* käyttämällä esimerkiksi eri eläinlajeja hyödyksi. Eri eläinlajeilla esiintyy kuitenkin lajispesifisiä metaboliaentsyymejä ja -reittejä ja siksi eläinkokeista saatujen tulosten ekstrapolointi eläimistä ihmisiin on ongelmallista ja sisältää useita virhelähteitä.[27] Lääkekehityksessä keskeisiä työvälineitä ovatkin erilaiset *in vitro* -menetelmät, joiden avulla selvitetään pääasiassa maksassa tapahtuvia biotransformaatioita.[28] Menetelmissä hyödynnetään kokonaisia soluja tai kudoksia, joita ovat muun muassa perfusoitu maksa, maksaleikkeet, hepatosyytit ja erilaiset solulinjat. Tutkimuksia voidaan suorittaa myös erilaisilla solun osilla, joita ovat esimerkiksi maksan mikrosomit, S9-fraktio sekä maksahomogenaatti.

Yleisesti ottaen kokonainen maksa tai maksaleikkeet edustavat elimistön tilaa parhaiten ja kaikki metaboloivat entsyymit ovat tallella.[28] Materiaali voi kuitenkin olla hankalasti saatavissa ja menetelmät ovat kalliita ja hankalia käyttää. Lisäksi materiaalin hepaattinen toimintakyky säilyy käyttökelpoisena vain muutamia tunteja. Ainakin Levedahl ja Samuels (1950) ovat selvittäneet syitä testosteronin ja metyylitestosteronin *in vivo* metabolian eroavaisuuksiin käyttämällä apunaan ihmisen sekä usean eläinlajin, muun muassa rotan, koiran ja apinan maksaleikkeitä.[29]

Maksan hepatosyytit edustavat *in vivo* -olosuhteita hyvin ja niitä on kohtuullisen helppo käyttää.[30] Ne soveltuvat myös kokonaisia maksanosia paremmin seulontatyyppisiin tutkimuksiin. Hepatosyytit menettävät kuitenkin nopeasti maksaspesifiset toimintansa, kun niitä säilytetään tyypillisissä *in vitro* –olosuhteissa.[31]

Maksan mikrosomeja käytetään paljon entsymaattisten reaktioiden tutkimiseen. Mikrosomien käyttö on suhteellisen edullista ja käyttöikä kokonaisiin elimiin verrattuna pitkä, koska mikrosomit voidaan säilyttää pakastettuina.[27] Lisäksi faasin I entsyymit ovat tallella. Menetelmä ei kuitenkaan vastaa *in vivo* tilannetta kovin hyvin, koska faasin II entsyymit sekä muut sytosoliset entsyymit puuttuvat. Mikrosomeilla voidaan kuitenkin hyvin tuottaa faasin I metaboliitteja ja tehdä seulontatutkimuksia.

Steroideista testosteronin metaboliaa on tutkittu eniten ja esimerkiksi testosteronin metaboliitin, androsteenidionin, muodostumista on tutkittu inkuboimalla testosteronia rotan, apinan ja ihmisen maksan mikrosomeilla.[14] Humaanimikrosomeilla saatiin tuotettua testosteronin erään päämetaboliitin, androsteenidionin, lisäksi 2β-, 16β-, 6β-, ja 15α/β -hydroksylaatiotuotteita. Näistä 6β-, 15β-, ja 2β-hydroksylaatioita katalysoivat CYP3A4-entsyymit ja androsteenidionin syntymistä katalysoi CYP2C19-entsyymi. Toisessa tutkimuksessa määritettiin humaanimikrosomien avulla testosteronin metaboliitteja ja havaittiin, että 6β-hydroksylaatiota tapahtui enemmän kuin 2β-hydroksylaatiota ja lisäksi syntyi androsteenidionia.[32]

S9-fraktio sisältää myös faasin II metaboloivat entsyymit, joten se mahdollistaa faasin I ja faasin II biotransformaatioiden tutkimisen samanaikaisesti.[28] Tämä antaa paremman kuvan tutkittavan yhdisteen metabolisesta profiilista. Mikrosomien tapaan myös S9-fraktioon on lisättävä kofaktoria, jotta se toimisi. S9-fraktioiden haittapuolena on mikrosomeja alhaisempi entsyymiaktiivisuus, joten osa metaboliiteista saattaa jäädä huomaamatta.

S9 -fraktioita on käytetty steroidienkin metabolian tutkimiseen. Esimerkiksi Kuuranne työryhmineen (2008) kehitti *in vitro* –mallia, jossa yhdellä menetelmällä voitaisiin ennustaa anabolisten steroidien faasin I ja faasin II metaboliareaktioita.[33] Tutkimuksessa yhdistettiin mikrosomit ja S9-fraktio ja tulosten perusteella menetelmän *in vitro-in vivo* vastaavuus oli hyvä. Osa tärkeistä metaboliatuotteista jäi kuitenkin syntymättä, koska menetelmä ei sisältänyt sulfataatioon vaadittavaa kofaktoria.

Puutteet *in vitro* -menetelmissä ovat lisänneet kiinnostusta muun muassa hiiren maksan humanisointiin ilmentämällä metabolian kannalta tärkeitä humaanigeenejä.[34] Esimerkiksi useita CYP-entsyymejä on onnistuttu ekspressoimaan bakteerien, hiivojen, hyönteisten ja nisäkkäiden soluissa.[12] Myös rekombinanttientsyymejä voidaan käyttää ja niillä voidaan tutkia yksittäisen entsyymin roolia metaboliareaktioissa.[27] Menetelmällä ei kuitenkaan ole kovin suurta *in vivo* -korrelaatiota.

Hyönteissolujen avulla on tutkittu muun muassa testosteronin, 17α-metyylitestosteronin ja metandienonin metaboliaa.[35] Tutkimuksessa käytetyt hyönteissolut ilmensivät steroidien metaboliassa keskeisiä CYP2C9- ja CYP3A4-isoentsyymejä ja lisäksi CYP2B6-isoentsyymiä, jota on ihmisen maksassa vain vähän. Sen tiedetään kuitenkin katalysoivan testosteronin 16α/β–hydroksylaatioita.[12] CYP3A4-isoentsyymiä ilmentävillä hyönteissoluilla tapahtui kaikilla tutkittavilla yhdisteillä 6β-hydroksylaatio, kun taas isoentsyymiä CYP2C9 ilmentävillä soluilla ei 6β-hydroksylaatiotuotteita muodostunut.[35] CYP2B6-isoentsyymiä ilmentäneillä ihmisen lymfoblasti mikrosomeilla muodostui 6β-hydroksylaatiotuote testosteronin ja metyylitestosteronin, mutta ei metandienonin, tapauksessa.

Johansson työryhmineen (2007) on pyrkinyt jäljittelemään CYP450-entsyymien katalysoimia hapetusreaktioita elektrokemiallisilla reaktioilla (EC), EC-avusteisella Fenton-reaktiolla (EC-Fenton) sekä synteettisillä metalloporfyriineillä.[36] EC-reaktiolla voidaan jäljitellä esimerkiksi dehydrogenaatiota, jossa reaktio käynnistyy yhden elektronin siirtymisellä.[37] Jos taas CYP450-entsyymien katalysoimat reaktiot käynnistyvät suoraan vetyatomin irtoamisella kuten esimerkiksi substituoimattoman renkaan hydroksylaatio, ei EC-reaktio sovellu metabolian jäljittelemiseen. Metalloporfyriinien avulla on puolestaan mahdollista jäljitellä esimerkiksi alifaattista ja bentsyylistä hydroksylaatiota sekä alkoholin ja aldehydin hapettumista mutta metalloporfyriinimenetelmän heikkous on toisinaan alhainen saanto.[36]

EC-Fenton-reaktion avulla on mahdollista jäljitellä alifaattista ja aromaattista oksidaatiota sekä dehydrogenaatiota.[36] Reaktiossa hydroksyyliradikaalit muodostuvat, kun kahdenarvoinen rauta (Fe^{2+}) luovuttaa elektronin vetyperoksidille ja hapettuu

kolmenarvoiseksi (Fe^{3+}).[38] Vetyperoksidista muodostunut OH-radikaali voi siepata vetyatomin yhdisteeltä. Johanssonin tutkimuksessa (2007) eräs tutkittavista yhdisteistä oli testosteroni ja EC-Fenton-reaktiossa syntyi kahta eri alifaattista hydroksylaatiotuotetta, joista toinen oli sama, jota syntyi humaanimikrosomikokeissa ja toinen sama, jota syntyi rotan mikrosomikokeissa.[36] Kaikkia tärkeimpiä hapetusreaktiota ei kuitenkaan pelkän EC-Fenton-reaktion avulla pystytä jäljittelemään.

1.2 Titaanidioksidivalokatalyysi

Titaanidioksidivalokatalyysin (TiO_2) tieteellinen tutkimus alkoi 1960-luvulla veden valoelektrolyysin tutkimisella.[39] Vesi voitiin pilkkoa UV-valon avulla hapeksi ja vedyksi ilman ulkoista jännitteen lisäystä yhtälöiden 2-5 mukaisesti:

$$TiO_2 + 2\ h\nu \rightarrow 2\ e^- + 2\ h^+ \qquad (2)$$

$$H_2O + 2\ h^+ \rightarrow (½)\ O_2 + 2\ H^+ \ (TiO_2 \text{ elektrodilla}) \qquad (3)$$

$$2\ H^+ + 2\ h\nu \rightarrow H_2 \ (\text{platina elektrodilla}) \qquad (4)$$

Kokonaisreaktio:

$$H_2O + 2\ h\nu \rightarrow (½)\ O_2 + H_2 \qquad (5)$$

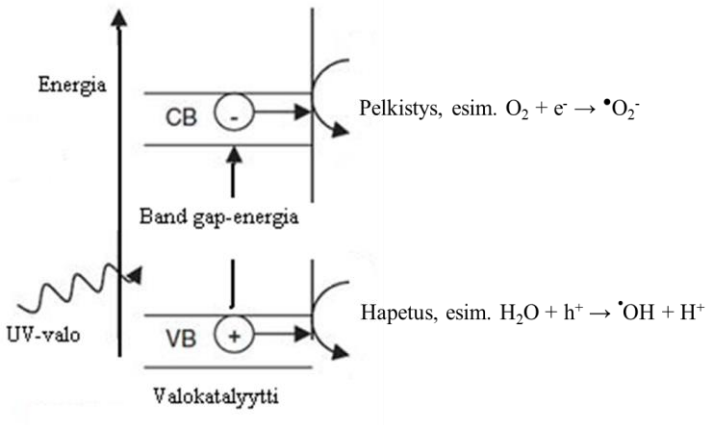
1970-luvulla puolestaan tutkittiin syanidin hajottamista vedestä, minkä seurauksena kiinnostus TiO_2-valokatalyysin hyödyntämisestä ympäristösovelluksissa kasvoi.[40-41]

1.2.1 Titaanidioksidivalokatalyysin periaate

TiO_2-valokatalyysi eroaa valokemiallisesta hajoamisesta muun muassa siten, että valokatalyyttisessä reaktiossa yhdiste mineralisoituu nopeasti ja välituotteita syntyy valokemialliseen hajoamiseen verrattuna huomattavasti vähemmän.[42] Valokatalyyttisissä reaktioissa käytettävä katalyytti on kiinteä yhdiste, puolijohde, joka edistää

reaktiota valon läsnä ollessa kulumatta siinä itse. Valokatalyytteinä on käytetty muun muassa titaanidioksidia (TiO_2), sinkkioksidia (ZnO) ja volframioksidia (WO_3).[43]

TiO_2-valokatalyysi on heterogeeninen valokatalyysi, mikä tarkoittaa, että reaktiot tapahtuvat kiinteän aineen ja nesteen rajapinnalla.[44] Heterogeenisessä valokatalyysissä puolijohteen (TiO_2) partikkeleita altistetaan joko luonnolliselle tai keinotekoiselle UV-valolle.[45] UV-valo virittää elektronit (e^-), jotka siirtyvät valenssivyöltä johtuvuusvyölle ja jättävät jälkeensä elektronivajeen, aukon (h^+) (kuva 7). [44] Nämä aukot voivat reagoida esimerkiksi veden kanssa tuottaen hydroksyyliradikaaleja (·OH), jotka puolestaan ovat voimakkaita hapettimia ja reagoivat kiivaasti useimpien orgaanisten yhdisteiden kanssa. Virittyneet elektronit puolestaan voivat reagoida hapen kanssa, jolloin syntyy superoksidiradikaaleja ($\cdot O_2^-$).[41] Mikäli sopivia hajotettavia yhdisteitä ei ole läsnä, tapahtuu rekombinaatio, jolloin valokatalyyttistä reaktiota ei tapahdu.[43]



Kuva 7. Valokatalyysin periaate. VB = valenssivyö, CB = johtuvuusvyö, Band gap = valenssivyön ja johtuvuusvyön välinen energiaero (Mukaillen Bhatkhande ym. 2002)

TiO_2 on osoittautunut hyväksi valokatalyytiksi.[39] Se on suhteellisen edullista, kemiallisesti stabiilia, ja lisäksi sen valoaltistuksella aikaan saadut aukot ovat erittäin hapettavia. Useita erilaisia orgaanisia yhdisteitä voidaan hajottaa täysin TiO_2 pinnalla, heikolle UV-valolle altistettuna. Reaktio on lisäksi suhteellisen nopea ja ainoana havaittavana kaasuna syntyy hiilidioksidia (CO_2).[46]

TiO_2:n valokatalyyttinen aktiivisuus riippuu siitä, mitä kidemuotoja käytetään. TiO_2:lla on kolme kidemuotoa, anataasi, rutiili ja brokiitti.[47] Viime vuosina yleisesti käytössä on

ollut Degussa P-25, joka koostuu TiO_2:n anataasi ja rutiili kidemuodoista (noin 70:30).[43] Näistä anataasi vaikuttaa olevan tehokkain puolijohde, kun taas rutiilin on osoitettu olevan katalyyttisiltä ominaisuuksiltaan huomattavasti vähemmän aktiivinen tai inaktiivinen, hieman valmistustavasta riippuen.[47] Eräs mielenkiinnon kohde on, miksi valokatalyyttinen aktiivisuus on parhaimmillaan silloin, kun kidemuotoja käytetään seoksina, kuten Degussa P-25:ssä.[48] Yhtenä syynä pidetään sitä, että kidemuotojen erilaiset partikkelikoot vaikuttavat rekombinaation nopeuteen.[49] Lisäksi rutiilin valenssivyön ja johtuvuusvyön välinen energiaero (3,0 eV) on pienempi kuin anataasin (3,2 eV). Tästä seuraa, että rutiili absorboi UV-valoa hieman eri aallonpituudella (413 nm) kuin anataasi (387 nm). Tämä mahdollistaa Degussa P-25 käytön myös näkyvän valon alueella.

TiO_2-valokatalyyttisen reaktion etenemiseen vaikuttavat monet tekijät, esimerkiksi liuotinkoostumus. Deksametasonin valokatalyyttistä hajoamista verrattiin pelkässä vedessä ja 0,64 M metanolissa.[50] Metanolin havaittiin hidastavat deksametasonin hajoamista huomattavasti. Metanoli toimii orgaanisena elektronin luovuttajana, joka pystyy reagoimaan sekä vapaan että adsorboituneen OH-radikaalin kanssa estäen valokatalyyttisen reaktion etenemisen.[51] Karpova työryhmineen (2007a, 2007b) tutki estrogeenien TiO_2-valokatalyyttistä hajoamista liuoksissa, joissa oli mukana etanolia, sakkaroosia tai ureaa.[52-53] Etanolin ja sakkaroosin havaittiin hidastavan merkittävästi reaktion nopeutta. Urealla sen sijaan ei ollut vaikutusta reaktion nopeuteen, minkä arveltiin johtuvan urean heikosta adsorboitumisesta TiO_2:n pinnalle.

Myös valon aallonpituus ja intensiteetti vaikuttavat valokatalyysiin. Crittenden työryhmineen (1997) havaitsi, että valokatalyyttisen hajoamisen nopeus kasvoi valon intensiteetin kasvaessa.[54] Samaan lopputulokseen päätyi myös Yawalkar.[42] UV-valon tuottamat fotonit virittävät elektronit valenssivyöltä johtuvuusvyölle ja kun aallonpituus on lyhyempi, niin fotonin energia on suurempi. Energisemmän säteilyn vuoksi valokatalyyttinen hajoaminen on nopeampaa.[55]

Heterogeenisessä valokatalyysissä hajoaminen tapahtuu katalyytin pinnalla, joten myös hajotettavan yhdisteen adsorboituminen TiO_2-partikkeleiden pinnalle vaikuttaa

reaktionopeuteen.[56-57] Valokatalyyttisen hajoamisen on havaittu olevan nopeampaa niillä substraateilla, jotka adsorboituvat voimakkaammin TiO_2-partikkeleiden pinnalle. Adsorptioon vaikuttavat kuitenkin muutkin reaktio-olosuhteet, kuten esimerkiksi käytetty pH.[58]

1.2.2 Titaanidioksidivalokatalyysin sovelluksia

TiO_2-valokatalyysissä erityisenä kiinnostuksen kohteena ovat olleet erilaiset ympäristösovellukset, joissa TiO_2:a käytetään heikossa UV-valossa esimerkiksi lasin, tiilen tai paperin pinnalla.[39] Sisäilmasta on onnistuttu poistamaan epämiellyttäviä tuoksuja, joita aiheuttavat erilaiset, pieninä pitoisuuksina esiintyvät, yhdisteet. Alhaisen pitoisuuden vuoksi heikkokin UV-valo riittää hajottamaan näitä orgaanisia yhdisteitä. Sisäilma olisi mahdollista pitää puhtaana TiO_2-pintaisten tapettien sekä fluoresoivien lamppujen avulla.

TiO_2:lla on myös antibakteerista vaikutusta ja monenlaisia mikro-organismeja voidaan tuhota valokatalyysin avulla.[59-60] Kun *E.colia* kasvatettiin TiO_2-pintaisella alustalla ja altistettiin UV-säteilylle, ei tunnin kuluttua ollut eläviä bakteerisoluja jäljellä.[61] Kuolleet solut pystyttiin myös hajottamaan täysin TiO_2-valokatalyysin avulla.[62]

TiO_2-valokatalyysiä on pyritty hyödyntämään myös syövän hoidossa.[63] Fujishima työryhmineen istutti syöpäsoluja hiiren ihon alle, jonne ruiskutettiin myös hienoja TiO_2-partikkeleita sisältävää liuosta. Muutaman päivän kuluttua iho avattiin ja syöpäsoluista muodostunut kasvain altistettiin säteilylle. Käsittelyn todettiin hillitsevän kasvaimen suurentumista selkeästi. UV-valo ei pysty tunkeutumaan kovin syvälle ihmiskehoon, mutta tekniikkaa voitaisiin hyödyntää esimerkiksi ihosyövän hoidossa.

TiO_2-valokatalyysiä on sovellettu myös jätevesien puhdistamisessa. TiO_2-valokatalyysin avulla on mahdollista hajottaa orgaanisia yhdisteitä, jotka ovat ihmisille, eläimille ja ympäristölle haitallisia.[39] Esimerkiksi naishormoneja 17β-estradiolia ja estronia, jotka estävät estrogeenistä aktiivisuutta jo hyvin pieninä pitoisuuksina, on todettu esiintyvän vesistöissä. Tutkimuksissa on todettu, että 17β-estradioli ja estroni

voidaan hajottaa vedestä täydellisesti TiO_2:n ja heikon UV-valon avulla ilman, että reaktioissa syntyisi aktiivisia välituotteita.[64-65]

1.2.3 Titaanidioksidivalokatalyysi lääkeaineiden faasin I metabolian tutkimisessa

TiO_2-valokatalyysiä on tutkittu jo kauan, ja myös sen soveltuvuus lääkeaineiden hajottamiseen juoma- tai pintavesistä on kiinnostanut tutkijoita.[66-67] TiO_2-valokatalyysin soveltuvuudesta ja hyödyntämisestä esimerkiksi metaboliareaktioiden jäljittelyyn ei kuitenkaan ole paljon tietoa. Deksametasonin TiO_2-valokatalyyttistä transformaatiota ja reaktiotuotteiden muodostumista on tutkittu ja todettiin, että deksametasonin hajotessa muodostui pääasiassa hapetustuotteita, esimerkiksi useita hydroksylaatiotuotteita.[49] Hydroksylaatio on eräs deksametasonin päämetaboliareitti myös maksassa, joten tuloksia voidaan pitää merkittävinä. Tutkijoiden mukaan useita isomeerejä muodostuu, koska TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa hydroksyyliradikaalin hyökkäys on stereokemian suhteen epäselektiivinen.

Myös buspironin TiO_2-valokatalyyttistä hajoamista on tutkittu ja useita reaktiossa syntyneitä tuotteita on tunnistettu HPLC/MS/MS:n avulla.[68] Suuri osa muodostuneista tuotteista, esimerkiksi hydroksi- ja dihydroksibuspironi, olivat samoja, mitä syntyy rotilla ja hevosilla *in vivo*. Myös sellaisia tuotteita löydettiin, joita ei *in vivo* -tutkimuksissa havaittu, esimerkiksi hydroksyloituneen yhdisteen hapettuminen ketoniksi. Lisäksi todettiin usean isomeerin syntyminen kuten deksametasonillakin. Tulosten perusteella tutkijat uskovat, että TiO_2-valokatalyysi voisi toimia metabolian jäljittelemisessä.

Sildenafiilin TiO_2-valokatalyyttisiä transformaatioita on niin ikään tutkittu.[69] Tutkijoiden mielestä TiO_2-valokatalyysi mahdollistaisi työskentelyn puhtaamman matriisin kanssa sekä mahdollistaisi suurempien konsentraatioiden käyttämisen kuin mitä *in vivo*-tilanteessa usein on mahdollista. Sildenafiilin todettiin katoavan täysin 10 minuutin UV-altistuksen kuluessa ja TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa havaittiin tapahtuvan hydroksylaatio, dihydroksylaatio, demetylaatio, demetylaatio + hydroksylaatio sekä de-etylaatio. Tutkimuksessa annettiin lisäksi kahdelle hevoselle sildenafiiliä, jonka jälkeen

veri- ja virtsanäytteiden tuloksia verrattiin TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden tuloksiin. Suuri osa TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneistä tuotteista olivat samoja, joita syntyi hevosilla *in vivo*.

Erilaisten pienten yhdisteiden, kuten verapamiilin ja metoprololin, faasin I metaboliaa, on tutkittu TiO_2-valokatalyyttisen reaktion ja mikrosirun avulla.[70] Tutkimusta varten kehitetty, piistä valmistettu mikrosiru, oli päällystetty TiO_2-nanokerroksella ja siruun oli integroitu sähkösumutuskärki MS-analyysiä varten. TiO_2-valokatalyyttinen reaktio saatiin aikaan ulkoisella UV-lampulla ja reaktiot olivat pääosin samoja, joita tapahtuu ihmisen maksan mikrosomeilla (HLM), rotan hepatosyyteillä tai CYP-entsyymien katalysoimina. Reaktiot olivat pääasiassa hydroksylaatioita, dehydrogenaatioita ja dealkylaatioita. Työryhmä piti tulosten *in vitro in vivo*-korrelaatiota merkittävänä ja totesi, että menetelmää olisi mahdollista käyttää yhtenä lääkekehityksen työkaluna.

1.3 Erikoistyön tarkoitus

Erikoistyön tarkoituksena oli tutkia, voidaanko TiO_2-valokatalyyttisillä reaktioilla jäljitellä valittujen anabolisten steroidien faasin I metaboliaa. Lääkekehitystyössä molekyylin metabolisen stabiilisuuden optimointi ja turvallisuus ovat tärkeitä tekijöitä ja mahdollisimman varhaisessa vaiheessa on tiedettävä, syntyykö metaboliatuotteina aktiivisia, inaktiivisia tai mahdollisesti toksisia yhdisteitä. Tällaiset tuotteet syntyvät usein faasin I metaboliareaktioiden seurauksena. Tutkimuksissa käytetään paljon biologista materiaalia, koska se kuvastaa parhaiten elimistön olosuhteita. Mikäli TiO_2-valokatalyyttisillä hapetusreaktioilla pystyttäisiin jäljittelemään steroidien faasin I metaboliaa, voisi olla mahdollista korvata osa *in vitro* -tutkimuksista TiO_2-valokatalyyttisillä menetelmillä. Käytettävä matriisi olisi puhtaampaa ja näytteen esikäsittelytarve voisi olla vähäisempi.

Anaboliset steroidit metaboloituvat elimistössä muun muassa CYP-entsyymien katalysoimissa hapetusreaktioissa. TiO_2-valokatalyysi keskeinen toimintaperiaate on niin ikään yhdisteiden hapettuminen, joten näin ollen voisi olla mahdollista tuottaa steroidien faasin I metaboliatuotteita TiO_2-valokatalyyttisesti.

TiO_2-valokatalyysiä on tutkittu paljon erityisesti ympäristösovelluksissa. Jonkin verran on tietoa myös valokatalyysin soveltuvuudesta lääkeainemetabolian jäljittelemiseen.[50,68-70] Liuotinkoostumuksen vaikutusta TiO_2-valokatalyyttiseen reaktioon on myös tutkittu ja todettu, että useat orgaaniset liuottimet, kuten esimerkiksi metanoli ja etanoli, hidastavat tai estävät reaktiota jo pieninä pitoisuuksina.[50,53] Steroidit tarvitsevat kuitenkin liukoisuutensa vuoksi jonkin verran orgaanista liuotinta. Tarkoitus olikin testosteronin avulla testata, miten reaktioseoksen asetonitriilipitoisuus ja toisaalta eri UV-altistusajat vaikuttavat steroidien TiO_2-valokatalyyttisiin reaktioihin. Tulosten perusteella oli tarkoitus valita optimaaliset olosuhteet kaikkien valittujen steroidien TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden suorittamiseen.

Erikoistyön tarkoituksena oli suorittaa TiO_2-valokatalyyttiset reaktiot sekä HLM-inkubaatiot testosteronilla, metyylitestosteronilla, metandienonilla, nandrolonilla ja stanotsololilla. Kaikki valitut steroidit ovat Maailman antidopingtoimiston (WADA) kiellettyjen aineiden listalla.[3] Vuoden 2011 WADAn tilastojen mukaan tutkittavat yhdisteet olivat niiden steroidien joukossa, joita löydettiin eniten urheilijoiden antamista näytteistä.[71] TiO_2-reaktioissa syntyviä hapetus- ja hajoamistuotteita oli tarkoitus verrata HLM-inkubaatioissa muodostuneisiin tuotteisiin ja arvioida, syntyykö TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa samoja tuotteita kuin HLM-reaktioissa. Tulosten perusteella pohdittiin, soveltuvatko TiO_2-valokatalyyttiset reaktiot anabolisten steroidien faasin I metabolian jäljittelemiseen.

Mikäli metabolian jäljitteleminen olisi mahdollista, voitaisiin kenties tuottaa suurempia määriä metaboliatuotteita standardiyhdisteiksi. Moneen *in vitro* –menetelmään verrattuna TiO_2-valokatalyyttinen reaktio olisi edullisempi ja nopeampi toteuttaa. Lisäksi TiO_2-valokatalyyttiset reaktiot olisi mahdollista automatisoida.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Aineet ja reagenssit

Testosteroni oli Sigma-Aldrichilta (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Saksa). Metyylitestosteronin ja nandrolonin alkuperä oli Diosynth (Diosynth BV, Alankomaat), metandienoni oli Steraloidsilta (Steraloids Inc., Newport, RI, USA) ja stanotsololi oli peräisin Sterling-Winthorpilta (Sterling-Winthrop, Inc., USA).

Kaikki työssä käytetyt liuottimet ja reagenssit olivat analyysi- tai LC-MS-laatuisia. TiO_2 (Degussa P-25), asetonitriili, metanoli, etikkahappo ja ammoniumasetaatti olivat Sigma-Aldrichilta (Steinheim, Saksa). Vesi puhdistettiin Milli-Q® -vedenpuhdistusjärjestelmällä (Millipore, Molsheim, Ranska).

Humaanimikrosomit hankittiin BD:ltä (Gentest LOT 23418, New Jersey, USA). NADPH ja natriumdivetyfosfaatti olivat Sigma-Aldrichilta (Steinheim, Saksa). Magnesiumkloridi, perkloorihappo (70-72%) ja dinatriumvetyfosfaatti sekä natriumhydroksidi olivat Merckiltä (Darmstadt, Saksa).

TiO_2-valokatalyysireaktioita varten valmistettiin kustakin steroidista 1 mM kantaliuos asetonitriiliin. HLM-inkubaatioita varten valmistettiin testosteronista, metyylitestosteronista, metandienonista ja nandrolonista 10 mM kantaliuos asetonitriiliin ja stanotsololista 5 mM kantaliuos metanoliin. Kaikkia kantaliuoksia säilytettiin pakastimessa näytteenvalmistushetkeen saakka, jolloin kantaliuokset laimennettiin vedellä pitoisuuteen 0,5 mM. TiO_2:n kantasuspensio, jonka pitoisuus oli 20 g/l, oli valmistettu veteen ja sitä säilytettiin jääkaapissa.

2.2 Näytteiden valmistus ja esikäsittely

2.2.1 Titaanidioksidinäytteiden valmistus

Testosteronin avulla testattiin asetonitriilipitoisuuden ja UV-altistusajan vaikutusta lähtöaineen vähenemiseen ja hapetus- ja hajoamistuotteiden muodostumiseen. TiO_2-valokatalyyttiset reaktiot suoritettiin eppendorf-putkissa (1,5 ml) ja reaktioseoksen kokonaistilavuus oli 500 µl. Reaktioseos sisälsi 10 µM tutkittavaa yhdistettä ja 1 g/l TiO_2-partikkeleita. ACN-pitoisuus oli 1 %, 50 % tai 95 %. Jokaista näytettä valmistettiin kaksi rinnakkaista ja lisäksi valmistettiin 0-näytteet, jotka eivät sisältäneet testosteronia. Reaktioseoksia sekoitettiin 1 minuutin ajan ja näytteet peitettiin alumiinifoliolla, jotta vältettäisiin ennenaikainen valoaltistus. Kun ACN-pitoisuus oli 1 %, käytetyt UV-altistusajat olivat 0 min, 0,5min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 6 min ja 12 min. Kun ACN-pitoisuus oli 50 % tai 95 %, UV-altistusajat olivat 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min ja 30 min. Ennen UV-altistuksen alkua eppendorf-putkien kannet avattiin. Ylhäältä päin tulevan UV-altistuksen aikana reaktioseoksia sekoitettiin magneettien avulla. UV-altistus suoritettiin metallihalidilampulla (Dymax UV Curing Flood Lamp, 5000-PC Series, Dymax Light Curin Systems, Torrington, CT, USA). Etäisyys magneettisekoitusalustan yläreunasta UV-lampun shutterin alempaan reunaan oli 22 senttimetriä. UV-altistuksen jälkeen magneetit poistettiin ja TiO_2 -partikkelit poistettiin sentrifugoimalla (Eppendorf 5415D, Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) (13200 rpm, 2 x 10 min). Supernatantit (450 µl) otettiin talteen ja säilytettiin pakastimessa analyysihetkeen saakka.

2.2.2 Humaanimikrosominäytteiden valmistus

HLM-inkubaatioiden olosuhteet valittiin aiemmin käytetyn menetelmän pohjalta[33]. Inkubaatioita varten valmistettiin 0,2 M fosfaattipuskuriliuos liuottamalla natrium-divetyfosfaattia ja dinatriumvetyfosfaattia vajaaseen 500 ml:aan vettä. Oikea pH (7,4) säädettiin pH-mittarin avulla (inoLab pH Level 1, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Saksa) lisäämällä tipoittain 1 M natriumhydroksidia. Lopuksi lisättiin vettä määrätilavuuteen (500 ml). Puskuriliuosta säilytettiin

näytteenvalmistushetkeen saakka jääkaapissa. Ennen näytteenvalmistusta fosfaattipuskuriin lisättiin vielä 20 mM magnesiumkloridiliuosta ($MgCl_2$) siten, että $MgCl_2$:n lopullinen pitoisuus oli 5 mM. NADPH:n veteen valmistettu kantaliuos (20 mM) säilytettiin pakastimessa näytteenvalmistushetkeen saakka.

HLM-inkubaatiot suoritettiin 100 µl tilavuudessa. Reaktioseos koostui tutkittavasta steroidista (50 µM), fosfaattipuskurista (50 mM, pH 7,4), humaanimikrosomeista ja vedestä. Mikrosomeja, joiden proteiinikonsentraatio oli 20 mg/ml, säilytettiin näytteenvalmistushetkeen saakka pakastimessa (-70 ^{o}C), josta ne sulatettiin ja pipetoitiin reaktioseokseen siten, että lopullinen proteiinipitoisuus seoksessa oli 0,5 mg/ml. Reaktioseoksia sekoitettiin huolellisesti ja metaboliareaktiot käynnistettiin lisäämällä seokseen 1 mM NADPH:a ja sekoittamalla. Reaktioseoksia inkuboitiin 37 ^{o}C lämpöhauteessa (Grant QBT2, Grant Instruments, Shepreth, Cambridgeshire, Iso-Britannia) 1-24 tuntia ja aikapisteet olivat 1, 2, 3, 6, 12, 18 ja 24 tuntia. Kutakin aikapistettä kohden valmistettiin kaksi rinnakkaista näytettä sekä kaksi rinnakkaista 0-näytettä. 12, 18 ja 24 tunnin näytteisiin lisättiin 6 tunnin inkuboinnin jälkeen 5 µl NADPH:ta, jolla varmistettiin reaktioiden jatkuminen. Inkubointiajan jälkeen reaktiot pysäytettiin lisäämällä 10 µl perkloorihappoa (4 M), sekoittamalla ja siirtämällä näytteet jäähauteeseen. Kiinteät partikkelit poistettiin reaktioseoksista sentrifugoimalla (13200 rpm, 10 min). Osa supernatantista (45 µl) siirrettiin poolattavaan näytteeseen ja osa (45 µl) säästettiin myöhempää mahdollista käyttöä varten.

2.2.3 Kiinteäfaasiuutto

UV-altistetut TiO_2-näytteet (450 µl) ja HLM-reaktioiden poolatut supernatantit (270 µl) laimennettiin kiinteäfaasiuuttoa varten 1 ml:lla ammoniumasetaattipuskuria (100 mM, pH 6,00). Uuttopatruunoiden (Waters Oasis 30 mg, tilavuus 1 ml) kunnostamiseen käytettiin 1 ml metanolia (100%) ja 1 ml puhdistettua vettä (100%). Näytteiden lisäämisen jälkeen patruunat huuhdottiin neutraalilla liuoksella (vesi:metanoli 95:5, v:v) ja happamalla liuoksella (vesi:metanoli 95:5 + 2 % etikkahappoa, v:v). Steroidit ja reaktiotuotteet eluoitiin patruunoista käyttämällä 1,5 ml asetonitriiliä (T, MT, MDN, NAN) tai 1,5 ml metanolia (STZ). Eluentit haihdutettiin kuiviin typpivirrassa. HLM-

näytteet rekonstituoitiin 100 µl tilavuuteen ja TiO_2-näytteet 50 µl tilavuuteen. Rekonstituointiin käytettiin liuotinseosta, jossa oli ajoliuoksia A ja B suhteessa 50:50 (T) tai 75:25 (MT, MDN, NAN, STZ). Kaksi TiO_2-näytettä yhdistettiin aina keskenään, jolloin kaikkien näytteiden lopullinen tilavuus oli 100 µl. Kiinteäfaasiuuton ja näytteiden rekonstituoinnin seurauksena TiO_2-näytteet konsentroituivat 9-kertaisesti ja HLM-näytteet 2,7-kertaisesti alkutilanteeseen verrattuna. TiO_2-näytteitä, joiden avulla tutkittiin liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutusta lähtöaineen häviämiseen ja hapetus- ja hajoamistuotteiden muodostumiseen, ei esikäsitelty kiinteäfaasiuutolla.

2.3 Laitteistot

2.3.1 Nestekromatografia

HLM- ja TiO_2-näytteiden kromatografinen erottaminen tapahtui erittäin korkean suorituskyvyn nestegromatografilla (Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, USA). Käytetty kolonni oli UPLC BEH Shield C-18 käänteisfaasikolonni (100 mm x i.d. 2,1 mm, partikkelikoko 1,7 µm) (Waters), jonka edessä oli esikolonni Vanguard BEH C18 (5 mm x i.d. 2,1 mm, partikkelikoko 1,7 µm) (Waters). Ajoliuos A sisälsi vettä ja 100 mM ammoniumasetaattipuskuria (95:5 v/v) (pH 6,0 säädetty etikkahapolla). Ajoliuos B sisälsi metanolia ja 100 mM ammoniumasetaattipuskuria (95:5 v/v) (pH 6,0 säädetty etikkahapolla). Näytteen injektointi tapahtui osittaisella silmukantäyttö-menetelmällä. Injektiotilavuus oli 5 µl ja jokaisesta näytteestä otettiin kaksi injektiota. Liikkuvan faasin virtausnopeus oli 300 µl/min ja kolonnin lämpötila 40 ^{o}C. Asetonitriilipitoisuuden ja UV-altistusajan vaikutusta tutkittaessa käytettiin liikkuvan faasin virtausnopeutena 200 µl/min ja gradienttia, joka on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Gradientti tutkittaessa liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutusta testosteronin hajoamiseen ja hapetus- ja hajoamistuotteiden muodostumiseen. Aika (min) = ajoaika minuutteina, A (%) = ajoliuoksen A %-osuus, B (%) = ajoliuoksen B %-osuus.

Testosteronin gradientti		
Aika (min)	A (%)	B (%)
0,0-2,50	50 → 0	50 → 100
2,50-4,00	0	100
4,00-4,10	0 → 50	100 → 50
4,10-6,50	50	50

HLM-inkubaatioissa syntyneiden metaboliatuotteiden ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa muodostuneiden hapetus- ja hajotustuotteiden vertailua varten optimoitiin jokaiselle tutkittavalle yhdisteelle gradientti, jotta samanmassaisten tuotteiden erottuminen olisi mahdollisimman hyvä (Taulukko 3).

Taulukko 3. HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden vertailussa käytetyt, testosteronin, metyylitestosteronin, metandienonin, nandrolonin ja stanotsololin, gradientit. Aika (min) = ajoaika minuutteina, A (%) = ajoliuoksen A %-osuus, B (%) = ajoliuoksen B %-osuus.

Testosteroni		
Aika (min)	A (%)	B (%)
0,0-13,0	67 → 50	33→50
13,0-18,0	50 → 0	50 → 100
18,0-20,0	0	100
20,0-20,10	0 → 67	100 → 33
20,10-22,50	67	33

Metyylitestosteroni		
Aika (min)	A (%)	B (%)
0,0-9,0	70 → 55	30 → 45
9,0-15,0	55 → 50	45 → 50
15,0-19,0	50 → 0	50 → 100
19,0-21,0	0	100
21,0-21,10	0 → 70	100 → 30
21,10-23,20	70	30

Metandienoni		
Aika (min)	A (%)	B (%)
0-7,50	70 → 60	30 →40
7,50-15,0	60 → 55	40 → 45
15,0-20,0	55 → 0	45 → 100
20,0-22,0	0	100
22,0-22,10	0 → 70	100 → 30
22,10-24,50	70	30

Nandroloni		
Aika (min)	A (%)	B (%)
0-10,0	75 → 60	25 → 40
10,0-20,0	60 → 0	40 → 100
20,0-22,0	0	100
22,0-22,10	0 → 75	100 → 25
22,10-24,50	75	25

Stanotsololi		
Aika (min)	A (%)	B (%)
0-4,0	70 → 42	30 → 58
4,0-11,0	42 → 36	58 → 64
11,0-15,0	36 → 0	64 → 100
15,0-17,0	0	100
17,0-17,10	0 → 70	100 → 30
17,10-19,50	70	30

2.3.2 Massaspektrometria

Kromatografisen erotuksen jälkeen näytteet analysoitiin kvadrupoli-lentoaikamassa-analysaattorilla (Xevo Q-TOF, Waters, Millford, MA, USA). Ionisaatiomenetelmänä käytettiin kaasuvirtausavusteista sähkösumutusta (ESI) ja kaikki ionit mitattiin positiivi-ionimoodissa. Massaspektrometri kalibroitiin käytetylle massa-alueelle 0,5 mM natriumformaattiliuoksen (2-propranololi:vesi, 90:10, v/v) avulla, jonka virtausnopeus oli 20 µl/min. Resoluutio oli noin 9000 *m/z*-arvolla 556,2771. Tarkan massan

mittauksessa käytettiin lukkomassakorjausta ja lukkomassana oli 2 µg/ml leusiini-enkefaliiniliuos (asetonitriili/vesi 1:1). Sumutuskaasuna käytettiin typpeä virtausnopeudella 800 l/h ja sumutuskaasun lämpötila oli 450 °C. Sumutuskapillaarin jännite oli 3 kV ja ionilähteen lämpötila 120 °C. Näytteensyöttösuppilon jännite oli 25,0 V ja keräyssuppilon jännite 3,0 V. Törmäyskaasuna MS/MS-menetelmässä käytettiin argonia.

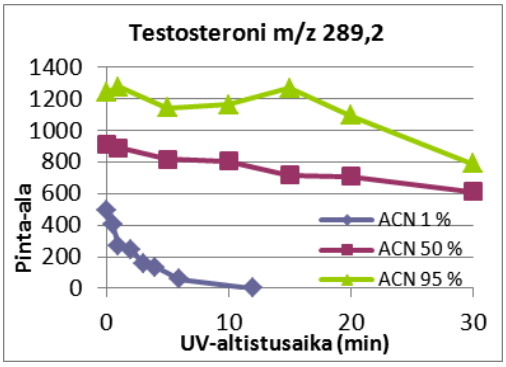
MS-pyyhkäisy suoritettiin massa-alueella 30-560 Da ja pyyhkäisyaika oli 0,1 s. Reaktiotuotteiden etsimisessä ja lähtöionien valinnassa hyödynnettiin Metabolynx-ohjelmaa ja löydettyjä mahdollisia metaboliatuotteita verrattiin Metabolynxilla prosessoinnin lisäksi manuaalisesti 0-näytteisiin. Mikäli vastaavaa piikkiä ei 0-näytteestä löytynyt, valittiin protonoitunut molekyyli lähtöioniksi tuoteionipyyhkäisyyn massa-alueella 30-560 Da. Kunkin lähtöionin tuoteionispektrin pyyhkäisyaika oli 0,1 sekuntia ja samalla ajettiin myös MS-pyyhkäisy, jonka pyyhkäisyaika oli 0,1 s. Samanaikaisia pyyhkäisyjä oli MS-pyyhkäisy mukaan lukien korkeintaan kuusi. HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden samanmassaisten isomeerien retentioaikoja vertailtiin ja mikäli HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa oli muodostunut samalla retentioajalla eluoituva isomeeri, verrattiin sen tuoteionispektrejä kahdella eri törmäysenergialla (CE) toisiinsa. Steroidien optimoidut törmäysenergiat olivat 20 ja 30 V (T), 20 ja 25 V (MT), 15 ja 20 V (MDN), 20 ja 25 V (NAN) sekä 42 ja 47 V (STZ). Masslynx 4.1 -ohjelmaa käytettiin instrumentin hallintaan ja datan käsittelyyn.

3 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

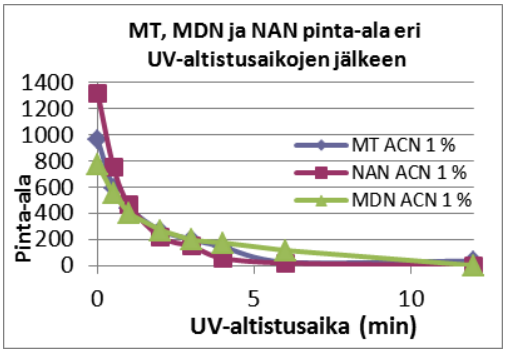
3.1 Liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutus titaanidioksidivalo-katalyyttiseen reaktioon

UV-altistetuille testosteroninäytteille suoritettiin MS-pyyhkäisy. Eristettyjen ionikromatogrammien (XIC) piikit integroitiin, jotta nähtiin, kuinka UV-altistusaika vaikutti lähtöaineen ja reaktiossa muodostuneiden tuotteiden piikkien pinta-aloihin. Kun

näytteen ACN-pitoisuus oli 1 %, havaittiin testosteronin määrän vähenevän nopeasti ja häviävän lähes kokonaan noin kymmenessä minuutissa (Kuva 8A). Kun orgaanisen liuottimen pitoisuus oli suurempi (50 % tai 95 %), lähtöaineen väheneminen hidastui huomattavasti eikä se vähentynyt merkittävästi pidemmilläkään UV-altistusajoilla. Myös muille tutkittaville steroideille toteutettiin vastaavat UV-altistusaikasarjat ACN-pitoisuudella 1 % ja todettiin, että metyylitestosteroni, metandienoni ja nandroloni hajosivat suunnilleen samassa ajassa kuin testosteroni (Kuva 8B). Stanotsololin huonosta vesiliukoisuudesta johtuen sille valittiin ACN-pitoisuus 50 %.



A.

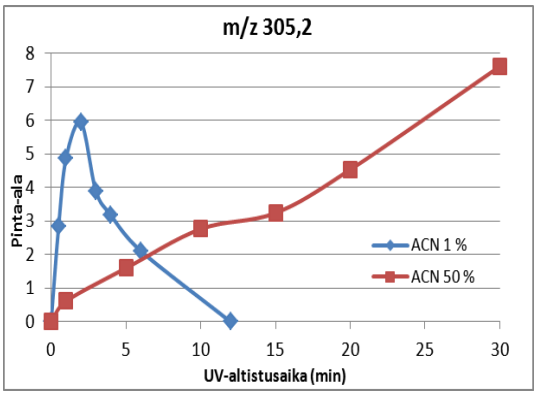


B.

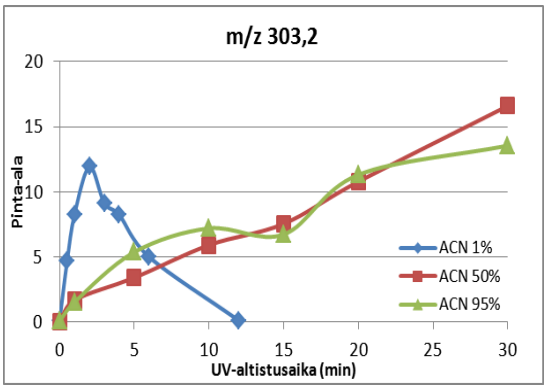
Kuva 8. A: Liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutus testosteronin (*m/z* 289,2) XIC:n piikin pinta-alaan TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa B: MT, MDN ja NAN XIC:en piikkien pinta-alat eri UV-altistusaikojen jälkeen. Kahdesta rinnakkaisesta näytteestä otettiin kaksi injektiota kummastakin ja tulokset on saatu näiden keskiarvosta. ACN:n haihtuminen UV-altistuksen aikana on huomioitu. ACN = asetonitriili, MT = metyylitestosteroni, MDN = metandienoni, NAN = nandroloni

Asetonitriilin haihtuminen reaktioseoksesta pitkillä UV-altistusajoilla huomioitiin ja todettiin, että kun reaktioseoksen asetonitriilipitoisuus oli 50 %, 15 minuutin UV-altistuksessa asetonitriiliä haihtui noin 10 %. Koska tämä työ oli luonteeltaan kvalitatiivinen, todettiin, että haihtumisella ei ole työn tulosten kannalta merkitystä.

Testosteronin TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneistä tuotteista eristettiin ionikromatogrammeja ja integroitiin piikit pinta-alan selvittämiseksi. Tuotteita syntyi nopeasti, kun ACN-pitoisuus oli 1 % ja hitaammin tai ei lainkaan, kun ACN-pitoisuutta kasvatettiin (Kuva 9). Hapetustuotteita M+O (*m/z* 305,2; t_R 2,89 min) ja M+O-2H (*m/z* 303,2; t_R 2,67 min) syntyi nopeasti parin minuutin kuluessa, jonka jälkeen reaktiotuotteiden muodostuminen loppui tai tuotteiden hajoaminen oli nopeampaa kuin niiden muodostuminen.



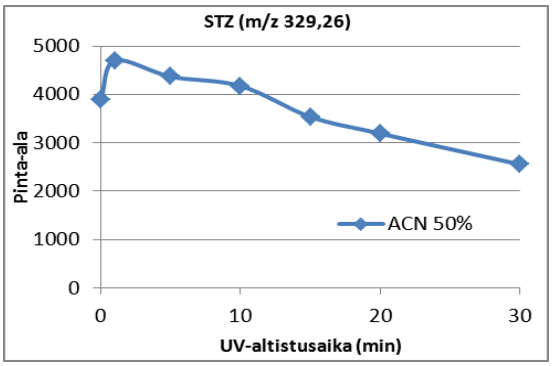
A.



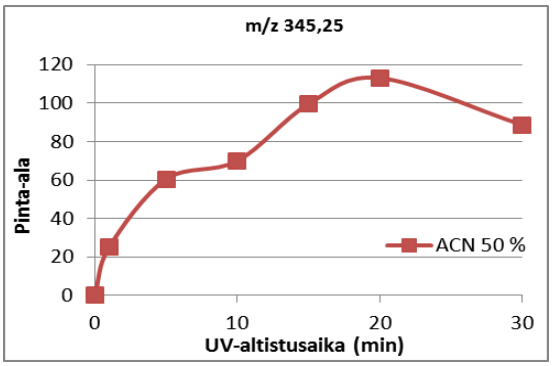
B.

Kuva 9. Liuotinkoostumuksen ja UV-altistusajan vaikutus testosteronin hapetus-tuotteiden piikkien pinta-aloihin TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa. A: M+O *m/z* 305,2 (t_R 2,89 min) B: M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 2,67 min). Kahdesta rinnakkaisesta näytteestä ajettiin kaksi injektiota kummastakin ja tulokset on laskettu näiden keskiarvosta. ACN:n haihtuminen UV-altistuksen aikana on huomioitu. ACN = asetonitriili

Asetonitriilipitoisuus 1 % vastasi parhaiten fysiologista tilannetta ja hapetustuotteita syntyi nopeasti. Siksi testosteronin, metyylitestosteronin, metandienonin ja nandrolonin HLM-reaktioiden ja TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden väliseen vertailuun valittiin olosuhteet, jossa steroidin reaktioseoksessa ACN-pitoisuus oli 1 % ja UV-altistusaika 2 minuuttia. Stanotsololille valittiin huonon vesiliukoisuuden vuoksi ACN-pitoisuus 50 % ja koska niissä olosuhteissa lähtöaineen väheneminen ja tuotteiden muodostuminen oli hitaampaa (Kuva 10), valittiin stanotsololin UV-altistusajaksi 15 minuuttia.



A.



B

Kuva 10. A: UV-altistusajan vaikutus stanotsololin $[M+H]^+$ (*m/z* 329,26) XIC:n piikin pinta-alaan TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa. B: UV-altistusajan vaikutus stanotsololin hapetustuotteen M+O (*m/z* 345,25) XIC:n piikin pinta-alaan TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa. Kahdesta rinnakkaisesta näytteestä otettiin kaksi injektiota kummastakin ja tulokset on saatu näiden keskiarvosta. ACN:n haihtuminen UV-altistuksen aikana on huomioitu. ACN = asetonitriili

3.2 Titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa ja mikrosomi-inkubaatioissa syntyvät tuotteet ja niiden vertailu

Kaikilla tutkittavilla yhdisteillä intensiivisin piikki MS-spektrissä oli protonoitunut molekyyli $[M+H]^+$. Tämä on tyypillistä niille steroideille, joilla on riittävän korkea protoniaffiniteetti ja jokin konjugoitunut osa rakenteessaan, esimerkiksi 4-eeni-3-oni-rakenne.[72] Tutkimuksissa on osoitettu, että A-renkaan ketofunktiolla on suurempi protoniaffiniteetti kuin alkeenilla.[73] Analyytit protonoituvat siis todennäköisimmin hiilen C3 karbonyylihapen kohdalta. Stanotsololilla on muihin tutkittaviin yhdisteisiin verrattuna korkeampi protoniaffiniteetti, mikä johtuu sen rakenteessa olevasta pyratsolirenkaasta. Myös metandienonin 1,4-dieeni-3-oni -rakenne lisää sen protoniaffiniteettia.[74]

Mikäli tutkittavien steroidien HLM-inkubaatioissa tai TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneet tuotteet olisivat rakenteeltaan kokonaan tai lähes kokonaan konjugoitumattomia, havaittaisiin ne jonkinlaisina addukteina (esim. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ tai $[M+NH_4]^+$).[10] Siksi tutkittavien yhdisteiden mahdollisista, erityisesti pelkistystuotteiden massalla esiintyvistä, reaktiotuotteista etsittiin Metabolynxillä prosessoinnin lisäksi manuaalisesti näitä addukteja mutta niitä ei löydetty. Tästä pääteltiin, että testosteronin, metyylitestosteronin, metandienonin, ja nandrolonin 4-

eeni-3-oni-rakenne säilyi myös HLM-inkubaatioiden ja TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden aikana.

Jokaisen tutkitun yhdisteen ja niiden HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden tuoteionipyyhkäisyt suoritettiin kahdella, aiemmin optimoidulla törmäysenergialla. Testosteronin, metyylitestosteronin, metandienonin, nandrolonin ja näiden steroidien reaktiotuotteiden tuoteionipyyhkäisyssä käytetyt törmäysenergiat olivat 15-30 V välillä. Stanotsololin ja sen reaktiotuotteiden tuoteionipyyhkäisy suoritettiin 42 ja 47 V törmäysenergioilla. Stanotsololin pilkkoutuminen vaatii korkeamman törmäysenergian, koska stanotsololin rakenteessa oleva pyratsolirengas mahdollistaa ionisoituneen molekyylin stabiloitumisen resonanssin kautta.[75]

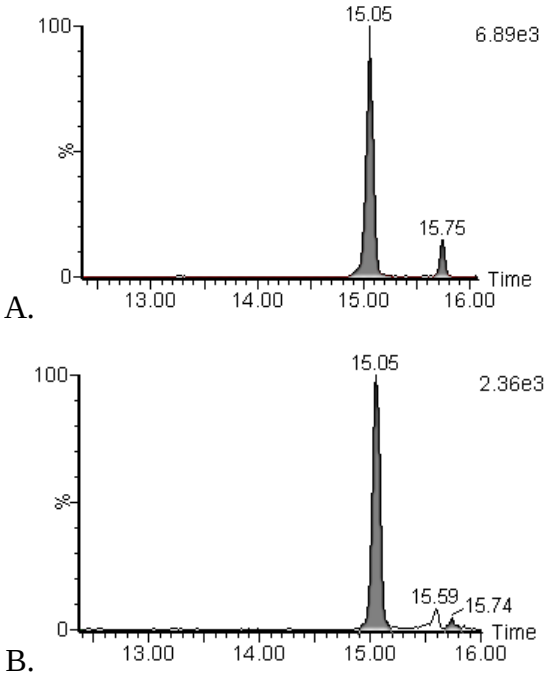
Stanotsololia lukuun ottamatta, kaikille tutkituille yhdisteille oli tyypillistä veden lohkeaminen. Steroidista riippuen veden lohkeamisia havaittiin yksi tai kaksi. Veden lohkeaminen on rakenteesta riippuvainen ominaisuus.[72] Yhden vesimolekyylin lohkeaminen viittaa konjugoituneeseen rakenteeseen ja kahden vesimolekyylin lohkeaminen vähemmän konjugoituneeseen rakenteeseen.[76]

Jokaisen tutkittavan yhdisteen kohdalla HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneitä samanmassaisia tuotteita verrattiin keskenään. Vertailu tapahtui tarkan massan lisäksi retentioajan perusteella. Mikäli molempien reaktioiden tietyn massan XIC:ssa oli samalla retentioajalla piikki, jota ei ollut 0-näytteessä, verrattiin näiden yhdisteiden tuoteionispektrejä kahdella eri törmäysenergialla toisiinsa. Tuoteionispektrien yhdenmukaisuus arvioitiin ja taulukoitiin (Taulukot 4-8). Mikäli retentioaika ja tuoteionispektrit olivat samat tai lähes samat, merkittiin tuotteen kohdalle kolme tähteä (***). Jos tuoteionispektreissä oli eroavaisuuksia mutta retentioaika oli sama, merkittiin yhdisteen kohdalle kaksi tähteä (**). Mikäli tuoteionispektreissä oli paljon eroja mutta retentioaika kuitenkin sama tai lähes sama, merkittiin reaktiotuote yhdellä tähdellä (*).

Taulukoiden 4-8 lisäksi tulososiossa on esitetty HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden XIC:t niillä *m/z*–arvoilla, joilla molemmissa reaktioissa syntyi isomeerejä samoilla retentioajoilla. Tulososioon on lisäksi valittu muutamia tuoteionispektrejä, joiden avulla havainnollistettiin, miten HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa samalla *m/z*–arvolla ja retentioajalla esiintyneiden isomeerien tuoteionispektrien samankaltaisuus arvioitiin. Kaikki HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden XIC:t ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty työn tulososiossa, on koottu liitteisiin 1-5.

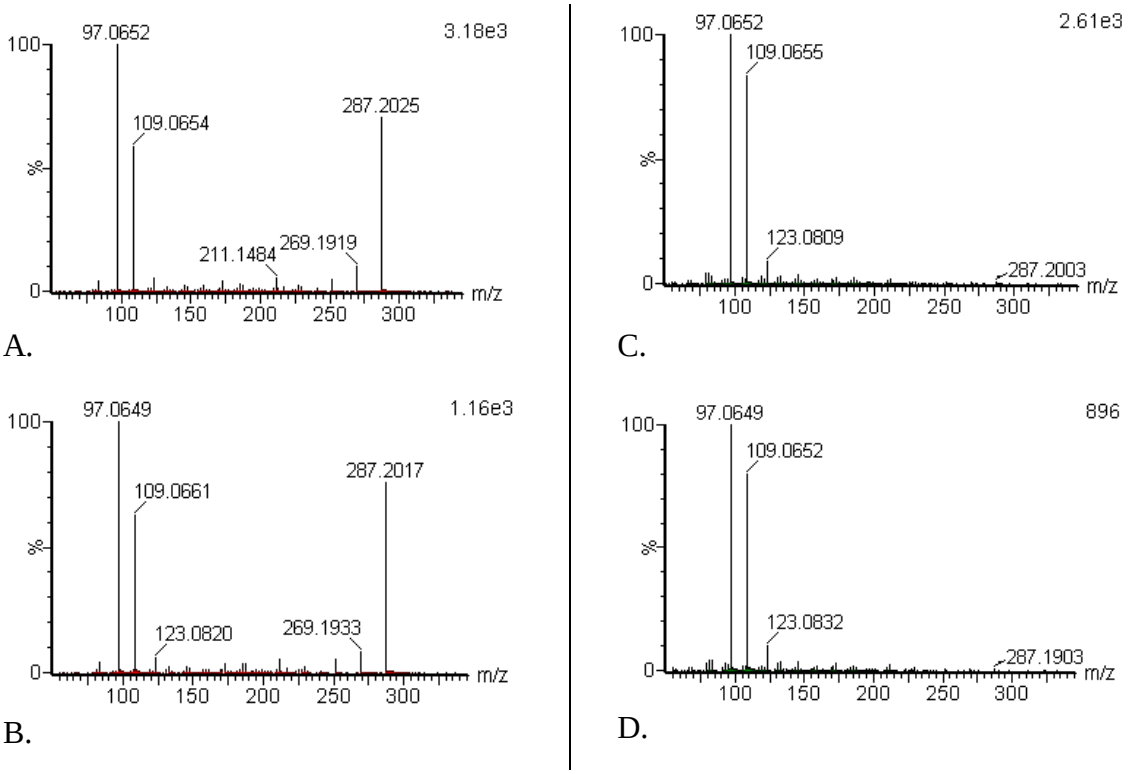
3.2.1 Testosteroni

Testosteronin retentioaika oli 16,02 min ja kaikki HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa muodostuneet tuotteet eluoituivat 6,12 min ja 15,75 min välillä (Taulukko 4). Testosteronin HLM- ja TiO_2-reaktioissa muodostui hapetustuotteita, joiden *m/z*-arvo oli 287,2 (Kuva 11) (Taulukko 4) (Liite 1). Tarkan massan avulla pääteltiin, että molekyylistä irtoaa kaksi vetyatomia, jolloin yhdisteeseen muodostuu uusi kaksoissidos. Reaktio on nimeltään dehydrogenaatio (M-2H). Eristetyissä ionikromatogrammeissa havaittiin kaksi retentioaikaa (15,05 min ja 15,75 min), jotka olivat samat sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyysireaktioissa ja ne on merkitty eristettyihin ionikromatogrammeihin tummennettuina (Kuva 11). Korkein kromatogrammin piikeistä (t_R 15,05 min) oli androsteenidioni, yksi testosteronin päämetaboliiteista. Tulos varmistettiin vertaamalla HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden yhdisteiden tuoteionispektrejä standardiyhdisteen tuoteionispektriin.



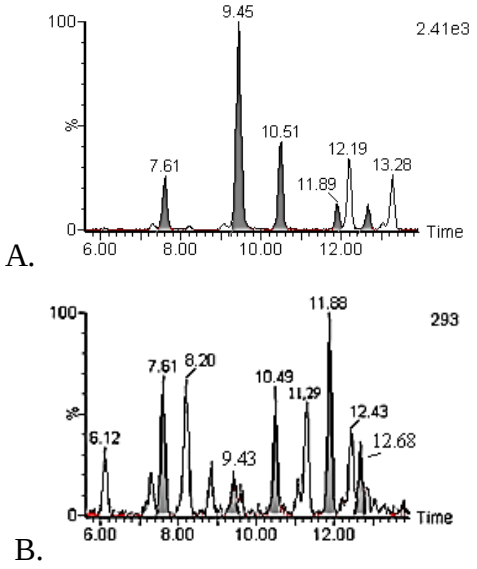
Kuva 11. XIC testosteronin hapetustuotteesta M-2H (*m/z* 287,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio.

Androsteenidionin tuoteionispektreissä havaittiin lähtöionin (*m/z* 287,2) lisäksi testosteronin rakenteelle tyypilliset tuoteionit *m/z* 97, *m/z* 109 sekä pienempänä *m/z* 123 (Kuva 12, A-D).[72] Näiden fragmenttien rakenne- ja molekyylikaavat on esitetty kirjallisuudessa.[72,77] Alhaisemmalla törmäysenergialla (CE 20 V) nähtiin lisäksi kaksi tuoteionia (*m/z* 269 ja *m/z* 251), jotka olivat syntyneet veden lohkeamisen seurauksena. Törmäysenergian ollessa korkeampi (CE 30 V) lähtöionin intensiteetti pieneni tai se hävisi lähes kokonaan eikä veden lohkeamisia enää havaittu. Tuoteionispektrejä vertaamalla todettiin, että intensiivisemmät piikit olivat HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa syntyneillä yhdisteillä samat ja molemmilla törmäysenergioilla piikkien intensiteettisuhteet olivat samanlaiset. Massan, retentioajan ja tuoteionispektrien samankaltaisuuden perusteella todettiin, että molemmissa reaktioissa muodostui sama dehydrogenoitunut reaktiotuote.



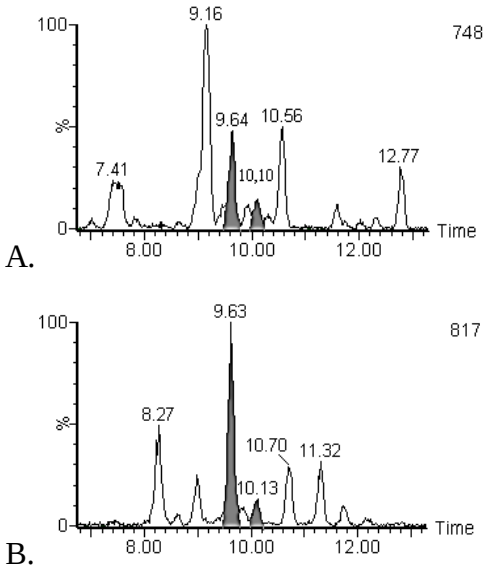
Kuva 12: T: tuoteionispektrit hapetustuotteesta M-2H *m/z* 287,2 (t_R 15,05 min) A: HLM CE 20 V B: TiO_2 CE 20 V C: HLM CE 30 V D: TiO_2 CE 30 V. Kuva on esimerkki tapauksesta, jossa tuoteionispektrit ovat hyvin samankaltaiset ja isomeeri on merkitty taulukkoon 4 kolmella tähdellä (***). HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalo-katalyyttinen reaktio.

Testosteronin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi useilla eri retentioajoilla yhdisteitä, joiden *m/z*-arvo 305,2 vastasi hydroksylaatiota M+O (Kuva 13) (Taulukko 4). Löydettiin viisi isomeeriä, joiden retentioajat olivat samat molemmissa reaktioissa (Taulukko 4). Lisäksi TiO_2-valokatalyysireaktioissa syntyi *m/z*-arvolla 305,2 isomeerejä, joita ei muodostunut HLM-reaktioissa ja päinvastoin (Liite 1). Hydroksyloitunut tuote on lähtöainetta polaarisempi, jolloin sillä on vähemmän vuorovaikutuksia kolonnin poolittoman stationäärifaasin kanssa. Tästä seuraa, että retentioajat ovat hydroksyloituneilla tuotteilla lähtöainetta lyhyempiä.



Kuva 13. XIC testosteronin hapetustuotteesta M+O (*m/z* 305,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Testosteronin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi useita isomeerejä myös *m/z*-arvolla 303,2 (Kuva 14) (Taulukko 4). Reaktio on hydroksylaatio + dehydrogenaatio (M+O-2H). Eristetyistä ionikromatogrammeista löydettiin kaksi isomeeriä, joilla oli sama retentioaika sekä HLM-inkubaatioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa (10,10 min ja 9,64 min). TiO_2-valokatalyysireaktioissa syntyi samalla *m/z*-arvolla muitakin isomeerejä, joita ei syntynyt HLM-reaktioissa ja päinvastoin (Liite 1).



Kuva 14. XIC testosteronin hapetustuotteesta M+O-2H (*m/z* 303,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Osa testosteronin HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneistä tuotteista eluoitui toisiinsa verrattuna eri retentioajoilla. Lisäksi HLM-reaktiossa syntyi kaksi isomeeriä *m/z*–arvolla 285,2 (M-4H) (Taulukko 4) (Liite 1).

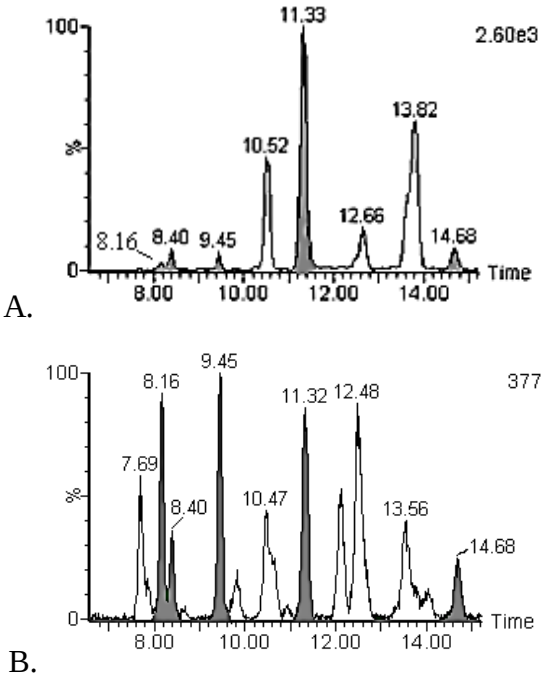
TAULUKKO 4: Testosteronin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneet tuotteet; retentioajat ja tuoteionispektrien samankaltaisuuden arviointi. t_R (min) = retentioaika minuutteina, HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio, o = tuote havaittu, *** = tuoteionispektrit hyvin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitakin eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.

Reaktiotuote	***m/z***	**Reaktio**	**t_R (min)**	**HLM**	**TiO_2**	**Spektrien yhdenmukaisuus**
M-2H	287,2	dehydrogenaatio	15,75	o	o	**
			15,59		o	
			15,05	o	o	***
M+O	305,2	hydroksylaatio	13,28	o		
			12,68	o	o	**
			12,43		o	
			12,19	o		
			11,89	o	o	*
			11,29		o	
			10,51	o	o	**
			9,45	o	o	*
			8,20		o	
			7,61	o	o	***
			6,12		o	
M+O-2H	303,2	hydroksylaatio, dehydrogenaatio	12,77	o		
			11,32		o	
			10,70		o	
			10,56	o		
			10,10	o	o	**
			9,64	o	o	***
			9,16	o		
			8,27		o	
			7,41	o		
M-4H	285,2	2x dehydrogenaatio	14,48	o		
			12,62	o		

3.2.2 Metyylitestosteroni

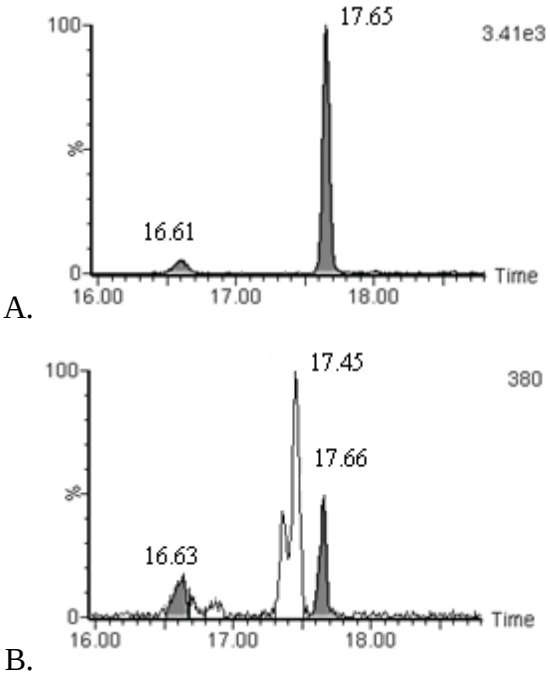
Metyylitestosteroni eluoitui ajassa 17,86 min ja kaikkien HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden retentioajat olivat 5,53 min ja 17,64 min välillä (Taulukko 5). Metyylitestosteronin HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa syntyi isomeerejä *m/z*-arvolla 319,2 ja reaktio oli

hydroksylaatio M+O (Kuva 15). XIC:sta löydettiin viisi isomeeriä, joilla oli samat retentioajat sekä HLM-inkubaatioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa. Lisäksi TiO_2-valokatalyysireaktiossa syntyi *m/z*-arvolla 319,2 isomeerejä, jota ei syntynyt HLM-reaktioissa ja päinvastoin (Taulukko 5) (Liite 2).



Kuva 15. XIC metyylitestosteronin hapetustuotteesta M+O (*m/z* 319,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Metyylitestosteronin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi myös useita dehydrogenaatiotuotteita M-2H (m/z 301,2) (Taulukko 5). Kahdella isomeerillä todettiin sama retentioaika molemmissa reaktioissa (Kuva 16). Metyylitestosteronilla ei ole rakenteessaan sekundääristä hydroksyyliryhmää, joka voisi hapettua ketoniksi kuten esimerkiksi testosteronilla. Metyylitestosteronin dehydrogenaatio voi tapahtua esimerkiksi siten, että molekyyliin liittyy OH-ryhmä, joka lohkeaa vetenä pois, jolloin molekyyliin muodostuu uusi kaksoissidos.

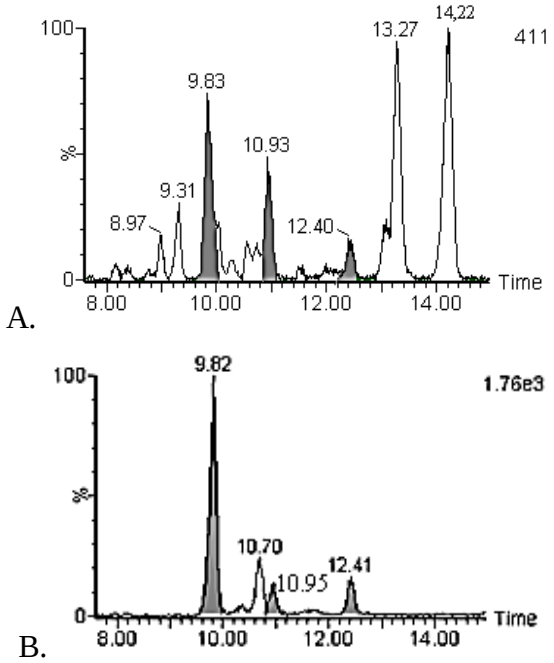


Kuva 16. XIC metyylitestosteronin hapetustuotteesta M-2H (*m/z* 301,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Metyylitestosteronin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa muodostui myös isomeerejä, joiden *m/z*-arvo oli 317,2 (Kuva 17) (Taulukko 5). Reaktio oli hydroksylaatio + dehydrogenaatio (M+O-2H). XIC:sta löydettiin kolme isomeeriä, joilla oli samat retentioajat HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa (12,41 min, 10,95 min ja 9,82 min). HLM-reaktioissa syntyi lisäksi joitakin isomeerejä, joita ei muodostunut TiO_2-valokatalyysireaktiossa (Liite 2).

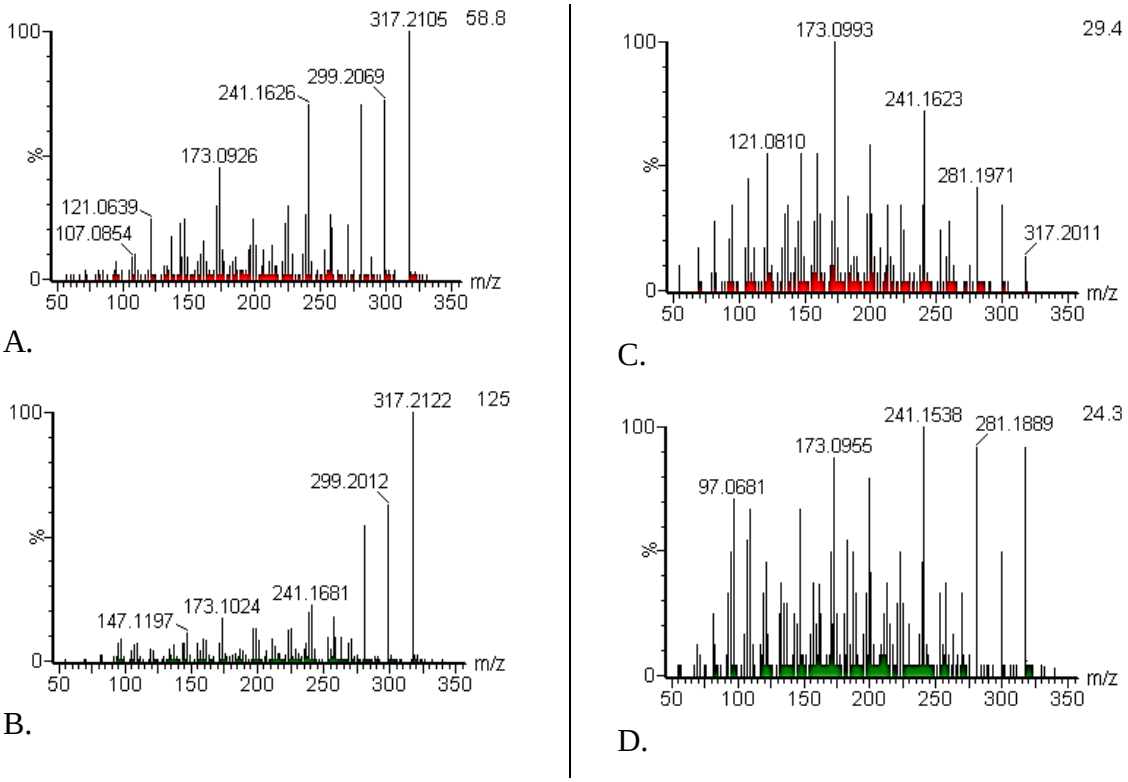
TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa hydroksylaatiotuotteiden XIC:n piikkien korkeus oli kertaluokkaa pienempi kuin reaktiossa, jossa tapahtui hydroksylaatio + dehydrogenaatio (Kuvat 15 B ja 17 B). Tämä voi johtua hapetustuotteiden erilaisesta ionisoitumisesta tai mikäli oletetaan, että molemmat reaktiotuotteet ionisoituivat yhtä hyvin, voidaan päätellä, että hydroksylaatiotuotteita muodostui vähemmän kuin hydroksylaatio + dehydrogenaatiotuotteita. On mahdollista, että TiO_2-valokatalyysireaktioissa muodostuneet hydroksylaatiotuotteet hajosivat valokatalyyttisesti tai reagoivat edelleen muodostaen dehydrogenaatiotuotteen. HLM-reaktioissa tilanne oli päinvastainen eli hydroksylaatiotuotteiden piikkien intensiteetti oli suurempi kuin hydroksylaatio + dehydrogenaatiotuotteiden (Kuvat 15 A ja 17 A). HLM-inkubaatioiden ja TiO_2-

valokatalyyttisten reaktioiden XIC:en piikkien korkeuksia ei voitu suoraan verrata keskenään, koska reaktioissa lähtöaineiden konsentraatiot eivät olleet samat ja näytteitä oli konsentroitu eri tavalla.



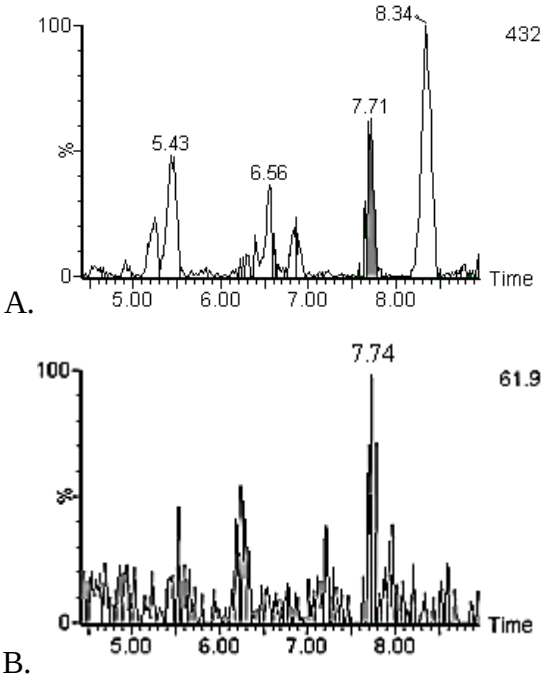
Kuva 17. XIC metyylitestosteronin hapetustuotteesta M+O-2H (*m/z* 317,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa retentioajalla 10,95 min eluoituneen yhdisteen tuoteionispektreissä havaittiin lähtöioni (*m/z* 317,2) sekä veden lohkeamisia (*m/z* 299 ja *m/z* 281) (Kuva 18, A ja B). Tuoteionispektrien piikit HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa olivat samat vaikka piikkien intensiteettisuhteet olivat erilaiset (Kuva 18 A-D). Esimerkkiyhdiste oli retentioajan (10,95 min) perusteella todennäköisesti sama tuote sekä HLM-reaktiossa että TiO_2-valokatalyysireaktiossa, mutta spektrit poikkesivat toisistaan. Eräs vaikuttava tekijä saattoi olla se, että TiO_2-valokatalyysireaktion XIC:ssa piikki ei ollut täysin erottunut viereisestä piikistä (Kuva 17, B).



Kuva 18: MT: tuoteionispektrit hapetustuotteesta M+O-2H *m/z* 317,2 (t_R 10,95 min) A: HLM CE 20 V B: TiO_2 CE 20 V C: HLM CE 25 V D: TiO_2 CE 25 V. Kuva on esimerkki tapauksesta, jossa tuoteionispektreissä oli joitakin eroavaisuuksia mutta retentioaika oli sama, joten isomeeri on merkitty taulukkoon 5 kahdella tähdellä (**). HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio.

Metyylitestosteronin HLM-inkubaatioissa muodostui myös dihydroksylaatiotuotteita M+2O (*m/z* 335,2) (Kuva 19, A) (Taulukko 5) (Liite 2). TiO_2-valokatalyysireaktion XIC:ssa ei havaittu kunnollisia piikkejä mutta retentioaika (7,71 min) oli sama kuin HLM-reaktiossa syntyneessä tuotteessa (Kuva 19, B). TiO_2-valokatalyysireaktion XIC:n intensiteetti oli kuitenkin heikko eikä kunnollista, vertailun mahdollistavaa, tuoteionispektriä saatu.



Kuva 19. XIC metyylitestosteronin hapetustuotteesta M+2O (*m/z* 335,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

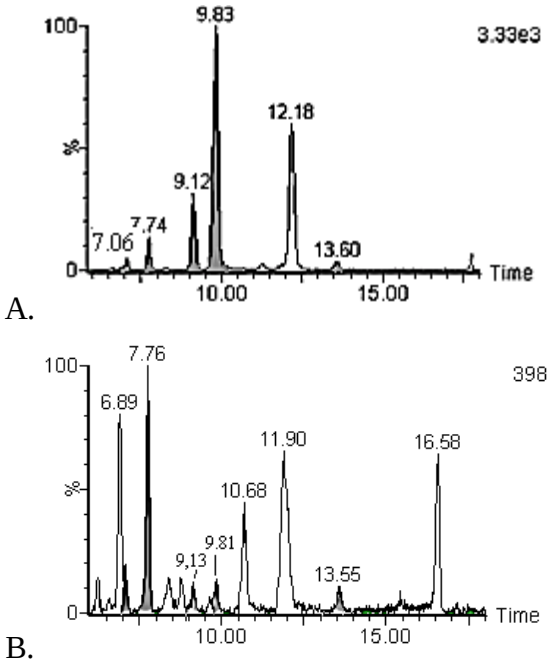
Edellä mainittujen hapetustuotteiden lisäksi metyylitestosteronin TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi yhdisteitä muilla *m/z*-arvoilla (Taulukko 5) (Liite 2). Joissakin tapauksissa *m/z*-arvojen eikä niitä vastaavien tuoteionispektrien perusteellakaan pystytty sanomaan, millainen reaktiotuote voisi olla kyseessä. Koska näitä tuotteita ei kuitenkaan muodostunut HLM-inkubaatioissa, niihin ei perehdytty yksityiskohtaisesti.

TAULUKKO 5: Metyylitestosteronin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneet tuotteet; retentioajat ja tuoteionispektrien samankaltaisuuden arviointi. t_R (min) = retentioaika minuutteina, HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio, o = tuote havaittu, *** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitakin eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.

Reaktiotuote	***m/z***	**Reaktio**	**t_R (min)**	**HLM**	**TiO_2**	**Spektrien yhdenmukaisuus**
M-2H	301,2	dehydrogenaatio	17,65	o	o	***
			17,45		o	
			16,63	o	o	**
M+O	319,23	hydroksylaatio	14,68	o	o	***
			13,82	o		
			13,56		o	
			12,66	o		
			12,48		o	
			12,11		o	
			11,33	o	o	***
			10,52	o		
			10,47		o	
			9,84		o	
			9,45	o	o	***
			8,40	o	o	***
			8,16	o	o	***
			7,69		o	
M+O-2H	317,2	hydroksylaatio,	14,22	o		
		dehydrogenaatio	13,27	o		
			12,41	o	o	**
			10,95	o	o	**
			10,70		o	
			9,82	o	o	**
			9,31	o		
			8,97	o		
M+2O	335,2	dihydroksylaatio	8,34	o		
			7,74	o	o	*
			6,56	o		
			5,43	o		
M+2O-2H	333,2	dihydroksylaatio,	6,79		o	
		dehydrogenaatio	5,53		o	
M+19	322,2		6,29		o	

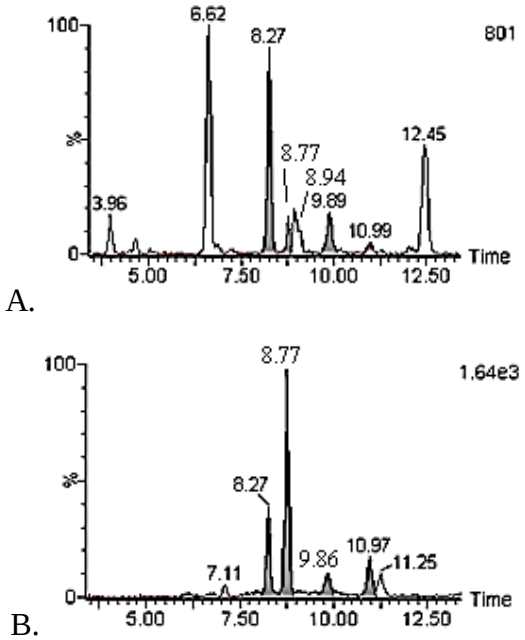
3.2.3 Metandienoni

Metandienonin retentioaika oli 17,86 min ja kaikki HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa havaitut tuotteet eluoituivat 3,95 min ja 16,58 min välillä (Taulukko 6). Metandienonin reaktioissa syntyi useita hydroksylaatiotuotteita M+O (*m/z* 317,2) (Kuva 20). XIC:ssa havaittiin viisi retentioaikaa, jotka olivat samat sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyysireaktioissa. TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa syntyi useampia isomeerejä kuin HLM-inkubaatioissa mutta piikit olivat pieniä. Retentioajat olivat erilaisia eri isomeereillä, mikä johtuu ainakin hydroksyyliryhmän sijainnista molekyylissä. Lisäksi esimerkiksi α- ja β-muodoilla saattaa olla erilaiset retentioajat. Muun muassa oksandrolonilla on todettu, että 17α-metyyli-,17β-hydroksyyli-konfiguraatiolla on selvästi lyhyempi retentioaika kuin 17β-metyyli-,17α-hydroksyyli-konfiguraatiolla.[74] Kaikkien metandienonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden hydroksylaatiotuotteiden tuoteionispektrit kahdella eri törmäysenergialla on esitetty liitteessä 3.



Kuva 20. XIC metandienonin hapetustuotteesta M+O (*m/z* 317,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

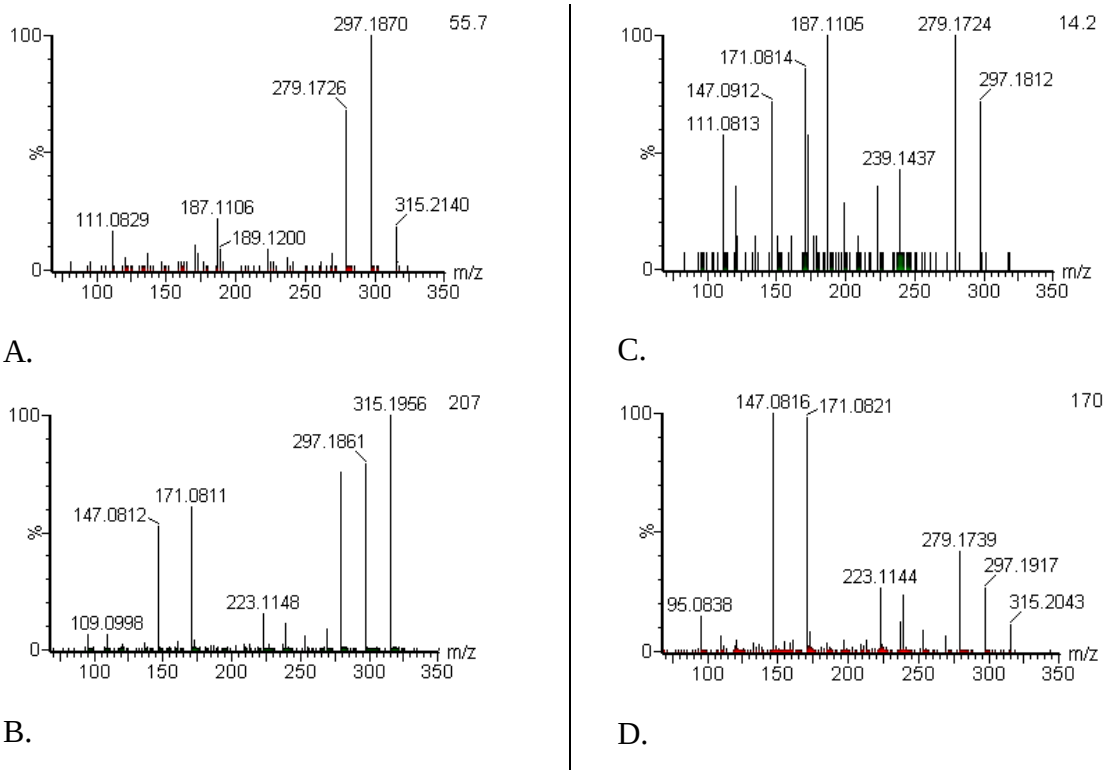
Metandienonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa tapahtui myös hydroksylaatio + dehydrogenaatio M+O-2H (*m/z* 315,2). Läydettiin useita isomeerejä, joista neljällä oli sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyysireaktioissa sama retentioaika (Kuva 21) (Taulukko 6) (Liite 3).



Kuva 21. XIC metandienonin hapetustuotteesta M+O-2H (*m/z* 315,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Isomeeri, joka eluoitui ajassa 10,97 min, esiintyi molemmissa reaktioissa ja sen tuoteionispektrejä verrattiin toisiinsa kahdella eri törmäysenergialla (Kuva 22). Alhaisemmalla törmäysenergialla (CE 15 V) näkyi molemmissa reaktioissa lähtöionin (*m/z* 315,2) lisäksi veden lohkeamisia (*m/z* 297 ja *m/z* 279). TiO_2-valokatalyysireaktioissa yhdisteen tuoteionispektrissä näkyi lisäksi intensiivisinä tuoteionit *m/z* 171 ja *m/z* 147, joita ei HLM-reaktioissa muodostuneen yhdisteen tuoteionispektrissä ollut selkeästi havaittavissa. Korkeammalla törmäysenergialla (CE 20 V) HLM-inkubaatiossa muodostuneen yhdisteen tuoteionispektreissä esiintyivät tuoteionit *m/z* 187 ja *m/z* 111, joita ei puolestaan TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa syntyneen tuotteen tuoteionispektreissä havaittu. HLM-reaktiossa muodostuneen yhdisteen tuoteionispektrissä oli paljon taustaa, mikä johtui heikosta intensiteetistä (Kuva 22 C). Suuret intensiteettierot HLM-reaktioiden ja TiO_2-valokatalyyttisten

reaktioiden välillä vaikeuttivat spektrien vertailua ja tässä tapauksessa ei voitu todeta reaktiotuotteiden olevan samoja.



Kuva 22: MDN: hapetustuote M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 10,97 min) A: HLM CE 15 V B: TiO_2 CE 15 V C: HLM CE 20 V D: TiO_2 CE 20 V. Kuva on esimerkki tapauksesta, jossa tuoteionispektreissä oli useita eroavaisuuksia mutta retentioaika oli sama, joten isomeeri on merkitty taulukkoon 6 yhdellä tähdellä (*). HLM = humaani-mikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio.

Muun muassa Schänzer ja Donike (1991) ovat tutkimuksissaan raportoineet metandienonin metaboliassa syntyvän dihydroksylaatiotuotteita, kun 6β-hydroksimetandienoni hydroksyloituu edelleen.[17] Metandienonin HLM-inkubaatioissa syntyi dihydroksylaatiotuotteita M+2O (*m/z* 333,2) ja myös TiO_2-valokatalyysireaktioissa oli havaittavissa piikkejä samalla *m/z*-arvolla (Taulukko 6) (Liite 3). Alhaisen intensiteetin vuoksi kunnollisia tuoteionispektrejä ei kuitenkaan saatu ja lisäksi molemmissa reaktioissa syntyneiden isomeerien retentioajat eivät olleet yhdenmukaisia.

Metandienonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi myös dehydrogenaatiotuotteita M-2H (*m/z* 299,2), mutta yhteisiä retentioaikoja ei löytynyt (Taulukko 6). Lisäksi havaittiin *m/z*-arvoja, joita esiintyi ainoastaan HLM-reaktioissa tai TiO_2-valokatalyysireaktiossa (Taulukko 6) (Liite 3). Joidenkin tuotteiden kohdalla ei *m/z*-arvon tai sitä vastaavien tuoteionispektrien perusteella pystytty sanomaan, mikä reaktiotuote olisi kyseessä.

TAULUKKO 6: Metandienonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneet tuotteet; retentioajat ja spektrien samankaltaisuuden arviointi. t_R (min) = retentioaika minuutteina, HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio, o = tuote havaittu, *** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitakin eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.

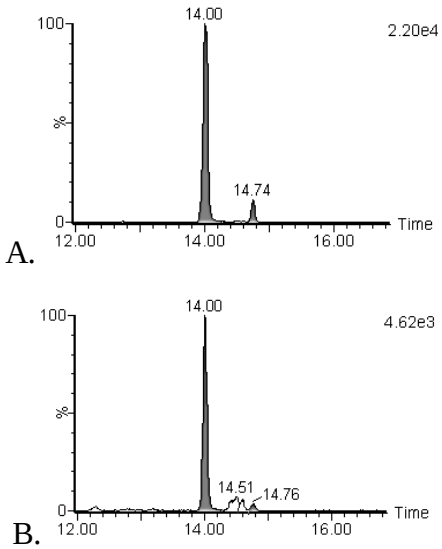
Reaktiotuote	*m/z*	Reaktio	t_R (min)	HLM	TiO_2	Spektrien yhdenmukaisuus
M+O	317,21	hydroksylaatio	16,58		o	
			13,55	o	o	**
			12,18	o		
			11,90		o	
			10,68		o	
			9,81	o	o	**
			9,13	o	o	*
			7,74	o	o	***
			7,06	o	o	**
			6,89		o	
M+O-2H	315,20	hydroksylaatio, dehydrogenaatio	12,45	o		
			11,25		o	
			10,97	o	o	*
			9,86	o	o	***
			8,94	o		
			8,77	o	o	***
			8,27	o	o	***
			7,11		o	
			6,62	o		
			3,96	o		
M+2O	333,2	dihydroksylaatio	6,60	o		
			4,64	o		
			3,95	o		
M+12	313,2		5,57		o	
			4,89		o	
			4,30	o		
M+2O-2H	331,2	dihydroksylaatio, dehydrogenaatio	9,82	o		
M+20	321,2		12,20		o	
			8,28		o	
M-2H-CH_2	285,2		13,45		o	
M-2H	299,2	dehydrogenaatio	17,88	o		
			17,32		o	
			17,15		o	

Taulukko 6 jatkuu edelliseltä sivulta

Reaktiotuote	*m/z*	Reaktio	t_R (min)	HLM	TiO_2	Spektrien yhdenmukaisuus
M-12	289,2		18,16		o	
M+42	343,2		18,99	o		
			18,46	o		

3.2.4 Nandroloni

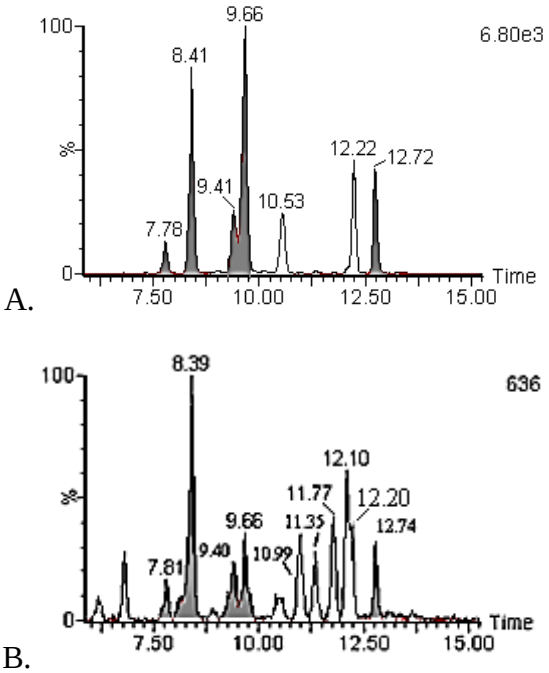
Nandroloni eluoitui ajassa 15,01 min ja kaikkien HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden retentioajat olivat 6,21 min ja 14,76 min välillä (Taulukko 7). Nandrolonin HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi dehydrogenaatiotuotteita M-2H (*m/z* 273,2). Nandrolonin rakenteessa hiilestä C17 puuttuu metyyliryhmä, joka estäisi sekundäärisen OH-ryhmän hapettumisen ketoniksi. Suurimman piikin kohdalla (t_R 14,00 min) on kyse todennäköisesti juuri hiilen C17 hapettumisesta (Kuva 23). Kaikkien nandrolonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden dehydrogenaatiotuotteiden tuoteionispektrit kahdella eri törmäysenergialla on esitetty liitteessä 4.



Kuva 23. XIC nandrolonin hapetustuotteesta M-2H (*m/z* 273,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

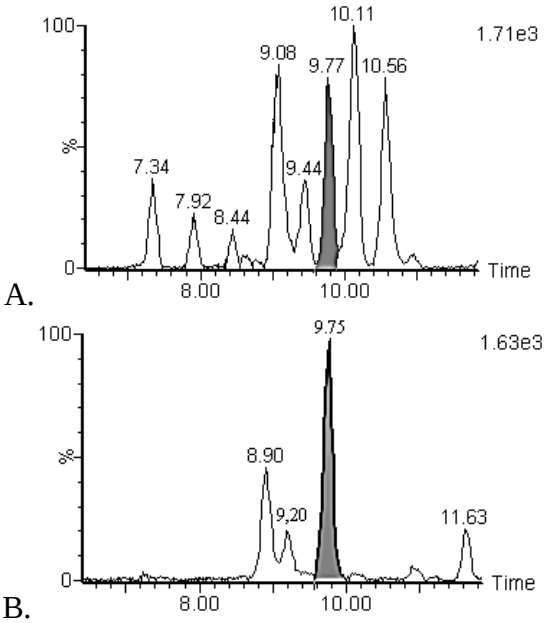
Nandrolonin HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa syntyi myös hydroksylaatiotuotteita M+O (*m/z* 291,2). Molemmista reaktioista löytyi viisi isomeeriä, joiden retentioajat olivat yhdenmukaiset (Kuva 24). TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi lisäksi useita isomeerejä, joita HLM-reaktioissa ei muodostunut (Taulukko 7) (Liite 4).

HLM-inkubaatioiden ja TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden analysoimisessa käytettyä gradienttia ei optimoitu jokaiselle reaktiotuotteelle erikseen vaan kaikki tuotteet analysoitiin samassa ajossa. Tämän vuoksi kaikkia piikkejä ei saatu täydellisesti erottumaan. Esimerkiksi nandrolonin TiO_2-valokatalyysireaktion eristetyssä ioni-kromatogrammissa (*m/z* 291,2) näkyi piikki, joka oli huonosti erottunut viereisestä, retentioajalla 12,10 min eluoituneesta, piikistä (Kuva 24, B). Retentioaika oli suunnilleen sama HLM-reaktiossa syntyneen isomeerin kanssa (t_R 12,22 min). Piikkien huonon erottumisen vuoksi luotettavaa, vertailukelpoista tuoteionispektriä ei kuitenkaan saatu.



Kuva 24. XIC nandrolonin hapetustuotteesta M+O (*m/z* 291,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Nandrolonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi myös useita isomeerejä *m/z*-arvolla 289,2 (Taulukko 7) (Liite 4). HLM-reaktioissa syntyi useampia isomeerejä kuin TiO_2-valokatalyysireaktioissa. Reaktio oli hydroksylaatio + dehydrogenaatio M+O-2H (*m/z* 289,2). Retentioajalla 9,75 min oli molempien reaktioiden XIC:ssa piikki (Kuva 25). Retentioaikojen ja tuoteionispektrien perusteella todettiin, että sama hapetustuote syntyi sekä HLM-inkubaatioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa (Liite 4).



Kuva 25. XIC nandrolonin hapetustuotteesta M+O-2H (*m/z* 289,2)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

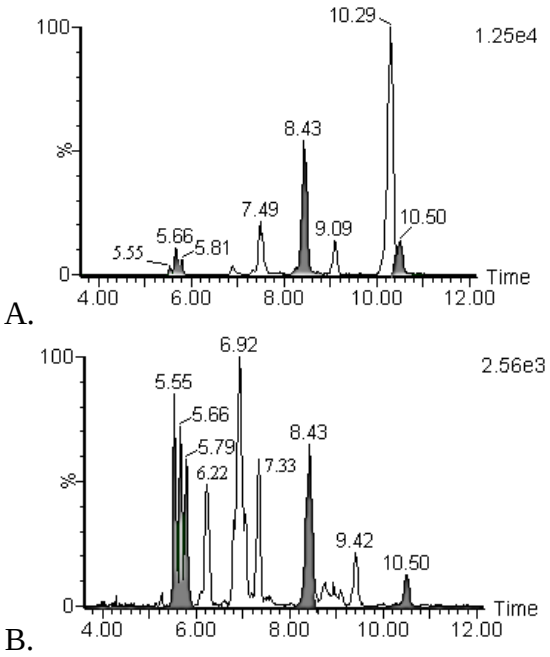
Nandrolonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi edellisten reaktiotuotteiden lisäksi tuotteita eri *m/z*-arvoilla (Liite 4). Reaktiotuotteet syntyivät ainoastaan HLM-reaktioissa tai TiO_2-valokatalyysireaktiossa tai sitten yhteisiä retentioaikoja ei ollut. Joidenkin tuotteiden kohdalla ei *m/z*-arvon tai sitä vastaavien tuoteionispektrien perusteella pystytty sanomaan, mikä reaktiotuote olisi kyseessä.

TAULUKKO 7: Nandrolonin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneet tuotteet; retentioajat ja spektrien samankaltaisuuden arviointi. t_R (min) = retentioaika minuutteina, HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio, o = tuote havaittu, *** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitakin eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.

Reaktiotuote	***m/z***	**Reaktio**	**t_R (min)**	**HLM**	**TiO_2**	**Spektrien yhdenmukaisuus**
M-2H	273,2	dehydrogenaatio	14,76	o	o	**
			14,51		o	
			14,00	o	o	***
M+O	291,2	hydroksylaatio	12,74	o	o	*
			12,22	o		
			12,10		o	
			11,77		o	
			11,35		o	
			10,99		o	
			10,53	o		
			9,66	o	o	**
			9,41	o	o	**
			8,39	o	o	***
			7,78	o	o	**
M+O-2H	289,2	hydroksylaatio,	11,63		o	
		dehydrogenaatio	10,56	o		
			10,11	o		
			9,75	o	o	***
			9,44	o		
			9,20		o	
			9,08	o		
			8,90		o	
			8,44	o		
			7,92	o		
			7,34	o		
M+2O	307,2	dihydroksylaatio	6,21	o		
M+20	295,2		5,31		o	
M+44	319,2		13,22		o	
			12,78		o	
			12,36		o	
M+46	321,2		13,04		o	

3.2.5 Stanotsololi

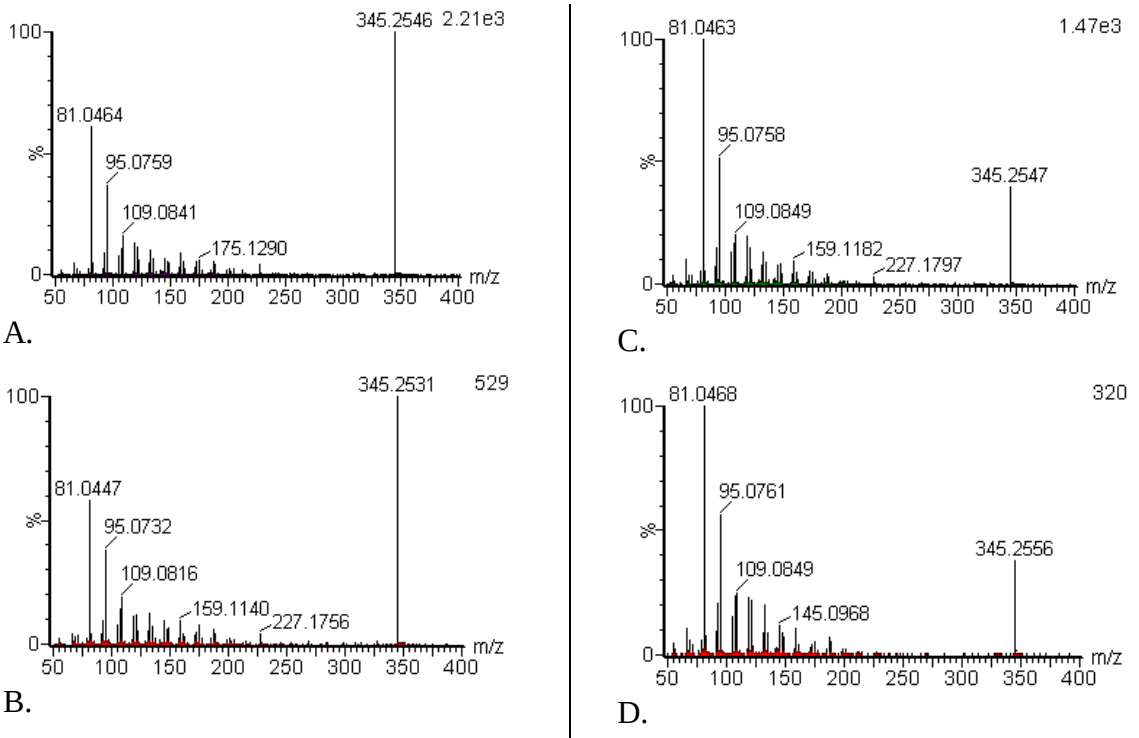
Stanotsololin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa muodostuneet tuotteet pystyttiin erottamaan hieman lyhyemmällä gradientilla. Stanotsololin retentioaika oli 13,66 min ja kaikki tuotteet eluoituivat 3,39 min ja 15,09 min välillä (Taulukko 8). Monohydroksylaatiotuotteita M+O (*m/z* 345,25) havaittiin molemmissa reaktioissa useita (Taulukko 8) (Liite 5). Viidellä isomeerillä oli samat retentioajat molemmissa reaktioissa (Kuva 26).



Kuva 26. XIC stanotsololin hapetustuotteesta M+O (*m/z* 345,25)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

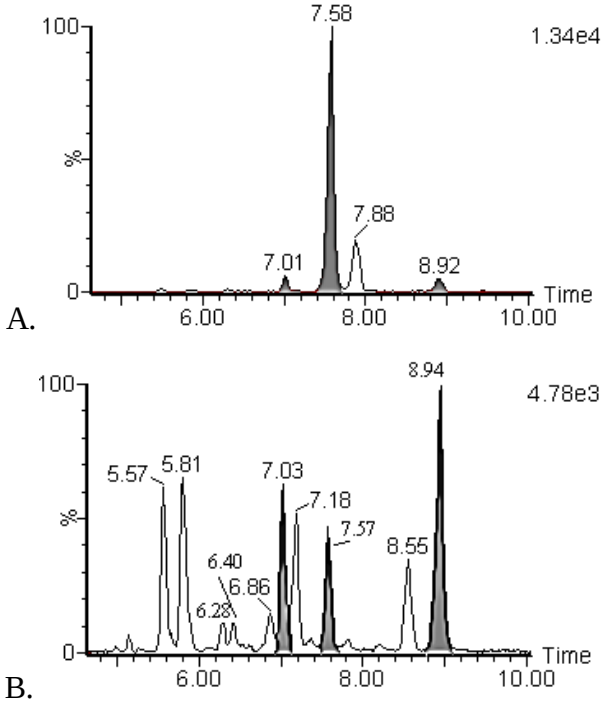
Retentioajalla 8,43 min esiintyi stanotsololin HLM-inkubaatioiden ja TiO_2-valokatalyysireaktioiden eristetyissä ionikromatogrammeissa piikit, joiden tuoteionispektrit kahdella eri törmäysenergialla (CE 42 ja CE 47 V) on esitetty kuvassa 27. Kaikissa tuoteionispektreissä näkyi lähtöionin (*m/z* 345,25) lisäksi stanotsololin rakenteelle tyypilliset ionit *m/z* 81 ja *m/z* 95. Stanotsololin rakenteessa oleva pyratsolirengas mahdollistaa ionisoituneen molekyylin stabiloitumisen resonanssin kautta[74] ja tästä johtuen stanotsololista ei lohkea vettä. Veden lohkeaminen on kuitenkin mahdollista havaita tuoteionispektrissä, mikäli molekyyliin on liittynyt OH-ryhmä, joka lohkeaa pois vetenä, jolloin molekyyliin muodostuu uusi kaksoissidos. Stanotsololin

tuoteionispektreissä ei tapahdu suuria muutoksia törmäysenergian kasvaessa. Ainoastaan lähtöionin intensiteetti heikkenee lisääntyneen pilkkoutumisen vuoksi ja fragmenttien *m/z* 81 ja *m/z* 95 intensiteetit kasvavat. Yhdisteen massan, retentioajan ja tuoteionispektrien perusteella todettiin, että stanotsololin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi sama hydroksylaatiotuote.



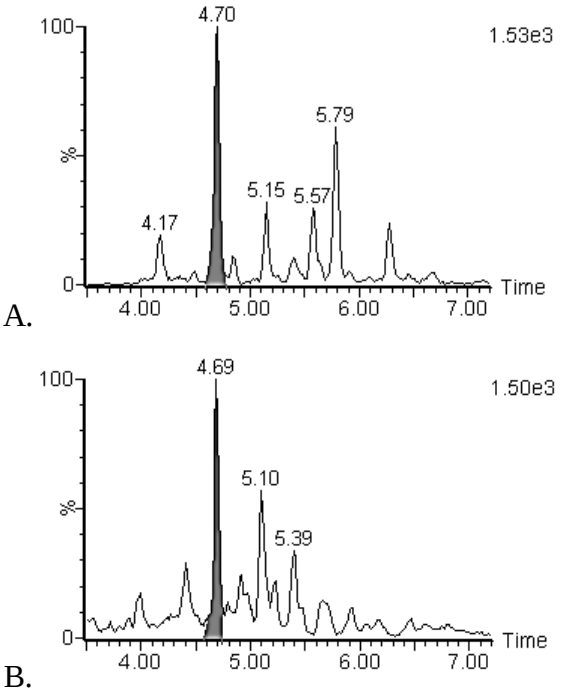
Kuva 27: STZ: hapetustuote M+O *m/z* 345,25 (t_R 8,43 min) A: HLM CE 42 V B: TiO_2 CE 42 V C: HLM CE 47 V D: TiO_2 CE 47 V. Kuva on esimerkki tapauksesta, jossa tuoteionispektrit ovat hyvin samankaltaiset ja isomeeri on merkitty taulukkoon 8 kolmella tähdellä (***). HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalo-katalyyttinen reaktio.

Stanotsololin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa havaittiin useita isomeerejä *m/z* -arvolla 343,24. Reaktio oli hydroksylaatio + dehydrogenaatio (M+O-2H). Molemmissa reaktioissa syntyi kolme isomeeriä, joiden retentioajat olivat yhdenmukaiset (Kuva 28). Lisäksi erityisesti TiO_2-valokatalyysireaktiossa muodostui muita isomeerejä (Taulukko 8) (Liite 5).



Kuva 28. XIC stanotsololin hapetustuotteesta M+O-2H (*m/z* 343,24)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Dihydroksylaatiotuotteita M+2O (*m/z* 361,25) syntyi sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa (Taulukko 8) (Liite 5). Yhteisiä retentioaikoja ei kuitenkaan ollut. Sen sijaan *m/z*-arvolla 359,23 muodostui yksi hapetustuote (M+2O-2H), joka eluoitui HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa samaan aikaan (t_R 4,69 min) (Kuva 29). Myös molemmissa reaktioissa syntyneen tuotteen intensiteetit olivat suunnilleen samat. Tuoteionispektreissä esiintyi kuitenkin niin paljon eroavaisuuksia, että kyseessä ei välttämättä ollut sama hapetustuote (Liite 5).



Kuva 29. XIC stanotsololin hapetustuotteesta M+2O-2H (*m/z* 359,23)
A: HLM-reaktio B: TiO_2-valokatalyyttinen reaktio

Stanotsololin TiO_2-valokatalyyttissä reaktioissa kromatogrammin ja tuoteionispektrien intensiteetit olivat korkeammat kuin muilla tutkittavilla yhdisteillä. Stanotsololi ionisoituu käytetyllä menetelmällä todennäköisesti paremmin kuin muut tutkittavat yhdisteet, mikä johtuu stanotsololin rakenteesta ja erityisesti siinä olevasta pyratsolirenkaasta. Reaktio-olosuhteissa oli myös eroja, koska stanotsololin TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa käytettiin korkeampaa ACN-pitoisuutta ja pidempää UV-altistusaikaa, jolloin lähtöaineen ja muodostuvien tuotteiden valokatalyyttinen hajoaminen oli hitaampaa.

Edellä mainittujen hapetustuotteiden lisäksi erityisesti stanotsololin TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi yhdisteitä muillakin *m/z*-arvoilla (Taulukko 8) (Liite 5). Monessa tapauksessa *m/z*-arvojen eikä niitä vastaavien tuoteionispektrien perusteella pystytty päättelemään, mikä reaktiotuote olisi kyseessä. Koska näitä tuotteita ei muodostunut HLM-inkubaatioissa, niihin ei perehdytty yksityiskohtaisesti.

TAULUKKO 8: Stanotsololin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneet tuotteet; retentioajat ja spektrien samankaltaisuuden arviointi. t_R (min) = retentioaika minuutteina, HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio, o = tuote havaittu, *** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitakin eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.

Reaktiotuote	***m/z***	**Reaktio**	**t_R (min)**	**HLM**	**TiO_2**	**Spektrien yhdenmukaisuus**
M+O	345,25	hydroksylaatio	10,50	o	o	***
			10,29	o		
			9,42		o	
			9,09	o		
			8,43	o	o	***
			7,49	o		
			7,33		o	
			6,92		o	
			6,22		o	
			5,79	o	o	***
			5,66	o	o	***
			5,55	o	o	**
M+O-2H	343,24	hydroksylaatio, dehydrogenaatio	8,94	o	o	*
			8,55		o	
			7,88	o		
			7,57	o	o	***
			7,18		o	
			7,03	o	o	**
			6,86		o	
			6,40		o	
			6,28		o	
			5,81		o	
			5,57		o	
M+2O	361,25	dihydroksylaatio	7,03	o		
			6,75	o		
			6,33	o		
			6,18	o		
			6,12		o	
			5,59		o	
			5,46	o		
			5,36		o	
			4,91	o		
			4,65	o		
			4,04		o	
			3,40	o		
M+2O-2H	359,23	dihydroksylaatio, dehydrogenaatio	5,79	o		
			5,57	o		
			5,39		o	
			5,15	o		
			5,10		o	
			4,69	o	o	*
			4,17	o		

Taulukko 8 jatkuu edelliseltä sivulta

Reaktiotuote	*m/z*	Reaktio	t_R (min)	HLM	TiO_2	Spektrien yhdenmukaisuus
M+O-2H-CH_2	329,22	hydroksylaatio, dehydrogenaatio,demetylaatio	6,16		o	
M-2H-CH_2	313,23	dehydrogenaatio,demetylaatio	11,11		o	
M-2H	327,24	dehydrogenaatio	13,45	o		
			13,10		o	
			12,73		o	
M+3O-2H	375,23	3 x hydroksylaatio,	3,60		o	
		dehydrogenaatio	3,39		o	
M+22	351,26		8,40		o	
			7,92		o	
M+42	371,27		15,09		o	
			14,78		o	
M+44	373,23		9,43		o	
			9,22		o	
			9,06		o	
			8,72		o	
			8,47		o	
			8,31		o	
			7,73		o	
			7,38		o	
			7,07		o	
			6,03		o	

3.2.6 Yhteenveto tutkittujen steroidien titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa ja mikrosomi-inkubaatioissa syntyneistä tuotteista ja niiden vertailusta

Kaikkien tutkittujen steroidien mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidi-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi dehydrogenaatiotuotteita (M-2H). Testosteronilla ja todennäköisesti myös nandrolonilla, joiden rakenteessa on sekundäärinen hydroksyyliryhmä, syntyi sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyysireaktioissa tuote, jossa hiilen C17 OH-ryhmä oli hapettunut ketoniksi. Molemmissa reaktioissa

retentioaika oli sama ja tuoteionispektrit olivat identtiset, joten tällä perusteella todettiin, että 17-ketosteroidin muodostumista on mahdollista jäljitellä TiO_2-valokatalyyttisellä reaktiolla. Yhdisteillä, joilla oli hiilessä C17 OH-ryhmän lisäksi sen hapettumista estävä metyyliryhmä (MT, MDN ja STZ), ei vastaavaa dehydrogenaatiota tapahtunut. Näilläkin steroideilla tapahtui kuitenkin dehydrogenaatio, mikä on mahdollista esimerkiksi siten, että reaktiossa tapahtuu hydroksylaatio ja sen jälkeen veden lohkeaminen, jolloin molekyylin muodostuu uusi kaksoissidos.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että dehydrogenaatiota on mahdollista jäljitellä TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden avulla.[70] Tässä työssä saadut tulokset ovat aikaisempien tutkimusten kanssa yhdensuuntaisia ja tulos on merkittävä, koska 17-ketosteroidin on osoitettu olevan yksi päämetaboliitti ainakin testosteronin metaboliassa *in vivo*.[8]

Myös hydroksylaatiotuotteita (M+O) syntyi kaikkien tutkittujen steroidien HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa ja löydettiin useita isomeerejä, joilla oli sama retentioaika molemmissa reaktioissa. TiO_2-valokatalyysireaktioissa syntyi lisäksi hydroksylaatiotuotteita retentioajoilla, joita HLM-inkubaatioissa ei muodostunut ja päinvastoin. Tämä saattaa johtua siitä, että CYP-entsyymit ovat spesifisiä stereokemian suhteen, kun taas TiO_2-valokatalyyttisestä reaktiosta selektiivisyys puuttuu. XIC:n piikkien intensiteetin perusteella TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi hydroksylaatiotuotteita dehydrogenaatiotuotteita vähemmän. Hydroksyloituneet yhdisteet todennäköisesti hajosivat valokatalyyttisesti. Olisi hyvä, jos muodostuvia hapetustuotteita voitaisiin kerätä talteen esimerkiksi läpivirtaussysteemin avulla, jolloin ne eivät ehtisi hajota UV-altistuksen aikana. On myös mahdollista, että hydroksyloituneet tuotteet reagoivat edelleen muodostaen esimerkiksi dehydrogenaatiotuotteen.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on onnistuttu tuottamaan eri lääkeaineiden hydroksylaatiotuotteita TiO_2-valokatalyyttisesti.[50,68-70] TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa muodostui lukuisia isomeerejä, joista osa oli samoja, joita syntyi HLM-reaktioissa. Tulos on merkittävä, koska joidenkin steroidien, kuten metandienonin ja stanotsololin,

metaboliassa hydroksylaatio on eräs päämetaboliareitti.[8,11] Hydroksylaatioita molekyylin eri kohtiin on todettu tapahtuvan myös esimerkiksi testosteronin metaboliassa.[8] Käytetyn analyysimenetelmän perusteella ei kuitenkaan ole mahdollista sanoa, syntyikö TiO_2-valokatalyysireaktioissa esimerkiksi metandienonin päämetaboliittia, 6β-OH-metandienonia.

Tutkittavien steroidien HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa tapahtui myös hydroksylaatio + dehydrogenaatio (M+O-2H). HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa havaittiin yleensä yksi tai kaksi yhteistä retentioaikaa suurimman osan isomeereistä eluoituessa eri aikoina. Hapetustuotteita, joissa on tapahtunut hydroksylaatio + dehydrogenaatio, on raportoitu syntyvän esimerkiksi stanotsololin metaboliassa.[26]

Dihydroksylaatioreaktioita ja dihydroksylaatio + dehydrogenaatioreaktioita tapahtui stanotsololin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa mutta isomeerejä, joilla olisi ollut sama retentioaika molemmissa reaktioissa ei havaittu. Dihydroksylaatio on merkittävä reaktio stanotsololin metaboliassa, joten olisi tarpeellista tutkia, miksi yhteisiä retentioaikoja ei HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyysireaktioissa havaittu. Dihydroksylaatiota on mahdollisesti tapahtunut muillekin tutkituille steroideille mutta syntyneet tuotteet ovat saattaneet hajota valokatalyyttisesti tai reagoida edelleen esimerkiksi siten, että toinen hydroksyyliryhmä on hapettunut ketoniksi.

Tutkittujen steroidien TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi lisäksi tuotteita muillakin *m/z*-arvoilla mutta niitä ei tutkittu tarkemmin, koska tässä työssä keskityttiin sellaisten tuotteiden vertailemiseen, joita syntyi sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyyttissä reaktioissa.

3.3 Käytettyjen menetelmien toimivuus

3.3.1 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuuton (SPE) saantoa testattiin menetelmällä, jota käytettiin myös vertailtavien HLM-inkubaatioiden ja TiO_2-valokatalyyttisten reaktioiden suorittamisessa. Jokaisesta tutkittavasta steroidista valmistettiin kaksi rinnakkaista, UV-altistettua näytettä materiaalit ja menetelmät -osiossa kuvatun menetelmän mukaisesti. Kummankin näytteen supernatanteista osa (100 µl) käsiteltiin SPE:lla ja osa (100 µl) jätettiin käsittelemättä. Jokaisesta näytteestä ajettiin kaksi injektiota. Lähtöaineiden ja valittujen TiO_2-valokatalyysireaktiossa syntyneiden hapetustuotteiden eristetyistä kromatogrammeista integroitiin piikit, jotta saatiin selville piikkien pinta-alat. Kiinteäfaasiuutolla käsiteltyjen ja käsittelemättömien näytteiden pinta-aloista laskettiin keskiarvot, suhteelliset keskihajonnat sekä saantoprosentit (Taulukko 9).

Suurimmassa osassa näytteistä toistojen välinen suhteellinen keskihajonta oli alle 10 %. Testosteronin kahden rinnakkaisen näytteen pinta-aloissa oli suuri ero ja toisen näytteen yhdisteiden pinta-alat olivat systemaattisesti pienempiä kuin toisen. Näytteiden välinen ero johtui todennäköisesti pipetoinnista. Keskiarvo laskettiin kuitenkin molemmista näytteistä, jotta saatiin useampi toisto. Testosteronin suuresta keskihajonnasta huolimatta kiinteäfaasiuuton saantoprosentti tutkituilla steroideilla ja niiden valituilla hapetustuotteilla oli 70-101 %. Mikäli rinnakkaisten näytteiden välinen hajonta olisi ollut pienempi, olisi saantoprosentti ollut vieläkin parempi. Saanto todettiin riittävän hyväksi, koska työ ei ollut luonteeltaan kvantitatiivinen.

Taulukko 9. Tutkittujen steroidien ja valittujen TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden hapetustuotteiden saanto kiinteäfaasiuuton (SPE) jälkeen. Tulokset on laskettu kahdesta TiO_2-näytteestä uutettuna ja uuttamattomana. Jokaisesta näytteestä ajettiin kaksi injektiota. Tulosten keskiarvoista laskettiin saantoprosentti. SPE = kiinteäfaasiuutto, ei SPE = kiinteäfaasiuuttamaton, Ka = piikkien pinta-alojen keskiarvo, RDS % = piikkien pinta-alojen suhteellinen keskihajonta, saanto (%) = kiinteäfaasiuuton saantoprosentti

Testosteroni		SPE		ei SPE		Saanto
	m/z	Ka	RSD %	Ka	RSD %	(%)
M	289,2	144,2645	30,72	161,9903	42,03	**89,06**
M-2H	287,2	10,6440	17,60	11,3103	24,31	**94,11**
M+O	305,2	8,6073	16,00	8,4588	25,13	**101,76**

Metyylitestosteroni		SPE		ei SPE		Saanto
	m/z	Ka	RSD %	Ka	RSD %	(%)
M	303,2	137,2985	21,27	169,6020	16,57	**80,95**
M+O	319,2	10,7205	4,00	12,3825	6,96	**86,58**
M+O-2H	317,2	40,1433	5,65	57,2823	1,75	**70,08**

Metandienoni		SPE		ei SPE		Saanto
	m/z	Ka	RSD %	Ka	RSD %	(%)
M	301,2	219,2060	4,72	261,8600	4,79	**83,71**
M+O-2H	315,2	38,6348	8,35	47,9058	2,07	**80,65**

Nandroloni		SPE		ei SPE		Saanto
	m/z	Ka	RSD %	Ka	RSD %	(%)
M	275,2	131,3448	10,74	165,0798	7,58	**79,56**
M-2H	273,2	7,9925	6,96	9,0133	9,2	**88,68**
M+O	291,2	8,0610	18,78	8,5193	4,61	**94,62**
M+O-2H	289,2	18,0253	4,41	20,1640	8,24	**89,39**

Stanotsololi		SPE		ei SPE		Saanto
	m/z	Ka	RSD %	Ka	RSD %	(%)
M	329,26	3127,679	2,39	3968,4153	1,23	**78,81**
M+O	345,25	70,0235	10,48	79,6105	4,89	**87,96**
M+O-2H	343,24	95,4780	3,67	120,6495	3,58	**79,14**

3.3.2 Nestekromatografisen menetelmän toistettavuus

UPLC-menetelmän toistettavuutta mitattiin tutkittujen steroidien ja niiden TiO_2-valokatalyysireaktioissa syntyneiden hapetustuotteiden retentioaikojen ja pinta-alojen avulla. Tulokset saatiin saman näytteen neljästä injektiosta (T) tai kuudesta injektiosta

(MT, MDN, NAN, STZ). Retentioajoista ja pinta-aloista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat (Taulukko 10). Kunkin steroidin gradientti oli sama, jota käytettiin HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden tuotteiden vertailussa.

Retentioaikojen ja pinta-alojen perusteella UPLC-menetelmän toistettavuus oli hyvä ja tämän työn tarkoitukseen nähden riittävä. Suhteelliset keskihajonnat kaikilla steroideilla ja niiden valituilla tuotteilla olivat retentioaikojen tarkastelussa alle 0,3 % (Taulukko 10). Pinta-alojen tarkastelussa suurimmalla osalla steroideista ja valituista tuotteista suhteellinen keskihajonta oli alle 10 %.

Käytetyn UPLC-menetelmän toistettavuus heikkenee piikkien pinta-alojen pienenemisen myötä, koska piikkien pinta-alojen välinen suhteellinen keskihajonta oli suurempaa, kun piikin pinta-ala oli pienempi. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että pienikin ero integroinnissa aiheuttaa suhteellisesti suuremman muutoksen pinta-alassa ja sitä kautta keskihajonnassa.

Taulukko 10. Tutkittujen steroidien ja niiden TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden hapetustuotteiden retentioaikojen ja pinta-alojen keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat neljässä injektiossa (T) tai kuudessa injektiossa (MT, MDN, NAN, STZ). Ka (min) = keskiarvo minuutteina, SD = toistojen välinen keskihajonta, RDS % = toistojen välinen suhteellinen keskihajonta prosentteina. T = testosteroni, MT = metyylitestosteroni, MDN = metandienoni, NAN = nandroloni, STZ = stanotsololi.

T	Retentioaika			Pinta-ala		
m/z	Ka (min)	SD (min)	RSD %	Ka	SD	RSD %
289,2	16,02	0,0035	0,02	1816,0110	107,7664	5,93
287,2	15,75	0,0083	0,05	4,8345	0,5690	11,77
	15,05	0	0	204,6683	7,3336	3,58
305,2	12,68	0,0214	0,17	11,9055	1,5592	13,09
	11,89	0,0083	0,07	36,8750	0,6158	1,67
	10,51	0,0120	0,12	21,3050	0,9380	4,40
	9,45	0,0220	0,24	8,08675	1,4774	18,27
	7,61	0,0107	0,14	27,5985	1,3143	4,76
303,2	10,10	0,0169	0,17	12,8100	0,9662	7,54
	9,64	0,0083	0,09	91,6540	5,1683	5,64

MT	Retentioaika			Pinta-ala		
m/z	Ka (min)	SD (min)	RSD %	Ka	SD	RSD %
303,2	17,86	0,0075	0,04	1804,6485	40,9414	2,27
301,2	17,65	0,0055	0,03	14,0620	0,7302	5,19
	16,63	0,0204	0,12	5,2648	1,7273	32,81
319,2	14,68	0,0186	0,13	17,1250	0,6933	3,93
	11,33	0,0138	0,12	51,6308	1,4692	2,82
	9,45	0,0117	0,12	50,5258	2,7013	5,35
	8,40	0,0163	0,19	16,9248	1,3061	7,72
	8,16	0,0103	0,13	40,1292	1,7300	4,31
317,2	12,41	0,0117	0,09	39,6098	2,1818	5,51
	10,95	0	0	24,9610	2,0375	8,16
	9,82	0,0082	0,08	297,3090	4,3656	1,47
335,2	7,74	0,0175	0,23	7,8608	0,7015	8,92

Taulukko 10 jatkuu edelliseltä sivulta

MDN	Retentioaika			Pinta-ala		
m/z	Ka (min)	SD (min)	RSD %	Ka	SD	RSD %
301,2	17,86	0,0075	0,04	1629,1180	46,5925	2,86
317,2	13,55	0,0243	0,18	4,9397	1,0814	21,89
	9,81	0,0264	0,27	8,9427	1,1527	12,89
	9,13	0,0175	0,19	2,7895	0,4088	14,66
	7,74	0,0082	0,11	50,1065	1,2885	2,57
	7,06	0,0133	0,19	7,0818	0,1820	2,57
315,2	10,97	0,0183	0,17	39,1928	2,2189	5,66
	9,86	0,0103	0,1	55,2092	2,5031	4,53
	8,77	0,0103	0,12	214,0298	5,0480	2,36
	8,27	0,0103	0,12	91,7617	1,6018	1,75

NAN	Retentioaika			Pinta-ala		
m/z	Ka (min)	SD (min)	RSD %	Ka	SD	RSD %
275,2	15,015	0,0105	0,07	3739,9710	119,2240	3,19
273,2	14,76	0,0103	0,07	17,4632	1,2728	7,29
	14,00	0,0084	0,06	401,0018	9,2159	2,30
291,2	12,74	0,0105	0,08	24,3202	0,5726	2,35
	9,65	0,0207	0,21	38,1780	2,9318	7,68
	9,41	0,0058	0,06	29,2757	3,4498	11,78
	8,39	0,0117	0,14	107,9623	3,4434	3,19
	7,78	0,0141	0,18	14,4955	1,1303	7,80
289,2	9,75	0,0147	0,15	289,5753	4,9830	1,72

STZ	Retentioaika			Pinta-ala		
m/z	Ka (min)	SD (min)	RSD %	Ka	SD	RSD %
329,26	13,66	0,0075	0,06	3335,1427	125,9470	3,78
345,25	10,50	0,0117	0,11	29,7487	1,8855	6,34
	8,43	0,0075	0,09	201,7760	4,9990	2,48
	5,79	0,0052	0,09	90,4045	2,7543	3,05
	5,66	0,0055	0,1	101,6385	5,5178	5,43
	5,55	0,0082	0,15	106,0760	8,1045	7,64
343,24	8,94	0,0151	0,17	351,5335	10,3794	2,95
	7,57	0,0052	0,07	144,9587	5,8011	4,00
	7,03	0	0	191,2913	8,8344	4,62
359,23	4,69	0	0	66,3397	2,6222	3,95

3.3.3 Samanmassaisten reaktiotuotteiden isomeerien resoluutio

Valittujen steroidien HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa samanmassaisia isomeerejä syntyi yleensä useita ja eri isomeerien erotuksen saaminen riittävän hyväksi oli haasteellista. Syntyneitä tuotteita oli paljon, joten täysin optimaalista gradienttia, jossa kaikkien tuotteiden kaikki isomeerit olisivat täydellisesti erottuneet samassa ajossa, oli mahdotonta saavuttaa. Mikäli oltaisiin kiinnostuneita esimerkiksi ainoastaan hydroksylaatiosta, voitaisiin gradientti optimoida hydroksylaatiota vastaavalle *m/z*-arvolle sopivaksi.

Käytetyn UPLC-menetelmän kromatografista erottumista mitattiin resoluution (Rs) avulla. Kahden kromatografisen piikin resoluutio voidaan laskea molempien piikkien retentioaikojen (t_{R1} ja t_{R2}) sekä kantojen leveyksien avulla (wb_1 ja wb_2) yhtälön 7 mukaisesti. Kun resoluution arvo on 1,5 tai enemmän, katsotaan, että piikit ovat erottuneet toisistaan pohjaviivaan saakka.

$$Rs = (t_{R2}-t_{R1}) / [1/2 (wb_1 + wb_2)] \qquad (7)$$

Koska syntyneitä tuotteita ja niiden isomeerejä oli paljon, laskettiin resoluutio niistä hapetustuotteista, joita syntyi sekä HLM-inkubaatioissa että TiO_2-valokatalyysireaktioissa samalla *m/z*-arvolla ja retentioajalla. Taulukossa 11 on esitetty niiden piikkien välinen resoluutio, joka eivät erottuneet toisistaan täydellisesti. Tällaisten piikkien välinen resoluutio oli vähemmän kuin 1,5. Muiden kuin taulukossa esitettyjen piikkien resoluutio oli selkeästi yli 1,5, eli piikit olivat erottuneet pohjaviivaan saakka.

Taulukko 11. Valittujen steroidien sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden hapetustuotteiden eri isomeerien välinen resoluutio. Taulukossa on esitetty piikit, joiden välinen resoluutio oli noin 1,5 tai vähemmän. Piikit, jotka esiintyvät sekä HLM-inkubaatioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa, on merkitty tummennettuina. HLM = humaanimikrosomireaktio, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyyttinen reaktio, t_R (min) = vertailtavien piikkien retentioajat minuutteina, Rs = piikkien välinen resoluutio

Testosteroni HLM			
m/z	t_R (min)		Rs
305,2	**11,89**	12,19	1,35
303,2	**10,10**	10,31	0,80
	10,10	9,93	0,72
	9,64	9,93	1,16

Testosteroni TiO_2			
m/z	t_R (min)		Rs
287,2	**15,75**	15,59	1,33
305,2	**12,68**	12,85	0,64
	12,68	12,43	0,84
	11,89	12,18	1,2
	10,51	10,74	0,89
	9,45	9,64	0,76
	7,61	7,3	1,35
303,2	**10,10**	9,87	1,01
	9,64	9,87	0,98

Metyylitestosteroni HLM			
m/z	t_R (min)		Rs
319,2	**8,40**	**8,16**	1,2
317,2	**10,93**	**10,74**	0,89
	9,83	10,01	0,89

Metyylitestosteroni TiO_2			
m/z	t_R (min)		Rs
301,2	**17,65**	17,45	1,4
	16,63	16,88	1,28
319,2	**8,40**	**8,16**	1,32
	8,16	7,87	1,41

Metandienoni HLM			
m/z	t_R (min)		Rs
315,2	**8,77**	8,94	0,62

Metandienoni TiO_2			
m/z	t_R (min)		Rs
315,2	**10,97**	11,25	0,93

Nandroloni HLM			
m/z	t_R (min)		Rs
291,2	**9,66**	**9,41**	1
289,2	**9,77**	10,11	1,21
	9,77	9,44	1,38

Nandroloni TiO_2			
m/z	t_R (min)		Rs
273,2	**14,76**	14,59	0,17
291,2	**9,66**	**9,40**	1
	8,39	**7,81**	1,52

Stanotsololi HLM			
m/z	t_R (min)		Rs
345,25	10,50	10,29	0,8
	5,81	**5,66**	0,98
	5,66	**5,55**	0,55
343,24	**7,58**	7,88	1,66
359,23	**4,70**	4,84	1,27

Stanotsololi TiO_2			
m/z	t_R (min)		Rs
345,25	**5,79**	**5,66**	1,13
	5,66	**5,55**	1
343,24	**8,94**	8,55	1,6
	7,57	7,82	1,28
	7,57	7,35	1,23
	7,03	7,18	0,86
	7,03	6,86	1,07
359,23	**4,69**	4,79	0,87
	4,69	4,40	1,66

Resoluution perusteella huonosti erottuvia isomeerejä oli HLM-inkubaatioissa vähemmän kuin TiO_2-valokatalyysireaktioissa. Tämä johtuu osittain siitä, että syntyneitä isomeerejäkin oli HLM-reaktioissa vähemmän. TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa epätäydellisesti erottuvia piikkejä esiintyi eniten hydroksylaatiotuotteilla, joiden isomeerejä muodostui eniten ja joita intensiteetin perusteella arvioituna muodostuu TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa vähemmän kuin esimerkiksi hydroksylaatio + dehydrogenaatiotuotteita. Huonompi resoluutio vaikutti myös tuoteionispektrien vertailuun. Toisinaan sekä HLM-reaktioissa että TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyi samanmassainen tuote samalla retentioajalla mutta kunnollisia tuoteionispektrejä ei huonon resoluution vuoksi saatu. Näin ollen HLM-reaktiossa ja TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa syntyneitä tuotteita ei pystytty vertailemaan toisiinsa.

3.3.4 Lukkomassan vaikutus tarkkaan massaan

Q-TOF:lla pystyttiin erottamaan toisistaan isobaarisia yhdisteitä, esimerkiksi stanotsololi (*m/z* 329,26) ja stanotsololin TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa syntynyt tuote (M+O-2H-CH_2) (*m/z* 329,22). Tarkan massan analysaattorilla on myös mahdollista saada tuntemattoman yhdisteen molekyylikaava selville. Tarkan massan mittauksessa käytettiin dual point-lukkomassana 2 µg/ml leusiini-enkefaliiniliuosta (asetonitriili/vesi 1:1) ja resoluutio oli noin 9000 *m/z*-arvolla 556,2771. Testosteronin, metyylitestosteronin ja metandienonin tuoteionipyyhkäisyssä lukkomassa ei jostain syystä kuitenkaan toiminut, mikä havaittiin vasta mittausten jälkeen. Nandrolonin ja stanotsololin tuoteionipyyhkäisyssä lukkomassa toimi sen sijaan normaalisti. Lukkomassan merkitystä tutkittiin laskemalla jokaisen steroidin mittauksissa saadut tarkat massat kuudesta toistosta ja vertaamalla niitä laskennallisiin massoihin. Taulukossa 12 on esitetty valittujen steroidien laskennalliset tarkat massat sekä MS-pyyhkäisyssä saadut tarkkojen massojen keskiarvot kuudesta toistosta. Tarkat massat poikkesivat valituilla steroideilla alle 1,5 mDa, joten tulosten kannalta ei ollut suurta merkitystä, vaikka lukkomassa ei testosteronin, metyylitestosteronin ja metandienonin mittauksissa toiminut.

Taulukko 12. Valittujen steroidien laskennalliset ja mitatut tarkat massat. Mitattujen massojen keskiarvo on laskettu kuudesta toistosta. T = testosteroni, MT = metyylitestosteroni, MDN = metandienoni, NAN = nandroloni, STZ = stanotsololi, HLM = humaanimikrosominäyte, TiO_2 = titaanidioksidivalokatalyysinäyte, massa (lask) = laskennallinen tarkka massa, mDa = millidalton, ka (exp) = mitattujen tarkkojen massojen keskiarvo, SD = mitattujen tarkkojen massojen keskihajonta, RDS = mitattujen tarkkojen massojen suhteellinen keskihajonta, ppm = miljoonasosa (parts per million).

Yhdiste	massa (lask) (mDa)	ka (exp) (mDa)	SD	RDS (ppm)	Virhe (mDa)	Virhe (ppm)
T: HLM	289,2168	289,2175	0,000554	1,91	0,9	2,4
T: TiO_2	289,2168	289,2177	0,000534	1,85	0,9	3,1
MT: HLM	303,2324	303,2338	0,000445	1,47	1,4	4,6
MT: TiO_2	303,2324	303,2335	0,000542	1,79	1,1	3,6
MDN: HLM	301,2168	301,2175	0,000715	2,37	0,7	2,3
MDN: TiO_2	301,2168	301,2174	0,000605	2,01	0,6	2,0
NAN: HLM	275,2011	275,2015	0,000275	1,00	0,4	1,4
NAN: TiO_2	275,2011	275,2019	0,000340	1,24	0,8	2,9
STZ: HLM	329,2593	329,2601	0,000376	1,14	0,8	2,3
STZ: TiO_2	329,2593	329,2604	0,000662	2,01	1,1	3,3

3.3.5 Tuoteionien intensiteettisuhteiden vaihtelu tuoteionispektreissä

Tuoteionien intensiteettisuhteiden vaihtelua tuoteionispektreissä tutkittiin valitsemalla esimerkinomaisesti muutamia tuoteionispektrejä, jotka edustivat intensiteettitasoja 10^1, 10^2, 10^3 ja 10^4. Kustakin tuoteionispektristä listattiin ne tuoteionit, joiden suhteellinen intensiteetti oli yli 10 %. Saman näytteen kahdesta eri injektiosta laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (Taulukko 13). Tarkastelu suoritettiin kahdella käytössä olleella törmäysenergialla. Intensiteettisuhteiden hajonta saattoi olla suurta (15 %) silloinkin, kun intensiteetti oli tasoa 10^4. Pienintä hajonta oli intensiteettitasolla 10^3 (3-6 %), mikä saattoi osittain johtua siitä, että esimerkin yhdisteellä tuoteioneja syntyi ainoastaan muutama. Intensiteetin ollessa alhainen, keskihajonta oli suurta ja

toistettavuus näin ollen heikko. Suhteellinen intensiteetti saattoi vaihdella huomattavasti (77 %) tai sellaisia tuoteioneja esiintyi, joita toisessa injektiossa ei havaittu. Tällaiset tapaukset on merkitty taulukkoon 13 tummennettuina. Tuoteionien intensiteettisuhteiden vaihtelua tuoteionispektreissä ei tutkittu systemaattisesti vaan vaihtelua tarkasteltiin saatavilla olevasta materiaalista jälkikäteen. Mikäli useampia toistoja olisi ollut mahdollista käyttää, olisi satunnaisvirheen todennäköisyys ollut pienempi.

Taulukko 13. Tuoteionien intensiteettisuhteiden vaihtelun tarkastelu tuoteionispektreissä. Eri intensiteettitasoja kuvastavia tuoteionispektrejä kahdella eri törmäysenergialla. TI = tuoteioni, suht.int. = tuoteionin suhteellinen intensiteetti tuoteionispektrissä, Ka = tuoteionin suhteellisen intensiteetin keskiarvo saman näytteen kahdesta eri injektiosta, SD = keskihajonta, RDS % = suhteellinen keskihajonta prosentteina, 0 = tuoteionia ei havaittu tuoteionispektrissä tai sen suhteellinen intensiteetti oli alle 10 %. Tällaisissa tapauksissa suhteellinen keskihajonta oli > 100 %. Tapaukset, joissa suhteellinen keskihajonta oli yli 50 %, on merkitty tummennettuina.

Esimerkki intensiteettitasosta 10^4: NAN $[M+H]^+$ *m/z* 275,2, TiO_2 CE 20					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
275	100	100	100	0,0000	0,00
257	55	55	55	0,0000	0,00
239	47	49	48	1,4142	2,95
109	46	46	46	0,0000	0,00
83	15	15	15	0,0000	0,00
145	25	25	25	0,0000	0,00
199	22	22	22	0,0000	0,00
187	15	18	16,5	2,1213	12,86
135	15	17	16	1,4142	8,84
163	12	12	12	0,0000	0,00
147	15	13	14	1,4142	10,10
185	13	15	14	1,4142	10,10

Esimerkki intensiteettitasosta 10^4: NAN $[M+H]^+$ *m/z* 275,2, TiO_2 CE 25					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
275	18	20	19	1,4142	7,44
257	25	25	25	0,0000	0,00
239	27	28	27,5	0,7071	2,57
109	100	100	100	0,0000	0,00
83	32	32	32	0,0000	0,00
145	33	35	34	1,4142	4,16
199	20	21	20,5	0,7071	3,45
187	21	20	20,5	0,7071	3,45
135	20	20	20	0,0000	0,00
163	15	12	13,5	2,1213	15,71
147	21	20	20,5	0,7071	3,45
81	19	18	18,5	0,7071	3,82
93	21	20	20,5	0,7071	3,45
119	14	15	14,5	0,7071	4,88

Esimerkki intensiteettitasosta 10^3: T (M-H) *m/z* 287,2, TiO_2 CE 20					
TI (*m/z*)	suht. Int. (1)	suht. Int. (2)	Ka	SD	RSD %
97	100	100	100	0,0000	0,00
109	58	61	59,5	2,1213	3,57
287	78	72	75	4,2426	5,66
269	10	10	10	0,0000	0,00

Esimerkki intensiteettitasosta 10^3: T (M-H) *m/z* 287,2, TiO_2 CE 30					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
97	100	100	100	0,0000	0,00
109	80	79	79,5	0,7071	0,89

Taulukko 13 jatkuu edelliseltä sivulta

Esimerkki intensiteettitasosta 10^2: STZ (M+O) *m/z* 345,25 TiO_2 CE 42					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
345	100	100	100	0,0000	0,00
81	62	66	64	2,8284	4,42
95	30	38	34	5,6569	16,64
107	19	35	27	11,3137	41,90
119	22	28	25	4,2426	16,97
145	15	22	18,5	4,9497	26,76
133	25	25	25	0,0000	0,00
187	11	11	11	0,0000	0,00
159	16	15	15,5	0,7071	4,56

Esimerkki intensiteettitasosta 10^2: STZ (M+O) *m/z* 345,25 TiO_2 CE 47					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
345	40	32	36	5,6569	15,71
81	100	100	100	0,0000	0,00
95	45	46	45,5	0,7071	1,55
107	42	32	37	7,0711	19,11
119	27	32	29,5	3,5355	11,98
145	21	25	23	2,8284	12,30
133	28	28	28	0,0000	0,00
187	**0**	**10**	**5**	**7,0710**	**70,71**
159	14	11	12,5	2,1213	16,97

Esimerkki intensiteettitasosta 10^1: T (M+O) m/z 305,2 TiO_2 CE 20					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
305	52	41	46,5	7,7782	16,73
257	100	100	100	0,0000	0,00
97	**31**	**72**	**51,5**	**28,9914**	**56,29**
109	38	35	36,5	2,1213	5,81
239	21	21	21	0,0000	0,00
161	**0**	**18**	**9**	**12,7279**	**141,42**
145	**0**	**18**	**9**	**12,7279**	**141,42**
173	**15**	**0**	**7,5**	**10,6066**	**141,42**
269	**14**	**0**	**7**	**9,8995**	**141,42**
199	**11**	**0**	**5,5**	**7,7782**	**141,42**

Esimerkki intensiteettitasosta 10^1: T (M+O) m/z 305,2 TiO_2 CE 30					
TI (*m/z*)	suht.int. (1)	suht.int. (2)	Ka	SD	RSD %
97	80	100	90	14,1421	15,71
109	100	93	96,5	4,9497	5,13
239	21	33	27	8,4853	31,43
145	17	27	22	7,0711	32,14
173	**0**	**21**	**10,5**	**14,850**	**141,42**
199	**0**	**13**	**6,5**	**9,1924**	**141,42**
123	32	55	43,5	16,264	37,39
131	**22**	**0**	**11**	**15,556**	**141,42**
79	**17**	**0**	**8,5**	**12,021**	**141,42**
209	**17**	**0**	**8,5**	**12,021**	**141,42**
183	**11**	**0**	**5,5**	**7,7782**	**141,42**
159	**12**	**41**	**26,5**	**20,506**	**77,38**
67	**0**	**14**	**7**	**9,8995**	**141,42**
83	**0**	**21**	**10,5**	**14,849**	**141,42**
133	**0**	**20**	**10**	**14,142**	**141,42**

4 JOHTOPÄÄTÖKSET

TiO_2-valokatalyysi on yksinkertainen ja nopea menetelmä. Lisäksi TiO_2 on halpaa ja sen saatavuus on parempi humaanimikrosomeihin verrattuna. HLM-inkubaatioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa tapahtui useita samoja reaktioita, joista tärkeimpiä olivat

dehydrogenaatio, hydroksylaatio sekä näiden yhdistelmä. Testosteronin ja nandrolonin 17-ketosteroidin muodostumista voitiin jäljitellä hyvin, kun taas hydroksylaatiossa TiO_2-valokatalyysireaktiossa syntyi useita isomeerejä, joita ei syntynyt HLM-reaktiossa. Tämä johtui siitä, että TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa muodostuvilta OH-radikaaleilta puuttuu CYP-entsyymien stereokemia. TiO_2-valokatalyyttisellä reaktiolla voitaisiin jäljitellä todennäköisesti paremmin sellaisten lääkeaineiden hydroksylaatioita, joiden rakenteessa olisi vähemmän hydroksyloituvia kohtia. Olisi myös tutkittava mahdollisuuksia lisätä TiO_2-valokatalyyttisen reaktion selektiivisyyttä stereokemian suhteen.

Lyhyemmällä UV-altistusajalla TiO_2-valokatalyyttinen reaktio on nopea ja alhaisempi ACN-pitoisuus 1 % muistuttaa parhaiten fysiologisia olosuhteita. Tuotteiden valokatalyyttisen hajoamisen estämiseksi olisi kuitenkin tarpeellista harkita mahdollisuutta kerätä hapetustuotteita talteen reaktioseoksesta esimerkiksi läpivirtaussysteemillä. Myös liuotinkoostumusta olisi tarpeellista tutkia ja optimoida systemaattisemmin. TiO_2-valokatalyyttisessä reaktiossa voidaan käyttää enemmän orgaanista liuotinta kuin HLM-inkubaatioissa ja olisi kiinnostavaa tietää, syntyisikö muillakin yhdisteillä enemmän tuotteita korkeammassa ACN-pitoisuudessa. Reaktio hidastuisi ACN-pitoisuuden kasvamisen myötä mutta hapetustuotteet eivät välttämättä ehtisi hajota. Lisäksi olisi tarpeellista tutkia muidenkin orgaanisten liuottimien vaikutusta TiO_2-valokatalyyttiseen reaktioon.

TiO_2-valokatalyyttisellä reaktiolla voitaisiin täydentää käytössä olevia *in vitro*-menetelmiä, joita suoritetaan biologisessa matriisissa. Materiaali olisi puhtaampaa ja näytteen esikäsittely yksinkertaisempaa. TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa TiO_2-partikkeleiden poistamiseksi reaktioseoksesta riittää sentrifugointi eikä SPE ole välttämätöntä. TiO_2-valokatalyysi sopisi mahdollisesti mikrosiruun sovellettuna nopeaan, seulontatyyppiseen tutkimukseen. Mikäli TiO_2-valokatalyysissä syntyviä tuotteita voitaisiin tuottaa suurempia määriä, voitaisiin menetelmän avulla tuottaa standardiyhdisteitä erilaisiin käyttötarkoituksiin, esimerkiksi dopinglaboratorioiden käyttöön.

5 KIRJALLISUUSLUETTELO

[1] Mottram DR, George AJ. Anabolic steroids. Bailliere Clin Endoc 14 (1): 55-69, 2000

[2] Shimada K, Mitamura K, Higashi T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. J Chromatogr A, 935: 141–172, 2001

[3] World Anti-Doping Agency. 2013 List of prohibited substances and methods 1.4.2013. Saatavissa Internetistä: http://list.wada-ama.org/prohibited-all-times/prohibited-substances/

[4] Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. Curr Opin Pharmacol 4: 614-620, 2004

[5] Thiblin I, Mobini-Far H, Frisk M. Sudden unexpected death in a female fitness athlete, with a possible connection to the use of anabolic androgenic steroids (AAS) and ephedrine. Forensic Sci Int 184: e7–e11, 2009

[6] Cooper CJ, Noakes TD, Dunne T, Lambert MI, Rochford K. A high prevalence of abnormal personality traits in chronic users of anabolic-androgenic steroids. Br J Sports Med 30: 246-250, 1996

[7] Hall RCW, Hall RCW, Chapman MJ. Psychiatric Complications of Anabolic Steroid Abuse. Psychosomatics 46 (4): 285-290, 2005

[8] Schänzer W: Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clin Chem 42:7: 1001-1020, 1996

[9] Kasal A. Structure and nomenclature of steroids. Kirjassa: Steroid analysis, s. 1-25, 2. painos. Toim. Makin HLJ, Gower DB, Springer, New York, 2010

[10] Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Delbeke FT. Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS. Trend Anal Chem 27 (8): 657-671, 2008

[11] Kicman AT, Houghton E, Gower DB. Anabolic steroids: metabolism, doping and detection in human and equistrian sports. Kirjassa: Steroid analysis, s. 743-836, 2. painos. Toim. Makin HLJ, Gower DB, Springer, New York, 2010

[12] Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drug Metab Rev,29: 413-580, 1997

[13] Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. Heme-containing oxygenases. Chem Rev 1996: 2841-2887, 1996

[14] Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. Arch Biochem Biophys 346 (1): 161-169, 1997

[15] Niwa T, Yabusaki Y , Honma K, Matsuo N. Tatsuta K, Ishibashi F, Katagiri M. Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. Xenobiotica 28 (6): 539-547, 1998

[16] Pozo OJ, Marcos J, Ventura R, Fabregat A, Segura J. Testosterone metabolism revisited: discovery of new metabolites. Anal Bioanal Chem 398: 1759-1770, 2010

[17] Schänzer W, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. Anal Chim Acta 275: 23-48, 1993

[18] Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Lootens L, Van Thuyne W, Parr MK, Schänzer W, Sancho JV, Hernández F, Meulumen P, Leroux-Roels G, Delbeke FT. Detection and characterization of a new metabolite of 17α-methyltestosterone. Drug Metab Dispos 37 (11): 2153-2162, 2009

[19] Schoene C, Nedderman ANR, Houghton E. Preliminary study of the metabolism of 17α-methyltestosterone in horses utilizing gas chromatography-mass spectrometric techniques. Analyst 119: 2537-2542, 1994

[20] Dumasia MC. In vivo biotransformation of 17α-methyltestosterone in the horse revisited: identification of 17-hydroxymethyl metabolites in equine urine by capillary gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 17: 320–329, 2003

[21] McKinney AR, Suann CJ, Stenhouse AM. A stereochemical examination of the equine metabolism of 17α-methyltestosterone. Anal Chim Acta 581: 377–387, 2007

[22] Blokland MH, van Rossum HJ, Herbold HA, Sterk SS, Stephany RW, van Ginkel LA. Metabolism of methyltestosterone, norethandrolone and methylboldenone in a heifer. Anal Chim Acta 529: 317–323, 2005

[23] Schänzer W, Geyer H, Donike M. Metabolism of metandienone in man: Identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas chromatographic-mass spectrometric identification of bis-hydroxylated metabolites. J Steroid Biochem Molec Biol 38: 441-464, 1991

[24] Massé R, Ayotte C, Bi H, Dugal R. Studies on anabolic steroids III. Detection and characterization of stanozolol urinary metabolites in humen by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr 497: 17-37, 1989

[25] Mück WM, Henion JD. High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Its use for the identification of stanozolol and its major metabolites in human and equine urine. Biomed Environ Mass Spectrom 19: 37-51, 1990

[26] Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Lootens L, Grimalt S, Sancho JV, Hernández F, Meuleman P, Leroux-Roels G, Delbeke FT. Detection and structural investigation of metabolites of stanozolol in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Steroids 74: 837-852, 2009

[27] Pelkonen O, Turpeinen M, Uusitalo J, Rautio A, Raunio H. Prediction of drug metabolisn and interactions on the basis of *in vitro* investigations. Basic Clin Pharmacol 96: 167-175, 2005

[28] Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens AHM. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. Toxicol Applied Pharmacol 189: 233-246, 2003

[29] Levedahl BH, Samuels LT. Metabolism of testosterone and 17-methyltestosterone by liver tissue. J Biol Chem 186 (2): 857-861, 1950

[30] Sivaraman A, Leach JK, Townsend S, Iida T, Hogan BJ, Stolz DB, Fry R, Samson LD, Tannebaum SR, Griffith LG. A microscale *in vitro* physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. Curr Drug Metab 6: 569-591, 2005

[31] Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. Curr Drug Metab 4: 292-312, 2003

[32] Tachibana S, Tanaka M. Simultaneous determination of testosterone metabolites in liver microsomes using column-switching semi-microcolumn high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 295: 248-256, 2001

[33] Kuuranne at, Pystynen K-H, Thevis M, Leinonen A, Schänzer W, Kostiainen R. Screening of *in vitro* synthesised metabolites of 4,9,11-trien-3-one steroids by liquid chromatography-mass spectrometry. Eur J Mass Spectrom 14: 181-189, 2008

[34] Guengerich PF. *In vitro* techniques for studying drug metabolism. J Pharmacokinet Biop 24 (5): 521-533, 1996

[35] Rendic S, Nolteernsting E, Schänzer W. Metabolism of anabolic steroids by recombinant human cytochrome P450 enzymes gas chromatographic–mass spectrometric determination of metabolites. J Chromatogr B 735: 73–83, 1999

[36] Johansson T, Weidolf L, Jurva U. Mimicry of phase I drug metabolism - novel methods for metabolite characterization and synthesis. Rapid Commun Mass Spectrom 21: 2323-2331, 2007

[37] Jurva U, Wikström HV, Weidolf L, Bruins AP. Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions. Rapid Commun Mass Spectrom 17: 800-810, 2003

[38] Lohmann W, Karst U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. Anal Bioanal Chem 391: 79–96, 2008

[39] Fujishima A, Zhang X. Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. C R Chim 9: 750-760, 2006

[40] Frank SN, Bard AJ. Heterogeneous photocatalytic oxidation of cyanide ion in aqueous solutions at titanium dioxide powder. J Am Chem Soc 99 (1): 303-304, 1977

[41] Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis. J Photoch Photobio C 1: 1-21, 2000

[42] Yawalkar AA, Bhatkhande DS, Pangarkar VG, Beenackers AACM. Solar-assisted photochemical and photocatalytic degradation of phenol. J Chem Technol Biotechnol 76: 363-379, 2001

[43] Bhatkhande DS, Pangarkar VG, Beenackers AACM. Photocatalytic degradation for environmental applications –a review. J Chem Technol Biotechnol 77: 102-116, 2002

[44] Minero C, Catozzo F, Pelizetti E. Role of adsorption in photocatalyzed reactions of organic molecules in aqueous TiO_2 suspensions. Langmuir 8: 481-486, 1992

[45] Pelizzetti E, Minero C. Role of oxidative and reductive pathways in the photocatalytic degradation of organic compounds. Colloids Surface A: 321–327, 1999

[46] Minabe T, Tryk DA, Sawunyama P, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A. TiO_2-mediated photodegradation of liquid and solid organic compounds. J Photoch Photobio A 137: 53-62, 2000

[47] Mills A, Davies RH, Worsley D. Water purification by semiconductor photocatalysis. Chem Soc Rev 22: 417-425,1993

[48] Ohtani B, Prieto-Mahaney OO, Li D, Abe R. What in Degussa (Evonik) P25? Crystalline composition analysis, reconstruction from isolated pure particles and photocatalytic activity test. J Photoch Photobio A 216: 179-182, 2010

[49] Hurum DC, Agrios G, Gray KA. Explaining the enhanced photocatalytic activity of Degussa P25 mixed-phase TiO_2 using EPR. J Phys Chem B 107: 4545-4549, 2003

[50] Calza P, Pelizetti E, Brussino M, Baiocchi C. Ion trap tandem mass spectrometry study of dexamethasone transformation products on light activated TiO_2 surface. J Am Soc Mass Spectrom 12: 1286-1295, 2001

[51] Micic, OI, Zhang Y, Cromack KR, Trifunac AD, Thurnauer MC. Photoinduced hole transfer from TiO_2 to methanol molecules in aqueous solution studied by electron paramagnetic resonance. J Phys Chem 97: 13284-13288, 1993

[52] Karpova T, Preis S, Kallas J. Selective photocatalytic oxidation of steroid estrogens in water treatment: urea as co-pollutant. J Hazard Mater 146 (3): 465-471, 2007a

[53] Karpova T, Preis S, Kallas J, Barros Torres AL. Selective photocatalytic oxidation of steroid estrogens in presence of saccharose and ethanol as co-pollutants. Environ Chem Lett 5:219–224, 2007b

[54] Crittenden JC, Liu J, Hand DW, Perram DL. Photocatalytic oxidation of chlorinated hydrocarbons in water. Water Res 31 (3): 429-438, 1997

[55] Hofstadler K, Bauer R, Novalic S, Heisler O. New reactor design for photocatalytis wastewater treatment with TiO_2 immobilized on fused-silica glass fibers: photomineralization of 4-chlorophenol. Environ Sci Technol 28: 670-674, 1994

[56] Noguchi T, Fujishima A, Sawunyama P, Hashimoto K. Photocatalytic degradation of gaseous formaldehyde using TiO_2 film. Environ Sci Technol 32 (23): 3831-3833, 1998

[57] Tanaka K, Padermpole K, Hisanaga T. Photocatalytic degradation of commercial azo dyes. Water Res 34: 327-333, 2000

[58] Son HS, Ko G, Zoh KD. Kinetics and mechanism of photolysis and TiO_2 photocatalysis of triclosan. J Hazard Mater 166: 954–960, 2009

[59] Sjogren JC, Sierka RA. Inactivation of phage MS2 by iron-aided titanium dioxide photocatalysis. Appl Environ Microb 60 (1): 344-347, 1994

[60] Rincón AG, Pulgarin C. Bactericidal action of illuminated TiO_2 on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. Appl Catal B-Environ 49: 99–112, 2004

[61] Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO_2 thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. J Photoch Photobio A 106: 51-56, 1997

[62] Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO_2 thin film. J Photoch Photobio A 156: 227–233, 2003

[63] Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. Induction of cytotoxity by photoexcited TiO_2 particles. Cancer Res 52: 2346-2348, 1992

[64] Ohko Y, Iuchi KI, Niwa C, Tatsuma T, Nakashima T, Iguchi T, Kubota Y, Fujishima A. 17β-estrodiol degradation by TiO_2 photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. Environ Sci Technol 36: 4175-4181, 2002

[65] Nakashima T, Ohko Y, Kubota Y, Fujishima A. Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO_2 modified polytetrafluoroethylene mesh sheets. J Photoch Photobio A 106: 115-120, 2003

[66] Rizzo L, Meric S, Kassinos D, Guida M, Russo F, Belgiorno V. Degradation of diclofenac by TiO_2 photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays. Water Res 43: 979-988, 2009

[67] Miranda-García N, Ignacio Maldonado M, Coronado JM, Malato S. Degradation study of 15 emerging contaminants at low concentration by immobilized TiO_2 in a pilot plant. Catal Today 151: 107–113, 2010

[68] Calza P, Pazzi M, Medana C, Baiocchi C, Pelizetti E. The photocatalytic process as a tool to identify metabolitic products formed from dopant substances: the case of buspirone. J Pharm Biomed Anal 35: 9-19, 2004

[69] Medana C, Calza P, Giancotti V, Dal Bello F, Pasello E, Montana M, Baiocchi C. Horse metabolism and the photocatalytis process as a tool to identify metabolic products formed from dopant substances: the case of sildenafil. Drug Test Anal 3: 724-734, 2011

[70] Nissilä T, Sainiemi L, Karikko MM, Kemell M, Ritala M, Franssila S, Kostiainen R, Ketola RA. Integrated photocatalytic micropillar nanoreactor electrospray ionization chip for mimicking phase I metabolic reactions. Lab Chip 11: 1470-1476, 2011

[71] World Anti-Doping Agency. 2011 Laboratory Testing Figures 16.4.2013. Saatavissa Internetistä: http://www.nada.at/files/doc/Statistiken/WADA-2011-Laboratory-Testing-Figures.pdf

[72] Williams TM, Kind AJ, Houghtin E, Hill DW. Electrospray collision-induced dissosiation of testosterone and testosterone hydroxy analogs. J Mass Spectrom 34: 206-216, 1999

[73] Bouchoux G, Leblanc D. Structural effects on the intrinsic basicities of α,β-unsaturated lactones and ketones. J Org Chem 62: 8439-8448, 1997

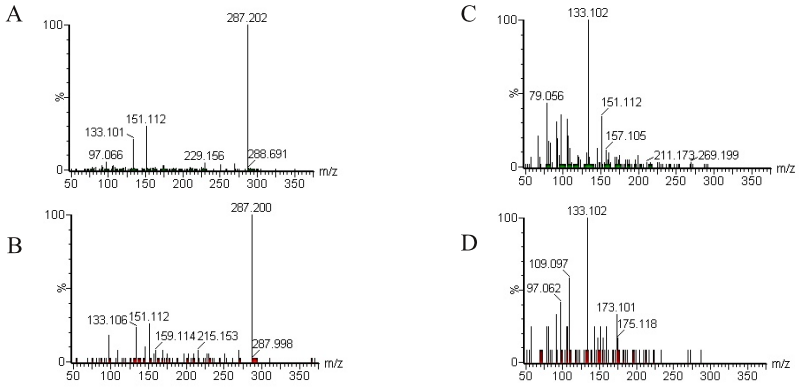
[74] Leinonen A, Kuuranne T, Kotiaho T, Kostiainen R. Screening of free 17-alkyl-substituted anabolic steroids in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Steroids 69: 101-109, 2004

[75] Leinonen A, Kuuranne T, Kostiainen R. Liquid chromatography/mass spectrometry in anabolic steroid analysis-optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. J Mass Spectrom 37: 693-698, 2002

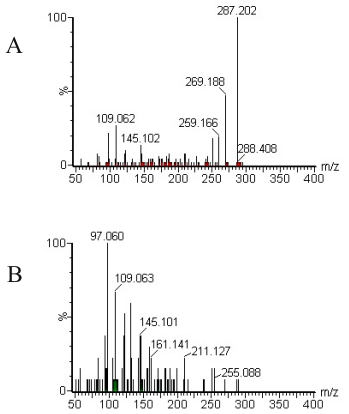
[76] Guan F, Soma LR, Luo Y, Uboh CE, Peterman S. Collision-induced dissociation pathways of anabolic steroids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 17: 477-489, 2006

[77] Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Grimalt S, Sancho JV, Hernández F, Delbeke FT. Collision-induced dissociation of 3-keto anabolic steroids and related compounds after electrospray ionization. Considerations for structural elucidation. Rapid Commun Mass Spectrom 22: 4009-4024, 2008

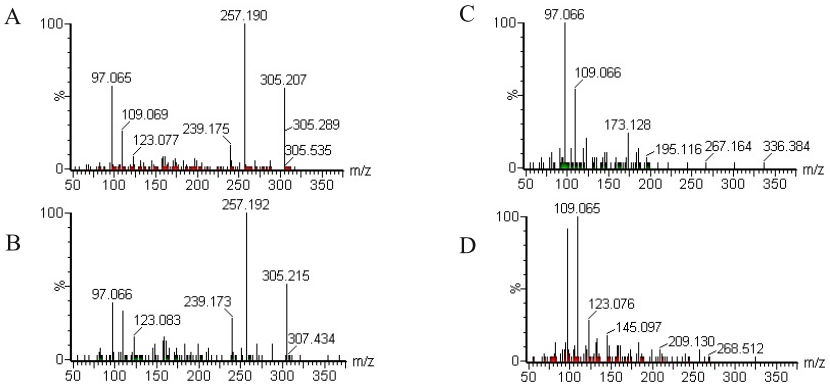
LIITE 1: Testosteronin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa. HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden samanmassaisten ja samalla retentioajalla eluoituneiden isomeerien samankaltaisuutta on arvioitu tuoteionispektrejä vertailemalla.
*** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitain eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.



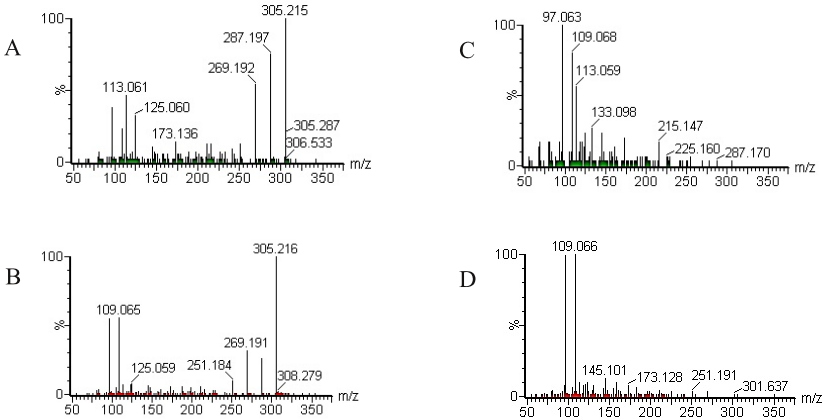
** T: M-2H *m/z* 287,2 (t_R 15,75 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



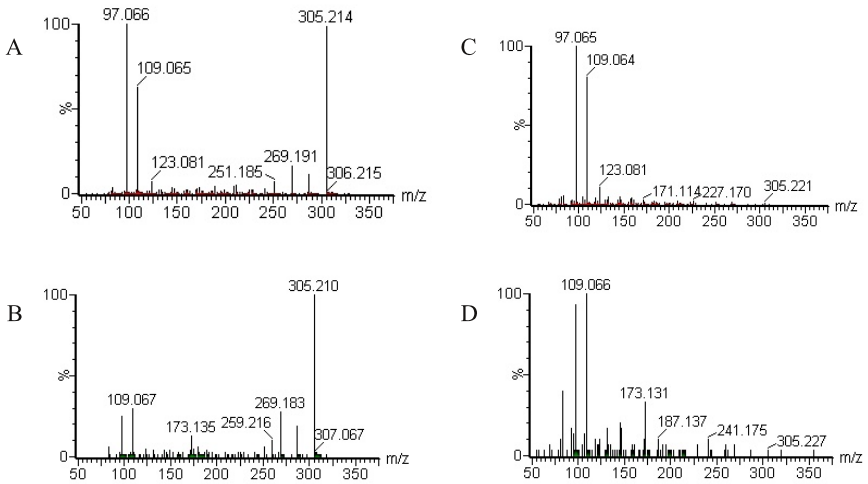
T: TiO_2 M-2H *m/z* 287,2 (t_R 15,59 min)
A: CE 20 B: CE 30



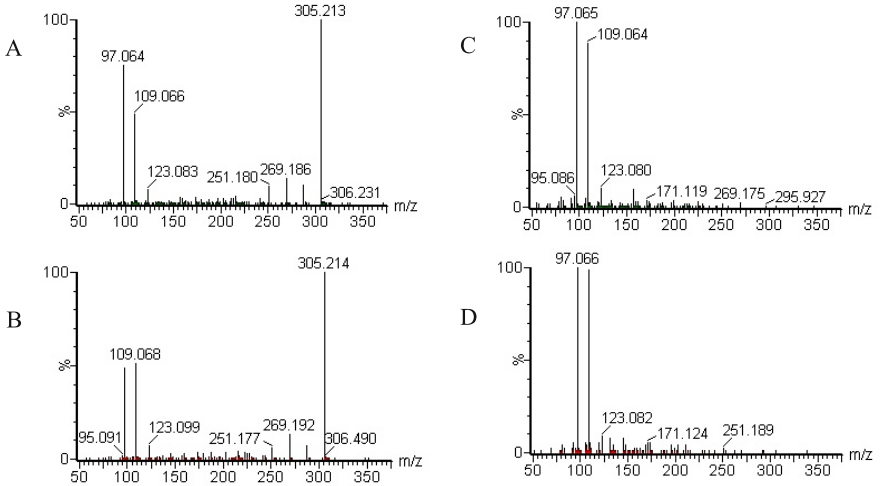
** T: M+O *m/z* 305,2 (t_R 12,68 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



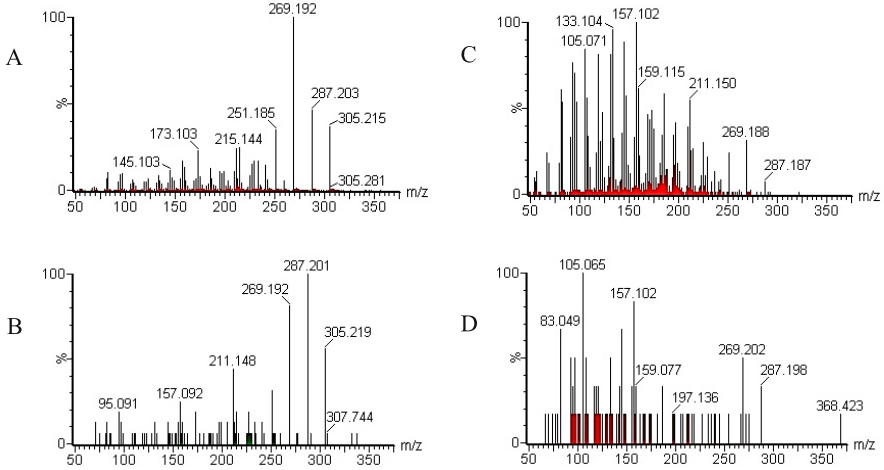
* T: M+O *m/z* 305,2 (t_R 11,89 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



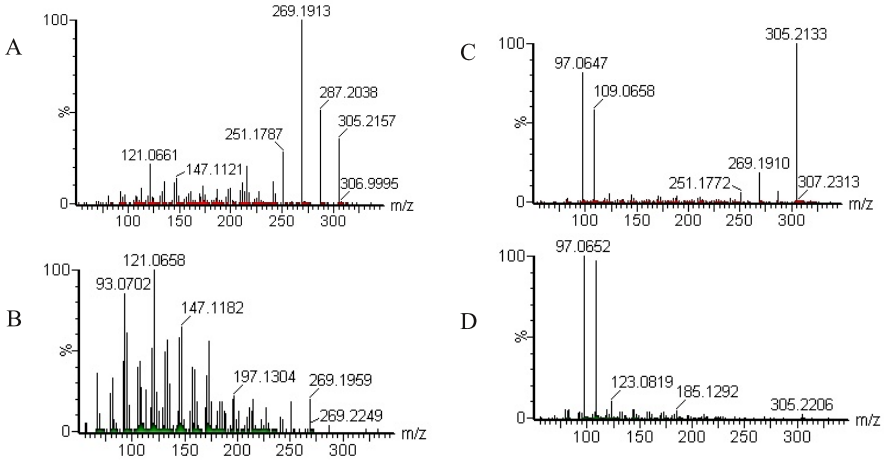
** T: M+O *m/z* 305,2 (t_R 10,51 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



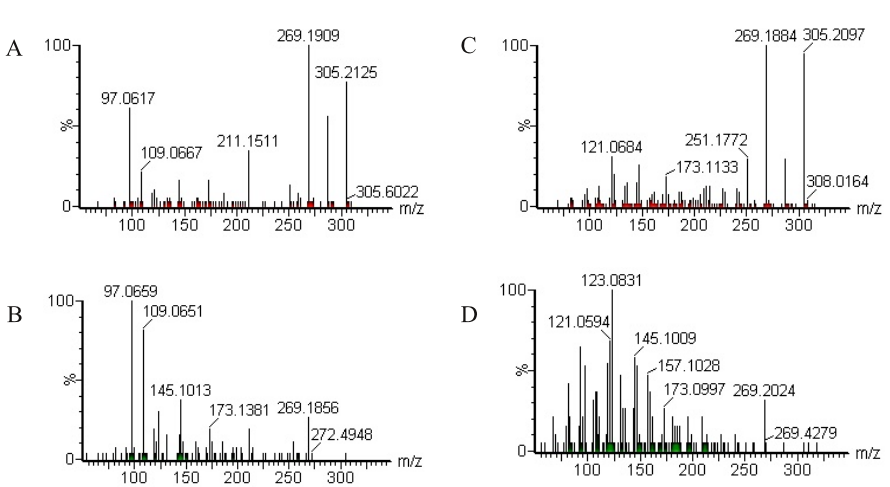
*** T: M+O *m/z* 305,2 (t_R 7,61 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



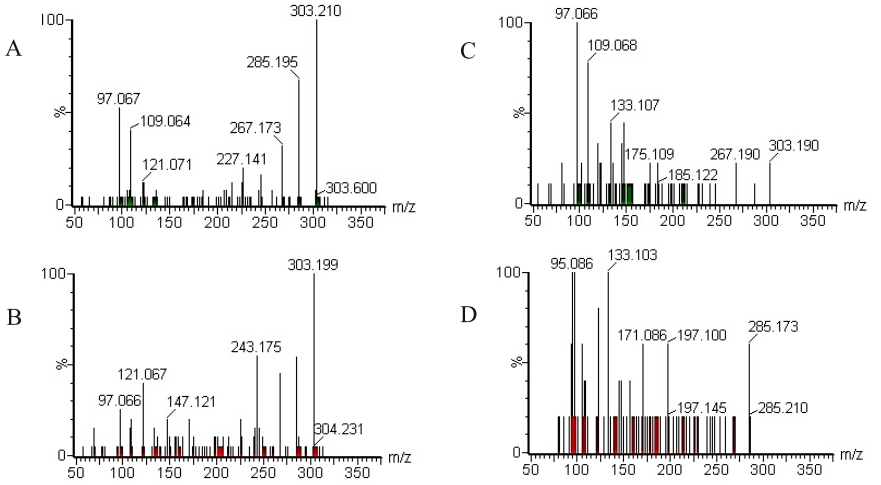
* T: M+O *m/z* 305,2 (t_R 9,45 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



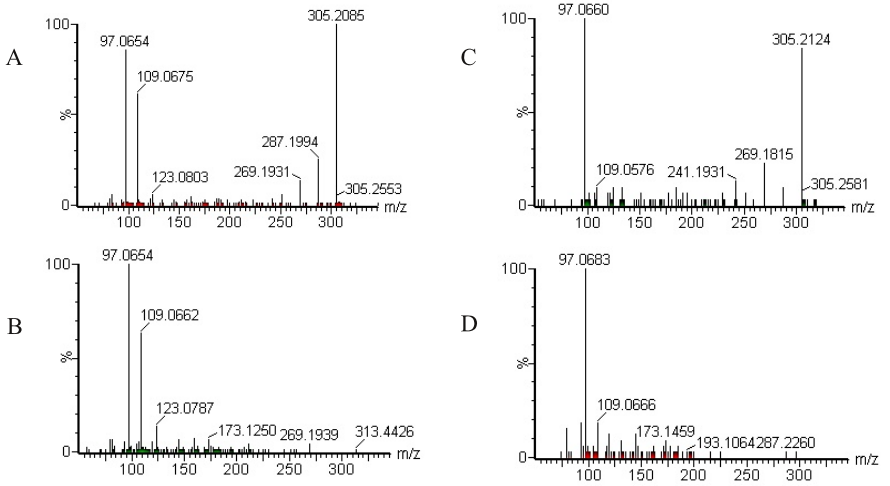
Vasemmalla: T: HLM M+O *m/z* 305,2 (t_R 13,28 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: HLM M+O *m/z* 305,2 (t_R 12,19 min) C: CE 20 D: CE 30



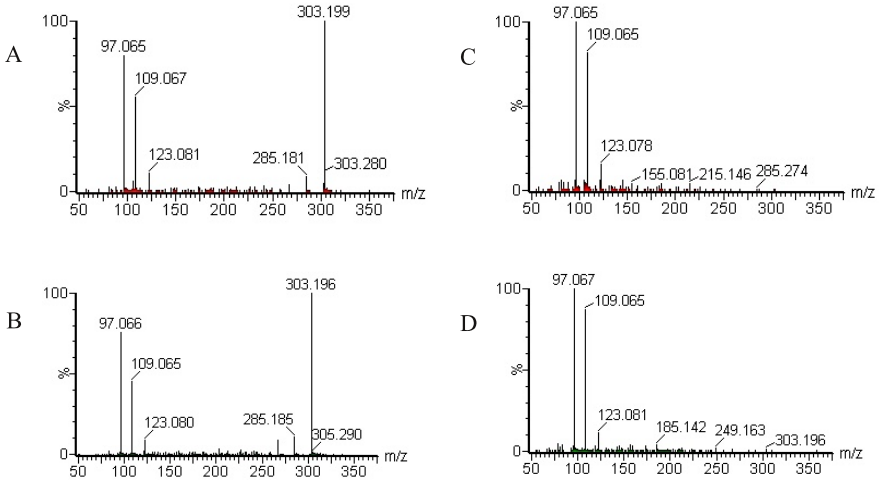
Vasemmalla: T: TiO_2 M+O *m/z* 305,2 (t_R 12,43 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: TiO_2 M+O *m/z* 305,2 (t_R 11,29 min) C: CE 20 D: CE 30



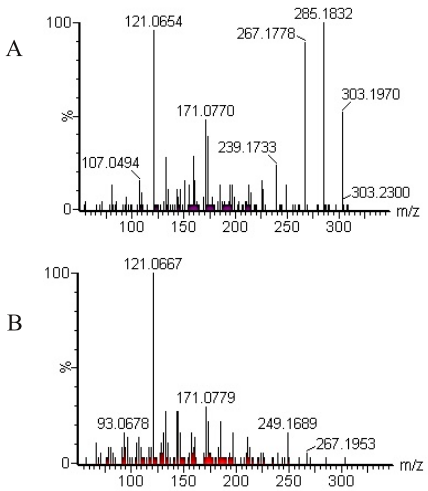
** T: M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 10,10 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



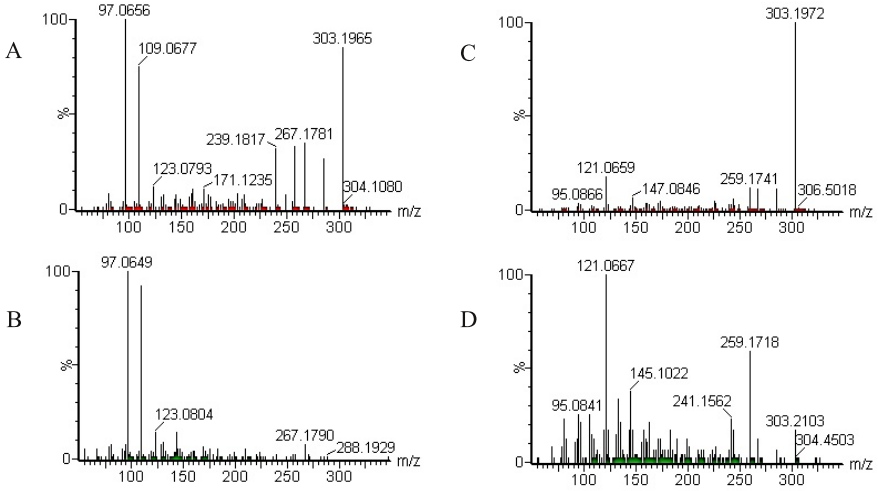
Vasemmalla: T: TiO_2 M+O *m/z* 305,2 (t_R 8,20 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: TiO_2 M+O *m/z* 305,2 (t_R 6,12 min) C: CE 20 D: CE 30



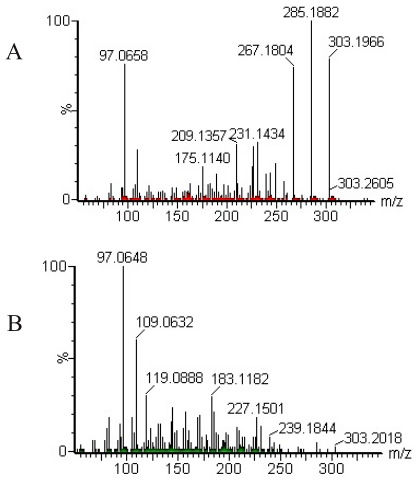
*** T: M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 9,64 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 30 D: TiO_2 CE 30



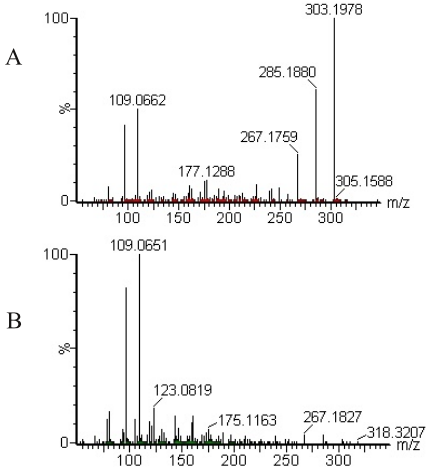
Vasemmalla: T: HLM M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 12,77 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: HLM M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 10,56 min) C: CE 20 D: CE 30



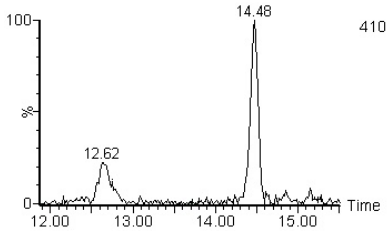
Vasemmalla: T: TiO_2 M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 11,32 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: TiO_2 M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 10,70 min) C: CE 20 D: CE 30



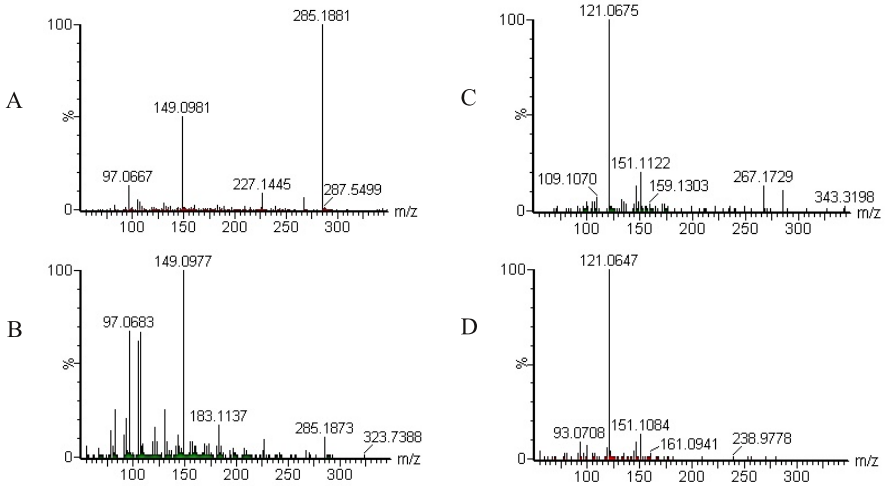
Vasemmalla: T: HLM M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 9,16 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: HLM M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 7,41 min) C: CE 20 D: CE 30



T: TiO_2 M+O-2H *m/z* 303,2 (t_R 8,27 min)
A: CE 20 B: CE 30

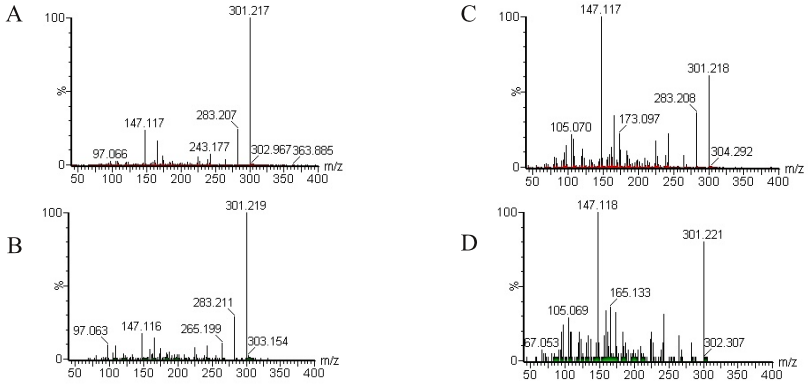


T: XIC HLM M-4H *m/z* 285,2

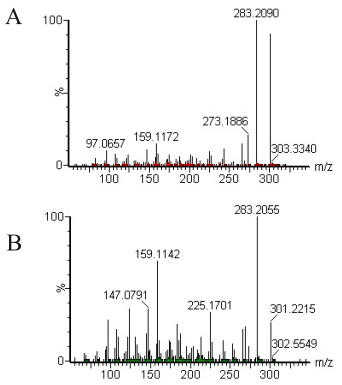


Vasemmalla: T: HLM M-4H *m/z* 285,2 (t_R 14,48 min) A: CE 20 B: CE 30
Oikealla: T: HLM M-4H *m/z* 285,2 (t_R 12,62 min) C: CE 20 D: CE 30

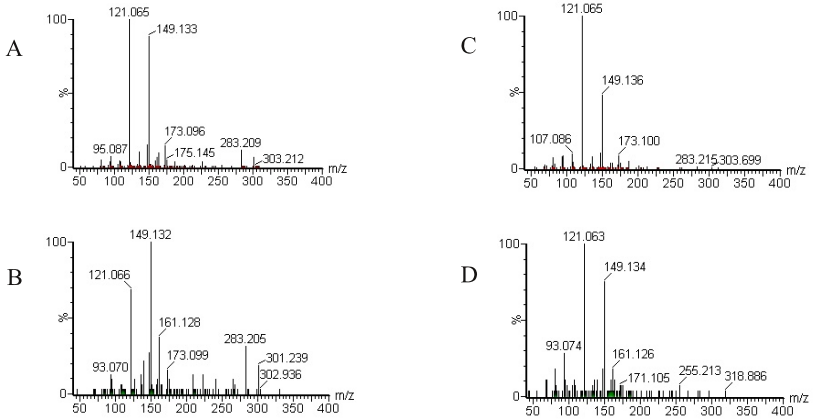
LIITE 2: Metyylitestosteronin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa. HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden samanmassaisten ja samalla retentioajalla eluoituneiden isomeerien samankaltaisuutta on arvioitu tuoteionispektrejä vertailemalla.
*** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitain eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.



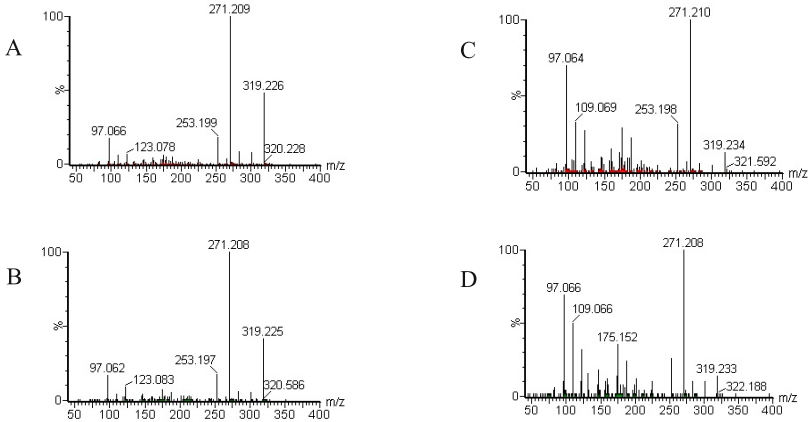
*** MT: M-2H *m/z* 301,2 (t_R 17,65 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



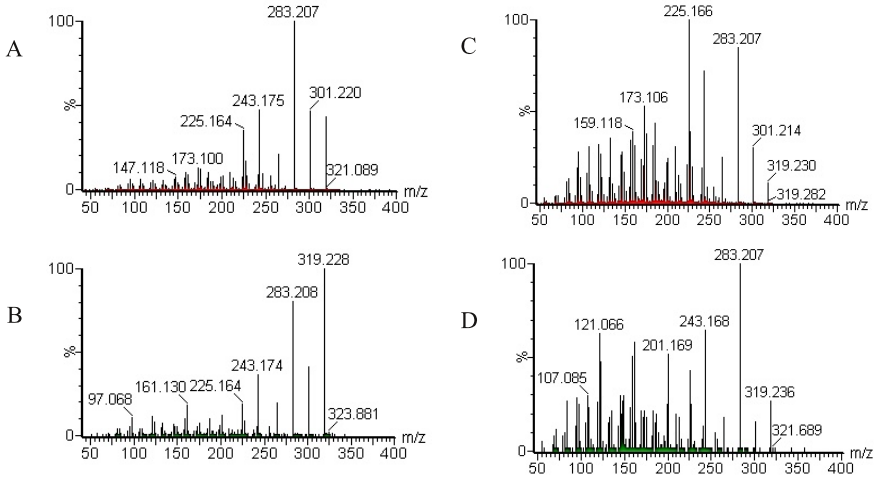
MT: TiO_2 M-2H *m/z* 301,2 (t_R 17,45 min)
A: CE 20 B: CE 25



** MT: M-2H *m/z* 301,2 (t_R 16,63 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25

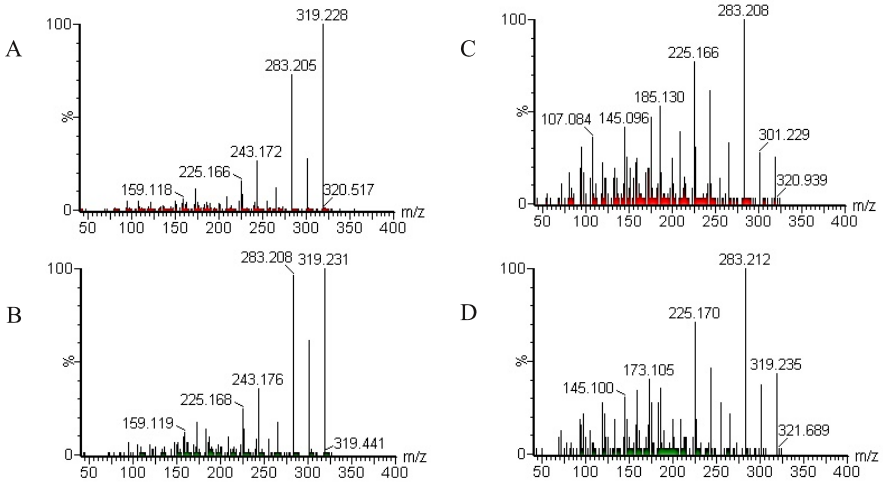


*** MT: M+O *m/z* 319,2 (t_R 14,68 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



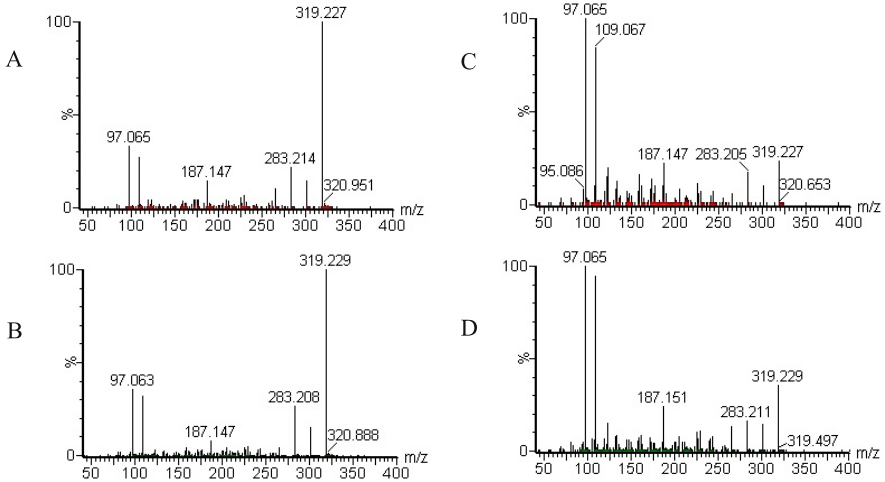
*** MT: M+O *m/z* 319,2 (t_R 11,33 min)

A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



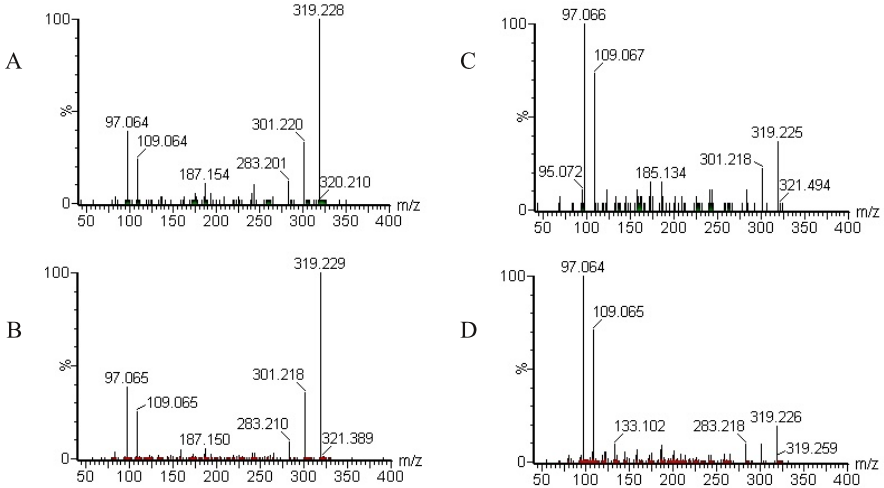
*** MT: M+O *m/z* 319,2 (t_R 8,40 min)

A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



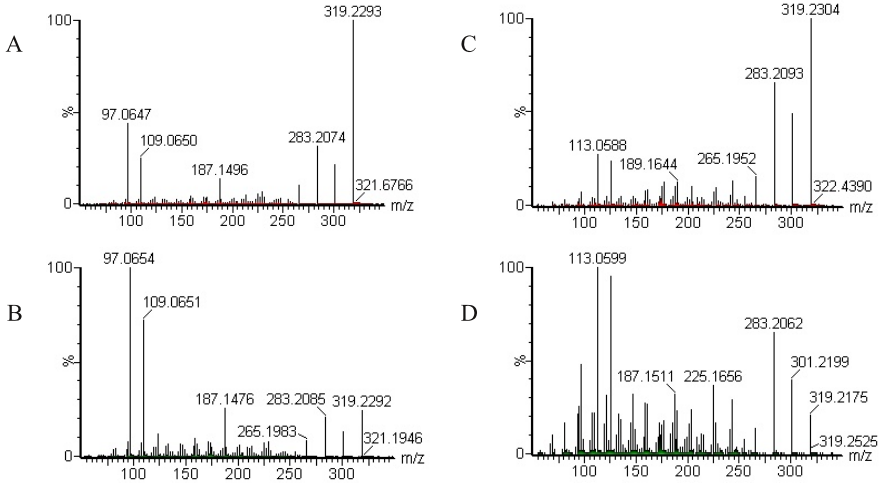
*** MT: M+O *m/z* 319,2 (t_R 9,45 min)

A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25

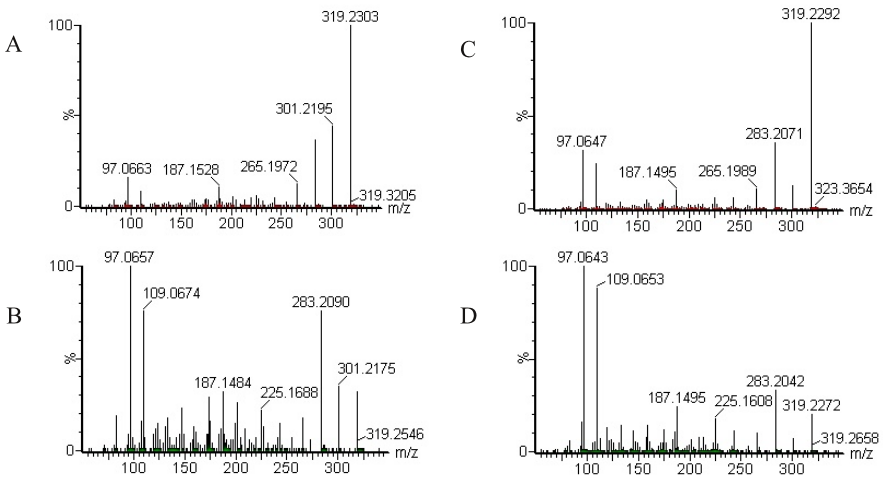


*** MT: M+O *m/z* 319,2 (t_R 8,16 min)

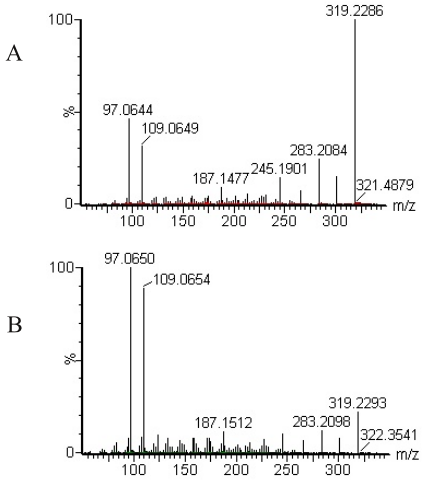
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



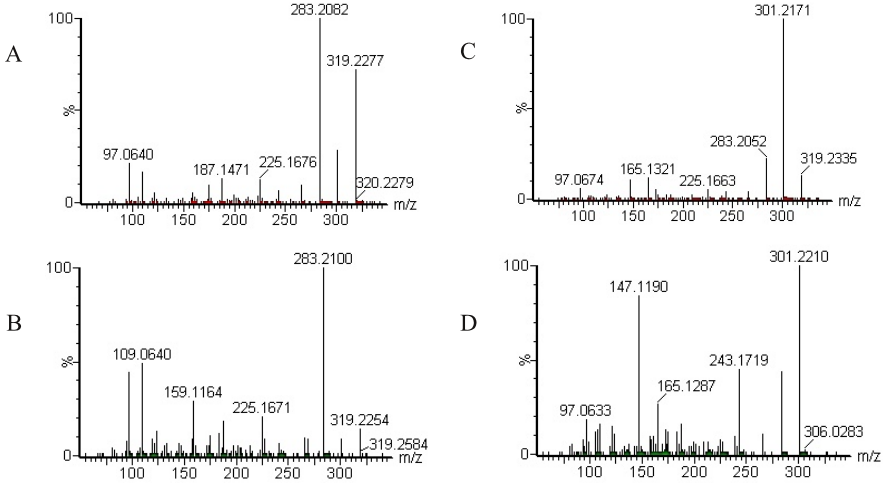
Vasemmalla: MT: HLM M+O *m/z* 319,2 (t_R 13,82 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: HLM M+O *m/z* 319,2 (t_R 12,66 min) C: CE 20 D: CE 25



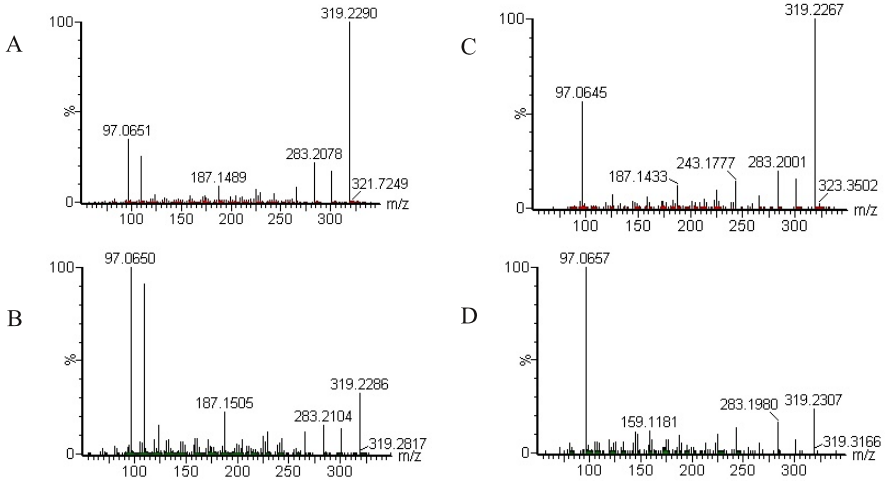
Vasemmalla: MT: TiO_2 M+O *m/z* 319,2 (t_R 13,56 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: TiO_2 M+O *m/z* 319,2 (t_R 12,48 min) C: CE 20 D: CE 25



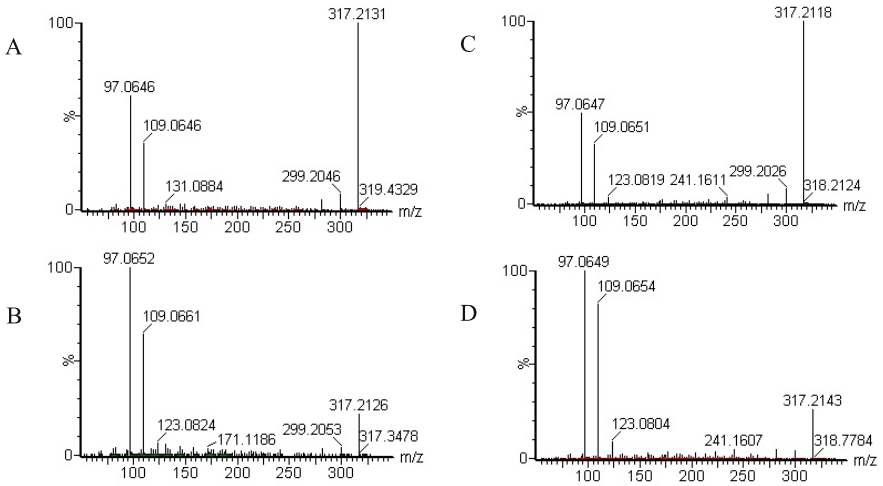
MT: HLM M+O *m/z* 319,2 (t_R 10,52 min)
A: CE 20 B: CE 25



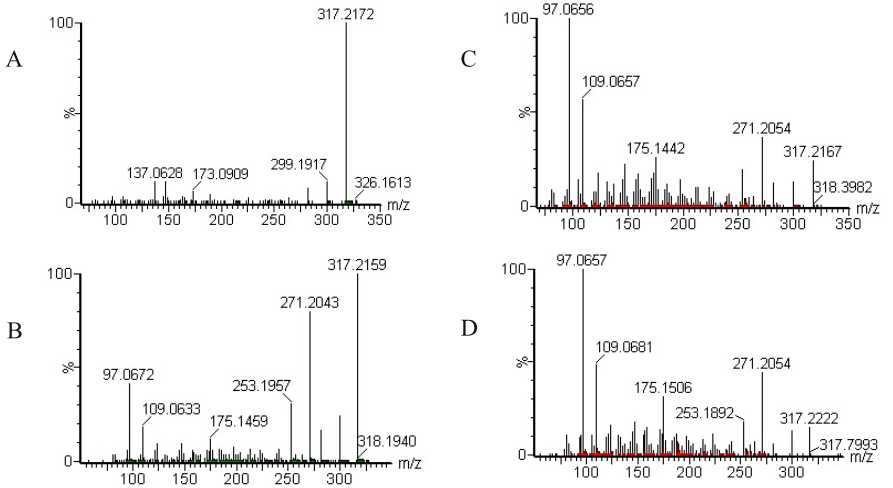
Vasemmalla: MT: TiO_2 M+O *m/z* 319,2 (t_R 12,11 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: TiO_2 M+O *m/z* 319,2 (t_R 10,47 min) C: CE 20 D: CE 25



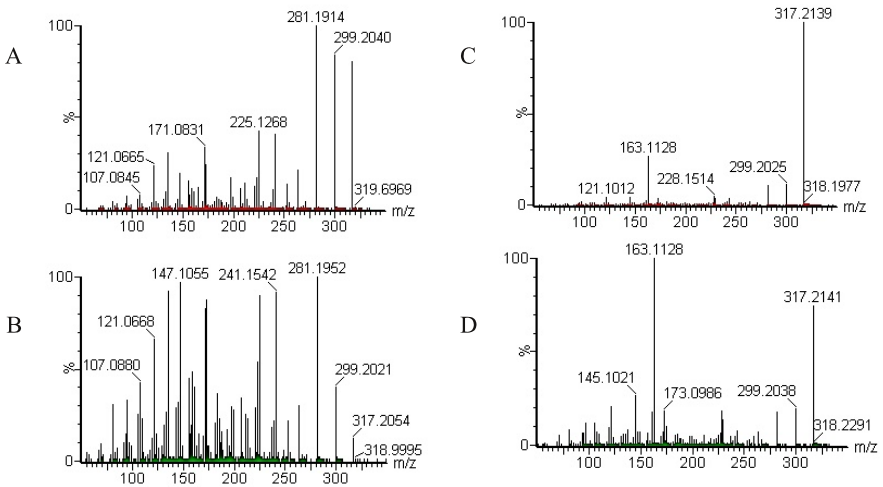
Vasemmalla: MT: TiO_2 M+O *m/z* 319,2 (t_R 9,84 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: TiO_2 M+O *m/z* 319,2 (t_R 7,69 min) C: CE 20 D: CE 25



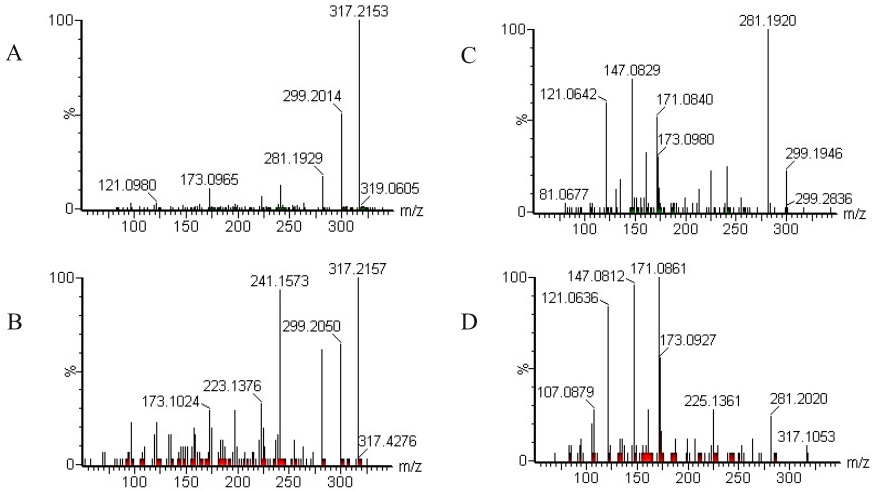
** MT: M+O *m/z* 317,2 (t_R 9,82 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



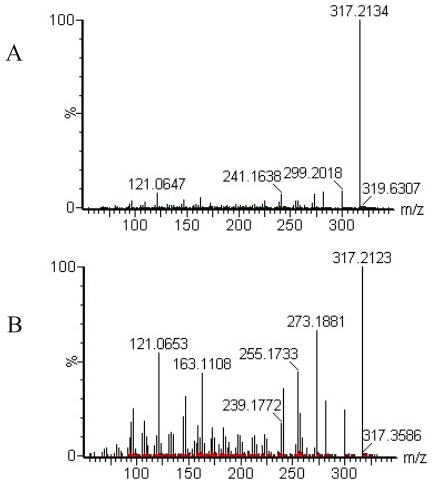
** MT: M+O *m/z* 317,2 (t_R 12,41 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



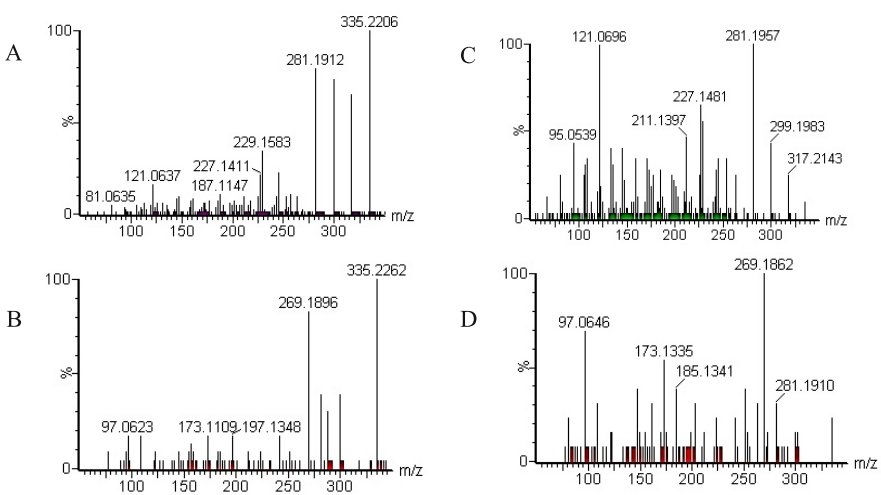
Vasemmalla: MT: HLM M+O-2H *m/z* 317,2 (t_R 14,22 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: HLM M+O-2H *m/z* 317,2 (t_R 13,27 min) C: CE 20 D: CE 25



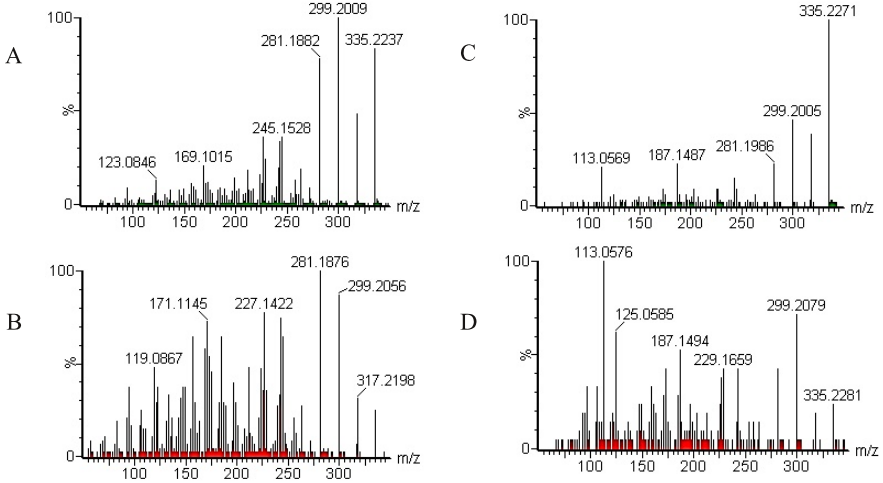
Vasemmalla: MT: HLM M+O-2H *m/z* 317,2 (t_R 9,31 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: HLM M+O-2H *m/z* 317,2 (t_R 8,97 min) C: CE 20 D: CE 25



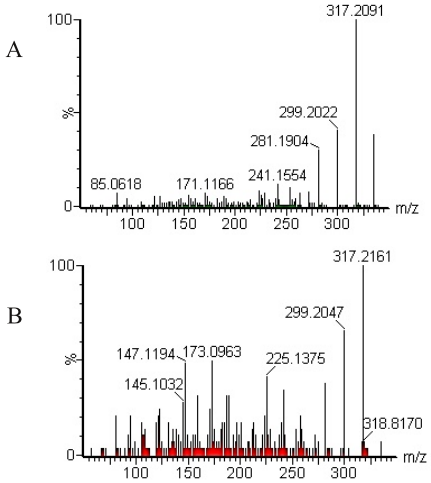
MT: TiO_2 M+O-2H *m/z* 317,2 (t_R 10,70 min)
A: CE 20 B: CE 25



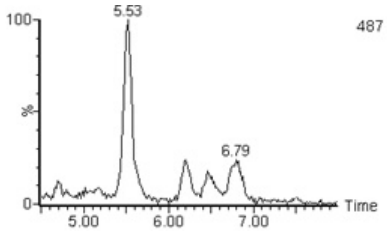
* MT: M+2O *m/z* 335,2 (t_R 7,74 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



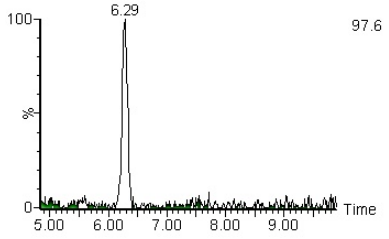
Vasemmalla: MT: HLM M+2O *m/z* 335,2 (t_R 8,34 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: HLM M+2O *m/z* 335,2 (t_R 6,56 min) C: CE 20 D: CE 25

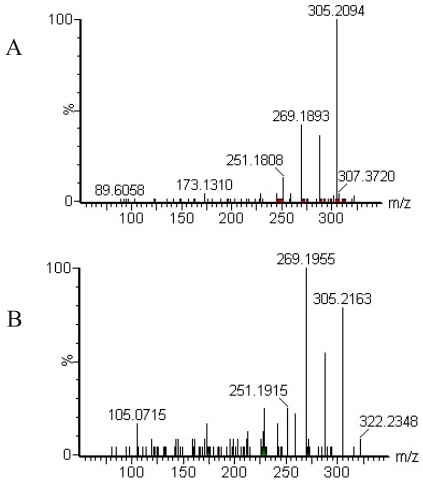


MT: HLM M+2O *m/z* 335,2 (t_R 5,43 min) A: CE 20 B: CE 25

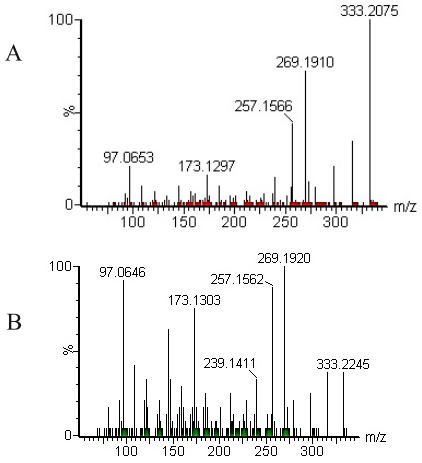


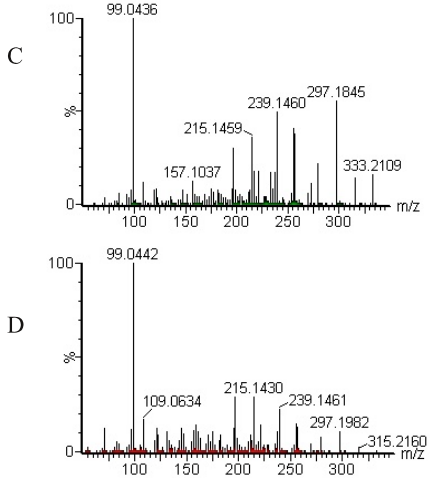
MT: XIC TiO_2 M+2O-2H *m/z* 333,2





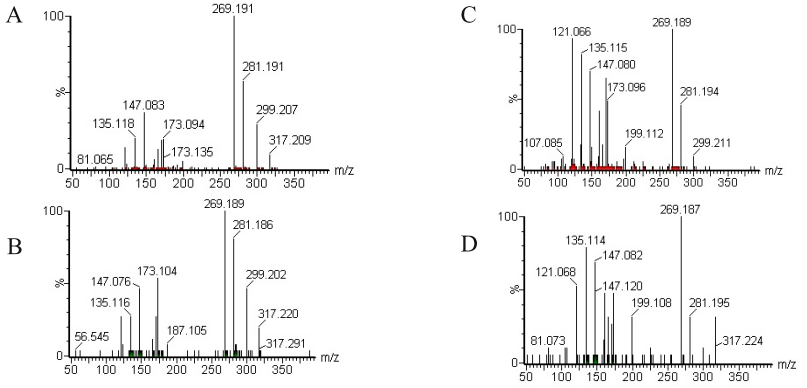
Vasemmalla: MT: XIC TiO_2 M+19 *m/z* 322,2
Oikealla: MT: TiO_2 M+19 *m/z* 322,2 (t_R 6,29 min) A: CE 20 B: CE 25



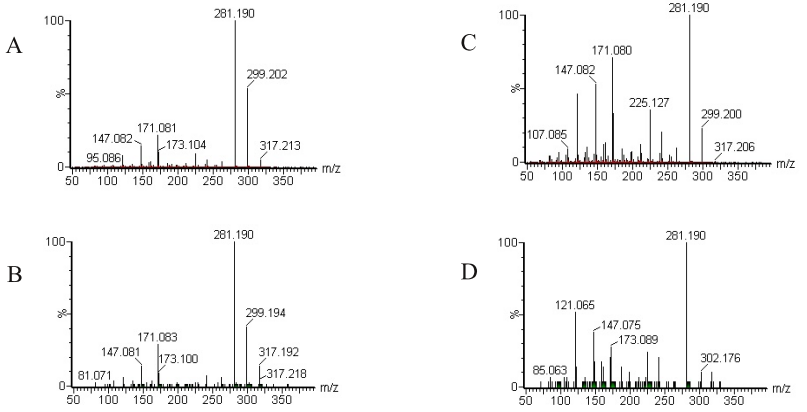


Vasemmalla: MT: HLM M+2O-2H *m/z* 333,2 (t_R 6,79 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: MT: HLM M+2O-2H *m/z* 333,2 (t_R 5,53 min) C: CE 20 D: CE 25

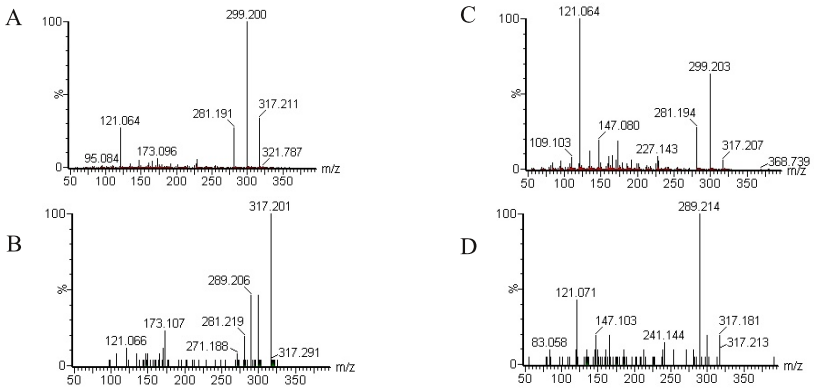
LIITE 3: Metandienonin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa. HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden samanmassaisten ja samalla retentioajalla eluoituneiden isomeerien samankaltaisuutta on arvioitu tuoteionispektrejä vertailemalla.
*** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitain eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.



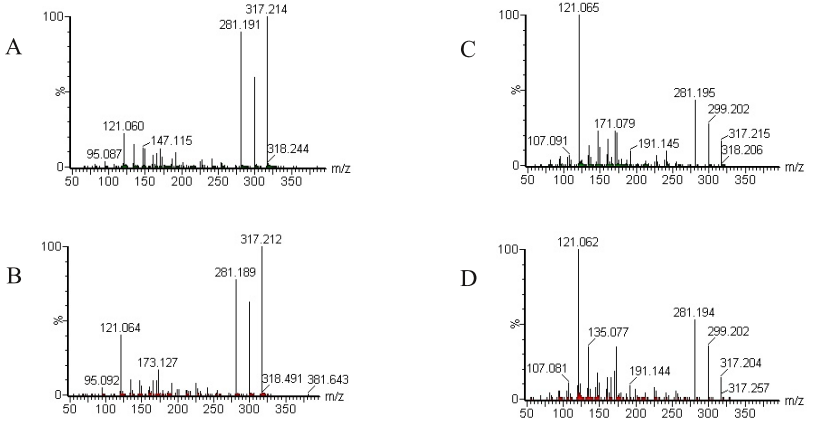
** MDN: M+O *m/z* 317,2 (t_R 13,55 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



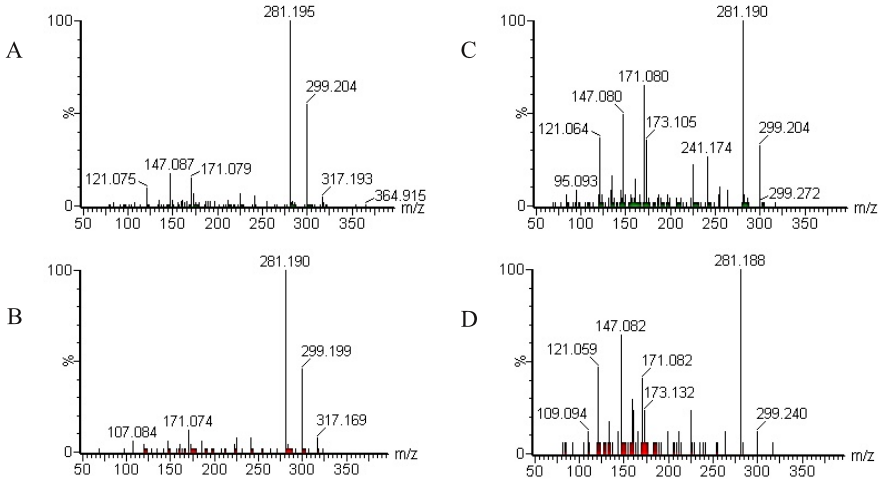
*** MDN: M+O *m/z* 317,2 (t_R 9,81 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



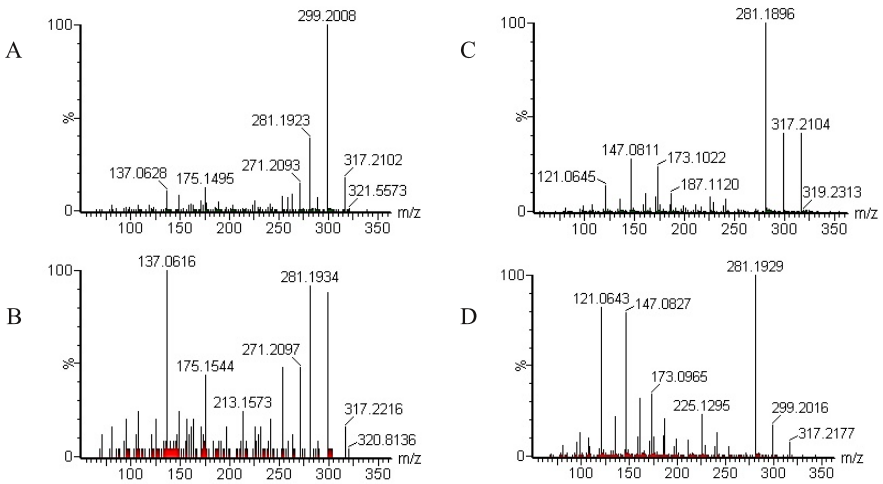
** MDN: M+O *m/z* 317,2 (t_R 9,13 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



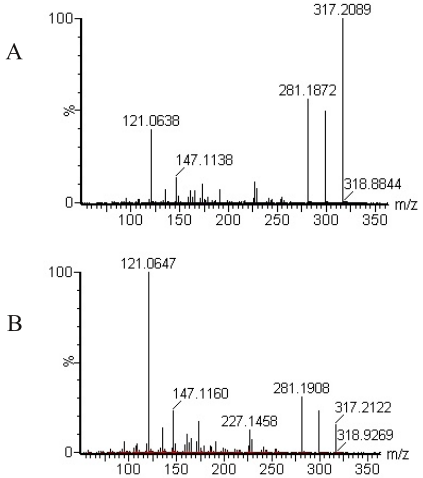
*** MDN: M+O *m/z* 317,2 (t_R 7,74 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



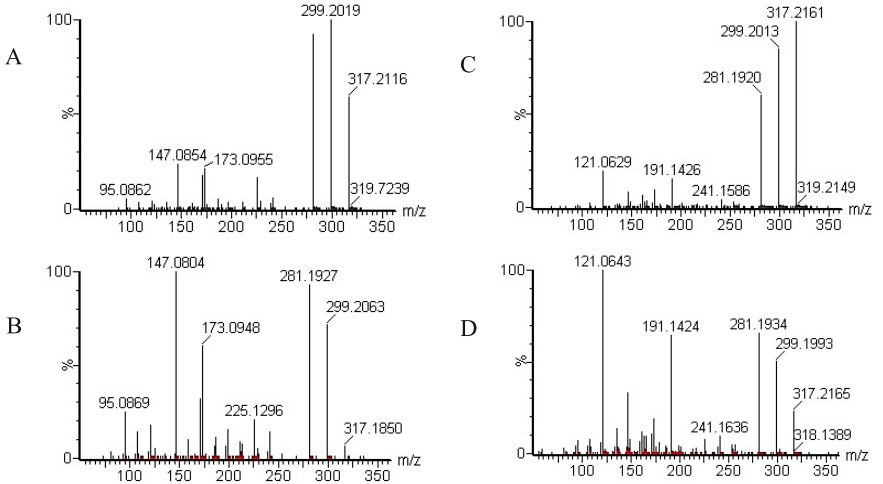
*** MDN: M+O *m/z* 317,2 (t_R 7,06 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



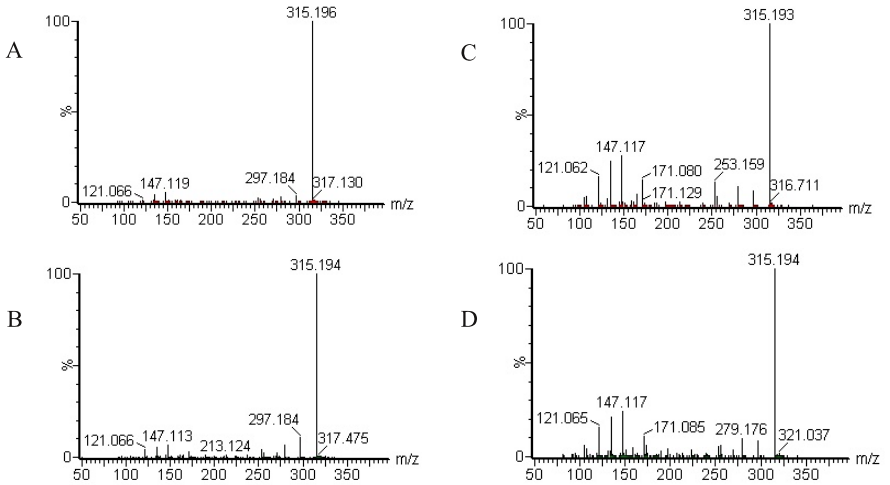
Vasemmalla: MDN: TiO_2 M+O *m/z* 317,2 (t_R 16,58 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: TiO_2 M+O *m/z* 317,2 (t_R 11,90 min) C: CE 15 D: CE 20



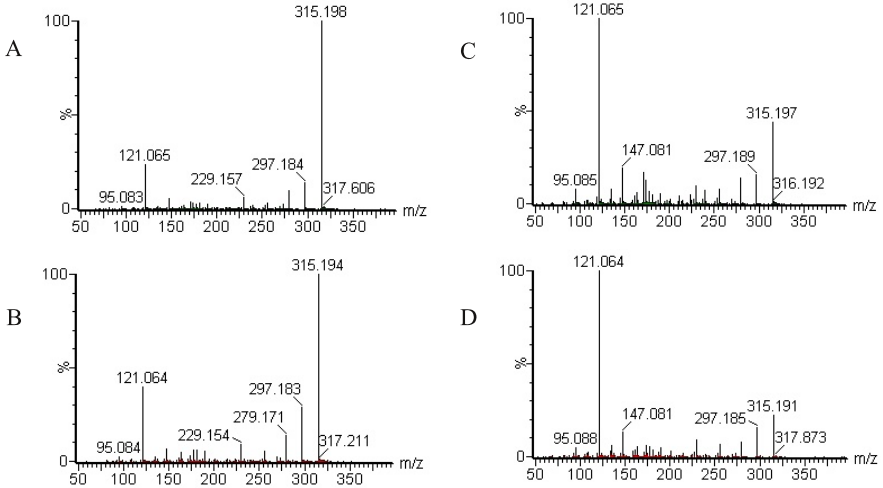
MDN: HLM M+O *m/z* 317,2 (t_R 12,18 min)
A: CE 15 B: CE 20



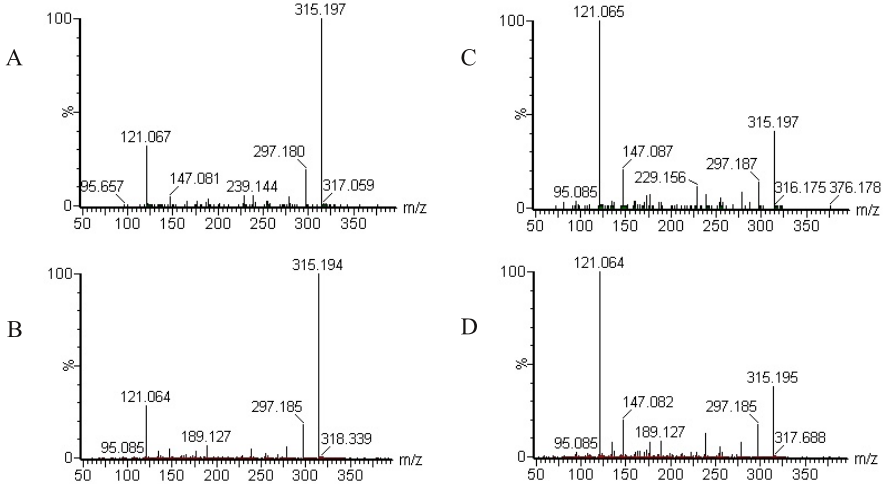
Vasemmalla: MDN: TiO_2 M+O *m/z* 317,2 (t_R 10,68 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: TiO_2 M+O *m/z* 317,2 (t_R 6,89 min) C: CE 15 D: CE 20



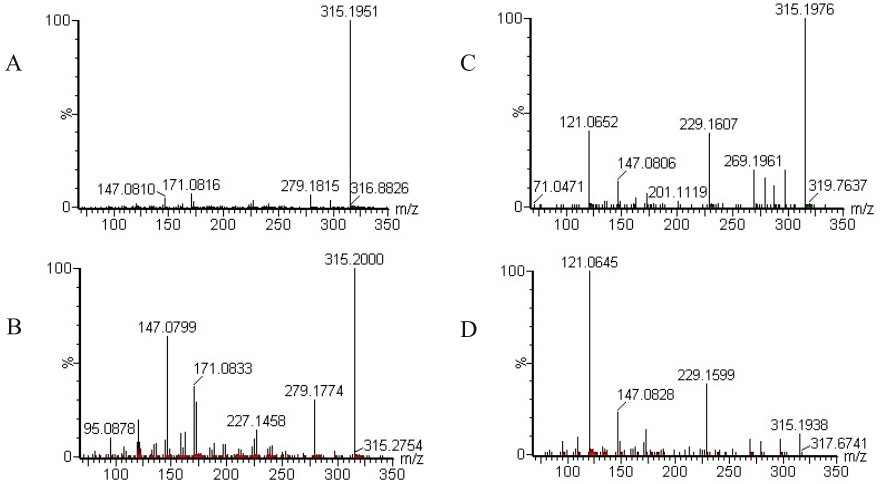
*** MDN: M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 9,86 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



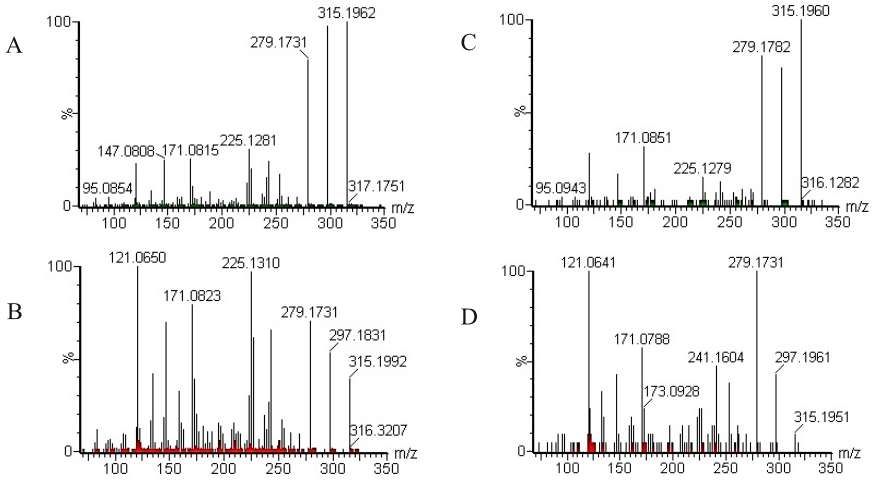
*** MDN: M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 8,27 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



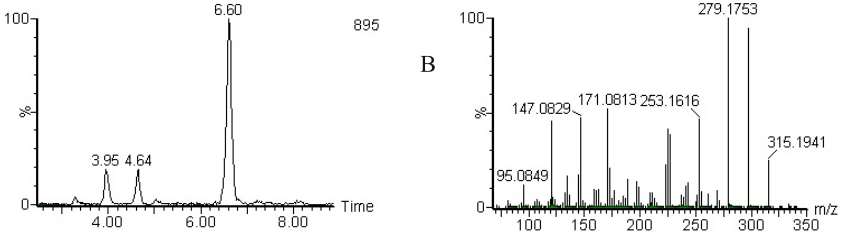
*** MDN: M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 8,77 min)
A: HLM CE 15 B: TiO_2 CE 15 C: HLM CE 20 D: TiO_2 CE 20



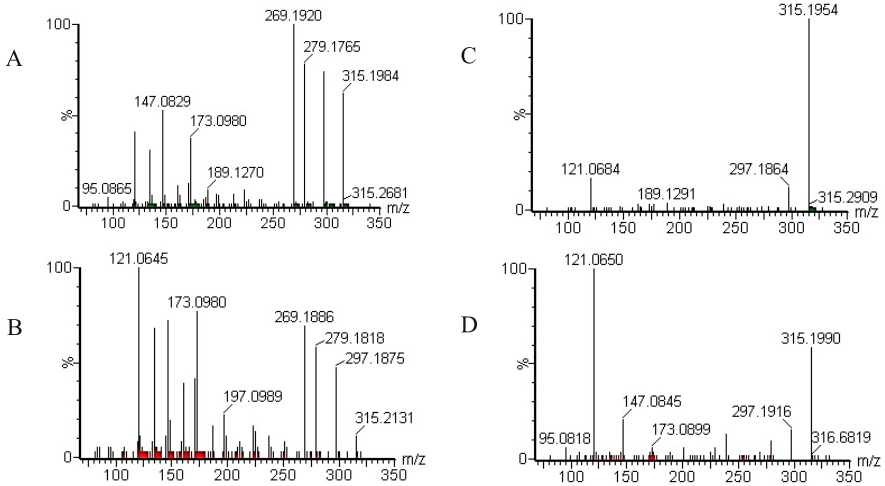
Vasemmalla: MDN: HLM M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 12,45 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: HLM M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 8,94 min) C: CE 15 D: CE 20



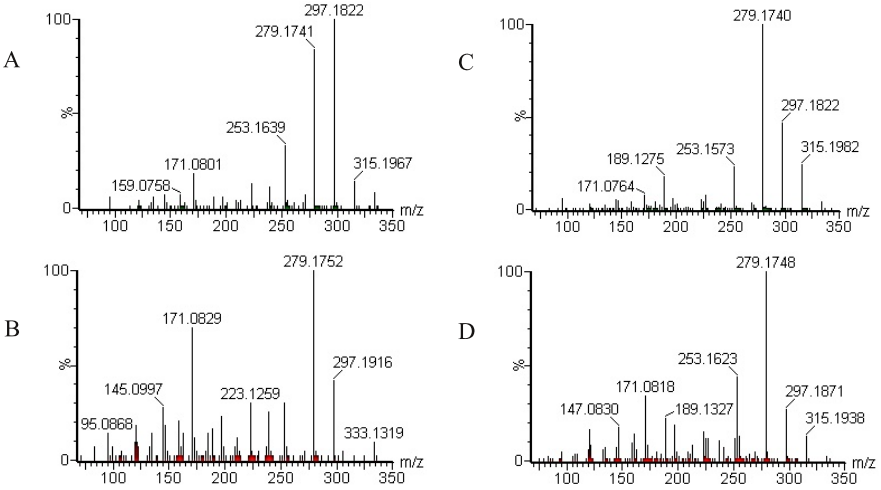
Vasemmalla: MDN: HLM M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 6,62 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: HLM M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 3,96 min) C: CE 15 D: CE 20



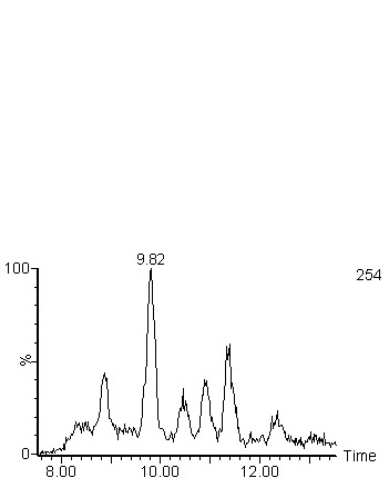
Vasemmalla: MDN: XIC HLM M+2O *m/z* 333,2
Oikealla: MDN: HLM M+2O *m/z* 333,2 (t_R 6,60 min) A: CE 15 B: CE 20

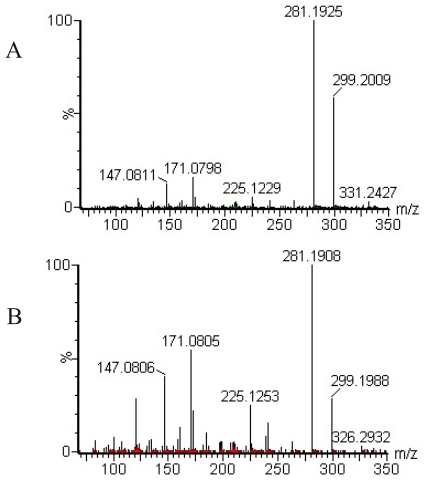


Vasemmalla: MDN: TiO_2 M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 11,25 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: TiO_2 M+O-2H *m/z* 315,2 (t_R 7,11 min) C: CE 15 D: CE 20

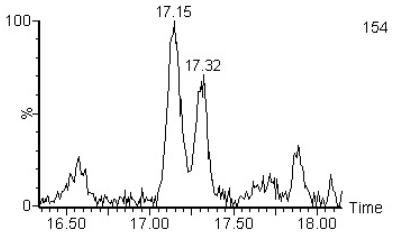


Vasemmalla: MDN: HLM M+2O *m/z* 333,2 (t_R 4,64 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: HLM M+2O *m/z* 333,2 (t_R 3,95 min) C: CE 15 D: CE 20

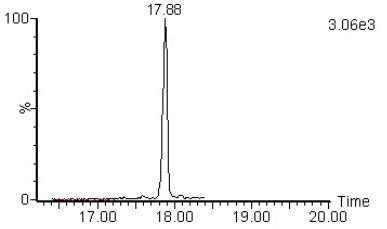


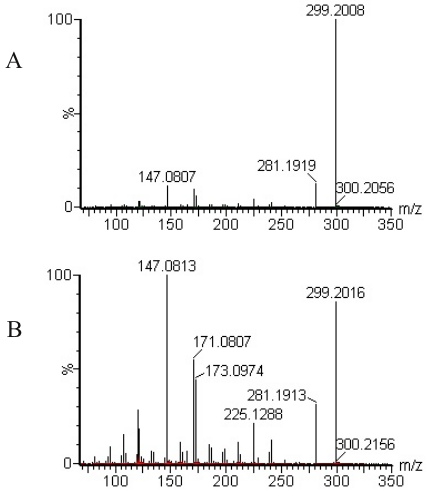


Vasemmalla: MDN: XIC HLM M+2O-2H *m/z* 331,2
Oikealla: MDN: HLM M+2O-2H *m/z* 331,2 (t_R 9,82 min) A: CE 15 B: CE 20

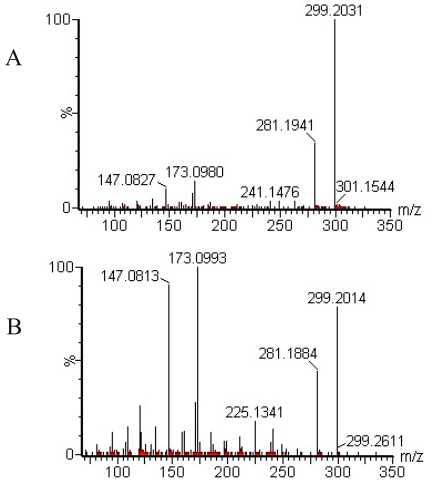


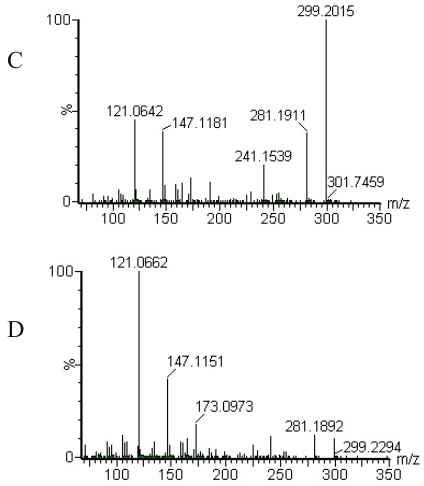
MDN: XIC TiO_2 M-2H *m/z* 299,2



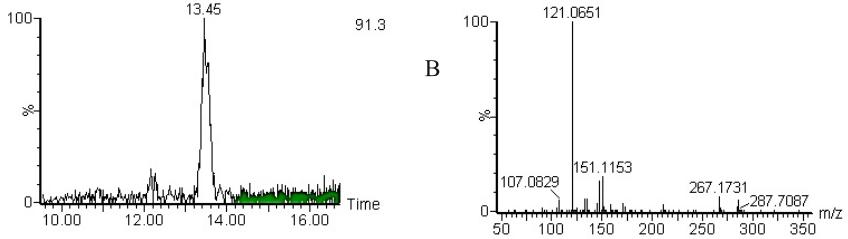


Vasemmalla: MDN: XIC HLM M-2H *m/z* 299,2
Oikealla: MDN: HLM M-2H *m/z* 299,2 (t_R 17,88 min) A: CE 15 B: CE 20

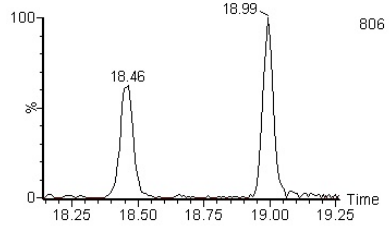




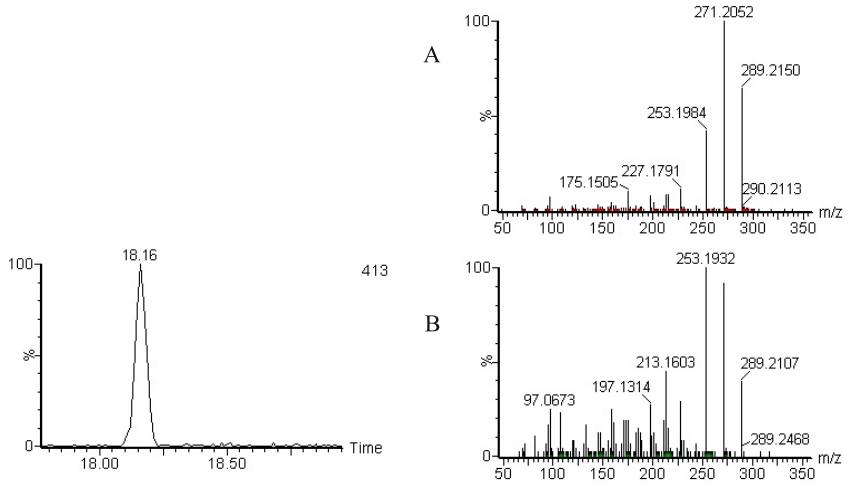
Vasemmalla: MDN: TiO_2 M-2H *m/z* 299,2 (t_R 17,32 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: TiO_2 M-2H *m/z* 299,2 (t_R 17,15 min) C: CE 15 D: CE 20



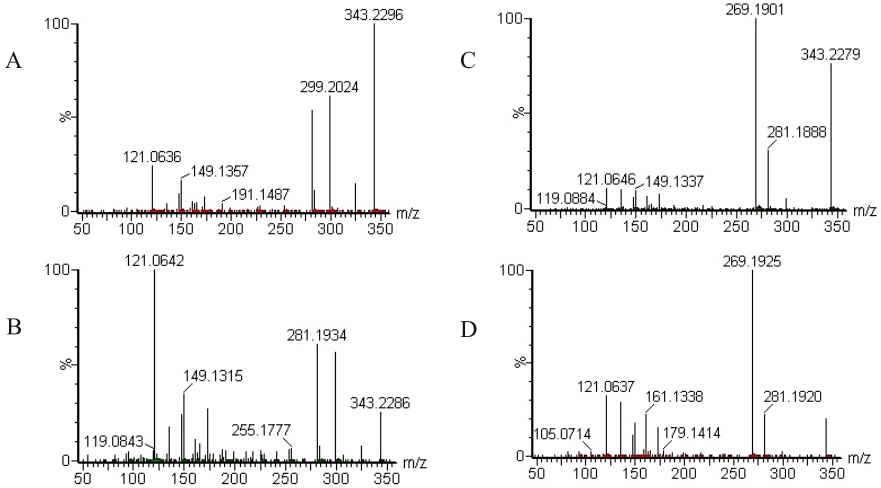
Vasemmalla: MDN: XIC TiO_2 M-2H-CH_2 *m/z* 285,2
Oikealla: MDN: TiO_2 M-2H-CH_2 *m/z* 285,2 (t_R 13,45 min) A: CE 15 B: CE 20



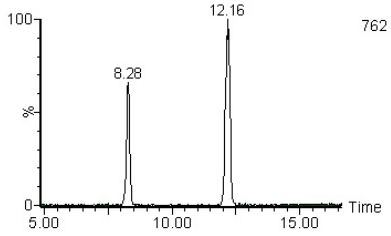
MDN: XIC HLM M+42 *m/z* 343,2



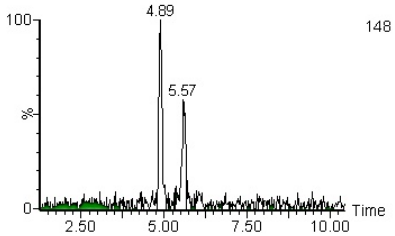
Vasemmalla: MDN: XIC TiO_2 M-12 *m/z* 289,2
Oikealla: MDN: TiO_2 M-12 *m/z* 289,2 (t_R 18,16 min) A: CE 15 B: CE 20



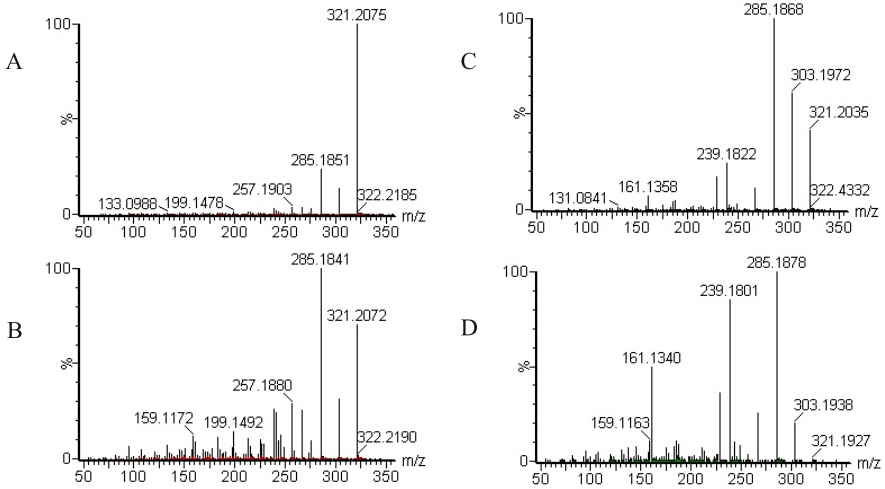
Vasemmalla: MDN: HLM M+42 *m/z* 343,2 (t_R 18,99 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: HLM M+42 *m/z* 343,2 (t_R 18,46 min) C: CE 15 D: CE 20



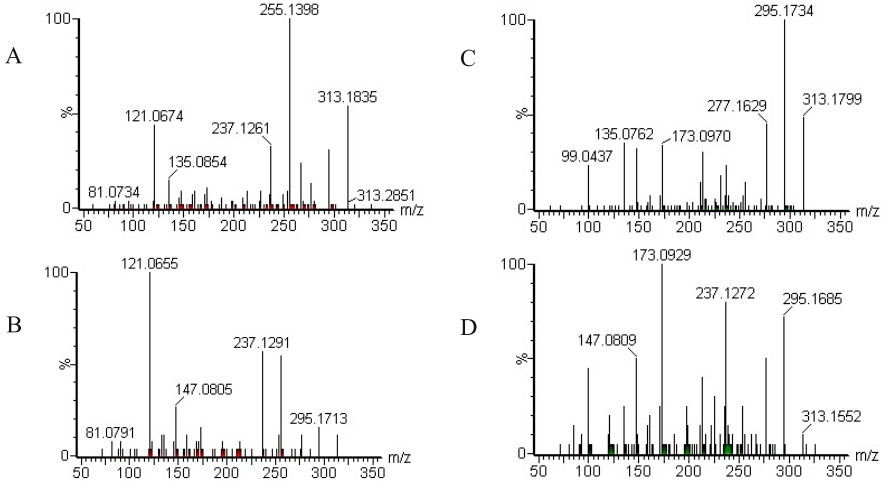
MDN: XIC HLM M+20 *m/z* 321,2



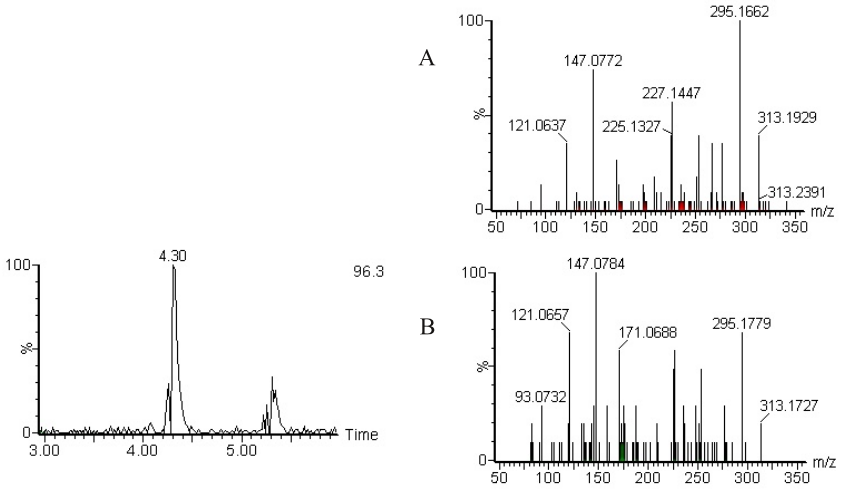
MDN: XIC TiO_2 M+12 *m/z* 313,2



Vasemmalla: MDN: TiO_2 M+20 *m/z* 321,2 (t_R 12,16 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: TiO_2 M+20 *m/z* 321,2 (t_R 8,28 min) C: CE 15 D: CE 20



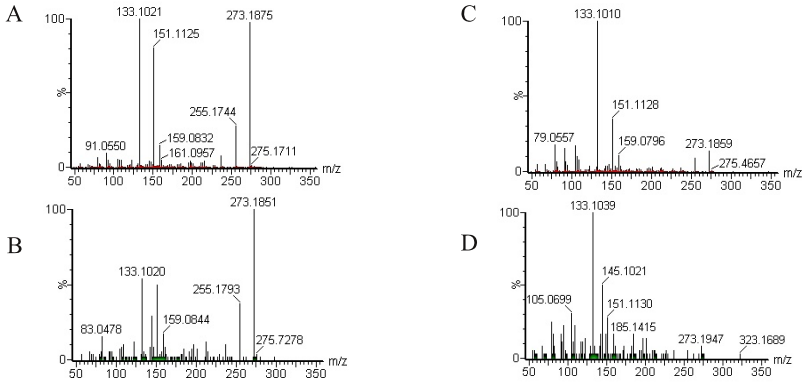
Vasemmalla: MDN: TiO_2 M+12 *m/z* 313,2 (t_R 5,57 min) A: CE 15 B: CE 20
Oikealla: MDN: TiO_2 M+12 *m/z* 313,2 (t_R 4,89 min) C: CE 15 D: CE 20



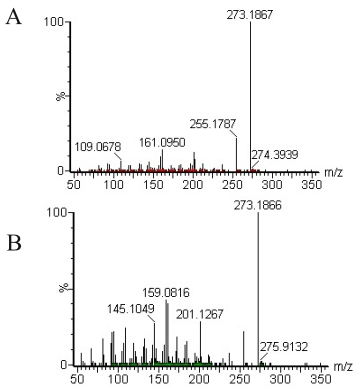
Vasemmalla: MDN: XIC HLM M+12 *m/z* 313,2

Oikealla: MDN: TiO_2 M+12 *m/z* 313,2 (t_R 4,30 min) A: CE 15 B: CE 20

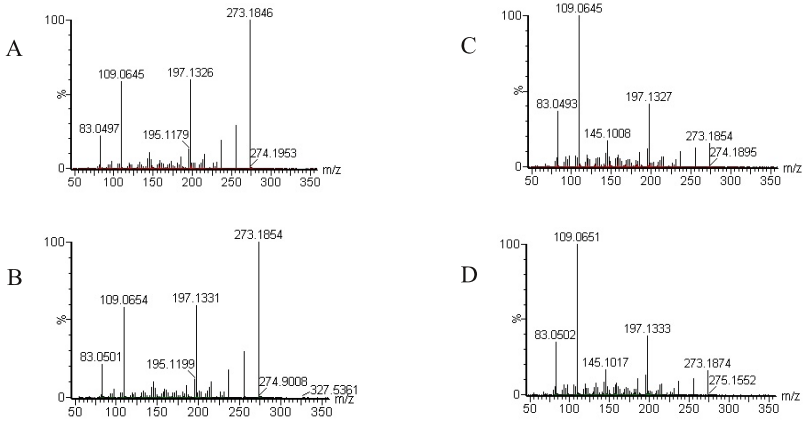
LIITE 4: Nandrolonin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa. HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden samanmassaisten ja samalla retentioajalla eluoituneiden isomeerien samankaltaisuutta on arvioitu tuoteionispektrejä vertailemalla.
*** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitain eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.



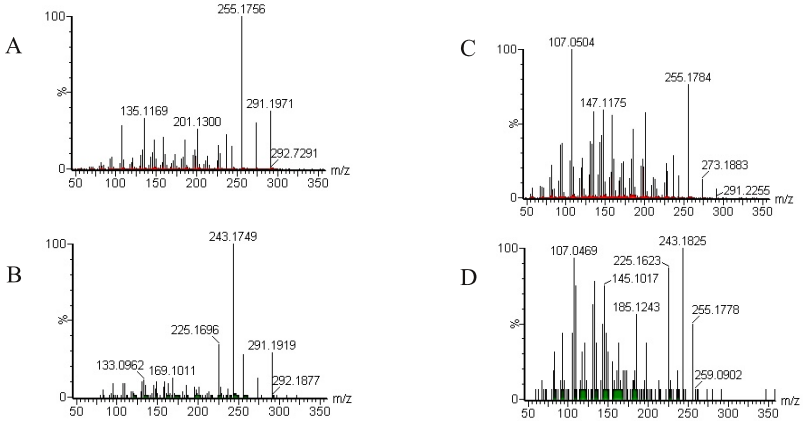
** NAN: M-2H *m/z* 273,2 (t_R 14,76 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



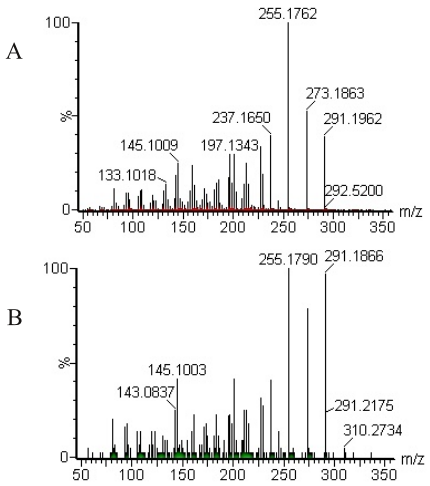
NAN: TiO_2 M-2H *m/z* 273,2 (t_R 14,51 min)
A: CE 20 B: CE 25



*** NAN: M-2H *m/z* 273,2 (t_R 14,00 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25

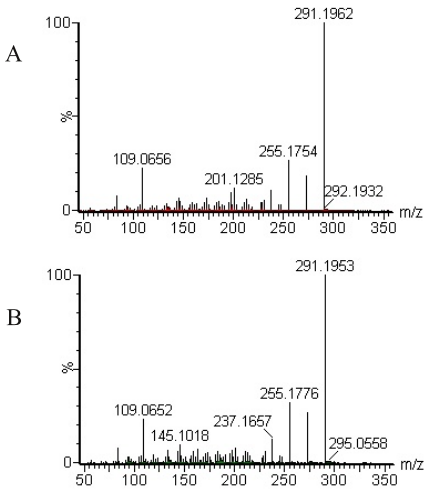


* NAN: M+O *m/z* 291,2 (t_R 12,74 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



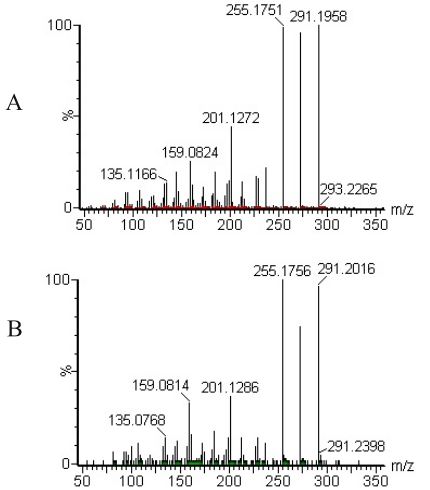
** NAN: M+O *m/z* 291,2 (t_R 9,66 min)

A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



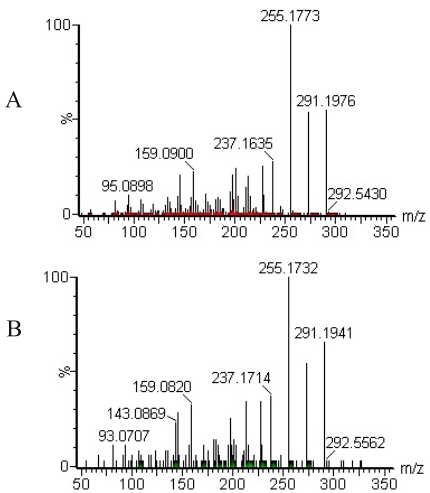
*** NAN: M+O *m/z* 291,2 (t_R 8,39 min)

A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



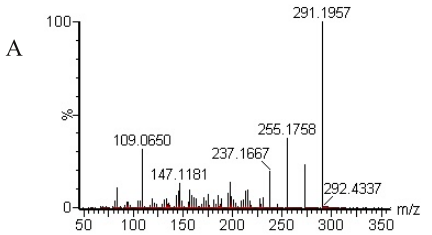
** NAN: M+O *m/z* 291,2 (t_R 9,41 min)

A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25

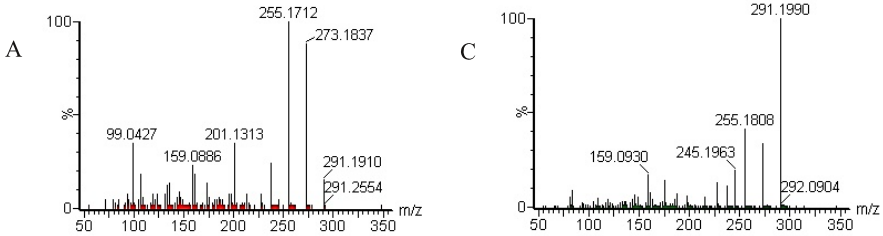


** NAN: M+O *m/z* 291,2 (t_R 7,78 min)

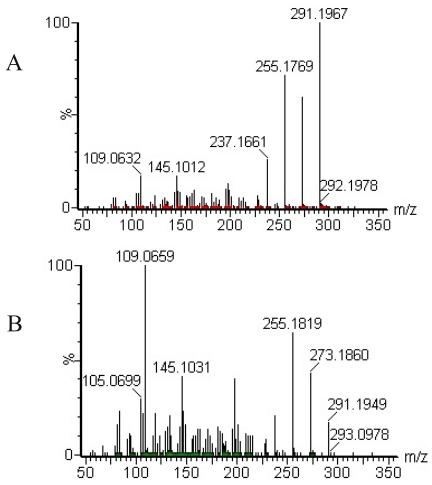
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



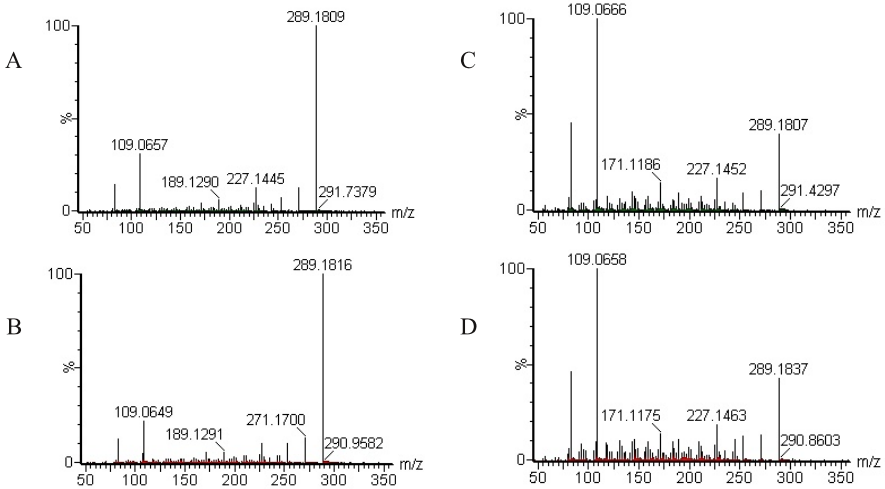
Vasemmalla: NAN: HLM M+O *m/z* 291,2 (t_R 12,22 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: HLM M+O *m/z* 291,2 (t_R 10,53 min) C: CE 20 D: CE 25



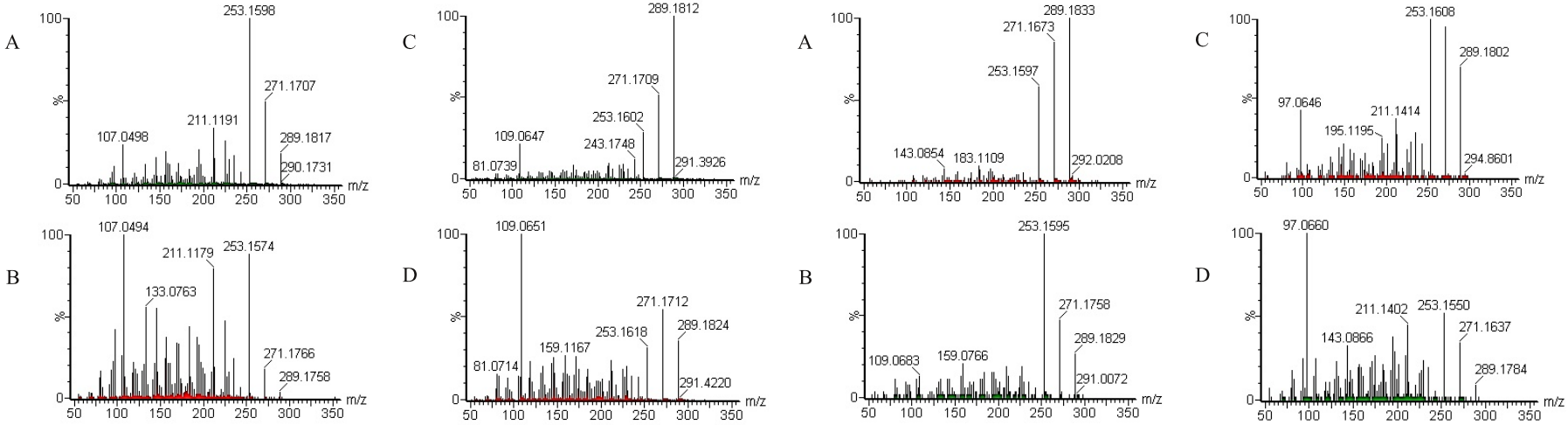
Vasemmalla: NAN: TiO_2 M+O *m/z* 291,2 (t_R 11,35 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: TiO_2 M+O *m/z* 291,2 (t_R 10,99 min) C: CE 20 D: CE 25



Vasemmalla: NAN: TiO_2 M+O *m/z* 291,2 (t_R 12,10 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: TiO_2 M+O *m/z* 291,2 (t_R 11,77 min) C: CE 20 D: CE 25

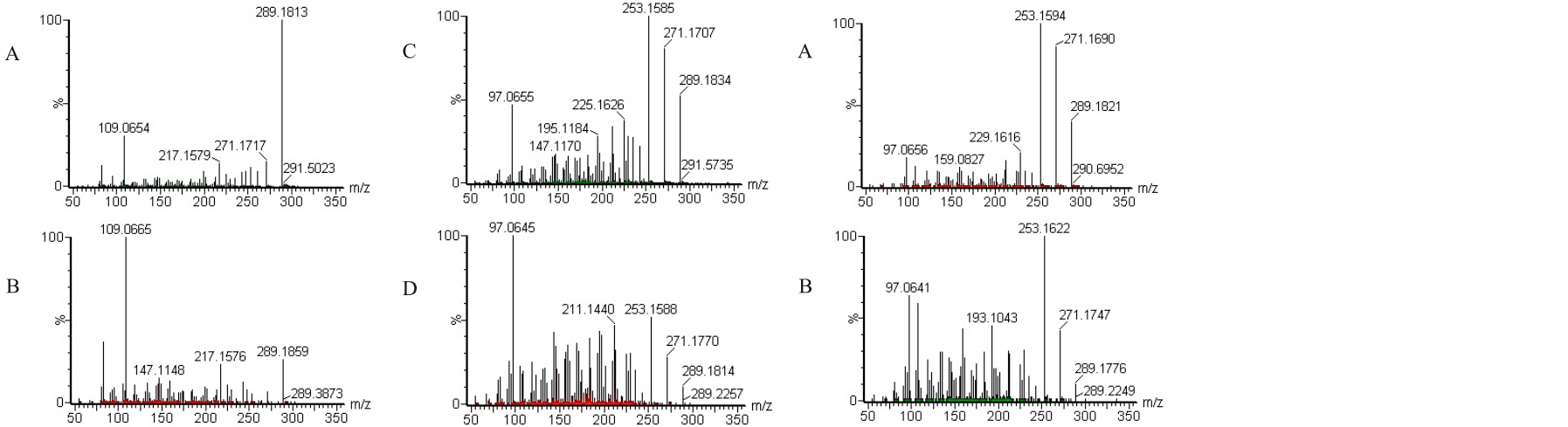


*** NAN: M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 9,75 min)
A: HLM CE 20 B: TiO_2 CE 20 C: HLM CE 25 D: TiO_2 CE 25



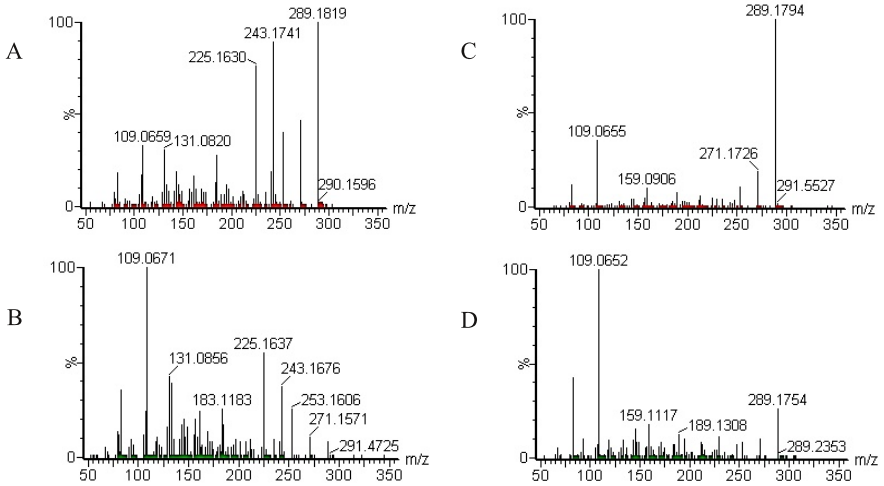
Vasemmalla: NAN: HLM M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 10,56 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: TiO_2 M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 10,11 min) C: CE 20 D: CE 25

Vasemmalla: NAN: HLM M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 8,44 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: HLM M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 7,92 min) C: CE 20 D: CE 25

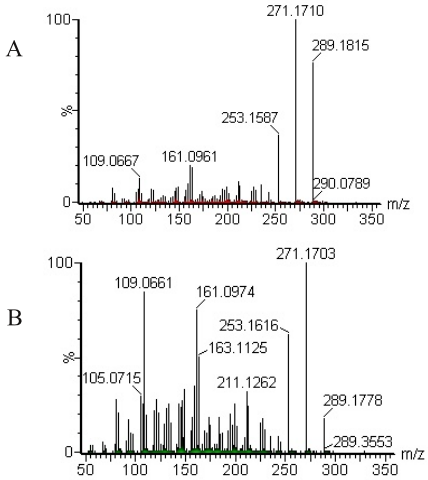


Vasemmalla: NAN: HLM M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 9,44 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: HLM M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 9,08 min) C: CE 20 D: CE 25

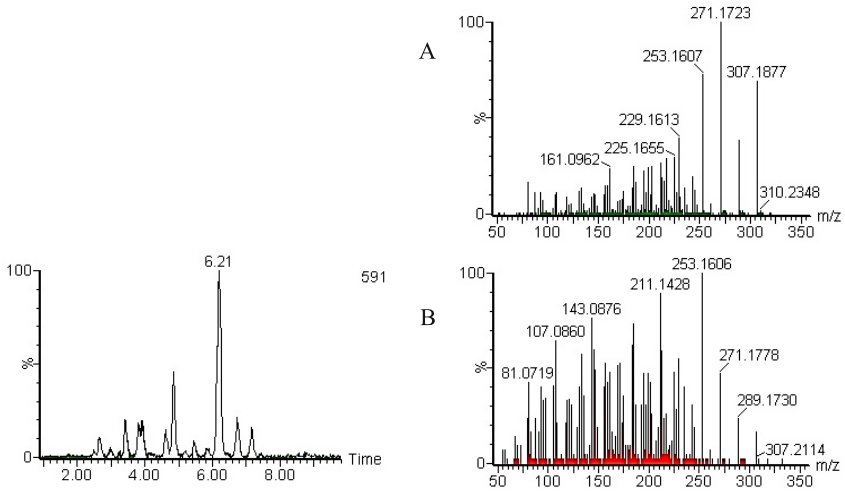
NAN: HLM M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 7,34 min)
A:. CE 20 B: CE 25



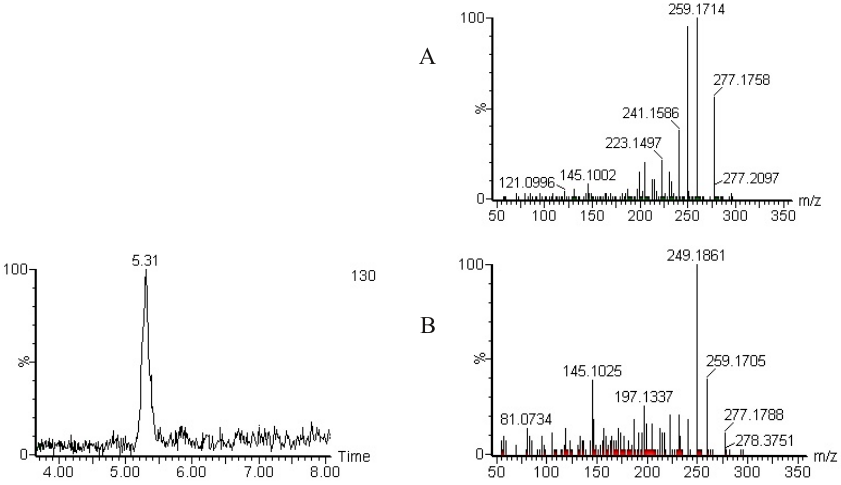
Vasemmalla: NAN: TiO_2 M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 11,63 min) A: CE 20 B: CE 25
Oikealla: NAN: TiO_2 M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 9,20 min) C: CE 20 D: CE 25



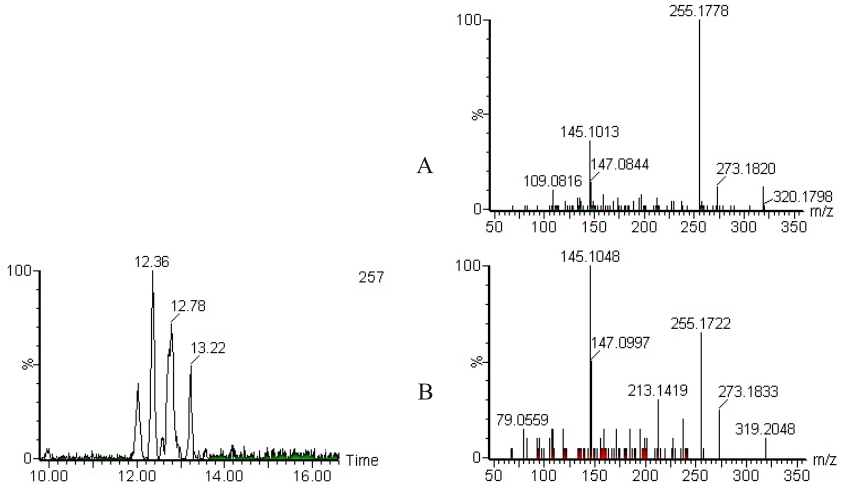
NAN: TiO_2 M+O-2H *m/z* 289,2 (t_R 8,90 min)
A: CE 20 B: CE 25



Vasemmalla: NAN: XIC HLM M+2O *m/z* 307,2
Oikealla: NAN: HLM M+2O *m/z* 307,2 (t_R 6,21 min) A: CE 20 B: CE 25

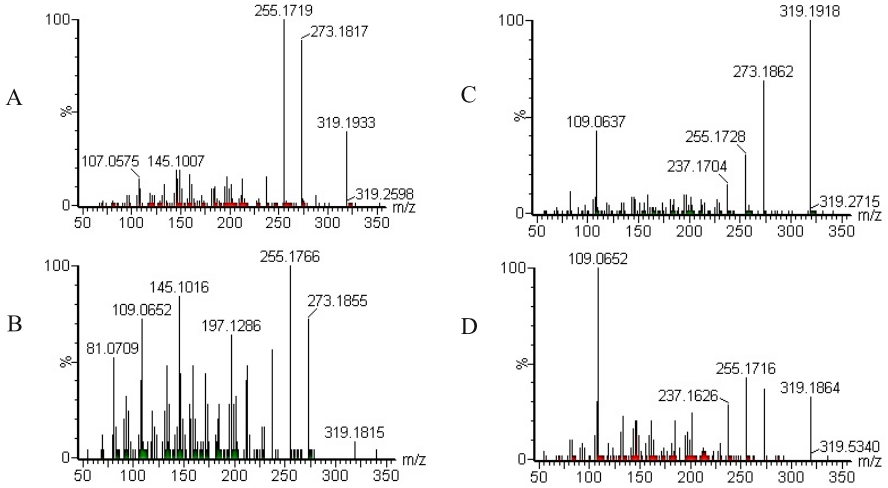


Vasemmalla: NAN: XIC TiO_2 M+20 *m/z* 295,2
Oikealla: NAN: TiO_2 M+20 *m/z* 295,2 (t_R 5,31 min) A: CE 20 B: CE 25



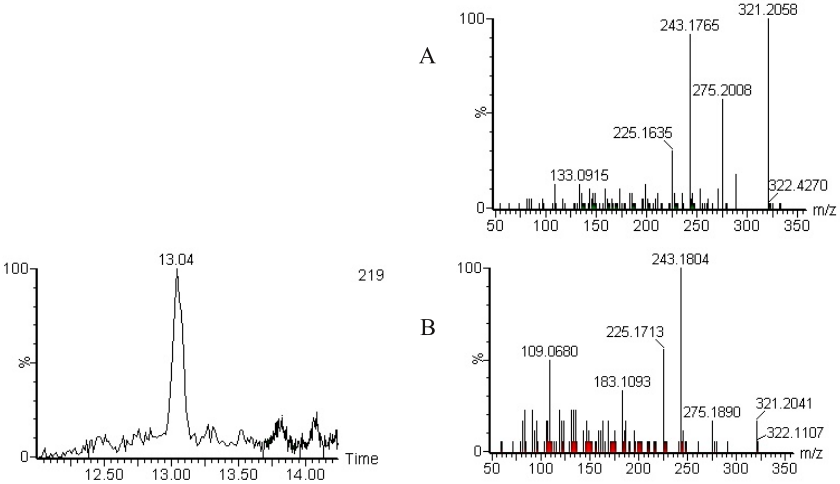
Vasemmalla: NAN: XIC TiO_2 M+44 *m/z* 319,2

Oikealla: NAN: TiO_2 M+44 *m/z* 319,2 (t_R 13,22 min) A: CE 20 B: CE 25



Vasemmalla: NAN: TiO_2 M+44 *m/z* 319,2 (t_R 12,78 min) A: CE 20 B: CE 25

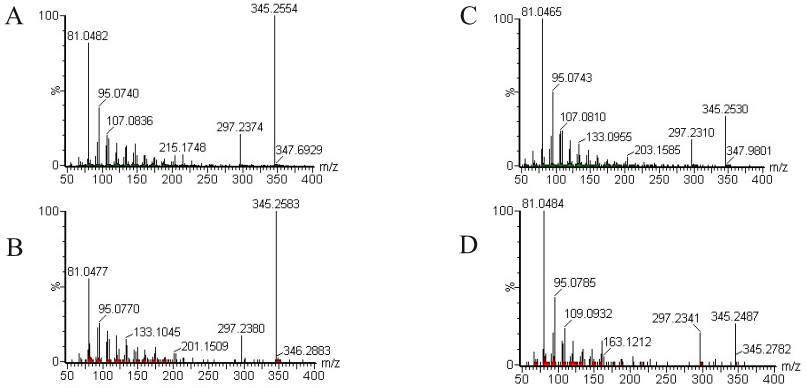
Oikealla: NAN: TiO_2 M+44 *m/z* 319,2 (t_R 12,36 min) C: CE 20 D: CE 25



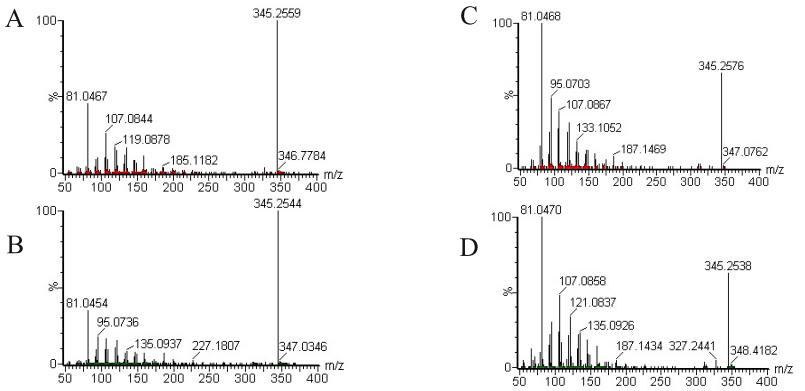
Vasemmalla: NAN: XIC TiO_2 M+46 *m/z* 321,2

Oikealla: NAN: TiO_2 M+46 *m/z* 321,2 (t_R 13,04 min) A: CE 20 B: CE 25

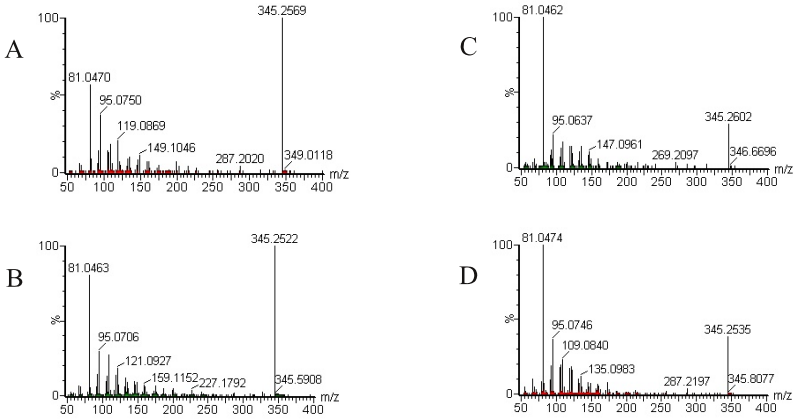
LIITE 5: Stanotsololin mikrosomi-inkubaatioissa ja titaanidioksidivalokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden reaktiotuotteiden eristetyt ionikromatogrammit (XIC) ja tuoteionispektrit, joita ei ole esitetty tulososiossa. HLM-reaktioissa ja TiO_2-valokatalyyttisissä reaktioissa syntyneiden samanmassaisten ja samalla retentioajalla eluoituneiden isomeerien samankaltaisuutta on arvioitu tuoteionispektrejä vertailemalla.
*** = tuoteionispektrit erittäin samanlaisia, ** = tuoteionispektreissä joitain eroja, * = tuoteionispektreissä useita eroavaisuuksia.



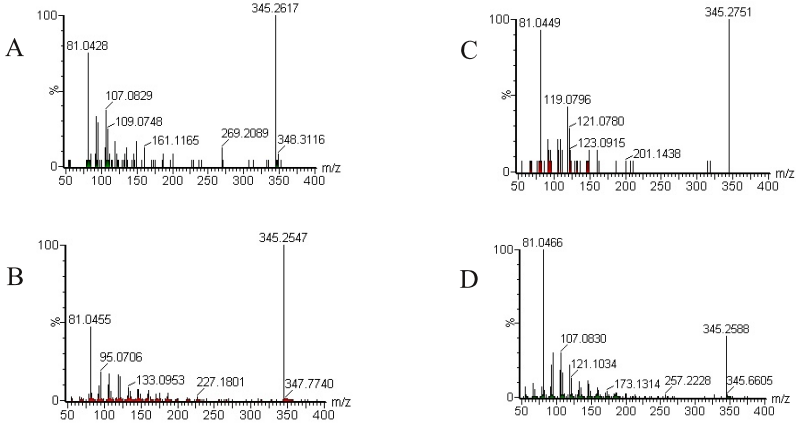
*** STZ: M+O *m/z* 345,25 (t_R 10,50 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



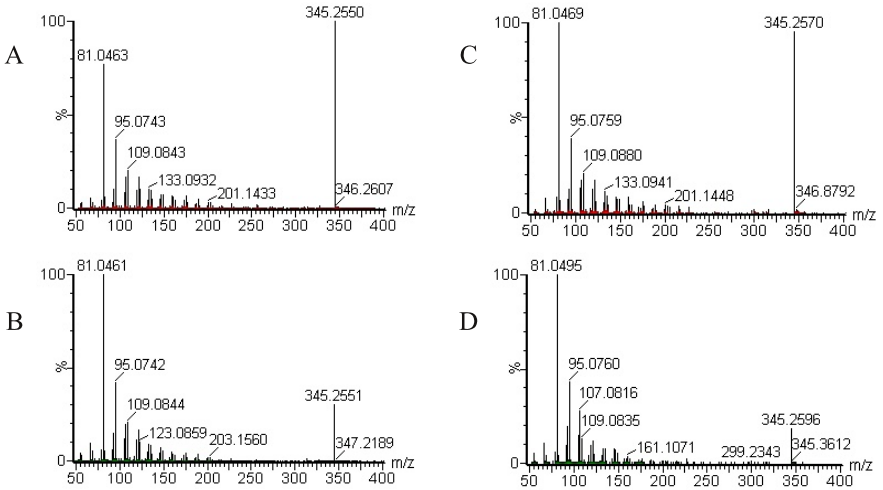
*** STZ: M+O *m/z* 345,25 (t_R 5,66 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



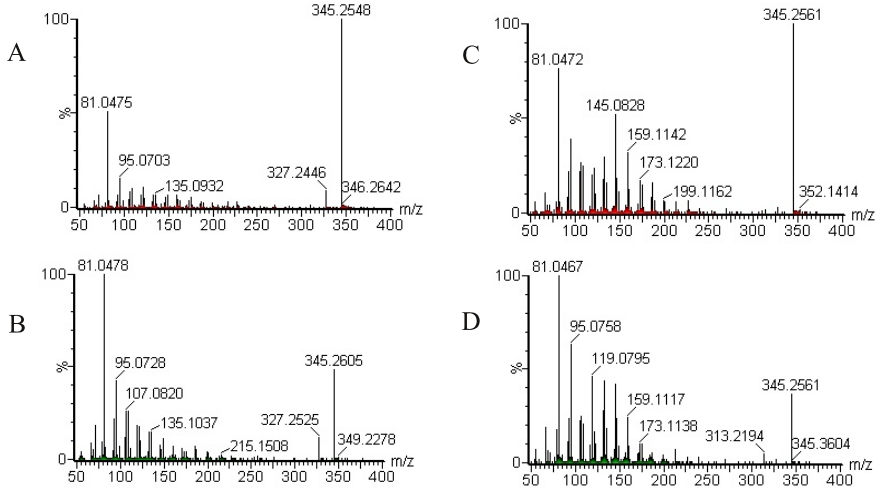
*** STZ: M+O *m/z* 345,25 (t_R 5,79 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



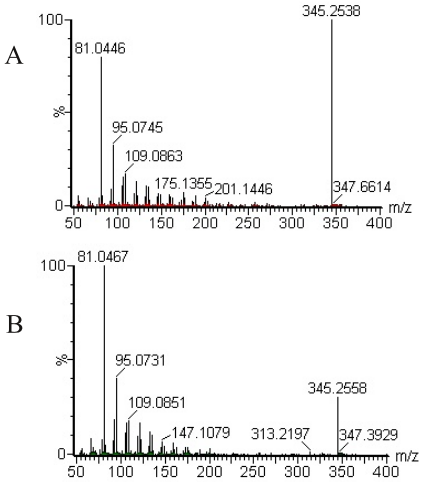
** STZ: M+O *m/z* 345,25 (t_R 5,55 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



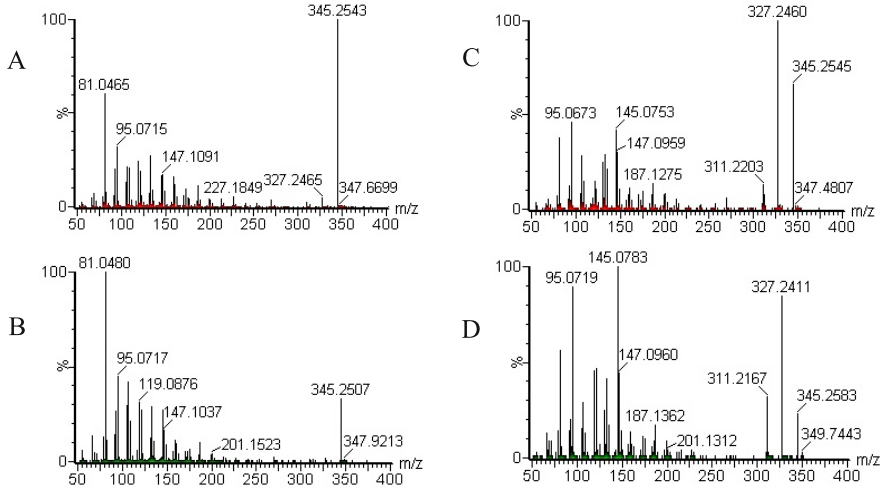
Vasemmalla: STZ: HLM M+O *m/z* 345,25 (t_R 10,29 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+O *m/z* 345,25 (t_R 9,09 min) C: CE 42 D: CE 47



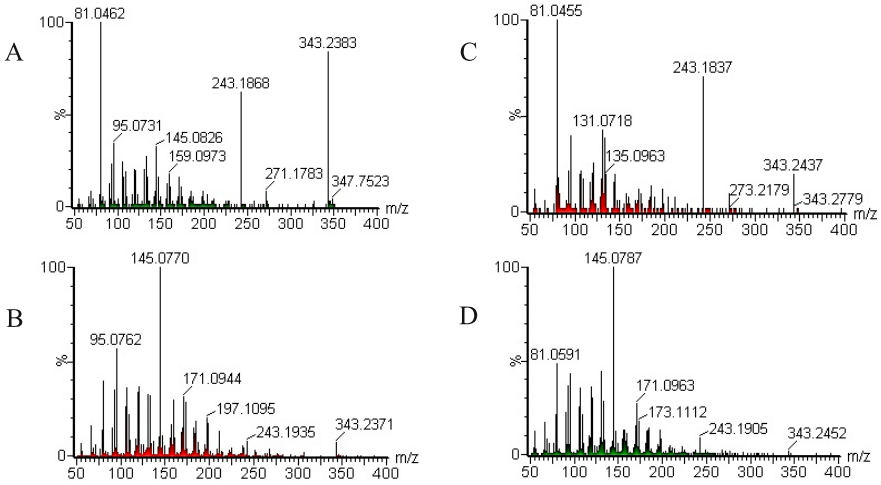
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+O *m/z* 345,25 (t_R 9,42 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+O *m/z* 345,25 (t_R 7,33 min) C: CE 42 D: CE 47



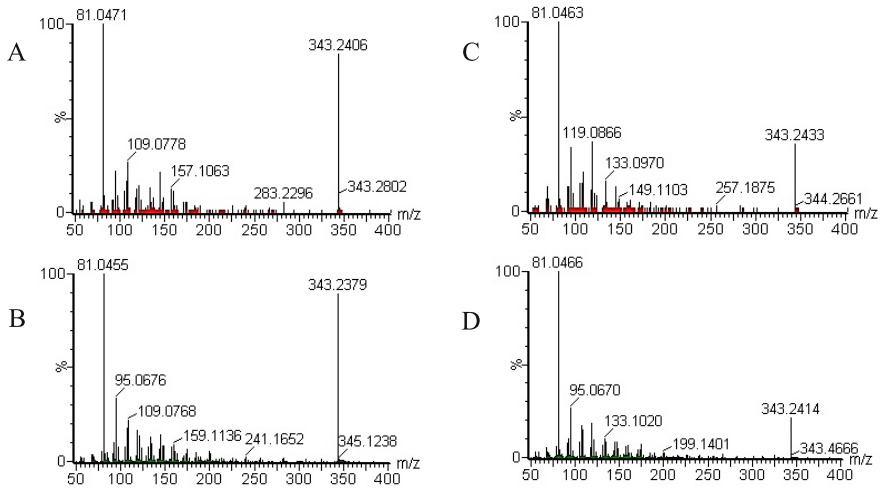
STZ: HLM M+O *m/z* 345,25 (t_R 7,49 min)
A: CE 42 B: CE 47



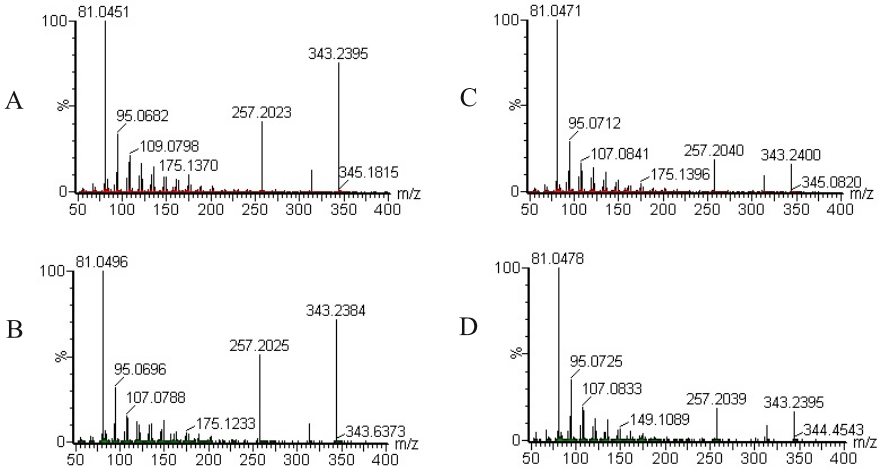
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+O *m/z* 345,25 (t_R 6,92 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+O *m/z* 345,25 (t_R 6,22 min) C: CE 42 D: CE 47



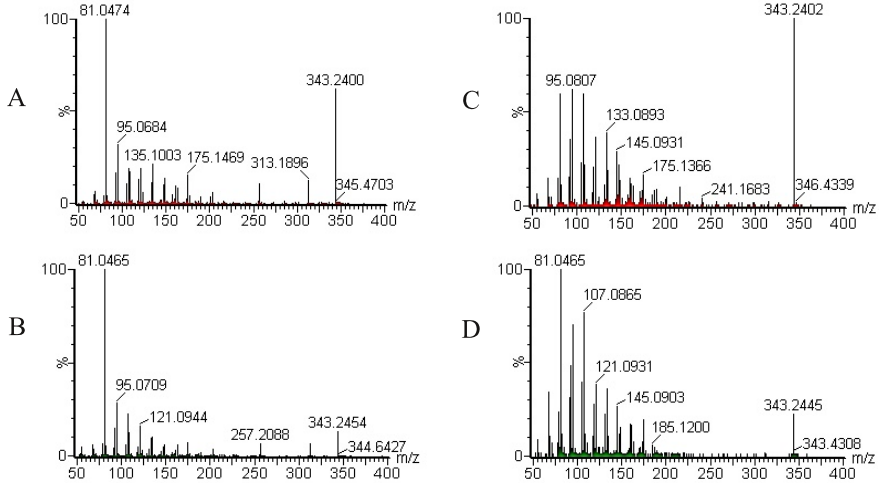
* STZ: M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 8,94 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



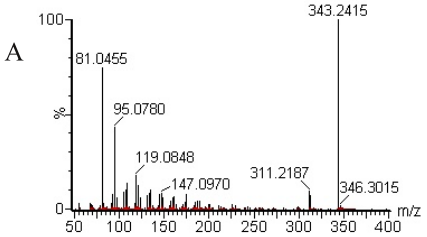
** STZ: M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 7,03 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



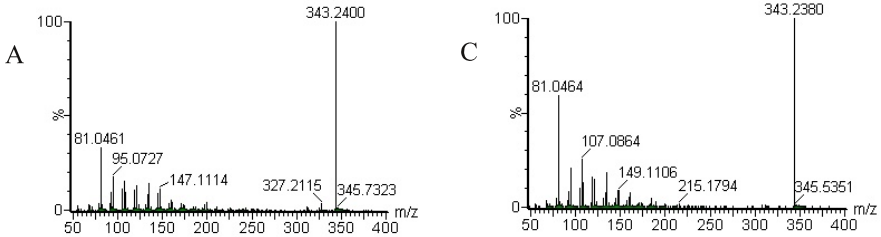
*** STZ: M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 7,57 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



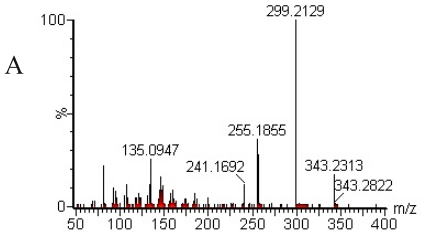
Vasemmalla: STZ: HLM M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 7,88 min) A: CE 42 B: CE 47 Oikealla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 8,55 min) C: CE 42 D: CE 47



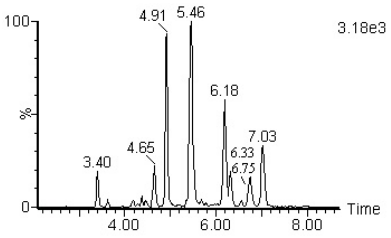
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 7,18 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 6,86 min) C: CE 42 D: CE 47



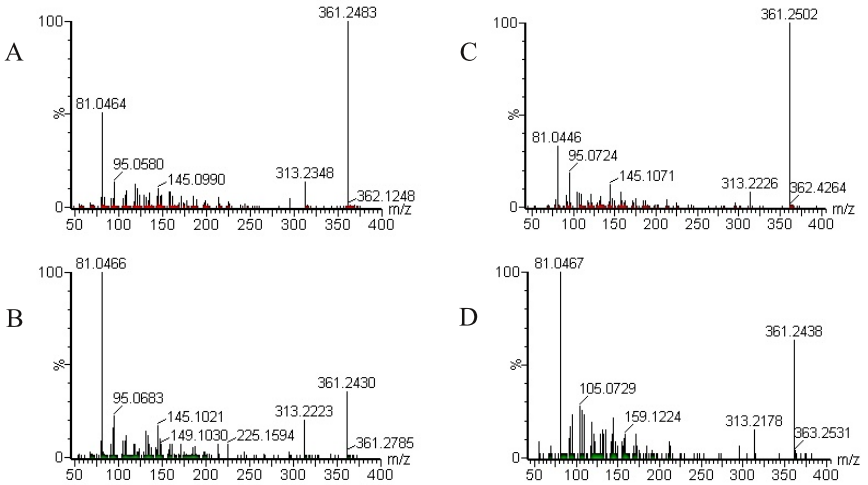
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 5,81 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 5,57 min) C: CE 42 D: CE 47



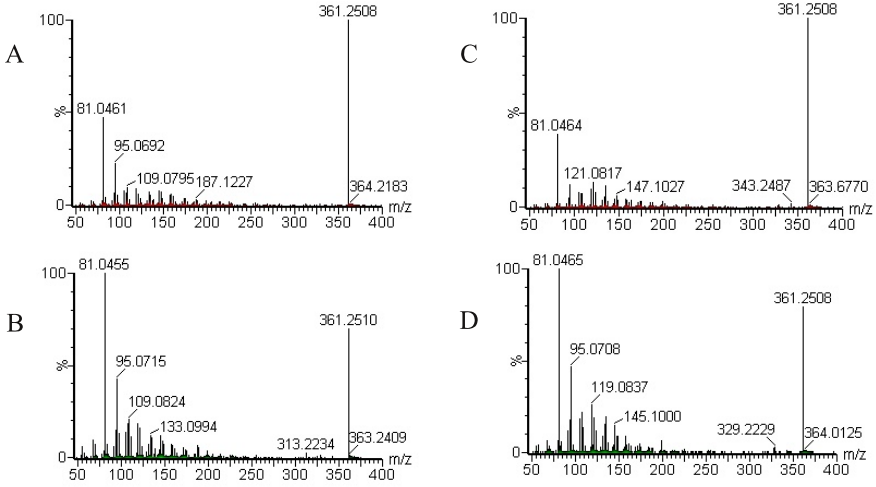
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 6,40 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+O-2H *m/z* 343,24 (t_R 6,28 min) C: CE 42 D: CE 47



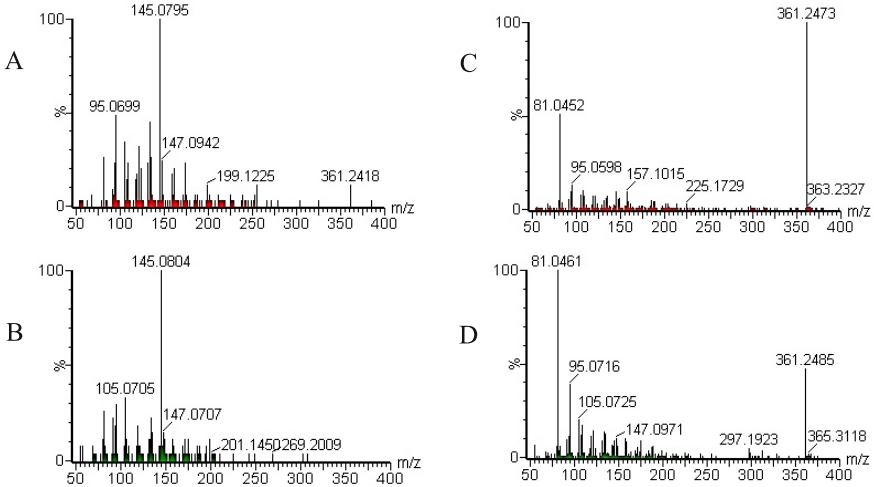
STZ: XIC HLM M+2O *m/z* 361,25



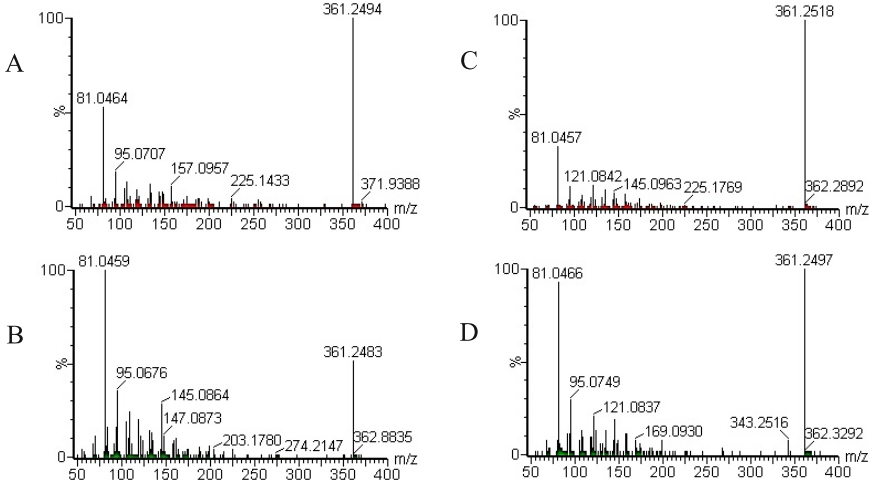
Vasemmalla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 7,03 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 6,75 min) C: CE 42 D: CE 47



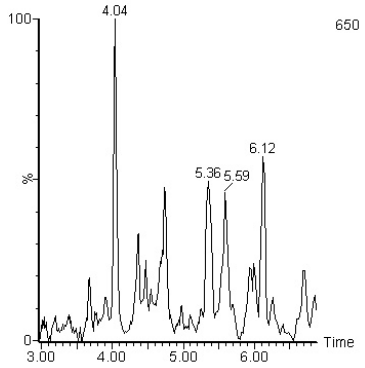
Vasemmalla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 5,46 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 4,91 min) C: CE 42 D: CE 47



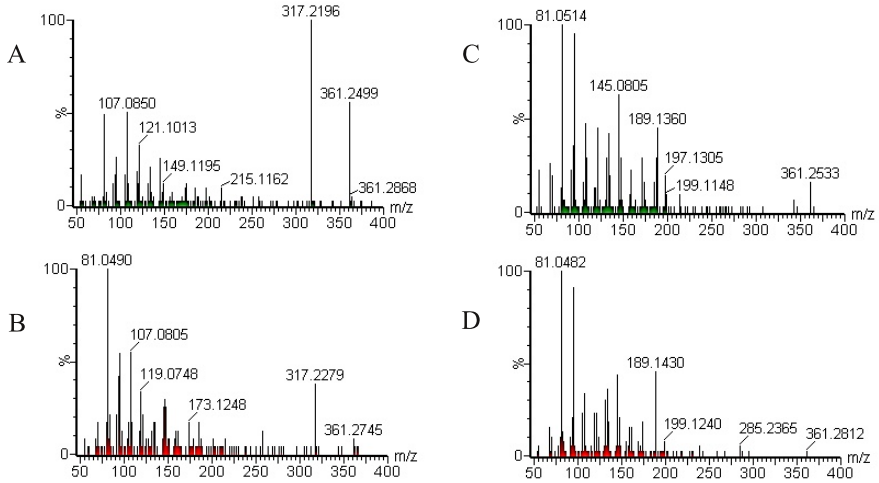
Vasemmalla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 6,33 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 6,18 min) C: CE 42 D: CE 47



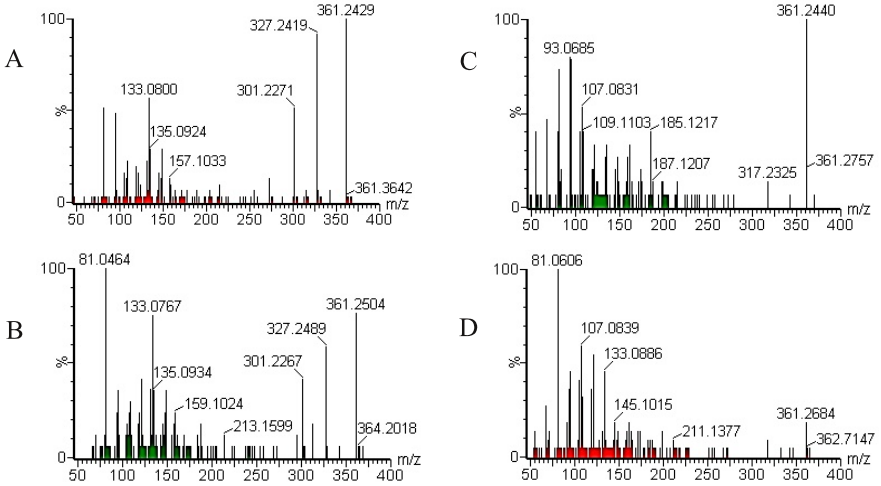
Vasemmalla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 4,65 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+2O *m/z* 361,25 (t_R 3,40 min) C: CE 42 D: CE 47



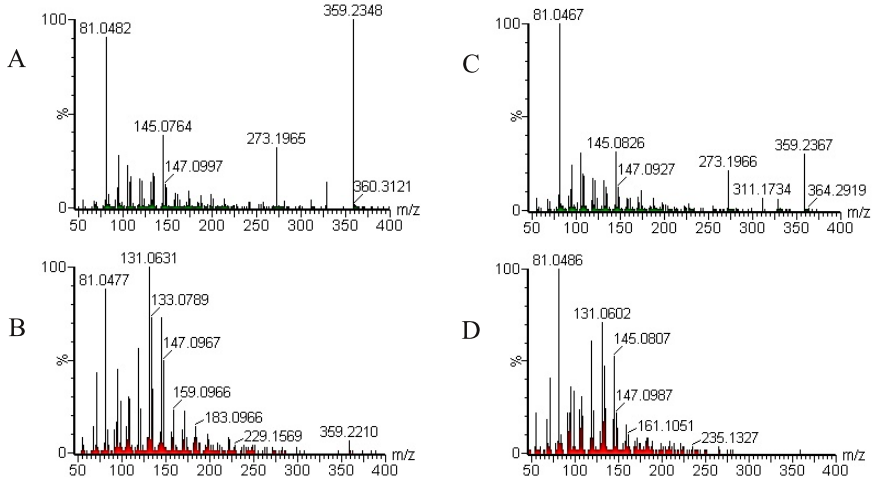
STZ: XIC TiO_2 M+2O *m/z* 361,25



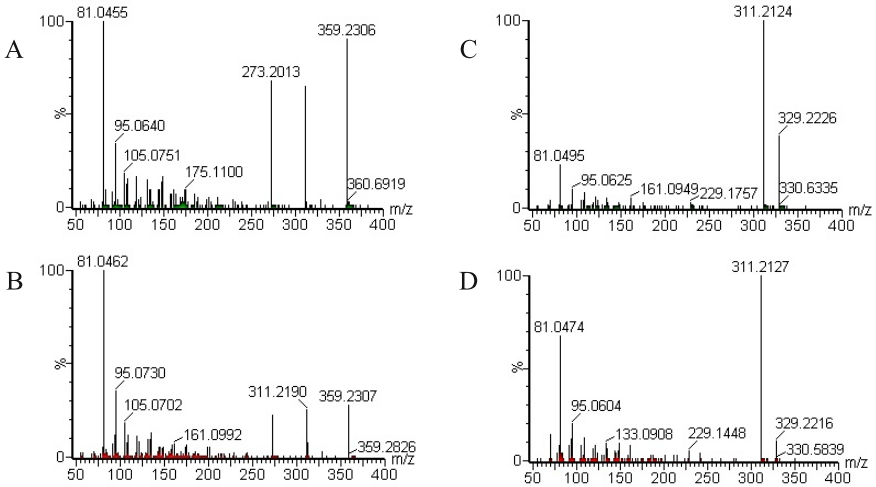
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+2O *m/z* 361,25 (t_R 5,36 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+2O *m/z* 361,25 (t_R 4,04 min) C: CE 42 D: CE 47



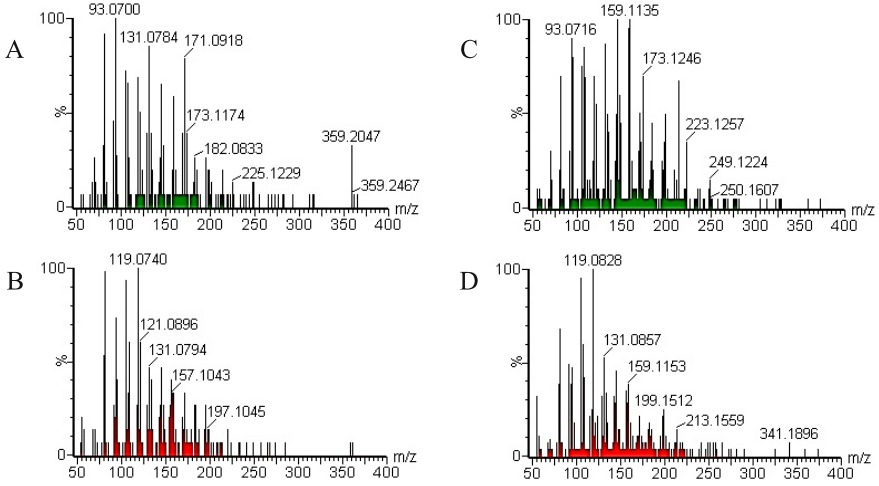
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+2O *m/z* 361,25 (t_R 6,12 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+2O *m/z* 361,25 (t_R 5,59 min) C: CE 42 D: CE 47



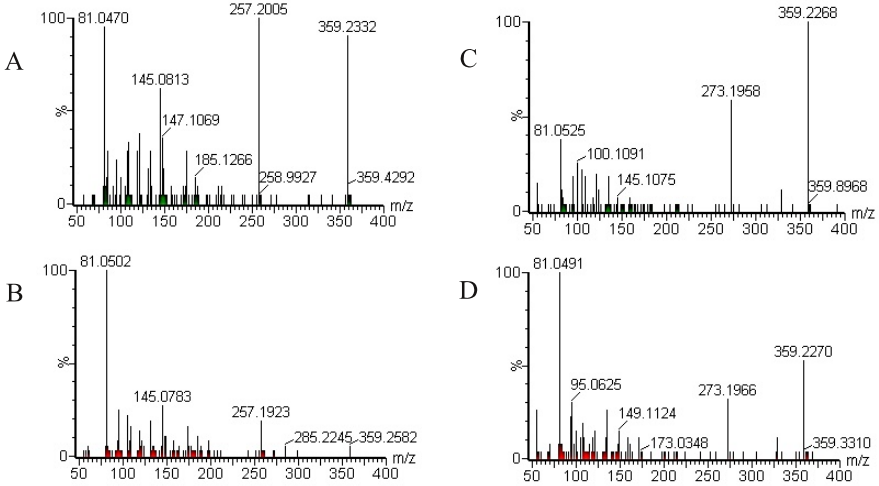
* STZ: M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 4,69 min)
A: HLM CE 42 B: TiO_2 CE 42 C: HLM CE 47 D: TiO_2 CE 47



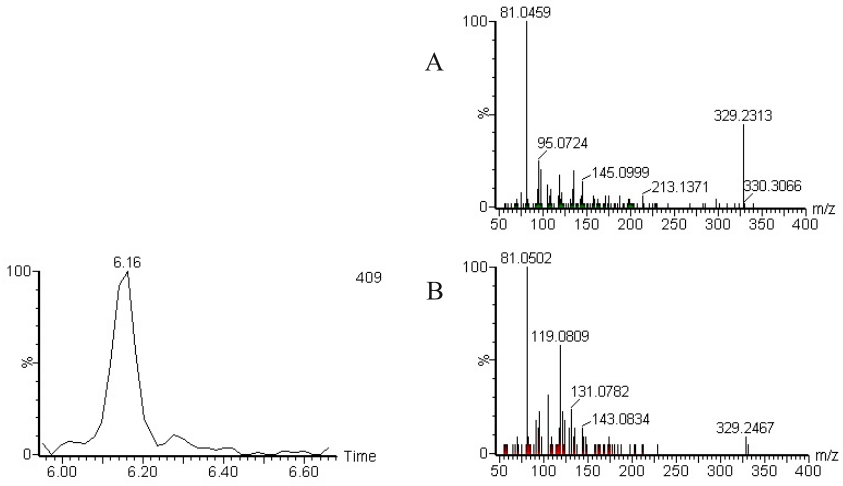
Vasemmalla: STZ: HLM M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 5,79 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 5,57 min) C: CE 42 D: CE 47



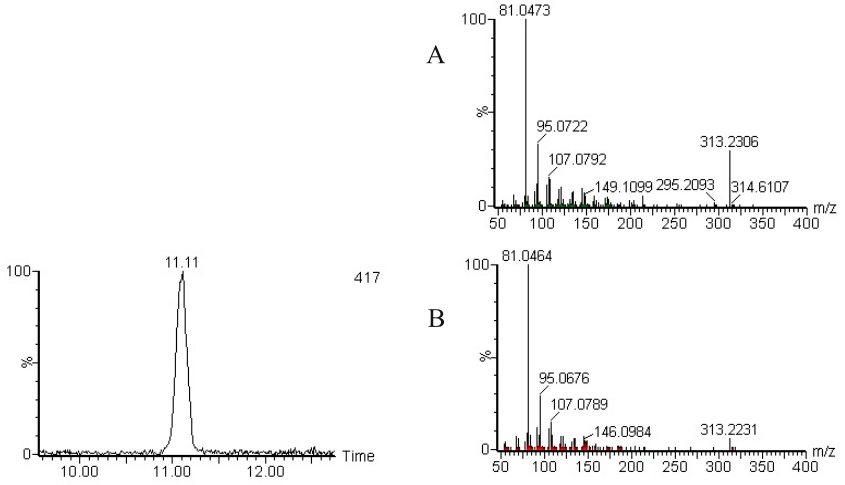
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 5,39 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 5,10 min) C: CE 42 D: CE 47



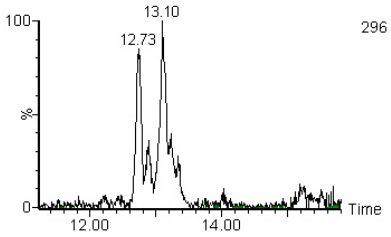
Vasemmalla: STZ: HLM M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 5,15 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: HLM M+2O-2H *m/z* 359,23 (t_R 4,17 min) C: CE 42 D: CE 47



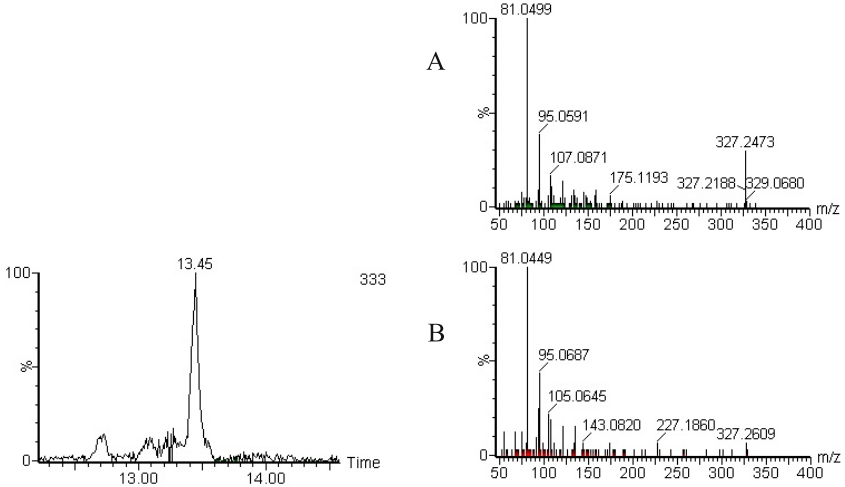
Vasemmalla: STZ: XIC TiO_2 M+O-2H-CH_2 *m/z* 329,22
Oikealla: STZ: TiO_2 M+O-2H-CH_2 *m/z* 329,22 (t_R 6,16 min) A: CE 42 B: CE 47



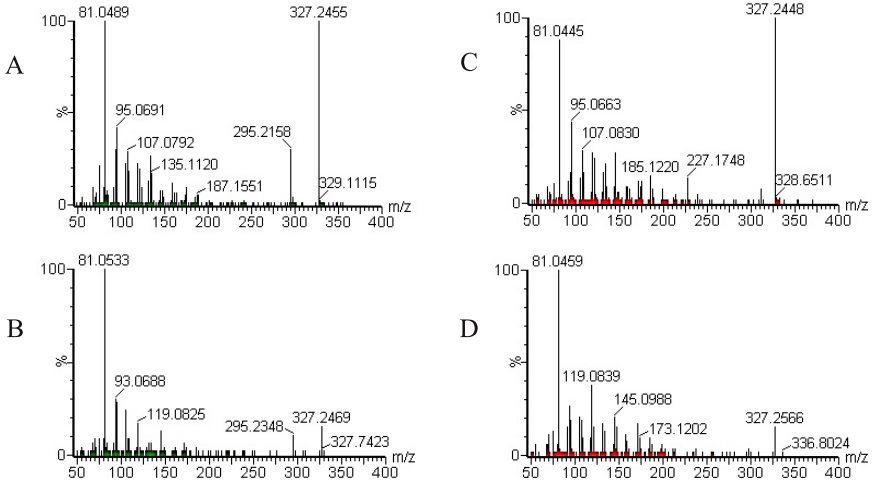
Vasemmalla: STZ: XIC TiO_2 M-2H-CH2 *m/z* 313,23
Oikealla: STZ: TiO_2 M-2H-CH2 *m/z* 313,23 (t_R 11,11 min) A: CE 42 B: CE 47



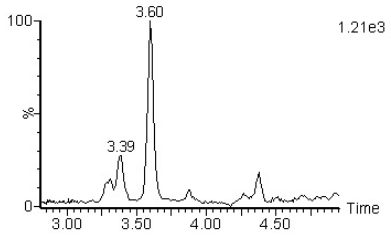
STZ: XIC TiO_2 M-2H *m/z* 327,24



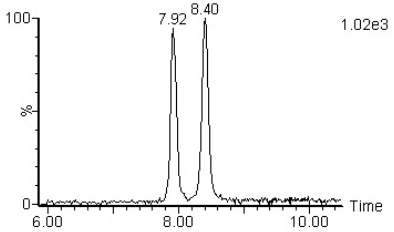
Vasemmalla: STZ: XIC HLM M-2H *m/z* 327,24
Oikealla: STZ: HLM M-2H *m/z* 327,24 (t_R 13,45 min) A: CE 42 B: CE 47



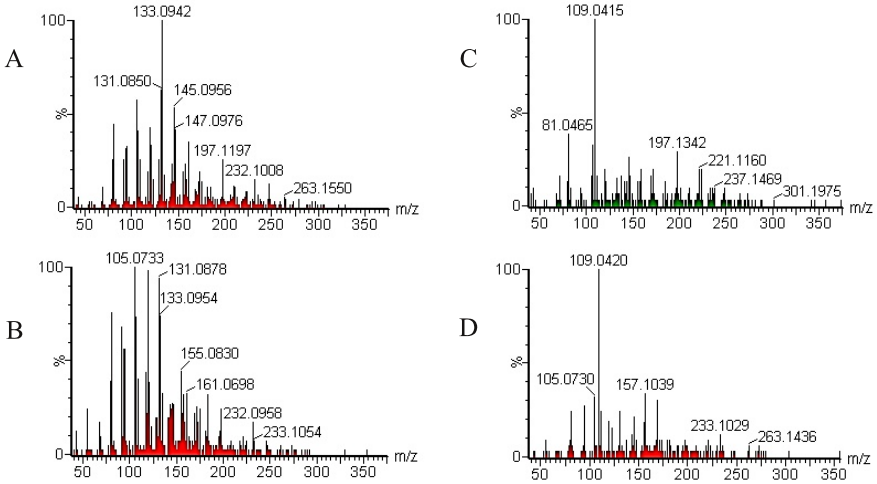
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M-2H *m/z* 327,24 (t_R 13,10 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M-2H *m/z* 327,24 (t_R 12,73 min) C: CE 42 D: CE 47



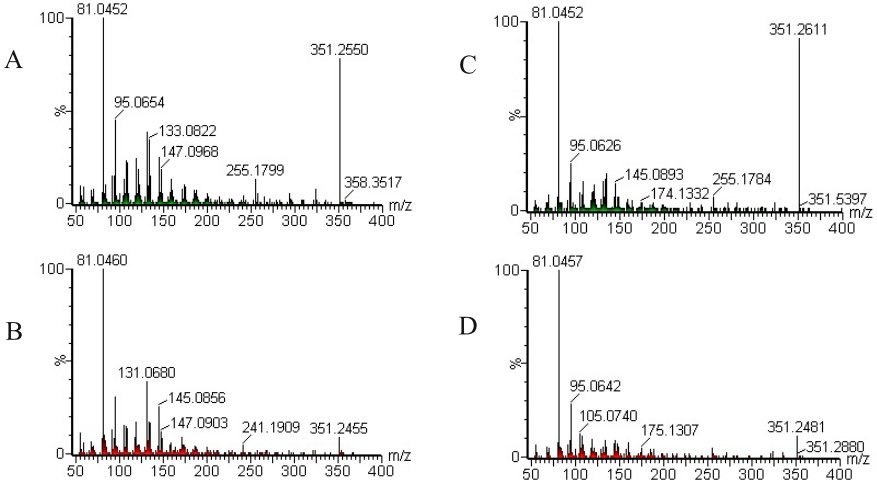
STZ: XIC TiO_2 M+3O-2H *m/z* 375,23



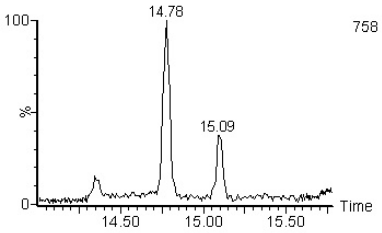
STZ: XIC TiO_2 M+22 m/z 351,26



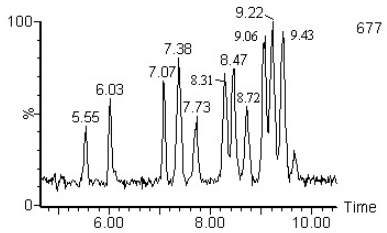
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+3O-2H *m/z* 375,23 (t_R 3,60 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+3O-2H *m/z* 375,23 (t_R 3,39 min) C: CE 42 D: CE 47



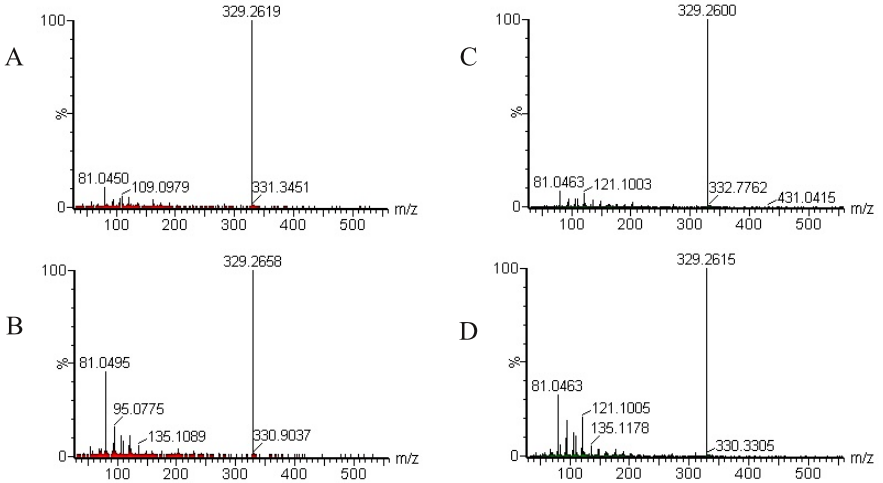
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+22 *m/z* 351,26 (t_R 8,40 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+22 *m/z* 351,26 (t_R 7,92 min) C: CE 42 D: CE 47



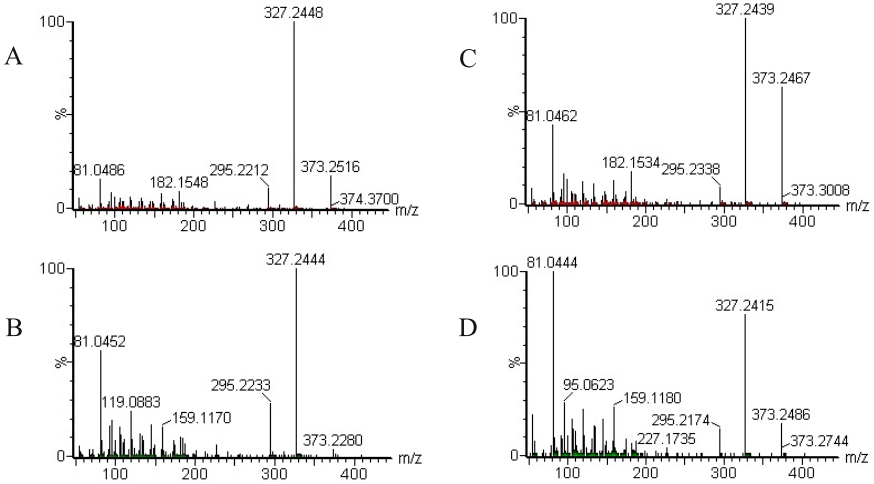
STZ: XIC TiO_2 M+42 *m/z* 371,27



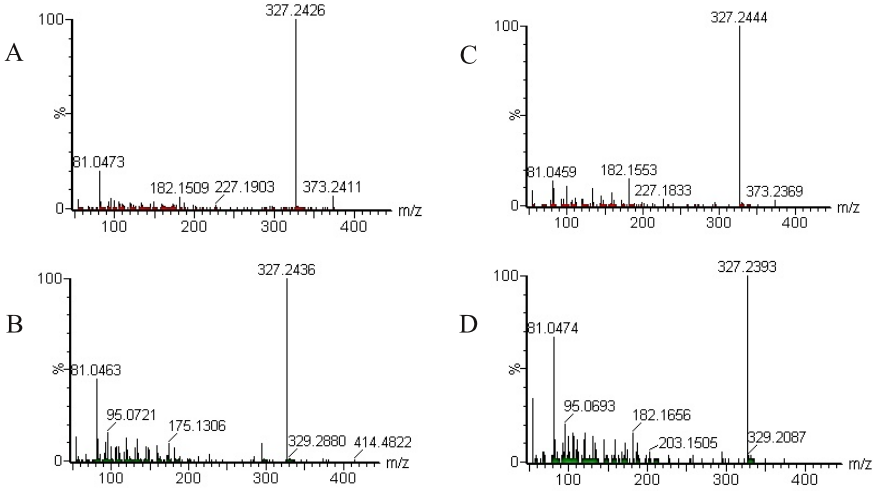
STZ: XIC TiO_2 M+44 *m/z* 373,23



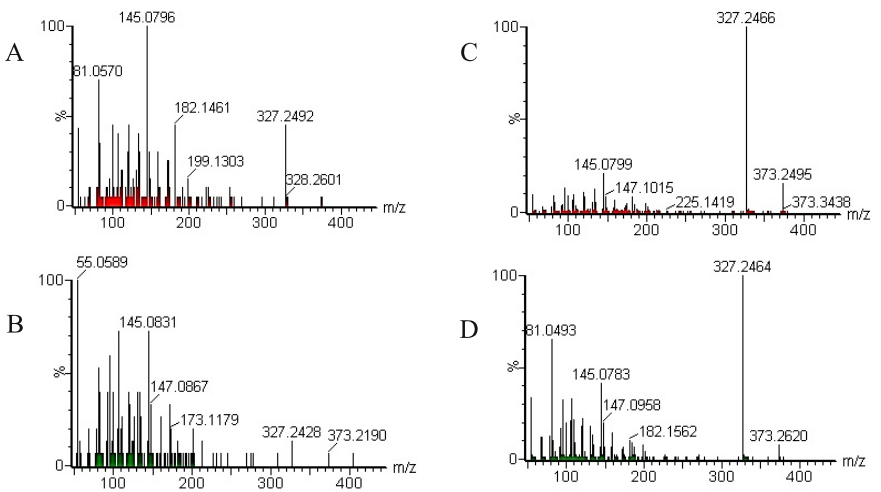
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+42 *m/z* 371,27 (t_R 15,09 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+42 *m/z* 371,27 (t_R 14,78 min) C: CE 42 D: CE 47



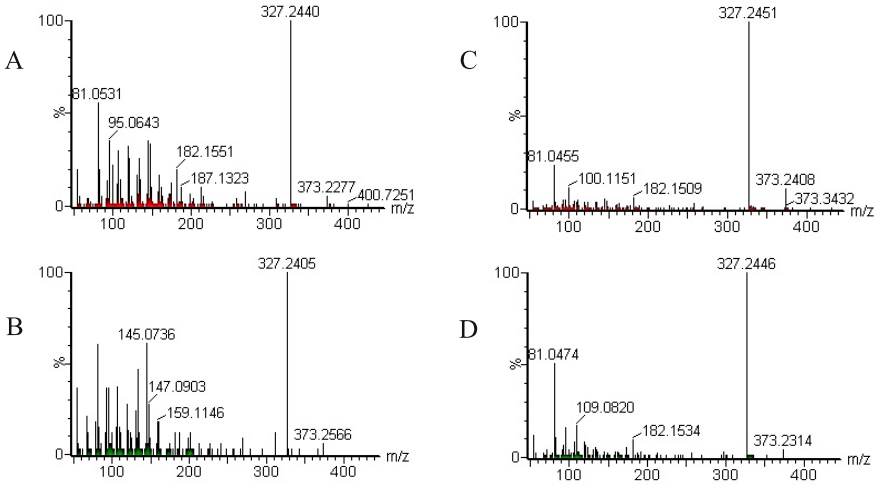
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 9,43 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 9,22 min) C: CE 42 D: CE 47



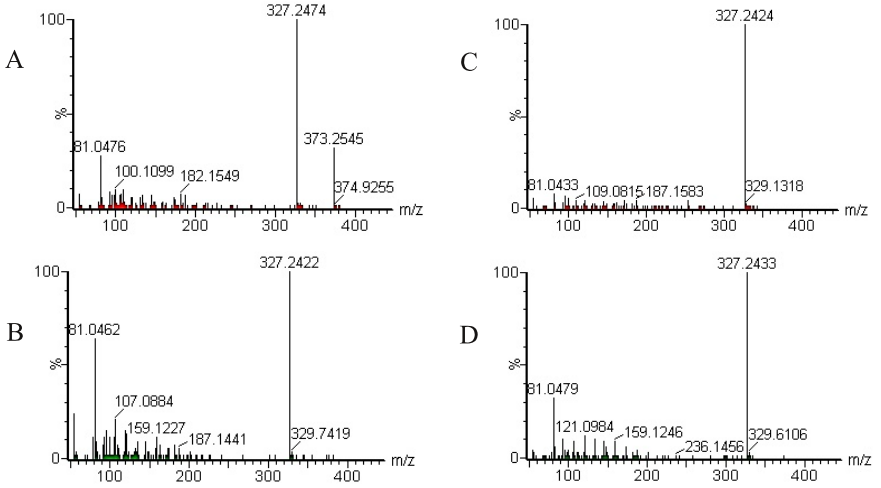
Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 9,06 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 8,72 min) C: CE 42 D: CE 47



Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 7,73 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 7,38 min) C: CE 42 D: CE 47



Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 8,47 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 8,31 min) C: CE 42 D: CE 47



Vasemmalla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 7,07 min) A: CE 42 B: CE 47
Oikealla: STZ: TiO_2 M+44 *m/z* 373,23 (t_R 6,03 min) C: CE 42 D: CE 47