

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Využití extrakčních a chromatografických technik v dopingové kontrole

Bakalářská práce

2021

Nikola Kratochvílová

---

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Kratochvílová**  
Osobní číslo: **C18175**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Využití extrakčních a chromatografických technik v dopingové kontrole**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Provedte literární rešerši zabývající se dopingem. Zaměřte se zejména na současné trendy používaných extrakčních technik ve spojení s technikami chromatografickými při stanovení, popřípadě důkazu zakázaných látek ze vzorků moči a proveďte tabelární formou jejich srovnání.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.  
Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: 18. prosince 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 2. července 2021

LS.

---

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

---

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití extrakčních a chromatografických technik v dopingové kontrole jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2021

Nikola Kratochvílová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za ochotu a cenné rady, které mi poskytovala při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za podporu v průběhu mého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je rešeršní a zabývá se využitím extrakčních a chromatografických technik při dopingové kontrole. Úvodní část práce je zaměřena na zakázané látky ve sportu a jejich zneužití, další kapitoly pojednávají o procesu odběru vzorku, laboratořích, extrakci a následné analýze. Část práce je věnována i chromatografickým technikám, které jsou při detekci zakázaných látek využívány. V závěru práce je vše shrnuto v přehledné tabulce.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Doping, dopingová kontrola, zakázané látky, sport, extrakce, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **TITLE**

Use of extraction and chromatographic techniques in doping control

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the use of extraction and chromatographic techniques in doping control. The introductory part of the thesis is focused on the prohibited substances in sport and its abuse, the next chapters deal with the process of sample consumption, laboratories, extraction process and following analysis. Part of the work is devoted even to chromatographic techniques that are used for the detection of banned substances. At the end of the work is given clear comparison to the table.

## **KEYWORDS**

Doping, doping control, prohibited substances, sport, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry

# OBSAH

Seznam zkratk a značek .....	9
Seznam tabulek .....	11
0 Úvod.....	12
1 Co je to doping.....	13
1.1 Původ slova doping.....	14
1.2 Proč je doping zakázán.....	14
2 Skupiny zakázaných látek.....	15
2.1 Látky a metody zakázané celoročně .....	15
2.1.1 Neschválené látky (S0) .....	15
2.1.2 Anabolické látky (S1) .....	15
2.1.3 Peptidové hormony, růstové faktory a příbuzné látky (S2).....	15
2.1.4 Beta-2 agonisté (S3).....	16
2.1.5 Hormonové a metabolické modulátory (S4) .....	16
2.1.6 Diuretika a ostatní maskovací látky (S5) .....	16
2.1.7 Manipulace s krví a krevními komponentami (M1).....	16
2.1.8 Chemická a fyzikální manipulace (M2).....	17
2.1.9 Genový doping (M3).....	17
2.2 Látky zakázané při soutěžích .....	17
2.2.1 Stimulanty (S6) .....	17
2.2.2 Narkotika (S7).....	20
2.2.3 Kanabinoidy (S8) .....	20
2.2.4 Glukokortikosteroidy (S9) .....	20
2.3 Látky zakázané v určitých sportech .....	21
2.3.1 Beta-blokátory (P1).....	21
3 Problematika suplementů a kontaminace potravin.....	22
3.1 Doplnky stravy a risk spojený s jejich konzumací.....	22
3.2 Kontaminace potravin .....	22
4 Průběh dopingové kontroly .....	24
4.1 Odběr moči.....	24
4.2 Odběr krve.....	24
4.3 Laboratoře dopingové kontroly.....	25

4.3.1	Screening a analýza vzorku.....	26
4.3.2	Výsledky analýzy .....	26
4.4	Biologický pas sportovce .....	26
4.5	Terapeutická výjimka.....	26
5	Příprava vzorku a extrakce .....	27
5.1	Extrakce kapalina-kapalina .....	28
5.2	Extrakce nadkritickou tekutinou .....	29
5.3	Mikroextrakční techniky .....	29
5.3.1	Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina.....	29
5.3.2	Mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu .....	30
5.3.3	Mikroextrakce tuhou fází .....	30
5.4	Extrakce tuhou fází .....	31
6	Chromatografické metody .....	32
6.1	Plynová chromatografie .....	32
6.1.1	Detekce anabolických androgenních steroidů.....	33
6.1.2	Analýza kanabinoidů z moči.....	33
6.1.3	Detekce kokainu a jeho derivátů .....	34
6.1.4	Analýza THC v plazmě.....	34
6.1.5	Analýza stimulantů.....	35
6.1.6	Rozlišení původu anabolických androgenních steroidů.....	35
6.1.7	Detekce xenonu z moči .....	36
6.2	Kapalinová chromatografie .....	36
6.2.1	Analýza anabolických steroidů .....	37
6.2.2	Detekce zneužití inzulínu .....	37
6.2.3	Detekce psychoaktivních substancí.....	38
6.2.4	Detekce a rozlišení původu klenbuterolu .....	39
6.3	Chromatografie na tenké vrstvě .....	39
6.3.1	Screening hydroxyethylškrobu.....	39
7	Metoda suché kapky krve .....	41
8	Závěr .....	43
9	Použitá literatura.....	44



## Seznam zkratek a značek

<b>AAF</b>	Pozitivní dopingový nález (Adverse Analytical Finding)
<b>AAS</b>	Anabolické androgenní steroidy (Anabolic Androgenous Steroids)
<b>ABP</b>	Biologický pas sportovce (Athlete's Biological Passport)
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>BCO</b>	Kvalifikovaný komisař pro odběr krve (Blood Collection Officer)
<b>BSTFA</b>	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
<b>CNS</b>	Centrální nervový systém (Central Nervous System)
<b>DBS</b>	Suchá kapka krve (Dried Blood Spot)
<b>DI-SPME</b>	Přímá SPME (Direct Immersion SPME)
<b>DK</b>	Dopingová kontrola
<b>DPS</b>	Suchá kapka plazmy (Dried Plasma Spot)
<b>DLLME</b>	Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction)
<b>E</b>	Epitestosteron
<b>ELISA</b>	Stanovení imunisorbentu spojené s enzymem (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
<b>EPO</b>	Erythropoetin (Erythropoietin)
<b>GC-IRMS</b>	Plynová chromatografie s využitím hmotnostní spektrometrie izotopických poměrů (Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry)
<b>GC-MS</b>	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography-Mass spectrometry)
<b>HES</b>	Hydroxyethylškrob (Hydroxyethylstarch)
<b>HOAc</b>	Kyselina octová (Acetic acid)

<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<b>HS-SPME</b>	Headspace SPME
<b>ISTD</b>	Vnitřní standard (Internal Standard)
<b>IUPAC</b>	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
<b>LC-HRMS</b>	Kapalinová chromatografie s vysokým rozlišením (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry)
<b>LC-MS</b>	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
<b>LLE</b>	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
<b>MALDI</b>	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
<b>MDA</b>	3,4-Methylendioxyamfetamin
<b>MDMA</b>	3,4-Methylendioxymetamfetamin
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MEPS</b>	Mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (Microextraction by Packed Sorbent)
<b>MRPL</b>	Minimální úroveň požadovaného výkonu (Minimum Required Performance Level)
<b>MSTFA</b>	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
<b>MS/MS</b>	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
<b>SALLE</b>	Extrakce kapalina-kapalina s vysolovacím efektem (Salting-out Liquid-Liquid Extraction)
<b>SFC</b>	Chromatografie v nadkritické tekutině (Supercritical Fluid Chromatography)
<b>SFE</b>	Extrakce nadkritickou tekutinou (Supercritical Fluid Extraction)
<b>SPE</b>	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
<b>SPME</b>	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction)

<b>T</b>	Testosteron
<b>TBME</b>	<i>Terc</i> -Butyl Methylether
<b>THC</b>	Tetrahydrokanabinol
<b>TLC</b>	Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
<b>TMCS</b>	Trimethylchlorsilan
<b>TMS</b>	Trimethylsilyl
<b>TV</b>	Terapeutická výjimka
<b>UHLPC</b>	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
<b>WADA</b>	Světová antidopingová organizace (World Antidoping Agency)
<b>WADC</b>	Světový antidopingový kodex (World Antidoping Code)

## **Seznam tabulek**

Tabulka 1 - Porovnání analýz látek s dopingovým účinkem.....	42
--	----

## 0 Úvod

Doping má ve společnosti již dlouhodobou historii. Při dopingu jde o používání látek pro zlepšení tělesné či psychické kondice. Výraz doping je spojován nejčastěji s růstem svalů a síly, ale výčet prostředků, kterými lze nedovoleně zvyšovat výkon, je velmi rozsáhlý. Poté, co se sportovní soutěžení s touhou zvítězit stalo symbolem prestiže, se o mnoho zvýšil i tlak na samotné sportovce, aby překonávali své osobní rekordy. Tento problém se však netýká pouze vrcholových sportovců na mezinárodních soutěžích, ale i dospívajících, kteří se snaží vyniknout. Používání dopingu je zakázáno hlavně z důvodu negativních účinků na zdraví, ale jedná se i o etický problém.

S rozmachem farmaceutického průmyslu se začaly uměle syntetizovat různorodé látky slibující zvýšení sportovního výkonu. Začaly se užívat nižší koncentrace látek a používat propracovanější metody a postupy, které činí detekci náročnější, až téměř nemožnou. Proto je kladen stále vyšší důraz na neustálé zlepšování analytických metod, které by byly schopny detekovat i nepatrná množství zakázaných substancí.

Předložená práce pojednává jak o samotném výčtu skupin látek, které jsou ve sportu zakázané, tak i o extrakčních a chromatografických metodách, jaké akreditované laboratoře využívají.

# 1 Co je to doping

Doping je způsob, jakým si sportovci nedovoleně zvyšují svoji výkonnost. Užívání dopingu může pomoci k nárůstu svalové hmoty, lepší regeneraci a také zmenšení pocitu bolesti. Pod vlivem tlaku, slávy, peněz, trenérů, rodičů, ale také od sebe samých, dělají sportovci špatná rozhodnutí a vystavují se tak riziku, že dříve či později budou odhaleni a potrestáni v podobě zastavení sportovní kariéry [1].

Doping je definován jako jev, při němž dochází k porušení jednoho či více antidopingových pravidel. Tato pravidla vymezuje Světový antidopingový kodex (WADC).

- Prokázání přítomnosti jakéhokoliv množství zakázané látky užitě úmyslně, neúmyslně či z nedbalosti, nebo jejích metabolitů či markerů v těle sportovce.
- Prokázání použití nebo pokus o použití zakázané látky nebo metody, kdy úspěšnost není rozhodující.
- Vyhýbání se dopingové kontrole nebo její odmítnutí, nedostavení se k odběru po výzvě bez náležitého důvodu.
- Neinformování o místě pobytu. Sportovci v registru pro testování i mimo soutěž jsou povinni informovat o svém aktuálním místě pobytu tak, aby je bylo možné zastihnout i bez předchozího oznámení.
- Podvádění nebo pokus o podvádění v průběhu dopingové kontroly. Podvádění zahrnuje také pokus o ovlivňování komisaře nebo zastrašování svědka.
- Držení zakázané látky nebo prostředku pro zakázané metody. Jedná se o držení látky zakázané celoročně, držení látek zakázaných při soutěži je postihováno jen v období soutěže.
- Nelegální obchodování, výroba, dovážení, vyvážení a manipulace se zakázanými látkami bez povolení.
- Podání nebo pokus o podání zakázané látky sportovci.
- Podílení se na asistování, napomáhání nebo navádění k porušení antidopingových pravidel.
- Vyhledání nebo kontaktování osoby na černé listině Světové antidopingové agentury (WADA). Osoby na této listině byly v minulosti potrestány za porušení antidopingových pravidel zákazem činnosti [2; 3].

## 1.1 Původ slova doping

Původ slova doping není jednoznačně znám. Jedna teorie uvádí, že etymologie slova pochází ze 17. století z Nového Amsterdamu, kdy kolonisté pili lektvar nazývaný ‚doop‘, obsahující směsi bylin a kořínků, na povzbuzení [4].

Další teorie uvádí, že tento pojem byl převzat od bílých přistěhovalců do Jižní Afriky, tzv. Búrů, kdy kořeny slova doping zasahují do jihovýchodní části Afriky. Obyvatelé při náboženských obřadech nebo kultovních slavnostech pravděpodobně konzumovali silnou pálenku nazývanou ‚dop‘. Pojem byl poté převzat Angličany a v roce 1889 se slovo doping objevilo v britském slovníku [3].

Dopingu se dříve široce využívalo při koňských závodech, kdy se pro zlepšení výkonu koní podávala směs opia a narkotik [4]. V současné době je na jedné straně sportovní doping, ale v některých sportovních disciplínách se testují také právě zvířata, a to například již zmínění koně v jezdectví, ve kterém je důležité doping kontrolovat, protože podávané látky mohou na jednu stranu zvyšovat výkon zvířete, ale na druhou stranu zhoršovat jeho zdravotní stav. Proto dopingová kontrola zvířat nemá na cílové sloučeniny žádná omezení a seznam zakázaných látek v jezdectví v porovnání se seznamem vydávaným WADA je mnohem delší [5].

## 1.2 Proč je doping zakázán

Hlavním důvodem, proč je doping zakázán, je, že sportovci poskytuje výhody před soupeřem, a to je v rozporu se závoděním v duchu ‚fair play‘. Dalším důvodem je jeho škodlivost, kdy většina dopingových prostředků patří mezi medikamenty a jejich zneužití ve vyšších dávkách může trvale poškodit organismus a následně vést až ke smrti [6; 3].

## 2 Skupiny zakázaných látek

Označení skupin vychází z anglických názvů, pro S jako „*substances*“ neboli látky, pro M jako „*methods*“ neboli metody, a označení P pro zakázané látky v určitých sportech vychází z výrazu „*in particular sports*“ [7].

Tento seznam je každoročně vydáván a aktualizován společností WADA a tvoří základní kámen Světového antidopingového kodexu. Seznam zakázaných látek pro daný kalendářní rok je vždy platný od 1. ledna do 31. prosince [8].

### 2.1 Látky a metody zakázané celoročně

Jsou děleny do následujících skupin:

#### 2.1.1 Neschválené látky (S0)

Neschválená látka je jakákoli farmakologická látka, která není zahrnuta v Seznamu zakázaných látek, ale v současné době není schválena žádným zdravotním úřadem pro humánní terapeutické použití. Jedná se o léky v preklinickém stádiu vývoje, uměle vyráběné drogy a látky schválené pouze pro veterinární léčbu. Tyto látky mohou být potenciálně využity k dopingům [9].

#### 2.1.2 Anabolické látky (S1)

Anabolické androgenní steroidy (AAS) jsou syntetické látky testosteronu, které jsou upraveny tak, aby zajistily maximální anabolický účinek. Tyto deriváty mají několik obecných účinků. Mezi ně lze zařadit zvýšení koncentrace dusíku ve svazech, který podporuje růst svalové hmoty a nabírání na tělesné váze. Nárůst svalové hmoty se zvyšuje prostřednictvím svalové hypertrofie a zvýšením počtu svalových vláken. Dále inhibují vazbu katabolických glukokortikoidů na sval, což znemožní rozpad svalové hmoty, a v neposlední řadě mají AAS vliv na agresivitu sportovce, čímž je zvýšena intenzita tréninku. V silovém tréninku AAS zvyšují nárůst svalové hmoty a celkovou sílu, zatímco v aerobním sportu nebylo prokázáno významné zlepšení [10]. Jsou zneužívány zejména v kulturistice [11].

#### 2.1.3 Peptidové hormony, růstové faktory a příbuzné látky (S2)

Z této skupiny je nejčastěji pro dopingové účely zneužíván erythropoetin (EPO), hormon, který se v těle produkuje přirozeně a ovlivňuje množství červených krvinek. Jejich zvýšený počet má vliv na rychlejší regeneraci, vyšší vytrvalost a oddálení únavy. Dále sem patří růstový hormon (GH), který patří mezi peptidové hormony a je také v těle produkován

přirozeně. Byl sem zařazen i vzácný plyn xenon, jehož používání může mít podobné účinky jako EPO [12; 13].

#### 2.1.4 Beta-2 agonisté (S3)

Beta-2 agonisté neboli  $\beta$ -adrenomimetika jsou látky stimulující  $\beta$ -adrenergní receptory, mezi jejich účinky patří zvýšení a zrychlení srdečních kontrakcí, zvýšení tonu cév, rozšíření průdušek a zvýšení svalové kontrakce. V medicíně se používají k léčbě astmatu, ve sportu díky jejich účinkům mohou být zneužity pro krátkodobé zvýšení sportovní výdrže a jsou zařazeny mezi zakázané látky. Jejich minimální detekovatelná hranice dle WADA ve vzorcích je 20 ng/ml [13; 5].

#### 2.1.5 Hormonové a metabolické modulátory (S4)

Do této skupiny patří například peptidový hormon inzulin, který je zneužíván sportovci především pro své anabolické účinky. V lékařství se používá při léčbě hormonálních a metabolických onemocnění. Dále sem patří inhibitory aromatázy, selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERMS) nebo myostatinové inhibitory [12; 13].

#### 2.1.6 Diuretika a ostatní maskovací látky (S5)

Diuretika jsou látky, které zvyšují tvorbu moči a stimulují její vyšší vylučování ven z těla. Zároveň zvyšují vylučování sodíku, a proto jsou zneužívány k rychlému úbytku hmotnosti anebo k naředění moči, a tím zamaskování jiných látek, jako jsou stimulanty nebo anabolické steroidy [14]. V klinické praxi se používají na léčbu různých nemocí a syndromů, jako je hypertenze, srdeční a ledvinové selhání, jaterní cirhóza, nebo ke snížení účinků zadržování vody nebo soli v těle [15]. Protože zabraňují detekci dalších dopingových látek, byly dle WADA zařazeny na Seznam zakázaných látek jak v soutěži, tak mimo soutěž, i přesto, že jejich role v navýšení výkonu je minimální [14].

#### 2.1.7 Manipulace s krví a krevními komponentami (M1)

Krevní doping je využíván zejména u vytrvalostních sportovců, kteří se tímto způsobem snaží zvýšit kapacitu kyslíku v krvi. Toho lze dosáhnout různými způsoby, buď cestou endogenní nebo exogenní. Exogenní zdroje zahrnují použití krevních náhražek, jako jsou polymerované sloučeniny hemoglobinu nebo emulze perfluorovaných uhlovodíků či lék efaproxiral. Mezi endogenní cesty patří krevní transfuze jak homologní (od jiné osoby), tak autologní (vlastní krev). Do této skupiny je zařazeno i používání erytropoetinu a sloučenin stimulujících jeho produkci. Samotný EPO podněcuje produkci červených krvinek a dle WADA jsou zakázané všechny formy zvýšeného přenosu kyslíku, tzn. že detekce těchto látek



je považována za doping. Dnes díky biologickému pasu sportovce (ABP) lze spolehlivě dokázat i sofistikovanější metody jako jsou mikrodávky vlastní krve (např. 50 ml denně). Znamená to, že dojde k odebrání krve, její uschování po dobu dvou až tří měsíců a následné vrácení zpět, jakmile tělo kompenzuje její ztrátu, čímž je zvýšen celkový objem krve [16; 17].

Zatímco u homologní krevní transfuze lze detekovat fenotypizaci erytrocytů pomocí průtokové cytometrie, pro stanovení autologní transfuze krve není žádná přímá metoda, a proto je stále nejlepším řešením ABP. Jedná se o nepřímou metodu dlouhodobě dokumentující data jedince, která může potenciálně pomoci detekovat prováděné změny v těle [18].

### 2.1.8 Chemická a fyzikální manipulace (M2)

Chemická a fyzikální manipulace zahrnuje podvádění nebo pokus o podvod za účelem porušit platnost a integritu odebraného vzorku při dopingové kontrole, například záměnou nebo úpravou vzorku. Zakázána je také nitrožilní infuze nebo injekce více než 100 ml za 12 hodin. Chirurgické, nemocniční zákroky, nebo legitimní diagnostické vyšetření jsou povoleny [19].

### 2.1.9 Genový doping (M3)

V posledních letech bylo dosaženo velkého pokroku ve znalosti lidského genomu. V medicíně se začíná provádět genová terapie při léčbě pacientů. Cílem této terapie je podpora endogenní syntézy chybějícího proteinu. Genový neboli genetický doping je spojen se zavedením transgenů nebo rekombinantního proteinu do těla za účelem exprese nebo její modulace stávajícího genu za účelem zvýšení fyzické aktivity jedince. Genetický materiál může být do buňky zaveden jak *in vivo*, tak *ex vivo*. *In vivo* metoda znamená přímé zavedení genu do lidského těla (cílové tkáně nebo orgánu), kdežto při nepřímé metodě *ex vivo*, jsou geny z těla jedince odebrány, náležitě upraveny, vyšlechtěny a po selekci následně vráceny zpět do těla [20].

## 2.2 Látky zakázané při soutěžích

### 2.2.1 Stimulanty (S6)

Stimulanty centrálního nervového systému (CNS) jsou látky, které zvyšují hladinu neuromediátorů noradrenalinu a dopaminu v mozku. Tímto účinkem se zvyšuje psychologický efekt bdělosti, koncentrace, vyššího sebevědomí i agresivity. Je mnohem pravděpodobnější, že budou zneužity při soutěži, ale mohou být použity i při tréninku ke zvýšení jeho intenzity. Při samotném tréninku mimo sportovní soutěž jejich používání zakázáno není. Do této skupiny patří například amfetamin, efedrin nebo kokain [13].

Tyto látky jsou zařazeny na Seznamu zakázaných látek už od 70. let. Při jejich detekci je bráno v úvahu, že jsou v lidském těle minimálně metabolizovány a vylučují se močí v nezměněné formě. Stimulanty ve své molekule obsahují atom dusíku a jsou snadno ionizovatelné za podmínek použití elektrosprejové ionizace. Tyto sloučeniny se kvantifikují nejčastěji metodou „dilute and shoot“, kdy je vzorek naředěn, a takto bez další úpravy je vstříkovan do chromatografu. Tato technika je důležitá pro primární screening, avšak složky matrice moči chromatografický systém kontaminují a může být potřeba častější výměna jednotlivých částí chromatografického systému jako například kolona nebo častější čištění iontového zdroje [5].

**Amfetaminy** jsou látky regulované protidrogovou legislativou [21] a bylo již syntetizováno mnoho jejich derivátů, např. methamfetamin, methyldioxyamfetamin (MDA), methyldioxymethamfetamin (MDMA, „extáze“). Vstřebávání amfetaminu probíhá v tenkém střevě a jeho plazmatická koncentrace dosahuje maxima po jedné až dvou hodinách po požití. Absorpce je úplná za čtyři hodiny a lze urychlit požitím potravy. Hlavními metabolity amfetaminu jsou *p*-hydroxy efedrin a *p*-hydroxy amfetamin. Amfetamin je poté z těla vylučován renální filtrací, kdy vylučování amfetaminu je rychlejší v kyselé moči. Pro jeho detekci je moč analyzována na přítomnost mateřské sloučeniny – amfetaminu. Po jedné dávce ho lze v moči detekovat po dobu 48 hodin, maximální koncentrace je dosaženo v rozmezí 3 až 12 hodin po požití v závislosti na jedinci [22].

**Efedrin** je alkaloid získaný z keře druhu *Ephedra sinica*, v přírodě se přirozeně vyskytuje v léčivých bylinách, například v rostlině *Ephedra sinica*, a je populární složkou mnoha doplňků stravy stimulačních CNS. Jedná se o smíšené sympatomimetikum, působící jako stimulant CNS zvýšením uvolňování noradrenalinu ze sympatických neuronů a stimulací  $\alpha$  a  $\beta$  receptorů. Tím zvyšuje srdeční frekvenci a způsobuje zvýšení krevního tlaku. Užití efedrinu společně s vitamíny, minerály či kofeinem podporuje jeho ergogenní účinky. Zvyšuje se síla, prodlužuje se doba do vyčerpání, termogenní vlastnosti zrychlují metabolismus a tím spalování tuků a nabírání svalové hmoty. Použitím efedrinu samostatně nebylo zlepšení fyzického výkonu prokázáno [22; 23].

Efedrin lze také vyrábět chemickou syntézou, jeho struktura je podobná syntetickému amfetaminu. Jeho působení na CNS je mnohem slabší, ale dlouhotrvající. Vylučuje se močí téměř beze změny, jeho obvyklý poločas eliminace je tři až šest hodin v závislosti na pH moči.

Zvýšením pH se doba vylučování prodlužuje [22]. Efedrin je Světovou antidopingovou organizací zakázán, pokud je jeho koncentrace v moči vyšší než 10 µg/ml [24].

**Kokain** je ve své čisté formě bílý krystalický prášek získávaný z jihoamerické rostliny, která se nazývá *Erythroxylum coca* neboli česky Kokainovník pravý [25]. Kokain je nejsilnějším stimulantem přírodního původu na rozdíl od amfetaminů, které jsou čistě syntetického původu. Kokain se jako stimulant užívá už po tisíce let, kdy Inkové odcházející do boje žvýkali Koku, aby zamezili únavě. Kokain byl v historii použit ve velkém množství léků, a dokonce přidáván i do nealkoholických nápojů, například až do roku 1903 byl obsažen v Coca-Cole [22; 26].

Jeho vysoce návykový účinek je způsoben uvolňováním dopaminu, jeho fyzické projevy jsou zúžené krevní cévy, rozšířené zorničky, zvýšená srdeční teplota a tepová frekvence, zvýšený krevní tlak. Zvyšuje také motorickou aktivitu a je silným induktorem euforie. Trvání těchto euforických účinků jako hyperstimulace, snížená únava a duševní jasnost závisí na způsobu podání, kdy, čím je rychlejší absorpce, tím intenzivnější jsou účinky, ale zato kratší doba trvání. Po vyprchání účinků se mohou dostavit až depresivní nálady, kdy závislý potřebuje užívat větší dávky proto, aby se alespoň cítil normálně, a závislost roste. Vyšší dávky kokainu mohou vést k podrážděnosti, neklidu, úzkosti až paranoie. Další komplikace zahrnují poruchy srdečního rytmu, záchvaty, bolesti hlavy, břicha a nevolnost. Užívání kokainu spolu s alkoholem nebo anabolickými steroidy je extrémně kardiotoxické a tyto praktiky zvyšují pravděpodobnost náhlé zástavy srdce nebo záchvatu následovaného zástavou dýchání vedoucí ke smrti [22; 26].

Navzdory škodlivým vedlejším účinkům je kokain i nadále ve sportu zneužíván, neboť při nízkých dávkách díky jeho stimulačnímu účinku na CNS umožňuje vysoký energetický výdej ve velké intenzitě při krátkodobé aktivitě. Nicméně při dlouhodobém užívání může vést k časové dezorientaci, nesprávnému úsudku i ke ztrátě energie, což ve finále sportovní výkon snižuje [22].

Kokain lze kouřit, šňupat, nebo podávat injekčně. Pokud se kokainový prášek vdechuje nosem, je absorbován do krevního řečiště skrz nosní tkáň. K injekčnímu podání se použije jehla a droga se uvolní přímo do krevního řečiště, kouřením se vdechuje kokainový kouř do plic a jeho uvolnění do krevního řečiště je stejně rychlé jako při injekčním podání [22].

Malé množství kokainu se vylučuje v nezměněné podobě močí (cca 9,5–20 %). Takto nezměněný kokain může být detekován po dobu od 24 až do 36 hodin v moči. Dále se mění

na dva hlavní metabolity, a to ekgonin methylester a benzoylekgonin. Tyto dva metabolity tvoří cca 80–90 % vylučovaného kokainu. Přibližně 1–3 % tvoří ekgonin, norbenzoylekgonin, norekgonin [26].

### 2.2.2 Narkotika (S7)

Narkotika jsou užívána hlavně v bojových sportech, protože pomáhají zmírňovat bolest spojenou se zraněními. V dopingových testech lze jejich přítomnost odhalit ze vzorku moči [14]. Mezi narkotické látky řadíme morfin, heroin, metadon, oxykodon a další [13].

### 2.2.3 Kanabinoidy (S8)

Do této skupiny patří tetrahydrokanabinol (THC), aktivní látka získaná z marihuany. Ve sportu se zneužívá především pro své uklidňující účinky, čímž snižuje předzávodní nervozitu. Její nebezpečí tkví v tom, že může vést k užívání i silnějších drog. V těle se THC metabolizuje a jeho derivát karboxy-THC se vylučuje močí i po několik měsíců od užití marihuany. Ovšem příbuzná látka obsažená v konopí, kanabidiol, je povolena [12; 13].

### 2.2.4 Glukokortikosteroidy (S9)

Glukokortikosteroidy neboli zkráceně glukokortikoidy jsou anabolické hormony se steranovým jádrem s boční skupinou ethyl-hydroxyketonu umístěnou na 17. uhlíku. To činí analýzu náročnější, protože se vyskytuje hodně podobných sloučenin [27].

Nejsou zakázané za všech okolností, ale pouze v soutěži [13]. Pokud převládají farmakologické účinky těchto sloučenin, kde jsou stanovené relevantní úrovně, je při nálezu látky, nebo jejího metabolitu ve vzorku pro dopingovou kontrolu, uplatněna sankce. Při testování těchto látek se ukazuje velkým příslibem a přidanou hodnotou pro dopingovou kontrolu použití alternativních matric k moči a to, suchá kapka krve (DBS), suchá kapka plazmy (DPS), sliny anebo vydechovaný dech. Protože po podání léku dosahuje koncentrace metabolitu v moči jiných hodnot než v krvi, jeví se tato cesta jako výhodná pro správnou interpretaci výsledků. Detekce zneužití kortikoidů je obtížná, vzhledem k jejich způsobu podávání. V současné době také nejsou zohledněny různé relativní účinnosti. Proto se odběr krve při metodě DBS zároveň s odběrem moči jeví jako cenná volba pro analýzu a poskytnutí komplexnějších informací pro následné řízení [28].

## **2.3 Látky zakázané v určitých sportech**

### **2.3.1 Beta-blokátory (P1)**

Do této skupiny patří látky jako propanolol, atenolol, acetobutolol, betaxolol, pindolol, esmolol a další. Tyto látky jsou zakázány pouze v určitých sportech při soutěži, například v golfu, šipkách nebo lyžování. Ve střelbě a lukostřelbě jsou zakázány i mimo soutěž [14; 13].

Jsou to látky, které snižují srdeční frekvenci a krevní tlak. Snižují pocit nervozity, úzkosti a jsou schopné stabilizovat motorický výkon. Proto jsou zneužívané hlavně v soutěžích, kde je zapotřebí koordinace, pevné ruce, přesnost a preciznost [29].

### **3 Problematika suplementů a kontaminace potravin**

Dle WADC je doping definován jako porušení jednoho či více antidopingových pravidel, které mimo jiné zahrnují jak detekci zakázané látky, tak jejich metabolitů v krvi nebo moči sportovce [2]. Existují však i případy, kdy pozitivní dopingový nález (AAF) nemusí nutně znamenat záměrné zneužití zakázané látky. Mezi takovéto případy patří požití falšovaných doplňků stravy, zkaženého jídla nebo kontaminovaných léků. Dle politiky osobní zodpovědnosti je každý sportovec osobně zodpovědný za všechny látky, které se dostanou do jeho těla nehledě na úmyslu [30]. Možné důsledky za porušení antidopingových pravidel zahrnují nejen dočasné, ale i trvalé pozastavení činnosti, ztrátu medailí, finanční sankce, ztrátu sportovcovy reputace a zrušení sponzorství [1].

#### **3.1 Doplněk stravy a risk spojený s jejich konzumací**

Doplněk stravy je definován jako potravina, složka potraviny, živina, nebo nepotravinářská sloučenina, která je přijímána společně s konzumovanou stravou za účelem zvýšení zdraví a výkonu sportovce. Doplněk stravy jsou v dnešní době velmi oblíbené zejména proto, že jsou dostupné bez lékařského předpisu. Jejich užívání může být pochopitelné pro sportovce s nutričním omezením (např. vegani) nebo za lékařských okolností (diagnostika nedostatku živin). U mnoha z nich však účinky na zdraví a výkon nejsou prokázány [31]. Proto by se měly užívat pouze po konzultaci s lékařem nebo odborníkem na výživu [32].

Sportovci, kteří užívají doplňky stravy jsou více náchylní k neúmyslnému doping. Zatímco bezpečnost, čistota a účinnost léků je důkladně kontrolována, pro doplňky stravy žádné předpisy a kontroly kvality neexistují. Hlavním problémem je zde nepřesné označení složek, které se v tobolce, prášku, nebo pilulce vyskytují [33]. Některé produkty obsahují pouze malé množství aktivní složky nebo v horším případě jsou obohaceny o látky, které nejsou uvedeny na etiketě a zvyšující výkon (může se jednat o anabolické steroidy nebo stimulanty) [34]. Může se vyskytnout i křížová kontaminace, jež je výsledkem nevhodně vyčištěných nádob používaných k přepravě či skladování surovin, zvláště v případě, probíhá-li ve stejné továrně výroba i jiných přípravků jako jsou například prohormony [34; 35]. I když jsou poté výsledné koncentrace zakázané látky tak nízké, aby měly potřebný fyziologický efekt, mohou způsobit AAF [32].

#### **3.2 Kontaminace potravin**

Kromě doplňků stravy je i jídlo potenciálním zdrojem neúmyslného doping. V zemích jako je Čína a Mexiko byl nelegálně používán clenbuterol jako stimulant růstu v živočišné

výrobě [36]. Ve výsledku bylo maso pozoruhodně libové, ale bylo kontaminováno zbytky klenbuterolu, který může představovat zdravotní rizika pro spotřebitele a vést k AAF ve sportu. Klenbuterol je beta-2 agonista, užívá se jako bronchodilatátor u pacientů s astmatem, u zvířat slouží primárně k léčbě chronické obstrukční plicní nemoci. Protože má i anabolické účinky na kosterní svalstvo, na Seznamu zakázaných látek je zařazen mezi anabolické látky [36; 13].

V roce 2011 se mezi sportovci mexického národního fotbalového týmu vyskytlo pět AAF při dopingové kontrole během mistrovství světa ve fotbale FIFA v Mexiku. Celkem 208 obyčejných vzorků dopingové kontroly bylo analyzováno vysoce citlivými metodami ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Z tohoto množství poskytlo AAF celkem 109 z nich, cca 52 %. Při podezření na problém kontaminace potravin bylo zahájeno vyšetřování, kdy v průběhu turnaje byly odebrány vzorky masa, ve kterých byl detekován klenbuterol. Vzhledem k dalším rozsáhlým důkazům naznačujícím kontaminaci masa jako nejpravděpodobnějšího důvodu výskytu klenbuterolu v moči sportovců, nebyl nakonec žádný z nich sankcionován [37].

Rozlišování mezi neúmyslným požitím klenbuterolu a dopingem zůstává nadále výzvou. Slibný přístup představuje rozlišování mezi enantiomery. Zatímco terapeutický klenbuterol je racemická směs (+) a (-), zvířecí tkáň je obohacena pouze jedním ze stereoizomerů [38]. Bylo zjištěno, že zatímco (+) se hromadí ve vepřové a kuřecí tkáni, enantiomer (-) zase v hovězí a jehněčí. Proto druh požitého masa může potenciálně ovlivnit poměr enantiomerů v lidské moči [39].

Dalším a zároveň nejstarším případem neúmyslného dopingu je narkotický morfin. Po konzumaci komerčně dostupných koláčů obsahujících mák byla provedena kvantitativní analýza morfinu a kodeinu. Několik vzorků moči obsahovalo morfin s koncentracemi vyššími než 1  $\mu\text{g/ml}$  a maximální hodnoty byly detekovány přibližně na hladině 10  $\mu\text{g/ml}$ . Při detekci tohoto alkaloidu platí mezní hodnota 1  $\mu\text{g/ml}$ , kterou stanovil Mezinárodní olympijský výbor. Proto by vrcholoví sportovci mohli vykazovat AAF po konzumaci produktů obsahujících mák [40].

## 4 Průběh dopingové kontroly

Dopingová kontrola (DK) může být provedena jak v průběhu soutěže, tak mimo ni. DK je souhrnné označení pro jednotlivé kroky zahrnující rozhodnutí o provedení testu, odběr vzorku, laboratorní analýzu, oznámení výsledku, a v případě pozitivního nálezu také odpovídající postih [41].

Zpravidla se testují vítězové či medailisté soutěže, popřípadě je sportovec vybrán náhodným losem [42]. Kdo bude ke kontrole vybrán, určuje dopingový komisař, který má také právo DK provádět. Vybraný sportovec, jenž je ke kontrole vyzván dopingovým komisařem, nebo jeho asistentem, po potvrzení přijetí výzvy podpisem na formulář, má povinnost se neprodleně dostavit do místnosti dopingové kontroly. Po dohodě s dopingovým komisařem je možné povolit odklad, například z důvodu pokračování v soutěži [43].

### 4.1 Odběr moči

Sportovec si vybere odběrovou nádobku a pod přímým dohledem dopingového komisaře stejného pohlaví na toaletě naplní nádobku vzorkem moči tak, aby dopingový komisař, nebo jeho asistent jasně viděl, odkud vzorek opouští tělo [41]. Komisař má za úkol zamezit podvodné manipulaci se vzorkem, která by vedla k porušení antidopingových pravidel [2]. Sportovec odevzdá vzorek moči o obsahu minimálně 90 ml. Odevzdaný vzorek rozdělí na dvě části, do lahvičky A nalévá alespoň 60 ml a do lahvičky B zbylých minimálně 30 ml. Posléze obě zapečetí [42].

Dopingový komisař ze zbytku vzorku určuje refraktometrem hustotu moči, která musí odpovídat limitu stanoveným WADA. Limit je stanoven na 1,005 g/ml. Pokud je však sportovec schopen poskytnout objem moči vyšší než 150 ml, sníží se limit hustoty na 1,003 g/ml [44]. Nakonec sportovec vyplňuje požadované údaje do protokolu (identifikační údaje, kódy lahviček, užívané léky) a stvrdí podpisem [42; 43].

### 4.2 Odběr krve

Vybraný sportovec pro dopingovou kontrolu může být také testován ze vzorku krve. Odběr krve provádí kvalifikovaný komisař pro odběr krve (BCO) [45]. Samotný odběr je prováděn zpravidla z loketní žíly, ale někdy je nutné provést odběr z žíly jiné. Pokud se nepovede odebrat požadované množství krve (dva vzorky po 5 ml), je možné provést vpich maximálně třikrát [42].



Sportovec je povinen vybrat si odběrové zkumavky, jehlu a kontejnery (A, B) s pečeticím uzávěrem, do kterých se vloží naplněné zkumavky. Vše zkontroluje, aby číselné kódy na kontejnerech, zkumavkách, byly všude stejné. Zbylé samolepící kódy nakonec vlepí do jednoho originálního protokolu a třech kopií, protokol podepíše [42].

### 4.3 Laboratoře dopingové kontroly

Jedná se o specializované akreditované laboratoře, zřizované WADA, z nichž jedna byla i v Praze do roku 2011 [46]. Celkový počet akreditovaných laboratoří ke dni 2. 5. 2021 je 30 [47]. Tato laboratorní zařízení musí splňovat velmi přísné podmínky na získání akreditace, která se každým rokem obnovuje. Za splnění kritérií a způsobilost laboratoře zodpovídá Lékařská komise Mezinárodního olympijského výboru a její subkomise pro biochemii a doping [48]. K analyzování vzorku se používá analytických instrumentálních metod, jako je plynová a kapalinová chromatografie spojená s hmotnostními detektory (GC-MS, LC-MS). Tyto metody jsou tradičně využívány k detekci malých molekul, jako jsou například steroidy, diuretika a některé hormony. Větší biomolekuly, jako jsou proteiny, se běžně analyzují pomocí gelové elektroforézy [16]. Všechny laboratoře WADA musí dosahovat požadované úrovně detekce, specifity a selektivity [27].

Existuje minimální úroveň požadovaného výkonu (MRPL) definovaná dle WADA, kterou musí laboratoře splňovat při testování na přítomnost zakázané látky nebo jejího metabolitu. Je to povinný analytický parametr technické výkonnosti, jehož cílem je sjednotit analytický výkon metod používaných k detekci bezprahových látek. MRPL je minimální koncentrace zakázané látky, nebo metody, kterou musí být laboratoře schopny spolehlivě detekovat v každodenní rutinní činnosti. Hodnoty MRPL jsou stanoveny dle metabolismu, stability a farmakokinetiky zakázané látky. Tudiž látky s dlouhodobým účinkem, jako jsou exogenní AAS, budou mít nižší hodnoty MRPL (5 ng/ml) než látky, které jsou užívány krátce před soutěží pro jejich ergogenní účinek, například stimulanty (100 ng/ml) [49].

V antidopingových testech se využívá chromatografických metod spojených s hmotnostní spektrometrií, imunochemických metod, a je důležitá také analýza krevních elementů. Historicky první metodou pro stanovení dopingu byla chromatografie na tenké vrstvě, hodně využívaná je také plynová chromatografie a v současné době se univerzální metodou pro analýzu skoro většiny zakázaných sloučenin stala vysoko účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) [5].

#### 4.3.1 Screening a analýza vzorku

Vzorek je zaslán do akreditované laboratoře WADA, kde je proveden počáteční screening, kdy je nejprve analyzován vzorek „A“ a vzorek „B“ je bezpečně uložen. Při screeningu se stanoví jedna nebo více skupin zakázaných látek. V případě pozitivního nálezu ve vzorku „A“, dojde k pozastavení činnosti, které musí být uloženo. Mezitím je provedena potvrzovací analýza, s přihlédnutím k vlastnostem sloučeniny, která má být při dopingové kontrole stanovena. Jestliže následná analýza vzorku „B“ potvrdí AAF vzorku „A“ antidopingová organizace zahajuje disciplinární řízení a vyhodnocení trestu. Pokud se následná analýza vzorku „B“ nepotvrdí, neprovádí se žádné další kroky a dojde ke zrušení pozastavení činnosti [41].

Pro samotnou dopingovou analýzu se používají standardní referenční vzorky sloučenin, jako jsou syntetické analogy moči a krve se zakázanou látkou. Tento postup významně zjednodušuje identifikaci látek. Dle statistik WADA se ročně analyzuje 200 000 až 270 000 vzorků biologických tekutin sportovců [5].

#### 4.3.2 Výsledky analýzy

O výsledku analýzy je sportovec písemně informován [46]. Výsledky jsou známy zpravidla do jednoho měsíce od provedení dopingové kontroly. V případě složitějších analýz může být tato lhůta, jež závisí na době zpracování analýz v laboratoři, překročena [50].

### 4.4 Biologický pas sportovce

ABP je nástroj WADA pro boj s dopingem ve sportu. Použití látek stimujících erytropoézu, autologní transfuze krve nebo manipulace s močí je velmi špatně detekovatelná tradičními metodami. Analýza tohoto dopingu je obtížná, špatně proveditelná a má svoje limity. Proto byl popsán adaptivní model pro monitorování krevního profilu jedince, jehož hodnoty jsou pravidelně kontrolovány [14].

### 4.5 Terapeutická výjimka

Terapeutická výjimka (TV) je prostředkem, kdy je sportovec na předpis od lékaře oprávněn užívat zakázanou látku, z odůvodněného zdravotního stavu. Udělení terapeutické výjimky musí splňovat určitá pravidla [51].

## 5 Příprava vzorku a extrakce

**Příprava vzorku** pro dopingovou kontrolu by měla být co nejuniverzálnější, jelikož je současně sledováno velké množství nelegálních látek formou prvotního screeningu. Tzv. neselektivní postup „**dilute and shoot**“ je užíván u ionizovatelných sloučenin, které nejsou příliš metabolizovány, jako jsou narkotika, diuretika nebo stimulanty. Takovýto postup je rychlý a levný, avšak mez detekce jednotlivých analytů je vzhledem k naředění snížena [52].

Metoda „dilute and shoot“ někdy zahrnuje i centrifugaci a filtraci vzorku. Tento postup je vhodný především pro detekci opioidů, amfetaminů nebo kanabinoidů v moči. Při analýze vzorku krve postup spočívá v naředění vzorku acetonitrilem (ACN) a následném srážení bílkovin, míchání, centrifugaci, odpaření do sucha a znovurozpuštění v ACN [53].

U sledování anabolických androgenních steroidů a jejich metabolitů je předúprava vzorku nezbytná. K odstranění hlavních interferencí je využívána extrakční metoda kapalina-kapalina (LLE). U této extrakce jsou využívána zejména rozpouštědla jako je *tert*-butyl methylether, diethylether a *n*-pentan. Nevýhodou této techniky je obecně nevhodnost pro látky obsahujících ve své sloučenině polární skupinu a současně při této extrakci je potřebný relativně velký objem vzorku. LLE při zásaditém pH je využívána zejména pro sloučeniny jako jsou právě endogenní a exogenní steroidy. Při paralelní extrakci zásaditých a kyselých látek pro screening jsou nutné dvě paralelní extrakce při různém pH [52].

Kromě vzorku moči je možné k doplnění informací využít i krev. Nejjednodušší úpravou vzorku krve je srážení bílkovin, dále pak postupy LLE, extrakce tuhou fází (SPE), stejně jako pro vzorek moči s následnou analýzou GC-MS či LC-MS. Modernější technikou je metoda suché kapky krve (**DBS**). Při metodě suché kapky krve je odběr vzorku méně invazivní než konvenční odběr krve, a to proto, že spočívá pouze ve sběru několika mikrolitrů plné krve na absorpční papír. Avšak stále má své nevýhody, zejména kvůli relativně vysokým limitům detekce a také kvůli možnému zkreslení výsledků závisících na viskozitě krve a podílu hematokritu [52; 54].

Ve všech oblastech dopingové analýzy byl zaznamenán velký pokrok jako je zvýšená analytická komplexnost, citlivost a rychlejší doba samotné analýzy. Ukázalo se však, že tyto pokroky vytvářejí nové výzvy v oblasti interpretace výsledků. Jsou detekována i stopová množství zakázaných látek, které mohou pocházet z kontaminovaných doplňků stravy nebo jako produkty transformace metabolismu schválených léků. Také změny hormonálních hladin jedince nebo změna metabolismu v důsledku zdravotního stavu, mohou být problémem.

Vyhodnocení rozdílu mezi neúmyslnou expozicí zakázanou látkou a úmyslným dopingem na základě výsledku analýzy jednotlivého vzorku je velmi složité, a je třeba dalších podpůrných informací [28].

V analytické chemii je **extrakce** definována jako přenos analytu z jedné fáze do fáze jiné, ve které jsou následně analyty analyzovány. Z původního vzorku je stanovovaný analyt izolován a v ideálním případě je oddělen od matricových složek vzorku. Rozhraní mezi fázemi vzniká působením mezimolekulárních sil zahrnujících hydrofobní, disperzní, dipólové, vodíkové vazby a iontové interakce [55]. Vzorkem je nejčastěji kapalina a analyt může být převeden do další kapaliny, díky lepší rozpustnosti v ní, anebo sorbován na tuhou fázi. Z tohoto postupu jsou potom odvozeny názvy technik úpravy vzorku jako je již výše zmíněná extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce na tuhou fázi (SPE), extrakce nadkritickou tekutinou (SFE), apod. [56; 52].

Pro měření využívajících chromatografických technik je extrakční krok úpravy vzorku důležitý zejména proto, že extrakce zlepšuje kompatibilitu vzorku s přístrojem, odstraňuje interference a znečištění analytického přístroje [55]. Extrakce je také důležitá pro zakoncentrování vzorku, čímž je následně snížena mez detekce a kvantifikace [55].

Za matrice pro rutinní dopingovou kontrolu jsou považovány moč a krev (sérum, plazma, plná krev). Odběr vzorku moči je neinvazivní, oproti tomu odběr vzorku krve je invazivním zásahem do těla s omezeným objemem pro analýzu. Z těchto důvodů je stále mnoho dopingových kontrol prováděno z moči, avšak procento krevních analýz se neustále zvyšuje [52].

## 5.1 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) je jednou z nejpoužívanějších metod extrakce analytů díky své jednoduchosti a velkému počtu extrahovaných sloučenin. Je to jednoduchá a velmi rychlá technika, při níž lze dosáhnout oddělení jak polární fáze od nepolární, tak dělení polárních sloučenin dle jejich povahy na kyselé, zásadité a neutrální [56].

Samotná LLE je založená na rozdílné rozpustnosti analytů mezi dvěma nemísitelnými kapalnými fázemi, roztokem vzorku a vybraným rozpouštědlem. Obvykle jsou zde vyžadovány kroky jako je protřepávání a následné fázové rozdělení směsi. Jako extrakční rozpouštědla jsou využívány např. diethylether, *n*-pentan, anebo *tert*-butylmethylether (TBME) hlavně vzhledem k jejich vlastnostem, jako je nemísitelnost s vodnou fází a vysoká extrakční účinnost [53].

Lze také použít acetonitril (ACN) vzhledem k jeho nízké koextrakci nepolárních interferentů jako jsou mastné sloučeniny. Iontová síla vodné fáze se zvyšuje přidáním solí a koncentrovaných pufrů, tím se zvýší výtěžnost analytu v acetonitrilové fázi. Technika je známá pod pojmem extrakce kapalina-kapalina s vysolovacím efektem (SALLE) a lze využít pro analýzu psychoaktivních látek z moči. LLE v kombinaci s technikou LC-MS je tak vhodná pro multianalytové stanovení neznámých látek z tělních tekutin [53].

Při extrakci kapalinou se ve většině případů získá extrakt, který musí být vysušen, a zakonzentrován, aby se při chromatografické analýze dosáhlo potřebné citlivosti [56].

## 5.2 Extrakce nadkritickou tekutinou

Při SFE se téměř výhradně jako nadkritická tekutina používá oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ). Obecně  $\text{CO}_2$  jakožto nadkritická tekutina má v některých parametrech vlastnosti jak kapaliny, tak i plynu. Jeho nízká viskozita je velmi blízká plynu, za to jeho hustota je blízká hustotě kapaliny. Kombinace těchto vlastností umožňuje vysokou extrakční účinnost a rozpustnost analytů [56; 57].

## 5.3 Mikroextrakční techniky

Mikroextrakce je extrakční technika, definována dle Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (IUPAC), při které je extrakční fáze v podstatně menším objemu, než je objem vzorku. Extrakční fáze obvykle nepřevyšuje objem 100  $\mu\text{l}$  [58]. Mikroextrakční metody nabízejí mnohé výhody, jakožto krátkou dobu samotné extrakce, malou spotřebu činidla, minimální požadovaný objem vzorku a možnost automatizace. Existuje mnoho typů mikroextrakčních technik jako například disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME), mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS) a mikroextrakce tuhými fázemi (SPME) [53].

### 5.3.1 Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina

Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) je založena na tvorbě zakaleného roztoku přidáním směsi extraktivních a disperzních rozpouštědel do vodného vzorku. Je to velmi citlivá metoda a lze stanovit více analytů díky vysoké univerzálnosti použitých rozpouštědel [53]. Provádí se rychlým vstříkáním malého množství organického rozpouštědla nemísitelného s vodou jako extrakčním činidlem a disperzním rozpouštědlem mísitelným s vodou do vodného roztoku. Takto vytvořená směs způsobuje tvorbu jemných kapiček, roztok je tímto zakalen. Kapičky jsou dispergovány ve vodné fázi a vytváří tak velkou výměnnou plochu, čímž je umožněna rychlá a efektivní extrakce [59].

### 5.3.2 Mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu

Další mikroextrakční technikou je mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS). Metoda MEPS je založená na technice extrakce tuhou fází (SPE), kdy je na konec jehly vložené do poloautomatické injekční stříkačky vloženo několik miligramů sorbentu. Technika je využívána zvláště pro analýzu orálních tekutin a v nich například obsažených syntetických kanabinoidů nebo katecholaminů a metanefrinů. Obvyklý objem vzorku se pohybuje v rozmezí 50 až 300  $\mu$ l a samotnému stanovení obvykle předchází centrifugace. Poté následuje analýza pomocí LC-MS. V kapalinové chromatografii jsou využívány sorbenty C8 nebo C18. Tyto sorbenty se liší v počtu uhlíků na alkylovém řetězci. C8 obsahuje osm atomů uhlíků, zatímco C18 obsahuje atomů uhlíků celkem osmnáct. Tyto řetězce jsou navázané na oxid křemičitý. Oktadecylové řetězce jsou obvykle více hydrofobní, a proto jsou kolony označené C18 výhodnější pro separaci vysokomolekulárních sloučenin jako jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Pro malé organické sloučeniny je dostačující kolona oktylového řetězce, značená C8 [53; 60; 61].

### 5.3.3 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je technika, při které je do jednoho kroku spojena extrakce i vzorkování. Principem této metody je sorpce analytu na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které je umístěno uvnitř kovové jehly. Povlak vláken je vystaven matici vzorku po předem stanovenou dobu, což vede k adsorpci analytu na jeho povrch. Provedení extrakce je možné dvěma způsoby a to, headspace SPME, označována zkratkou HS-SPME, a využívá extrakci analytů z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě. Proto je vhodná zejména pro analýzu těkavých látek. Druhým způsobem je přímá SPME, označována zkratkou DI-SPME, při níž dochází k ponoření vlákna přímo do vzorku. DI-SPME metoda je vhodná především pro látky ve stavu kapalném. Ustálení rovnováhy probíhá kratší dobu u techniky HS-SPME, protože molekuly v plynném skupenství se pohybují rychleji než ve skupenství kapalném [62; 63].

Využití metody SPME ve spojení s GC-MS je vhodné pro simultánní stanovení návykových látek ze slin, jako je kokain, THC, MDMA anebo amfetamin. Před vlastní extrakcí s využitím SPME je bezprostředně upraveno pH pomocí 20  $\mu$ l 0,1M NaOH. Pro zvýšení účinnosti extrakce je ještě ke vzorku přidáno 30-50 mg chloridu sodného. Vzorek obsahuje také deuterované vnitřní standardy (amfetamin-d<sub>5</sub>, MDMA-d<sub>5</sub>, kokain-d<sub>3</sub>, THC-d<sub>3</sub>). Při použití techniky HS-SPME je hermeticky uzavřená zkumavka se vzorkem umístěna do vodní lázně

na 60 °C, aby byla zvýšena těkavost analytu. Vlákno je poté vystaveno plynné fázi v horní části zkumavky. Poté je vzorek z vlákna injikován do GC prostoru pro analýzu [64].

#### **5.4 Extrakce tuhou fází**

Metoda extrakce tuhou fází (SPE) je jednoduchá a relativně nenáročná na technické vybavení. Je snadno automatizovatelná a splňuje požadavky jako je úspora práce a času, vysoká návratnost vzorku a minimální interference s použitými materiály. Výhodou je i cena a možnost sterilního provedení. Podstatou této metody jsou kolonky, které umožňují izolaci analytu i ze složitějších matric jako je plazma nebo sérum. Po extrakci následuje nejčastěji HPLC, jež umožňuje kvantifikaci složek stanovovaného analytu [56].

SPE byla v roce 2012 úspěšně zařazena jako rutinní strategie přípravy vzorku při dopingové kontrole během Olympijských her v Londýně [65]. Tato metoda byla využita pro extrakce mnoha různých látek včetně AAS, beta-2 agonistů, diuretik, narkotik, glukokortikoidů nebo beta-blokátorů [52].

SPE je nejčastější metodou čištění vzorků před instrumentálním stanovením. V dnešní době je platnou a uznávanou technikou při detekci nelegálních látek z biologických tekutin. Postup při extrakci tuhou fází zahrnuje čtyři kroky, a to úpravu vzorku, nadávkování vzorku na SPE kolonku, resp. sorbent, promývání a vyluhování. Analyty jsou zachyceny z kapalně fáze na tuhém sorbentu, následně promytí tuhé fáze vhodným rozpouštědlem nebo kombinací vhodných rozpouštědel slouží k odstranění zadržených matricových sloučenin a posledním krokem celého SPE procesu je uvolnění (vyluhování) analytů vhodným rozpouštědlem [53].

Většina látek je metabolismem v těle přeměněna a močí vyloučena v konjugované formě, většinou s glukuronovými nebo sulfátovými skupinami, vzniklými ve druhé fázi biotransformace. Prvním krokem extrakce vzorku moči je tedy enzymatická hydrolyza pomocí enzymu  $\beta$ -glukuronidázy a arylsulfatázy. Následně je vzorek zředěn pufrům a nadávkován do SPE kolonky. SPE kolonky jsou komerčně dostupné a pro většinu standardních analytů jsou popsány dodavatelem postupy pro jednotlivé aplikace. V poslední době převažují zautomatizované postupy systémů SPE s použitím 96 jamkových destiček jako pouzdra sorbentu pro kvantitativní screening metabolitů zakázaných látek v moči i dalších biologických tekutinách. Následné analytické stanovení po extrakci tuhou fází se provádí hlavně pomocí LC-MS a GC-MS [53].

## 6 Chromatografické metody

Plynová a kapalinová chromatografie je ve spoustě případů používána v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, která slouží jako detektor zmiňovaných technik. Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda sloužící k určování hmot volných molekul a jejich částí, které je třeba převést na kladné nebo záporné ionty. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které tyto ionty buď vytvoří nebo je emituje do plynného stavu. Z plynné směsi iontů, molekul nebo jejich nenabitých fragmentů separuje nabitě částice. Získá se záznam, tzv. hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou danou látku. Organická hmotnostní spektrometrie je velmi univerzální analytická metoda pro charakterizaci látek jako jsou proteiny, lipidy, steroidy, i pro analýzu drog [66].

Identifikace analytu je provedena na základě hmotnostních spektrálních informací. MS je zlatým standardem pro dopingovou kontrolu. Jednoduchý kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ) a kvadrupólová iontová past (QTrap) jsou nejčastěji využívané detektory v laboratořích pro rutinní dopingovou kontrolu, protože nabízí vhodnou specifitu a citlivost [52].

### 6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je hojně využívanou metodou pro identifikaci a kvantifikaci dopingových látek. Při použití GC je velmi často potřebná derivatizace, která zajistí, aby i látky, které bez derivatizace jsou netěkavé, byly dostatečně těkavé a bylo je možné analyzovat za použití plynového chromatografu. Současně s možností vlastní analýzy jednotlivých analytů bývá zlepšena i citlivost detekce. Tyto postupy mohou být nákladné i časově náročné, avšak GC stále zůstává standardní metodou pro potvrzení zneužití anabolických steroidů, protože AAS se vylučují z moči v různých koncentracích, ve formě metabolitů a izomerů, které se obtížně oddělují. GC je často spojená s hmotnostní spektrometrií s rychlým sběrem dat [52].

V GC-MS je vzorek nejprve převeden do plynného skupenství ve vyhřívaném nástřikovém prostoru a poté je zaveden na počátek kolony. Na koloně jsou separovány jednotlivé složky vzorku, které jsou zavedeny do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Kvalitativní (MS spektrum) a kvantitativní (intenzita iontů) informace jsou získány vyhodnocením chromatogramu a jednotlivých píků [66].



### 6.1.1 Detekce anabolických androgenních steroidů

Obecně steroidy konjugované s glukuronidem jsou před extrakcí zhydrolyzovány 1 ml 0,8 M roztoku difosforečnanu sodného a 50  $\mu$ l glukuronidázy. Takto připravené vzorky jsou inkubovány při teplotě 50 °C po dobu 1,5 hodiny. Po úpravě pH jsou steroidy extrahovány do diethyletheru. Organická fáze je převedena do nové zkumavky a následně odpařena v proudu dusíku. Do zkumavky je přidáno derivatizační činidlo, směs je promíchána a přenesena do lahvíček. Vzorky jsou inkubovány při 60 °C po dobu 15 min, aby došlo k silylaci všech hydroxylových a keto skupin steroidů pomocí trimethylsilylu (TMS). Po derivatizaci jsou vzorky nadávkovány do plynového chromatografu [67]. Další postupy různých typů extrakcí s následnou detekcí jednotlivých zakázaných látek s dopingovým účinkem jsou shrnuté v závěru práce do *Tabulky 1*.

### 6.1.2 Analýza kanabinoidů z moči

Pomocí plynové chromatografie, které předchází extrakce kapalinou lze stanovit tetrahydrokanabinol (THC) ze vzorku moči, jehož používání je ve sportu při soutěži zakázáno [13]. THC je sloučenina obsažená v konopí, jež je považována za psychoaktivní látku a je jednou z nejužívanějších nelegálních drog na světě. Identifikace a kvantifikace této látky v biologických vzorcích je složitá zejména proto, že jeho koncentrace v tělních tekutinách dosahuje pouze nízkých hodnot.  $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinol ( $\Delta$ 9-THC) podléhá biotransformaci v játrech a mění se na několik vedlejších produktů. Jedním z nich je 11-hydroxy- $\Delta$ 9-THC, který může být oxidován na kyselinu 11-nor- $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinol-9-karboxylovou ( $\Delta$ 9-THC-COOH). Ta je konjugována s kyselinou glukuronovou a je vylučována močí.  $\Delta$ 9-THC-COOH je hlavní produkt biotransformace, který lze detekovat v moči, krvi, i ve vlasech [68].

Extrakce vzorku moči spočívá v přidání ke 2 ml vzorku 50 ng/ml vnitřního standardu (ISTD) v podobě  $\Delta$ 9-THC-COOH- $d_3$  a 10% NaOH. Směs je přenesena do propylenových zkumavek a je inkubována při 60 °C po dobu 20 min, aby došlo k hydrolýze. Krok hydrolýzy je prováděn proto, že více než 80 % THC-COOH vylučovaného močí je konjugováno s kyselinou glukuronovou [68].

Po hydrolýze jsou zkumavky vyndány a vychlazeny na pokojovou teplotu. Poté jsou do zkumavek přidány 2 ml deionizované vody, 2 ml 10% kyseliny octové a 8 ml extrakčního rozpouštědla složeného z *n*-hexanu a ethylacetátu. Tato směs je promíchána a následně zcentrifugována. Supernatant je přenesen do kuželových skleněných zkumavek

a při 50 °C na vodní lázni je odpařen do sucha. K vysušenému zbytku je pro derivatizaci přidán *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) a 1% trimethylchlorsilan (TMCS) a vzorek je inkubován. Směs je znovu zcentrifugována, následně je přenesena do lahvíček a 1 µl vzniklého roztoku je dávkován do systému GC-MS [68].

### 6.1.3 Detekce kokainu a jeho derivátů

Při zneužití kokainu ve sportu při soutěži je popsána extrakční technika MEPS s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie. Ve vzorku moči jsou detekovány jeho dva hlavní metabolity, a to methylester ekgoninu a benzoylekgonin, které jsou vylučovány močí, ve které jsou v mnohem vyšší koncentraci než v krvi [69]. Samotný proces extrakční techniky MEPS se skládá ze čtyř kroků, a to z odběru vzorku, promývání, eluce a následného čištění sorbentu. Vlastní příprava vzorku moči pro detekci je taková, že je odebráno 200 µl vzorku, který je naředěn 100 µl pufru fosforečnanu draselného obohaceného o 20 µl pracovního roztoku vnitřního standardu (kokain- $d_3$ , ekgonin methylester- $d_3$  a benzoylekgonin- $d_3$  v methanolu). Směs je zhomogenizována protřepáním. Následně je sorbent promyt methanolem a kyselinou mravenčí. Analyty jsou ze sorbentu uvolněny 100 µl 1% hydroxidu amonného v methanolu. Extrakt je převeden do zkumavky a v proudu dusíku je odpařen do sucha. Takto vzniklé suché extrakty jsou zderivatizovány derivatizačními činidly (MSTFA s 5% TMCS) v uzavřené zkumavce v mikrovlnné troubě. Tyto zderivatizované extrakty jsou přeneseny do lahvičky autosampleru a 2 µl výsledného roztoku jsou dávkovány do systému GC-MS. Po každé extrakci je sorbent promyt postupně amoniakem v methanolu, acetonitrilem, kyselinou mravenčí a nakonec 2-propanolem [69].

### 6.1.4 Analýza THC v plazmě

Pomocí techniky MEPS s následnou detekcí plynovou chromatografií lze stanovit THC i v lidské plazmě [70]. Jak přírodní, tak syntetické kanabinoidy jsou zařazeny na Seznamu zakázaných látek při soutěži [13].

Analýza derivátů THC v plazmě se provádí proto, že jejich koncentrace v plazmě je kvůli nízkému rozdělovacímu koeficientu látky do červených krvinek dvojnásobná oproti plné krvi. Deriváty nacházející se v plazmatické složce krve jsou navázány na lipoproteiny. Metabolismus THC generuje dva hlavní metabolity, a to 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol (11-OH-THC) a 11-nor-9-karboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) [70].

Příprava vzorku spočívá ve vysrážení proteinů acetonitrilem a centrifugací. Supernatant je přenesen do skleněné zkumavky a odpařen v proudu dusíku při laboratorní teplotě. Takto

předupravené vzorky plazmy jsou zředěny 5 ml 0,1M pufru fosforečnanu draselného a obohaceny vnitřním standardem ( $\Delta^9$ -THC- $d_3$ , 11-OH-THC- $d_3$ , THC-COOH- $d_3$ ). Vzniklá směs je promíchána. Sorbent MEPS je kondicionován methanolem a kyselinou mravenčí ve vodě. Endogenní interference jsou odstraněny ze sorbentu 100  $\mu$ l 3% kyseliny octové ve vodě a poté 5% vodným methanolem. Zadržené analyty ze sorbentu jsou eluovány hydroxidem amonným v methanolu s následným odpařením v proudu dusíku do sucha. Vysušené extrakty jsou zderivatizovány za použití 65  $\mu$ l MSTFA s 5% TMCS a 2  $\mu$ l výsledného roztoku jsou dávkovány do systému GC-MS [70].

#### 6.1.5 Analýza stimulantů

Stimulanty, které sdílejí stejnou chemickou strukturu fenylethylaminu, jsou jednou ze tříd stimulantů na trhu, a to konkrétně methamfetamin nebo MDMA. Tyto látky jsou zakázané při soutěži [59] [13]. Lze je detekovat v moči nebo v krvi pomocí extrakční metody DLLME s následnou separací GC. Princip úpravy vzorku moči spočívá v tom, že jsou 2 ml odebraného vzorku obohaceny o 10  $\mu$ l deuterovaného vnitřního standardu (mefedron- $d_3$ ) tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 50 ng/ml. Poté je přidáno 200  $\mu$ l 0,2M NaOH, obsahující 20 mg/ml NaCl, a 500  $\mu$ l MeOH [59].

Vzorek krve je připraven tak, že 2 ml vzorku jsou obohaceny roztokem vnitřního standardu tak, aby byla získána výsledná koncentrace vzorku 50 ng/ml. Poté jsou ze vzorku vysráženy bílkoviny 2 ml MeOH a po vysrážení následuje centrifugace. Čirý supernatant je převeden do zkumavky s 1 ml vody a je přidán 1 ml 0,2M NaOH s 10 mg/ml NaCl, aby bylo dosaženo pH vyššího než 9 [59].

Takto upravené roztoky jsou derivatizovány přidáním 20  $\mu$ l hexylformiátu a protřepávány po dobu 30 sekund. Pro dosažení tvorby zakaleného roztoku je do vzorku moči přidáno 350  $\mu$ l směsi chloroformu a methanolu, do vzorku krve je to 700  $\mu$ l. Vzorky jsou poté zcentrifugovány, jemné kapičky extrakční fáze jsou na dně zkumavky. Tato fáze infranatanu je přenesena do lahvičky a cca 1  $\mu$ l je přímo nadávkován do systému GC-MS [59].

#### 6.1.6 Rozlišení původu anabolických androgenních steroidů

Anabolické androgenní steroidy jsou zařazeny do první skupiny na Seznamu zakázaných látek a jejich zneužívání je zakázáno Světovou antidopingovou organizací [13]. Většina látek včetně anabolických androgenních steroidů se v lidském těle metabolizuje ve dvou fázích. V první fázi se sloučenina přemění na polárnější deriváty, ve druhé fázi dochází ke konjugaci s kyselinou sírovou nebo glukuronovou a vytvoří se sulfokonjugáty anebo

glukuronidy. Sulfáty tvoří přibližně 5 % z celkového množství steroidů a v běžné antidopingové kontrole nejsou hodnoceny. Pouze malé množství je vylučováno močí v nezměněné podobě [5]. Následně lze zneužití AAS vyhodnotit měřením změn koncentrací v plazmě a jejich hladiny v moči. Po perorálním nebo intramuskulárním podání jsou v plazmě zvýšené glukuronidované metabolity jako je androsteron nebo 5-dihydrotestosteron [14]. Stanovení steroidů komplikuje jejich nízká polarita, těkavost, i jejich široké koncentrační rozmezí v moči [5].

Při dopingové kontrole je indikátorem pro zneužití AAS poměr koncentrací testosteronu a jeho neaktivního epimeru, epitestosteronu. V roce 1993 Lékařská komise Mezinárodního olympijského výboru stanovila hranici podezření na doping při poměru testosteron/epitestosteron (T/E) v moči vyšším než 6:1. WADA v roce 2005 tuto hranici snížila na prahovou hodnotu 4:1 [71]. Podání exogenního testosteronu neovlivňuje množství endogenního epitestosteronu. Vysoký poměr T/E značí možnost dopingu. Stanovení koncentrací dalších endogenních sloučenin anabolických steroidů, včetně testosteronu a jeho metabolitů, se nazývá steroidní profil a slouží k charakterizaci metabolismu a hormonálního pozadí. Stanovení steroidního profilu je prováděno jako počáteční screening vzorku moči a je potvrzeno pomocí plynového chromatografu, který je připojen k hmotnostnímu spektrometru přes pyrolýzní jednotku, kde jsou veškeré analyty spáleny na uhlík a vodu, a je měřen poměr izotopů uhlíku. Následné vyhodnocení závisí na poměru izotopů  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  [5].

#### 6.1.7 Detekce xenonu z moči

Další vhodné použití GC je pro detekci xenonu ze vzorku moči. Vzácný plyn xenon je zařazen na Seznamu zakázaných látek jako faktor indukující hypoxii. Příprava vzorku pro analýzu spočívá v obohacení 1 ml moči o 100 mikrolitrů vnitřního standardu (1,8  $\mu\text{mol}$  vodného roztoku ISTD – cyklohexanon- $\text{d}_6$ ). Tato směs je promíchána po dobu pěti sekund a lahvička je inkubována při 70 °C 20 minut. Po dokončení inkubace je 5  $\mu\text{l}$  plynné fáze z horní části zkumavky nastříknuto do GC-MS s trojitým kvadrupólem. Detekční limit metody je 0,5 nmol/ml [72; 13].

## 6.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi se stacionární fází C18 je při dopingové kontrole nejpoužívanější technikou pro analýzu biologických vzorků. Protože úprava vzorku před samotnou analýzou je rychlá a jednoduchá, je tato metoda vhodná pro průkaz polárních těkavých sloučenin bez nutnosti derivatizace [52].

### 6.2.1 Analýza anabolických steroidů

Dalším možným postupem pro analýzu steroidů a jejich strukturních analytů pro dopingovou analýzu bez falešně negativních i falešně pozitivních výsledků je s využitím LC-MS/MS. Vzorek jako takový je složen ze 2 ml moči a 1 ml 0,2M fosfátového pufru, pro dosažení pH 7, a methyltestosteronu jako vnitřního standardu. Tento roztok je hydrolyzován po dobu 2 hodin při teplotě 55 °C s 50 µl β-glukuronidázy z *Escherichia coli*. Směs je poté extrahována přidáním 4 ml *tert*-butyl methyletheru (TBME) a je 5 minut třepána. Takto připravená směs je odstředěna, organická vrstva je oddělena a odpařena do sucha. Tento suchý zbytek je rozpuštěn ve 150 µl směsi vody (10mM HCOONH<sub>4</sub>; 0,05% HCOOH) a MeOH v objemovém poměru 75:25. 10 µl takto připraveného vzorku je použito pro LC-MS/MS analýzu [73].

S využitím LC-IRMS je možné rozlišit původ analytu na základě poměrů izotopů vodíku nebo uhlíku mezi endogenně syntetizovaným analytem a jeho exogenním analogem. Tato technika se zejména využívá u analytů jako je testosteron, nandrolon, boldenon atd. [28].

### 6.2.2 Detekce zneužití inzulínu

Inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I) je jednořetězcový peptid, tvořený ze 70 aminokyselin s molekulovou hmotností 7,6 kDa obsahující tři disulfidické můstky, které tvoří terciální strukturu. IGF-I je svojí strukturou podobný inzulínu a je schopný se vázat na inzulínový receptor. Je hlavním mediátorem růstového hormonu (GH), vylučovaného z přední hypofýzy. Rekombinantní lidský inzulínu podobný růstový faktor I (rhIGF-I) je odvozený buď od kvasinek, nebo *E. coli*, a tyto modifikace mohou mít mnohonásobně vyšší účinnost [74].

IGF-I je cirkulující peptidový hormon, jehož produkce je ovlivňována produkcí GH z hypofýzy. Zvýšené hodnoty IGF-I mají anabolický účinek, může být zneužit sportovci jak samotný GH, IGF-I, tak jeho syntetické analogy [13; 75].

Pro detekci zneužití inzulínu ve sportu při dopingové kontrole je vhodná kvantifikace IGF-I ze séra pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-HRMS). Dlouhodobé sledování IGF-I je vhodné i k doplnění ABP [75].

Pokud sportovec nemá diagnostikovaný *diabetes mellitus*, neterapeutické používání inzulínu je ve sportu zakázáno [13; 76]. V dopingové analýze nelze jasně zaznamenat zneužití inzulínu pomocí imunotestu. Používají se různé chromatograficko-hmotnostně spektrometrické metody, které rozlišují mezi lidským inzulínem, modifikovaným syntetickým a zvířecím

inzulinem pomocí měření metabolitů v séru, plazmě nebo moči. Dopingová analýza inzulinu má stále svá omezení [76]. Stále neexistuje mezinárodně uznávaný test pro detekci zneužívání rekombinantního lidského růstového faktoru podobnému inzulinu I (rhIGF-I) ve sportu. Stejných účinků lze dosáhnout právě i exogenně podávaným GH [74].

Příprava vzorku séra pro detekci za pomoci LC-HRMS zahrnuje vysrážení bílkovin organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou jako je okyselený acetonitril 2% kyselinou octovou a směs také obsahuje izotopem značený vnitřní standard (IGF-1-N<sup>15</sup>). Přidáním vnitřního standardu ke směsi jsou spojeny tři kroky do jednoho. Kyselina octová je nezbytná pro disociaci IGF-I od jeho vazebných proteinů a kyselá labilní podjednotky. Směs je připravena ve zkumavce již obsahující hovězí sérový albumin (BSA), aby nedošlo k nespecifické adsorpci vnitřního standardu na její povrch. IGF-I je kvantitativně zadržen, proto nejsou další kroky jako je odpaření a rekonstituce vzorku nutné. Vysrážená směs, která obsahuje 75 % ACN a 25 % H<sub>2</sub>O obsahující 2% HOAc, je obohacena o IGF-I, 60 µl této směsi je přidáno k 30 µl vzorku séra. Následně je směs promíchána, zcentrifugována, 75 µl supernatantu je přeneseno do lahvičky a 60 µl je dávkováno do systému LC-HRMS [75].

Pro rozlišení různých typů inzulinu je používána hmotnostní spektrometrie. Inzuliny lze extrahovat pomocí extrakce tuhou fází a po zakoncentrování je možné analyzovat pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Vyšší čistoty analytů je možno dosáhnout multidimenzionální kapalinovou chromatografií nebo izolací cílových analytů za pomoci imunoafinitní extrakce. Tento postup následně umožňuje použití laserové desorpce/ionizace pomocí matrice (MALDI) [76].

### 6.2.3 Detekce psychoaktivních substancí

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je pro analýzu dopingových látek velmi vhodná, jelikož je možné dosáhnout screeningu až 200 zakázaných látek za dobu 10 až 20 minut. UHPLC lze použít pro detekci psychoaktivních drog jako například opioidů, amfetaminů, kokainu nebo kanabinoidů v orální tekutině. Toto vybavení používá mnoho akreditovaných laboratoří [65].

Úprava vzorku spočívá v odběru 0,5 ml orální tekutiny do skleněné zkumavky, následně je přidáno 10 µl vnitřního standardu, směs je zředěna 1 ml vody, zamíchána a zcentrifugována, aby byla odstraněna slizovitá část, která zůstává na dně. Supernatant je dávkován do systému UHPLC-MS/MS v množství 2 µl [77].

#### 6.2.4 Detekce a rozlišení původu klenbuterolu

V chromatografii v nadkritické tekutině (SFC) je používána tekutina, obvykle CO<sub>2</sub> smísená s MeOH, která je pod tlakem zahřívána na svůj kritický bod. Takováto tekutina poté vykazuje hustotu podobnou kapalině a difuzivitu a viskozitu blízkou plynu. Tyto vlastnosti umožňují dobrou rozpustnost a rychlý transport analytů v chromatografickém systému bez vytvoření vysokého tlaku. Tato metoda lze využít při testování dopingových látek, jako jsou narkotika, stimulanty, diuretika a beta-blokátory [52].

Pomocí SFC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (SFC-MS/MS) lze kvantitativně stanovit klenbuterolové izomery. Protože se za posledních 10 let objevují případy neúmyslného dopingů klenbuterolu po požití kontaminovaných masných výrobků, je třeba rozlišit mezi záměrným užíváním farmaceutického přípravku a neúmyslnou konzumací masa s obsahem klenbuterolu z důvodu následných sankcí. K tomu slouží stanovení poměru enantiomerů v moči, kdy přípravky používané pro léčbu astmatu obsahují racemickou směs a poměr enantiomerů v moči je shodný s lékem. Poměr enantiomerů v mase se liší, protože se jeden akumuluje v mase zvířete kvůli svým farmakokinetickým vlastnostem [5; 38; 78].

### 6.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě neboli tenkovrstvá chromatografie (TLC) je forma kapalinové chromatografie. Jedná se nejjednodušší a nejlevnější typ chromatografie, protože nezahrnuje náročné technické vybavení a vzorky lze oddělit již v jednom běhu. Jako stacionární fáze zde slouží tenká vrstva chromatografického materiálu, který je připevněn na ploché skleněné, kovové nebo plastové podložce. Po separaci se vzorky vizuálně detekují jako samostatné oddělené proužky. Vzorek je obvykle po rozpuštění ve vhodném těkavém rozpouštědle s malou eluční silou aplikován na TLC desku, nejlépe s minimálním kontaktem, aby nedošlo k porušení stacionární fáze. Jsou nanášeny menší objemy vzorku raději několikrát než jednou s velkým objemem, a mezi každou aplikací je třeba, aby deska uschla. Ačkoli lze kvalitativní detekci provést právě pomocí TLC, je nutné potvrzení a stanovení látky s nízkým detekčním limitem pomocí přesnější chromatografické techniky [79].

#### 6.3.1 Screening hydroxyethylškrobu

TLC může sloužit jako doplňková metoda pro screening hydroxyethylškrobu (HES) a redukci vzorků před samotnou analýzou pomocí GC-MS [80]. Umělý HES je synteticky vyrobený koloid odvozený od amylopektinu z kukuřičného škrobu a je používán jako expandér objemu plazmy v lékařství. Je tvořen z jednotek glukózy a jeho odstranění z oběhu probíhá

převážně renální exkrecí. Mimo lékařství může dojít k jeho zneužití pro dopingové účely [80]. Je zařazen na Seznamu zakázaných látek jako diuretikum a maskovací látka, protože je využíván k maskování dopingu rekombinantním erythropoetinem (rEPO) [81]. HES je zneužíván vytrvalostními sportovci, jako jsou atleti, kvůli výhodám jako již zmíněné zvýšení objemu plazmy, které brání dehydrataci a snížení výkonu. Další výhodou je zlepšení mikrocirkulace, která vede ke zlepšení přenosu kyslíku z krve do tkáně [82].

Metoda pro screening je založena na kyselé hydrolyze HES a následné detekci derivátů glukózy a hydroxyethylglukózy Benediktovou reakcí. Reakce spočívá v redukci síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4$ ) pomocí glukózy nebo jejích derivátů na oxid měďný ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), který poskytuje cihlově červenou sraženinu [80].

Příprava vzorku pro Benediktovu reakci spočívá v umístění 25  $\mu\text{l}$  vzorku moči do skleněné zkumavky zředěným desetkrát destilovanou vodou. Je přidáno 100  $\mu\text{l}$  3M HCl ke zředěným vzorkům i kontrolám. Zkumavky jsou umístěny do vroucí vody na 60 minut a po ochlazení je přebytek kyseliny zneutralizován 3M NaOH. Dále je přidán 1 ml Benediktova činidla obsahující síran měďnatý, uhličitan sodný a cínat sodný do všech roztoků a zkumavky jsou umístěny do vroucí vody na 8 minut. Po vyjmutí a ochlazení je vyhodnocena výsledná barva sraženiny. Pro vizualizaci chromatografického profilu hydrolyzy HES je provedena TLC. Hydrolyzát vzorku moči je nanesen na chromatografickou desku. Jsou přidány hydrolyzáty slepého vzorku moči, HES roztok, HES pozitivní moč, amidový a glukózový roztok jako kontrola. Pozitivní vzorky na HES lze poté rozeznat dle jejich charakteristického vzoru, čímž mohou být negativní vzorky eliminovány a počet vzorků potřebných pro GC-MS analýzu je takto snížen [80].



## 7 Metoda suché kapky krve

Použití metody suché kapky krve (DBS) pro antidopingové účely by mohlo výrazně zvýšit počet krevních analýz, protože metoda eliminuje invazivitu, snižuje náklady na přepravu a skladování, a není zde potřeba odborného personálu. Tato metoda spočívá v nanesení kapky krve odebrané vpichem do prstu nebo paty na specifický filtrační papír. Zaschlé skvrny nevyžadují okamžité zpracování, lze je takto odeslat a skladovat na později. Nevýhody zahrnují malý objem odebraného vzorku, rušící podíl hematokritu a požadované sušení [83].

Po nanesení vzorku skvrny plné krve na filtrační papír je kruh z filtračního papíru přenesen do zkumavky. Do ní je přidán 1 ml pufru obsahující proteázové inhibitory, zkumavka je protřepána a inkubována při laboratorní teplotě 4 hodiny za mírného míchání. Vzniklý extrakt je přenesen do odstředivé filtrační jednotky a je zcentrifugován. Poté je vyměněn pufr za 1 ml Tris-HCl obsahující proteázové inhibitory a je provedena další centrifugace. Objem zbývající nad filtrem je přenesen do ELISA jamek potažených protilátkou anti-EPO. Zachycené proteiny jsou separovány pomocí gelové elektroforézy s 10% polyakrylamidovými gely a je proveden Western blot. Metoda je vhodná pro kvalitativní detekci rekombinantního erythropoetinu, nového proteinu stimulující erytropoézu a kontinuální aktivátoru receptoru erythropoetinu v jedné usušené kapce krve [83].

Tabulka 1 - Porovnání analýz látek s dopingovým účinkem

Látka	AAS	AAS	THC	THC	Kokain	MDMA „Extáze“	MDMA „Extáze“	Inzulin	Opioidy	HES
Matrice	moč	moč	moč	plazma	moč	moč	krev	sérum	orální tekutina	moč
Extrakce	LLE	LLE	LLE	MEPS	MEPS	DLLME	DLLME	SPE	dilute and shoot	Benediktova reakce
Postup	hydrolyzáza 1 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 50 µl glukuronidázy, extrakce do diethyletheru	1 ml 0,2M fosfátového pufru, ISTD, hydrolyzáza 50 µl β-glukuronidázy, extrakce TBME, rozpuštění ve 150 µl směsi vody (10mM HCOONH <sub>4</sub> a 0,05% HCOOH) a MeOH v poměru 75:25	hydrolyzáza ISTD + 10% NaOH, 2 ml H <sub>2</sub> O, 2 ml 10% CH <sub>3</sub> COOH 8 ml rozpuštědla ( <i>n</i> -hexan a EtOAc)	srážení proteinů ACN, 5 ml 0,1M pufr K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , ISTD, kondicionace v MeOH a HCOOH, eluce NH <sub>4</sub> OH v MeOH	100 µl pufru K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , + 20 µl ISTD, promytí MeOH + HCOOH, eluce 100 µl 1% NH <sub>4</sub> OH v MeOH	obohacení o 10 µl deuterovaného ISTD, 200 µl 0,2M NaOH s 20 mg/ml NaCl a 500 µl MeOH	obohacení o 10 µl deuterovaného ISTD, srážení bílkovin 2 ml MeOH, přidání 1 ml H <sub>2</sub> O + 1 ml NaOH → pH > 9	srážení bílkovin ACN okyseleným 2% CH <sub>3</sub> COOH, ISTD, HOAc	10 µl ISTD, 1 ml H <sub>2</sub> O	zředění H <sub>2</sub> O, 100 µl 3M HCl, neutralizace přebytku 3M NaOH, 1 ml Benediktova činidla (CuSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , citrát sodný)
Derivatizace	TMS	-	BSTFA, 1% TMCS	MSTFA, 5% TMCS	MSTFA, 5% TMCS	20 µl hexylformiátu, 350 µl směsi CHCl <sub>3</sub> + MeOH	20 µl hexylformiátu, 700 µl směsi CHCl <sub>3</sub> + MeOH	-	-	-
Detekce	GC-MS	LC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-MS	LC-HRMS	UHPLC- MS	TLC
Zdroj	[67]	[73]	[68]	[70]	[69]	[59]	[59]	[75]	[77]	[80]

## 8 Závěr

Tato literární rešerše byla zaměřena na látky zneužívané ve sportovním odvětví a jejich detekci v tělních tekutinách. Byly zde vyjmenovány a popsány jednotlivé skupiny zakázaných látek, ať už to byly látky zakázané celoročně, pouze při soutěžích anebo látky zakázané jen v určitých sportech. Dále zde byla zmíněna problematika konzumace kontaminovaných potravin či doplňků stravy pro dopingovou kontrolu.

V této práci je popsán průběh samotné dopingové kontroly od výběru sportovce, přes odběr vzorku, až po samotnou analýzu v laboratoři. Každý krok je prováděn dle striktně definovaných pravidel, které musí být dodrženy jak komisaři, tak samotnými sportovci.

Byly zde uvedeny postupy analýz konkrétních látek s dopingovým účinkem, které často vyžadují specifickou úpravu odebraného vzorku, extrakci, hydrolýzu, derivatizaci a následnou separaci buď pomocí plynového, anebo kapalinového chromatografu. Detekce se zpravidla provádí na hmotnostním spektrometru, čímž je zvýšena citlivost stanovení požadované substance.

V současné době se techniky neustále zlepšují a je zaznamenán velký pokrok ve schopnosti detekovat i velmi nízké koncentrace analytu. Paralelně se také vyvíjejí sofistikovanější možnosti metod dopingů ve snaze překonat soupeře s vidinou vítězství a slávy. Neustávající dohled antidopingových organizací nad sportovci v blízké budoucnosti pravděpodobně nezmizí.

## 9 Použitá literatura

- [1] Doping...UNESCO. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-05-28]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/documents/doping\\_unesco.pdf](https://www.antidoping.cz/documents/doping_unesco.pdf)
- [2] Co je do doping? *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-05-28]. Dostupné z: <https://www.antidoping.cz/cs/co-je-to-doping>
- [3] Příručka pro rodiče. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/documents/prirucka\\_pro\\_rodice.pdf](https://www.antidoping.cz/documents/prirucka_pro_rodice.pdf)
- [4] HNÍZDIL J., TŘEŠŇÁK P., BUŠTA P.: *Doping aneb Záklisy vrcholového sportu*. Praha: Grada, 2000. Strom života. ISBN 80-7169-776-1.
- [5] OBUKHOVA E. N., BURYAK A. K.: Determination of Isomers in Doping Control by Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*. 2019, **74**(9), 847-860. doi:10.1134/S1061934819090077.
- [6] Nebezpečí dopingu. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-05-02]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/sites/default/files/nebezpeci\\_dopingu\\_2016-06-30.pdf](https://www.antidoping.cz/sites/default/files/nebezpeci_dopingu_2016-06-30.pdf)
- [7] What is prohibited. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited>
- [8] Seznam zakázaných látek a metod dopingu. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.antidoping.cz/cs/seznam-zakazanych-latek-a-metod-dopingu>
- [9] Non-approved substances. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited/prohibited-at-all-times/non-approved-substances>
- [10] DANDOY C., GEREIGE R.: Performance-Enhancing Drugs. *Pediatrics in Review*. 2012, **33**(6), 265-272. doi:10.1542/pir.33-6-265.
- [11] Pozitivní dopingové případy v ČR. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-11-01]. Dostupné z: [www.antidoping.cz/cs/pozitivni-dopingove-pripady-v-cr](http://www.antidoping.cz/cs/pozitivni-dopingove-pripady-v-cr)
- [12] Sport bez dopingu: Příručka do kapsy. *Informační vzdělávací materiály* [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/documents/prirucka\\_do\\_kapsy.pdf](https://www.antidoping.cz/documents/prirucka_do_kapsy.pdf)
- [13] Prohibited list: 2021. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-03-02]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/sites/default/files/WADA/2021\\_Prohibited\\_list\\_en.pdf](https://www.antidoping.cz/sites/default/files/WADA/2021_Prohibited_list_en.pdf)
- [14] SOWJANYA K., GIRISH Ch.: An Overview of Performance Enhancing Drugs (PED's) in Sports and WADA. *Journal of Young Pharmacists*. 2019, **11**(4), 344-349. doi:10.5530/jyp.2019.11.71.

- [15] CADWALLADER A., DE LA TORRE X., TIERI A., BOTRÈ F.: The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. *British Journal of Pharmacology*. 2010, **161**(1), 1-16 doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x.
- [16] HARRISON C. R.: Role of Capillary Electrophoresis in the Fight Against Doping in Sports. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(15), 6982-6987. doi:10.1021/ac302821x.
- [17] Průvodce boje proti dopingu ve sportu. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2020-10-15]. Dostupné z: <http://www.antidoping.cz/documents/pruvodce.pdf>
- [18] VOSS. S., JAGANJAC M., AL-THANI A. a kol.: Analysis of RBC-microparticles in stored whole blood bags – a promising marker to detect blood doping in sports? *Drug Testing and Analysis*. 2017, **9**(11-12), 1794-1798. doi:10.1002/dta.2212.
- [19] What is prohibited: prohibited at all times/chemical and physical manipulation. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2020-10-24]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited/prohibited-at-all-times/chemical-and-physical-manipulation>
- [20] BRZEZIAŃSKA E., DOMAŃSKA D., JEGIER A.: Gene doping in sport – perspectives and risks. *Biology of Sport*. 2014, **31**(4), 251-259. doi:10.5604/20831862.1120931.
- [21] Seznam právních předpisů upravujících oblast návykových látek. *Home – drogy-info.cz* [online]. [cit. 2021-04-30]. Dostupné z: <https://www.drogy-info.cz/nms/politika-v-oblasti-zavislosti/legislativa/legislativa-uvod>
- [22] AVOIS L.: Central nervous system stimulants and sport practice. *British Journal of Sports Medicine*. 2006, **40**(1), 16-20. doi:10.1136/bjism.2006.027557.
- [23] SELLAMI M., SLIMENI O., POKRYWKA A. a kol.: Herbal medicine for sports: a review. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2018, **15**(1). doi:10.1186/s12970-018-0218-y.
- [24] What is prohibited: Prohibited in competition. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2020-11-12]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited/prohibited-in-competition/stimulants>
- [25] Koka. *Medicina.cz: První český zdravotnický portál* [online]. Panax [cit. 2021-04-30]. Dostupné z: <https://medicina.cz/clanky/2324/34/Koka>
- [26] GOLDSTEIN R., DESLAURIERS C., BURDA A., JOHNSON-ARBOR K.: Cocaine: history, social implications, and toxicity. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2009, **26**(1), 10-17. doi:10.1053/j.semmp.2008.12.001.

- [27] HAND R., BASSINDALE T., TURNER N., MORGAN G.: Application of Comprehensive 2D Chromatography in the Anti-Doping Field: Sample Identification and Quantification. *Journal of Chromatography B*. 2021. doi:10.1016/j.jchromb.2021.122584.
- [28] THEVIS M., WALPURGIS K., THOMAS A.: Analytical Approaches in Human Sports Drug Testing: Recent Advances, Challenges, and Solutions. *Analytical Chemistry*. 2019, **92**(1), 506-523. doi:10.1021/acs.analchem.9b04639.
- [29] GONÇALVES V., RODRIGUES P., RIBEIRO C., TIRITAN M.: Quantification of alprenolol and propranolol in human plasma using a two-dimensional liquid chromatography (2D-LC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **141**, 1-8. doi:10.1016/j.jpba.2017.03.064.
- [30] Strict Liability in Anti-Doping. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/strict-liability-in-anti-doping>
- [31] GARTHE I., MAUGHAN R.: Athletes and Supplements: Prevalence and Perspectives. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2018, **28**(2), 126-138. doi:10.1123/ijsnem.2017-0429.
- [32] MAUGHAN R., BURKE L., DVORAK J. a kol.: IOC Consensus Statement: Dietary Supplements and the High-Performance Athlete. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2018, **28**(2), 104-125. doi:10.1123/ijsnem.2018-0020.
- [33] ANDERSON J M.: Evaluating the Athlete's Claim of an Unintentional Positive Urine Drug Test. *Current Sports Medicine Reports*. 2011, **10**(4), 191-196. doi:10.1249/JSR.0b013e318224575f.
- [34] GEYER H., PARR M., KOEHLER K. a kol.: Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of Mass Spectrometry*. 2008, **43**(7), 892-902 doi:10.1002/jms.1452.
- [35] JUDKINS C., TEALE P., HALL D.: The role of banned substance residue analysis in the control of dietary supplement contamination. *Drug Testing and Analysis*. 2010, **2**(9), 417-420. doi:10.1002/dta.149.
- [36] PREZELJ A., OBREZA A., PECAR S.: Abuse of Clenbuterol and its Detection. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, **10**(4), 281-290. doi:10.2174/0929867033368330.
- [37] THEVIS M., GEYER L., GEYER H. a kol.: Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues. *Drug Testing and Analysis*. 2013, **5**(5), 372-376. doi:10.1002/dta.1471.

- [38] PARR M., BLOKLAND M., LIEBETRAU F. a kol.: Distinction of clenbuterol intake from drug or contaminated food of animal origin in a controlled administration trial – the potential of enantiomeric separation for doping control analysis. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017, **34**(4), 525-535. doi:10.1080/19440049.2016.1242169.
- [39] SMITH D J.: Stereochemical Composition of Clenbuterol Residues in Edible Tissues of Swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48**(12), 6036-6043. doi:10.1021/jf001054v.
- [40] THEVIS M., OPFERMANN G., SCHÄNZER W.: Urinary Concentrations of Morphine and Codeine After Consumption of Poppy Seeds. *Journal of Analytical Toxicology*. 2003, **27**(1), 53-56. doi:10.1093/jat/27.1.53.
- [41] Průvodce pro sportovce: Kodex. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/documents/pruvodce\\_pro\\_sportovce.pdf](https://www.antidoping.cz/documents/pruvodce_pro_sportovce.pdf)
- [42] Dopingová kontrola. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2020-09-24]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/documents/dopingova\\_kontrola.pdf](https://www.antidoping.cz/documents/dopingova_kontrola.pdf)
- [43] Dopingová kontrola a její průběh. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2020-09-24]. Dostupné z: <https://www.antidoping.cz/cs/prubeh-dopingove-kontroly>
- [44] WADA reminds stakeholders that the revised International Standard for Testing and Investigations is now in effect. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2021-05-02]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2020-03/wada-reminds-stakeholders-that-the-revised-international-standard-for-testing-and>
- [45] WADA Quiz. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2020-09-25]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/czech.pdf>
- [46] Práva a povinnosti sportovce. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: <https://www.antidoping.cz/cs/prava-a-povinnosti-sportovce>
- [47] Accredited laboratories. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2021-05-02]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories/accredited-laboratories#main-content>
- [48] SLEPIČKA P.: *Problematika dopingu a možnosti dopingové prevence*. 1. vyd., Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0205-9.
- [49] WADA Technical Document – TD2019MRPL. *World Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2021-05-28]. Dostupné z: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl\\_eng.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf)
- [50] Výsledky dopingových kontrol. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: <https://www.antidoping.cz/cs/vysledky-dopingovych-kontrol>

- [51] Udělení terapeutické výjimky. *Antidopingový výbor ČR* [online]. [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: [https://www.antidoping.cz/cs/granting\\_the\\_tue](https://www.antidoping.cz/cs/granting_the_tue)
- [52] NICOLI R., GUILLARME D., LEUENBERGER N. a kol.: Analytical Strategies for Doping Control Purposes: Needs, Challenges, and Perspectives. *Analytical Chemistry*. 2015, **88**(1), 508-523. doi:10.1021/acs.analchem.5b03994.
- [53] ESTEVE-TURRILLAS F., ARMENTA S., DE LA GUARDIA M.: Sample preparation strategies for the determination of psychoactive substances in biological fluids. *Journal of Chromatography A*. 2020, **1633**. doi:10.1016/j.chroma.2020.461615.
- [54] TRETZEL L., THOMAS A., GEYER H. a kol.: Determination of Synacthen® in dried blood spots for doping control analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(16), 4709-4720. doi:10.1007/s00216-015-8674-6.
- [55] HANSEN F., PEDERSEN-BJERGAARD S.: Emerging Extraction Strategies in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*. 2019, **92**(1), 2-15. doi:10.1021/acs.analchem.9b04677.
- [56] VENTURA K.: *Příprava vzorku ve stopové analýze organických látek: licenční studium*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1995. Správná laboratorní praxe, management systému jakosti a instrumentace v analytické laboratoři, VIII.
- [57] LIANG Y., LIU J., ZHONG Q. a kol.: An automatic online solid-phase dehydrate extraction-ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry system using a dilution strategy for the screening of doping agents in human urine. *Analytica Chimica Acta*. 2020, **1101**, 184-192. doi:10.1016/j.aca.2019.12.011.
- [58] POOLE C., MESTER Z., MIRÓ M. a kol.: Glossary of terms used in extraction (IUPAC Recommendations 2016). *Pure and Applied Chemistry*. 2016, **88**(5), 517-558. doi:10.1515/pac-2015-0903.
- [59] MERCIECA G., ODOARDI S., CASSAR M., STRANO ROSSI S.: Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, **149**, 494-501. doi:10.1016/j.jpba.2017.11.024.
- [60] XIONG X., ZHANG Y.: Simple, rapid, and cost-effective microextraction by the packed sorbent method for quantifying of urinary free catecholamines and metanephrines using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in clinical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020, **412**(12), 2763-2775. doi:10.1007/s00216-020-02436-8.



- [61] Difference between C8 and C18 Columns Used in HPLC System. *Pharmaceutical Guidelines* [online]. [cit. 2021-6-19]. Dostupné z: <https://www.pharmaguideline.com/2018/05/difference-between-c8-and-c18-columns.html>
- [62] BALASUBRAMANIAN S., PANIGRAHI S.: Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, **4**(1), 1-26. doi:10.1007/s11947-009-0299-3.
- [63] BORDEN S A., PALATY J., TERMOPOLI V. a kol.: Mass spectrometry analysis of drugs of abuse: Challenges and emergencing strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. 2020, **39**(5-6), 703-744. doi:10.1002/mas.21624.
- [64] FUCCI N., DE GIOVANNI N., CHIAROTTI M.: Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Science International*. 2003, **134**(1), 40-45. doi:10.1016/S0379-0738(03)00098-7.
- [65] MUSENGA A., COWAN D.: Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1288**, 82-95. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.006.
- [66] HOLČAPEK M.: *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného 5.-7.11. 2001 v Kongresové hale Univerzity Pardubice*. 1. vyd., Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
- [67] PÖHÖ P., SCHOLZ K., KÄRKKÄINEN N. a kol.: Analysis of steroids in urine by gas chromatography-capillary photoionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2019, **1598**, 175-182. doi:10.1016/j.chroma.2019.03.061.
- [68] OLIVEIRA K., SCANFERLA D., SILVA J. a kol.: Quantitative analysis of  $\Delta^9$ -THC-COOH in Human Urine by the Liquid-Liquid Extraction technique and Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Adaptation, Optimization and Validation. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*. 2021, **8**. doi:10.30744/brjac.2179-3425.TN-59-2020.
- [69] ROSADO T., GONÇALVES A., MARGALHO C. a kol.: Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, **409**(8), 2051-2063. doi:10.1007/s00216-016-0152-2.
- [70] OSADO T., FERNANDES L., BARROSO M., GALLARDO E.: Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1043**, 63-73. doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.007.

- [71] BOWERS L. D.: Testosterone Doping: Dealing with Genetic Differences in Metabolism and Excretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008, **93**(7), 2469-2471. doi:10.1210/jc.2008-0977.
- [72] THEVIS M., PIPER T., GEYER H. a kol.: Urine analysis concerning xenon for doping control purposes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2015, **29**(1), 61-66. doi:10.1002/rcm.7080.
- [73] HE G., WU Y., LU J.: Doping control analysis of 13 steroids and structural-like analytes in human urine using Quadrupole-Orbitrap LC–MS/MS with parallel reaction monitoring (PRM) mode. *Steroids*. 2018, **131**, 1-6. doi:10.1016/j.steroids.2017.12.011.
- [74] BAILES J., SOLOVIEV M.: Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and Its Monitoring in Medical Diagnostic and in Sports. *Biomolecules*. 2021, **11**(2), 15. doi:10.3390/biom11020217.
- [75] COPPIETERS G., JUDÁK P., VAN HAECKE N. a kol.: A high-throughput assay for the quantification of intact Insulin-like Growth Factor I in human serum using online SPE-LC-HRMS. *Clinica Chimica Acta*. 2020, **510**, 391-399. doi:10.1016/j.cca.2020.07.054.
- [76] THEVIS M., THOMAS A.: Nachweis synthetischer Insuline in Doping-Analytik und Forensik. *Rechtsmedizin*. 2021, **31**(1), 1-9. doi:10.1007/s00194-019-00347-2.
- [77] MALACA S., BUSARDÒ F., GOTTARDI M. a kol.: Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, **170**, 63-67. doi:10.1016/j.jpba.2019.02.039.
- [78] WALPURGIS K., THOMAS A., GEYER H. a kol.: Dietary Supplement and Food Contaminations and Their Implications for Doping Controls. *Foods*. 2020, **9**(8), 21. doi:10.3390/foods9081012.
- [79] LUNDANES E., REUBSAET L., GREIBROKK T.: *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. ISBN 9783527336203.
- [80] SCALCO F., SIMONI R., OLIVEIRA M. a kol.: Screening for hydroxyethyl starch (HES) doping in sport. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2010, **13**(1), 13-15. doi:10.1016/j.jsams.2008.06.010.
- [81] Diuretics and masking agents. *WORLD Anti-Doping Agency (WADA)* [online]. [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited/prohibited-at-all-times/diuretics-and-masking-agents>

- [82] THEVIS M., OPFERMANN G., SCHÄNZER W.: Detection of the plasma volume expander hydroxyethyl starch in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, **744**(2), 345-350. doi:10.1016/S0378-4347(00)00251-6.
- [83] REVERTER-BRANCHAT G., VENTURA R., EZZEL DIN M. a kol.: Detection of erythropoiesis-stimulating agents in a single dried blood spot. *Drug Testing and Analysis*. 2018, **10**(10), 1496-1507. doi:10.1002/dta.2418.