



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Pixabay*

Horváthné Soós Erika¹, Garai Gábor¹, Dési Eszter¹, Szigeti Tamás János¹

Érkezett: 2018. december – Elfogadva: 2019. március

Étrend-kiegészítő készítmények vizsgálatainak tapasztalatai

KULCSSZAVAK: étrend-kiegészítők, kockázatbecslés, tiltott összetevők, gyógyszer hatóanyag, designer vegyület, sportolóknak szánt termékek, fogyasztószerek, potencianövelő készítmények, anabolikus hatású szerek, aromataz inhibitorok, stimulánsok.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az étrend-kiegészítők és a sportolóknak szánt termékek tiltott hatóanyagainak – gyógyszerek és ezek designer vegyületei - meghatározása az élelmiszer-analitikai vizsgálatok fontos, de a mai napig nem igazán ismert és szabályozott területe.

Laboratóriumunkban három fő termékcsoporthoz vizsgálataival foglalkozunk. Az első csoportba a sportolóknak szánt termékek tartoznak. Ezek lehetnek étrend-kiegészítők, valamint a 2016 előtt a különleges táplálkozási célú élelmiszerek közé sorolt készítmények csoportja – például az elsősorban sportolóknak és nehéz fizikai munkát végzőknek szánt nagy fehérje tartalmú, nagy izomerő kifejtését elősegítő termékek –, amelyek 2016 után az étrend-kiegészítők vagy a normál élelmiszerek kategóriájába kerültek át. A sportolók számára a készítmények fogyasztásakor az egészség megőrzése és az elérni kívánt élettani hatások mellett fontos szempont, hogy a termékek még nyomnyi mennyiségben se tartalmazzanak a WADA (Nemzetközi Doppingellenes Ügynökség) tiltólistáján szereplő hatóanyagokat, hiszen ezek jelenlétéért a szervezetükben kizárólagosan önmaguk felelnek.

A második a fogyasztószerek csoportja. Az étrend-kiegészítőkben használt tiltott hatóanyagaikat tekintve az ide sorolt készítmények nagy hasonlóságot mutatnak a sportolók számára tiltott stimulánsokat tartalmazó termékek csoportjával.

A harmadik csoportot a szexuális diszfunkciók kezelésében használt készítmények képezik. Ezekben a gyógyszerként széles körben ismer foszfodiészteráz-gátlók jelenhetnek meg tiltott hatóanyagként vagy szennyezőként. A termékek összetevői között leggyakrabban növényi kivonatokat tüntetnek fel.

A szennyezés mértéke a vizsgált csoportokban széles skálán mozoghat mindhárom esetben, a nyomnyi mennyiségtől a gyógyszer hatóanyagnyi mennyiségekig is megtalálhatók egyes termékekben.

12 évvel ezelőtt, amikor a laboratóriumunkban hozzáfogtunk a sportolóknak szánt termékek vizsgálatához, célunk olyan áttekintő – screening – analitikai módszerek kidolgozása volt, amelyekkel a tiltott stimulánsokat 100 ng/g, míg az anabolikus hatású szereket 10-50 ng/g kimutatási határral tudtuk hatékonyan, robosztusan, kellő mérési (detektálási) pontossággal meghatározni. A potencianövelő készítmények vizsgálatát 3 évvel később indítottuk el. A kezdeti 40 komponens analízise óta a vizsgált hatóanyagok típusa és a komponensek száma is számottevően növekedett, ezen túlmenően a stimulánsok és narkotikumok esetében a kimutatási határ 10 ng/g-ra javult. Jelenleg 126 tiltott összetevő meghatározását végezzük akkreditáltan a laboratóriumunkban. Ez idő alatt alapanyagokból és késztermékekből együttesen több mint 10 000 elemzést végeztünk el. Az anabolikus hatású szerek, hormon és metabolikus módosítók

¹ WESSLING Hungary Kft.

vizsgálatára GC-MS és LC-MS/MS, míg a stimulánsok, narkotikumok, béta-blokkolók, béta2-agonisták, valamint a potencianövelő szerek meghatározására a megfelelő mintaelőkészítést követően LC-MS/MS méréstechnikát alkalmazunk.

Kéziratunkban a laboratórium által vizsgált vegyületcsoportok közül az anabolikus hatású szerek, valamint a hormon és metabolikus módosítók közé tartozó aromataz inhibitorok vizsgálatát mutatjuk be a sportolóknak szánt termékekben és alapanyagaikban. Megjegyezzük, hogy a dolgozatban szereplő, az étrend-kiegészítőkben található vegyületek nevére a nemzetközi gyakorlatban alkalmazott angolszász írásmódot alkalmazzuk, kivéve a magyar köznyelvben is használt vegyületneveket és - csoportokat (pl. koffein stb.).

BEVEZETÉS

Az a 37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet értelmében az étrend-kiegészítő készítmény fogalmának meghatározása a következő: „*hagyományos étrend kiegészítését szolgáló olyan élelmiszer, amely koncentrált formában tartalmaz tápanyagokat vagy egyéb táplálkozási vagy élettani hatással rendelkező anyagokat, egyenként vagy kombináltan; adagolt vagy adagolható formában kerül forgalomba (például kapszula, pasztilla, tableta, port tartalmazó tasak, adagolható por, ampulla, csepegtető üveg vagy más hasonló por-, illetve folyadékforma, amely alkalmas kis mennyiség adagolására)*”. A rendelet a tápanyag fogalmát még meghatározza, ezek a rendelet mellékletében felsorolt vitaminok és ásványi anyagok. Az egyéb táplálkozási vagy élettani hatással rendelkező anyagokat azonban nem nevesíti. Ebbe a csoportba tartozik például számos, növényi extraktumot tartalmazó készítmény is.

Az étrend-kiegészítőkkel kapcsolatos hatósági, állami feladatok felosztása Magyarországon igen szerteágazó. Az ellenőrzésben résztvevő hatóságok és szervezetek többek között az Országos Gyógyszerészeti- és Élelmezés-egészségügyi Intézet (OGYÉI), Emberi Erőforrások Minisztériuma (EMMI), a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) és számos egyéb szervezet szerepel. Fontos kiemelni az önszabályozás fontosságát is. A piac tisztaságáért elkötelezett szervezetek a saját kereteiken belül is támogatják a termékek ellenőrzését. Ilyen többek között a Magyarországi Étrend-kiegészítő Gyártók és Forgalmazók Egyesülete (MÉKISZ), a Gyógyszer-nagykereskedők Szövetsége (GYNSZ), a Magyar Gyógyszerész Kamara (MGYK), a Magyarországi Gyógyszergyártók Országos Szövetsége (MAGYOSZ) és a Hamisítás Elleni Nemzeti Testület (HENT) [1]. Magyar bejelentés alapján például a hatósági vizsgálatok eredményeként 2018-ban 9 potencianövelő készítmény került a RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) riasztási rendszerbe és visszavonásra tiltott gyógyszer-hatóanyag tartalom miatt.

Az étrend-kiegészítők és a sportolóknak szánt készítmények forgalmazása a XX. század végére jelentősen megnövekedett. Ez a növekedési ütem napjainkban is folyamatos. A forgalmazott mennyiségek növekedésével párhuzamosan

a termékek hamisításának és tiltott gyógyszer hatóanyaggal történő szennyezésének gyakorisága is növekedett. Az USA-ban már 1975-ben jelent meg olyan esettanulmány, amelyben hamisított kínai gyógynövény készítmények fogyasztásából eredő egészségkárosodásról számoltak be [2]. Az alkalmazott készítmények a címkén összetevőként fel nem tüntetett aminopyrine és phenylbutazon hatóanyagot tartalmaztak. Tajvani szerzők az 1990-es évek elején 8 kórházban 2609 hagyományos, a betegek által használt kínai gyógynövényterméket vizsgáltak meg. A vizsgálataik alapján a készítmények 23,7%-a tartalmazott a címkén fel nem tüntetett hatóanyagot. A szennyezett termékek több mint felében egynél több szintetikus hatóanyagot találtak az összetevők között. Ezek a teljesség igénye nélkül koffeint, gyulladásgátló és lázcsillapítókat, glükokortikoszteroidokat, nem szteroid gyulladásgátlókat, vízhajtókat, nyugtatókat tartalmaztak [3].

A sportolók körében a kiegészítők az 1990-es években a doppingszerek alternatívájaként terjedtek el. A versenysportban mind a felkészülési időszakban, mind a különböző szintű versenyek idején előnyt jelent az adjuváns szerek (pl. vitaminok, ásványi anyagok, egyéb kiegészítők) szedése. Ezekkel a készítményekkel szemben az a követelmény, hogy lerövidítsék a szervezet regenerálódásának idejét, biztosítsák az átlagosnál nagyobb izommunka energiaszükségletét, javítsák az izmok oxigénellátottságát és előzzék meg az izomgörcsöket [4, 5]. A hatásosság mellett a sportolók számára elengedhetetlen, hogy az alkalmazott készítmény ne tartalmazzon a WADA Tiltólistáján lévő komponenseket [6]. Szeretnénk eloszlatni azt a tévhitet, miszerint ezek a termékek nem tartalmaznak, mert nem tartalmazhatnak doppinglistán szereplő komponenseket hiszen normál kereskedelmi forgalomban megszorítás nélkül kaphatók. Számos, sportolók által használt kiegészítő alkalmazásával kapcsolatos pozitív doppingeset ennek az állításnak az ellenkezőjét bizonyítja [7, 8]. A sportolók által használt termékeket a felhasználás alapján többféle módon kategorizálhatják. Ezek közül egy lehetséges felosztás a következő:

- sportélelmiszerek (sport italok, sport gélek, energia szeletek);
- gyógyászati kiegészítők (vas, kalcium, multivitaminok, ásványi anyagok, probiotikumok);

- ergogén kiegészítők (koffein, béta-alanin, bikarbonát, kreatin);
- funkcionális és szuper élelmiszerek (gyógynövények, tengeri moszatok, növényi rostok, magok, pl. chia);
- egyéb kiegészítők (növényi extraktumok és koncentrátumok széles skálája speciális hatásokkal, mint potencianövelés, súlycsökkentés, energia fokozás) [5].

A fenti lista természetesen nem élelmiszerjogi besorolás, de a laboratóriumunkban kidolgozott analitikai módszerek analitikai teljesítményjellemzői megfelelnek a kiválasztott termékcsoportok vizsgálatára. Mivel az étrend-kiegészítők, és a sportolóknak szánt készítmények élelmiszerjogi szempontból az élelmiszerek közé tartoznak, előállításukra és forgalmazásukra az élelmiszerekre vonatkozó szabályozások érvényesek.

A sportolóknak szánt termékek tiltott hatóanyagokra történő ellenőrzése az 1990-es évek közepén kezdődött. Az USA-ban 2004 végéig a prohormonokat tartalmazó készítmények is szabadon forgalomba kerülhettek. Ezek jellemzően a testosterone, 19-nortestosterone és a boldenone prohormonjai voltak. Az izomerő és a testosteronszint növelésére szánt készítményekből számos esetben mutatták ki ezeket a hatóanyagokat akkor is, amikor a termék címkéjén nem voltak feltüntetve [9, 10, 11].

Az első, nagy mintaszámú, átfogó vizsgálatot a Nemzetközi Olimpiai Bizottság végeztette 2000-2001-ben. 13 ország 215 különböző forgalmazójától 634 deklaráltan hormont nem tartalmazó mintát vásároltak. A vizsgált termékek közül 289 termék prohormonokat is gyártó, míg 345 termék prohormonokat nem gyártó cégtől származott. Az összes minta 14,8%-a (94 db) tartalmazott prohormonokat. Analitikai szempontból érdekes, hogy mátrixhatás miatt 66 mintát (10,4%) nem tudtak kielégítően analizálni [12].

A sportolóknak szánt készítményekben és a fogyasztószerekben gyakran megjelenő a WADA tiltólistáján szereplő komponenseket az **1. táblázatban** mutatjuk be. A feltüntetett hatóanyagokat deklarált hatóanyagként vagy szennyezőként is tartalmazhatják a termékek. Ilyen módon a dehydroepiandrosterone-t (DHEA) és a 7-keto-DHEA-t több termékben megtalálhatjuk a feltüntetett összetevők között. Az is előfordul, hogy a tiltott anyagokat olyan néven tüntetik fel az összetevők listáján, hogy azt ne lehessen megtalálni a WADA tiltólistáján.

ANABOLIKUS SZEREK

A WADA anabolikus szerek csoportjába soroljuk az exogén és endogén anabolikus androgén szteroidokat, és az egyéb anabolikus hatású szereket.

ANABOLIKUS ANDRÓGÉN SZTEROIDOK

A szteroidok a lipidek családjába tartozó szteránvázis szerves molekulák. A molekula vázát tizenhét szénatom képezi, három ciklohexán – A, B és C – és egy ciklopentán – D – alkotja a gonán alapvázat (**1. ábra**). A szteroidok változatosságát a gyűrűk oxidációs foka és a hozzájuk kapcsolódó funkciók csoportok adják. A vegyületek változatosságához hozzájárul még az oldalláncok konfigurációs helyzete, a kapcsolódó metilcsoportok száma és a gyűrűn található további funkciók csoportok.

Az anabolikus androgén szteroidok közé tartoznak az emberi szervezetben endogén módon termelődött testosterone, dihydrotestosterone (DHT), testosterone előhormonok és ezek metabolitjai, valamint az exogén anabolikus androgén szteroidok, amelyek a testosterone szintetikus származékai. A testosterone, az elsődleges férfi nemi hormon, egyaránt rendelkezik anabolikus és androgén tulajdonságokkal. A molekulát a herék Leydig-féle sejtjei szintetizálják koleszterinből. A testosterone-t

1. táblázat: A WADA tiltólistáján szereplő vegyületcsoportok néhány jellemző példával
Table 1: Compound groups in the prohibited list of WADA with some typical examples

Csoport / Group	Példák / Examples
S1. Anabolikus hatású anyagok (exogén és endogén anabolikus androgén szteroidok, egyéb anabolikus anyagok) S1. Anabolic agents (exogenous and endogenous anabolic androgenic steroids, other anabolic agents)	1,4-androstadiene-dione, 4-androstenedione, boldenone, stanozolol, testosterone, DHEA, 7-keto-DHEA, clenbuterol, egyéb designer steroidok... 1,4-Androstadiene-dione, 4-androstenedione, boldenone, stanozolol, testosterone, DHEA, 7-keto-DHEA, clenbuterol, other designer steroids...
S2. Peptidhormonok és származékaik S2. Peptide hormones and their derivatives	GHRP-6
S3. β_2 -agonisták / S3. β_2 agonists	higenamine / Higenamine
S4. Hormon- és metabolikus módosítók S4. Hormone and metabolic modulators	4-androstene-3,6,17-trione (6-OXO), formestane 4-Androstene-3,6,17-trione (6-OXO), formestane
S6. Stimulánsok S6. Stimulants	DMAA, ephedrine, heptaminol, octodrine, octopamine, oxilofrin, pseudoephedrine, sibutramine, strychnine... DMAA, ephedrine, heptaminol, octodrine, octopamine, oxilofrine, pseudoephedrine, sibutramine, strychnine...
S8. Kannabinoidok / S8. Cannabinoids	Δ^9 -tetrahidrokannabinol / Δ^9 -tetrahydrocannabinol

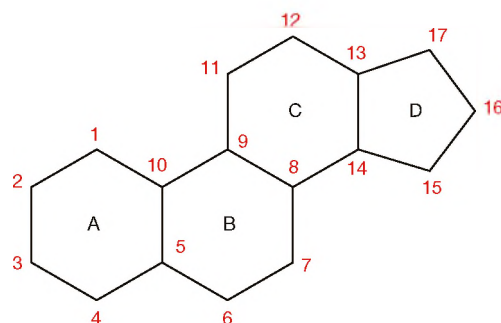
kis mennyiségben a petefészek és a mellékvesék is kiválasztják.

Az első androgén szteroidokat az androsterone-t és a trans-dehydroandrosterone-t (dehydroepiandrosterone, DHEA) 1932-ben vizeletből vonták ki [13]. Néhány évvel később 1935-ben Adolf Butenandt szintetizálta és jellemezte a férfi nemi hormont a testosterone-t. A nemi hormonokkal

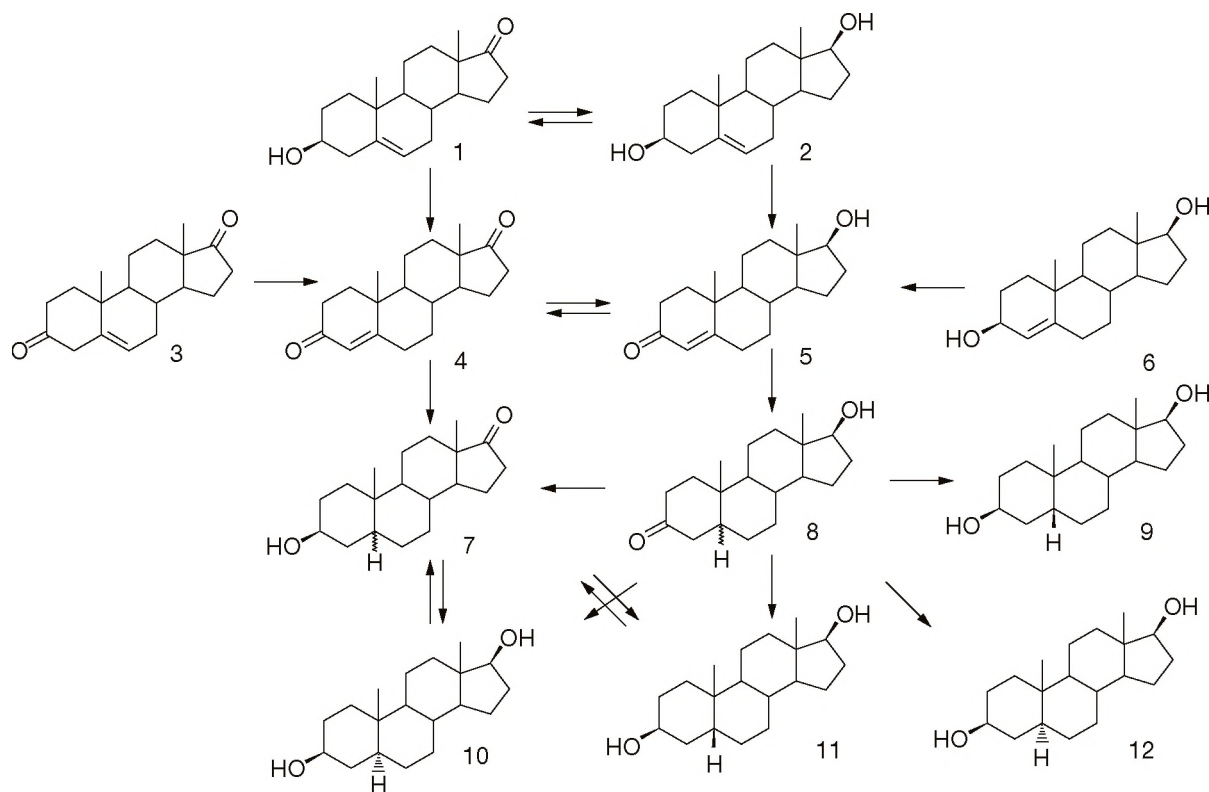
végzett munkájáért 1939-ben, Leopold Ružička-val közösen, megosztott kémiai Nobel díjat kapott.

A testosterone és prohormonjainak anyagcsere folyamatait a **2. ábra** mutatja be [14].

A szintetikus úton előállított exogén anabolikus androgén szteroidok szerkezetileg a testosterone-hoz (**2. ábra**) hasonlítanak, és gyógyszerként alkalmazzák



1. ábra: Gonán váz
Figure 1: Gonane structure



2. ábra: A testosterone és prohormonjainak anyagcsere folyamatai
1: dehydroepiandrosterone; 2: androst-5-ene-3β,17β-diol; 3: androst-5-ene-3,17-dione; 4: androst-4-ene-3,17-dione; 5: testosterone; 6: androst-4-ene-3β,17β-diol; 7: 5α- és 5β-androstanedione; 8: 5α- és 5β-dihydrotestosterone; 9: 5β-androstane-3β,17β-diol; 10: androsterone (5α-) és etiocholanolone (5β); 11: 5α- és 5β-androstane-3α,17β-diol; 12: 5α-androstane-3β,17β-diol.

Figure 2: Metabolic processes of testosterone and its prohormones
1: dehydroepiandrosterone; 2: androst-5-ene-3β,17β-diol; 3: androst-5-ene-3,17-dione; 4: androst-4-ene-3,17-dione; 5: testosterone; 6: androst-4-ene-3β,17β-diol; 7: 5α- and 5β-androstanedione; 8: 5α- and 5β-dihydrotestosterone; 9: 5β-androstane-3β,17β-diol; 10: androsterone (5α-) and etiocholanolone (5β); 11: 5α- and 5β-androstane-3α,17β-diol; 12: 5α-androstane-3β,17β-diol.

azokat, például metandienone, stanazolol, methandriol, methyltestosterone. Az anabolikus androgén szteroidokat számos káros mellékhatásuk és a szigorú jogi szabályozás ellenére több országban forgalmazzák illegálisan. Jó néhány esetben étrend-kiegészítőkben is megjelentek címkén fel nem tüntetett szennyezőként [15, 16, 17, 18]. A meglévő jogszabályok megkerülése érdekében szerkezetüket gyakran módosítják. A designer szteroidokat főleg a testépítőknek szánt termékekben, az interneten keresztül forgalmazzák. Az így előállított szteroidok (3. ábra) [19] farmakológiai tulajdonságairól és metabolizmusáról a klinikai vizsgálatok hiányában kevés ismerettel rendelkezünk, ami nagy kockázatot jelent a fogyasztók számára [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29]

EGYÉB ANABOLIKUS HATÁSÚ SZEREK

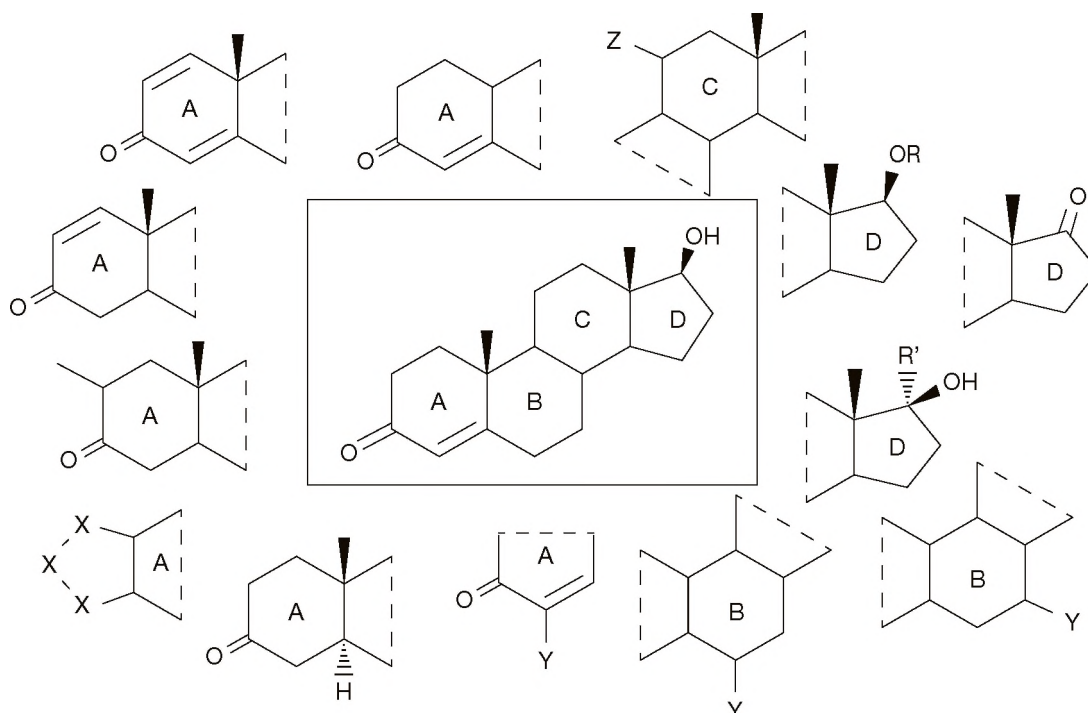
Ebbe a csoportba tartoznak azok a szerek, amelyek nem anabolikus szteroidok, de anabolikus mellékhatással rendelkeznek. Ide tartozik a clenbuterol, amely az asztma kezelésében használt hatékony hörgőtágító. Ezen tulajdonsága mellett fokozza az állóképességet és a kitartást, növeli az izomtömeget és csökkenti a zsír mennyiségét. Étrend-kiegészítőben is leírták már, mint az összetevők között fel nem tüntetett szennyező [30]. Sportolók esetében azért fontos, hogy a fogyasztott termék ne tartalmazzon clenbuterolt, mert a WADA szabályzata értelmében nincs olyan küszöbérték, amely alatt a vizeletmintából kimutatva ne lenne

tiltott [31]. Ez azt jelenti, hogy a clenbuterolnak a vizeletben kimutatható legkisebb mennyisége is pozitív vizsgálati eredményt ad. Ilyen tekintetben a határérték a mindenkor kimutatási határ (LOD – Limit of Detection).

A szelektív androgén receptor modulátorok (Selective Androgen Receptor Modulators – SARMs) nem szteroid típusú anyagok, szelektíven az izomszövet androgén receptorait célozzák meg, és gyors izomnövekedést indítanak el. Jellemzően feketepiaci gyógyszerkészítményként kerülnek forgalomba, de mint étrend-kiegészítőnek látszó készítmények is megjelennek a piacon.

HORMON- ÉS METABOLIKUS MÓDOSÍTÓK

A hormon- és metabolikus módosítók olyan anyagok csoportja, amelyek nem korlátozódnak magukra a hormonokra. Ez az anyagcsoport gyakran módosítja a hormonok működését, akár egy hormon blokkolásával, akár egy hormon aktivitásának növelésével. A biológiai hatásuk alapján több alcsoportra osztják. Az egyik alcsoportba az aromatáz inhibitorok tartoznak. A testépítőknek szánt termékekben feltüntetett összetevőként is gyakran megjelenik a 4-androstene-3,6,17-trion (6-oxo), 2-androstenol (5 α -androst-2-en-17-ol), 2-androstenon (5 α -androst-2-ene-17-on), 3-androstenol (5 α -androst-3-ene-17-ol); 3-androstenone (5 α -androst-3-ene-17-on) [18, 22].



3. ábra: A testosterone szerkezete (középen bekeretezve), és néhány példa a módosítás lehetőségeire (R: acil; R': alkil; X: szén, nitrogén, oxigén; Y: metil, hidroxil, oxo, bróm, klór; Z: oxo, hidroxil)
 Figure 3: The structure of testosterone (framed in the middle, and some examples of modification (R: acyl; R': alkyl; X: carbon, nitrogen, oxygen; Y: methyl, hydroxyl, oxo, bromine, chlorine; Z: oxo, hydroxyl))

AZ ANALITIKAI MÓDSZER LEÍRÁSA

VEGYSZEREK ÉS STANDARDOK

Az analitikai standardokat az LGC Standards GmbH-től és a Sigma-tól szereztük be, analitikai tisztaságban. A hangyasavat, kálium-hidroxidot a Merck GmbH, az etántiolt a Sigma, ammónium-jodidot a Riedel-de Haën, a vízmentes nátrium-szulfátot a Molar Chemicals, az N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide-ot (MSTFA) a TCI Europe szállította. A n-pentánt a Promochem, míg az LC-MS tisztaságú metanolt a Honeywell gyártotta.

A vizsgált komponenseket a **2. és 3. táblázatban** mutatjuk be.

GC-MS PARAMÉTEREK

A gázkromatográfiás mérést Agilent 5973 inert MSD-vel összekapcsolt Agilent 6890 gázkromatográfyon végeztük. Az elválasztás Restek Rxi-5Sil MS

(30 m; 0,25 mm; 0,25 μ m) oszlopon történt. Az injektor hőmérséklete 270 °C, a hőmérséklet program 180 °C-tól 300 °C-ig tartott. Az injektálást split üzemmódban végeztük.

LC-MS/MS PARAMÉTEREK

A folyadékkromatográfiás elválasztást Agilent 1290RRLC készülékkel végeztük, amely bináris pumpából, vákuum degasser-ből, termosztált mintaadagolóból és oszlop termosztátból áll. A detektáláshoz Agilent 6495 hármas kvadrupol tandem tömegspektrométert használtunk Jet Stream ESI forrással. A kromatográfiás elválasztás fordított fázisú Thermo Hypersil Gold C18 (50x3mm; 1,9 μ m) oszlopon történt. Az A eluens 0,1%-os hangyasavas nagytisztaságú víz, a B eluens 0,1%-os hangyasavas metanol. A kezdeti eluens összetétel 70/30 víz/metanol. Az injektált minta mennyisége 3 μ l, az oszloptermosztát hőmérséklete 40 °C. Az elválasztás gradiens elúcióval történt.

2. táblázat: Relatív retenciók (RRT) és a SIM paraméterek GC-MS módszernél
Table 2: Relative retention times (RRT) and SIM parameters for the GC-MS method

Megnevezés Component	Összegképlet Chemical formula	Molekula-tömeg Molecular mass	RRT	m/z	m/z
17 α -Methyl-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.5	0.94	435	450
19-norandrosterone	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276.4	0.73	405	420
19-noretiocholanolone	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276.4	0.79	405	420
5 α -androstane-3 α ,17 β -diol	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292.5	0.85	436	241
5 α -androstane-3 β ,17 β -diol	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292.5	0.94	436	421
5 β -androstane-3 α ,17 β -diol	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292.5	0.86	436	241
Androsterone	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.4	0.82	419	434
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.4	0.95	417	432
Dehydroepiandrosterone-acetate	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.5	1.00	402	327
Dihydrotestosterone (DHT)	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.4	0.96	434	405
Epiandrosterone	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.4	0.92	434	419
Etiocholanolone	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.4	0.85	434	419
Formestane	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302.4	1.20	518	503
Furazabol	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₂	330.5	1.33	387	332
Methandriol	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.5	1.04	268	253
Methylclostebol	C ₂₀ H ₂₉ ClO ₂	336.9	1.35	480	465

Progesterone	$C_{21}H_{30}O_2$	314.5	1.27	458	443
Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)	$C_{21}H_{30}O_2$	314.5	0.65	386	371
Testosterone -d3 (ISTD)	$C_{19}H_{25}D_3O_2$	291.4	1.00	435	420

3. táblázat: Relatív retenciók (RRT) és a MRM paraméterek LC-MS/MS módszernél
Table 3: Relative retention times (RRT) and MRM parameters for the LC-MS/MS method

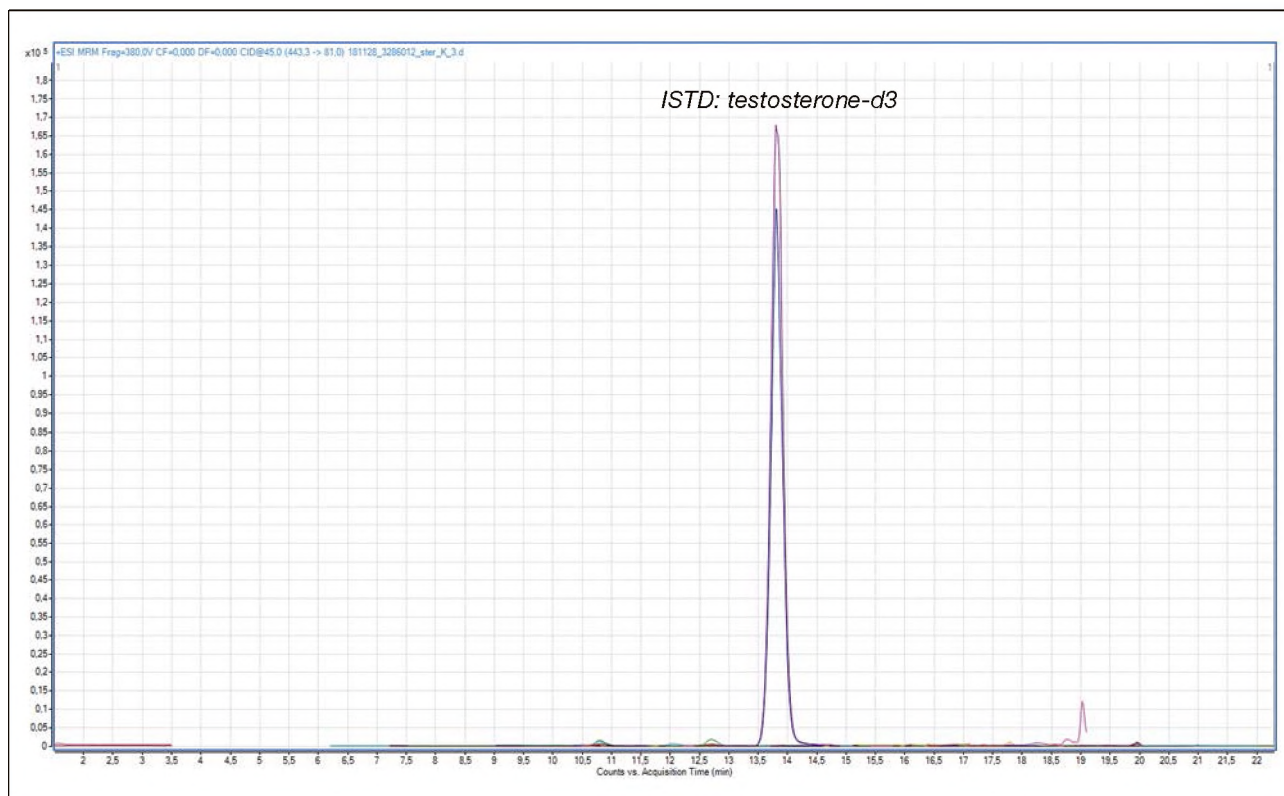
Megnevezés Component	Összegképlet Chemical formula	[M+H] ⁺	RRT	Leányion Daughter ion	
1,4-androstadiene-3,17-dione	$C_{19}H_{24}O_2$	285.4	0.73	151	121
19-nor-4-androstene-3,17-dione	$C_{18}H_{24}O_2$	273.4	0.76	197	109
1-testosterone	$C_{19}H_{28}O_2$	289.4	1.14	205	187
4-androstene-3,17-dione	$C_{19}H_{26}O_2$	287.4	0.85	109	97
4-Hydroxynandrolone (oxabolone)	$C_{19}H_{26}O_3$	291.4	0.84	93	125
7-Keto-Dehydroepiandrosterone	$C_{19}H_{26}O_3$	304.4	0.62	285,1	81
9(10)-Dehydronandrolone	$C_{18}H_{24}O_2$	274.4	0.83	161	135
Adrenosterone	$C_{19}H_{24}O_3$	302.4	0.62	121	257
Anastrazole	$C_{17}H_{19}N_5$	295.4	0.52	225	210
Androst-4-ene-3,6,17-trione	$C_{19}H_{24}O_3$	302.4	0.59	283,1	265
Bolasterone	$C_{21}H_{32}O_2$	318.5	1.19	97,1	123
Boldenone	$C_{19}H_{26}O_2$	288.4	0.83	135	121
Calusterone	$C_{21}H_{32}O_2$	318.4	1.22	97	203
Clenbuterol	$C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$	279.4	0.19	259	203
Clostebol	$C_{19}H_{27}ClO_2$	324.9	1.15	143	131
Danazol	$C_{22}H_{27}NO_2$	339.4	1.26	310	120
Dehydrochloromethyltestosterone	$C_{20}H_{27}ClO_2$	336.9	1.13	155	149
Drostanolone	$C_{20}H_{32}O_2$	306.4	1.27	269,3	215
Epitestosterone	$C_{19}H_{28}O_2$	290.4	1.12	109	97
Exemestane	$C_{20}H_{24}O_2$	298.4	0.87	149	121
Gestrinone	$C_{21}H_{24}O_2$	310.4	0.97	228	199
Mestanolone	$C_{20}H_{32}O_2$	306.4	1.24	269	105
Mesterolone	$C_{20}H_{32}O_2$	306.4	1.22	269	229
Metandienone	$C_{20}H_{28}O_2$	302.5	0.93	149	121

Megnevezés Component	Összegképlet Chemical formula	[M+H] ⁺	RRT	Leányion Daughter ion	
Methasterone	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	320.5	1.31	283	229
Methyldienolone	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	288.4	0.93	135,3	107,1
Methylstenbolone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	318.5	1.3	201,4	145,1
Methyltestosterone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	304.4	1.14	109	97
Metribolone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	286.4	0.91	266,9	227
Mibolerone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	304.50	1.13	107,2	121
Nandrolone	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	276.4	0.89	109	257
Norbolethone	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	318.5	1.28	109	245
Norclostebol	C ₁₈ H ₂₅ ClO ₂	310.8	1.06	291,1	143
Norethandrolone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	304.5	1.22	285	109
Oxandrolone	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	308.4	0.85	289,2	271
Oxymesterone	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	320.4	1.08	301	113
Stanozolol	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	330.5	1.25	95	81
Stenbolone	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	304.5	1.25	187	205
Testosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	290.4	1.01	109	97
Testosterone-acetate	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	332.4	1.3	97	109
Testosterone-propionate	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	346.5	1.35	109	97
Tetrahydrogestrinone (THG)	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	314.4	1.23	241	159
Trenbolone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	272.4	0.82	253	199
Trenbolone-acetate	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	314.4	1.22	253	270,9
Δ ¹ -Androstenedione	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	288.4	0.96	97,1	143,3
Δ ⁹ -methyltestosterone	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	302.4	1.05	283	159
Testosterone-d ₃ (ISTD)	C ₁₉ H ₂₅ D ₃ O ₂	292.4	1	109	97

MINTAELŐKÉSZÍTÉS

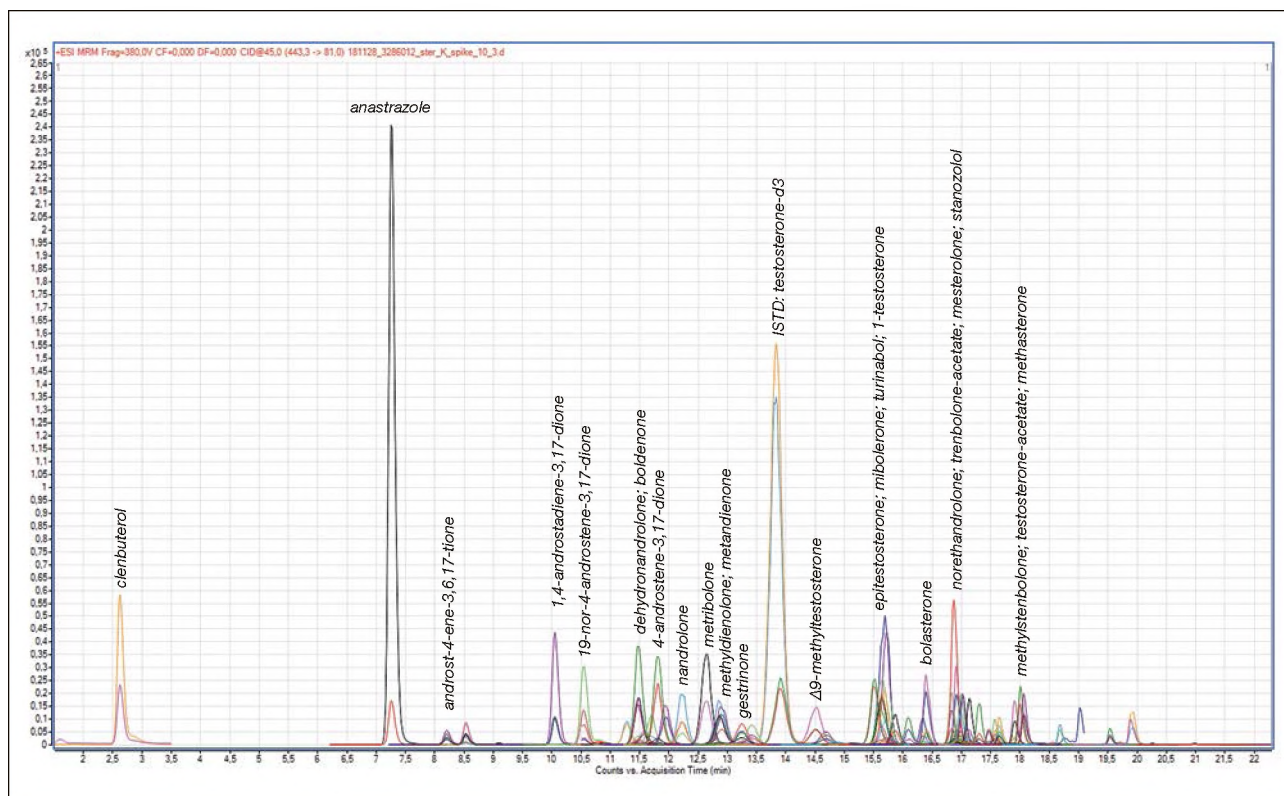
A vizsgálathoz 2 g homogenizált mintát mértünk be, majd a W. Thuyne és F.T. Delbeke által leírt [32] módszer kismértékű módosításával dolgoztuk fel. A belső standard 1 µg/ml testosterone-d₃ oldat. Az előkészítés során kapott n-pentános extraktumot két részre osztottuk és nitrogén áramban szárazra pároltuk. A bepárlási maradékot az LC-MS/MS méréshez 200 µl 70/30 víz/metanol eleggyel oldottuk. A GC-MS méréshez a bepárolt mintát 50 µl MSTFA/NH₄I/etántiol (320/1/2) szililezőszerben oldottuk, és 60 °C-on 15 percig szárazmázoltuk.

2019-ben rugalmas akkreditált területen 25 új komponenssel bővítettük a vizsgált tiltott hatóanyagok számát. A módszer minőségi meghatározásra szolgál. A **2. és 3. táblázatban** az analizált komponensek adatait és a mérések jellemző paramétereit tüntettük fel. A módszer validálása során az elvárt kimutatási határ komponenstől és mátrixtól függően 10-250 ng/g, a mérési bizonytalanság kisebb volt, mint 30%.



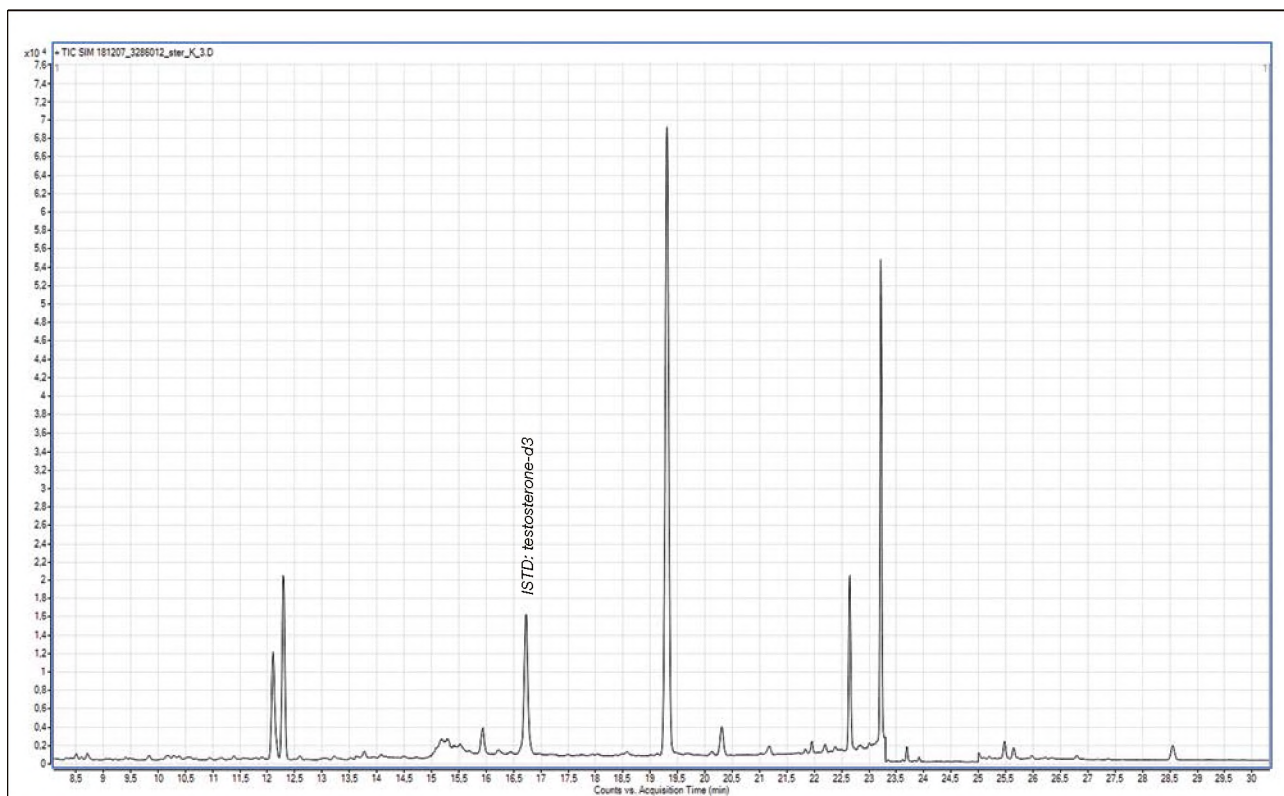
4. ábra: Magnézium tartalmú étrend-kiegészítő LC-MS/MS MRM kromatogramja testosterone-d3 belső standarddal adalékolva előkészítés után

Figure 4: LC-MS/MS MRM chromatogram of a magnesium-containing dietary supplement spiked with testosterone-d3 internal standard after sample preparation



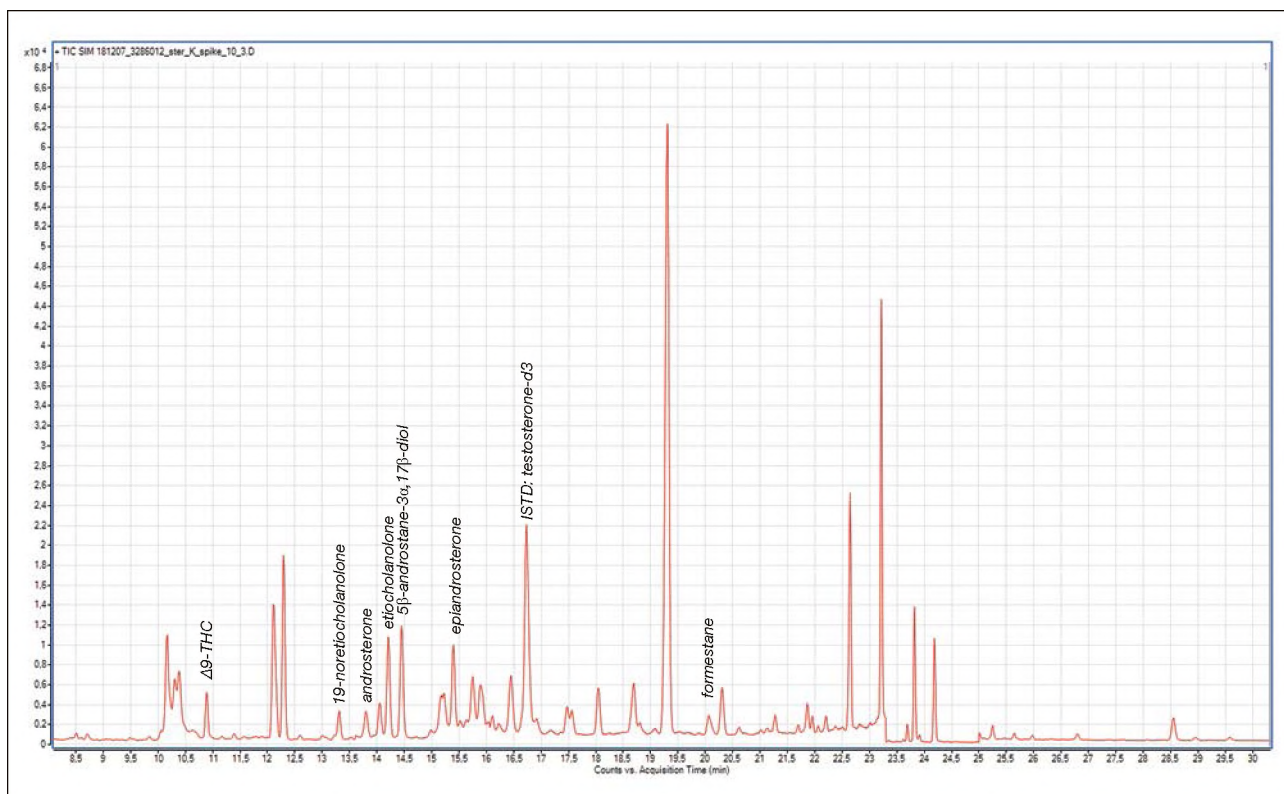
5. ábra: Magnézium tartalmú étrend-kiegészítő LC-MS/MS MRM kromatogramja testosterone-d3 belső standarddel és hatóanyagokként 10ng/g szinten adalékolva előkészítés után

Figure 5: LC-MS/MS MRM chromatogram of a magnesium-containing dietary supplement spiked with testosterone-d3 internal standard and to 10 ng/g levels for each active ingredient after sample preparation



6. ábra: Magnézium tartalmú étrend-kiegészítő GC-MS SIM kromatogramja testosterone-d3 belső standarddel adalékolva előkészítés után

Figure 6: GC-MS SIM chromatogram of a magnesium-containing dietary supplement spiked with testosterone-d3 internal standard after sample preparation



7. ábra: Magnézium tartalmú étrend-kiegészítő GC-MS SIM kromatogramja testosterone-d3 belső standarddel és hatóanyagoként 10ng/g szinten adalékolva előkészítés után

Figure 7: GC-MS SIM chromatogram of a magnesium-containing dietary supplement spiked with testosterone-d3 internal standard and to 10 ng/g levels for each active ingredient after sample preparation

Az utóbbi években a felelős gyártók a késztermékek bevizsgálata mellett több alapanyag, főleg különböző növényi extraktumok analízisét végeztették el laboratóriumunkban. Az elemzések során több esetben találtunk tiltott hatóanyagokat a vizsgált minták között.

Az **4. táblázatban** összefoglalva mutatjuk be a tiltott összetevőt tartalmazó alapanyagokat és a termékből kimutatott tiltott komponenseket. A kimutatási határérték (LOD) 10 ng/g.

4. táblázat: Tiltott összetevőt tartalmazó alapanyagok és a termékből kimutatott tiltott komponensek
Table 4: Raw materials containing prohibited ingredients and the prohibited components detected in the products

Szilárd növényi kivonat <i>Solid plant extract</i>	Tiltott hatóanyag <i>Prohibited active ingredient</i>						
Ajuga Turkestanica ext.	ADD	AD	DHEA	T			
BioPerine (Pioerine)	DHEA						
Black pepper extract	DHEA						
Commiphora Mukul	AD	PR					
Cynara scolimus	ADD	AD	DHEA	PR			
Dandelion	DHEA	PR					
Echinacea	ADD	AD	T	epi-T	EC	PR	
Ginseng ext.	ADD	DHEA					
Hesperidine	ADD	AD					
Leuzea extract	ADD	AD	B				
Milk thistle ext.	ADD	AD	B	DHEA	T	PR	
Resveratol	ADD	AD	DHEA	T	epi-T	PR	
Rhaponticum Carthamoides	ADD	AD	T	epi-T			
Rhodiola rosea ext.	ADD	AD	T	epi-T	PR		
Salix alba ext.	ADD	AD	T	epi-T	PR		
Silybum marianum ext.	ADD	AD	B	DHEA	T	epi-T	PR
Spinach ext.	ADD	AD					
Tribulus Terestis	ADD	AD	THC	PR			
Urtica dioica leaf	ADD	AD					

Jelmagyarázat / Abbreviations:

ADD 1,4-androstadiene-3,17-dione;

AD 4-Androstene-3,17-dione

DHEA Dehydroepiandrosterone

B Boldenone

T Testosterone

epi-T epi-Testosterone

EC Etiocholanolone

THC Δ9-THC

PR Progesterone (a vegyület nem szerepel a WADA tiltólistáján / the compound is not on the prohibited list of WADA)

A **8. ábrán** a vizsgált alapanyagok közül egy pozitív *Salix alba* kivonat MRM átmeneteit mutatjuk be. A mintában lévő tiltott anyagok szemikvantitatív mennyiségét az **5. táblázatban** foglaltuk össze.

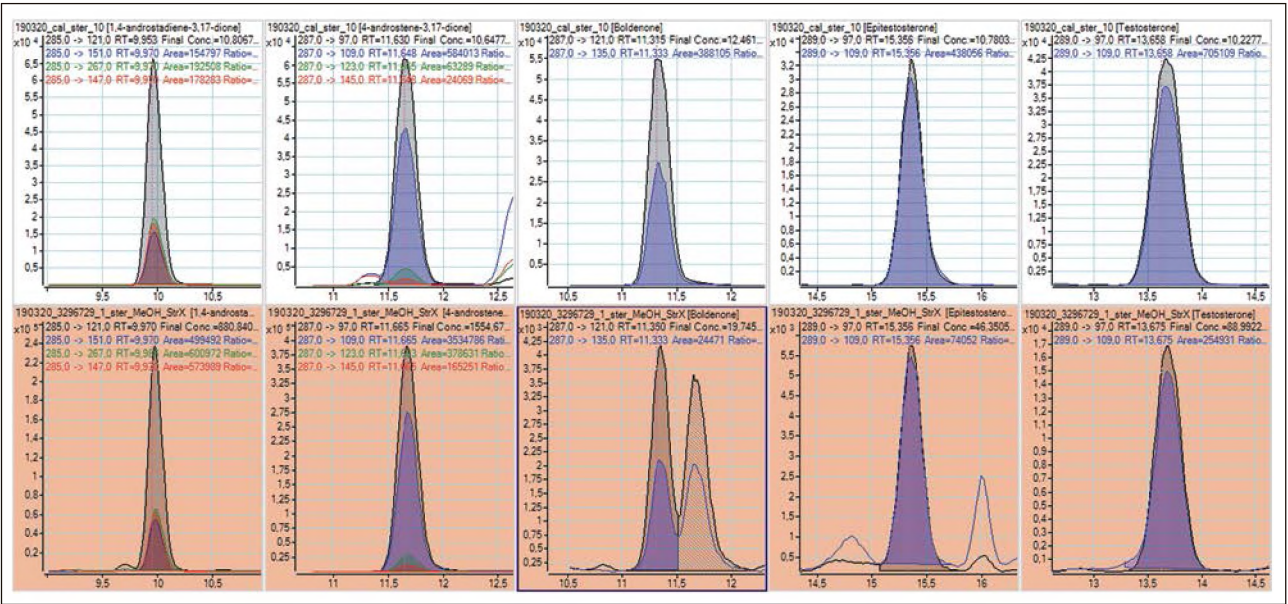
A **8. ábrán** a felső sorában látható kromatográfiás csúcsok 10 ng/g koncentrációjú standard oldathoz tartoznak. Az alsó sorban a *Salix alba* kivonat MRM kromatogramja látható. A komponensek sorrendje: 1, ADD; 2, AD; 3, B; 4, epi-T; 5, T.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az alapanyagok tiltott hatóanyagokra történő vizsgálatának eredményei rávilágítanak arra, hogy a növényi alapanyagok szennyezőként tartalmazhatnak a cikkben bemutatott anabolikus hatású anyagokat. Tapasztalatunk szerint az anabolikus hatású anyagok mellett a stimulánsok közé tartozó efedrin és származékai, valamint sztrihnin is előfordulhat a növényi alapanyagokban. A tiltott hatóanyagokat tartalmazó alapanyagokból gyártott készítmények nagy kockázatot jelentenek mind a professzionális, mind az amatőr sportolók számára. Az étrend-kiegészítőket gyártó vállalatok a vizsgálatok eredményeit felhasználhatják a megfelelő minőségű alapanyagokat gyártó cégek kiválasztásához és a késztermékek gyártásának kockázatbecsléséhez. A jó minőségű termékek gyártása és forgalmazása a gyártók, forgalmazók és a fogyasztók közös érdeke.

5. táblázat: Tiltott anyagokra pozitív *Salix alba* kivonat mérési eredményei
 Table 5: Measurement results of a *Salix alba* extract positive for prohibited substances

Tiltott hatóanyag <i>Prohibited active ingredient</i>	Koncentráció (ng/g) <i>Concentration (ng/g)</i>
ADD	850
AD	1600
B	20
epi-T	50
T	90



8. ábra: Tiltott anyagokra pozitív *Salix alba* kivonat MRM átmenetei
 Figure 8: MRM transitions of a *Salix alba* extract positive for prohibited sunstances