

## İdrarda Testosteron ve Epitestosteronun İnce Tabaka Kromatografisi ve Gaz Sıvı Kromatografisi İle Tayini\*

The Determination of Urinary Testosterone and Epitestosterone Using  
Thin-Layer Chromatography and Gas Liquid Chromatography

Nevin VURAL\*\*

Sinan SÜZEN\*\*

### ÖZET

İdrarda testosteron (T) ve epitestosteronun (E) tayini için, ince tabaka kromatografisi ile kombine basit ve duyarlı gaz kromatografik bir yöntem tanımlanmıştır. İdrardaki testosteron ve epitestosteron asit hidrolizi ve ekstraksiyondan sonra ince tabaka kromatografisi (İTK) ile ayrılmış ve elüe edilmiştir. Elüat asetillenmiş, tekrar İTK ile izole edilmiş ve iç standart ilave edilip gaz sıvı kromatografisinde (GSK) analiz edilmiştir. Bu yöntemle verim testosteron için  $\% 73.79 \pm 3.9$  ve epitestosteron için  $\% 75.94 \pm 7.9$ , duyarlılık ise  $0.05 \mu\text{g}$  olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem normal erkek ve kadın idrarları ile ilaç verilen kişilerin idrarlarına uygulanarak T E oranları saptanmıştır. Normal erkek idrarlarında bu oran  $1.96 \pm 0.62$ , normal kadın idrarlarında  $2.62 \pm 0.32$ , ilaç verilen kişilerin idrarlarında ise  $4.88 \pm 1.78$  olarak bulunmuştur. Bulgular doping kontrolü açısından değerlendirilmiştir.

### SUMMARY

A simple and accurate gas chromatographic method for the determination of testosterone (T) and epitestosterone (E) in human urine is described. Urinary testosterone and epitestosterone after acid hydrolysis and extraction, were separated by thin layer chromatography (TLC)

Redaksiyona verildiği tarih: 26.4. 1989

\* Bu çalışma A. Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 87. 30. 0012).

\*\* Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi Ankara Üniversitesi

and then eluted. The eluates acetylated, applied to TLC for further isolation and analyzed by gas liquid chromatography (GLC) by using internal standard. The recovery was found  $73.79 \pm 3.9$  % for testosterone and  $75.94 \pm 7.9$  % for epitestosterone with  $0.05 \mu\text{g}$  sensitivity. T/E ratio in urine samples of normal males, females and testosterone administered male subjects were determined by the described method. The ratios were found  $1.96 \pm 0.62$ ;  $2.62 \pm 0.32$  and  $4.88 \pm 1.78$  for males, females and testosterone administered subjects respectively. Results were discussed from the point of doping control.

**Anahtar Kelimeler** Testosteron, epitestosteron, doping kontrol, gaz kromatografisi.

Anabolik steroidler içinde yer alan testosteron ve sentetik türevleri klinikte terapötik amaçlar dışında, sporda doping amacı ile kullanılan ilaçlar arasında da yer almaktadırlar. Bu grup ilaçlar başta halterciler olmak üzere sporcular tarafından yüksek dozlarda ve uzun antrenman periyotlarında atletik performanslarını arttırmak için kullanılmaktadırlar (1).

Testosteron, sporcular tarafından son yıllarda diğer anabolik steroidlere göre daha çok suistimal edilmeğe başlanmıştır. Vücudun doğal olarak sentezlenen ürünü olan bu maddenin kullanımı, doping kontrolünde suistimalinin ispatlanamayacağı düşüncesi nedeni ile yaygınlaşmıştı (2). Ancak gerek testosteron türevleri ve gerekse diğer anabolik steroidlerin doping amacı ile suistimalinin sporcularda üreme sisteminde bozukluklara, karaciğer fonksiyon testlerinde anormalliklere, peliosis hepatis'e ve karaciğer tümörlerine neden oldukları gösterilmiştir (3,4,5,6,7). Ayrıca libidoda değişiklik, saldırganlık, kas spazmı, jinekometri, akne, huzursuzluk ve ödem gibi kişisel yan etkileri de olduğu bilinmektedir(1).

Anabolik steroidler bu yan etkileri nedeni ile 1976 yılından beri Uluslararası Olimpiyat Komitesi (IOC) tarafından sporda kullanımı yasaklanan ilaçlar arasında yer almaktadır(8).

Doğal olarak oluşan androjenlerin en önemlisi olan testosteronun (17- $\beta$ -hidroksiandrost-4-en-3-on) doku ve vücut sıvılarında tayini, kişinin androjenik durumunu belirlemede önemli bir kriterdir(9). Diğer taraftan doping amacı ile testosteron suistimalinin belirlenmesi için idrarda testosteron konsantrasyonunun tayini yanında izomeri olan

epitestosteron, (17<sup>α</sup>-hidroksiandrost-4-en-3-on) konsantrasyonunun tayini ve T/E oranının hesaplanması da gerekmektedir (2) IOC'nin kurallarına göre T/E'nin 6/1 büyük olması halinde, testosteronun doping amacı ile kullanıldığı kabul edilmektedir (10,11,12).

Doping kontrol amacı ile idrarda testosteron ve epitestosteron analizi için, konjugatlarının enzim veya asit hidrolizinden sonra izolasyonları, kantitatif tayinleri ile ilgili kağıt, kolon, ince tabaka kromatografisi (İTK) ile gaz kromatografisi (GK), kütle spektrometresi (MS), radyoimmünosay (RIA) veya bu yöntemlerin kombinasyonları gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır (11,13,14,15,16). Bu yöntemlerin, IOC tarafından tescil edilebilmesi için yeterli derecede duyarlı, tekrarlanabilen, spesifik ve kesin olması gerekmektedir(17).

Ülkemizde, anabolik steroidler arasında önemli bir yeri olan testosteron ve epitestosteronun biyolojik sınırlarda tayini ile ilgili fazla bir çalışma yoktur. Bu araştırmada idrarda testosteron tayini için gerek doping ve gerekse klinik uygulamada kullanılacak bir yöntem geliştirilmesi amaç edinilmiştir. Testosteron ve epitestosteron asit hidrolizden sonra İTK ile saflaştırılmış, GSK'da türevleme yöntemi ile tayin edilmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği normal kişilerle, ilaç alan kişilerin idrar örneklerinin analizi yapılarak gösterilmiştir.

## DENEL KISIM

### Materyal

Testosteron (Organon), epitestosteron (Sigma), metiltestosteron (Sigma), asetik asit anhidriti (Merck), Sülfirik asit (Merck), β-Glukuronidaz (Sigma).

Kullanılan Aletler: İTK takımı (Desega), mor ötesi ışın lambası (254-366 nm Camag) Rotary vakum evaporatörü, Gaz Kromatograf (Packard-Becker model 419) ve alev iyonlaşma detektörü (FID-Model 706).

Kullanılan Biyolojik Materyal: Çalışmamızda biyolojik materyal olarak idrar kullanılmıştır. Yöntemin standardizasyonu için sabahleyin alınan (spot) idrar örnekleri hiç ilaç almamış kişilerden seçilmiştir. Testosteron ve epitestosteronun kantitatif analizinde yaşları 21-32 arasında değişen 5 kadın ve yaşları 22-34 arasında değişen 5 erkek-

ten sabah alınan idrarlarla çalışılmıştır. Ayrıca ilaç alan (Sustanon 250) kişilerin idrarları da aynı şekilde analiz edilmiştir.

## Metod

A- Testosteronun İdrardan İzolasyonu. Her iki steroid glukuronidat ve sülfat konjugatları halinde atıldıklarından hidrolizleri için asit hidroliz ve enzim hidroliz yöntemleri kullanılmıştır.

1- Asit Hidroliz Yöntemi: Testosteron ve epitestosteron konjugatlarının hidroliz ve ekstraksiyonunda GOTO ve FEHER'in yöntemleri ile IBAYASHI'nin yöntemi kombine edilerek uygulanmıştır (18, 19, 20, 21). 100 ml idrar, üzerine 0.5 ml formaldehit, 60 ml benzen ve 1 ml sülfürik asit ilave edilerek 2 saat 80-85°C'de geri çeviren soğutucu altında tutulmuştur. Benzen fazı ayrıldıktan sonra, idrar fazına 60 ml benzen ve 15 ml sülfürik asit ilave edilerek aynı şartlarda 20 dk. tutulmuştur. Tekrar benzen fazı alınarak, idrar son kez 60 ml benzen ile ekstrakte edilmiştir. Tüm benzen fazları birleştirilerek 2 kez 40 ml % 20 NaOH ve distile su ile yıkanmıştır. Benzen fazı susuz sodyum sülfatdan geçirildikten sonra uçurulmuştur (18, 19, 20). Daha sonra kalıntı Kieselgel HF<sub>254</sub> ile kaplı plaklara standart testosteron ve epitestosteron ile beraber uygulanmıştır. Hareketli faz olarak benzen-etilasetat (1:1) kullanılmıştır. Plaklar developpe edildikten sonra 254 nm'de UV lambası altında standart testosteron ve epitestosterona karşılık gelen lekeler metanol ile elüe edilmiştir. Metanol azot gazı altında uçurulduktan sonra Kieselgel HF<sub>254</sub> ile kaplı plaklara standart testosteron asetat ve epitestosteron asetat ile beraber uygulanmıştır. Benzen-etilasetat (3:1) ile developpe edildikten sonra 254 nm'de UV lambası altında standartlara karşılık gelen lekeler metanol ile elüe edilip daha sonra metanol uçurulmuştur(21). Kalıntıya iç standart olarak metiltestosteron ilave edilerek 5 µl gaz kromatografisine verilmiştir.

2- Enzim ile Hidroliz:Enzim ile hidrolizde β-Glukuronidaz (130.000 ünite /ml) kullanılmıştır. 100 ml idrar pH'sı 5'e ayarlandıktan sonra enzim ilave edilerek 55°C de 2.5 saat inkübe edilmiştir.(22). Soğuduktan sonra 3 kez 100 ml eter ile ekstrakte edildikten sonra eterli faz % 20 NaOH ve distile su ile yıkanıp susuz sodyum sülfatdan geçirilmiştir (15, 18). Eter fazı kuruluğa kadar uçurulduktan sonra kalıntıya aynen asit hidrolizdeki işlemler uygulanmış ve en son kalıntıya iç stan-

dart olarak metiltestosteron ilave edilip gaz kromatografisine 5 µl enjekte edilmiştir.

B- Gaz-Sıvı Kromatografisine Ait Çalışmalar: Testosteron asetat ve epitestosteron asetatın kantitatif tayini için gaz-sıvı kromatografisinde sabit faz olarak % 3 SE-30 "Chromosorb WHP 80-100 mesh üzerinde" ve detektör olarak FID kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 260 C. enjeksiyon giriş sıcaklığı 280°C, detektör sıcaklığı 300°C, taşıyıcı gaz (azot) akış hızı 30 ml /dk., hidrojen akış hızı 50 ml /dk., hava akış hızı 300 ml /dk., kaydedici hızı 0.5 cm/dk ve attenuation 8 alınarak bu kromatografik şartlarda kantitatif tayine geçilmiştir. 5 µl numune ile çalışılmıştır.

C- Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi: Standart testosteron asetat (mg /ml) ve epitestosteron asetat (mg /ml) çözeltileri, 10 µg /ml, 25 µg /ml, 50 µg /ml, 75 µg /ml ve 100 µg /ml konsantrasyonda olmak üzere kloroformla seyreltildi. Bunların hazırlanması sırasında iç standart olarak kullanılan metiltestosteron 50 µg /ml konsantrasyonda olmak üzere ilave edilerek birlikte hazırlandı. Hazırlanan seri çözeltilerden 5 µl çekilip gaz kromatografisine verildi. Pik yükseklikleri oranları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi.

D- Ekstraksiyon Veriminin Hesaplanması: Testosteron ve epitestosteron idrarda normal olarak atıldığı için her maddenin ekstraksiyon verimi standart katma yöntemi uygulanarak hesaplanmıştır. Bu amaçla kadın idrarından yararlanılmıştır. Bu maddelerin ekstraksiyon verimi gaz-sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak yapılmıştır(21).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda benzen ve eter ekstraktlarının safra asitleri ve diğer asidik veya fenolik bileşiklerden uzaklaştırılması için % 20 NaOH ile yıkanmıştır (18,21). Testosteron ve epitestosteronun saflaştırılması ve diğer steroidlerden ayrılması içinde ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır.

Gaz-sıvı kromatografisinde % 3 SE-30, yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklılığı ve steroidlerin daha iyi ayrılmasını sağladığından seçilmiştir (23, 24). Testosteron ve epitestosteron gaz kromatografisine doğrudan verildiklerinde SE-30 fazında iyi bir şekilde ayrılmaları mümkün olmamıştır. Bu nedenle her iki steroid de 17. karbon atomundaki

hidroksil grubundan asetillenmiştir. Oluşan testosteron asetat ve epitestosteron asetat türevleri laboratuvar koşullarında uzun süre dayanıklıdır ve gaz sıvı kromatografisinin yüksek sıcaklıktaki çalışma koşullarına uygundur (14,15). Böylece testosteron asetat ve epitestosteron asetatın SE-30 sabit fazında alıkonma zamanları daha uzun ve farklı olmuştur. Bu farklılık, birbirlerinden ayrılmalarını ve ayrı pikler elde etmemizi mümkün kılmıştır. Ayrıca asetilleme ile duyarlılık artırılmıştır. Testosteron ve epitestosteron ile doğrudan çalışıldığında 0.2 µg madde tanımlanabilmesine karşın asetillemeden sonra 0.05 µg madde düzeyine inilebilmiştir. Elde ettiğimiz duyarlılık sınırı bu konudaki araştırmalarla uyum göstermektedir (15, 23). Şekil-1'de testosteron asetat ve epitestosteron asetat standartlarının gaz-sıvı kromatografisindeki kromatogramları gösterilmiştir.

Asit hidroliz yöntemi ile idrardan benzen ekstraksiyon verimi, kadın idrarına standart testosteron ve epitestosteron çözeltilerinden ilave edilerek hesaplanmıştır. Elde edilen testosteron ve epitestosteron yüzdeleri tablo -1'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre testosteron için ortalama verim % 73.39 ± 3.9 (S.D.) ve epitestosteron için ortalama verim % 75.94 ± 7.9 (S.D.) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların gaz kromatografisi ile elde ettikleri ortalama yüzde verime yakındır (14,15) (Regresyon denklemleri testosteron asetat için,  $y = 2.42x - 0.03$ ; epitestosteron asetat için,  $y = 3.03x + 0.04$ , bulunarak kantitatif değerlendirme yapılmıştır).

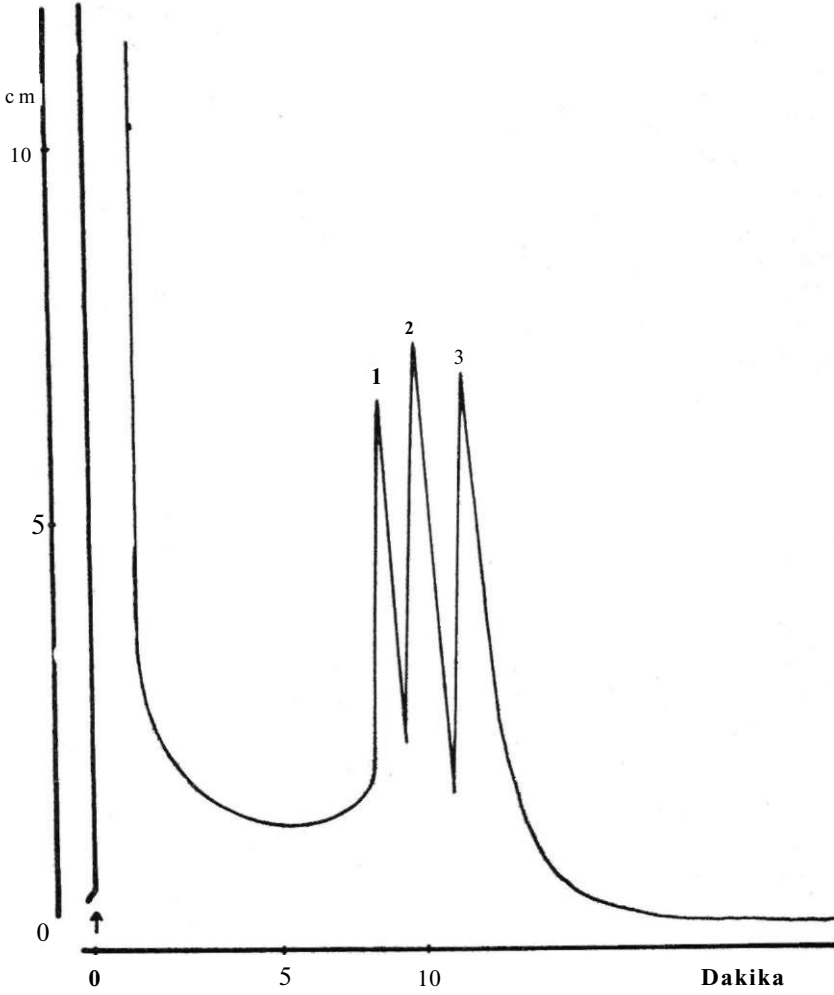
Enzim hidroliz yönteminde sonucun daha çabuk alınması nedeniyle idrar 55°C'de 2.5 saat inkübe edilmiştir (22). Asit hidroliz ve en-

**Tablo 1. Testosteron ve epitestosteronun asit hidroliz ve benzen ekstraksiyon verimi**

| İdrara (100 ml) katıları T ve E miktarı (µg) | Elde edilen T miktarı (µg) | Elde edilen E miktarı (µg) | % Verim |       |
|--|----------------------------|----------------------------|---------|-------|
|  |                            |                            | T       | E     |
| 75   | 60.27                      | 51.45                      | 80.36   | 68.60 |
| 75   | 56.71                      | 52.66                      | 75.62   | 70.22 |
| 100  | 71.30                      | 76.05                      | 71.30   | 76.05 |
| 100  | 74.07                      | 72.11                      | 74.07   | 72.11 |
| 125  | 86.02                      | 97.87                      | 68.82   | 78.30 |
| 125  | 90.75                      | 112.89                     | 72.60   | 90.37 |

Ortalama verim T: 73.79 ± 3.9

(x ± S.D.) E: 75.94 ± 7.9



**Şekil 1.** Testosteron asetat, epitestosteron asetat ve metiltestosteron standartlarının gaz-sıvı kromatografisindeki kromatogramları 1-Metiltestosteron (0.5 µg) 2- Epitestosteron asetat (0.5 µg) 3. Testosteron asetat (0.5 µg).

zim hidrolizi aynı idrar örneklerine uygulanarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre gerek testosteron ve gerekse epitestosteronda elde edilen verim enzim hidrolizi yöntemiyle daha düşük bulunmuştur (ortalama % 15). Böylece asit hidroliz yöntemi de hem verimin

daha yüksek olması ve hem de çok daha ekonomik olması sebebiyle tercih edilebilir.

Metodun uygulanabilirliği açısından 5 kadın ve 5 erkek idrarında testosteron ve epitestosteron miktarları saptanmıştır. Normal kişilerden alınan idrarlarda asit hidroliz ve benzen ekstraksiyonundan sonra saflaştırılıp, türevlenen testosteron ve epitestosteron miktarları tablo-2'de yer almaktadır. Şekil-2'de de erkek idrarındaki testosteron ve epitestosteron'un gaz-sıvı kromatografisindeki kromatogramı gösterilmiştir. Ayrıca olayı doping açısından değerlendirmek için testosteron / epitestosteron (T/E) oranları da belirlenmiştir. Tablo-2'ye dikkat edildiğinde T /E arasındaki oranlarının normal erkeklerde  $1.96 \pm 0.62$  (S.D.) ve kadınlarda ise  $2.62 \pm 0.32$  (S.D.) olduğu görülmektedir.

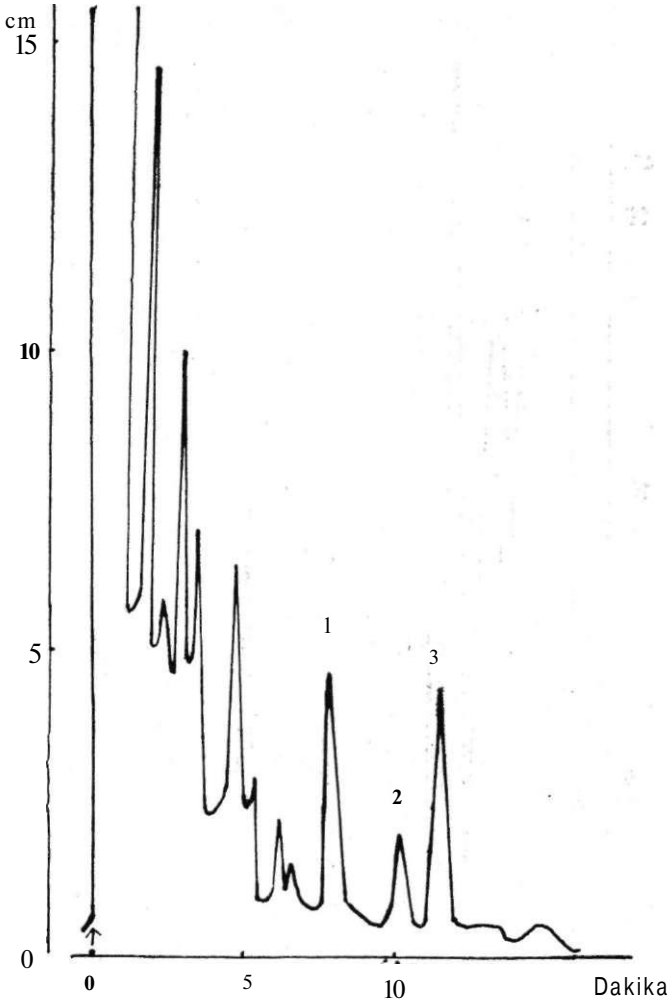
**Tablo 2. Deneme şahıslarında saptanan testosteron ve epitestosteron miktarları ( $\mu\text{g}/100$  ml) ve testosteron /epitestosteron oranları**

| Cinsiyet     | T               | E               | T/E             |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| K            | 0.51            | 0.19            | 2.6             |
| K            | 0.74            | 0.25            | 2.9             |
| K            | 0.35            | 0.15            | 2.3             |
| K            | 0.66            | 0.28            | 2.3             |
| K            | 0.30            | 0.10            | 3.0             |
| x $\pm$ S.D. | 0.51 $\pm$ 0.19 | 0.19 $\pm$ 0.07 | 2.62 $\pm$ 0.32 |
| E            | 2.39            | 0.85            | 2.8             |
| E            | 3.21            | 1.80            | 1.7             |
| E            | 1.72            | 0.80            | 2.1             |
| E            | 1.98            | 0.94            | 2.1             |
| E            | 2.74            | 2.30            | 1.1             |
| x $\pm$ S.D. | 2.40 $\pm$ 0.59 | 1.33 $\pm$ 0.67 | 1.96 $\pm$ 0.62 |

**Tablo3. İlaç verilen kişilerde saptanan testosteron ve epitestosteron miktarları ( $\mu\text{g}/100$  ml) ve testosteron/epitestosteron oranları**

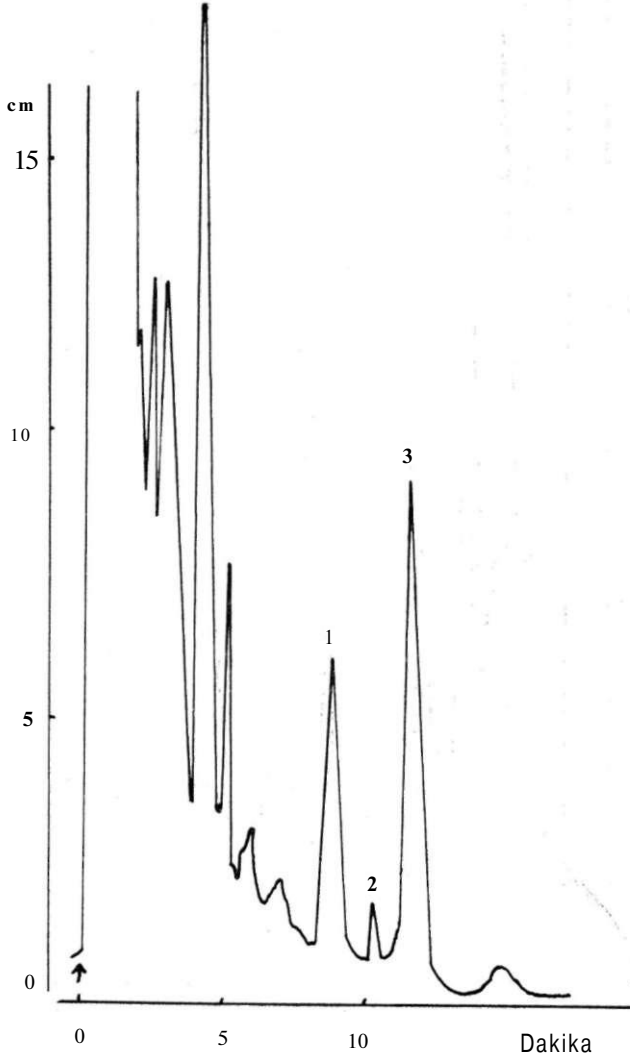
| T                        | E                          | T/E                        |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 2.59                     | 0.84                       | 3.08                       |
| 6.12                     | 0.94                       | 6.80                       |
| 5.22                     | 1.21                       | 4.30                       |
| 4.18                     | 1.02                       | 4.09                       |
| 4.18                     | 1.02                       | 4.09                       |
| 8.65                     | 1.10                       | 7.86                       |
| 4.04                     | 1.21                       | 3.34                       |
| 10.80                    | 2.29                       | 4.71                       |
| x = 5.94 $\pm$ 87 (S.D.) | x = 1.23 $\pm$ 0.48 (S.D.) | x = 4.88 $\pm$ 1.78 (S.D.) |





Şekil 2. Erkek idrarından elde edilen ekstraktın gaz-sıvı kromatografisindeki kromatogramı- 1- Metiltestosteron 2- Epitestosteron asetat 3- Testosteron asetat

Testosteron türevi ilaç (Sustanon 250) kullanan hastalardan alınan örneklerde saptanan T/E oranları ise tablo-3'de yer almaktadır. Şekil-3'de de ilaç kullanan bir erkek idrarından elde edilen ekstraktın gaz sıvı kromatografisindeki kromatogramı yer almaktadır. Bu oranın normal insanlardaki T/E oranına göre dışardan testosteron alın-



**Şekil 3. İlaç kullanan bir erkek idrarından elde edilen ekstraktın gaz-sıvı kromatografisindeki kromatogramı 1- Metiltestosteron 2- Epitestosteron asetat 3- Testosteron asetat**

masıyla arttığı görülmektedir. Bu yüzden Uluslararası Olimpiyat Komitesi (IOC) bu oranı 6 olarak belirlemiştir. Dışardan testosteron türevi bir ilaç alan sporcunun idrarında T/E oranı 6'nın üzerinde çıktığında IOC bu sporcuju dopingli olarak kabul etmekte ve yarışmalardan diskalifiye ederek ceza uygulamasına geçmektedir (12, 17).

Normal erkek ve ilaç almış erkek idrarlarındaki testosteron, epitestosteron ve T/E oranları istatistik açıdan karşılaştırıldığında, her iki grup arasında epitestosteron atılımında fark olmadığı halde, testosteron ve T/E oranları ilaç alanlarda anlamlı yüksek bulunmuştur.

İdrarla atılan testosteron ve epitestosteronun ince tabaka kromatografisi kullanılarak kantitatif tayininin yapıldığı bu metod, spesifik ve güvenilir olması yanında ekonomik, hızlı ve nispeten basit bir metoddur. Ayrıca yalnız sporcudaki testosteron/epitestosteron oranının saptanması dışında endokrin bozukluklarının sebep olduğu hastalıklarda laboratuvar testi olarak da uygulanabilir.

#### LİTERATÜR

1. Haupt, H.A., Rovere, G.D., Anabolic-Steroids: A review of the literature, *The Am. J. Sports Med.*, 12, 469-84 (1984).
2. Zurer, P.S., Diugs in Spoit, *Chem. Eng. News*, 30, 69-78 (1984)
3. Naeim, F., Copper, P.H., Peliosis Hepatis: Possible Etiologic Role of Anabolic Steroids, *Arch. Pathol.*, 95, 284-5 (1973).
4. Faik, H., Thomas, L.B., Popper, H., Hepatic angiosarcome associated with androgenic-anabolicsteroids, *Lancet*, 2, 1120-21 (1979).
5. Johnson, F.L., Feagler, J.R., Association of Androgenic-Anabolic Steroid Therapy With Development of Hepatocellular Carcinoma, *Lancet*, 2, 1273-76 (3972).
6. Hoima, P.K., Effect of anabolic steroid on spermatogenesis, *Contraception*, 15, 151-62 (1977).
7. Hagerman. F.C., Jones-Witters, P., The effects of anabolic steroid ingestion on serum enzyme and urine 17-ketosteroid levels, *J. Sport. Med.*, 15, 287-795 (1975).
8. Akgün, Necati, Olimpiyatlarda Doping Kontrolunda Prensip ve Özel Problemler, *Spor Hekimliği Dergisi*, 14, 15-25 (1979).
9. Goodman, L.S., Gillman, A., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 5 th ed., New York, Macmillan Publishing (1975).
10. Wagner, J.C., Substance-abuse Policies and Guidelines in Amateur and Professional Athletics, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 44, 305-10 (1987).

11. Leinonen, A., Kuoppasalmi, M., Dopinganeiden Laboratoria-analysit, *Kemia-Kemi*, 12, 407-12 (1985).
12. Oseid, S., Doping and Athletes-Prevention and Counseling, J., *Allergy Clin. Immunol.*, 73, 735-739 (1984).
13. Brooks, R.V., Jeremiah, G., Detection of Anabolic Steroid Administration to Athletes, *J. Steroid Biochem.*, 11, 913-17 (1979).
14. Watson, J.T., A Simplified Determination of Urinary Testosterone Utilizing Column and Gas-Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 43, 339-49 (1969).
15. Luisi, M., Fassorra, C, Levanti, C, Determination of Testosterone in Human Urine by Means of Horizontal Thin-Layer and Gas - Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 58, 213-226 (1971).
16. Cartoni, G.P., Giraruso, A., Ciard, M., Capillary Gas Chromatography and Mass Spectrometry Detection of Anabolic Steroids II, *Journal of High Resolution Chromatography - Chromatography Communications*, 8, 539-543 (1985).
17. Donike, M., List of Doping Classes and Methods, Beauftragter Fur Dopinganalytik Des Bundesinstituts Fur Sportwissenschaft, (1986).
18. Goto, H., Takenaka, I., Estimation of Testosterone in Human Urine, I. Analysis of Urinary Testosterone by Gas-Liquid Chromatography with Hydrolysis Using Acid in Normal Adult Men, *Nishi Nippon Hinyokika*, 37, 53-58 (1975).
19. Feher, T., Testosterone in Human Urine as Determined by Gas-Liquid Chromatography, *Endocrinologia Experimentalis*, 10, 201-209 (1976).
20. Bodrogi, L., Hollosi, I., Pucsok, J., Feher, T., Isolation, Quantitative Determination of Anabolics in Human Urine by GC-FID or GC-ECD, and their Identification by GC-MS, *Prof. of the Symp. on the Analysis of Steroids*, Szeged, Hungary, 287-293, (1984).
21. Ibayashi, H., Nakamura, M., The Determination of Urinary Testosterone Using Thin-Layer Chromatography and Gas Chromatography, *Steroids*, 3, 559-568 (1964).
22. Uralets, V.P., Semenova, V.A., Analysis of Anabolic Steroids in Body Fluids by Capillary Gas Chromatography with Two-Channel Detection System and a Computer, *J. Chromatogr.*, 279, 695-707 (1982).
23. Charransonl, G., Bobas-Masson, F., Determination of Urinary Androstanediol and Testosterone in Normal Men by Gas-Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 66, 55-61 (1972).
24. Pinelli, A., Nair, P.P., Gas-Liquid Chromatographic Separation of Steroids and Their Derivatives on a Dual Component Column of High thermal Stability, *J. Chromatogr.*, 43, 3223-8 (1969).