

Validación de un método para la determinación de 19-norandrosterona en orina humana por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas de Trampa de Iones

Juan Francisco Sánchez Bruzón, Rodny Montes de Oca Porto, Mirta Torres Castellanos, Roberto Oropesa Rodríguez y Mario José Granda Fraga.

Instituto de Medicina del Deporte, Laboratorio Antidoping, Calle 100 y Aldabó, Ciudad de La Habana, C.P. 10800, Cuba.

Recibido: 12 de marzo de 2003. Aceptado: 23 de septiembre de 2003.

Palabras clave: 19-norandrosterona, tandem EM-EM, validación, control antidopaje.
Key words: 19-norandrosterone, tandem MS/MS, validation, antidoping control.

RESUMEN. El consumo de nandrolona rinde en el humano tres metabolitos fundamentalmente, 19-norandrosterona (19-NA), 19-noreticolanolona (19-NE) y 19-norepiandrosterona. Estudios recientes han demostrado la producción endógena de 19-NA a niveles de concentración muy cercana al límite de corte establecido por el Comité Olímpico Internacional, es decir de 2 ng/mL para los hombres y de 5 ng/mL para las mujeres. El metabolito marcador del consumo de ese esteroide es la 19-NA. El presente trabajo trata de la validación cualitativa de un método analítico para su determinación con metiltestosterona como patrón interno que emplea un paso de extracción en fase sólida con columnas Detectabuse™, seguida de una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa de *E. coli*, extracción líquido-líquido, derivatización con *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) para obtener el bis-trimetilsilil derivado de la 19-NA (19-NA bis-O-TMS) y análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en tandem (CG-EM-EM) utilizando un espectrómetro de masas de trampa de iones. Se utilizó una columna capilar Ultra HP-1 (20 m X 0,20 mm X 0,11 μ m), con un programa de temperatura que va desde 181 °C (por 1 min), hasta 210 °C (10 °C/min), entonces hasta 310 °C (20 °C/min), manteniéndose en esa temperatura durante 2 min. El modo de adquisición fue EM-EM con ionización por impacto electrónico seguido de disociación mediante colisión inducida con helio. Se utilizó como ion precursor para la 19-NA bis-O-TMS, el ion de *m/z* 405, adquiriendo como iones hijos los de *m/z* 315 y 225 y para el patrón interno (metiltestosterona) el ion precursor fue el de *m/z* 446, adquiriendo el de *m/z* 356 como ion hijo. Se presentan los resultados de la validación del método analítico. Esta técnica demostró ser una herramienta excelente para la determinación de bajas concentraciones 19-NA en muestras de orina. El límite de detección fue de 0,05 ng/mL y la recuperación del método analítico fue del 92 % para la 19-NA y del 77 % para el patrón interno (metiltestosterona).

ABSTRACT. Nandrolone consumption gives in humans three main metabolites, 19-norandrosterone (19-NA), 19-noreticolanolone (19-NE) and 19-norepiandrosterone. Recent studies demonstrated the endogenous production of these compounds in man at concentrations very close to the threshold of the International Olympic Committee, this means 2 ng/mL for men and 5 ng/mL for women. The Target metabolite to diagnostic consumption is 19-NA. This paper deals with the qualitative validation of analytical method for 19-NA determination in human urine with methyltestosterone as internal standard, using a solid phase extraction procedure with Detectabuse™ cartridges, enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase from *E. Coli*, liquid-liquid extraction, derivatization with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) to obtain the 19-NA trimethylsilyl derivative (19-NA bis-O-TMS) and analysis by gas chromatography couple with tandem mass spectrometry (GC-MS-MS), using an ion trap mass spectrometer.

Ultra HP-1 capillary column was used (20 m x 0.20 mm X 0.11 μ m), operated with temperature programming ranging from 181 °C (held for 1 min), to 210 °C (10 °C/min), then to 310 (20 °C/min) held for 2 min. The acquisition mode was MS/MS with ionization by electronic impact and helium collision induced dissociation using as parent ion for 19-NA bis-O-TMS the ion with *m/z* 405, monitoring the daughter ions *m/z* 315 and *m/z* 225, and the parent ion for the internal standard (methyltestosterone) was the ion with *m/z* 446, monitoring as daughter ion with *m/z* 356. Detailed results of the method validation are shown. This technique has been demonstrated to be an excellent tool for 19-NA detection in urine samples at very low concentrations. Detection limit for 19-NA was 0.05 ng/mL. The recovery for 19-NA was of 92.1 and 77 % for the internal standard methyltestosterone.

INTRODUCCION

Los 19-norandrógenos son sustancias que pueden ser clasificadas dentro de dos grupos, los 17 α -desalquil-19-norandrógenos y los 17 α -alquil-19-norandrógenos. Dentro del primer grupo los más importantes son la nandrolona (conocida como 19-nortestosterona), 19-nor-4-androstendiona, 19-nor-5-androstendiona y 19-nor-5-androstendiol, estos últimos denominados precursores de hormonas o pro hormonas.¹

La nandrolona o 19 nortestosterona (17 β -hidroxi-19-nor-4-andros-

ten-3-ona) (Fig. 1), es un clásico agente androgénico anabólico sintetizado por primer vez en 1950 y utilizado desde entonces en la práctica médica en estados que provoquen debilitamiento, en el tratamiento de anemias, osteoporosis o en el cáncer de mama, además, se usa en el tratamiento tópico en Oftalmología en ciertas patologías.

La nandrolona está disponible en preparaciones farmacéuticas como 17β-hidroxi éster de nandrolona en una matriz oleosa o en disoluciones acuosas en forma de sal de nandrolona.² Los ésteres de nandrolona (decanoato y fenilpropionato) son generalmente la forma más usada de este esteroide. La inyección intramuscular es la vía más utilizada cuando se quieren obtener los efectos anabólicos esperados. En este caso, la excreción de los metabolitos es muy lenta. De acuerdo con un reporte de Le Bizet y col., después de la inyección de 25 mg de éster de nandrolona, los metabolitos fueron detectados al menos después de 7 semanas del consumo.³

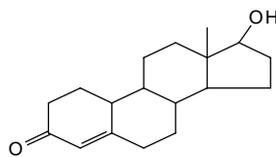


Fig. 1. Estructura de la nandrolona (19-nortestosterona).

La 19-nortestosterona ha sido utilizada en los últimos 30 años para mejorar el rendimiento físico en caballos de carrera y en atletas, a pesar de que el Comité Olímpico Internacional (COI) prohibió su uso en el deporte desde 1976. EL efecto que se busca con el consumo de esta sustancia es fundamentalmente la aceleración en el crecimiento muscular debido a su efecto anabólico. Además, aumenta la fortaleza, incrementa la agresividad y disminuye el tiempo de recuperación, por citar algunos de los llamados efectos positivos que se buscan con su consumo.

La nandrolona puede ser también consumida en humanos por vía

oral o como se señaló mediante inyección intramuscular, en ambos casos se podrán encontrar fundamentalmente tres metabolitos en la orina: la 19-norandrosterona (NA, 3α-hidroxi-5α-oestran-17-ona), 19-noreticolanolona (NE, 3α-hidroxi-5β-oestran-17-ona) y la 19-norepiandrosterona (NEA, 3β-hidroxi-5α-oestran-17-ona) (Fig. 2) Estos metabolitos son isómeros, por lo tanto, tienen la misma composición química y masa molecular, pero diferente estructura química. La 19-norandrosterona (19-NA) es el metabolito más abundante en la orina cuando se consume dicha sustancia, de modo que es considerado el marcador del consumo de nandrolona en atletas.⁴

En 1998 el COI estableció concentraciones de corte para la 19-NA en orina por debajo de las cuales los análisis se declararían como negativos, armonizando para todos los laboratorios de control *antidoping* criterios analíticos para reportar bajas concentraciones de este esteroide.⁵ Se definió que concentraciones ma-

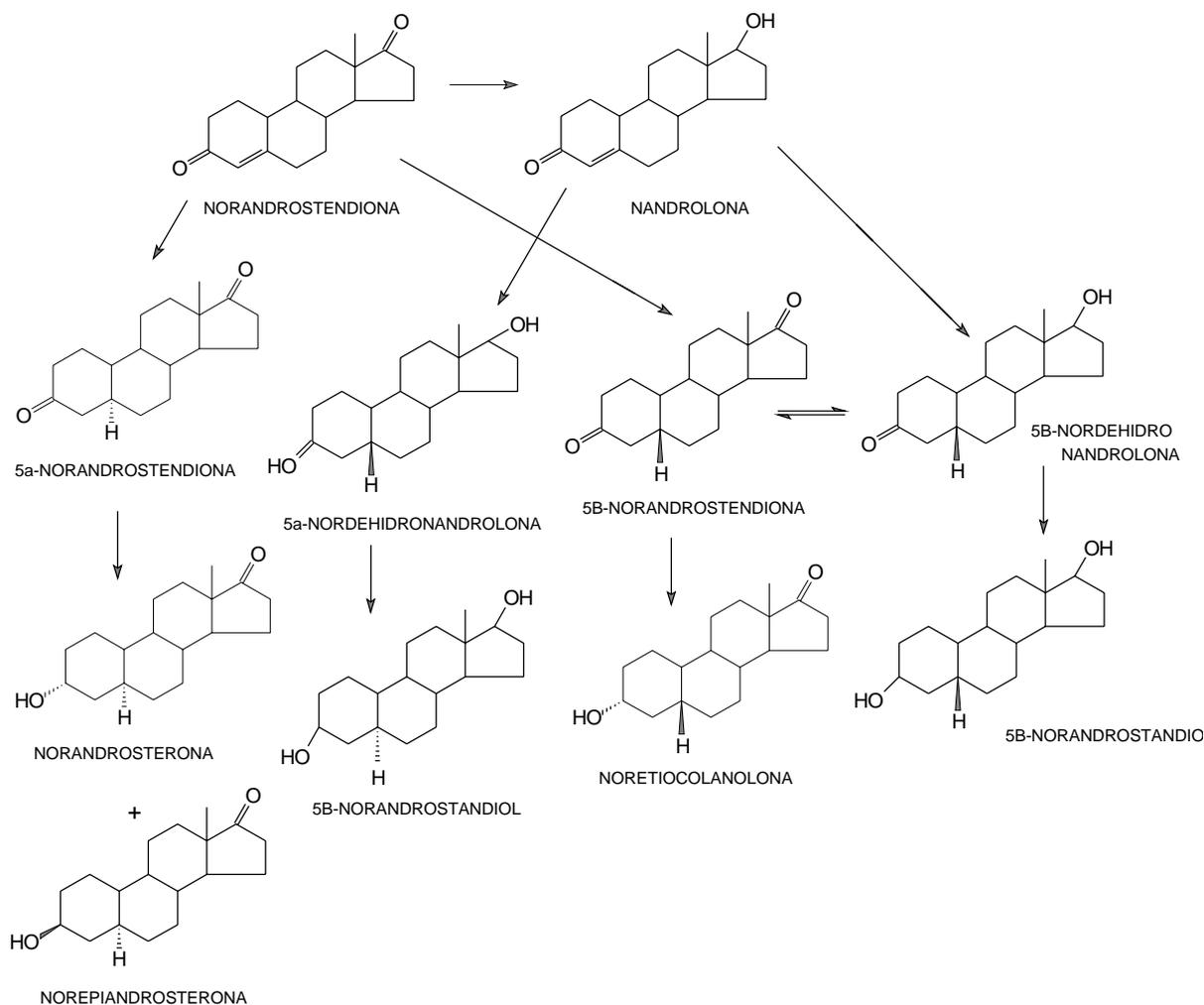


Fig. 2. Metabolismo de la nandrolona en humanos.

yores de 2 ng/mL para los hombres y 5 ng/mL para las mujeres serían consideradas como positivas y tributarias de una posible sanción en el caso de los atletas. Esta decisión se basó en el hecho de que se demostraron condiciones fisiológicas normales en las cuales podrían existir concentraciones endógenas de metabolitos de nandrolona en orina humana, pero nunca excederían de los valores antes mencionados.⁶⁻¹⁰

De modo que el origen de los metabolitos de nandrolona en orina humana no relacionada con un consumo voluntario se ha tratado de explicar de las formas siguientes:

1. Una producción de metabolitos de nandrolona endógena similar a la que tiene lugar durante el embarazo.^{11,12}
2. Un consumo exógeno de nandrolona o de precursores a través de alimentos, que se liberarían de los tejidos grasos al torrente sanguíneo solo después de un ejercicio físico intenso.
3. Un consumo exógeno de nandrolona o de precursores a través de la ingestión de suplementos nutricionales que los contengan.¹³

En primer término, es importante considerar el consumo de alimentos especialmente carnes procedentes de animales que fueron alimentados con suplementos que contenían esteroides. Al respecto, Le Bizec y col. informaron tres casos que presentaron concentraciones sobre los 2 ng/mL de 19-NA en orina después de haber consumido 310 g de carne de cerdo, los cuales volvieron a la normalidad después de 48 h del consumo.¹⁴

Por otro lado, un hallazgo significativo es que desde hace tres años hubo un incremento súbito de atletas declarados positivos a metabolitos de nandrolona. El COI reportó solo en el año 1999 unos 343 casos positivos a metabolitos de nandrolona y más de 250 casos el año anterior. Muchos de estos casos ocurrieron en Europa, solo en Gran Bretaña se presentaron 17 casos en 1999.¹⁵

Varios atletas han hecho reclamaciones, alegando que algunos suplementos dietéticos podrían haber estado contaminados. Esto constituye la hipótesis en virtud de la cual, algunos suplementos nutricionales podrían contener trazas de esteroides o pro hormonas que no están declaradas en el rótulo. De hecho, varios estudios han demostrado que los suplementos nutricionales no siempre contienen declarado en el rótulo todos sus ingredientes.¹⁶⁻¹⁸

Es conocido que desde 1997 salieron al mercado suplementos nutricionales conteniendo pro hormonas precursoras de testosterona y de 19-nortestosterona, las cuales están también prohibidas en el deporte bajo la cláusula de "sustancias relacionadas" por definición del COI. Uralets y col. en estudios de excreción realizados en humanos, demostraron que después de una dosis de solo 50 mg de estas pro hormonas, se detectan metabolitos de nandrolona después de 7 a 10 d del consumo.^{19,20}

Recientemente en un estudio llevado a cabo por el Laboratorio Antidoping de Los Ángeles se demostró también que la ingestión de un suplemento con trazas de 19-norandrostendiona produjo un resultado positivo para la 19-NA después de 2 a 4 h de su uso en más del 80 % de los individuos.²¹ Los autores respectivos sugirieron que la mayor cantidad de casos positivos a 19-NA son debido a suplementos contaminados con androstendiona y que esta constituye otra fuente de aparición de metabolitos de nandrolona en orina humana y se explica por la formación de estrógenos a partir de andrógenos por acción de la enzima aromatasas (estrógeno sintetasa). Todos los andrógenos aromatizables como la androstendiona podrían experimentar una desmetilación en el carbono 19 y formar los correspondientes 19-noresteroides.²²⁻²⁴

Por otra parte, Geyer y col. llamaron la atención sobre el cuidado que debe tenerse cuando se utilizan suplementos nutricionales sin el control de la calidad correspondiente, en cuanto a si contienen pro hormonas. Ellos demostraron que 15 de 18 suplementos nutricionales contenían trazas de precursores de nandrolona y tales suplementos fueron vendidos en países tales como Alemania, Suecia, Bélgica, Israel, Austria, Estados Unidos e Inglaterra.²⁵

La necesidad de un procedimiento eficiente para el control del dopaje de esteroides anabólicos tuvo un fuerte ímpetu para el desarrollo de técnicas analíticas capaces de detectar trazas de esteroides tanto en sangre como en orina. Con respecto a esto, la Cromatografía de gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM) ha sido la técnica de elección para realizar análisis de metabolitos de nandrolona en fluidos biológicos.

Existen muchos reportes relacionados con la detección de metabolitos de nandrolona en orina humana,

la mayoría de los cuales involucra un paso de extracción en fase sólida, hidrólisis enzimática, extracción líquido-líquido con n-pentano o tert-butilmetileter, seguido de un procedimiento de derivatización con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), para obtener los bis-trimetilsilil derivados de la 19-NA y 19-noreticolanolona, los cuales son analizados por CG-EM usando el impacto electrónico a 70 eV como modo de ionización.^{3,9,26-28}

La Espectrometría de Masas en Tándem (EM-EM) cada día adquiere más popularidad como una valiosa técnica analítica, sobre todo, cuando se pretende analizar determinados compuestos en matrices complejas. Muchos de los componentes presentes en la orina son esteroides endógenos en un amplio intervalo de concentraciones, que durante el procesamiento de las muestras son extraídos junto con los analitos de interés e introducidos en el sistema cromatográfico. Como resultado, estas sustancias que coeluyen deforman los picos cromatográficos así como distorsionan los espectros de masas. Esta técnica permite la eliminación de estas interferencias, con el consiguiente incremento en la selectividad y sensibilidad en los análisis.^{29,30}

Se han reportado en los últimos años varios métodos analíticos para la determinación de esteroides anabólicos en muestras de orina utilizando la EM-EM, específicamente, con el uso de espectrómetros de masas de trampa de iones. Estas técnicas permiten la detección simultánea de varios esteroides entre los cuales se incluyen los metabolitos de nandrolona, aunque también se pueden encontrar métodos específicos para la detección de dichos metabolitos.³¹⁻³³

El uso de la EM-EM en el control del dopaje, específicamente, para la detección de metabolitos de nandrolona en orina en muy bajas concentraciones, ha adquirido notable interés en los días actuales debido al creciente número de investigaciones que se llevan a cabo que necesitan de una técnica analítica lo suficientemente confiable para tales fines.^{34,35}

El objetivo del presente trabajo fue la validación de un método para la determinación de 19-NA a nivel de trazas en orina humana con metilttestosterona como patrón interno utilizando una extracción en fase sólida, seguida de una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa de *E. Coli*, ex-

tracción líquido-líquido, derivatización con MSTFA para obtener el bis-trimetilsilil derivado de la 19-norandrosterona y análisis mediante Cromatografía Gaseosa acoplada a EM-EM (CG-EM-EM) utilizando un espectrómetro de masas de trampa de iones.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Los análisis fueron realizados utilizando un cromatógrafo de gases TRACE GC (Thermoquest Corporation, EEUU), acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones POLARIS Q (Finnigan, EEUU). El control del instrumento y el procesamiento de datos fue realizado con una computadora (Gateway) utilizando el paquete de programas Xcalibur para el control del método instrumental, la adquisición y el procesamiento de los datos.

Condiciones cromatográficas.

Columna capilar de cuarzo 100 % metilsilicona (dimetilpolisiloxano) de tipo Ultra HP-1, (20 m X 0,20 mm X 0,11 µm). Gas portador: He 1 mL/min. Programa de temperatura: de 181 °C (por 1 min), hasta 210 °C (10 °C/min), entonces sube a 310 °C (20 °C/min), manteniéndose en esa temperatura durante 2 min. Temperatura del inyector: 280 °C. El volumen de inyección fue de 3 µL en el modo Split. Relación de Split: 20:1, Flujo de Split: 20 mL/min. Temperaturas del detector: transfer line 300 °C, fuente de iones: 225 °C. Modo de adquisición: EM-EM. El ion precursor o padre para la 19-NA fue el de m/z = 405 y para el patrón interno fue el de m/z 446. Se siguieron como iones hijos el de m/z = 315 y el 225 para la 19-NA y el de m/z = 356 y 301 para el patrón interno metiltestosterona. La tabla 1 ofrece las condiciones de adquisición.

Equipo de extracción en fase sólida (EFS) de 12 posiciones (Supleco, EEUU). Baño seco Multi Blok Heater de 36 posiciones (Lab-Line USA).

Centrífuga y zaranda (Fisher Scientific, EEUU)

Reactivos

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad analítica (Aldrich, Milwaukee, EEUU), así la enzima β-glucuronidasa de *Escherichia Coli* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), las columnas de extracción en fase sólida Detectabuse™ (Biochemical Diagnostics, New York EEUU). La 19-NA, 19-NE y la metiltestosterona (patrón interno) (Research Plus, Bayonne, New York, EEUU), la MSTFA y el yoduro de amonio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y el mercaptoetanol (Fluka, Busch, Suiza).

Muestras

Se trabajó con una muestra blanco de orina procedente de un individuo saludable del sexo masculino, el cual reportó no haber consumido ningún suplemento nutricional ni medicamentos. Este blanco de orina se preparó y chequeó de acuerdo con el procedimiento normalizado de trabajo establecido en el laboratorio, el cual está comprendido dentro del alcance de las normas internacionales de la calidad ISO/IEC 17025.

De esta muestra de orina se utilizaron 12 alícuotas de 2,5 mL cada una, cuatro de ellas fortificadas con un patrón (25 µL de una disolución metanólica de 19-NA 50 ng/mL), para obtener una concentración de 19-NA de 0,5 ng/mL (Control Inferior, CI 1-4), y 4 fortificadas con un patrón de 19-NA (25 µL de una disolución metanólica de 1 µg/mL) para obtener una concentración de 10 ng/mL (Control Superior, CS 1-4).

Con el objetivo de realizar el ensayo correspondiente al rendimiento de la extracción se tomaron otras cuatro alícuotas las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y luego, el disolvente orgánico antes de la evaporación fue fortifi-

cado con el volumen correspondiente de disolución de 19-NA para conseguir el equivalente al de los controles superiores. (25 µL de una disolución metanólica de 19-NA de 1 µg/mL (Matriz MAT 1-4).

Para los ensayos de selectividad-especificidad se trabajó con cinco blancos de orina de diferentes orígenes, pertenecientes a individuos saludables del sexo masculino los cuales reportaron no haber consumido ningún medicamento ni suplemento nutricional. (Blancos de orina BLOR 1-5).

Procedimiento de extracción

A 2,5 mL de orina se les adiciona patrón interno (metiltestosterona 500 ng) y se extraen como sigue: la orina se pasa a través de una columna Detectabuse C18, previamente activada con 2 mL de metanol y 2 mL de agua desionizada. Se realiza un lavado con 2 mL de agua desionizada, la elución se realiza con 2 mL de metanol. Después de la evaporación del eluato en corriente de nitrógeno a 40 °C en un baño seco, se reconstituye en 1 mL de una disolución estabilizadora de fosfato (pH 7, 0,2 mol/L) y se somete a una hidrólisis con 50 µL de β-glucuronidasa de *E.coli* a 55 °C por 1 h. El hidrolizado se deja enfriar a temperatura ambiente y se le añaden 250 µL de una disolución de carbonato de potasio al 5 %, se extrae con 5 mL de terbutilmetiléter en una zaranda durante 20 min. La fase orgánica se centrifuga a 3 500 r/min y se evapora a sequedad en baño seco a 40 °C en corriente de nitrógeno. Antes de la derivatización se coloca 1 h en una desecadora. El residuo seco se derivatiza con 50 µL de una mezcla MSTFA:NH₄I:mercaptoetanol (1 000:2:6 v/p/v) en baño seco a 60 °C por 30 min. El producto de la reacción se encapsula en viales antes de proceder a la inyección de 3 µL en el sistema CG-EM-EM.

Tabla 1. Condiciones de adquisición EM-EM.

TC (min)	Aislamiento iones padres			Excitación			Intervalo de masas de los iones hijos			Compuesto a buscar
	(m/z)	Width	TA (ms)	VRE V	TE (ms)	MEE	(m/z)			
5	405	1	8	0,75	15	0,225	220 - 230	305 - 320	395 - 410	19-NA
	405	1	8	0	15	0,225	350 - 450			
6,8	405	1	8	0	15	0,225	350 - 450			Metiltestosterona Patrón interno

TC Tiempo de comienzo de la adquisición en un segmento. m/z Ion precursor o padre en cada evento. Width Anchura en la ventana de aislamiento del ion precursor. TA Tiempo de aislamiento (ms). VRE Voltaje resonante de excitación (V). TE Tiempo de excitación (ms). MEE Máxima energía de excitación.

Validación del método analítico

Se realizó la validación cualitativa del método mediante la demostración de la selectividad-especificidad, límite de detección, precisión intraensayo (repetibilidad) y el rendimiento de la extracción, de acuerdo con el procedimiento normalizado de trabajo establecido en el laboratorio, el cual está comprendido dentro del alcance de las normas internacionales de la calidad ISO/IEC 17025 y en armonía con las tendencias actuales relacionadas con la validación de métodos bioanalíticos.^{36,34}

Estudio pre validación

Solamente se evaluó como parámetro crítico la energía de colisión o voltaje resonante de excitación (VRE), que constituye una radiofrecuencia aplicada a los electrodos terminales de la trampa para provocar la formación de iones hijos a partir del ion precursor a través de la disociación con colisión inducida. Se controló el valor de VRE óptimo para producir un espectro EM-EM de acuerdo con los requerimientos del COI. (El ion precursor debe tener al menos el 5 % de la intensidad del máximo ion hijo en el espectro EM-EM).⁵

Selectividad-especificidad

Se procesaron cinco blancos de orina de orígenes diferentes y se analizaron mediante CG-EM-EM buscando posibles interferencias de sustancias endógenas en el tiempo de adquisición correspondiente a los metabolitos de la nandrolona. Se comprobó de manera visual la ausencia de sustancias interferentes en cada uno de los blancos de orina.

Precisión intra-ensayo (repetibilidad)

La precisión definida como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV) se estudió a dos niveles de concentración (inferior de 0,5 ng/mL y superior de 10 ng/mL). Se procesaron cuatro réplicas de cada nivel de concentración un mismo día. Se calculó el coeficiente de variación de los tiempos de retención relativos (TRR) y el CV de la relación entre los iones m/z 315 y 356. Como criterio de aceptación se tuvo en cuenta que el CV para el nivel inferior fuese menor al 20 % y en el nivel superior menor de un 10 % para ambos parámetros. Se aplicó la prueba de Dixon para descartar valores aberrantes.³⁷

Límite de detección

El límite de detección se calculó ensayando concentraciones decrecientes de 19-norandrosterona en muestras de orina enriquecidas al efecto y evaluando la relación señal/ruido alrededor del ión de m/z 315, utilizando para ello el paquete de programas "signal to noise calculator" adquirido junto con el Xcalibur. Como criterio de aceptación para el límite de aceptación se tuvo en cuenta que la relación señal/ruido alrededor del ion de 315 (ion de mayor intensidad en el espectro) fuese mayor e igual que 3.

Recuperación

Se calculó la recuperación de la 19-NA comparando la relación de las áreas de los iones de m/z 315/356 obtenidas para cada muestra del nivel superior (Control superior, CS 1-4, 10 ng/mL), con el promedio de la relación de los iones de m/z 315/356 de las muestras de igual nivel de concentración, pero con la adición del analito después del paso de extracción líquido-líquido (Matriz MAT 1-4), multiplicando este cociente por 100. Este mismo procedimiento se realizó también con las áreas del ion de m/z 315, sin tener en cuenta las del patrón interno. En estas últimas muestras (MAT 1-4) también se aplicó la prueba de Dixon para descartar valores aberrantes. El criterio de aceptación para la recuperación del método fue superior a un 60 %.

RESULTADOS Y DISCUSION

La nandrolona y algunas prohormonas producen en el metabolismo humano tres metabolitos, de los cuales la 19-NA y la 19-NE se excretan en la orina conjugados como glucuronidos y la 19-norepiandrosterona como sulfato. En el presente procedimiento se logró extraer los dos primeros, debido a que se utiliza la enzima β -glucuronidasa de *E.coli*. El metabolito marcador del consumo de nandrolona es la 19-norandrosterona, no obstante, con las presentes condiciones instrumentales se logra la separación de ambos metabolitos. La figura 3 presenta el cromatograma y el espectro EM-EM de la 19-NA y de la metiltestosterona (patrón interno) pertenecientes a una orina control de una concentración de 2 ng/mL. (Límite de corte establecido por el COI, por encima del cual se declara una muestra como positiva para atletas masculinos).

Estudio pre validación

De acuerdo con los criterios analíticos expuestos por el COI,⁵ para diagnóstico de la presencia de 19-NA en bajas concentraciones en muestras de orina, se plantea que el ion precursor (ion padre) debe tener al menos una intensidad del 5 % respecto al ion hijo más intenso en el espectro EM-EM. Las figuras 4 y 5 muestran el estudio de optimización de la energía de colisión para la 19-NA bis-O-TMS utilizando como ion padre el de m/z 405, el cual rinde los iones hijos de m/z 225 y 315, siendo ese último el más intenso del espectro. De acuerdo con estos resultados la energía de colisión óptima para la 19-NA bis-O-TMS está entre 0,70 y 0,85 V.

La figura 6 muestra el espectro de masas de la 19-NA bis-O-TMS obtenido en el modo *full Scan* donde se aprecia que el ion de m/z 405 es el pico base, el cual fue seleccionado como ion precursor para realizar el evento EM-EM. La figura 7 presenta el espectro EM-EM de la 19-NA bis-O-TMS obtenido con una energía de colisión de 0,80 V.

En el método instrumental propuesto se registran para la 19-NA bis-O-TMS tres iones diagnóstico obtenidos en dos eventos. En el primero, se aplica una energía de colisión de 0,80 V y en el otro, de 0 V. En este evento se obtiene un espectro EM-EM característico de la 19-NA bis-O-TMS con un ion de m/z 315 como pico base, otro de m/z 225 entre el 50 y el 70 % del ion de m/z 315 y el de m/z 405 con una intensidad de al menos, el 5 % del pico base. En el segundo evento se conserva el ion de m/z 405 como precursor, pero al aplicar una energía de colisión de 0 V, no se fragmenta y se detecta como tal, teniendo un ion de m/z 405 como pico base y único en el espectro de masas logrando con este procedimiento un indicador diagnóstico adicional, ya que se aísla un ion que es característico de la sustancia y se registra con la máxima intensidad posible.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que aumentando la energía de colisión hasta 1,0 V, se destruiría totalmente al ion precursor de m/z 405, pero se lograría aumentar la intensidad del ion de m/z 315 de manera que incrementaría la sensibilidad al doble (Fig. 4). Por lo tanto, este es un aspecto muy importante cuando se trabaja con concentraciones a nivel de trazas, por lo cual se propone que cuando se esté realizando un análisis de rutina para la 19-noran-

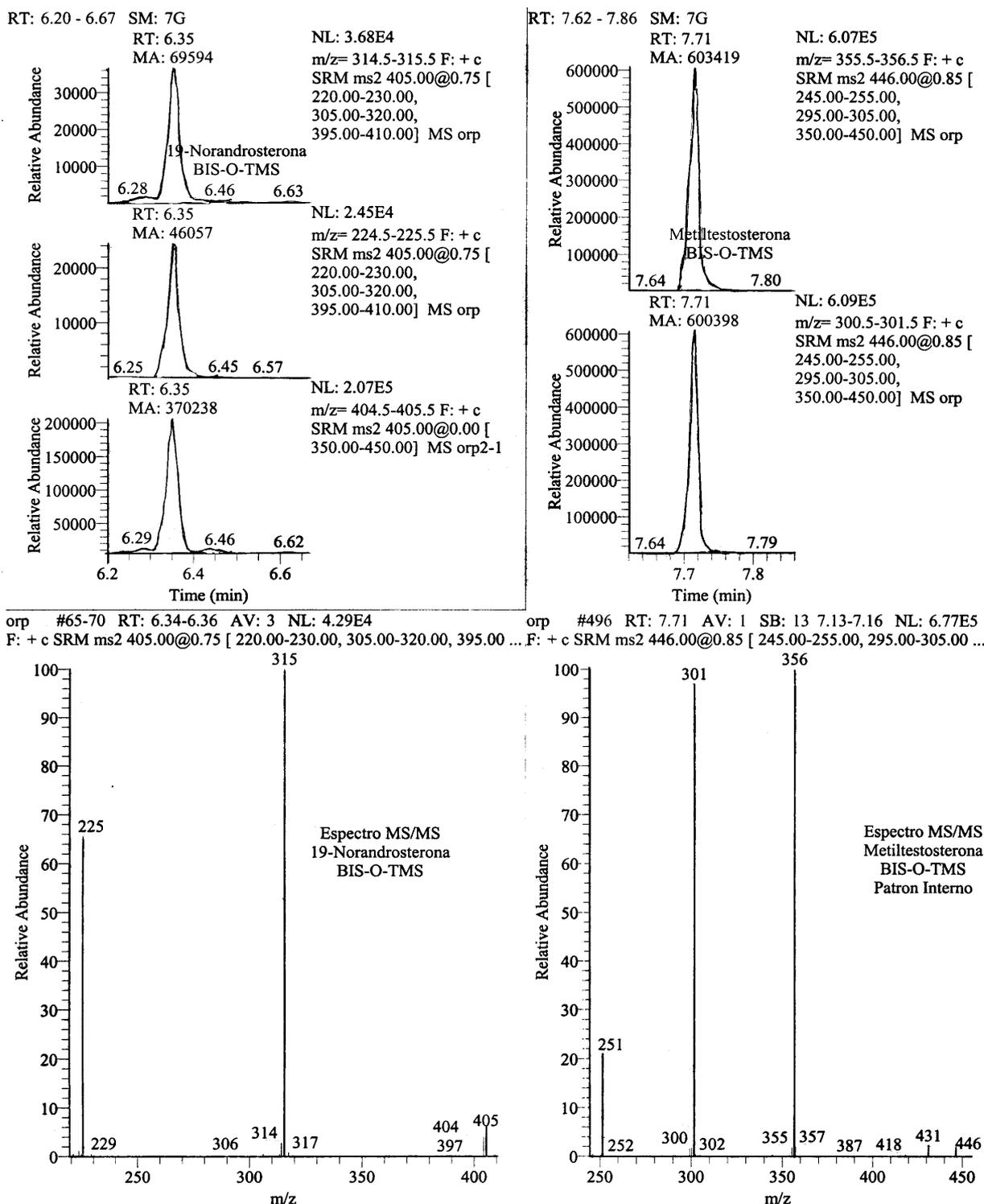


Fig. 3. Cromatograma de la 19-NA bis-O-TMS (arriba izquierda) que muestra los tres iones diagnósticos y su espectro EM-EM (abajo izquierda) y cromatograma del patrón interno, metiltestosterona bis-O-TMS (arriba derecha) y su espectro EM-EM (abajo derecha).

drosterona se utilice una energía de colisión de 1.0 V y de esta forma se garantizará la necesaria sensibilidad alrededor de los 2 ng/mL. Ahora bien, para la confirmación, sí se deben procurar condiciones instrumentales en las cuales se obtenga un espectro EM-EM característico de la sustancia, mostrando un ion precursor con un intensidad adecuada.

Marcos y col.³⁸ optimizaron la energía de colisión para la 19-NA bis-O-TMS proponiendo utilizar 1.1 y 1.2 V para la 19-NA y 19-noreticolona respectivamente, usando el ion de m/z 405 como ion padre para ambos metabolitos con objetivos de análisis de rutina, pero en el espectro EM-EM no se muestra el ion precursor.

Selectividad-especificidad

En ninguno de los blancos de orinas se detectaron picos al tiempo de retención de la 19-NA bis-O-TMS, por lo tanto, se puede asegurar que el método esta libre de interferencias de sustancias endógenas. Este resultado era de esperar, debido al principio en que se basa la espectrometría de masas de trampa de iones en el

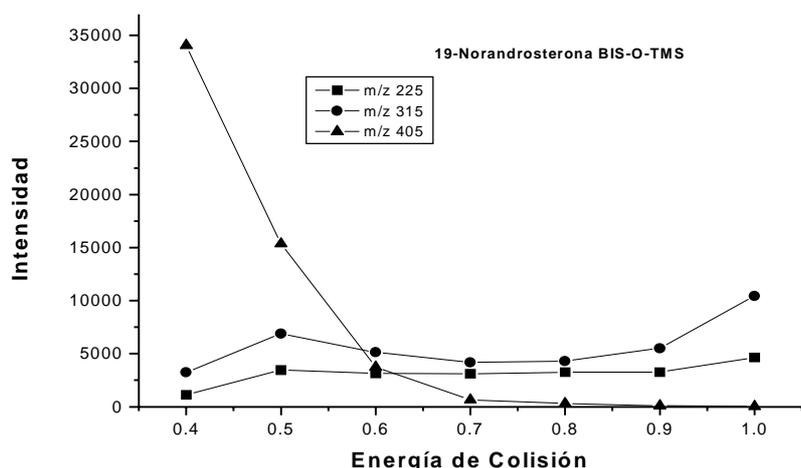


Fig. 4. Variación de la intensidad de los iones de m/z 315, 225 (iones hijos) y 405 (ion precursor) con la radiofrecuencia del voltaje resonante de excitación (energía de colisión).

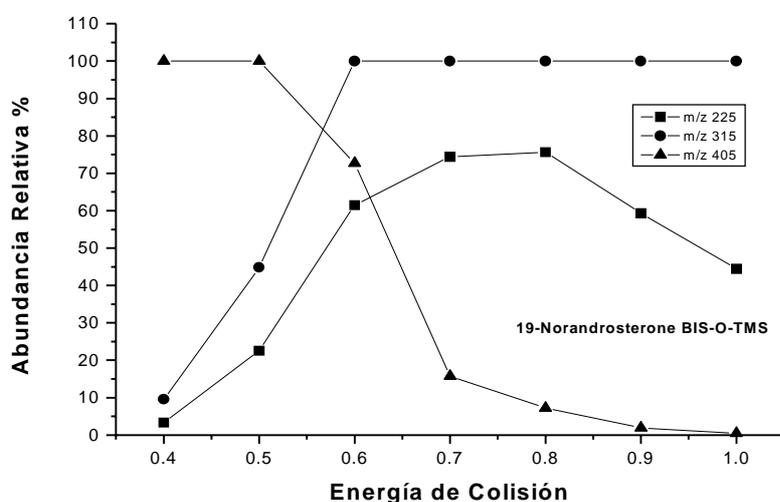


Fig. 5. Variación de la abundancia relativa de los iones de m/z 315 y 225 (iones hijos) y 405 (ion precursor) con la radiofrecuencia del voltaje resonante de excitación (energía de colisión).

modo EM-EM, la cual permite la eliminación de interferencias que coeluyen con el analito.

Precisión intra-ensayo (repetibilidad)

Como se pudo apreciar en los resultados de los estudios de precisión

(Tablas 2 y 3) el método cumple con los límites de aceptación establecidos para la validación de métodos bioanalíticos, especialmente, los criterios establecidos para los ensayos de repetibilidad, que señalan que el CV (de la relación de los iones de m/z

315/356) para el control inferior debe estar por debajo del 20 % y por debajo del 10 % para el control superior.^{36,39,40} Además, con la prueba de Dixon se descartó la presencia de valores aberrantes en la relación de m/z 315/356 para ambos controles, ya que r_{10} resultó menor de 0,765 (r_{10} de la tabla de Dixon para una probabilidad del 5 %).³⁷

Limite de detección

El límite de detección fue definido como la concentración más baja que resultó tener una relación señal/ruido alrededor del ion de m/z 315 mayor o igual a 3 y donde se pudiera definir un espectro EM-EM característico de la 19-NA bis-O-TMS. El límite de detección resultó de 0,05 ng/mL. A esta concentración la relación señal/ruido fue de alrededor de 7 con un CV de 11,1 %. Concentraciones menores a esta tuvieron una relación señal/ruido muy cerca de 3 y el espectro EM-EM no estaba muy bien definido. Este límite de detección es suficientemente bajo para los propósitos del control antidopaje porque satisface los requerimientos establecidos por el COI y permite utilizar este método analítico para detectar posibles concentraciones endógenas de este esteroide, además, de modo general coincide con lo que ha sido publicado.^{34,41}

Recuperación

El recobrado analítico se calculó comparando la relación de iones de m/z 315/356 para cuatro muestras blanco de orina enriquecidas con una concentración nominal de 10 ng/mL con otras cuatro enriquecidas con la misma concentración, pero al final del proceso de extracción, de modo que estas últimas presentan una relación de m/z 315/356 máxima posible (el patrón interno también fue añadido al final del proceso de extracción). La tabla 4 presenta los resultados correspondientes a las muestras MAT 1-4, los cuales fueron comparados con los obtenidos para las muestras de control superior CS 1-4 (Tabla 3). La recuperación obtenida para la 19-NA (92 %) cumple con el criterio de aceptación establecido y coincide de forma general con los resultados obtenidos para este analito por otros autores.^{34,41,42} Para el patrón interno la recuperación fue del 77 %. Además, con la prueba de Dixon se descartó la presencia de valores aberrantes en la relación de m/z 315/356 para ambos controles, ya que r_{10} resultó menor de 0,765 (r_{10} de la tabla de Dixon para una probabilidad del 5 %).³⁷

Tabla 2. Resultados de los ensayos de repetibilidad para el control de 0,5 ng/mL de 19-norandrosterona.

Muestra	TRR	Areas		Relación de m/z 315/356	Prueba de Dixon	
		Patrón interno	Analito		r_{10}	r_{10}
CI-1	0,823	138 546	311	0,002 2		
CI-2	0,823	169189	286	0,001 7	0,714	0,111
CI-3	0,823	97 720	152	0,001 6		
CI-4	0,823	137 224	209	0,001 5		
Media	0,823	135 669,7	239,5	0,001 8		
DE	0	29 293,9	72,7	0,000 3		
CV (%)	0	21,5	30	19,1		

ORP #562 RT: 6.34 AV: 1 SB: 32 6.19-6.31, 6.37-6.54 NL: 1.15ES
 F: + c Full ms [50.00-650.00]

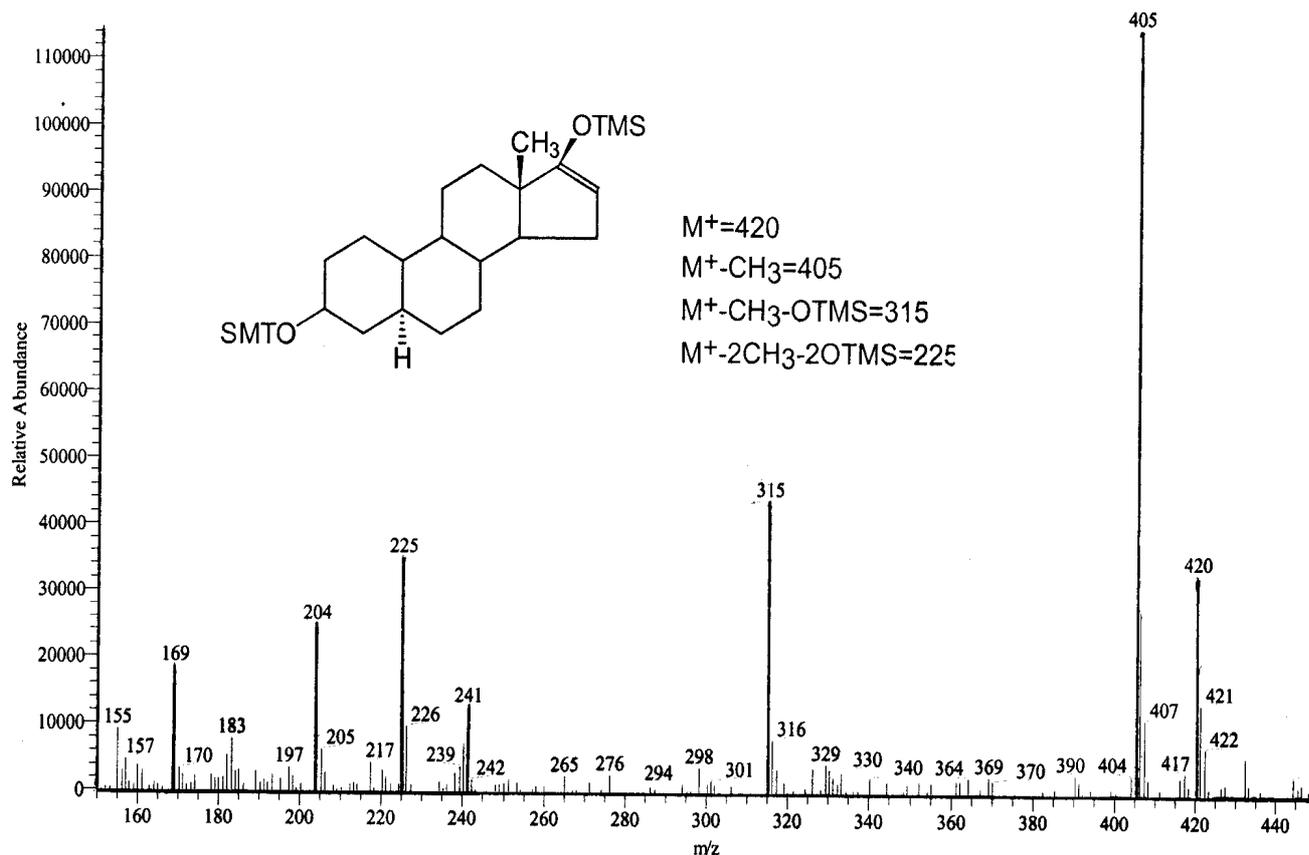


Fig. 6. Espectro de masas y patrón de fragmentación de la 19-norandrosterona obtenido en el modo full Scan.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de repetibilidad para el control de 10 ng/mL de 19-norandrosterona.

Muestra	TRR	Areas		Relación de m/z 315/356	Prueba de Dixon	
		Patrón interno	Analito		Qs	Qi
CS-1	0,823	141 644	4 709	0,033 2		
CS-2	0,823	131 089	4 442	0,033 9	0,194	0,639
CS-3	0,823	118 873	3 601	0,030 3		
CS-4	0,823	133 961	4 372	0,032 6		
Media	0,823	131 391,7	4 281	0,032 5		
DE	0	9 460,8	476,0	0,001 6		
CV (%)	0	7,2	11,1	4,8		

CONCLUSIONES

El procedimiento propuesto para la determinación de 19-NA en muestras de orina mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem es un método muy sensible y específico por lo que constituye una excelente técnica para el análisis de control antidopaje y para estudios de estimación fisiológica de ese metabolito en los cuales se requiere la detección de muy bajas concentraciones de este analito.

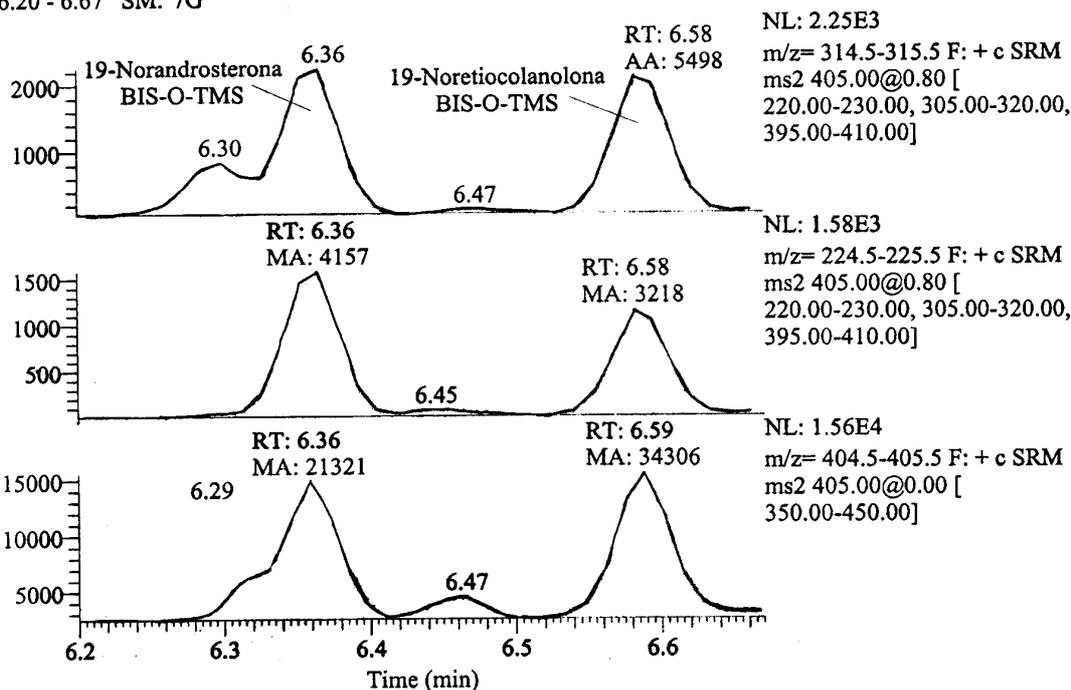
BIBLIOGRAFIA

- Gilman A.G., Goodman S.L and Gilman A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th Ed. Mac Millan Publishing Co., 1441-1457, 1996.
- Martindale, The extra Pharmacopoeia, 13th Ed. The Pharmaceutical Press, 1166-1198, 1993.
- Le Bizet B., Montteau F., Gaudin I. and Andre F. Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **723**, 157, 1999.
- Köhler R.M.N, Lambert M. Review. Urine nandrolone metabolites: false

positive doping test? *Br. J. Sports Med.*, **36**, 325, 2002.

- International Olympic Committee. Criteria for reporting low concentrations of anabolic steroids. International Olympic Committee. Appendix 4. Aug 1, 1998.
- Le Bizet B., Bryand F., Gaudin I., Moteau F., Poulain F., and Andre F. Endogenous nandrolone metabolites in human urine. Two-year monitoring of male professional soccer players. *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 43, 2002.
- Le Bizet B., Bryand F., Gaudin I., Moteau F., Poulain F., and Andre F. Endogenous nandrolone metabolites in human urine: preliminary results to discriminate between endogenous and exogenous origin. *Steroids*, **67**, 105, 2002.
- Uralets V., Gillette P., and Latven R. Occurrence of 19-nordehydro-androsterone/etiocholanolone in nandrolone positive specimens. Recent advances in doping analyses (4). *Sport & Busch Strauß*. 35-41, 1997.
- Dehennin L., Bonnaire Y. and Plou P. Urinary excretion of 19 norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **721**, 301, 1999.
- Kintz P., Cirimele V., and Ludes B. Norandrostenolone and Nor etiocho-

D:\Xcalibur\
19 norandrosterone
RT: 6.20 - 6.67 SM: 7G



prueba57 #47-50 RT: 6.35-6.36 AV: 2 NL: 3.81E3
F: + c SRM ms2 405.00@0.80 [220.00-230.00, 305.00-320.00, 395.00-410.00]

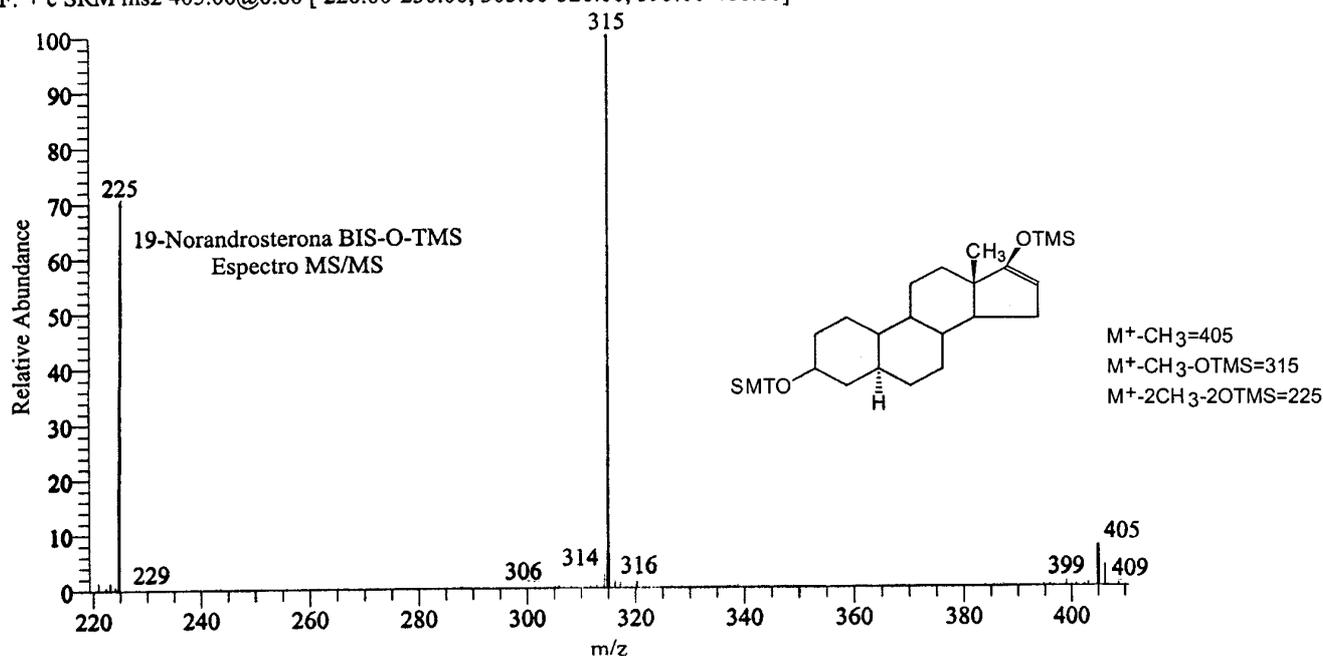


Fig. 7. Cromatograma que muestra los tres iones diagnóstico para los trimetilsilil derivados de la 19-norandrosterona (6,36) y de la 19-NE (6,58) (arriba), espectro EM-EM y patrón de fragmentación propuesto para la 19-norandrosterona bis-O-TMS (debajo).

lanolone: metabolites markers. *Acta Clin. Belg. Suppl.*, **1**, 68, 1999.

11. Mareck-Engelke U., Schultze G., Geyer H. and Schanzer W. 19-norandrosterone in Pregnant women Recent advances in doping analyses (8). *Sport & Busch Strauß.*, 145-154, 2000

12. Hemmersbach P., Hagensen H. and Misund J. Determination of urinary norandrosterone excretion in females during one menstrual cycle by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Recent advances in doping analyses (8). *Sport & Busch Strauß.*, 141-144, 2000.

13. Kamber M., Baume N., Saugy M. and Rivier L. Nutritional supplements as a source for positive doping cases. *Int J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, **2**, 258, 2001.

14. Le Bizec B. *et al.* Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profile of nandrolone metabolite. I. Mass Spectrometry detection and quantification of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone in human urine. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 1058, 2000.

15. Ryan M. Some dietary supplements can give you a "positive" experience. <http://www.vn1.velonews.com>, 2002.

16. Parasrampur M., Schwarts K. and Petesch R. Quality Control of dehydroepiandrosterone dietary supplements products. *Letter. J. Amer. Med. Ass.*, **280**, 1565, 1998.

Tabla 3. Resultados del estudio de recuperación.

Muestra	TRR	Areas		Relación de m/z	Recuperación	Prueba de Dixon	
		Patrón interno	Analito			Qs	Qi
Controles				315/356			
MAT-1	0,823	153 660	4 770	0,031 0	94,2		
MAT-2	0,823	174 406	6 078	0,034 8	96,0	0,705	0,031
MAT-3	0,823	168 329	7 395	0,043 9	85,8		
MAT-4	0,823	181 637	5 702	0,031 4	92,4		
Media	0,823	169 508	5 986	0,035 2	92,1		
DE	0	11 883,5	1 088,2	0,005 9	4,449		
CV (%)	0	7	18,0	17,0	4,8		

17. Ayotte C. Nutritional supplements and doping controls. **IAAF-New studies in athletics.**, **14**, 37, 1999.
18. Geyer H., Mareck-Engelke U., Reinhart U., Thevis M. and Schanzer W. The analysis of nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids. Recent advances in doping analyses (8). **Sport & Busch Strauß.**, 23-32, 2000.
19. Uralets V.P. and Gillette P. Over-The-Counter anabolic steroids 4-androsten-3,17-dione; 4-androsten-3 β , 17 β -diol; and 19-nor-4-androsten-3,17-dione: excretion study in men. **J. Anal. Toxicol.**, **23**, 357, 1999.
20. Uralets V.P. and Gillette P. Over-The-Counter Δ^5 anabolic steroids 5-androsten-3,17-dione; 5-androsten-3 β , 17 β -diol; dehidroepiandrosterone; and 19-nor-5-androsten-3,17-dione: excretion study in men. **J. Anal. Toxicol.**, **24**, 188, 2000.
21. Catlin D.H., Leder B.Z., Ahrens B., Hatton C.K., Green C.K., Green G.A. and Finkelstein J.S. Trace contamination of over-the-counter androstenedione and positive urine test results for a nandrolone metabolite. **JAMA**, **284**, 2618, 2000.
22. Fishman J. Biochemical mechanism of aromatization. **Cancer Res.**, **42**, 3277, 1982.
23. Van Eenoo P., Delbeke F.T., De Jong F.H. and De Backer P. Endogenous origin of norandrosterone in female urine: indirect evidence for the production of 19-norsteroids as by-products in the conversion from androgen to estrogen. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **78**, 351, 2001.
24. Reznik Y., Dehennin L., Coffin C., Mahoudeau J. and Leymarie P. Urinary Nandrolone metabolites of endogenous origin in man: A confirmatory by output regulation under human chorionic gonadotropin stimulation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **86**, 146, 2001.
25. Geyer H., Mareck-Engelke U., Wagner A. and Schanzer W. The analysis of "Non-Hormonal" nutritional supplements for prohormones. Recent advances in doping analyses (9). **Sport & Busch Strauß.**, 63-71, 2001.
26. Schanzer W. and Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. **Anal. Chim. Acta**, **275**, 23, 1993.
27. Ozer D. and Temizer A. The determination of nandrolone and its metabolites in urine by gas chromatograph-mass spectrometry. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.**, **22**, 421, 1997.
28. Manhnik M., Shrader Y. and Shanzer W. Plasma levels of 19-norsteroids after oral and bucal administration of norandrosterone. Recent advances in doping analyses (9). **Sport & Busch Strauß.**, 125-131, 2001.
29. Fannin S.T., Woffendin G. and Edwards J. Tandem Mass Spectrometry with a benchtop GC/MS/MS system for the analysis of target compounds in complex matrices. Web page: www.thermofininningan.com Technical note P7015. Finnigan Corporation, 1-8, 1997.
30. Fannin S.T., Ofsa B., Wells B.R. and sample B.R.H. Analysis of anabolic steroids in urine by GC/MS/MS with an external source Ion trap Mass Spectrometer. Web page: www.thermofininningan.com Technical Note P7024 Finnigan Corporation, 1-8, 1997.
31. Muñoz-Guerra J., Carreras D., Soriano C., Rodriguez A. and Rodriguez F. Use of Ion Trap gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for detection and confirmation of anabolic substances at traces levels in doping analysis. **J. Chromatogr. B.**, **704**, 129, 1997.
32. Hoberg A. and Scharlingn S. Quantitation and confirmation of anabolic agents in human urine using Ion Trap Tandem Mass spectrometry. Application Note AN 9155. ThermoQuest Corporation. Web page www.thermoquest.com. 1-3, 1998.
33. Saugy M. *et al.* Nandrolone metabolites in football players: Utility for in and out of competition test. Recent advances in doping analyses (7). **Sport & Busch Strauß.**, 95107, 1999.
34. Gambelunghe C., Somavilla M. and Rossi R. Testing for nandrolone metabolites in urine samples of professional athletes and sedentary subjects by GC/MS/MS analysis. **Bio-medical Chromatography** **16**, 508, 2002.
35. Marcos J., Pascual J. A., de la Torre X. and Segura J. Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by GC/MS/MS. **J. Mass Spectrom.**, **37**, 1059, 2002.
36. Peters F.T. and Maurer H.H. Bio-analytical method validation-How, How much and Why? A Review. **Bulletin of The International Association of Forensic Toxicologists**, **XXXII**, 16-23, 2002.
37. Ressources nationales de Chimie. Recherche de Valeurs aberrantes. Test de Dixon. Page web: <http://www.educnet.education.fr/rnchimie>
38. Marcos J., Pascual J.A., De la Torre X. and Segura J. Fast and comprehensive screening of anabolic agents and other compounds in human urine by GC/MS/MS. Recent advances in doping analyses (9). **Sport & Busch Strauß.**, 99-106, 2001.
39. Shah V.P. *et al.* Bioanalytical method validation- a revisit with a decade of progress. **Pharm Res.**, **17**, 1551, 2000.
40. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L. and McDowall R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **17**, 193, 1998.
41. Martin G.A.M. *et al.* Determination of nandrolone and metabolites in urine samples from sedentary persons and sportsmen. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.**, **761**, 229, 2001.
42. Schanzer W. Detection of exogenous anabolic androgenic steroids. Drug Abuse Handbook. Cap 9.4, Ed CRC Press, Boca Raton, 671-689, 1998.