

Recuperación de columnas de extracción en fase sólida Detectabuse™ para la detección de esteroides anabólicos en el control doping

Dayamín Martínez Brito, Margarita Teresa Correa Vidal, Ariana Rodríguez Fernández, Alberto Álvarez, Mirta Torres Castellanos y Tania T. Ferrer Alcalá.

Instituto de Medicina del Deporte, Laboratorio Antidoping, Departamento Analítico, Calle 100 y Aldabó, Ciudad de La Habana, Código Postal 10800, Cuba. Correo electrónico: antidop@inder.cu

Recibido: 17 de julio de 2006. Aceptado: 21 de mayo de 2007.

Palabras clave: extracción en fase sólida, Detectabuse™, esteroides anabólicos, control doping.
Key words: solid phase extraction, Detectabuse™, anabolic steroids, antidoping control.

RESUMEN. Las columnas Detectabuse™ han sido desarrolladas para la extracción cuantitativa de drogas a partir de fluidos biológicos; debido a su versatilidad y robustez son actualmente uno de los productos poliméricos más populares en la técnica de extracción en fase sólida. Una de las ventajas que presentan es la capacidad de extraer, de manera eficiente, una amplia variedad de compuestos que incluye las drogas de abuso más comunes, las de actividad terapéutica y esteroides excretados en forma libre y conjugada. La utilización de estas columnas en la preparación de muestras para la determinación de esteroides anabólicos y otros compuestos, tiene como objetivo disminuir las sales inorgánicas excretadas en la orina y aumentar con esto la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Se presentan los resultados de la recuperación de estas columnas para su posterior utilización en procedimientos de tamizaje. El estudio se realizó con los compuestos siguientes: metenolona, boldenona, fluoximesterona, 3'-hidroxistanozolol, 19-norandrosterona, epimetendiol, clenbuterol, salbutamol, etamiván, dehidroepiandrosterona, ácido carboxílico del tetrahidrocannabinol, morfina, triamtereno, testosterona, epitestosterona, androsterona, etiocholanolona, 16,16,17-d3 testosterona y 17 α -metiltestosterona y metabolitos de la metenolona, la boldenona, la bolasterona, la drostanolona, la mesterolona, la metandienona, del danazol y la metiltestosterona. Se compararon las abundancias absolutas y relativas de cada uno de los compuestos de la columna 1 con las recuperadas 2 y 3. Fueron determinadas la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada compuesto. Se realizó una prueba F para análisis de varianzas y una prueba T de Student para análisis de medias. Este trabajo demostró que las columnas Detectabuse™ pueden ser reutilizadas hasta dos veces en el procedimiento de pesquisaje, realizando un lavado posterior a la elución de los compuestos con el mismo sistema de disolventes utilizado en su activación.

ABSTRACT. Detectabuse™ extraction columns have been developed for the quantitative extraction of several families of drugs from biological fluids and due to their versatility and robustness they are, at present time, widely used in solid phase extraction procedures (SPE). One of their advantages is the ability to extract, in an efficient way, a wide range of compounds of the most common drugs of abuse, drugs of therapeutic activity and steroids excreted in free and conjugated form in urine. Detectabuse™ columns are used in doping for sample preparation in the analysis of anabolic steroids and other compounds excreted in urine and have, as main objective, to remove the inorganic salts excreted in the urine and to regulate the efficiency of the enzymatic hydrolysis process. This paper shows the results of the regeneration of these columns for their later use in screening procedures. The study was carried out with the following compounds: methenolone, methenolone metabolite, boldenone, boldenone metabolite, bolasterone metabolite, fluoxymesterone, drostanolone metabolite, mesterolone metabolite, methandienone metabolite1, danazol metabolite, 3'-

hydroxystanozolol, 19-norandrosterone, methyltestosterone metabolite2, epimethendiol, clenbuterol, salbutamol, ethamivan, tetrahydrocannabinol carboxylic acid (the metabolite), morphine, triamterene, testosterone, epitestosterone, androsterone, etiocholanolone, dehydroepiandrosterone, 16,16,17-d3 testosterone and 17 α -methyltestosterone. Intermediate blanks were included to discard the possibility of cross contamination of some substance from a sample to another. The absolute abundances obtained after a second and third uses of the columns were compared with those obtained with its first use starting with new columns, standard deviation and the variation coefficient were determined for each compound. A F-test for variances analysis and a Student's t-test for analysis of means were carried out. This paper shows that Detectabuse™ extraction columns can be reused twice with a previous rinse for screening proposes without affecting the quality of results.

INTRODUCCION

Las columnas Detectabuse™ han sido desarrolladas para la extracción cuantitativa de drogas a partir de fluidos biológicos; debido a su versatilidad y robustez son actualmente uno de los productos más populares en la técnica de extracción en fase sólida (EFS). Una de las ventajas que presentan es la capacidad de extraer, de manera eficiente, una amplia variedad de compuestos que incluye las drogas de abuso más comunes, drogas de actividad terapéutica y este-

roides excretados en forma libre y conjugada. Las columnas se encuentran empaquetadas con microparticulas de un copolímero poliestireno enlazadas con divinilbenceno e impregnadas con agentes humectantes para optimizar su eficiencia en la extracción. La adsorción de la resina está basada en su capacidad de interaccionar a través de fuerzas de Van der Waals y además, enlaces de hidrógeno (no iónicos).¹ Otras resinas están descritas con características similares tales como XAD₂ y C₁₈ para la extracción de esteroides anabólicos y otros compuestos de interés en el control doping.²⁻¹³ El objetivo fundamental de la utilización de la EFS, en la determinación de esteroides anabólicos, es la de eliminar las sales inorgánicas presentes en la matriz que pueden interferir en el paso de hidrólisis enzimática. La resina de las columnas Detectabuse™ presenta propiedades similares a la XAD₂, por lo que su utilidad es válida en la extracción de esteroides anabólicos.

Estas columnas de EFS son utilizadas en el Laboratorio Antidoping específicamente, en la preparación de muestras para la detección de esteroides endógenos y exógenos y otros compuestos, entre ellos: β_2 -agonistas, narcóticos y estimulantes.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el número de veces que pudieran ser reutilizadas las columnas Detectabuse™, manteniendo una garantía en la calidad de los resultados y una reducción de los gastos en el análisis de las mues-

tras en el procedimiento de detección de esteroides en la fracción conjugada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

β -Glucuronidasa/tipo IX-A *E coli* (Sigma, Alemania); carbonato de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania); dihidrógenofosfato de sodio anhidro y monohidratado (Merck, Alemania); metanol, pureza 99,93 % (Sigma, Alemania); *tert*-butilmetiléter, pureza 99,8 % (Sigma, Alemania); *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida para CG (MSTFA), (Sigma, Alemania); yoduro de amonio, pureza 100,7 % (Sigma Chemical, Alemania); 2-mercaptoetanol (Merck, Alemania); columnas de extracción en fase sólida Detectabuse™ (Biochemical Diagnostics, EE. UU.).

Equipos

Vortex mixer M-63210-33 (Thermolyne, EE. UU.); Zaranda 260300F (Boekel, EE. UU.); Centrifuga (Fisher Scientific, EE. UU.); bomba de vacío 400-1901 (Barnant, EE. UU.); termostato seco de 36 plazas (Pierce, EE. UU.); baño termostatado GP-100 (Neslab, EE. UU.); procesador de extracción sólido-líquido (Supelco, EE. UU.); cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolar HP 5973, con inyector automático serie 7683 y computadora HP Vectra VL, (Hewlett Packard, EE. UU.); condiciones cromatográficas: columna capilar HP-1 (metilsiloxano, 17 m, d.i. 0,20 mm, grosor de la fase estacionaria 0,11 μ m); temperatura (T) del inyector: 280 °C; modo

de inyección: split (relación 10 : 1); volumen de inyección: 2 μ L; gas portador: helio (0,9 mL/min, flujo constante); programa de temperatura: 180 °C, incrementar a 235 °C con una rampa de 3 °C/min; incrementar hasta 310 °C con una rampa de 40 °C/min. Tiempo final: 3 min. Tiempo total de corrida: 23,21 min. El espectrómetro de masas fue operado en el modo de *monitoreo* selectivo de iones (SIM) con un voltaje de ionización de 70 eV, fuente iónica a 230 °C e interfase a 280 °C y cuadrupolo a 150 °C.

Métodos

Las columnas Detectabuse™ fueron activadas con 2 mL de metanol y 2 mL de agua desionizada, una vez aplicadas las muestras, se llevó a cabo un lavado de la columna con 2 mL de agua desionizada. La elución de los compuestos de interés se realizó con 2 mL de metanol. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en condiciones neutras (pH = 7) y la extracción líquido-líquido se realizó con *tert*-butilmetiléter. Según recomendaciones del fabricante estas columnas son desechadas una vez utilizadas, sin embargo, se inició un proceso de recuperación sumamente sencillo donde sólo se repite el paso de activación (recuperación). En el estudio fueron empleadas 10 columnas. Se utilizaron muestras de orina blanco, las cuales fueron contaminadas con los compuestos relacionados en la tabla 1.

Con el objetivo de verificar y controlar la calidad del proceso de recuperación de las columnas, fue inclui-

Tabla 1. Relación de los compuestos incluidos en el estudio y las concentraciones utilizadas.

No.	Compuesto	Concentración (ng/mL)	No.	Compuesto	Concentración (ng/mL)
1	metenolona	25	15	clenbuterol	25
2	metabolito de la metenolona	25	16	salbutamol	100
3	boldenona	25	17	etamivan	200
4	metabolito de la boldenona	25	18	metabolito del THC	15
5	metabolito de la bolasterona	25	19	morfina	150
6	fluoximesterona	25	20	triamtereno	200
7	metabolito de la drostanolona	25	21	testosterona	120
8	metabolito de la mesterolona	25	22	epitestosterona	20
9	metabolito de la metandienona	25	23	androsterona	2 000
10	epimetendiol	25	24	etiocolanolona	2 000
11	3'-hidroxistanazolol	25	25	dehidroepiandrosterona (DHEA)	400
12	19-norandrosterona	25	26	16,16,17-d3 testosterona	50
13	metabolito de la metiltestosterona	25	27	17 α -metiltestosterona	500
14	metabolito del danazol	25			

do en el estudio el análisis de las muestras siguientes: blanco después de la recuperación de cada columna y metanol obtenido después del paso de activación. Las de orina y las de control fueron analizadas siguiendo el mismo procedimiento extractivo y de análisis instrumental.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el cálculo de la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada compuesto ($n = 10$). Se aplicó además, un prueba t de Student para el análisis de medias y un prueba F para el análisis de varianzas ($p > 0,01$). El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Microsoft Excel 2000.

Esquema de trabajo

Para el estudio se utilizó el esquema de trabajo siguiente:

Columna 1 (inicial) → Recuperación, activación → Columna 2 → Recuperación, activación → Columna 3

Este esquema fue seguido hasta la segunda recuperación de la misma columna. En el análisis estadístico de los datos fueron comparadas las abundancias absolutas obtenidas de los analitos estudiados para cada una de las columnas recuperadas (2 y 3) con las abundancias absolutas de estos mismos compuestos en la columna inicial (1). Una vez realizado el procedimiento extractivo de las muestras y ejecutado su análisis instrumental, se procedió a la integración del pico correspondiente al ión más abundante para cada uno de los compuestos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos seleccionados para realizar el presente estudio son esteroides androgénicos con propiedades anabólicas, además, se encuentran incluidos β_2 -agonistas, narcóticos y estimulantes. Estas sustancias se encuentran en el Listado de Sustancias Prohibidas por el Comité Olímpico Internacional (COI). Algunos presentan gran interés desde el punto de vista analítico debido al nivel de corte que presentan (19-norandrosterona, salbutamol, morfina, epitestosterona y Δ^9 -tetrahidrocannabinol ácido carboxílico). Se analizan además, cinco de los esteroides endógenos excretados de forma fisiológica en la orina (testosterona, epitestosterona, androsterona, eticolanolona y dehidroepiandrosterona). El análisis de la testosterona y la epitestoste-

rona es de gran importancia debido al criterio de positividad establecido por el COI para el consumo de testosterona (relación testosterona/epitestosterona mayor de 4). La androsterona, la eticolanolona y la DHEA fueron incluidos en el estudio, pues son esteroides de interés en el análisis del perfil de esteroides endógenos en el control doping.

Análisis del rendimiento de extracción o recobrado

En el análisis estadístico de los resultados se realizó una prueba F para el análisis de varianzas y una prueba t de Student para el análisis de medias, lo cual arrojó que no existían diferencias significativas ($p > 0,01$) entre las abundancias absolutas de los compuestos estudiados extraídos utilizando las columnas recuperadas (2 y 3) con respecto a la inicial (1). La tabla 2 muestra el recobrado o rendimiento de extrac-

ción de las sustancias estudiadas considerando las áreas obtenidas con las columnas nuevas como el 100 % (Fig. 1).

Pudo observarse un incremento en el rendimiento de extracción para la fluoximesterona, el 3'-hidroxistanozolol y el triamtereno después de la primera recuperación. Estos compuestos presentaron además elevados coeficientes de variación desde un inicio, lo que confirma sus débiles propiedades cromatográficas.

Análisis de las abundancias absolutas y coeficientes de variación

Partiendo de las áreas absolutas del ión más abundante para cada uno de los compuestos incluidos en el estudio fueron determinados los parámetros estadísticos siguientes: media, desviación estándar y CV (Tabla 3). La mayoría de los compuestos que presentaron el coefi-

Tabla 2. Relación de los compuestos estudiados y los recobrado obtenidos para la segunda y tercera recuperación de las columnas respecto a la primera utilización.

No.	Compuesto	Recuperación 1 (2)	Recuperación 2 (3)
1	metenolona	108,4	106,7
2	metabolito de la metenolona	102,2	100,7
3	boldenona	101,6	102,4
4	metabolito de la boldenona	101,8	102,1
5	metabolito de la bolasterona	107,7	106,0
6	fluoximesterona	131,5	151,2
7	metabolito de la drostanolona	101,4	98,6
8	metabolito de la mesterolona	103,3	99,3
9	metabolito de la metandienona	100,0	98,3
10	epimetendiol	95,4	94,0
11	3'-hidroxistanozolol	130,7	141,2
12	19-norandrosterona	103,3	104,9
13	metabolito de la metiltestosterona	107,2	105,5
14	metabolito del danazol	106,3	101,3
15	clenbuterol	104,5	105,2
16	salbutamol	102,8	101,4
17	etamivan	102,7	103,0
18	metabolito del THC	106,7	106,5
19	morfina	101,4	97,6
20	triamtereno	137,9	141,6
21	testosterona	102,7	103,7
22	epitestosterona	103,6	102,0
23	androsterona	103,9	100,6
24	eticolanolona	111,4	107,0
25	dehidroepiandrosterona (DHEA)	101,8	100,8
26	16,16,17-d3 testosterona	103,3	101,1
27	17 α -metiltestosterona	106,5	108,1

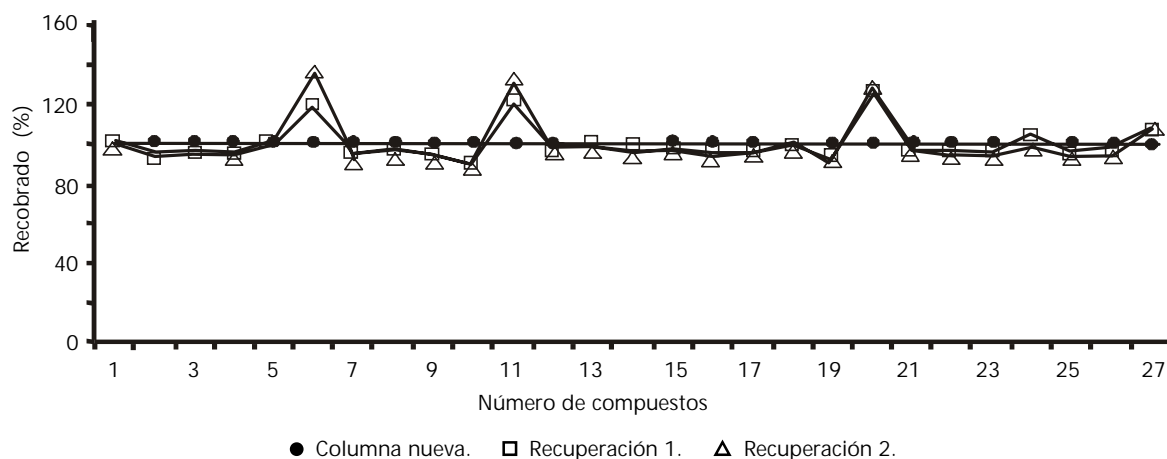


Fig. 1. Recobrados obtenidos considerando la columna nueva como el 100 % de extracción.

Tabla 3. Relación de los compuestos estudiados y los coeficientes de variación determinados para las abundancias absolutas de cada compuesto.

Compuesto	CV (%)			Compuesto	CV (%)		
	(1)	(2)	(3)		(1)	(2)	(3)
Metenolona	9,8	12,4	9,1	Clenbuterol	6,0	9,4	6,8
Metabolito de la metenolona	13,5	9,8	8,2	Salbutamol	12,2	13,9	12,4
Boldenona	15,2	13,3	13,1	Etamivan	15,3	14,4	12,9
Metabolito de la boldenona	8,6	9,1	8,0	Metabolito del THC	17,6	19,7	15,6
Metabolito de la bolasterona	9,5	12,1	8,1	Morfina	5,5	19,6	6,7
Fluoximesterona	54,3	26,3	15,0	Triamtereno	27,6	39,8	41,5
Metabolito de la drostanolona	13,5	11,0	7,3	Testosterona	6,5	11,5	7,3
Metabolito de la mesterolona	11,9	10,8	8,0	Epitestosterona	7,0	11,1	8,5
Metabolito de la metandienona	21,3	18,7	19,2	Androsterona	14,1	5,1	5,1
Epimetendiol	14,0	13,7	10,3	Etiocolanolona	15,6	13,6	17,7
3'-Hidroxiandrostanozolol	36,6	34,2	19,4	Dehidroepiandrosterona (DHEA)	7,1	11,8	7,4
19-Norandrosterona	8,2	9,9	8,6	16,16,17-d3 Testosterona	10,2	10,9	8,7
Metabolito de la metiltestosterona	12,9	13,3	13,9	17 α -Metiltestosterona	9,5	12,6	10,2
Metabolito del danazol	11,0	11,0	7,1				

ciente de variación entre 5 y 10 %, se mantuvieron prácticamente estables, lo cual no fue observado para la morfina. Resultó notable cómo también en la mayoría de los casos, el CV aumenta después de la primera recuperación de la columna para luego volver a acercarse al valor inicial. En el grupo de los compuestos que presentaron CV por encima del 20 %, se encuentran aquellos que presentan problemas en su comportamiento cromatográfico o presentan estructuras químicas complejas que influyen en el proceso de extracción. De todas formas, llama la atención que muchos compuestos mejoran el CV con el número de veces que se recupera la columna de extracción en fase sólida, excepto el triamtereno (Tabla 3).

Análisis de las muestras controles

Después de realizado el análisis instrumental, se observó que en las muestras controles (metanol y muestras blancas de orina) no se encontraban los iones correspondientes a los compuestos de interés, lo cual demostró que la limpieza de las columnas fue adecuada y garantizó que no se contaminaran unas muestras con otras por el uso de columnas recuperadas.

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que las columnas Detectabuse™ pueden ser reutilizadas hasta dos veces en el análisis de esteroides anabólicos y otros compuestos incluidos en el proceso de pesquizado, sin que se altere la calidad de los resultados, lo

cual a su vez, disminuye el costo del ensayo analítico respectivo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Aristides Rosado Pérez por su participación en la revisión del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Biochemical Diagnostics, Inc., Extraction Columns Detectabuse™, Type-R. Instrucciones. <http://www.biochemicaldiagnostics.com> (Consultado: 25 de mayo de 2003)
- Fiori M., Cartoni C., Bocca B. and Brambilla G. The use of Nonendcapped C18 columns in the cleanup of clenbuterol and a new adrenergic agonist from bovine liver by gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis, *Journal of Chromatographic Science*, **40**, 92-96, 2002.

3. Shänzer W., Geyer H. and Donike M. Metabolism of metandienone in man: identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas-chromatographic-mass spectrometric identification of *bis*-hydroxylated metabolites, **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **38**, 441-464, 1991.
4. Kammerer K., Merdink J., Jagels M. and Catlin D. Testing for fluoxymesterone (Halotestin[®]) administration to man: identification of urinary metabolites by gas-chromatography/mass spectrometry, **J. Steroid Biochem.**, **36**, 659-666, 1990.
5. Gradden C., Cha, S.C. and Przybylski P. Urinary excretion of Furazabol metabolite, **Journal of Analytical Toxicology**, **14**, 120-122, 1990.
6. Le Bizec B., Gaudin I., Pohu A., Monteau F. and André F. Identification of endogenous 19-norandrosterone in human urine, in **Recent Advances in Doping Analysis**, **7**, 109-118, 1997.
7. Schaenzer W., Delahau, P., Geyer H., Machni, M. and Hornonig, S. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas-chromatography-high resolution-mass spectrometry, **Journal Chromatography B**, **687**, 93-108, 1996.
8. Le Bizec B., Montrade M.P., Monteau F., Gaudin I. and André, F. 4-Chlorotestosterone acetate metabolites in cattle after intramuscular and oral administration, **Clin. Chem.**, **44**, 973-984, 1998.
9. Massé R., Honggang B. and Ping D. Studies on anabolic steroids VII. Analysis of urinary metabolites of formebolone in man by gas chromatography-mass spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, **247**, 211-221, 1991.
10. Massé R., Honggang B., Ayotte C., Ping D., Gélinas H. and Dugal R. Studies on anabolic steroids V. Sequential reduction of methandienone and structurally related steroid A-ring substituents in human: gas chromatographic-mass spectrometric study of the corresponding urinary metabolites, **J. Chromatogr. BA**, **562**, 323-340, 1991.
11. Kottenhahn B., Meyer L. V., Drasch G., Roider G. and Hofbauer B.. Direct Detection of Drugs of Abuse in Whole Hemolysed Postmortem Blood and Qualitative Measurement in EDTA. Plasma using the CEDIA DAU Urine Assays, **T + K**, **69**, 2, 2002.
12. Jiménez C., Ventura R., Segura J., De la Torre R. Protocols for stability and homogeneity studies of drugs for its application to doping control, **Anal. Chim. Acta**, **515**, 323-331, 2004.
13. Peng S.-H., Segura J., Farre´ M. and De la Torre X. Oral Testosterone Administration Detected by Testosterone Glucuronidation Measured in Blood Spots Dried on Filter Paper, **Clin. Chem.**, **46**, 515-522, 2000.

CORROSIÓN Y PROTECCIÓN

Grupo de Corrosión e Ingeniería de Materiales,
Facultad de Ingeniería Química,
Instituto Superior Politécnico "José A. Echeverría".



Calle 114 y 127, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.
Tel: (537) 204 0745. Fax: 204 0641. email: ggei@ceta.infcu
rigo@quimica.cujae.edu.cu jdom@quimica.cujae.edu.cu

DIRECCIONES DE TRABAJO:

- Formación profesional de pre y postgrado (cursos, adiestramientos, maestrías y doctorados) en Cuba y en el extranjero.
- Desarrollo de una amplia actividad de investigación científica y técnica en los campos de la Corrosión y la Protección Anticorrosiva, así como de su impacto ambiental.
- Consultorías, asesoramientos y servicios científico-técnicos a organismos e instituciones del país y del exterior.

CONSULTORÍAS, ASESORAMIENTO Y SERVICIOS:

- Diseño y evaluación de sistemas de protección catódica: estudios de campo, proyectos, equipos y montaje.
- Selección, evaluación y aplicación de inhibidores de corrosión en sistemas industriales.
- Preparación de superficies metálicas con fines anticorrosivos y decorativos.
- Electrodeposición de metales y tratamiento de sus residuos.
- Diseño mecánico y anticorrosivo de equipos de la industria química.
- Problemas de corrosión en estructuras de hormigón armado.
- Deterioro y protección de instalaciones industriales diversas: petróleo y gas, energética, alimentaria, médico-farmacéutica y otras.
- Corrosión y protección de sistemas de enfriamiento, climatización, suministro de agua y vapor en la industria o en instalaciones de servicios turísticos, hospitalarios y similares.

Vasta experiencia profesional avalada por más de 30 años de trabajo.