

Identificación y caracterización de los productos de degradación de las benzotiadiazinas en orina humana. Importancia para el control antidoping

Rodny Montes de Oca Porto, Margarita Teresa Correa Vidal, Arístides Rosado Pérez, Odalys González Pérez y Mario Granda Fraga.

Instituto de Medicina del Deporte. Laboratorio Antidoping. Calle 100 y Aldabó, Código Postal 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: rodnylad@yahoo.com

Recibido: 3 de abril de 2008. Aceptado: 12 de agosto de 2008.

Palabras clave: tiazidas, benzotiadiazinas, cromatografía de gases-espectrometría de masas, control antidoping.
Key words: thiazides, benzothiadiazines, gas chromatography-mass spectrometry, doping control.

RESUMEN. Los diuréticos de tipo tiazidas (benzotiadiazinas) son ampliamente usados con fines terapéuticos. Al igual que otros diuréticos pueden ser utilizados ilegalmente en el deporte con el objetivo de evitar resultados positivos en el control antidoping por dilución de la orina o para reducir el peso de los atletas que compiten por categorías de peso. Las benzotiadiazinas son un grupo de diuréticos que tienen una estructura 1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido con una sustitución de cloro o trifluorometil en la posición 6 y otros sustituyentes diferentes en la posición 3. Estos compuestos son muy inestables en orina por experimentar procesos de hidrólisis no metabólica y la relación compuesto/producto de hidrólisis está gobernada por las condiciones de almacenamiento de las muestras de orina. En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio de estabilidad de benzotiadiazinas en orina humana, las cuales fueron sometidas a diferentes condiciones de temperatura y tiempo con el objetivo de lograr la identificación de sus productos de degradación. Las muestras fueron sometidas a una extracción líquido-líquido con acetato de etilo en condiciones alcalinas y los análisis fueron realizados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. La identificación de los productos de degradación (2,4-disulfonamida-5'-cloroanilina y 2,4-disulfonamida-5'-trifluorometilanilina) permitió dar respuesta a las exigencias de la Agencia Mundial Antidopaje de perseguir estos compuestos en los análisis de rutina. Además, permitió dar resultados analíticos adversos aún cuando no se observen a los diuréticos que le dieron origen en la orina o estén a muy bajas concentraciones debido a su degradación.

ABSTRACT. The thiazides diuretics (benzothiadiazines) are widely used in the therapeutic. Like other diuretics can be used illegally in sport with the aim to avoid a positive result or to reduce the athlete's body weight to reach better results in lower weight category. The thiazides diuretics are substances with the structure of 1,2,4-benzothiadiazine-7-sulphonamide-1,1-dioxide with chloro or trifluoromethyl substituents at 6th position and different other substituents at 3rd position. These compounds are very unstable due to the fact that no metabolic hydrolysis process and the ratio of parent-compound to hydrolysis product is mainly governed by storage conditions of the urine sample. A stability study of urine spiked with different benzothiadiazines is presented. Different temperature and time to determinate the degradation product were assayed. The samples were prepared following a liquid-liquid extraction with ethyl acetate under alkaline conditions and the analysis was carried out by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Identification of 2,4-disulphonamide-5'-chloroaniline and 2,4-disulphonamide-5'-trifluoromethylaniline allowed respond to the World Antidoping Agency requirements and to emit Adverse Analytical Finding in urine samples where this kind of diuretics are absent or they are at very low concentration due to degradation process.

INTRODUCCIÓN

Los diuréticos son drogas ampliamente usadas principalmente en la práctica clínica en el tratamiento contra la hipertensión y diferentes tipos de edemas.¹ El uso de estos compuestos está prohibido en el deporte por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA),² sin embargo, los atletas lo utilizan principalmente por dos razones:

Para lograr pérdidas de peso antes de competencias deportivas en que se establecen categorías por pesos y para enmascarar la ingestión de otras sustancias prohibidas reduciendo su concentración en la orina.³

Desde la inclusión de los diuréticos en la Lista de Sustancias Prohibidas en el deporte en 1988, un gran número de procedimientos para detectar la presencia de estas sustancias en muestras de orina ha sido desarrollado. La utilización de la técnica de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas para la detección e identificación de diuréticos y sus metabolitos en orina ha sido la más generalizada por ser un método sensible y selectivo.⁴⁻¹⁰ No obstante, en los últimos años han sido desarrollados numerosos métodos donde se emplean efectivamente otras técnicas analíticas como la Cromatografía Líquida,^{11,12} la

Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas¹³⁻¹⁹ y la Electroforesis.²⁰⁻²³

Las benzotiadiazinas son un grupo de diuréticos que tienen una estructura 1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido con una sustitución de cloro o trifluorometil en la posición 6 y otros sustituyentes diferentes en la posición 3 (Fig. 1 y Tabla 1).

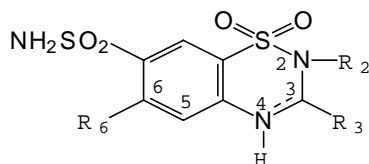


Fig. 1. Estructura central de las benzotiadiazinas.

Elas producen una diuresis más prolongada que los diuréticos de alto techo. La diuresis es iniciada dentro de las dos primeras horas después de la administración y alcanza su máximo al cabo de las 6 h. Su efecto se mantiene por un período de 24 a 48 h. Las tiazidas con tiempo de vida media entre 6 y 26 h son excretadas en un período de tiempo mayor.²⁴ Estos compuestos son muy inestables en la orina por experimentales procesos de hidrólisis no metabólica lo que provoca que desaparezcan relativamente rápido de ella y se generen dificultades en su determinación (Fig. 2).

El presente trabajo tuvo como objetivo llevar a cabo la identificación y caracterización estructural de los productos de degradación de las benzotiadiazinas en orina humana con el empleo de la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas. Para esto, muestras cargadas con benzotiadiazinas fueron sometidas a diferentes condiciones de temperatura y tiempo con el objetivo de lograr la identificación de sus productos de degradación y de esta forma, dar cumplimiento a los requisitos establecidos por la AMA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad analítica (Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) y el mefruside (patrón Interno) (Research Plus, Bayonne, New York, Estados Unidos). El carbonato de potasio y la acetona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y el yoduro de metilo (Merck, Darmstadt, Alemania).

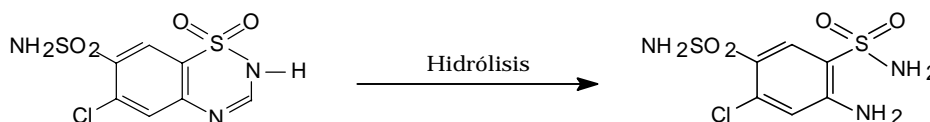


Fig. 2. Formación de compuestos de degradación en benzotiadiazinas por hidrólisis.

Todos los patrones de las sustancias empleadas (bendroflumetiazida, altiazida, politiazida) (Sigma, Steinheim, Alemania).

Equipamiento

Los análisis fueron realizados utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Palo Alto, CA, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar 5973. La separación cromatográfica se llevó a cabo empleando una columna capilar Ultra-2 (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos), de 12 m de largo, con un diámetro de 0,2 mm y un grosor de película de 0,33 μm ; se utilizó como gas portador helio a un flujo de 1,0 mL/min y un programa de temperatura de 172 $^{\circ}\text{C}$ con incrementos de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 300 $^{\circ}\text{C}$, entonces se dejó a 300 $^{\circ}\text{C}$ por 4 min.

El tiempo de corrida fue de 10,40 min. La inyección de 3 μL fue efectuada a 280 $^{\circ}\text{C}$ en el modo *split* (relación de *split* 10 : 1). La temperatura de la interfase y de la fuente de ionización fueron de 280 y 230 $^{\circ}\text{C}$ respectivamente. El modo de adquisición empleado fue *Full Scan* a 70 eV con un intervalo de masas desde 50 uma hasta 600 uma para la identificación de los mismos. Una vez identificados los compuestos, el pesquizado se llevó a cabo mediante el modo SIM utilizando los iones m/z 44, 268 y 375 para la bendroflumetiazida y m/z 44, 234 y 341 para el resto de las tiazidas.

Muestras de orina

En el presente trabajo se utilizaron 18 blancos de orina procedentes de voluntarios sanos cargados a 300 ng/mL de bendroflumetiazida, altiazida y politiazida las cuales fueron sometidas a un proceso de degradación utilizando las temperaturas de 35 y 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 24, 48 y 72 h. Las temperaturas fueron seleccionadas teniendo en cuenta la temperatura promedio en Cuba y las superiores fueron empleadas para acelerar el proceso de degradación.

Procedimiento de extracción

Las muestras de orina fueron procesadas siguiendo un procedimiento normalizado de trabajo previamente publicado y que se aplica en la mayoría de los laboratorios de control antidoping del mundo.³ A 2,5 mL de orina se le adicionan 25 μL de patrón interno (mefruside 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente, se adicionan 100 μL de NH_4Cl

Tabla 1. Sustituyentes característicos de las benzotiadiazinas.

Nombre	R3	R2	R6	Enlace 3-4
Clorotiazida	H	H	Cl	Doble
Hidroclorotiazida	H	H	Cl	Simple
Politiazida	$\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CF}_3$	CH_3	Cl	Simple
Altiazida	$\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH=CH}_2$	H	Cl	Simple
Benzotiazida	$\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$	H	Cl	Doble
Triclotmetiazida	CHCl_2	H	Cl	Simple
Bemetizida	1-Feniletíl	H	Cl	Simple
Butizida	$\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	H	Cl	Simple
Hidroflumetiazida	H	H	CF_3	Simple
Bendroflumetiazida	$\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$	H	CF_3	Simple

NH_3 pH = 9,5, 1 g de NaCl y 8 mL de acetato de etilo. La mezcla se agitó en una zaranda por 30 min. A continuación, se centrifugaron las muestras a 3 500 r/m y se separó la fase acuosa de la orgánica. La fase orgánica se evaporó a sequedad en baño seco a 40 °C bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco se colocó una hora en desecadora y se hizo reaccionar con 50 μL de yoduro de metilo, en presencia de 50 mg de carbonato de potasio y 150 μL de acetona, en baño seco a 60 °C durante tres horas para obtener los ésteres metílicos derivados.

RESULTADOS Y DISCUSION

La separación por cromatografía de gases de los diuréticos requiere de un proceso previo de formación de derivados. La técnica más frecuentemente empleada es la metilación de los grupos aminos y carboxílicos, pero no siempre es completa y reproducible. Los principales problemas ocurren con las benzotiadiazinas con las que se forman productos imprevisibles y compuestos de degradación debido a la gran inestabilidad que presentan. La identificación por Espectrometría de Masas de la mayoría de las tiazidas (altiazida, butiazida, meticlo-tiazida, politiazida, triclometiazida) se lleva a cabo identificando un fragmento común a m/z 352.¹⁴ Este fragmento es considerado característico para benzotiadiazinas con sustituyentes en la posición 3 aunque no es observado en los espectros de masas obtenido por impacto electrónico de la bendroflumetiazida o la clorotiazida.²⁵ La estructura asignada a este fragmento puede experimentar procesos de hidrólisis que disminuyen su estabilidad (Fig. 3).

Esta reacción de hidrólisis tiene lugar en disoluciones acuosas de diuréticos por lo que no es un proceso metabólico. Se ha observado que la relación entre el producto de degradación y el compuesto de origen varía en dependencia de las condiciones de almacenamiento de las muestras. Debido a la existencia de muestras sospechosas de contener benzotiadiazinas a muy bajas concentraciones y la imposibilidad de llevar a

cabo un proceso de confirmación de ellas, se llevó a cabo un estudio para determinar por CG-EM estos compuestos de degradación.

En el análisis de las muestras sometidas al proceso degradativo (hidrólisis), se observó que la mayor cantidad de productos de degradación se obtuvo para todos los compuestos al cabo de las 72 h a 40 °C. No obstante, a 35 °C se comenzó a observar productos de degradación a partir de las 48 h. Los resultados obtenidos para la bendroflumetiazida resultaron los más significativos en el presente trabajo (Fig. 4). Los valores representados corresponden a la relación de áreas entre el ión m/z 268 (pico base del compuesto de degradación) y el m/z 85 (pico base del estándar interno).

La AMA exige a los laboratorios que en el caso que existan sustancias inestables en orina, se deben llevar a

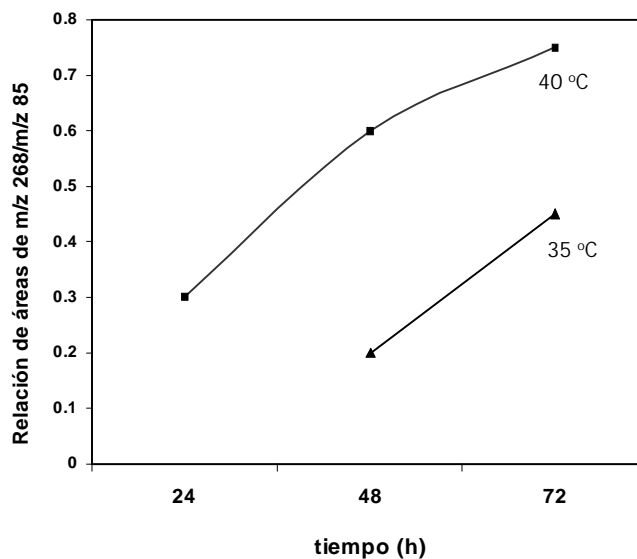


Fig. 4. Gráfico obtenido para la formación del producto de degradación de la bendroflumetiazida.

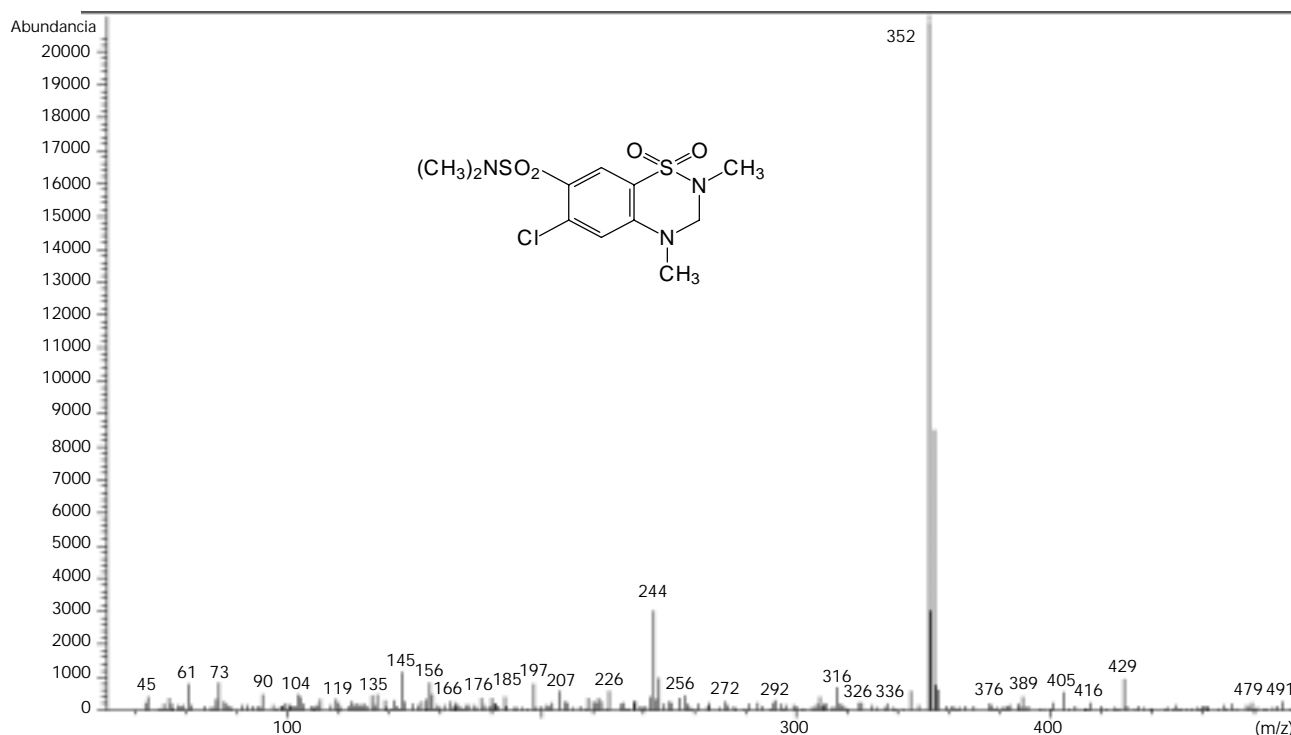


Fig. 3. Espectro de masas y estructura común utilizada para la detección de un gran número de benzotiadiazinas.

cabo siempre, estudios que permitan emitir fehacientemente un resultado analítico adverso o negativo según corresponda. Respecto a las benzotiadiazinas, el pesquijaje de sus productos de degradación es obligatorio para de esta forma, evitar la emisión de resultados falsos negativos en el caso que no se puedan detectar las tiazidas por estar degradadas totalmente o estar presentes en muy bajas concentraciones. Este estudio permitió dar cumplimiento a estas exigencias de la AMA²⁶ implementándose la identificación de estos compuestos de degradación dentro del procedimiento para la detección y confirmación de diuréticos en el laboratorio antidoping de Cuba.

Identificación y estudio de derivatización-fragmentación de los compuestos de degradación

Al no contar con los patrones analíticos de los compuestos de degradación fue necesario llevar a cabo su búsqueda en muestras de orinas degradadas. En el estudio correspondiente a la bendroflumetiazida se encontró un pico cromatográfico cuyo espectro presentó el ión molecular a m/z 375 sugiriendo la presencia del derivado tetrametilado de la 2,4-disulfonamida-5'-trifluorometilanilina (compuesto de degradación de la bendroflumetiazida). En el espectro de masas (Fig. 5) pudieron observarse otros fragmentos que confirmaron la presencia de este compuesto. El ión a m/z 356 correspondió con la pérdida de un átomo de flúor del ión molecular (M⁺-19), el ión a m/z 331 se forma por la pérdida de un radical dimetilamina del ión molecular, el ión m/z 44 correspondió a N-(CH₃)₂ y el ión a m/z 268 resultó de la pérdida de una cadena del tipo SO₂-N-(CH₃)₂ (m/z 107) constituyendo el pico base del espectro de masas. Otro importante ión observado fue el m/z 159 que ha sido propuesto como la pérdida sucesiva de dimetilamina (45 uma) y dióxido de azufre (64 uma) del ión m/z 268. Estas pérdidas sucesivas de dimetilamina y dióxido de azufre en los procesos de fragmentación de los diuréticos ha sido discutida en un trabajo publicado recientemente.²⁵

El resto de las tiazidas estudiadas (politiazida y la altiazida) presentaron un compuesto de degradación común; su ión molecular apareció a m/z 341 y pudo observarse claramente el ión m/z 343 (Fig. 6) correspondiente a la contribución isotópica del cloro. Además se observó la pérdida de 107 unidades de masas del ión molecular (SO₂-N-(CH₃)₂) con la formación de los iones m/z 234/236 (contribución isotópica del cloro). El ión m/z 297 se forma por la pérdida de un radical dimetilamina del ión molecular. Otro importante ión observado fue el m/z 125 que fue propuesto como la pérdida sucesiva de dimetilamina (45 uma) y dióxido de azufre (64 uma) del ión m/z 234. El ión m/z 44 tiene el mismo origen para todos los compuestos.

Estos compuestos presentan un átomo de nitrógeno sin metilar. Esto se debe a que el anillo bencénico está empobrecido electrónicamente por la cantidad de elementos electronegativos que presenta unidos él, lo que provoca que el par de electrones sin aparear que tiene el nitrógeno se encuentren involucrados con el anillo aromático por un efecto de resonancia. Este efecto de resonancia ocurre normalmente en la anilina, lo que la hace poco reactiva.²⁷ Si se tienen en cuenta los efectos electronegativos explicados anteriormente, este nitrógeno empobrecido electrónicamente no puede reaccionar con el yoduro de metilo para formar los derivados metilados.

En el macro correspondiente al procedimiento de detección de diuréticos, aparecen los iones fundamentales que son pesquisados para las tiazidas (Fig. 7.). En dicho macro se observan sus compuestos de degradación. Este macro corresponde a una orina patrón cargada a 250 ng/mL de cada benzotiadiazina, almacenada a -20 °C por más de seis meses. En este trabajo pudo comprobarse que aún bajo estas condiciones de almacenaje se forman los compuestos productos de la hidrólisis.

Se observó además un macro correspondiente con una muestra control negativo (orina libre de fármacos)

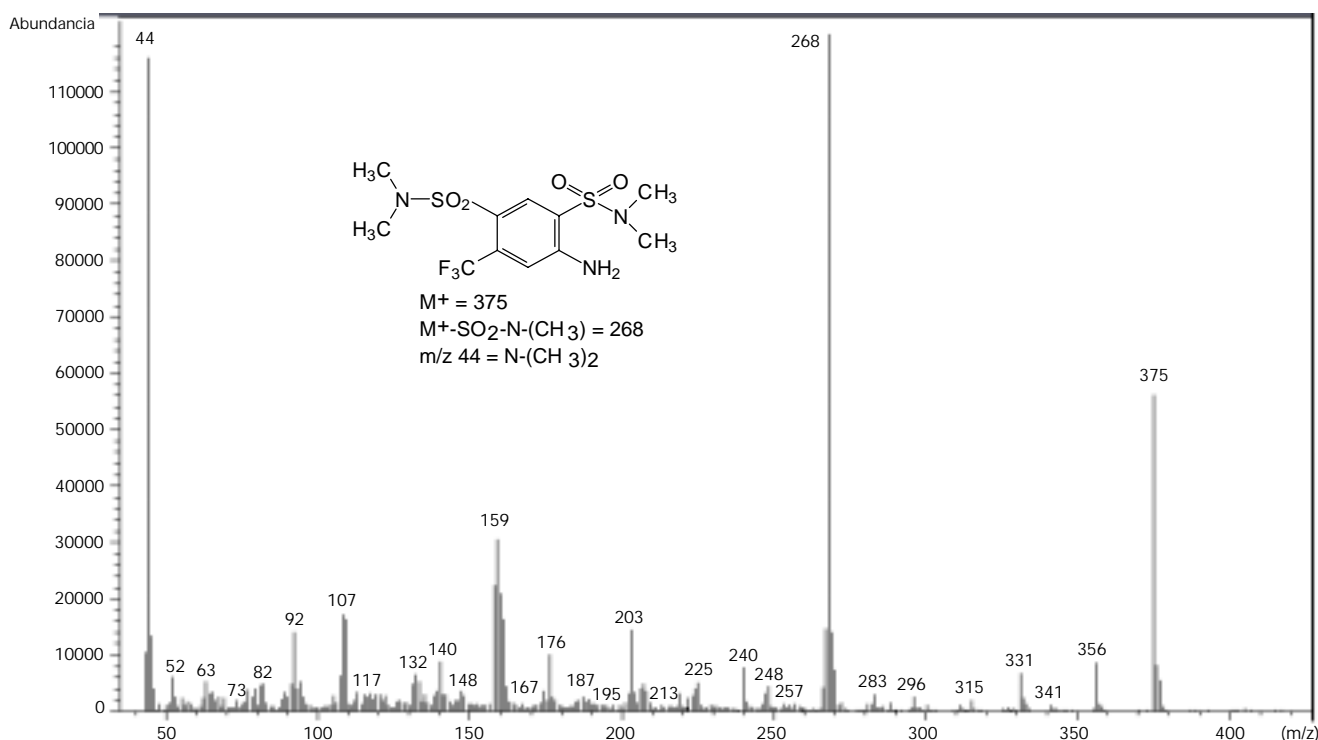


Fig. 5. Espectro de masas y propuesta de fragmentación para la tetrametil-2,4-disulfonamida-5'-trifluorometilanilina.

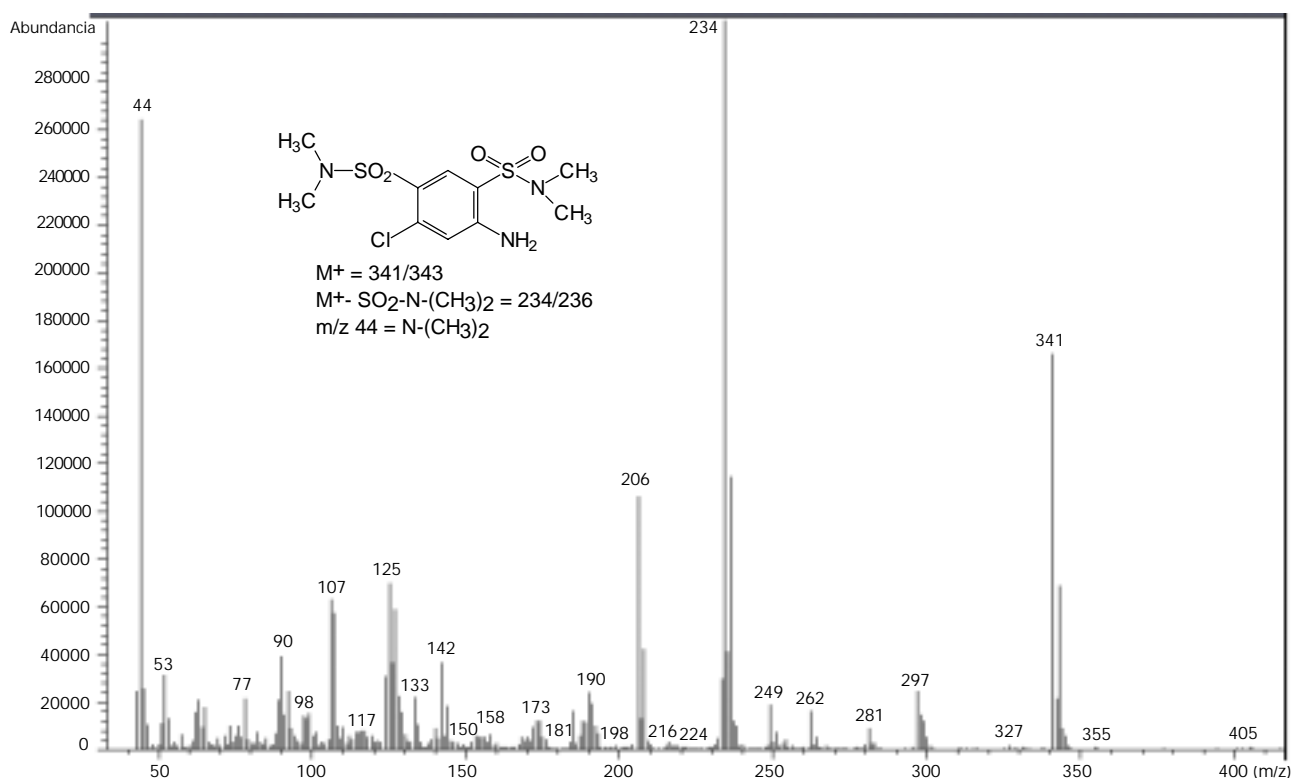


Fig. 6. Espectro de masas y propuesta de fragmentación para la tetrametil-2,4-disulfonamida-5'-cloroanilina.

(Fig. 7. arriba) donde se evidencia la selectividad/especificidad del método empleado, pues a los tiempos de retención de los compuestos pesquisados, no se observan señales cromatográficas que puedan interferir en los resultados.

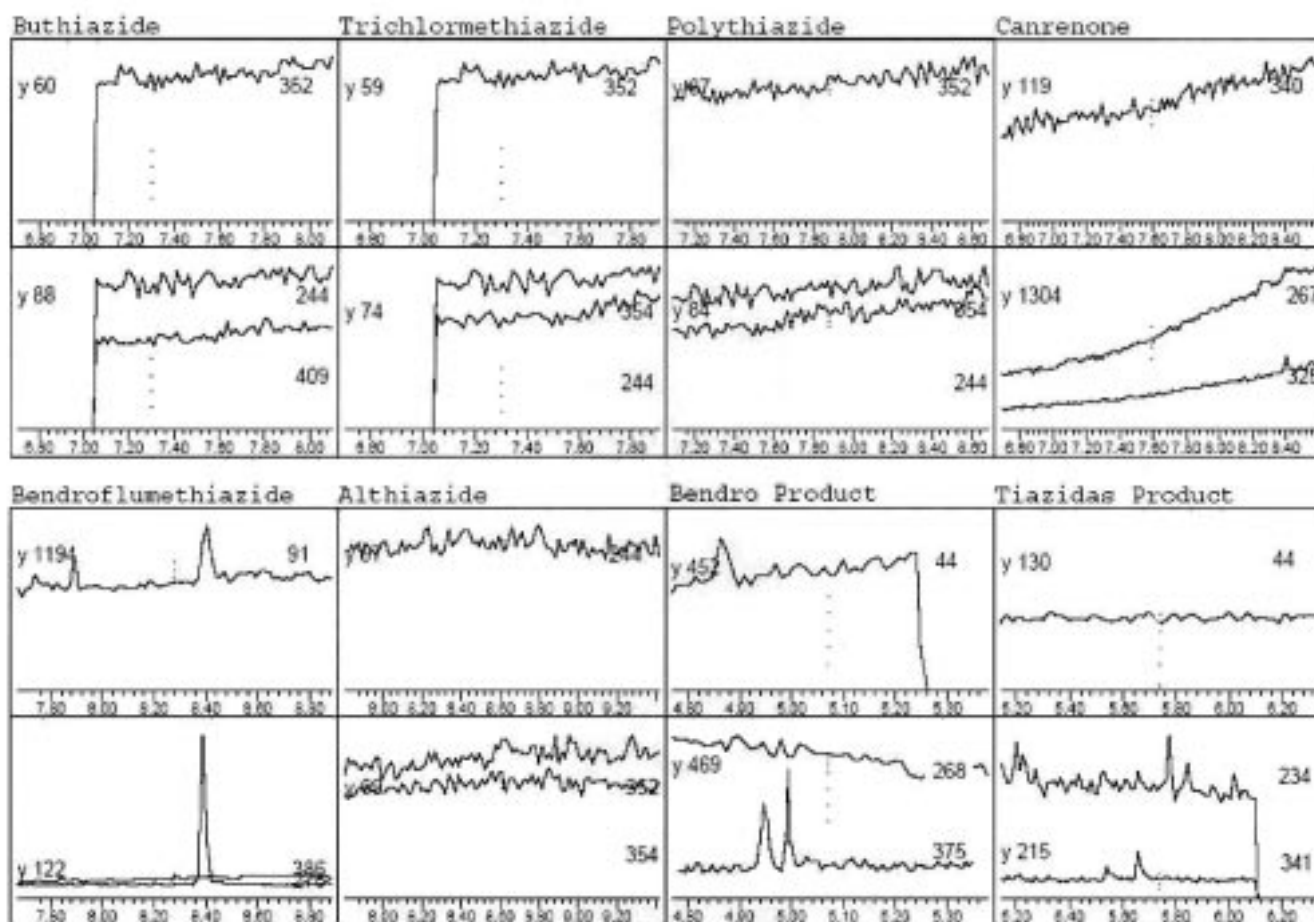
CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la identificación y caracterización estructural por Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas de los compuestos de degradación de las tiazidas (cloroamidofenamida y trifluorometilamidofenamida). Esto permitió dar respuesta a los requerimientos de la Agencia Mundial Antidopaje contenidos en su documento técnico TD2004MPRL y poder emitir resultados analíticos adversos, mediante la identificación de los compuestos de degradación de las benzotiadiazinas. El estudio demostró que a temperaturas de almacenamiento cercanas a la ambiente (alrededor de 35 °C), ocurren procesos degradativos (hidrólisis) que pueden interferir en la calidad de los resultados. Además, se determinó que bajo las condiciones de conservación establecidas (-20 °C), las benzotiadiazinas en orina pueden degradarse. Por eso se propone el pesquaje de los iones m/z 44, 268 y 375 para la bendroflumetiazida y m/z 44, 234 y 341 para el resto de las tiazidas (altiazida, butiazida, meticloziazida, politiazida, triclotiazida).

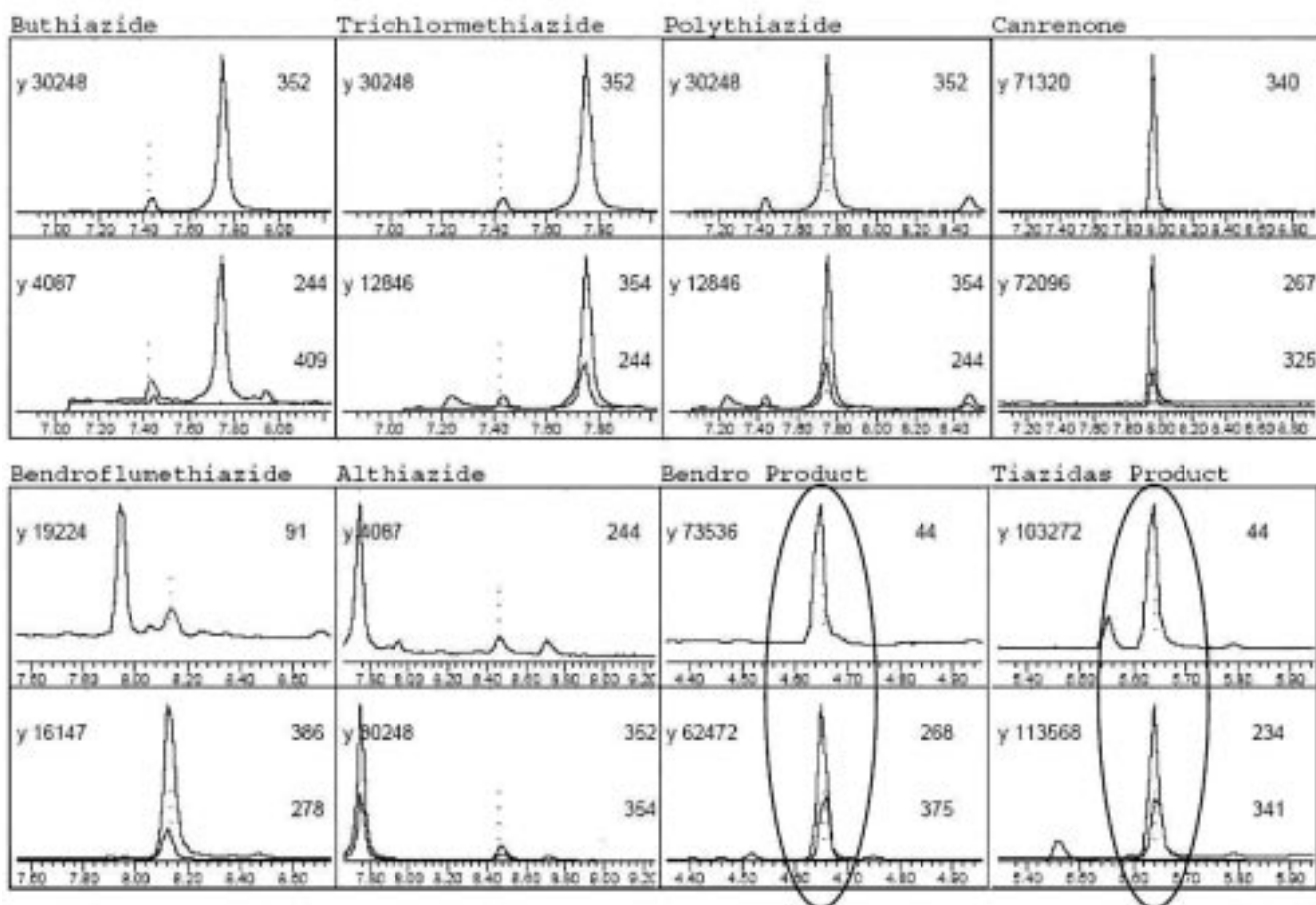
BIBLIOGRAFÍA

- Goodman A., Goodman L., Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. *Editora Rev.* Ciudad de la Habana, 882, 1984. <http://www.wada-ama.org/rtcontent/document/2008> (Consultado: 29 de septiembre de 2008.)
- WADA. The World Antidoping Code. International Standard for the Prohibited List. The 2008 Prohibit List. January, 2008. <http://www.wada-ama.org/rtcontent/document/2008> (Consultado: 29 de septiembre de 2008.)
- Ventura R. and Segura J. Detection of diuretic agents in doping control. *J. Chromat., B.* **687**, 127, 1996.
- Barroso M.B., Meiring H.D., de Jong A., Alonso R.M. and Jimenez R.M. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the loop diuretic torasemide in human urine. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.*, **690**, 105, 1997.
- Hagedorn H.W. and Schulz R. Detection of diuretics in horse urine by GC/MS. *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 194, 1992.
- Carreras D., Imaz C., Navajas R., Garcia M.A, Rodriguez C., Rodriguez A.F and Cortes R. Comparison of derivatization procedures for the determination of diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **683**, 195, 1994.
- Amendola L., Colamonica C., Mazzarino M. and Botré F. Rapid determination of diuretics in human urine by gas chromatography-mass spectrometry following microwave assisted derivatization. *Analytica Chimica Acta*, **475**, 125, 2003.
- Beyer J., Bierl A., Peters F., and Maurer H. Screening procedure for detection of diuretics and uricosurics and/or their metabolites in human urine using gas chromatography mass spectrometry after extractive methylation. *Therapeutic Drug Monitoring*, **24**, 509, 2005.
- Brunelli C., Bicchi C., Di Stilo A., Salomone A. and Vincentin M. High-speed gas chromatography in doping control: fast-GC and fast-GC/MS determination of beta-adrenoceptor ligands and diuretics. *J. Sep. Sci.*, **29**, 2765, 2006.
- Morra V., Davit P., Capra P., Vincenti M., Di Stilo A. and Botré F. Fast gas chromatography/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine. Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. *J. Chromatogr. A.*, **1135**, 219, 2006.
- Zendelovska D., Stafilov T. and Milosevski P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 71, 2004.
- Engelhardt S., Meineke I. and Brockmoller J. Improved solid-phase extraction and HPLC measurement of torasemide and its important metabolites. *J. Chromatogr. B.* **831**, 31, 2006.
- Sanz-Nebot V., Toro I., Bergés R., Ventura R., Segura J. and Barbosa J. Determination and characterization of diuretics in human urine by liquid chromatography coupled to

D:\PROCD-V\06-03-08\BLOR.D



D:\PROCD-V\06-05-07\ORP1-V1.D



- pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, **36**, 652, 2001
14. Thieme D., Grosse J., Lang R., Mueller R.K. and Wahl, A. Screening, confirmation and quantification of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B.**, **757**, 49-57, 2001.
 15. Goebel C., Trout G.J. and Kazlauskas R. Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, **502**, 64, 2004.
 16. Song M., Hang T., Zhao H., Wang L., Ge P. and Ma P. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionisation. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **21**, 3427, 2007.
 17. Politia L, Morinia L. and Poletini A. A direct screening procedure for diuretics in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with information dependent acquisition. **Clinica Chimica Acta**, **386**, 46, 2007.
 18. Liu F, Xu Y., Gao S., Zhang J., and Guo Q. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.** **44**, 1187, 2007.
 19. Tsai T.F and Lee M.R. Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for detecting diuretics in urine. **Talanta**, **75**, 658, 2008.
 20. Rodríguez J., Berzas J.J. Durán I. and Rodríguez M.J. Capillary electrophoretic determination of triamterene, methotrexate, and creatinine in human urine. **J. Sep. Sci.**, **28**, 658, 2005.
 21. Zhang L., Tong P., He Y., Huang D. and Chen G. Study of capillary electrophoresis with end-column electrochemical detection for the diuretics of hydrochlorothiazide and triamterene. **Se. Pu.**, **23**, 22, 2005.
 22. Yang X., Wang X. and Zhang X. Indirect laser-induced fluorescence detection of diuretics separated by capillary electrophoresis. **J. Sep. Sci.**, **29**, 577, 2006.
 23. Tolba K and Belder D. Fast quantitative determination of diuretic drugs in tablets and human urine by microchip electrophoresis with native fluorescence detection. **Electrophoresis**, **28**, 2934, 2007.
 24. Draganova-Tsoutsoulova A. Investigation on products of thiazide diuretics in human urine. Recent advances in doping analysis, Vol. 2. Schänzer *et al.* (eds.). Sport und Buch Straub, Köln, Germany, 357-366, 1994.
 25. Thevis M. and Schanzer W. Mass spectrometry in sports drug testing: structure characterization and analytical assays. **Mass Spectrometry Reviews**, **26**, 79, 2007.
 26. WADA. TD2004MPRL, Minimum required performance limits for detection of prohibited substances. WADA Technical Document 2004. Version 1.0. Available <http://www.wada.ama.org/>. (Consultado: 3 de junio de 2008).
 27. Morrison y Boyd. Química Orgánica. Capítulo 14. Sustitución electrofílica aromática. Rosa Zugagoitia, Peter Fielder, Cristina Rock.(eds.) México, 511-514,1998.