

TESI DOCTORAL

**DETECCIÓ DEL CONSUM D'AGENTS ANABOLITZANTS
EN HUMANS: ESTRATÈGIES ALTERNATIVES DE
PREPARACIÓ DE MOSTRES I ANÀLISI INSTRUMENTAL**

Josep Marcos del Àguila

2004

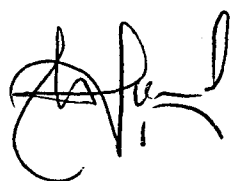
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra

**DETECCIÓ DEL CONSUM D'AGENTS ANABOLITZANTS
EN HUMANS: ESTRATÈGIES ALTERNATIVES DE
PREPARACIÓ DE MOSTRES I ANÀLISI INSTRUMENTAL**

Memòria presentada per Josep Marcos del Àguila per optar al grau de Doctor
per la Universitat Pompeu Fabra.

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Josep Antoni Pascual Esteban, a la
Unitat de Recerca en Farmacologia de l'Institut Municipal d'Investigació
Mèdica de Barcelona (IMIM).

Programa de Doctorat de la Universitat Pompeu Fabra, bienni 1999-2001.



Signatura del director de la tesi
Dr. Josep Antoni Pascual Esteban



Signatura del doctorand
Josep Marcos del Àguila

A Marisa y a mis padres

Agraïments:

Al Dr. Josep Antoni Pascual, per la direcció d'aquesta tesi doctoral. Per animar-me a la realització d'aquest treball i ajudar-me a superar el repte amb la seva dedicació i estímul constant. Sense el seu ajut aquest treball no hagués estat possible.

Al Dr. Jordi Segura, per haver-me donat la oportunitat de formar part de l'excel·lent grup de recerca que ell dirigeix. La seva confiança i els seus esforços personals són unes de les raons principals per les que avui aquesta Tesi es veu completada.

Al Dr. Xavier de la Torre, per la seva generositat a l'hora de compartir els seus extraordinaris coneixements sobre l'anàlisi d'esteroides.

Al Josep Carles González, per ser el millor company imaginable i esforçar-se en demostrar-ho dia rera dia.

A tots i cadascun dels companys de la Unitat de Recerca en Farmacologia de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica amb els que he tingut el privilegi de treballar des de Desembre del 1996 a Abril del 2002. Per les seves petites i no tan petites contribucions.

A l'ajut rebut per part de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) per a l'enquadernació d'aquesta tesi.

ESTRUCTURA DE LA PRESENT MEMÒRIA

La memòria que es presenta està estructurada en sis capítols:

- En el *primer* (1) es presenta una introducció general d'**antecedents** sobre els agents anabolitzants i la detecció del seu abús en l'àmbit del control antidopatge.
- En el *segon* (2) capítol, un cop exposats aquests antecedents, s'exposen els **objectius** d'aquesta Tesi Doctoral.
- En els capítols *tercer* (3), *quart* (4) i *cinquè* (5) es descriu el **treball experimental** realitzat en el desenvolupament de noves estratègies analítiques per a la detecció d'agents anabolitzants en orina humana.

L'estructura interna de cadascun d'aquests capítols i dels seus sub-capítols conté:

- una curta introducció específica al treball concret.
- el treball experimental realitzat (bé en forma de la pròpia publicació científica final o, descrit com a treball addicional no publicat incloent la corresponent discussió).

Així:

Al *capítol 3* es descriu el desenvolupament d'un mètode basat en la cromatografia líquida capil·lar per a la quantificació de les concentracions de testosterona i epitestosterona (que inclou la publicació: **Marcos J. et al. .J Microcolumn Separations 2000; 12(12): 623-629**)

Al *capítol 4*, s'engloben els resultats obtinguts durant l'estudi de la preparació de les mostra prèvia a l'anàlisi instrumental. Es descriu la purificació de les mostres mitjançant cromatografia líquida convencional (que inclou la publicació: **Marcos J. et al. .Anal Chim Acta 2004. Acceptat**) i mitjançant cromatografia d'immunoafinitat (com a treball addicional no publicat).

Al *capítol 5*, es discuteix l'aplicació de noves estratègies per a l'anàlisi instrumental. Es presenten els resultats obtinguts en l'aplicació de la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem, a l'hora de millorar la sensibilitat instrumental (que inclou la publicació: **Marcos J. et al. .J Mass Spectrom 2002; 37: 1059-1073**). També es discuteix la utilització de procediments de derivatització alternatius (publicats a **Marcos J Marcos et al. A: Control de dopaje: aspectos analíticos de sustancias**

*prohibidas en el deporte. Estudios sobre ciencias del deporte 31. CSD.
Ministerio de Educación Cultura y Deporte. 2001: 9-60.*

- .- Al capítol sisè (6) es presenta una **discussió** global de tots els resultats obtinguts.

- .- Al capítol setè (7) es poden trobar les **conclusions**.

- .- Al capítol vuitè (8) es llista la **bibliografia que no apareix específicament a les publicacions**.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. AGENTS ANABOLITZANTS I L'ANÀLISI DE CONTROL ANTIDOPATGE	3
1.1.1. CONTROL ANTIDOPATGE	3
1.1.2. CLASSIFICACIÓ DELS AGENTS ANABOLITZANTS	4
1.1.3. TESTOSTERONA	6
1.1.4. HISTORIA I PROPIETATS DELS AGENTS ANABOLITZANTS	11
1.1.4.1 <i>PERSPECTIVA HISTÒRICA</i>	11
1.1.4.2 <i>EFFECTES I REPERCUSSIO DEL CONSUM D'ESTEROIDES</i>	12
1.1.5. METABOLISME I EXCRECIÓ DELS AGENTS ANABOLITZANTS	13
1.1.5.1 <i>REACCIONS DE FASE I</i>	13
1.1.5.2 <i>REACCIONS DE FASE II</i>	14
1.1.5.3 <i>METILTESTOSTERONA</i>	15
1.1.5.4 <i>METANDIENONA</i>	16
1.1.5.5 <i>ESTANOZOLOL</i>	16
1.1.5.6 <i>NANDROLONA</i>	17
1.1.5.7 <i>CLENBUTEROL I ALTRES β_2-AGONISTES</i>	18
1.2. DETECCIÓ DELS AGENTS ANABOLITZANTS EN ORINA HUMANA	19
1.2.1. PROCEDIMENTS ANALÍTICS CLASICS	19
1.2.2. LA TESTOSTERONA I LA DETECCIÓ DEL SEU ABÚS	21
1.2.3. APLICACIÓ DE MÈTODES ALTERNATIUS	23
2. OBJECTIUS	25
3. QUANTIFICACIÓ DE TESTOSTERONA I EPITESTOSTERONA PER CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA CAPIL·LAR.....	29
3.1. INTRODUCCIÓ.....	30
3.1.1 HPLC CAPIL·LAR VERSUS HPLC CONVENCIONAL	30
3.1.2 FLUXE CAPIL·LAR	30
3.1.3 SISTEMES DE BOMBEIG	31
3.1.4 VOLUM D'INJECCIÓ.....	34
3.1.5 DETECCIÓ	37

3.2 QUANTIFICATION OF TESTOSTERONE AND EPITESTOSTERONE IN HUMAN URINE BY CAPILLARY LIQUID CHROMATOGRAPHY	40
4. MÈTODES ALTERNATIUS EN LA PREPARACIÓ DE LES MOSTRES.....	49
4.1 PREPARACIÓ DE MOSTRES MITJANÇANT TÈCNiques DE CROMATOGRÀFIA D'IMMUNOAFINITAT	52
4.1.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS.....	52
4.1.2. MATERIAL I MÈTODES.....	54
4.1.3. RESULTATS	55
4.1.3.1 CARACTERITZACIÓ DE LES COLUMNES.....	55
4.1.3.2 ANÀLISI D'ORINES.....	56
4.1.3.3 MÈTODES DE CONFIRMACIÓ	59
4.1.3.4 ESTABILITAT DEL GELS.....	63
4.1.4. DISCUSSIÓ.....	67
4.2 PREPARACIÓ DE MOSTRES MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA	69
4.2.1 ANTECEDENTS.....	69
4.2.2 LIQUID CHROMATOGRAPHY CLEAN-UP METHOD TO IMPROVE IDENTIFICATION OF ANABOLIC AGENTS IN HUMAN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY	70
5. APLICACIÓ DE NOVES ESTRATÈGIES INSTRUMENTALS.....	95
5.1 FORMACIÓ DE DERIVATS ALTERNATIUS.....	97
5.1.1 ANTECEDENTS I OBJECTIUS	97
5.1.2. MATERIAL I MÈTODES.....	98
5.1.2.1 REACTIUS.....	98
5.1.2.2 INSTRUMENTAL	98
5.1.3. RESULTATS	99
5.1.4. DISCUSSIÓ.....	106
5.2 APLICACIÓ DE L'ESPECTROMETRIA DE MASSES DE TRAMPA IÒNICA	114
5.2.1. ANTECEDENTS.....	114

5.2.2. <i>FAST SCREENING OF ANABOLIC STEROIDS AND OTHER BANNED DOPING SUBSTANCES IN HUMAN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY</i>	117
6. DISCUSSIÓ	133
7. CONCLUSIONS	139
8. BIBLIOGRAFIA	143

ABREVIACIONS

AMA	Agencia Mundial Antidopatge
CIO	Comite Internacional Olimpic
CMO-BSA	Carboximethyloxime-bovine serum albumin
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	5 α -dihidrotestosterona
E. Coli	Escherichia Coli
EEUU	Estats Units d'America
GC/HRMS	Cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses d'alta resolucio
GC/MS	Cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses
HPLC	Cromatografia liquida d'alta resolucio.
IAC	Cromatografia d'immunoafinitat
ID	Diametre intern
MIAC	Multidimensional Immunoaffinity Chromatography
MS/MS	Espectrometria de masses en tandem.
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
P450scc	<i>P450 side chain cleavage</i>
PBS	Solucio de tampo fosfat
S/N	Relacio senyal/soroll
SIM	Selective ion monitoring
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
T/E	Quocient entre les concentracions de testosterona i epitestosterona
TBS	<i>terc-butyl-dimetilsilil</i>
TMS	Trimetilsilil
UV	Ultraviolada

Capítol 1.
INTRODUCCIÓ

1.1. AGENTS ANABOLITZANTS I L'ANÀLISI DE CONTROL ANTIDOPATGE

1.1.1. CONTROL ANTIDOPATGE

El mal ús de fàrmacs per part d'esportistes és un problema ètic i de salut des de fa més de 30 anys. Està considerat com a dopatge l'administració de substàncies prohibides o la utilització de mètodes prohibits [International Olympic Committee, 2003].

Les *substàncies prohibides* es classifiquen segons el grup farmacològic al que pertanyen: estimulants, narcòtics, cannabinoides, agents anabolitzants, hormones peptídiques, beta-2 agonistes, agents amb activitat anti-estrogènica, agents enmascarants (incloent diürètics, epitestosterona, probenecid i els expandors de plasma) i glucocorticoides. Addicionalment, algunes substàncies estan específicament prohibides només en alguns esports (per exemple l'alcohol, els beta-blocadors o els diürètics). Està prohibit l'ús de qualsevol substància que pertanyi a algun d'aquests grups, encara que la substància en concret no aparegui explícitament a la llista d'exemples representatius publicada anualment pel Comitè Internacional Olímpic (CIO) i per l'Agència Mundial Antidopatge (AMA).

Els *mètodes prohibits* inclouen l'administració de qualsevol producte que augmenti la transferència d'oxigen (sang o qualsevol altre tipus de producte sanguini, hemoglobines, eritropoietina, compostos perfluorocarbonats i efaproxiral), l'alteració de la integritat de la mostra d'orina mitjançant manipulacions físiques, químiques o farmacològiques, i el dopatge genètic.

És conegut que la millora del rendiment per part de molts esportistes està parcialment lligada a la pràctica de dopatge, però l'extensió d'aquest abús no és del tot coneguda. Possiblement les dades més fiables les trobem a les estadístiques del CIO, que fins l'any passat era l'organisme encarregat d'acreditar els laboratoris responsables de dur a terme el control antidopatge. Durant l'any 2002, els 26 laboratoris llavors acreditats arreu del món, varen globalment analitzar més de 131.000 mostres d'esportistes. El percentatge de casos positius trobats va ser de l'1.8% [Segura J, 2002].

Amb l'objectiu de reduir aquest percentatge, durant els darrers anys les federacions esportives nacionals i internacionals han reforçat la lluita contra el dopatge.

A més de formular normatives antidopatge similars a les del CIO, s'ha produït un constant augment en el nombre de mostres analitzades al llarg dels anys. D'aquesta forma dels 34.000 controls realitzats a l'any 1986, es va passar als gairebé 131.000 a l'any 2002.

Cal destacar que també s'ha produït un augment en el percentatge de controls corresponents a mostres *fora de competició*, es a dir mostres recollides durant períodes d'entrenament i en molts casos sense previ avis. Aquest tipus de controls van passar de representar un 17% del total de controls anuals al 1987 a representar un 65.5% al 1994 [Catlin DH, 1997; Segura J, 2002]. Donades les pautes de consum d'alguns dels productes abusats, la realització de controls fora de competició és un dels elements dissuasius més importants.

Conjuntament, la millora en les tècniques instrumentals i el desenvolupament de noves estratègies analítiques per part dels laboratoris ha suposat i continua suposant un avanç en la detecció d'aquest frau.

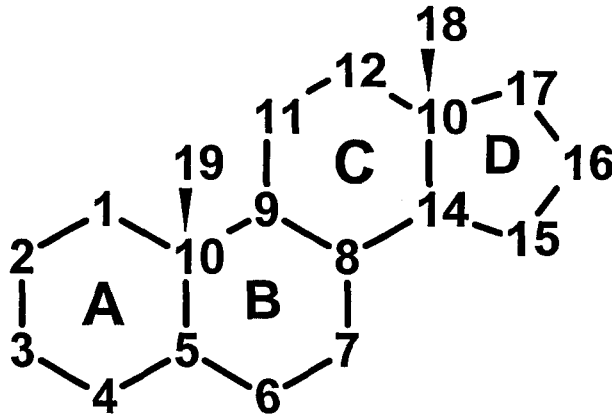
1.1.2 CLASSIFICACIO DELS AGENTS ANABOLITZANTS

Entre els diferents grups de substàncies prohibides, el grup dels agents anabolitzants és el que té una incidència més gran, representant un 51.3% al 2002 [Segura J, 2002]. A més de per la seva elevada incidència, el control del seu abús és d'especial importància degut al dany que pot representar per a la salut de l'esportista.

Dins d'aquest grup de compostos cal diferenciar entre esteroides anabolitzants androgènics i β_2 -agonistes. Quan parlem d'esteroides anabolitzants fem referència a l'hormona sexual masculina testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona) i als seus derivats sintètics o naturals. Així doncs, els esteroides anabolitzants es classifiquen en dos grans grups: esteroides endògens, és a dir aquells que són produïts pel nostre organisme, i els esteroides exògens.

Químicament, els esteroides són una família de compostos amb una estructura basada en un esquelet de quatre anells condensats del sistema del ciclopentàperhidrofenantrè. A la figura 1-1 es presenta la nomenclatura per a designar els anells i la numeració dels àtoms de carboni internacionalment acceptada.

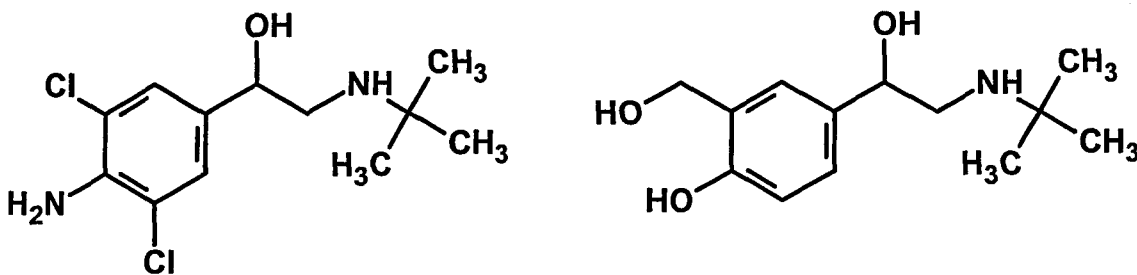
Figura 1-1. Representació convencional de l'estructura esteroïdal bàsica dels andrògens, indicant les lletres i els números utilitzats per designar els anells i els àtoms de carboni, respectivament.



Es important destacar que l'estructura esteroïdal es més complicada del que sembla al ser representada en dues dimensions. La tridimensionalitat de la molècula està causada per la disposició en forma de cadira dels anells de sis àtoms de carboni i perquè les valències lliures dels àtoms de carboni involucrats en els anells no estan confinades en el pla de la estructura cíclica. Per conveni, està establert que els grups metil C18 i C19 defineixen la cara superior del pla esteroïdal que es anomenada cara β de la molècula. La cara inferior es la cara α .

D'altra banda, els β_2 -agonistes són una família de compostos amb una estructura química i unes propietats farmacològiques similars. Tots ells presenten una estructura basada en una β -fenil- β -etanolamina a la que se li incorporen diferents substituents al nitrogen de la amina i a l'anell fenòlic. A la figura 1-2 es representen les estructures del clenbuterol i del salbutamol, els dos β_2 -agonistes amb una major incidència en el control antidopatge.

Figura 1-2. Estructures químiques del clenbuterol (esquerra) i salbutamol (dreta).



Els β_2 -agonistes son administrats en el tractament de problemes pulmonars, particularment en el tractament de l'asma, que es la síndrome pulmonar més comuna en esportistes [Weiler JM, 1997]. A més de l'activitat estimulants en la respiració i en el sistema nerviós central [Schaffler K, 1985], la seva administració produeixen certs efectes anabòlics, depenent de la dosi i de la ruta d'administració [Martineau L, 1992].

En quantitats adequades aquests compostos tindrien un efecte anabòlic a través de la seva acció sobre el metabolisme lipídic i proteic [Buyse J, 1990; Fiems LO, 1991]. Així, el clenbuterol és utilitzat després d'una pauta d'esteroides i d'un significatiu increment de la massa muscular per passar a una fase de "definició" dels músculs en els fisiculturistes (supressió del greix subcutani per ressaltar la musculatura assolida).

1.1.3 TESTOSTERONA

La testosterona és la principal hormona esteroïdal endògena. Va ser descoberta l'any 1935 per David i col·laboradors [David K, 1935] en ser aïllada dels testicles de bous. El mateix any, la seva estructura va ser elucidada independentment per Ruzicka i Wettstein. Aquest treball va merèixer el premi Nobel de química l'any 1939.

Com tota la resta d'esteroides endògens, és sintetitzada a partir del colesterol. El colesterol és transportat a la mitocòndria a través de la proteïna StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*), un cop a la mitocòndria es transforma en pregnenolona (reacció catalitzada per l'enzim P450_{scc}), i aquesta darrera és transportada al reticle endoplasmàtic. En el reticle, la pregnenolona és convertida a testosterona mitjançant dues vies biosintètiques diferents, la denominada via delta-5 a través de la 17-hidroxi-pregnenolona, dehidroepiandrosterona i 5-androsten-3 β ,17 β -diol i la via delta-4 a través de la 17-hidroxi-progesterona i la 4-androstendiona (figura 1-3).

La testosterona es metabolitza a nivell hepàtic en androsterona (3 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona) i etiocolanolona (3 α -hidroxi-5 β -androstan-17-ona). A determinats teixits perifèrics la testosterona és transformada a 5 α -dihidrotestosterona (DHT). L'activitat de la testosterona s'ha de contemplar tenint en compte la seva transformació a esteroides amb major activitat androgènica (DHT) (figura 1-4).

La testosterona no pot ser administrada per via oral degut a que és ràpidament absorbida i biodegradada dins l'organisme. Així doncs, al llarg de la història s'han introduït successives modificacions químiques en la seva estructura per tal de retardar la seva velocitat d'absorció i/o el seu catabolisme. Amb això s'assoleixen nivells dins l'organisme més sostinguts, en ocasions administrant dosis d'anabolitzant menors.

Figura 1-3. Biosíntesi dels esteroides andrògens.

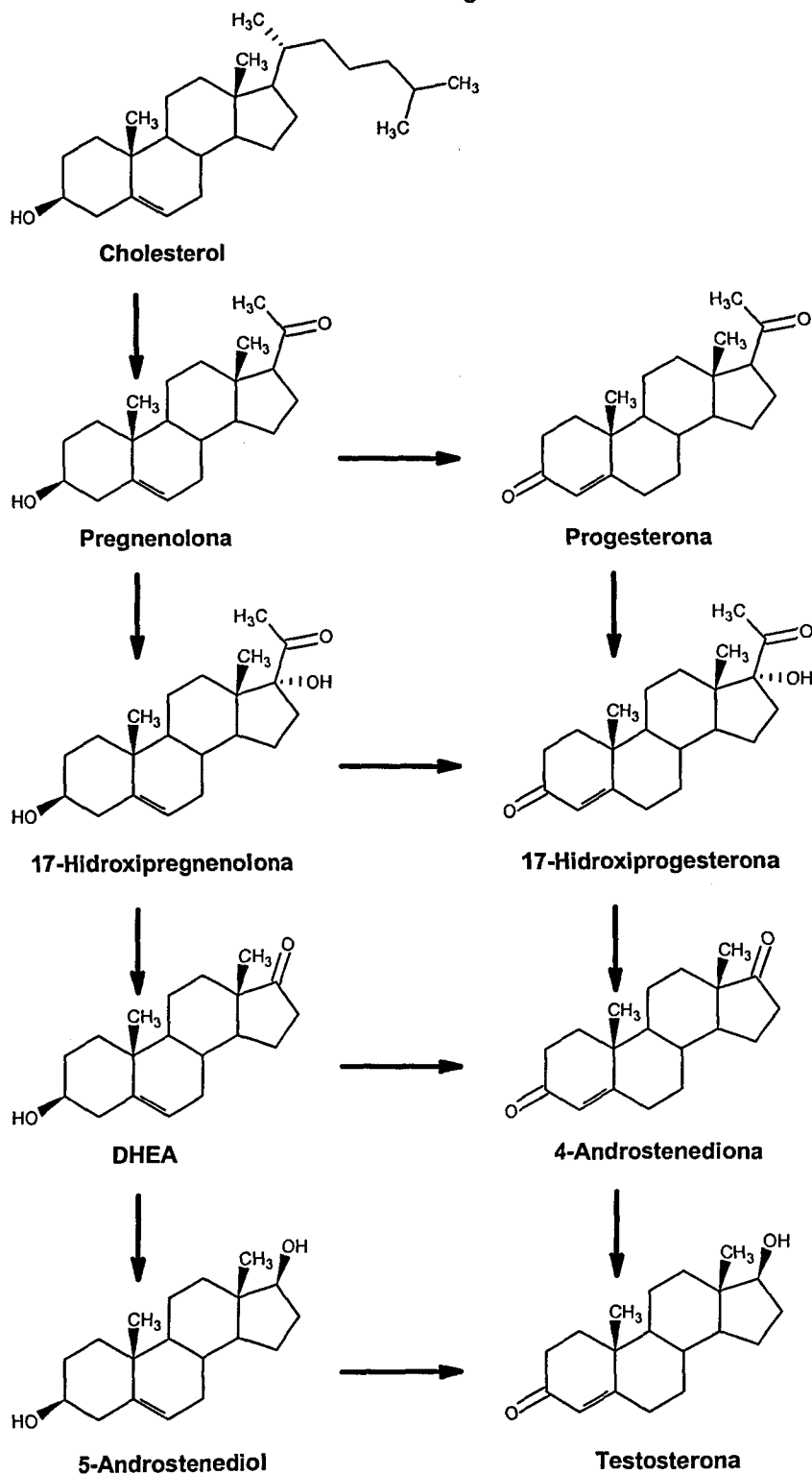
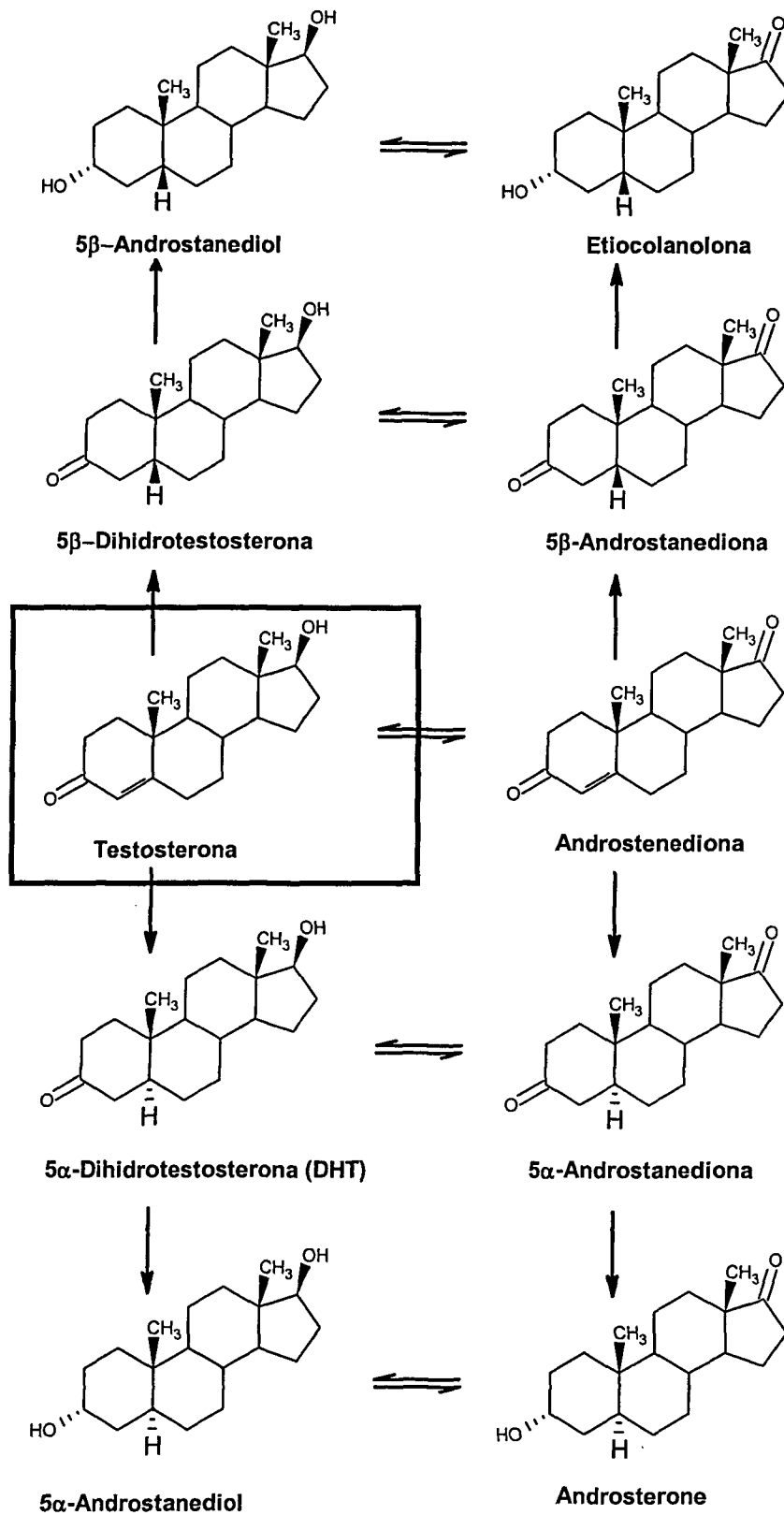


Figura 1-4. Principals rutes metabòliques de la testosterona.

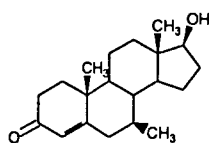


Les modificacions estructurals que han demostrat ser les més efectives són: esterificació del grup hidroxil en la posició 17 β , alquilació de la posició 17 α , metilació a les posicions 1, 2 i 7, fluoració a la posició 9 i formació de 19-nor derivats. Alguns dels esteroides anabolitzants exògens obtinguts mitjançant aquestes modificacions es representen a la figura 1-5. Els seus noms comuns i sistemàtics es recullen a la taula 1-1.

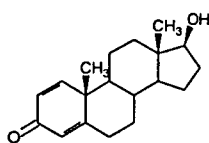
Taula 1-1. Principals esteroides anabolitzants exògens.

Nom comú	Nom sistemàtic
4-clormetandienona	4-clor-17 α -metilandrosta-1,4-dien-17 β -ol-3-ona
Bolasterona	7 α ,17 α -dimetilandrosta-4-en-17 β -ol-3-ona
Boldenona	Androst-1,4-dien-17 β -ol-3-ona
Calusterona	7 β ,17 α -dimetilandrosta-4-en-17 β -ol-3-ona
Closterbol	4-clorandrosta-4-en-17 β -ol-3-ona
Drostanolona	2 α -metil-5 α -androsta-17 β -ol-3-ona
Estanozolol	17 α -metil-17 β -hidroxi-5 α -androsta-2-eno[3,2-c]pirazol
Esterbolona	2 α -metil-5 α -androsta-1-en-17 β -ol-3-ona
Fluoximesterona	9 α -fluor-17 α -metilandrosta-4-ene-11 β ,17 β -diol-3-ona
Formebolona	2-formil-17 α -metilandrosta-1,4-diene-11 α ,17 β -diol-3-ona
Furazabol	17 α -metil-5 α -androsta[2,3-c]-[1,2,5]-oxadiazol-17 β -ol
Mestanolona	17 α -metil-5 α -androsta-17 β -ol-3-ona
Mesterolona	1 α -metil-5 α -androsta-17 β -ol-3-ona
Metandienona	17 α -metilandrosta-1,4-dien-17 β -ol-3-ona
Metenolona	1-metil-5 α -androsta-1-en-17 β -ol-3-ona
Methandriol	17 α -metilandrosta-5-ene-3 β ,17 β -diol
Metiltestosterona	17 α -metilandrosta-4-en-17 β -ol-3-ona
Mibolerona	7 α ,17 α -dimetilestra-4-en-17 β -ol-3-ona
Nandrolona	Estra-4-en-17 β -ol-3-ona
Noretandrolona	17 α -etil-estra-4-en-17 β -ol-3-ona
Oxandrolona	17 α -metil-2-oxa-5 α -androsta-17 β -ol-3-ona
Oximesterona	17 α -metilandrosta-4-ene-4,17 β -diol-3-ona
Oximetolona	2-hidroximetilene-17 α -metil-5 α -androsta-17 β -ol-3-ona
Trenbolona	17 β -hidroxiestra-4,9,11-trien-3-ona

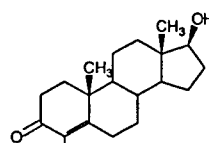
Figura 1-5. Estructures químiques dels esteroides anabolitzants exògens mes importants.



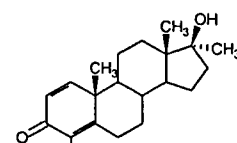
Bolasterona



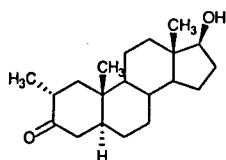
Boldenona



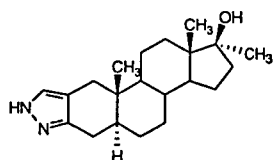
Clostebol



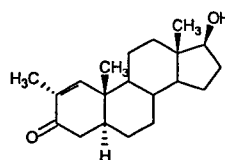
4-Clormetandienona



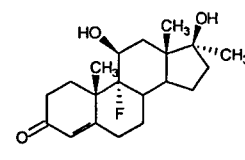
Drostanolona



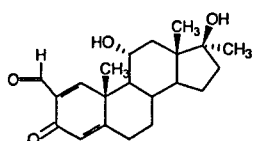
Estanozolol



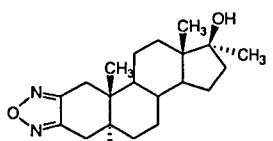
Estenbolona



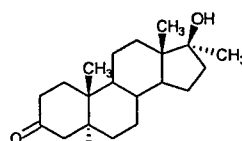
Fluoximesterona



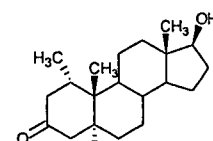
Formebolone



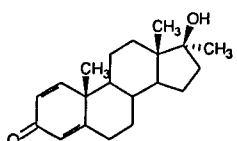
Furazabol



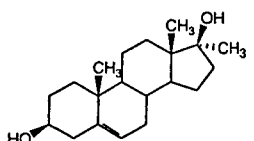
Mestanolona



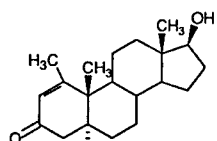
Mesterolona



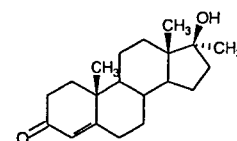
Metandienona



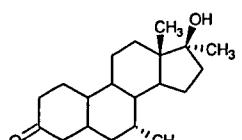
Metandriol



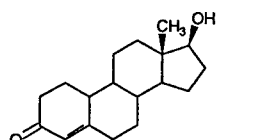
Metenolona



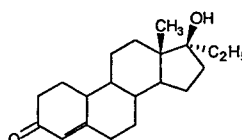
Metiltesterona



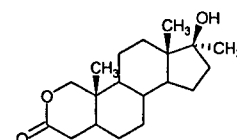
Mibolerona



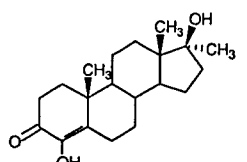
Nandrolona



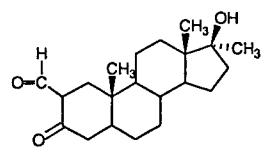
Noretandrolona



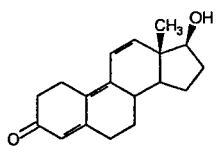
Oxandrolone



Oximesterona



Oximetolone



Trenbolona

Per via oral s'acostumen a administrar compostos alquilats a la posició 17 α , 1, 2 i 7 o bé esters en la posició 17 β . L'administració per via intramuscular s'utilitza quan s'esterifica la testosterona amb diversos àcids carboxílics (propionat, cipionat, enantat, etc.). És important remarcar que en cap dels casos, els efectes anabolitzants i androgènics no s'han pogut separar.

1.1.4 HISTÒRIA I PROPIETATS DELS AGENTS ANABOLITZANTS

1.1.4.1 PERSPECTIVA HISTORICA

L'ús d'esteroides anabolitzants a l'esport va començar als anys 1950. Es pensa que ja es van utilitzar en disciplines de força durant els Jocs Olímpics de Melbourne, el 1956. Es va accelerar durant els anys 1970, i als anys 1980 el seu impacte als esports era evident [Catlin DH, 1990; Dickman S, 1991].

El seu ús va ser prohibit per primera vegada als Jocs Olímpics de Montreal de 1976, on es varen portar a terme els primers controls per a la detecció d'esteroides anabolitzants a l'orina. Aquelles primeres anàlisis es varen fer mitjançant tècniques de radioimmunoassaig [Brooks RV, 1975; Tchaikowsky V, 1979] i els casos positius es varen confirmar per cromatografia de gasos acoblada a la espectrometria de masses (GC/MS).

A partir de llavors, els mètodes per a la detecció rutinària mitjançant espectròmetres de masses es varen perfeccionar cada cop més. Així, en els primers dies dels Jocs Panamericans celebrats a Caracas el 1983 varen ser trobats 7 casos positius per esteroides, el que va provocar que una dotzena d'atletes nord-americans abandonessin els jocs abans de competir al·legant lesions o motius personals. Al final dels jocs, i malgrat que no tots els atletes varen ser controlats, 19 atletes varen perdre les seves medalles pel consum d'esteroides anabolitzants.

Els β_2 -agonistes varen ser incorporats a la llista de substàncies prohibides al 1992 [De la Torre R, 1995]. Són considerats agents anabolitzants ja que, depenent de la dosi i la via d'administració, poden tenir importants efectes anabòlics. Actualment, només està permès l'ús per via inhalatòria del salbutamol, el salmeterol i la terbutalina, sempre i quan la seva administració sigui declarada abans de la competició.

1.1.4.2. EFECTES I REPERCUSSIÓ DEL CONSUM D'ESTEROIDES.

Els esteroides anabolitzants incrementen la massa muscular a través d'un increment de la síntesi de proteïnes per la interacció de l'esteroide amb el seu receptor i a través d'efectes anti-catabolitzants en inhibir els efectes dels glucocorticoides en situacions d'estrès. També contribueix al guany en la massa muscular l'estat d'eufòria en alguns casos o de menor fatiga que permet a l'organisme tolerar càrregues de treball superiors en els períodes d'entrenament [Lamb DR, 1984; Celotti F, 1992; Forbes GB, 1992].

Respecte als efectes indesitjables cal dir que els esteroides anabolitzants administrats en dosis elevades i de forma repetida poden crear alteracions importants en l'equilibri homeostàtic e immunològic de l'individu i son un risc per a la salut. Entre els efectes adversos més importants cal mencionar l'augment dels factors de risc de patologies cardiovasculars [Allen M, 1985; Mc Nutt RA, 1988; Huie MJ, 1994], disfuncions hepàtiques (canvis estructurals intrahepàtics, colestasis ictèrica, tumors) [Wilson JD, 1988; Creagh TM, 1988; Ishak KG, 1981], efectes endocrinològics com per exemple depressió de la producció d'hormones testiculars i gonadotrofines, esterilitat, atrofia testicular i ginecomastia en l'home o inhibició de la ovulació i virilització en la dona [Hickson RC, 1989; Moore WV, 1988], efectes psicològics (especialment agressivitat i dependència) [Malone DA, 1995; Kouri EM, 1996].

Per tot això, la seva administració terapèutica només està indicada en situacions clíniques molt concretes com el hipogonadisme masculí, algunes alteracions ginecològiques com la endometriosi, càncer de mama, osteoporosi i algunes anèmies o estats d'extrema debilitat [Hollard D, 1976; Basaria S, 2001]. En tots els casos es necessari un estricte control mèdic del tractament i han de ser subministrats amb recepta mèdica segons indica la Ordre de 7 de Novembre de 1985 del Ministeri de Sanitat i Consum.

En diversos països (p.e. Suècia, Canadà, EEUU) existeixen normatives en les que s'intenta equiparar el status dels esteroides anabolitzants amb les clàssiques drogues d'abús (p.e. cocaïna o heroïna), respecte a la seva possessió, producció i distribució il·lícita.

El consum de β_2 -agonistas s'ha introduït més recentment substituint parcialment als esteroides anabolitzants. La seva utilització s'ha beneficiat de l'experiència adquirida en el camp agroalimentari en el engreix de bestiar i el seu us ha crescut degut a la creença

popular que el seu consum no implica alguns dels efectes indesitjables associats al dels esteroides anabolitzants.

1.1.5 METABOLISME I EXCRECIÓ DELS AGENTS ANABOLITZANTS

Degut a que la majoria d'esteroides anabolitzants són metabolitzats extensivament, la detecció de l'esteroide inalterat només és possible durant un curt període de temps després de la seva administració. Així doncs, a la majoria dels casos, la detecció del seu ús es basa en la identificació dels metabòlits principals de cadascun dels esteroides exògens. Conseqüentment, part de la recerca en aquest camp ha estat encaminada a l'estudi del metabolisme dels esteroides exògens en humans, l'elucidació de les estructures químiques dels metabòlits [Masse R, 1989; Deboer D, 1992; Schanzer W, 1996] i la síntesi química de materials de referència adequats [Schanzer W, 1992; Saugy M, 2000].

El metabolisme dels esteroides anabolitzants té com a objectiu convertir l'esteroide en substàncies més polars per tal de inactivar-lo i facilitar la seva eliminació a través de l'orina. Aquestes transformacions generalment es divideixen en dos grups denominats reaccions de Fase I i de Fase II.

Les reaccions denominades de Fase I inclouen oxidacions, reduccions i hidroxilacions. Les reaccions de Fase II, són reaccions de conjugació de l'esteroide amb una molècula d'àcid glucurònic o un grup sulfat.

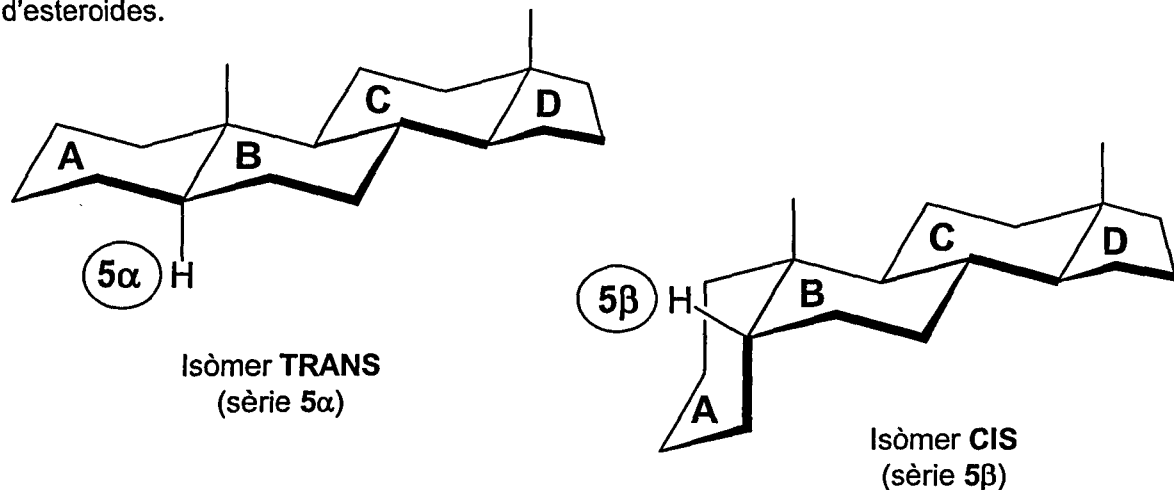
1.1.5.1. Reaccions de Fase I

Com es pot observar a la figura 1-5, molts dels esteroides exògens presenten una estructura de enona a les posicions C3-C5. La reacció limitant en el metabolisme d'aquests esteroides és la reducció del doble enllaç C4-C5, reacció catalitzada per la 5 α -reductasa i/o la 5 β -reductasa [Clark AF, 1979]. Depenent de quin dels dos enzims actuï, l'hidrogen unit al C5 es troba per sota de l'estructura de l'esteroide produït (5 α -esteroide), o bé per sobre (5 β -esteroide).

El nou centre d'asimetria creat en la molècula fa que les dues series de compostos generats presentin estructures tridimensionals prou diferents. Com es pot observar a la figura 1.6, en els 5 β -androstans l'àtom d'hidrogen es troba en la cara β de la molècula i

l'anell A ja no es troba en el mateix pla que els anells B, C i D, ara es troba en un segon pla gairebé perpendicular al primer.

Figura 1.6. Isomerisme cis-trans en la unió dels anells A-B donant lloc a les series 5α i 5β d'esteroides.



Un cop el doble enllaç ha estat eliminat, la cetona és immediatament reduïda. En els 5α -esteroides la reacció pot ser catalitzada per la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa o per la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa [Bower DB, 1984]. En canvi, sembla ser que els 5β -esteroides únicament són reduïts per la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, ja que cap 3β -hidroxi- 5β -esteroide ha estat identificat [Schanzer W, 1996].

L'afinitat envers una o altra ruta metabòlica depèn de l'estructura de l'esteroide administrat. Així per exemple, la metandienona i la boldenona (3-ceto-1,4-dien-androstans) no produeixen 5α -metabòlits [Galletti F, 1971; Schanzer W, 1992].

Altres reaccions de fase I inclouen 6β -, 16α - i 16β -hidroxilacions, 17-oxidació dels 17β -hidroxils i 17β -hidroxilació i 17α -hidroxilacions dels grups 17-cetònics.

1.1.5.2. Reaccions de Fase II

Les reaccions de conjugació faciliten l'eliminació dels esteroides i/o els seus metabòlits. Com a norma general es pot dir que els 3α -hidroxiesteroides són transformats en glucuronids, independentment de si tenen una configuració 5α o 5β . Els 3β -hidroxi esteroides, per altra banda, són excretats majoritàriament en forma de sulfats [Shanzer W, 1996].

Els 17β -hidroxiesteroides i els 17β -hidroxi- 17α -metil esteroides poden ser excretats en forma de glucurònids o sulfats. No obstant, els sulfats dels 17β -hidroxi- 17α -metil esteroides són inestables i es descomponen a l'orina formant diferents productes de degradació i els corresponents 17α -hidroxi- 17β -metil epimers [Bi H, 1992]. Finalment cal esmentar que alguns esteroides no són conjugats, excretant-se en forma lliure.

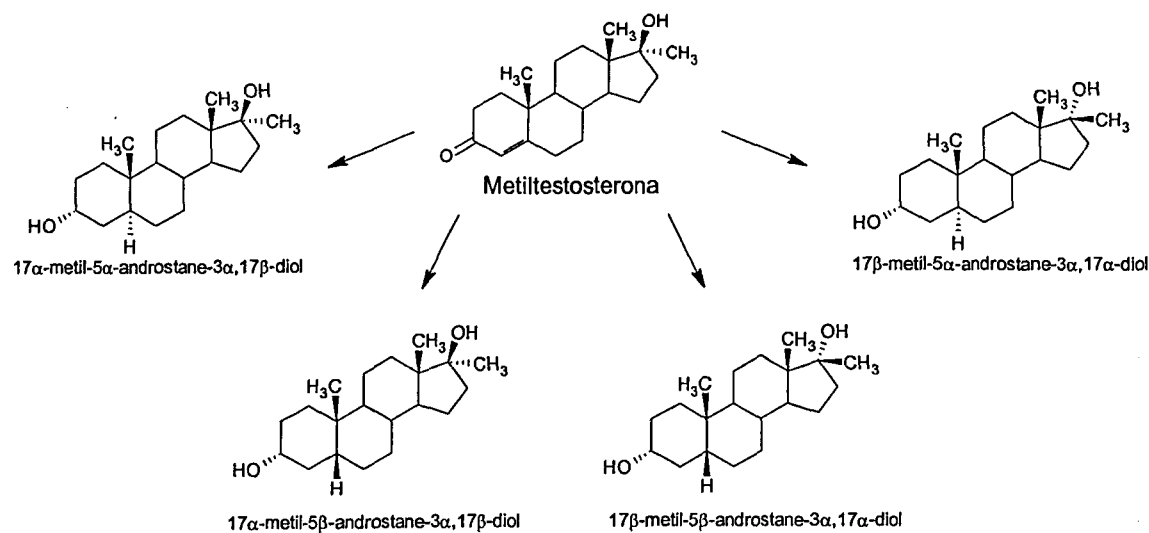
Donat el gran nombre d'esteroides exògens i reaccions metabòliques existents, no es descriurà aquí exhaustivament el metabolisme de cadascun dels esteroides exògens estudiats. A mode d'exemple, a continuació es discuteix breument el metabolisme dels esteroides amb una incidència més elevada.

1.1.5.3. Metilttestosterona (17β -hidroxi- 17α -metilandro-4-en-3-ona)

Conjuntament amb dos altres 17α -metilesteroides (la mestanolona i el methandriol), va ser sintetitzada per primera vegada el 1935 [Ruzicka L, 1935].

Els metabòlits principals són el 17α -metil- 5α -andro-3 α , 17β -diol i el 17α -metil- 5β -andro-3 α , 17β -diol (figura 1-6), ambdós excretats en forma de glucurònids [Rongone EL, 1962; Shinohara Y; 2000].

Figura 1-6. Metabolisme en fase I de la metilttestosterona.



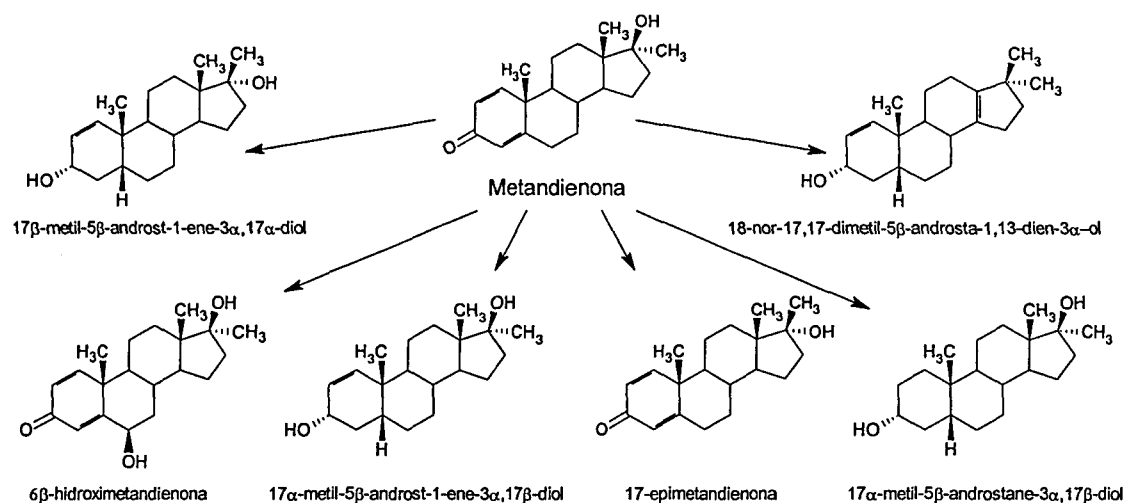
Es troba comercialitzada com a Metesto (ACDHON). A l'any 2002 es van detectar 25 nous casos positius per metilttestosterona el que representa un 2.6% dels total de positius per esteroides trobats aquell any.

1.1.5.4. Metandienona (17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-ona)

La metandienona va ser sintetitzada per primera vegada l'any 1955 i a més del grup metil a 17 α , incorpora un doble enllaç entre els carbonis 1 i 2 [Vischer E, 1955].

Els metabòlits principals són la 6 β -hidroximetandienona excretada de forma lliure, la 17-epimetandienona i el 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol excretat com a glucurònic o sulfat [Rongone EL, 1963; Macdonald BS, 1971; Schanzer W, 1996]. Aquest darrer és el metabòlit detectat durant un període de temps més llarg. S'ha proposat que la detecció del 18-nor-17,17,-dimetil-5 β -androst-1,13-dien-3 α -ol és igualment adequada ja que aquest seria el producte de degradació del seu 17 β -sulfat [Schanzer W, 1996]. A més altres 4 metabòlits minoritaris han estat identificats (figura 1-7).

Figura 1-7. Metabolisme en fase I de la metandienona.



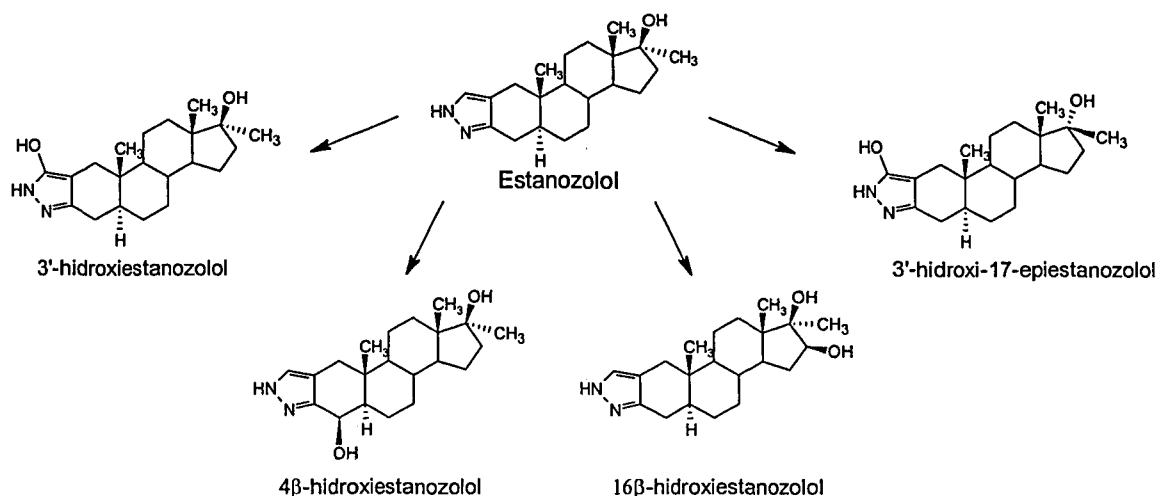
Es troba comercialitzada com amb diferents noms, Dianabol, Anabol, Reforvit-B, Pronabol, Bionabol, Danabol, etc.. Els casos positius per metandienona van representar un 5.9% del total de casos positius per esteroides a l'any 2002.

1.1.5.5. Estanozolol (17 β -hidroxi-17 α -metil-5 α -androst-2-eno[3,2-c]pirazol)

L'estanozolol va ser creat quatre anys més tard [Clinton RO, 1959]. En aquest cas a l'estructura de la 17 α -metiltestosterona se li va afegir un anell pirazòlic a l'anell A.

Els metabòlits principals són el 3'-hidroxiestanozolol, el 4β-hidroxiestanozolol i el 16β-hidroxiestanozolol, excretats parcialment lliures i parcialment com a glucurònids [Masse R, 1989; Schanzer W, 1996]. A més a més, altres vuit metabòlits minoritaris han estat identificats [Schanzer W, 1990] (figura 1.8).

Figura 1.8. Metabolisme en fase I de l'estanozolol.



Es troba comercialitzat com a Winstrol Depot (Zambon). Els casos positius per estanozolol van representar un 16.8% dels positius per esteroides detectats a l'any 2002.

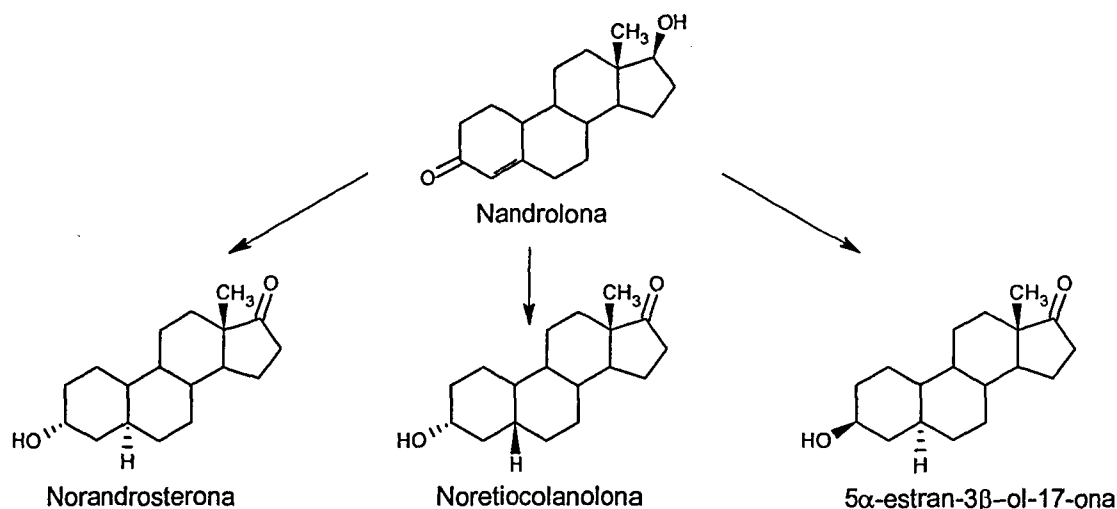
1.1.5.6. Nandrolona (17β-hidroxiestr-4-en-3-ona)

La nandrolona o 19-nortestosterona va ser sintetitzada per primera vegada el 1950 [J.A. Birch JA, 1950]. Igual que la seva estructura, el seu metabolisme són molt semblant al de la testosterona (figura 1-9). Els principals metabòlits són la 3α-hidroxi-5α-estr-17-ona (norandrosterona) i la 3α-hidroxi-5β-estr-17-ona (noreticolanona), ambdós excretats en forma de glucurònids [Engel LL, 1958].

Es troba comercialitzada en forma de decanoat de nandrolona amb diversos noms: Deca Durabolin (Organon), Anaboline (Adelco), Elpihormo (Chemica), etc. També es comercialitza en forma de hexilfenilpropionat de nandrolona (Nandrolone Hexylphenylpropionat, Anadur), en forma d'undecanoat de nandrolona (Dynabolon, Fournier) i en forma de laurat de nandrolona com a Fortadex (Hydro).

Els casos positius per nandrolona representen un 32.1% dels positius per esteroides detectats al 2002.

Figura 1-9. Metabolisme en fase I de la nandrolona.



1.1.5.7. Clenbuterol i altres β_2 -agonistes

Segons a la seva polaritat els β_2 -agonistes són excretats en forma de metabòlits de fase I (β_2 -agonistes de baixa polaritat) o de fase II (β_2 -agonistes d'alta polaritat), amb un important percentatge de fàrmac inalterat [Poletini A, 1996]. La proporció de fàrmac inalterat respecte a la quantitat de metabòlits excretats depèn, generalment, de la via d'administració del fàrmac [Morgan DJ, 1990].

El clenbuterol es, possiblement, el β_2 -agonista que ha demostrat tenir una eficàcia mes alta per millorar el rendiment esportiu, especialment en disciplines on la força muscular juga un paper important [Ayotte C, 1993].

La curta semi-vida del clenbuterol dificulta la seva determinació retrospectiva en orina humana. Per exemple, només pot ser identificat fins a 24 hores després de l'administració d'una única dosi de 100 μ g de clorhidrat de clenbuterol [Ayotte C, 1993].

Es troba comercialitzat en forma de clorhidrat amb diferents noms, com per exemple Ventolase (Juste), Spiropent® (Europharma) o Novegam (Chinon).

A l'any 2002 es varen detectar 23 nous casos positius per clenbuterol.

1.2. DETECCIÓ DELS AGENTS ANABOLITZANTS EN ORINA HUMANA

1.2.1. PROCEDIMENTS ANALÍTICS CONVENCIONALS

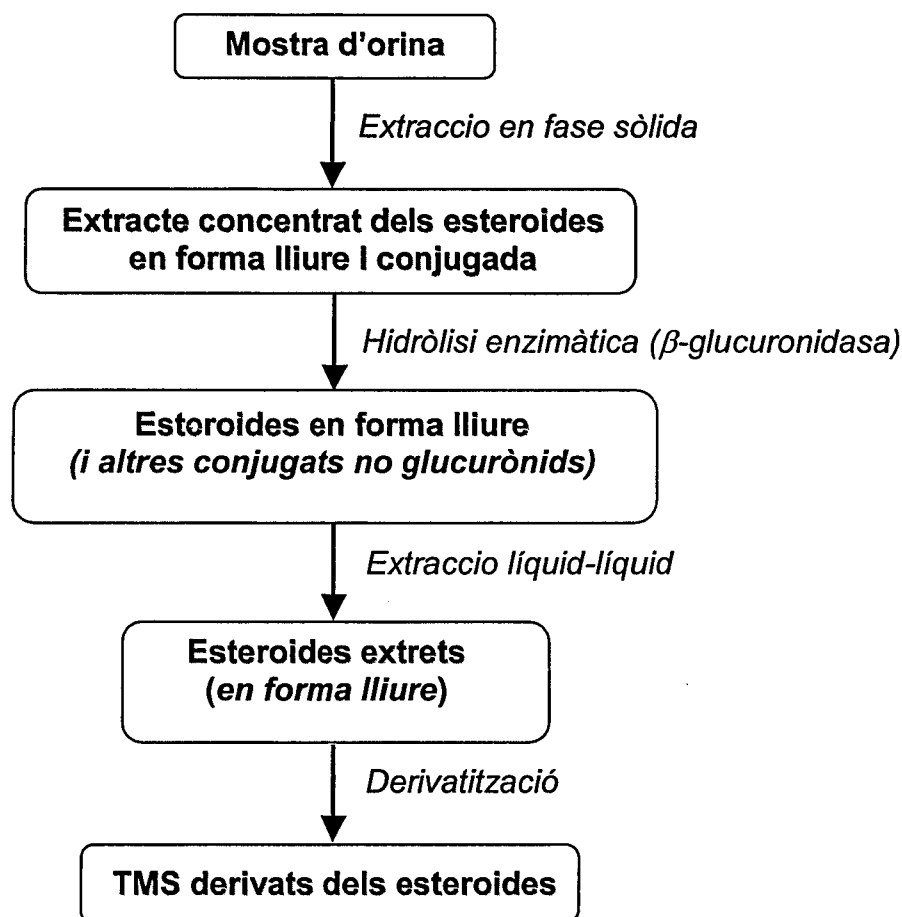
L'anàlisi de mostres d'orina per a la detecció del consum d'agents anabolitzants és una pràctica rutinària en els laboratoris de control antidopatge. Aquest control es realitza en dues etapes. Primerament totes les mostres són analitzades mitjançant un mètode de cribatge que permet identificar i descartar totes les mostres veritablement negatives. En una segona etapa, noves alíquotes de les mostres presumptament positives són analitzades amb un mètode de confirmació per tal d'obtenir dades inequívokes sobre la positivitat de la mostra en qüestió.

La importància dels resultats d'aquestes segones anàlisis fa que, a més de molt sensibles, els mètodes de confirmació hagin de ser altament específics. És per aquest motiu que el CIO exigeix l'espectrometria de masses com a sistema de detecció per aquest tipus d'anàlisi [International Olympic Committee, 1999; World Anti-Doping Agency, 2003].

El repte analític en la detecció d'agents anabolitzants en orina humana be donat per tres fets: les baixes concentracions presents (en l'ordre dels ng/mL); el gran número de metabòlits a detectar; i la complexitat de la matriu, que conté esteroides endògens amb estructures molt similars en alguns casos a concentracions mil vegades superiors a les dels analits d'interès.

En el cas dels esteroides anabolitzants, i donada la complexitat de la matriu, l'espectrometria de masses és també l'eina utilitzada per dur a terme les anàlisis de cribatge. En les anàlisis de cribatge, la metodologia habitualment emprada per a la preparació de les mostres consisteix en una extracció en fase sòlida per desalinitzar l'orina, una hidròlisi enzimàtica per tal d'alliberar els compostos en forma no conjugada, una segona extracció líquid-líquid o sòlid-líquid i una derivatització de l'extracte amb un agent silanitzant (figura 1-10).

Figura 1-10. Esquema del procediment de preparació de les mostres habitualment emprats per a l'anàlisi d'agents anabolitzants ("fracció combinada").



L'extracte silanitzat s'analitza per cromatografia de gasos en columnes capil·lars acoblada a l'espectrometria de masses. Aquesta es realitza en instruments quadrupolars de sobretaula, essent la ionització per impacte electrònic a 70 eV. Per tal d'augmentar la sensibilitat, només es monitoritzen alguns ions característics dels compostos a detectar el que es coneix com a mode de "detecció selectiva de ions" o mode "SIM" [Masse R, 1989; Chung BC, 1990].

La presència d'una hidròlisi en l'estratègia de preparació de les mostres és necessària ja que com s'ha comentat anteriorment, la major part d'aquestes substàncies s'excreten en l'orina com a productes metabòlics conjugats. L'extracte finalment analitzat conté tant els analits excretats en forma lliure com en forma de glucurònid (un cop hidrolitzats). Per aquesta raó, a aquesta fracció se la denomina "fracció combinada".

En aquells casos en que els esteroides són excretats en forma lliure, com per exemple la oxandrolona i alguns metabòlits de la 4-clorometandienona, fluoximesterona, i

metandienona, la hidròlisi és innecessària i es pot establir un segon mètode de cribatge per a l'anàlisi d'aquesta fracció lliure . Aquesta fracció té una menor complexitat en quant a esteroides endògens presents, conseqüentment és preferible a l'hora de millorar el límit de detecció.

Així doncs, l'estratègia analítica més freqüentment emprada consisteix en l'anàlisi per mètodes de cribatge de les fraccions esteroïdal combinada i lliure de totes les mostres i la confirmació mitjançant mètodes específics per les mostres presumptament positives.

1.2.2. LA TESTOSTERONA I LA DETECCIÓ DEL SEU ABÚS

La detecció de l'ús de testosterona és particularment difícil ja que la testosterona es produeix en el nostre organisme de forma natural. El seu ús en l'àmbit esportiu està prohibit des de 1983, i el seu control es va realitzar per primera vegada l'any 1984 amb motiu dels Jocs Olímpics de Los Angeles. Des de llavors la seva determinació a l'orina humana s'ha convertit en una pràctica habitual en les anàlisis de control antidopatge.

Al tractar-se d'una substància endògena, la simple detecció de la seva presència no és suficient ja que la determinació de la seva concentració urinària no permetria distingir entre quantitats fisiològiques de la substància i aquelles resultants d'una ingestió exògena [Brooks RV, 1979]. Es per això, la detecció de l'ús il·lícit de testosterona es duu a terme mesurant el quocient entre la concentració de testosterona i la del seu isòmer epitestosterona (17α -hidroxi-4-androsten-3-ona).

L'ús del quocient T/E (testosterona/epitestosterona) proposat fa trenta anys [Donike M, 1983] es possible ja que la testosterona no és metabolitzada a epitestosterona [Korenman SG, 1964; Wilson H, 1966] i la concentració d'epitestosterona, segregada a las gònades es similar a la concentració de testosterona.

A mes a mes alguns estudis semblen indicar que l'administració de testosterona produeix una disminució en la concentració de epitestosterona [Dehennin L, 1993]. Tot plegat, fa que la relació T/E augmenti després de l'administració de testosterona exògena.

Un cop es van establir els valors poblacionals de la relació T/E, al 1983, la Comissió Medica del CIO va prohibir l'ús de testosterona i va definir una relació entre la testosterona

glucurònid i la epitestosterona glucurònid superior a 6 com una ofensa a les regulacions del dopatge.

Actualment el valor de tall per el quocient T/E continua essent 6. Valors de T/E superiors a 6 han de ser considerats com una indicació de l'ús il·lícit de testosterona,

Encara que la epitestosterona no esta comercialitzada com a fàrmac, el quocient T/E pot ser modificat mitjançant la ingestió conjunta d'epitestosterona com agent emmascarant. Per aquesta raó la Comissió Mèdica del CIO ha establert com a límit per a la concentració endògena d'epitestosterona a l'orina un valor de 200 ng/ml.

La determinació del quocient T/E es un dels pocs casos on cal establir una relació numèrica entre dos compostos ja que, en general, les anàlisis per a la detecció dels agents anabolitzants en el control antidopatge són fonamentalment qualitatives.

La determinació de l'administració de testosterona es d'especial importància per la seva alta incidència. Els casos positius a testosterona representen entre un 33.6% del total de casos positius a esteroides detectats a l'any 2002 i la incidència de casos amb T/E superior a 6 ha estat avaluada entre un 0.35% i un 0.80% (De laTorre X, 1997; Segura J 2002; Catlin DH, 1997).

El mètode analític comunament emprat en el control antidopatge per a la determinació d'aquest quocient utilitza una estratègia similar a la representada en la figura 1-10. En aquest cas s'analitzen les fraccions glucuronoconjugada i lliure. Com per a la resta d'agents anabolitzants, l'anàlisi instrumental es realitza un cop derivatitzats els compostos (O-TMS) per GC/MS. Es monitoritzen de forma selectiva els ions m/z 432 i m/z 435 que corresponen als derivats dels productes excretats i dels estàndards interns deuterats respectivament.

1.2.3. APLICACIÓ DE MÈTODES ALTERNATIUS

Com s'ha indicat anteriorment, l'aparició a principis dels anys 1980 dels detectors selectius de masses quadrupolars de sobretaula va suposar una revolució en el camp del control antidopatge. El baix cost, afegit a la selectivitat i sensibilitat de la tècnica, permetien plantejar-se el cribatge de mostres d'orina per l'anàlisi d'anabolitzants de forma rutinària per cromatografia de gasos capil·lar amb detecció selectiva de masses utilitzant la ionització tradicional d'impacte electrònic.

Durant els anys 1980 es van descriure alguns mètodes basats en tècniques de més alta sensibilitat, com ara la cromatografia de gasos acoblada l'espectrometria de masses d'alta resolució (GC/HRMS) per a la que es necessiten instruments de sector magnètic, o l'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) sobre instruments de triple quadrupol.

La tècnica de GC/HRMS es va presentar com a tècnica analítica instrumental de confirmació de mostres trobades com a presumptament positives per les tècniques mono-quadrupolars convencionals, gràcies a l'increment de sensibilitat que aquests instruments poden assolir. Malgrat tot, el seu ús com a tècnica de cribatge no es evident, en part degut a algunes limitacions pròpies d'aquest tipus d'instruments i en part pel seu elevat cost.

Després d'alguns èxits en la determinació rutinària d'un número molt reduït de substàncies, entre elles alguns metabòlits de metandienona i estanozolol per GC/HRMS, el CIO va promoure la seva utilització com a mètode de referència amb motiu dels Jocs Olímpics d'Atlanta a l'any 1996. Per primera en un Jocs Olímpics, totes les mostres van ser analitzades per GC/HRMS per detectar la presència d'agents anabolitzants.

Des de llavors, es va presentar la necessitat de desenvolupar noves metodologies, amb una millor sensibilitat que la dels mètodes convencionals, utilitzant aquest tipus d'instrumental com a referència. Aquesta metodologia ha de ser capaç de detectar totes les substàncies incloses en els mètodes de cribatge per tal que el mètode pugui ser utilitzat.

Les tècniques GC/MS/MS, que utilitzen instruments amb tres quadrupols en sèrie, han estat l'altra alternativa instrumental per a la millora de la relació senyal/ soroll, encara que el seu ús s'ha restringit també a la confirmació d'aquells casos difícilment abordables amb la instrumentació de sobretaula convencional.

L'elevat cost d'ambdós tipus d'instruments, així com la seva complexitat han estat les raons fonamentals per l'intent de trobar altres estratègies alternatives.

Noves estratègies instrumentals, en el camp de l'espectrometria de masses basades en analitzadors de trampa iònica han propiciat que l'anàlisi en tàndem no només sigui possible en l'espai (triple quadrupols) sinó que també ho sigui en el temps.

Malgrat que la sensibilitat assolida amb aquests instruments depèn en gran mesura de la disponibilitat de ions precursors adequats i de si s'utilitzen espectròmetres trampes iòniques amb ionització interna (Varian Saturn) o ionització externa (Finnigan PolarisQ), aquesta nova instrumentació sembla cridada a suposar un salt generacional en la sensibilitat i versatilitat dels procediments de cribatge.

La millora en els límits de detecció també pot ser assolida a través de la millora en l'estratègia de preparació de la mostra. La incorporació d'etapes més selectives en el procés d'extracció basades en la cromatografia d'immunoafinitat (IAC), [Schanzer W, 1996] o en la cromatografia líquida [Gotzmann A, 1996] han estat reportades. Aquestes estratègies semblen més adequades per mètodes de confirmació.

Capítol 2.
OBJECTIUS

Com prèviament s'ha exposat, el mal ús de substàncies anabolitzants (esteroides i β 2-agonistas) és un problema ètic i de salut que afecta a la pràctica esportiva. Per tal de combatre aquest frau, és necessari que la detecció d'aquests compostos i/o els seus metabòlits presents a l'orina sigui inequívoca. Les baixes concentracions i la complexitat de la matriu biològica fa que no sigui fàcil disposar de mètodes d'anàlisi prou sensibles i fiables per a la seva determinació.

L'objectiu global d'aquesta tesi ha estat el desenvolupament de noves estratègies analítiques per a la detecció del consum d'aquestes substàncies.

L'aproximació metodològica triada consta de tres grans apartats:

1. Estudi de l'aplicabilitat de la cromatografia líquida capil·lar per a la quantificació de les concentracions urinàries de testosterona i epitestosterona.
2. Estudi de la millora en la preparació de la mostra prèvia a l'anàlisi instrumental mitjançant la utilització de la cromatografia d'immunoafinitat i de la cromatografia líquida d'alta resolució.
3. Estudi de l'increment de la sensibilitat a l'anàlisi instrumental mitjançant la utilització de l'espectrometria de masses de trampa iònica i la formació de derivats alternatius.

Aquests apartats s'han concretat en els següents punts del pla experimental:

- I.- Implementar un sistema de cromatografia líquida capil·lar capaç de produir fluxos de l'ordre de 4 μ l/min i que a la vegada sigui compatible amb la injecció de volums comparables amb els utilitzats en cromatografia líquida convencional.
- II.- Desenvolupar i validar un procediment analític per a la quantificació de testosterona i epitestosterona en orina humana fent ús del sistema instrumental de cromatografia líquida capil·lar implementat.
- III.- Determinar quins són els esteroides endògens que interfereixen en la retenció dels compostos exògens en utilitzar quatre tipus diferents de columnes d'immunoafinitat.

-
- IV.- Desenvolupar i validar nous procediments per a l'aïllament d'esteroides anabolitzants mitjançant columnnes d'immunoafinitat.
- V.- Desenvolupar i validar un nou procediment de purificació de la mostra basat en el fraccionament per HPLC i el posterior anàlisi per GC/MS en mode de *full scan* per a la identificació inequívoca d'agents anabolitzants amb especials requeriments de sensibilitat.
- VI.- Obtenir els espectres de masses dels derivats *terc*-butil-dimetilsilil (TBS) d'alguns esteroides anabolitzants i comparar la sensibilitat obtinguda amb aquest tipus de derivats respecte a la dels derivats trimetilsilil (TMS) habitualment utilitzats.
- VII.- Desenvolupar i validar un mètode de cribatge ràpid i sensible per a la detecció d'agents anabolitzants i altres substàncies d'ús prohibit per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem, mitjançant l'ús d'un espectròmetre de masses de trampa iònica.

Capítol 3

**QUANTIFICACIÓ DE TESTOSTERONA I EPITESTOSTERONA
PER CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA CAPIL·LAR**

3.1. INTRODUCCIÓ

Com s'ha esmentat anteriorment, el mètode convencional per a la determinació del quocient entre les concentracions de testosterona i epitestosterona es basa en l'anàlisi per GC/MS dels derivats O-TMS. Aquests mètode és molt útil per a la detecció qualitativa d'aquest tipus de substàncies, donat que implica l'aprofitament del mateix mètode rutinari utilitzat pel cribatge dels esteroides anabolitzants. Tanmateix, la quantificació, està sotmesa a una gran variació, evidenciada en estudis inter-laboratori (D.H.Catlin, 1996). La determinació d'aquestes substàncies per cromatografia líquida d'alta eficàcia amb detecció ultraviolada (HPLC/UV) seria una solució a aquests problemes. Tanmateix, s'ha de considerar l'inconvenient que suposa la menor selectivitat del detector UV quan es compara amb la monitorització selectiva de ions (SIM) en l'espectrometria de masses. La quantificació de testosterona i epitestosterona en orina humana per HPLC ha estat estudiada, evidenciant bona reproductibilitat (R. Navajas, 1995). Tanmateix, aquest mètode assolia límits de quantificació per a la testosterona i epitestosterona massa elevats (20 i 30 ng/ml respectivament) si es comparen amb les concentracions presents a moltes mostres d'orina, ja sigui per raó de sexe (p.e. orines femenines), d'ètnia (p.e. orientals) o farmacològiques (p.e. consum d'algun altre esteroide anabolitzant).

3.1.1 HPLC CAPIL·LAR VERSUS HPLC CONVENCIONAL

La cromatografia líquida amb columnes capil·lars presenta alguns avantatges respecte a la cromatografia líquida convencional (J.P. Chervet, 1992). En especial, la disminució d'escala que suposa la cromatografia líquida capil·lar produeix, finalment, un augment de la concentració en el pic cromatogràfic (C_{max}), i per aquesta raó augmenta la sensibilitat en el cas d'utilitzar un detector sensible a la concentració.

3.1.2 FLUXE CAPIL·LAR

La cromatografia de líquids, amb columnes de 300 μm de diàmetre intern reblertes amb partícules de fase estacionària de 3 μm , es pot considerar com una versió miniaturitzada de la cromatografia de líquids convencional en la qual s'ha aplicat un factor de disminució d'escala. Aquest factor de disminució d'escala es deriva del fet que, d'acord amb l'equació de van Deemter per aquest tipus de rebliment cromatogràfic, la velocitat lineal òptima (equació 1) correspon a un valor al voltant de 1.4 mm/s

$$(Eq. 1) \quad u = \frac{L}{t_0}$$

on u : velocitat lineal de la fase mòbil.

L : longitud de la columna.

t_0 : temps mort de la columna.

El flux cromatogràfic a través de la columna es pot expressar com:

$$(Eq. 2) \quad F = \frac{u\pi B d_c^2 \varepsilon}{4}$$

on: u : velocitat lineal de la fase mòbil.

d_c : és el diàmetre de la columna.

ε : és la porositat de la columna.

Per una columna convencional de diàmetre intern de 4.6 mm, suposant un valor de porositat per a la fase estacionària de 0.7, el valor de flux cromatogràfic corresponent a una velocitat lineal d'1.4 mm/s és d'aproximadament 1 ml/min.

En el cas d'una columna capil·lar de 300 μm de diàmetre intern, el flux cromatogràfic òptim resultant és de 4 $\mu\text{l}/\text{min}$.

En definitiva, s'ha aplicat un factor de reducció d'escala (f) que equival al quocient entre aquests fluxos. Si dividim l'equació 2, per ambdues columnes, s'obté una expressió que indica que el factor de reducció d'escala correspon a la relació entre els quadrats dels diàmetres de les columnes cromatogràfiques:

$$(Eq. 3) \quad f = \frac{d_{\text{convencional}}^2}{d_{\text{capilar}}^2}$$

3.1.3 SISTEMES DE BOMBEIG

Per a la producció de fluxos reproduïbles tan baixos no es poden utilitzar bombes de pistó convencionals, per la qual cosa s'utilitzen bombes de xeringa. Tanmateix, la manca d'instrumentació adequada per a la producció de microgradients reproduïbles és una limitació d'aquest tipus de sistemes (V. Berry, 1989). Algunes formes de solventar aquest problema han estat descrites, com l'ús de bombes de xeringa senzilles per a la producció

de gradients preformats mitjançant l'ús de vàlvules de múltiples bucles (C. L. Flurer, 1988; J. F. Banks, 1990), o els sistemes de bombeig amb xeringues duals. Aquests últims estan comercialitzats (F. Andreolini, 1990) i són capaços de produir qualsevol tipus de gradient (inclosos els exponencials), però la reproductibilitat i precisió dels gradients produïts a fluxos tan baixos és sovint insatisfactòria (D. Ishii, 1990).

La barreja de fluxos de pocs microlitres per minut requerida per la cromatografia de líquids capil·lar, és extremament difícil de realitzar, especialment quan s'utilitzen bombes de xeringa. La cambra de barreja ha de tenir un volum de l'ordre de nanolitres per tal de minimitzar el volum mort, reduir el temps en la formació i el risc de distorsió en el gradient. A més, s'ha de produir una barreja homogènia per a qualsevol tipus de dissolvent i a qualsevol composició. Actualment no existeixen cambres de barreja capaces de complir aquests requisits. Un altre inconvenient de l'ús de bombes de xeringa per a la producció d'aquests microgradients és el risc de microfugues. Aquestes petites fugues són gairebé impossibles de detectar degut al petit volum i a la immediata evaporació. A més, l'equilibrament del flux amb bombes de xeringa requereix temps i depèn de la temperatura i de la compressibilitat i viscositat del dissolvent (P. Jandera, 1985).

L'ús de tècniques de divisió de flux utilitzant bombes de pistons es presenta com una alternativa atractiva per a la producció de microfluxos. El flux es divideix mitjançant una T situada entre una bomba de pistons convencional, on es barregen els dissolvents, i la columna capil·lar. A l'altra sortida de la T es situa un restrictor, de forma que la relació entre el flux que arriba a la columna i el flux que abandona el sistema pel restrictor (relació de divisió o de "split") sigui l'adequada. Alguns autors utilitzen columnes empaquetades com a restrictors (S. Abbott, 1988; N. Nagae, 1991). Aquestes columnes restrictores, usualment fetes amb columnes convencionals de 4.6 mm de diàmetre intern, han d'estar empaquetades amb el mateix material que la columna capil·lar i han de tenir la mateixa longitud per a garantir un flux constant durant l'elució del gradient. Conseqüentment, es necessita tenir una columna restrictora per a cada columna capil·lar, cosa que resulta poc pràctica per a l'anàlisi de rutina.

La utilització de dos capil·lars de sílice, un com a capil·lar restrictor i un altre situat entre la T i la columna, permet la selecció d'una relació de *split* adequada mitjançant la variació de la longitud i el diàmetre intern del capil·lar restrictor, com es deriva de l'aplicació de l'equació de Hagen-Poiseuille:

$$(Eq. 4) \quad F = \frac{r^4 \Delta p \pi}{8L\eta}$$

on: F : flux de la fase mòbil a través del capil·lar.

Δp : caiguda de pressió a través del capil·lar.

r : radi del capil·lar.

L : longitud del capil·lar.

η : viscositat de la fase mòbil.

Per tant, per dos capil·lars, la relació entre els fluxos d'una mateixa fase mòbil que flueix a través d'ells (relació de *split*) serà :

$$(Eq. 5) \quad S_{1/2} = \frac{r_1^4 L_2}{r_2^4 L_1}$$

on 1 correspon al capil·lar situat abans de la columna i 2 al capil·lar restrictor.

Depenent d'aquesta relació de *split* i del flux de sortida de la bomba, podem ajustar el flux capil·lar mitjançant l'equació 5:

$$(Eq. 6) \quad F = S_{1/2} F_{bomba}$$

Aquesta equació és aproximada, ja que se suposa que el flux que circula pel capil·lar restrictor, F_2 , és igual al flux bombejat. Aquesta suposició és vàlida quan es treballa amb relacions de *split* grans.

Per compensar els possibles canvis en la viscositat durant l'elució del gradient i per tal de minimitzar pulsacions i altres fluctuacions causades per la bomba, els capil·lars restrictors han de proporcionar una pressió superior a la pressió creada per la columna. Si aquesta premisa es compleix, el flux capil·lar es manté constant, independentment del tipus i de la composició de la fase mòbil. D'aquesta forma, fent servir dos capil·lars restrictors de silici, és possible la producció de microgradients per una àmplia varietat de columnes capil·lars i de dissolvents de diferent viscositat.

Algunes marques comercials han elaborat alguns dispositius, compatibles amb bombes de pistó, per a generar microfluxos reproduïbles (P. Chervet, C.J. Meijvogel, 1992). Aquests dispositius consisteixen en una cambra de barreja de, per exemple, 250 μ l connectada a

través d'un divisor de flux (T), tant a la bomba com a un capil·lar restrictor, obtenint així una relació en la divisió de flux (relació de *split*) fixa.

En el treball que es presenta a continuació es va utilitzar una bomba de pistons i una T per a realitzar la divisió del flux. Malgrat que aquest sistema permet treballar amb gradients, ja que la bomba quaternària i el flux cromatogràfic que s'utilitza així ho fan possible, els mètodes finalment validats per a la quantificació de testosterona i epitestosterona en orina es van desenvolupar en règim isocràtic. Aquestes condicions permeten reciclar la fase mòbil que circula pel capil·lar restrictor i conseqüentment permeten estalviar dissolvents.

3.1.4 VOLUM D'INJECCIÓ

El volum d'injecció és un altre dels paràmetres als que cal aplicar el factor de reducció d'escala. Probablement sigui aquest l'aspecte més complicat de tot el procés de miniaturització.

El volum injectat en una columna cromatogràfica pot contribuir a una pèrdua d'eficàcia. L'expressió que relaciona el volum màxim que pot ser injectat (V_{\max}) un cop establerta una pèrdua fraccional d'eficàcia vé donat per la següent equació :

$$(Eq. 7) \quad V_{\max} = \frac{\theta d_c^2 L \epsilon \pi (1+k') C}{\sqrt{N}}$$

- on:
- V_{\max} : Volum màxim d'injecció.
 - θ : pèrdua fraccional del número de plats causada per la injecció.
 - d_c : diàmetre de la columna
 - L : longitud de la columna.
 - ϵ : porositat de la columna.
 - k' : factor de capacitat
 - C : constant que descriu el perfil d'injecció.
 - η : viscositat de la fase mòbil.

Acceptant un 5% de pèrdua fraccional ($\theta = 0.05$), una porositat de la columna $\epsilon = 0.7$ i un perfil d'injecció quasi idealment rectangular ($C = 4$), l'equació (7) queda reduïda a:

$$(Eq. 8) \quad V_{\max} = 0.4398 \frac{d_c^2 L (1+k')}{\sqrt{N}}$$

Si a més, s'accepta que les columnes tenen bona eficàcia amb una alçada de plat teòrica igual a 2 ($h = 2$) i es substitueix N per :

$$(Eq. 9) \quad N = \frac{L}{h d_p}$$

on d_p és la grandària de les partícules de fase estacionària, l'equació (8) es pot reescriure com :

$$(Eq. 10) \quad V_{\max} \cong 0.622 d_c^2 (1+k') \sqrt{L d_p}$$

Així doncs, el volum màxim d'injecció és proporcional al quadrat del diàmetre de la columna (d_c^2), al factor de capacitat (k'), i a l'arrel quadrada de la longitud de la columna (L) i de la mida de partícula (d_p).

Així, per una columna capil·lar de 300 μm de diàmetre intern i 15 cm, reblerta amb partícules de 5 μm , el volum d'injecció per un solut pràcticament no retingut ($k'=1$) no ha de ser més gran de 97 nl. Per $k' = 5$, el volum màxim d'injecció seria de 291 nL. Per a una columna convencional, aquest valor seria de 20 μl .

La necessitat d'injectar volums tan petits és un inconvenient, ja que representen un percentatge molt petit del volum total de l'extracte final obtingut a partir de la mostra (generalment entre 50 i 200 μl).

Una forma d'augmentar el volum d'injecció sense provocar una pèrdua d'eficàcia és adaptar la força elutròpica de la fase mòbil (ϵ_{mp}) i del dissolvent que conté la mostra (ϵ_s). Si la mostra està dissolta a un dissolvent més dèbil que la fase mòbil ($\epsilon_s < \epsilon_{mp}$), la mostra es retindrà o "reenfocarà" al cap de la columna (N. Nagae, 1991). Els volums d'injecció (V_i) que permeten utilitzar aquest efecte de compressió es poden estimar mitjançant la següent expressió :

$$(Eq. 11) \quad V_i = V_{\max} \left(\frac{1+k'_0}{1+k'} \right)$$

on: k'_0 : factor de capacitat del solut en l'elució amb el dissolvent de la mostra.

k' : factor de capacitat del solut en l'elució per la fase mòbil

Si utilitzem valors típics de $k'_0/k' > 100$, es podran injectar volums més de 100 vegades més grans que el V_{max} (que era només de 0.1-0.3 μ l). D'aquesta forma es poden injectar directament a la columna capil·lar volums convencionals de 10-20 μ L sota condicions d'elució isocràtica, amb el consegüent augment en la sensibilitat. Els desavantatges d'aquesta tècnica de reenfoc són fonamentalment el risc d'obstrucció (degut al gran augment del volum injectat) i l'augment del temps d'anàlisi provocat pel llarg procés de càrrega necessari per desplaçar la mostra des del bucle d'injecció fins a la columna quan es treballa a fluxos tan baixos.

Per evitar ambdós problemes s'han desenvolupat tècniques de "*column-switching*" que utilitzen una micro-precolumna per al reenfoc de la mostra (J.A. Pascual, 1996). La micro-precolumna (0.5 mm x 4 cm) s'omple de la fase estacionària desitjada, però de mida de partícula gran (p.e. 40 μ m). Aquestes micro-precolumnes permeten la utilització de fluxos relativament elevats (0.1 ml/min) reduint dràsticament el temps de càrrega a la vegada que eliminen el risc d'obstrucció.

Aquest sistema combina els avantatges dels sistemes d'injecció convencionals amb les proporcionades pel menor volum d'elució de la cromatografia capil·lar. A més, suposa una disminució en el risc d'obturació de la columna, ja que es pot situar un filtre en línia entre l'injector i la precolumna.

Malgrat tot, s'ha de tenir present que totes les tècniques de preconcentració, ja sigui mitjançant l'ús d'una precolumna o mitjançant el reenfoc en cap de columna, són tècniques no selectives, que a més de concentrar els analits, concentraran també els possibles interferents presents en la mostra o en els reactius o dissolvents utilitzats. Conseqüentment, la puresa dels dissolvents i la selectivitat en l'extracció són aspectes cabdals en la millora dels límits de detecció mitjançant l'ús de la cromatografia líquida capil·lar.

La capacitat de càrrega de la columna és també un element a considerar. De forma similar a com es va definir el volum màxim d'injecció (V_{max}) en relació a la pèrdua d'eficàcia de la columna, la màxima quantitat de massa ($M_{max.}$) que pot ser injectada en una columna (ref24) es pot expressar com:

$$(Eq. 12) \quad M_{max} = \frac{C_m d_c^2 L \epsilon \pi C}{2\sqrt{N}}$$

on C_m és la concentració màxima de mostra del pic que elueix de la columna de massa M_{max} . Per a dos columnes que es diferenciïn només en el diàmetre, la relació entre les quantitats màximes injectables en ambdues columnes per obtenir la mateixa concentració de mostra (C_m) serà igual al factor de reducció d'escala:

$$(Eq. 13) \quad f = \frac{d_{conv}^2}{d_{cap}^2} = \frac{(M_{max})_{conv}}{(M_{max})_{cap}}$$

A la pràctica, això significa que per a una columna de 15 cm x 0.3 mm, la màxima massa injectable (capacitat de càrrega) per a un compost no retintut ($k'=0$) no ha d'excedir els 800 ng. Aquest valor suposa un límit suficientment còmode per a les aplicacions de bioanàlisi dutes a terme en el treball que es presenta a continuació.

3.1.5 DETECCIÓ

El procés de dilució de la mostra que té lloc quan aquesta és injectada i difon a la fase mòbil al llarg de la seva elució per la columna, afecta directament a la concentració màxima del pic (C_{max}), i es relaciona amb la massa de mostra injectada (M_s) a través de l'expressió :

$$(Eq. 14) \quad C_{max} = \frac{2\sqrt{2} M_s \sqrt{N}}{d_c^2 L \epsilon (1+k') \pi^{3/2}}$$

- on:
- C_{max} : Concentració màxima del pic cromatogràfic.
 - M_s : quantitat de mostra injectada.
 - N : número de plats teòrics
 - d_c : diàmetre de la columna
 - L : longitud de la columna.
 - ϵ : porositat de la columna.
 - k' : factor de capacitat.

Així doncs, el factor de reducció d'escala també afecta a la concentració màxima obtenible:

$$(Eq. 15) \quad \frac{(C_{max})_{cap}}{(C_{max})_{conv}} = \frac{d_{conv}^2}{d_{cap}^2}$$

Això significa que, teòricament, a la columna capil·lar (p.e. de 0.3 mm de diàmetre intern) s'arribaria a concentracions més de 200 vegades superiors a les assolides a una columna convencional (p.e. de 4.6 mm de diàmetre intern). Aquest fet implica un augment en la

sensibilitat, sempre que s'utilitzi un detector sensible a la concentració, com ara el detector de UV, el més universal en HPLC.

D'acord a la llei de Lambert-Beer, l'absorbància (A) és proporcional al camí òptic de la cel·la de detecció, a la concentració del solut (c), i a l'absortivitat molar del solut (ϵ_λ):

$$\text{(Eq. 16)} \quad A = b c \epsilon_\lambda$$

Per tal de mantenir l'eficàcia de la columna capil·lar i per evitar la dispersió del pic durant la detecció, el volum de la cel·la de detecció (volum il·luminat) no ha de ser més gran a una desena part del volum del pic. Per aquest motiu les cel·les dels detectors han de ser adaptades aplicant el factor de reducció d'escala. Això provoca la necessitat d'utilitzar cel·les de només 35 nl. Tanmateix, una disminució en el camí òptic implicaria una pèrdua de sensibilitat, com es deriva de l'equació 16. Per evitar aquest problema es fan servir cel·les en forma d' U o de Z, a les quals el feix de llum i el flux tenen la mateixa direcció (J.P. Chervet, 1991), a diferència del que passa amb les cel·les utilitzades en HPLC convencional a les quals el feix de llum i el flux són perpendiculars.

La millora de la sensibilitat ha estat demostrada (J.P. Chervet, R.E.J. van Soest, 1992) comparant els resultats obtinguts a l' injectar una mateixa quantitat de mostra a un sistema d'HPLC convencional i a un sistema d'HPLC capil·lar, ambdós amb detecció UV. Malgrat això, la petita relació d'obertura d'aquestes cel·les capil·lars implica un major soroll respecte a l'existent a una cel·la convencional. Això és degut al soroll produït al xocar, i a les refraccions i reflexions del feix de llum en els colzes de la cel·la (J.P. Chervet, R.E.J. van Soest, 1991). Així, la relació senyal/soroll per a la cel·la capil·lar $(S/N)_{cap}$ és aproximadament 4 vegades menor que la d'una cel·la convencional $(S/N)_{conv}$, encara que aquest valor depèn de la longitud d'ona de detecció, del camí total de la cel·la i del tipus de detector utilitzat.

Un resum de totes les consideracions relatives a la reducció d'escala als diferents tipus de cromatografia líquida (d'acord al diàmetre intern de la columna) es presenta a continuació a la taula 3-1.

A la literatura, es pot trobar una barreja confusa a la nomenclatura utilitzada per descriure la diferència entre aquests sistemes. Potser la terminologia HPLC convencional, "narrowbore", "microbore" i capil·lar es la més clarificadora. També es troben descrits altres

sistemes encara més reduïts (diàmetres interns de columna de 75 μm i fluxos analítics menors a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$). A aquests sistemes se'ls coneix com micro-capil·lars o nano-LC i no estan inclosos en aquest resum.

Taula 3-1. Resum dels paràmetres que descriuen l'efecte corresponent a la reducció del diàmetre interior de les columnes de cromatografia líquida.

PARÀMETRE	TIPUS DE CROMATOGRAFIA			
	CONVENCIONAL	"NARROWBORE"	"MICROBORE"	CAPIL·LAR
Diàmetre interior de columna (mm)	4.6	2	1	0.3
Velocitat lineal (mm/s)	1.4	1.4	1.4	1.4
Factor de reducció d'escala (d^2/d_{cap}^2)	235	44	11	1*
Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)	1000	200	50	4
Diàmetre interior conduccions (μm)	254	178	127	50
Volum d'injecció V_{max} (μl)	50	10	2.5	0.2
Volum cel·la UV (μl)	10	3	1	0.035
Factor de concentració del pic	1*	5.3	21.4	235**

* paràmetre de normalització

** degut a l'empitjorament de la relació S/N per cel·les de diàmetre capil·lar, aquest increment teòric de la sensibilitat es veu reduït a valors quatre vegades inferiors (p.e. 50-60).

CAPÍTOL 3.2**QUANTIFICATION OF TESTOSTERONE AND EPITESTOSTERONE IN HUMAN
URINE BY CAPILLARY LIQUID CHROMATOGRAPHY**

J. Marcos, J.A. Pascual, J. Barbosa and J. Segura

Journal of Microcolumn Separations 2000; 12: 623-629

Marcos J, Pascual JA, Barbosa J, Segura J. [Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine by capillary liquid chromatography](#). J Microcolumn Sep. 2000; 12(12): 623-629.

Capítol 4

MÈTODES ALTERNATIUS EN LA PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

Els mètodes actuals d'extracció líquid-líquid i sòlid-líquid per l'anàlisi d'anabolitzants són inespecífics. Aquest fet provoca que el material biològic co-extret sigui el factor limitant en la consecució de límits de detecció suficientment baixos. D'ençà de l'establiment per part de les autoritats esportives internacionals d'un límit de 2 ng/ml per a reportar la presència de cinc agents anabolitzants exògens [International Olympic Committee, 1998], les limitacions d'aquestes estratègies d'extracció convencionals s'han posat més de manifest. Així doncs, una millora en la selectivitat del procés d'extracció és desitjable si es volen assolir límits de detecció adequats a la vegada que es compleixen amb els criteris d'identificació establerts.

Òbviament, l'aplicació de mètodes alternatius en el procés de preparació de les mostres dependrà de si la nova estratègia es vol incorporar en un procediment de cribatge o bé en un procediment de confirmació.

Respecte als procediments de cribatge, la gran varietat de compostos a detectar en el control antidopatge implica la necessitat de monitoritzar el major número de compostos simultàniament per tal de reduir el número de procediments a realitzar. Aquest fet condiona irreversiblement la selectivitat en el procés de preparació de la mostra, ja que en general, extraccions més selectives comporten una reducció en el número i/o quantitat d'analits extrets. Malgrat tot, l'establiment d'un mètode d'extracció altament específic per un número reduït d'analits amb especials requeriments de sensibilitat podria tenir interès. Un mètode d'aquestes característiques podria permetre la detecció dels compostos d'especial dificultat (p.e. 3'-hidroxiestanozolol) amb espectròmetres de masses de sobretaula, fent innecessària la presència d'espectròmetres de masses més sofisticats (p.e HRMS o analitzadors de trampa iònica) en el laboratori.

D'altra banda, l'objectiu dels procediments confirmatius és la detecció inequívoca de només un metabòlit o d'un reduït número de metabòlits. Aquest escenari és molt més adequat per a la incorporació d'estratègies alternatives en el procés de preparació de la mostra. Donada la cabdal importància dels resultats, una altíssima especificitat és requisit indispensable per tal d'evitar cap fals positiu. A més, modificacions en les tècniques emprades respecte al procés de cribatge són desitjables ja que aportaran més dades sobre la identitat del compost.

Dues possibles aproximacions per tal d'augmentar l'especificitat en el procés d'extracció de les mostres són la utilització de la cromatografia d'immunoafinitat, o bé la separació de

fraccions per cromatografia líquida d'alta eficàcia a partir de l'extracte obtingut pel mètode convencional de preparació de mostres. En aquest capítol es presenten els resultats obtinguts al aplicar aquestes dues estratègies.

Els mètodes actuals d'extracció líquid-líquid i sòlid-líquid per l'anàlisi d'anabolitzants són inespecífics. Aquest fet provoca que el material biològic co-extret sigui el factor limitant en la consecució de límits de detecció suficientment baixos. D'ençà de l'establiment per part de les autoritats esportives internacionals d'un límit de 2 ng/ml per a reportar la presència de cinc agents anabolitzants exògens [International Olympic Committee, 1998], les limitacions d'aquestes estratègies d'extracció convencionals s'han posat més de manifest. Així doncs, una millora en la selectivitat del procés d'extracció és desitjable si es volen assolir límits de detecció adequats a la vegada que es compleixen amb els criteris d'identificació establerts.

Òbviament, l'aplicació de mètodes alternatius en el procés de preparació de les mostres dependrà de si la nova estratègia es vol incorporar en un procediment de cribatge o bé en un procediment de confirmació.

Respecte als procediments de cribatge, la gran varietat de compostos a detectar en el control antidopatge implica la necessitat de monitoritzar el major número de compostos simultàniament per tal de reduir el número de procediments a realitzar. Aquest fet condiona irreversiblement la selectivitat en el procés de preparació de la mostra, ja que en general, extraccions més selectives comporten una reducció en el número i/o quantitat d'analits extrets. Malgrat tot, l'establiment d'un mètode d'extracció altament específic per un número reduït d'analits amb especials requeriments de sensibilitat podria tenir interès. Un mètode d'aquestes característiques podria permetre la detecció dels compostos d'especial dificultat (p.e. 3'-hidroxiestanozolol) amb espectròmetres de masses de sobretaula, fent innecessària la presència d'espectròmetres de masses més sofisticats (p.e HRMS o analitzadors de trampa iònica) en el laboratori.

D'altra banda, l'objectiu dels procediments confirmatius és la detecció inequívoca de només un metabòlit o d'un reduït número de metabòlits. Aquest escenari és molt més adequat per a la incorporació d'estratègies alternatives en el procés de preparació de la mostra. Donada la cabdal importància dels resultats, una altíssima especificitat és requisit indispensable per tal d'evitar cap fals positiu. A més, modificacions en les tècniques emprades respecte al procés de cribatge són desitjables ja que aportaran més dades sobre la identitat del compost.

Dues possibles aproximacions per tal d'augmentar l'especificitat en el procés d'extracció de les mostres són la utilització de la cromatografia d'immunoafinitat, o bé la separació de

fraccions per cromatografia líquida d'alta eficàcia a partir de l'extracte obtingut pel mètode convencional de preparació de mostres. En aquest capítol es presenten els resultats obtinguts al aplicar aquestes dues estratègies.

4.1. PREPARACIÓ DE MOSTRES MITJANÇANT TÈCNIQUES DE CROMATOGRAFIA D'IMMUNOAFINITAT

4.1.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Per cromatografia d'immunoafinitat (IAC) entenem qualsevol mètode cromatogràfic en el qual la fase estacionària consisteix en anticossos o en reactius relacionats amb anticossos [Hage SH, 1998].

Donada l'elevada selectivitat, la utilització d'anticossos és una alternativa esperançadora per reduir el material biològic co-extret en la preparació de mostres. Els anticossos són fixats sobre diversos tipus de gels, com per exemple agarosa o polímers d'acrilamida.

Inicialment aquesta tècnica va ser aplicada a l'anàlisi de proteïnes, però la capacitat de produir anticossos contra un gran varietat de substàncies va fer que l'IAC esdevingués una eina popular per a la purificació de tot tipus de compostos, entre ells els esteroides [Lazar A 1976; Gaskell SJ, 1983].

Degut a les regulacions emanades de la Comunitat Europea relatives al control d'anabolitzants en el camp agroalimentari [Commission of the European Communities, 1987-1989], aquest tipus de tècniques van rebre un gran impuls durant els anys vuitanta aplicant-se a l'anàlisi d'anabolitzants. Aquestes normatives exigeixen un estricte control tant a la carn com en altres òrgans per tal de detectar l'engreix il·legal de bestiar. Sobre aquestes matrius biològiques, de gran complexitat, la utilització de la cromatografia d'immunoafinitat per la preparació de mostres va demostrar ser una tècnica de gran valor [Van Ginkel LA, 1991].

Es distingeixen diverses modalitats d'aquest tipus de tècnica en funció de si l'anticòs reconeix una única substància, varies substàncies estructuralment relacionades, o bé de si es combinen diversos anticossos per tal de detectar diverses substàncies o grups de substàncies.

Existeixen mètodes comercials utilitzats de forma rutinària en un gran número de laboratoris. Però s'ha de tenir present que algunes d'aquestes columnes comercialitzades presenten problemes associats a una gran variabilitat en les especificitats i les capacitats dels gels [Crooks SRH, 1997]. A més les tècniques de cromatografia d'immunoafinitat avui

dia disponibles han estat desenvolupades, en general, per a la detecció de l'agent anabolitzant inalterat [Van Ginkel LA, 1988; Machnik M, 1999].

Malgrat tot això, l'any 1996 va ser descrit un mètode d'IAC per a la purificació del 3'-hidroxiestanozolol a l'orina humana [Schanzer W, 1996]. En aquest mètode s'aprofitava la gran afinitat d'aquest metabòlit per un anticòs generat contra la metiltestosterona. De totes formes, es desconeix fins a quin punt aquesta estratègia pot ser aplicada a altres metabòlits d'interès en el món del control antidopatge.

La major part de les aplicacions comercials de la cromatografia d'immunoafinitat han estat dissenyades per a la detecció d'una substància (p.e. clenbuterol) o bé d'un grup de substàncies (p.e. esteroides anabolitzants 17-metil derivats). Des de la perspectiva d'utilitzar aquestes tècniques en el cribatge d'agents anabolitzants, seria més útil una via menys explorada consistent en la combinació de diversos anticossos per detectar simultàniament grups de substàncies (Multidimensional Immunoaffinity Chromatography, MIAC).

Així, ens vam plantejar com a objectiu estudiar l'aplicabilitat de tècniques d'immunoafinitat per al cribatge i confirmació d'agents anabolitzants a l'orina humana. Es van estudiar quatre tipus diferents d'anticossos. Els immunògens corresponents, els esteroides per als quals els gels van ser originàriament i els metabòlits triats per aquest estudi es resumeixen a la taula 4-1.

Taula 4-1. Anticossos triats per a la purificació dels extractes d'orina.

Tipus de gel	Inmunogen	Esteroides	Metabòlits
I	17 α MT-3CMO-BSA	Metiltestosterona	17 α -metil-17 β -hidroxi
II	17 β MT-3CMO-BSA	Epimetiltestosterona	17 β -metil-17 α -hidroxi
III	TES-3CMO-BSA	Testosterona	17 β -hidroxiesteroides
IV	DHEA-7CMO-BSA	DHEA	17-cetoesteroides

La tria d'aquest metabòlits i aquests gels està basada en les seves característiques estructurals. Així, semblaria que els esteroides amb una estructura 17 α -metil-17 β -hidroxi (p.e. 17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol i 3'-hidroxiestanozolol) haurien de presentar certa reactivitat creuada amb el gel tipus I, els esteroides amb una estructura 17 β -metil-17 α -hidroxi (p.e. 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol) amb el gel tipus II i els 17 β -hidroxi-esteroides (p.e. boldenona) amb el gel tipus III. El gel tipus IV va ser triat per assajar la

seva capacitat per retenir 17-ceto-esteroides, en especial la norandrosterona i la noreticolanolona.

4.1.2. MATERIALS I MÈTODES

El metanol (qualitat HPLC), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , KCl , NaN_3 , HCl , NH_4I i el 2-mercaptoetanol es van obtenir de Merck (Darmstadt, Alemanya), el MSTFA de Macherey-Nagel (Düren, Alemanya). L'aigua amb una resistivitat de $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ es va obtenir amb un sistema de purificació Milli-Q (Millipore, Molsheim, França). La β -Glucuronidasa d'*Escherichia Coli* es va obtenir de Boehringer (Mannheim, Alemanya).

Els anticossos usats van ser desenvolupats en conills i van ser dirigits als següents immunògens: 17α -metilttestosterona-3-carboximetiloxima- seroalbúmina bovina ($17\alpha\text{MT-3CMO-BSA}$), 17β -methyltestosterone-3-carboxymethyloxime-($17\beta\text{MT-3CMO-BSA}$), testosterone-3-carboximetiloxima-seroalbúmina bovina (TES-3CMO-BSA) i DHEA-7-carboximetiloxima-seroalbúmina bovina (DHEA-7CMO-BSA). Els gels van ser afegits a columnes Econo (Biorad, Munich, Alemanya) i les columnes mantingudes a 4°C en tampó PBS (120 mmol NaCl , 2.7 mmol KCl , $10 \text{ mmol Na}_2\text{HPO}_4$, ajustat a pH 7.4 amb HCl) i contenint 0.05% en NaN_3 .

La 19-noreticolanolona, 17α -metil- 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 17α -metil- 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, són de Research Plus (Bayonne, EEUU). 17β -metil- 5β -androst-1-ene- $3\alpha,17\alpha$ -diol, 19-norandrosterona, 19-noreticolanolona són de The Natinal Analytical Refrence Laboratory (Pymble, Australia). El 3'-hidroxi-estanozolol és de Radian Corporation (Austin, EEUU). La resta d'esteroides van ser obtinguts de Sigma (St. Louis, EEUU).

Las dissolucions metanòliques d'1 mg/ml de les substàncies de referència es van preparar dissolent 10 mg de cada substància en metanol i enrasant en un matràs aforat de 10 ml. Les dissolucions 10 $\mu\text{g/ml}$ es van preparar diluint 0.1 ml de la dissolució concentrada en 10 ml de metanol en un matràs aforat. Las dissolucions es van conservar a una temperatura inferior a -20°C .

4.1.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1.3.1 Caracterització de les columnes

En una primera sèrie d'experiments es va estudiar la capacitat dels quatre tipus de columnes disponibles. 50 µl contenint 500 ng de cadascun dels esteroides, per als quals els anticossos havien estat creats, van ser dissolts en 5 ml de tampó PBS i aplicats a les respectives columnes. Seguidament es van aplicar 10 ml d'una barreja aigua/metanol 8:2 v/v i els esteroides es van eluir amb 3 ml d'una barreja aigua/metanol 3:13 v/v. Finalment, 5 ml d'una barreja aigua/metanol 2:8 v/v va ser aplicada. Les quatre fraccions (càrrega, neteja, el·lució i post-el·lució) van ser recollides. Després d'afegir 300 ng d'estàndard intern a totes les fraccions recollides, el metanol va ser evaporat i les fases aquoses extretes amb *terc*-butil-metil-èter van ser analitzades.

Per als gels I, II i III aquesta quantificació es va realitzar per cromatografia líquida amb detecció ultraviolada. El temps de retenció (TR) dels analits i dels estàndards interns utilitzats a cada un dels casos es resumeixen a la taula 4-2. En el cas del gel IV, la quantitat de DHEA i de l'estàndard intern (metiltestosterona) es van determinar per GC/MS amb el mètode comunament emprat (J. Segura, 1993).

Taula 4-2. Detecció per HPLC/UV d'esteroides aïllats per IAC.

Columna	Hypersil BDS (100 x 4.6 mm I.D.) 3 µm mida de partícula.			
Fase mòbil	Aigua/Acetonitril 67:33 (v/v). Flux: 1 ml/min.			
Detecció	Longitud d'ona: 244 nm			
Injecció	10 µl (extracte reconstituït en 50 µl)			
Tipus de gel	Analit		Estàndard intern	
	Nom	TR (min)	Nom	TR (min)
I	Metiltestosterona	10.4	Bolasterona	13.6
II	Epimetiltestosterona	12.1	Metiltestosterona	10.4
III	Testosterona	7.9	Metiltestosterona	10.4

La capacitat dels gels per retenir els esteroides d'interès, va ser assajada aplicant el mateix protocol d'extracció descrit anteriorment a patrons de cadascun dels analits (250 ng). Els resultats d'aquest experiment semblen indicar que la majoria d'esteroides queden lligats als anticossos d'acord amb el previst inicialment. L'excepció és la norandrosterona, un 98% de la qual es perd durant l'etapa de neteja (taula 4-3). A eliminar el contingut

metanòlic de la solució de neteja, la retenció de la norandrosterona en el gel tipus IV va augmentar fins a un 60%. També va millorar lleugerament la retenció de la boldenona en el gel tipus III (taula 4-3).

Taula 4-3. Recuperació dels analits aplicats individualment sobre els gels.

Tipus de gel	Analit	Condicions	
		A	B
I	3'-hidroxiestanozolol	100%	100%
I	17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol	100%	100%
I	17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	100%	100%
II	17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol	41.7%	100%
III	Boldenona (androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-ona)	83.9%	100%
III	5 β -androst-1-en-17 β -ol-3-ona	95.6%	100%
IV	Norandrosterona	1.9%	59.8%

4.1.3.2. Anàlisi d'orines.

Amb l'objectiu d'avaluar quins són els esteroides endògens que interaccionen de forma específica amb els anticossos, i com aquests competeixen amb els analits, es varen realitzar una segona sèrie d'experiments. Aquest cop diferents alíquotes d'una orina enriquides amb 50 ng/ml de cadascun dels esteroides estudiats es van hidrolitzar amb β -glucuronidasa i aplicar a les corresponents columnes d'IAC.

A tots aquest experiments es van utilitzar 5 mL d'una orina blanc corresponent a un voluntari sa que presentava un perfil esteroïdal endogènic estàndard. S'ha de tenir present la gran variabilitat existent en les concentracions dels esteroides endògens a la població general. A la taula 4-4 es presenten les concentracions de l'orina utilitzada, així com els valors mitjos i desviacions estàndard de les poblacions masculina (n=126) i femenina (n=49).

Taula 4-4. Perfil esteroïdal de l'orina utilitzada i valors poblacionals d'alguns esteroides endògens. Mitjana \pm desviació estàndard.

Esteroides	Orina utilitzada	Població Masculina (n=126)	Població Femenina (n=49)
Testosterona	59 ng/mL	55.7 \pm 75.9	9.5 \pm 7.8
Epitestosterona	70 ng/mL	46.6 \pm 40.4	13.3 \pm 12.7
Androsterona	1737 ng/mL	5169.7 \pm 2974.7	2928.0 \pm 1775.6
Etiocolanolona	2015 ng/mL	2883.8 \pm 2220.3	2058.0 \pm 1257.8
DHEA	37 ng/mL	101.1 \pm 211.0	54.3 \pm 30.7
11-hidroxiandrosterona	540 ng/mL	1419.6 \pm 218.0	803.8 \pm 488.6
11-hidroxietiocolanolona	270 ng/mL	281.2 \pm 316.2	157.6 \pm 135.7
5 α -dihydrotestostosterona	9 ng/mL	39.1 \pm 45.1	6.1 \pm 6.2
5 α -androstan-3 α ,17 α -diol	43 ng/mL	68.3 \pm 55.7	33.6 \pm 32.1
5 β -androstan-3 α ,17 α -diol	150 ng/mL	122.4 \pm 143.6	66.6 \pm 79.8
5 β -pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol	742 ng/mL	1345.8 \pm 756.3	966.1 \pm 597.6

En les primeres condicions assajades (condicions A), 5 ml de l'orina enriquida van ser aplicats a la columna. A continuació la columna va ser netejada amb 10 ml d'aigua i els esteroides van ser eluïts amb 3 ml de la barreja aigua/metanol 3:13 v/v.

Com es pot observar a la taula 4-5, les recuperacions obtingudes varen disminuir dràsticament. En el cas concret de la norandrosterona, el cent per cent de la quantitat aplicada es va perdre en les etapes de càrrega i neteja. Els resultats d'aquests experiments va posar de manifest la impossibilitat de la utilització del gel de tipus IV per a la purificació de la norandrosterona.

Per a la resta de gels, una segona sèrie d'aliquotes va ser aplicada a les columnes en unes condicions lleugerament diferents: a l'extracte d'orina hidrolitzada se li afegia metanol (14% del volum total). Aquesta barreja era aplicada a la columna, el rentat de la columna es realitzava amb 10 ml d'una solució metanòlica al 14% en volum i l'elució amb 5 ml de la barreja aigua/metanol 3:13 v/v (condicions B).

En general, les recuperacions obtingudes amb les condicions B no difereixen significativament de les obtingudes amb les primeres condicions.

Taula 4-5. Recuperacions obtingudes al aplicar orines enriquides amb 250 ng de cadascun dels esteroides d'interès a les respectives columnes d'IAC.

Tipus de gel	Analit	Condicions	Condicions
		A	B
I	3'-hidroxiestanozolol	90.6%	95.3%
I	17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol	65.3%	59.3%
I	17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	36.9%	44.2%
II	17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol	68%	55%
III	Boldenona (androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-ona)	21.5%	24.6%
III	5 β -androst-1-en-17 β -ol-3-ona	19.7%	21.1%
IV	Norandrosterona	0%	0%

Conjuntament amb els compostos afegits a les orines, altres esteroides endògens van ser detectats a les corresponents fraccions d'elució. En els gels tipus I i tipus III es va detectar la presència de testosterona, androsterona, etiocolanolona i pregnantriol. La retenció d'un percentatge elevat de la testosterona inicialment aplicada a la columna (aproximadament un 70% en ambdós gels) s'ha d'atribuir a una interacció específica d'aquest 17 β -hidroxi-esteroide amb els llocs actius dels anticossos. En canvi, la presència de petits percentatges d'androsterona, etiocolanolona i pregnantriol correspon possiblement a una interacció inespecífica d'aquests esteroides amb el gel.

En el gel tipus II, a més de detectar petites quantitats de d'androsterona, etiocolanolona i pregnantriol, es va detectar la presència d'epitestosterona degut a una interacció específica amb els anticossos.

Pel que fa al gel tipus IV, la presència de DHEA a la fracció d'elució, demostra que com era d'esperar, aquest esteroide té una afinitat molt superior a la de la norandrosterona. En aquest cas no es va observar la presència de testosterona ni epitestosterona, però igual que a la resta dels casos es va detectar androsterona, etiocolanolona i pregnantriol. És possible que tant l'androsterona com l'etiocolanolona tinguin certa afinitat per aquest anticòs ja que són 17-ceto-esteroides. Aquest fet complica encara més la utilització del gel tipus IV per a la purificació de cap esteroide exogen.

Cal afegir que en les condicions B s'observa una disminució significativa en les quantitats d'androsterona, etiocolanolona i pregnantriol detectades. Així doncs, encara que les condicions B no suposen una millora pel que fa a la recuperacions assolides, sí que

impliquen una major neteja en l'extracte final obtingut i per aquesta raó són preferides respecte a les condicions A.

Així doncs, l'establiment d'un mètode de MIAC per al cribatge d'un grup reduït d'esteroides exògens (3'-hidroxiestanozolol, 17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol, norandrosterona i 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol) resulta inviable amb el grup d'anticossos disponibles.

A més, per a l'establiment de mètodes de confirmació la utilització dels gels tipus I i tipus III es veu complicada per la presència de testosterona a l'orina. De forma anàloga, la presència d'epitestosterona pot suposar un problema a l'hora de purificar 17 α -hidroxi-esteroides amb el gel tipus II.

4.1.3.3. Mètodes de confirmació.

Malgrat tots aquests inconvenients, la utilització d'aquestes columnes encara és possible per a la confirmació d'alguns esteroides exògens. En concret, per al 3'-hidroxiestanozolol i pels dos metabòlits principals de la metiltestosterona (17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol i 17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol) es pot purificar la mostra per IAC seguint un procés de dues etapes.

En una primera etapa la testosterona present a la mostra, la concentració de la qual es coneix pel mètode de cribatge d'esteroides aplicat rutinàriament, s'elimina mitjançant una columna del tipus III. Seguidament, les fraccions de càrrega i neteja combinades s'apliquen sobre una columna del tipus I on queden retinguts tots els 17 α -metil-17 β -hidroxi esteroides. A la figura 4-1 s'il·lustra el diagrama de flux del mètode.

Figura 4-1. Diagrama de flux del mètode de confirmació de 17 α -metil-17 β -hidroxi esteroides per IAC.

A. PREPARACIÓ DE LAS MUESTRAS

GRADILLA (identificar: # lote), conteniendo las muestras (4 alícuotas de 5 ml de orina para cada muestra)

- 1__ + 2 TUBOS con 5 ml de Orina blanco [LOTE:] e identificar BLO1, BLO2 *
 2__ + 3 TUBOS con 5 ml de Orina OR2x [LOTE:] e identificar OR21, OR22, OR23
 3__ + TUBOS con 5 ml de Orinas de control positivas, preparadas e identificadas como sigue: *

Identificación	Orina blanco utilizada	Solución añadida	μ l añadidos	DI	Conc. Orina
CA11 a CA13					
OR11					
PADE					

(Para tubo PADE pasar a paso 55)

- 4__ añadir 50 μ l de solución ISTD (Methyltestosterone 10 μ g/ml) a todos los tubos excepto BLO2, OR11 y alícuota 4 de muestra, vórtex 3 seg

- 5__ **EXTRACTOR SL**, identificado: # lote

- 6__ + DETECTABUSE™ COLUMNS, identificadas como los tubos [LOTE:]
 7__]
 8__ + 2 ml metanol [LOTE:] [DI:]
 9__ + 2 ml H₂O Milli Q [DI:]

aplicar muestra

- 10__ pasar la muestra

- 11__ + 2 ml H₂O Milli Q [DI:]
 12__ + TUBOS DE ELUCIÓN, identificados como las columnas
 13__ + 2 ml metanol [LOTE:] [DI:]

- 14__ **GRADILLA** (identificar: # lote)

- 15__ + TUBOS, identificar como los otros

- 16__ decantar eluatos

- 17__ evaporar bajo N₂, baño < 50°C [T °C]

- 18__ + 1ml T.F.S. 0.2M pH 7 [LOTE:] [DI:]

- 19__ vórtex 5 seg.

- 20__ + 50 μ l β -glucuronidasa *E. coli* [LOTE:] [DI:]

- 21__ vórtex 3 seg. aprox

- 22__ baño agua 55 \pm 2 °C, 1h [T °C]

- 23__ dejar enfriar a temperatura ambiente

- 24__ + 250 μ l sol. 5% K₂CO₃ [LOTE:] [DI:]

- 25__ vórtex 5 seg.

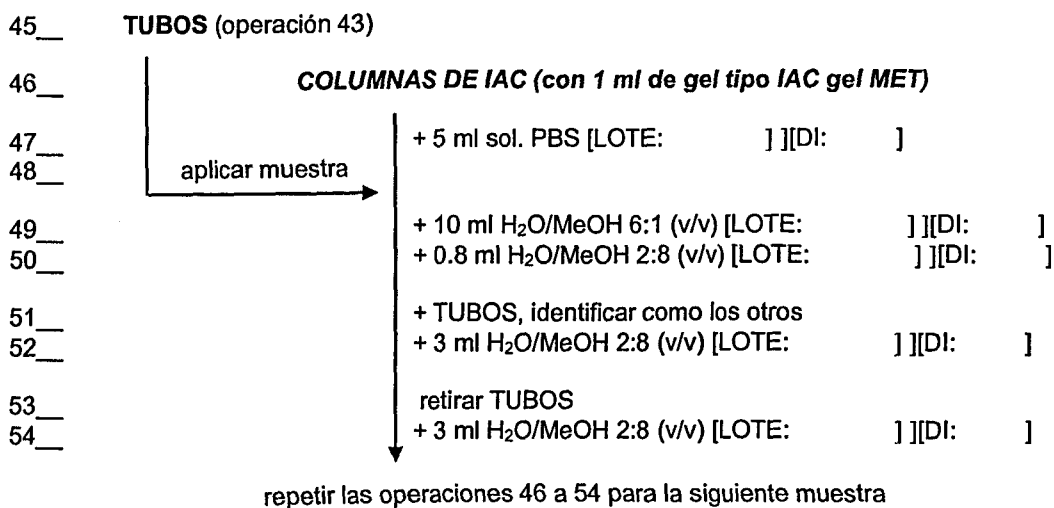
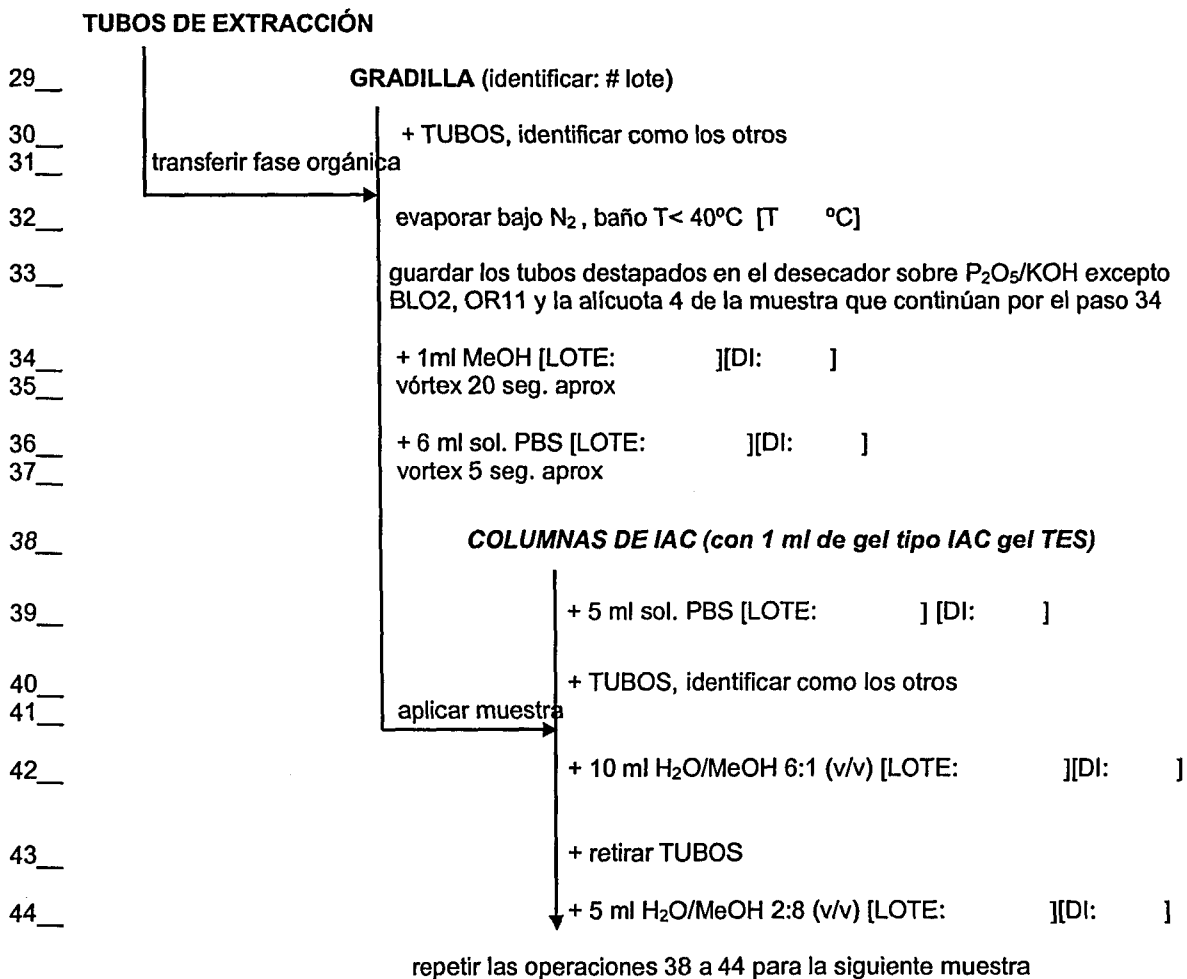
- 26__ + 5 ml *tert*-butilmetiléter [LOTE:] [DI:]

- 27__ vórtex 1 min. o agitador vasculante 20 min. a 40 mov/min.

- 28__ centrifugar 3500 rpm aprox , 5 min.

Figura 4-1. Diagrama de flux del mètode de confirmació de 17 α -metil-17 β -hidroxi esteroides per IAC (continuació).

B. PURIFICACIÓ POR IAC



Aquest mètode, un cop validat, ha estat empleat amb èxit per a la confirmació de 34 mostres positives a estanozolol i metiltestosterona en el laboratori de control antidopatge de Barcelona.

En el cas de que la mostra a confirmar presentés una concentració molt elevada de testosterona, la mostra s'hauria d'aplicar més d'una vegada a la columna tipus III amb la finalitat d'assegurar una correcta retenció de l'analit a la columna tipus I.

El 17β -metil- 5β -androst-1-ene- $3\alpha,17\alpha$ -diol també es pot aïllar selectivament mitjançant el gel tipus II. En aquest cas però no és possible aplicar una etapa prèvia d'IAC per tal d'eliminar el competidor endogen (en aquest cas l'epitestosterona), ja que no es disposa d'un anticòs d'aquestes característiques. Tanmateix, i donat que la concentració d'epitestosterona és coneguda abans de començar el procés de confirmació, és possible decidir si la capacitat de la columna serà suficient per retenir l'analit i l'epitestosterona al mateix temps. Aplicant aquest procediment (esquematitzat a la figura 4-2) s'han confirmat 8 mostres positives a metandienona al laboratori de control antidopatge de Barcelona.

4.1.3.4. Estabilitat dels gels

Un cop finalitzada cada extracció, les columnes eren equilibrades amb 10 ml de tampó PBS (0.05% NaN_3) i emmagatzemades a 4°C . En principi, aquest tractament hauria de ser suficient per regenerar els gels i permetre d'aquesta forma la re-utilització indefinida de les columnes. L'estabilitat de les columnes va ser estudiada mitjançant el re-anàlisi al llarg del temps de la capacitat màxima de retenció per als esteroides per als quals els gels van ser generats. Els resultats obtinguts (taula 4-6) demostren que si les columnes són mantingudes correctament, aquestes poden ser re-utilitzades sense cap problema.

Figura 4-2. Diagrama de flux del mètode de confirmació de 17β -metil- 5β -androst-1-ene- $3\alpha,17\alpha$ -diol per IAC.

GRADILLA (identificar: # lote), conteniendo las muestras (4 alícuotas de 5 ml de orina para cada muestra)

- 1__ + 2 TUBOS con 5 ml de Orina blanco [LOTE:] e identificar BLO1, BLO2, *
 2__ + 3 TUBOS con 5 ml de Orina OR2x [LOTE:] e identificar OR21, OR22, OR23
 3__ + TUBOS con 5 ml de Orinas de control positivas y muestras de calibración, preparadas e identificadas como sigue: *

Identificación	Orina blanco utilizada	Solución añadida	µl añadidos	DI	Conc. Orina
CA11 a CA13					
OR11					
PADE					

(Para tubo PADE pasar a paso 47)

- 4__ añadir 50 µl de solución ISTD (Methyltestosterone 10 µg/ml) a todos los tubos excepto BLO2, OR11 y alícuota 4 de muestra, vórtex 3 seg aprox.

- 5__ **EXTRACTOR SL**, identificado: # lote

- 6__ + DETECTABUSE™ COLUMNS, identificadas como los tubos [LOTE:]
 7__ + 2 ml metanol [LOTE:] [DI:]
 8__ + 2 ml H₂O Milli Q [DI:]

aplicar muestra

- 10__ pasar la muestra

- 11__ + 2 ml H₂O Milli Q [DI:]
 12__ + TUBOS DE ELUCIÓN, identificados como las columnas
 13__ + 2 ml metanol [LOTE:] [DI:]

- 14__ **GRADILLA** (identificar: # lote)

- 15__ + TUBOS, identificar como los otros

- 16__ decantar eluatos

- 17__ evaporar bajo N₂, baño < 50°C [T: °C]

- 18__ + 1ml T.F.S. 0.2M pH 7 [LOTE:] [DI:]

- 19__ vórtex 5 seg aprox.

- 20__ + 50 µl β-glucuronidasa *E. coli* [LOTE:] [DI:]

- 21__ vórtex 3 seg aprox.

- 22__ baño agua aprox. 1 h a 55 ± 2 °C [T: °C]

- 23__ dejar enfriar a temperatura ambiente (5 min. aprox.)

- 24__ + 250 µl sol. 5% K₂CO₃ [LOTE:] [DI:]

- 25__ vórtex 5 seg aprox.

- 26__ + 5 ml pentano [LOTE:] [DI:]

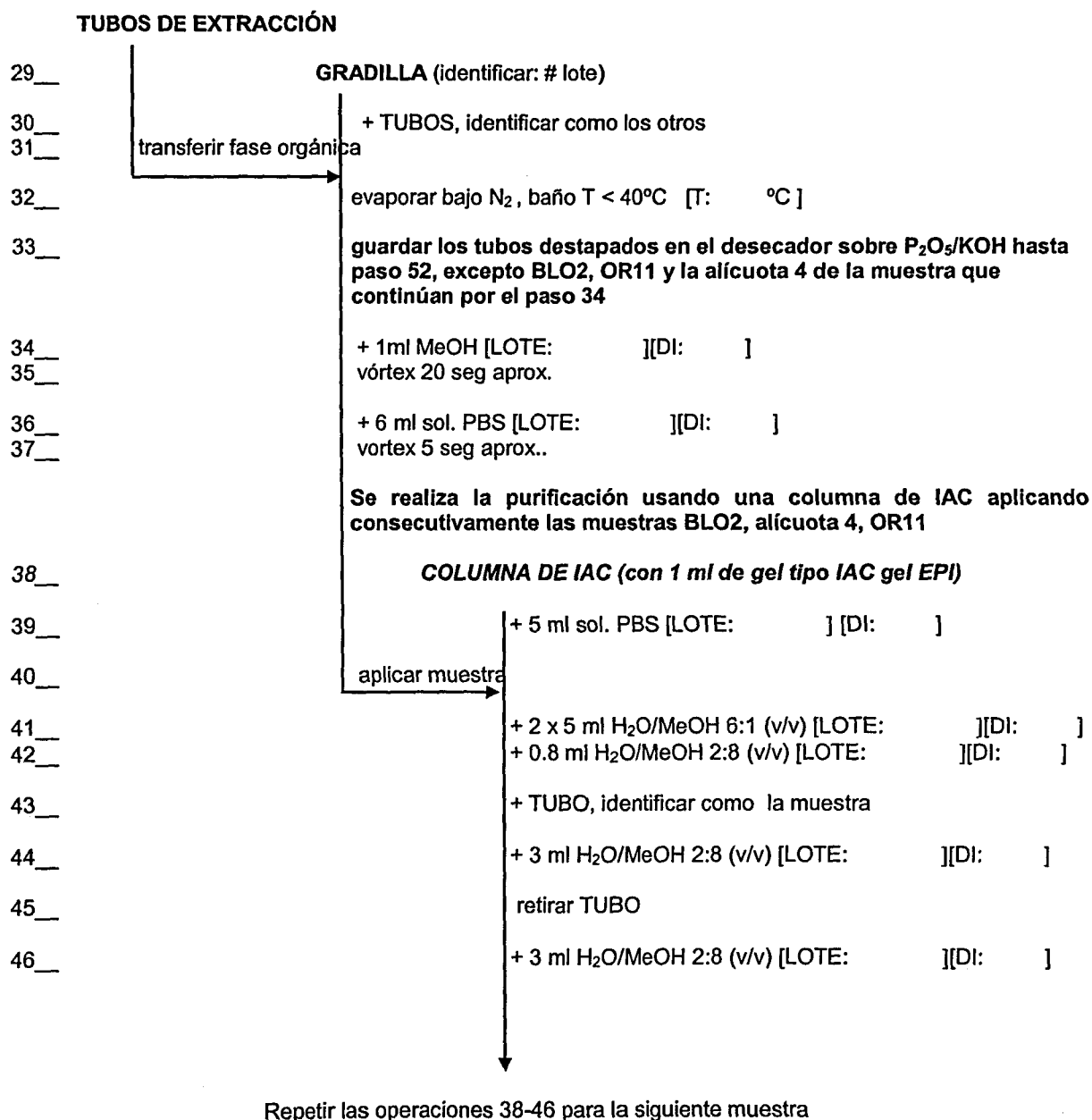
- 27__ vórtex 1 min. aprox. o agitador vasculante 20 min aprox. a 40 mov/min.

- 28__ centrifugar aprox. a 3500 rpm, 5 min.

TUBOS DE EXTRACCIÓN

Figura 4-2. Diagrama de flux del mètode de confirmació de 17β -metil- 5β -androst-1-ene- $3\alpha,17\alpha$ -diol per IAC (continuació).

B. PURIFICACIÓ POR IAC



Taula 4-6. Estabilitat d'algunes de les columnes d'IAC utilitzades.

Tipus de gel	Codi columna	Capacitat inicial (ng)	Capacitat final (ng)	Número anàlisis	Període de temps
I	IC03	377	331	66	6.1 anys
I	IC06	488	411	158	5.6 anys
II	IC07	209	189	101	5.2 anys
III	IC05	160	195	113	4.3 anys
III	IC12	326	308	168	4.3 anys

4.1.4. DISCUSSIÓ

Malgrat que els metabòlits d'interès tenen prou afinitat per als anticossos triats, quan aquest són aplicats individualment, l'aïllament d'aquest metabòlits a l'orina humana resulta inviable en alguns casos. La presència d'esteroides d'origen endogen a l'orina amb una afinitat superior fa que els llocs actius dels anticossos siguin ocupats pels analits, impedit el seu aïllament. Això, afegit a la gran variació existent en els perfils esteroïdals fa que l'establiment d'un mètode de cribatge per un número reduït d'esteroides mitjançant MIAC sigui impossible amb el grup de gels triats.

Tanmateix, la utilització d'aquesta tècnica en processos de confirmació és possible i aporta més informació estructural ja que només esteroides amb estructures adequades són retinguts en el gel.

El primer mètode desenvolupat permet la confirmació de 3'-hidroxiestanozolol i dels dos metabòlits principals de la metiltestosterona (17α -metil- 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol i 17α -metil- 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol) mitjançant l'ús successiu de dos anticossos diferents. A una primera etapa la testosterona present a la mostra és eliminada en un gel tipus III, els compostos no retinguts en aquesta columna són aplicats a una segona etapa a un gel tipus I, on queden retinguts els 17α -metil- 17β -hidroxi-esteroides.

El segon mètode desenvolupat permet la confirmació de 17β -metil- 5β -androst-1-en- $3\alpha,17\alpha$ -diol (metabòlic de la metandienona) mitjançant la utilització del gel tipus II.

Donada la reactivitat creuada que presenten, és important avaluar les concentracions de testosterona i epitestosterona (els principals interferents endògens) abans de procedir a l'anàlisi de la mostra.

4.2. PREPARACIÓ DE MOSTRES MITJANÇANT CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

4.2.1. ANTECEDENTS I OBJECTIUS

Dins l'àmbit del control antidopatge, els mètodes de confirmació tenen com a requisit fonamental l'obtenció de la màxima informació estructural possible sobre la substància detectada. En general, això es tradueix en l'obtenció d'un espectre de masses complet. La sensibilitat dels espectròmetres de masses en mode *full scan* és molt inferior a la sensibilitat obtinguda quan es realitza una monitorització selectiva d'alguns ions (mode *SIM*). Els mètodes de cribatge utilitzen el mode *SIM* per oferir la màxima sensibilitat, però ofereixen poca informació estructural. Conseqüentment, per a la confirmació de mostres trobades presumptament positives pel mètode de cribatge, és necessari disposar d'extractes molt més concentrats i nets.

Com s'ha comentat al principi d'aquest capítol, una de les opcions és la utilització de la cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) com etapa de separació de fraccions prèvia a l'anàlisi per GC/MS.

Emprant aquesta estratègia és possible separar tantes fraccions com es consideri necessari per aïllar, de forma el més pura possible, cadascun dels metabòlits a determinar. Els mètodes descrits fins ara incorporen la purificació per HPLC com una etapa addicional en el procés d'extracció habitual i requereixen la utilització d'espectròmetres de masses d'alta resolució per a la detecció a baixes concentracions.

Nosaltres ens vam proposar com a objectiu el desenvolupament d'un únic mètode de fraccionament per HPLC que permetés l'aïllament de cadascun dels cinc compostos amb especials requeriments de sensibilitat (clenbuterol, norandrosterona, 17α -metil- 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 17β -metil- 5β -androst-1-ene- $3\alpha,17\alpha$ -diol i 3'-hidroxiestanozolol). El posterior anàlisi es realitzaria per GC/MS amb un espectròmetre de masses de trampa iònica i hauria de permetre l'obtenció d'espectres de massa complets, comparables amb els de substàncies de referència.

Els resultats d'aquest estudi es presenten a la següent publicació.

**LIQUID CHROMATOGRAPHY CLEAN-UP METHOD TO IMPROVE
IDENTIFICATION OF ANABOLIC AGENTS IN HUMAN URINE BY GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**

J. Marcos, X. de la Torre, J.C. Gonzalez, J. Segura and J.A. Pascual

Analytica Chimica Acta 2004

Marcos J, de la Torre X, Gonzalez JC, Segura J, Pascual JA. [Liquid chromatography clean-up method to improve identification of anabolic agents in human urine by gas chromatography-mass spectrometry](#). Anal Chim Acta. 2004; 552(1): 79-88.

Table 1. LC fractionation sequence. Fractions are defined by its initial relative retention time (RRT_i) with respect to the marker substance (trenbolone) and time window widths.

Compound collected	Abbreviation	RRT _i	width (min)
clenbuterol	CLE	0.695	1.5
3'-hydroxy-stanozolol	STA-m1	1.303	1.5
4β-hydroxy-stanozolol	STA-m2		
19-norandrosterone	NAN-m1	1.503	2.0
19-noretiocholanolone	NAN-m2		
17α-methyl-5β-androstane-3α,17β-diol	MET-m2	1.741	1.7
17α-methyl-5α-androstane-3α,17β-diol	MET-m1		
17β-methyl-5β-androst-1-ene-3α,17α-diol	MED-m1		

Table 2. Recovery and precision values for the compounds analysed with indication of the derivative formed, ions used for calculations and their retention times.

Compound	Derivative	m/z ^a	RT (min)	RRT ^b	Recovery (%) mean ± SD	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)
CLE	N-TMS, O-TMS	335,337,300	8.94	0.661	74.3 ± 9.2	9.7	16.0
STA-m1	N-TMS, bis O-TMS,	545, 560,254	8.73	1.484	77.0 ± 6.3	6.0	12.1
NAN-m1	bis O-TMS	405,315,420	10.01	0.723	73.2 ± 3.2	6.7	6.4
NAN-m2	bis O-TMS	405,315,420	11.00	0.794	74.2 ± 2.3	5.0	5.4
MET-m2	bis O-TMS	435,345,255	14.80	0.838	87.1 ± 7.8	7.1	7.3
MET-m1	bis O-TMS	435,345,255	14.66	0.830	89.6 ± 7.7	5.6	6.1
MED-m1	bis O-TMS	358,448,268	11.49	0.648	72.7 ± 5.0	5.4	13.7

SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation; RT: retention time; RRT: relative retention time

^a Ions used to calculate area ratios to meet identification criteria. The base ion, indicated in bold, was used for calculations of recovery, precision and accuracy.

^b Relative retention times with respect to the I.S. (methyltestosterone) for each GC method.

Table 3. LC fractionation scheme for other analytes of doping interest. Fractions are defined by its initial relative retention time (RRT) with respect to the marker substance (trenbolone, RT=10.97 min). A fixed time window width of 1.5 min was found to be appropriate for all listed compounds.

Compound	RRT	Compound	RRT
Pemoline	0.337	Oxymesterone	1.258
Ethamivan	0.520	Methenolone	1.349
Morphine	0.529	5 β -androst-1-en-17 β -ol-3-one	1.349
Triamterene	0.529	Epitestosterone	1.349
Codeine	0.565	5 α -androstane-3 α -17 β -diol	1.613
Salbutamol	0.611	1 α -methyl-5 α -androstan-3 α -ol-17-one	1.641
Terbutaline	0.620	5 β -androstane-3 α ,17 β -diol	1.659
6 β -hydroxymetandienone	0.620	17 α -ethyl-5 β -estrane-3 α ,17 β -diol	1.668
Buprenorphine	0.793	Etiocholanolone	1.668
5 β -androstane-3 α ,11 β -diol-17-one	0.930	4-chloroandrost-4-en-3 α -ol-17-one	1.686
Boldenone	0.957	1 α -methyl-5 α -androstan-3 α -ol-17-one	1.686
Probenecid	0.975	5 α -androstane-3 α -ol-17-one	1.714
5 α -androstane-3 α ,11 β -diol-17-one	0.975	5 β -pregnane-3 α -20 α -diol	1.759
4-androstene-3,17-dione	0.975	5 β -pregnane-3 α -17 α -20 α -triol	1.759
Fluoxymesterone	1.003	7 α ,17 α -dimethyl-5 β -androstane-3 α ,17 β -diol	1.778
Oxandrolone	1.003	2 α -methyl-5 α -androstan-3 α -ol-17-one	1.823
Testosterone	1.121	11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol	1.823
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	1.203		

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Typical LC profiles obtained for the analysis of urine samples. (A): UV chromatogram at 340 nm corresponding to a standard solution of trenbolone (the RT marker). (B): UV spectrum of trenbolone. (C): Chromatogram corresponding to the analysis of a calibration urine sample containing 2 ng/mL of 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone. The position of the 4 defined fractions is also indicated. Fraction 1 for clenbuterol. Fraction 2 for stanozolol metabolites (STA-m1 and STA-m2). Fraction 3 for nandrolone metabolites (NAN-m1 and NAN-m2), and Fraction 4 for methyltestosterone metabolites (MET-m1 and MET-m2) as well as metandienone metabolite (MED-m1).

Figure 2. GC/MS analysis of the LC fraction 2 of a urine sample obtained after an oral administration of stanozolol containing both metabolites, i.e. 3'-hydroxy-stanozolol (1) and putative 4 β -hydroxy-stanozolol (2) after LC fractionation. (A) extracted ion chromatograms. (B) Mass spectrum of 3'-hydroxy-stanozolol. (C) Mass spectrum of putative 4 β -hydroxy-stanozolol.

Figure 3. GC-MS analysis of urine samples (5 mL) containing a series of anabolic agents (2 ng/mL) after application of the method. Blank urine (bold line) is given as a reference.

Figure 4. Unsubtracted EI mass spectra of the TMS derivatives of the analytes of interest (A): from pure reference substances after direct GC/MS analysis. (B): obtained from the analysis of 5 mL human urine samples containing 2 ng/mL after application of the method herein described.

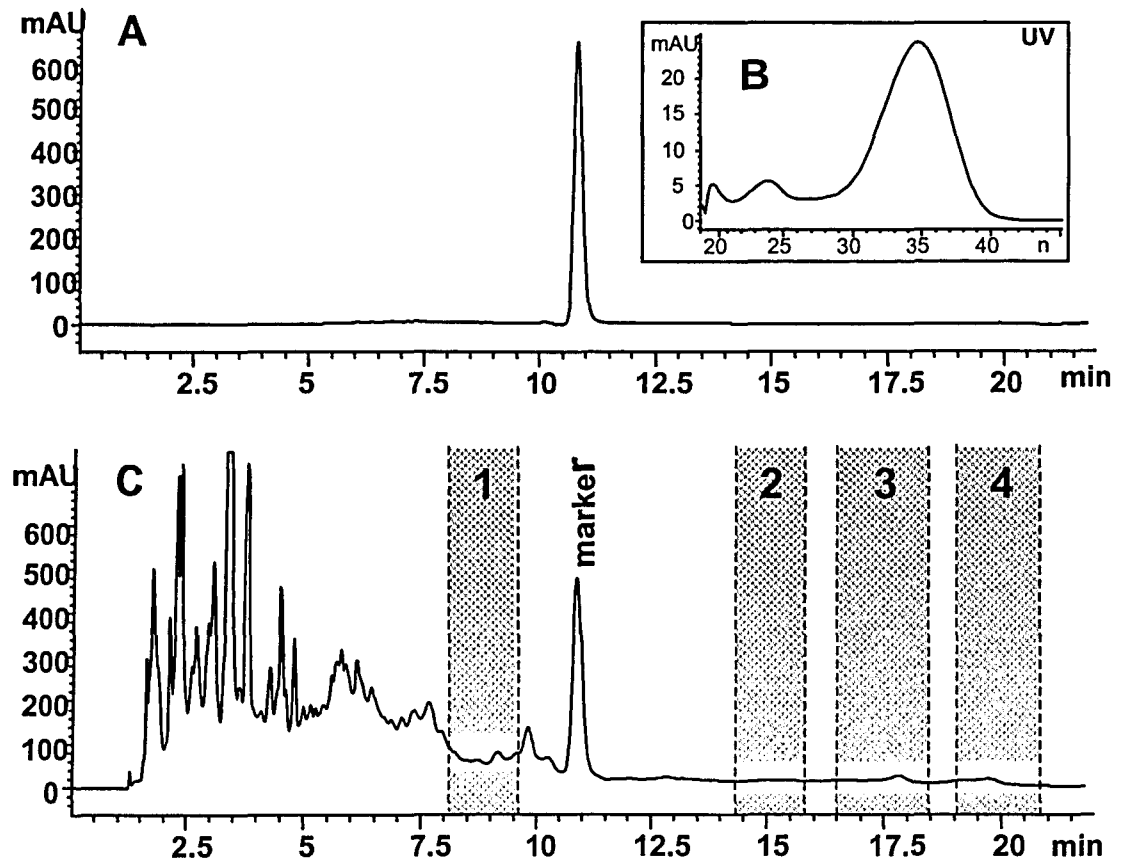


FIGURE 1

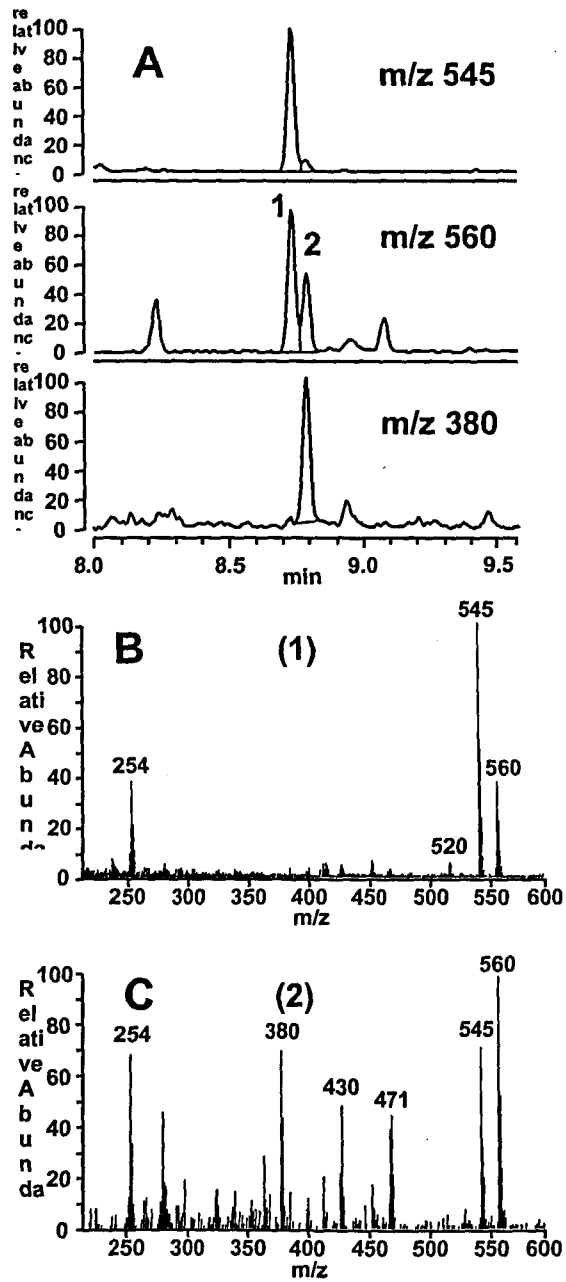


FIGURE 2

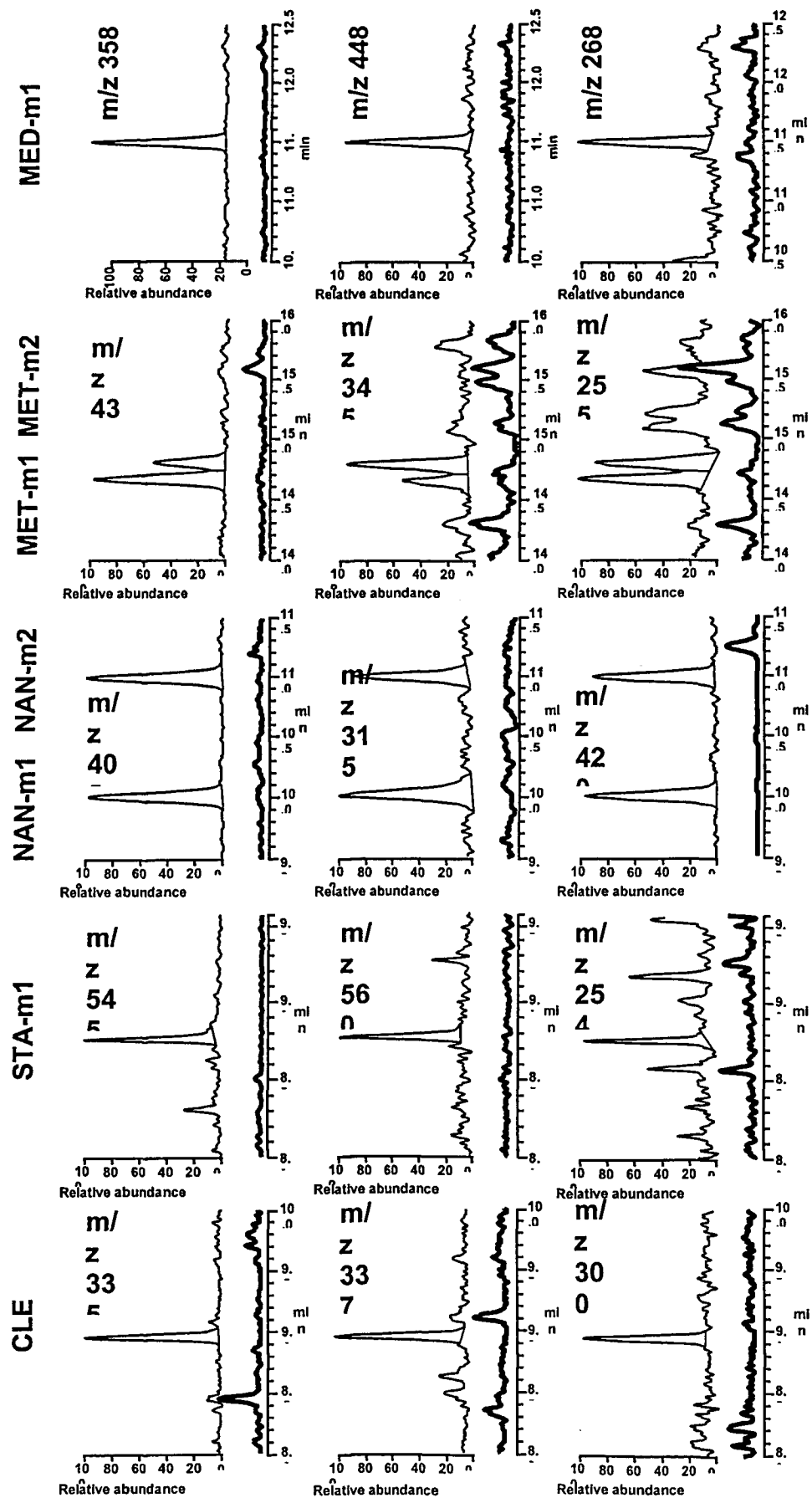


FIGURE 3

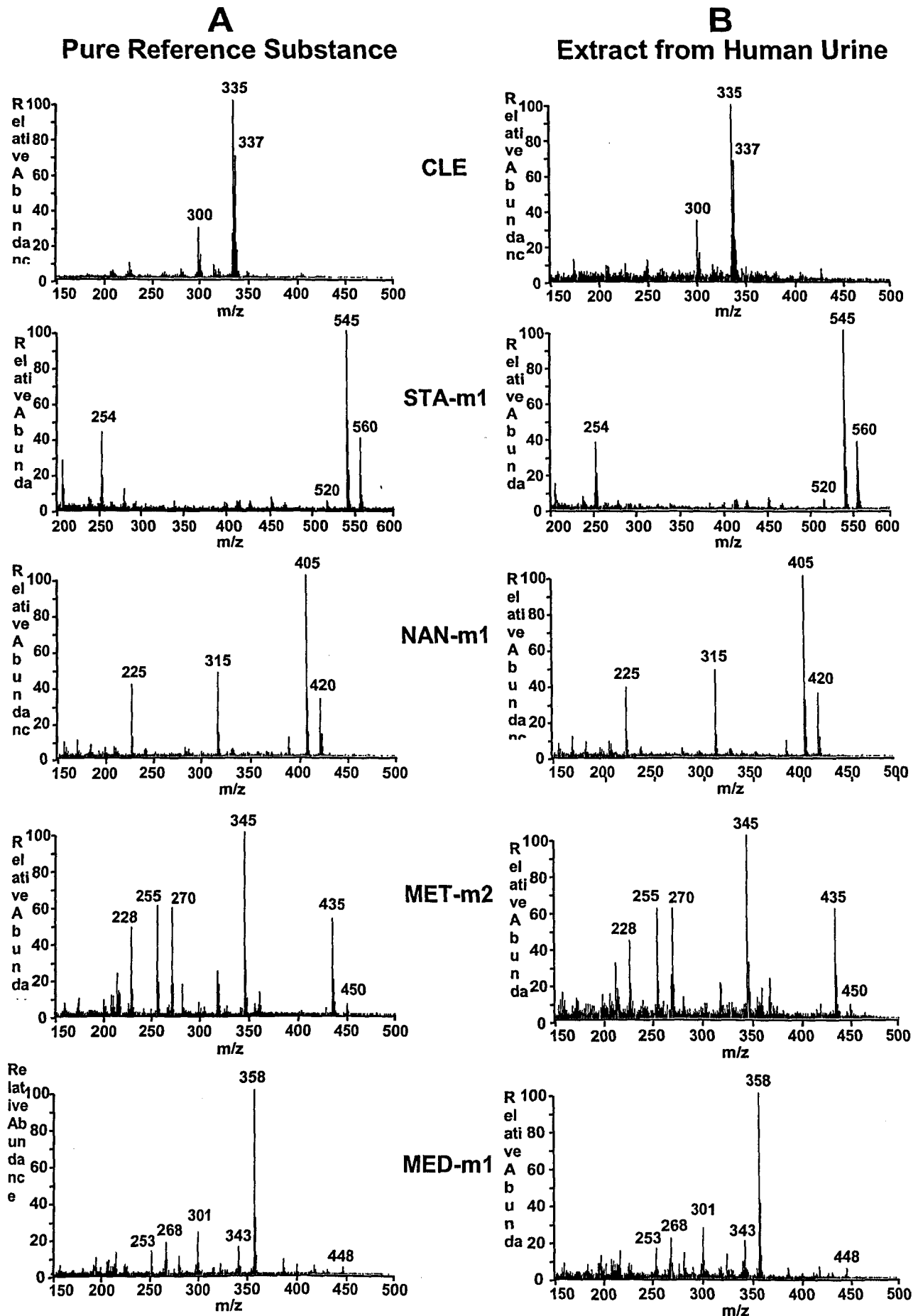


FIGURE 4

Còpia del text de l'e-mail rebut confirmant l'acceptació del manuscrit :

Re: PH937

Dear Dr. Pascual,

On behalf of the editor handling your revised manuscript, Professor P.R. Haddad, I am pleased to inform you about the **acceptance of the manuscript entitled:**

“Liquid chromatography clean-up method to improve identification of anabolic agents in human urine by gas chromatography-mass spectrometry.” by Marcos, J., De la Torre, X., Gonzalez, J.C., Segura, J. and Pascual, J.A.

As to point 18 of reviewer II: in your letter of response, you indicate the changed sentence you would like to include in reply to this comment. In the actual manuscript, however, this change was not made. We have included the corrected sentence from your letter; please check when you receive the galley proofs.

Transfer of copyright form and galley proofs will be sent to you in due course by the publisher. For questions with regard to proofs, publication date or reprints of your article, please contact our Author Support Department (fax: +353-61-709100; e-mail: authorsupport@elsevier.ie).

Yours sincerely,

Robert J. Marx

Friday, 05 March 2004

==

Editorial Office Analytica Chimica Acta

P.O. Box 681, 1000 AR Amsterdam, The Netherlands

Fax: +31-20-4852304; E-mail: chrom-eo@elsevier.nl

==

Capítol 5

APLICACIÓ DE NOVES ESTRATÈGIES INSTRUMENTALS

5.1 FORMACIÓ DE DERIVATS ALTERNATIUS

5.1.1. ANTECEDENTS I OBJECTIUS

Diversos tipus d'estratègies han estat descrites al llarg dels anys, a l'hora de derivatitzar els esteroides anabolitzants [Shackleton CHL, 1986; Donike M, 1970]. La formació dels trimetilsilil derivats (TMS) ha estat, sense cap mena de dubte, la reacció més emprada. Per a l'obtenció dels TMS derivats, l'ús de diferents agents silanitzants amb o sense catalitzadors ha estat descrit al llarg del temps.

Des de la seva aparició als anys 80 [Donike M, 1980], la utilització de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) amb trimetiliodosilà o iodur amònic com a catalitzador ha estat àmpliament estesa, convertint-se en el procés de derivatització de referència per als esteroides en el camp de l'anàlisi antidopatge. A la barreja se li acostuma a afegir una petita quantitat d'un agent reductor (etantiol, 2-mercaptoetanol o ditioeritritol) per tal d'evitar la oxidació del iodur.

Els espectres de masses dels enol-TMS èters corresponents a la pràctica totalitat dels esteroides coneguts es troben publicats a la literatura [Schanzer W, 1996]. És per això que aquest és el procediment de referència per mètodes de cribatge i de confirmació.

Respecte a la derivatització dels β_2 -agonistes, diferents procediments com ara la trimetilsililació, l'acilació, la formació de derivats metilboronats cíclics o acilacions i sililacions combinades han estat avaluats i comparats recentment [Damasceno L, 2000]. D'aquest estudi es desprèn que la millor alternativa en procediments de cribatge és la formació derivatització amb MSTFA o BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) per formar els TMS derivats.

La formació de derivats de pes molecular més elevats, presentaria l'avantatge d'un menor soroll de fons, degut a la, a priori, major especificitat dels ions amb m/z més elevada. D'altra banda aquesta part de l'espectre de masses ($m/z > 400$) presenta una major resposta en els espectròmetres de masses de trampa iònica.

La utilització de derivats TBS dels esteroides anabolitzants no ha estat exhaustivament estudiada.

Així doncs, vam decidir estudiar la viabilitat de la utilització dels derivats *terc*-butil-dimetilsilil (TBS) com alternativa als derivats trimetilsilil, habitualment emprats en aquest tipus de determinacions.

Com a d'altres apartats d'aquesta tesi, els esteroides triats per aquest estudi van ser el 3'-hidroxiestanozolol, la norandrosterona, la 19-noreticolanolona, el 17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol, el 17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol i el 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol, ja que aquests són els esteroides que s'han de reportar a concentracions més baixes (2 ng/ml).

5.1.2 MATERIAL I MÈTODES

5.1.2.1 Reactius

La (MSTFA), la N-metil-N-trimetilsilil-heptafluorobutiramida (MSHFBA), el N-trimetilsililimidazol (TMSIM) es van obtenir de Macherey-Nagel (Düren, Alemanya) i la N-metil,N-*terc* butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) d'Aldrich (Milwaukee, EEUU).

El 17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (MET-m2) i el 17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (MET-m1) són de Research Plus (Bayonne, EEUU). El 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol (MED-m3), la 19-noreticolanolona (NAN-m2) i la 19-norandrosterona (NAN-m1) són de The National Analytical Reference Laboratory (Pymble, Australia). El 3'-hidroxi-estanozolol (STA-m1) és de Radian Corporation (Austin, EEUU).

Les dissolucions metanòliques d'1 mg/ml de les substàncies de referència es van preparar dissolent 10 mg de cada substància en metanol i enrasant en un matràs aforat de 10 ml. Les dissolucions 10 μ g/ml es van preparar diluint 0.1 ml de la dissolució concentrada en 10 ml de metanol en un matràs aforat. Les dissolucions es van conservar a una temperatura inferior a -20° C.

5.1.2.2. Instrumental

L'anàlisi instrumental es va dur a terme amb un espectròmetre de masses quadrupolar model HP5973, acoblat a un cromatògraf de gasos model HP6890 equipat amb un injector automàtic HP7673A i una columna capil·lar HP 19091A-002 (16,5 m x 0.2 mm I.D.; 0.11 μ m d'espessor de pel·lícula) (Hewlett-Packard, Palo Alto, EEUU). Les injeccions es van realitzar sense divisió de flux (splitless) i el gas portador va ser heli. El

programa de temperatures del forn del cromatògraf va ser: temperatura inicial 180°C, increment a 3 °C/min fins a 230°C i llavors a 40 °C/min fins a 310°C. i mantingut a 310°C durant 3 minuts.

5.1.3 RESULTATS

Es va estudiar la utilització de diferents reactius de derivatització. Es van derivatitzar de sis formes diferents 500 ng de MET-met1, MET-met2, NAN-met1, MED-met3 i STA-met1. Els reactius i condicions d'aquests sis assajos (A - F) es recullen en la taula 5-1. L'anàlisi es va fer amb un espectròmetre de masses quadrupolar en mode de *full scan*.

Taula 5-1. Reactius de derivatització i condicions assajades.

Exp	Reactiu	T (°C)	Temps (min)
A	50 µl MTBSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v	100	20
B	50 µl MTBSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v	80	20
C	30 µl MTBSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v 20 µl MSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v	80	20
		60	20
D	50 µl MTBSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v	100	40
E	50 µl MTBSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v	80	40
F	30 µl MTBSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v 20 µl MSTFA/NH ₄ I/ HS(CH ₂) ₂ OH 1000:2:6 v/p/v	80	40
		60	20

Entre els experiments C i F no es van observar grans diferències. En aquestes condicions els derivats formats majoritàriament per cadascun dels sis compostos varen ser: mono-O-TBS-mono-O-TMS-MET-met1, mono-O-TBS-mono-O-TMS-MET-met2, mono-O-TBS-mono-O-TMS-metiltestosterona, mono-O-TBS-mono-O-TMS-MED-met3, bis-O-TBS-NAN-met1 i bis-TBS-mono-TMS-STA-met1. També es van formar el bis-O-TMS-MET-met1 i dos derivats mono-O-TBS-mono-O-TMS-NAN-met1 (figures 5-1 i 5-2). Els espectres corresponents a aquests compostos es presenten en les figures 5-3 a 5-6.

Figura 5.1. Cromatogrames obtinguts al analitzar patrons mitjançant GC/MS amb les condicions de l'experiment C. Superior: 500 ng de MET-m2, NAN-m1 i STA-m1. Inferior: 500 ng de MET-m1, MED-m3 i metiltestosterona.

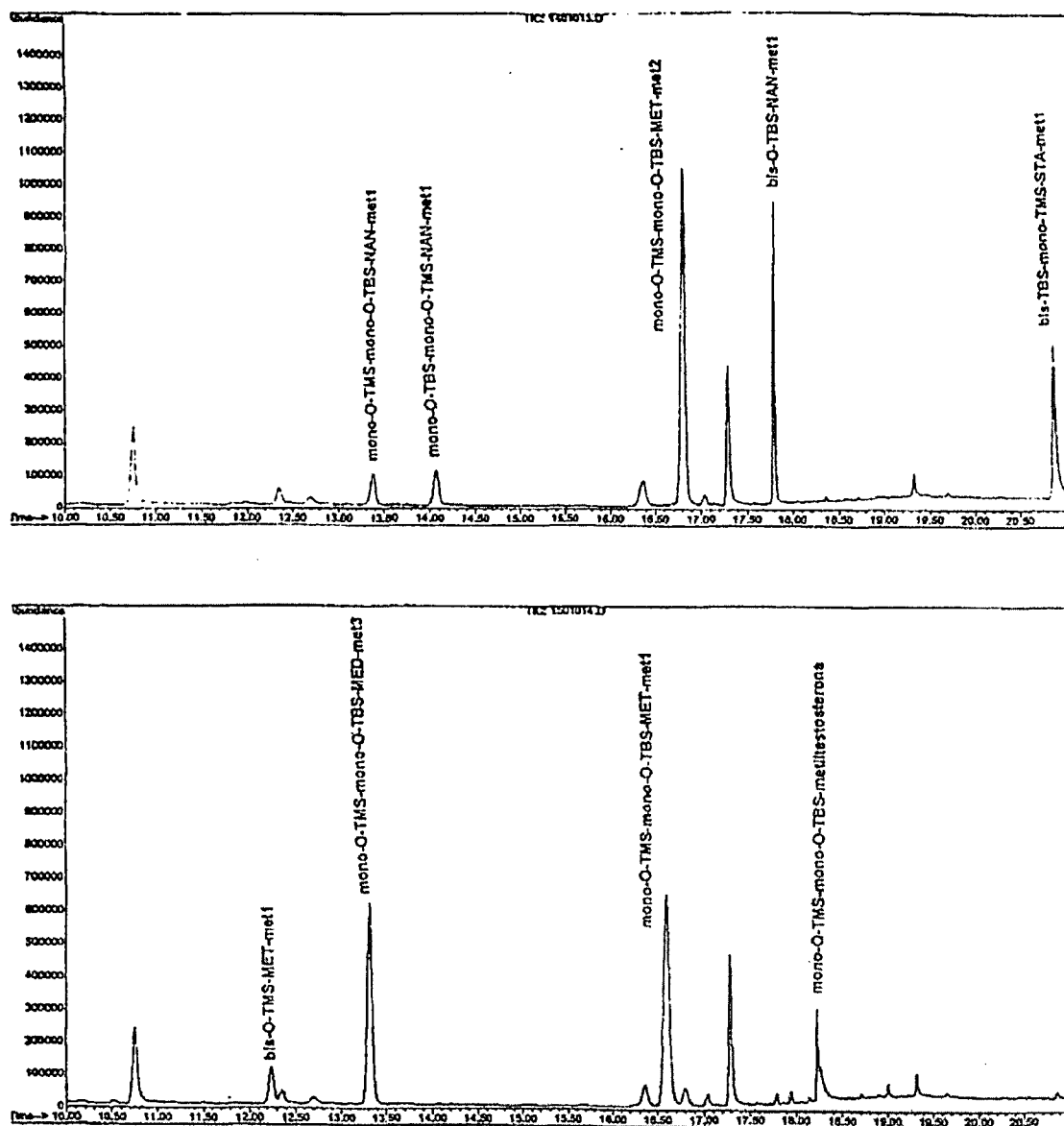


Figura 5.2. Cromatogrames obtinguts al analitzar patrons mitjançant GC/MS amb les condicions de l'experiment F. Superior: 500 ng de MET-m2, NAN-m1 i STA-m1. Inferior: 500 ng de MET-m1, MED-m3 i metiltestosterona.

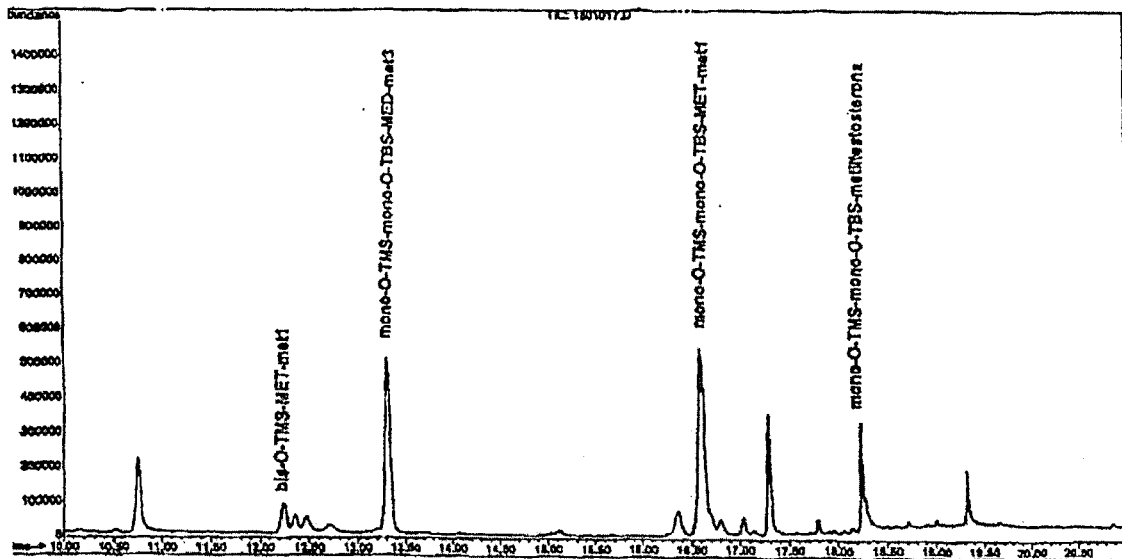
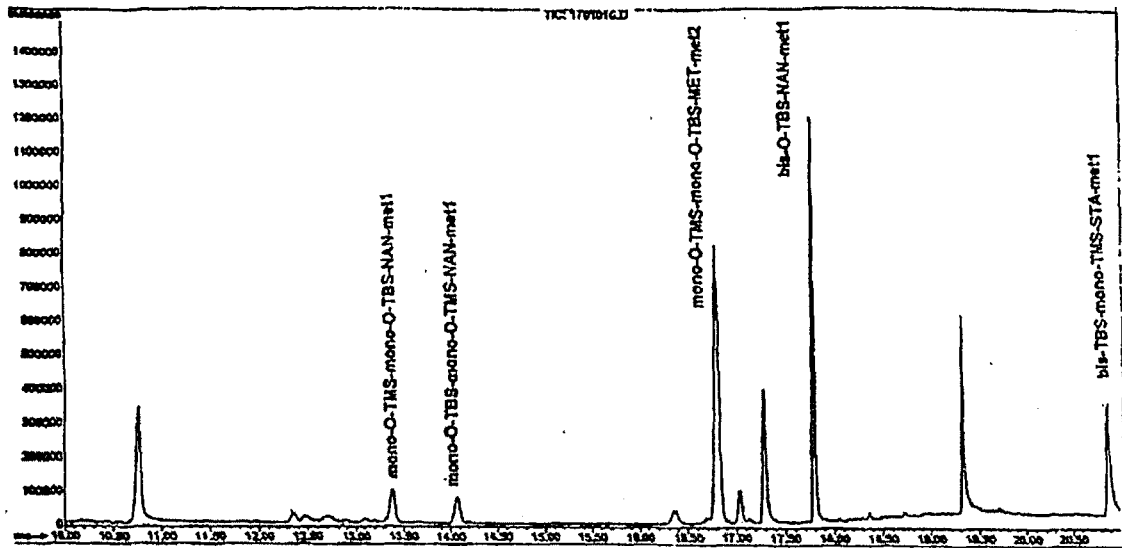


Figura 5.3. Espectres de masses dels derivats mono-O-TMS-mono-O-TBS-MET-m2 (superior) i mono-O-TMS-mono-O-TBS-MET-m1 (inferior).

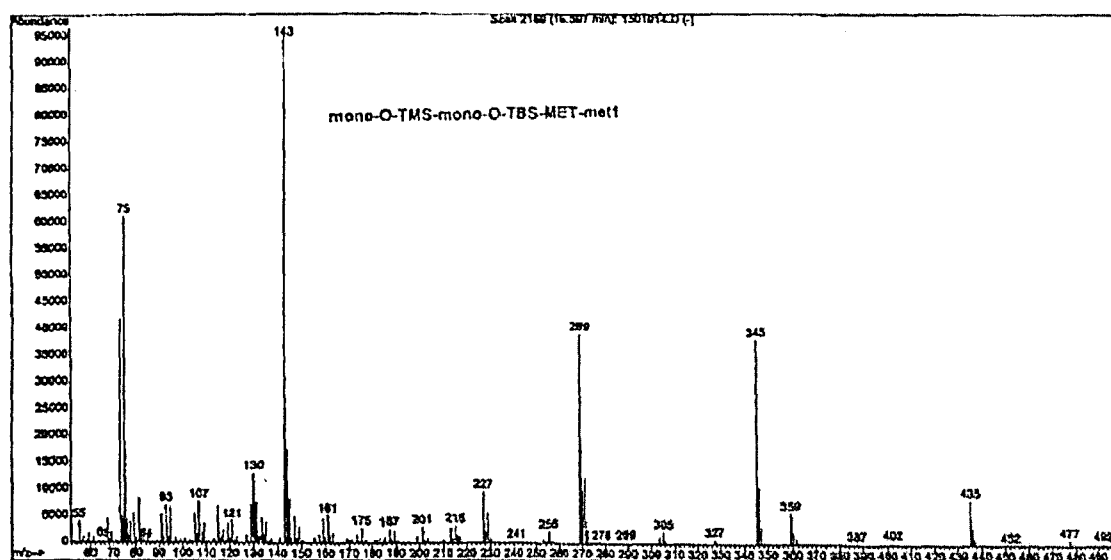
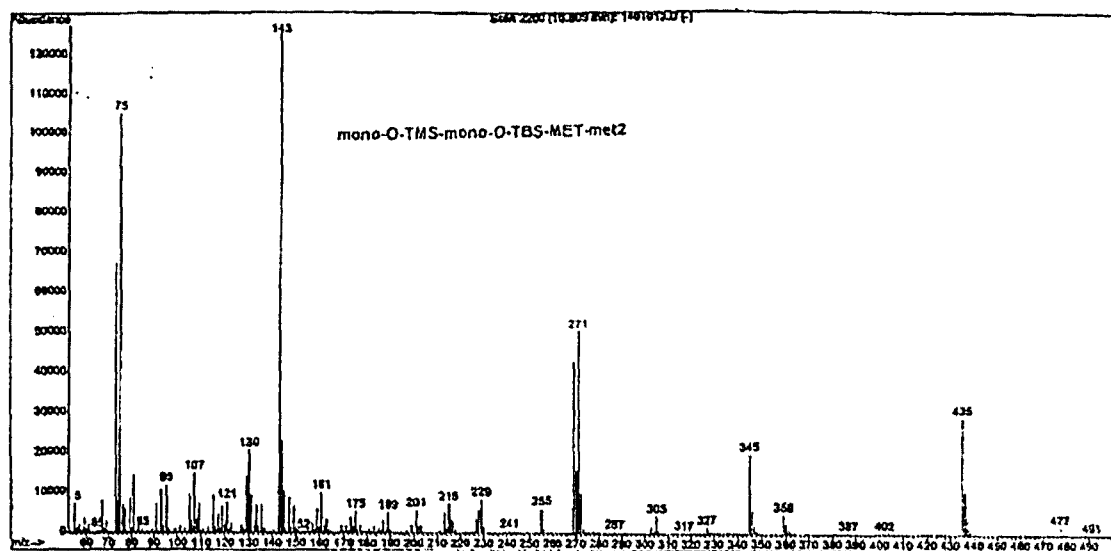


Figura 5.4. Espectres de masses dels derivats mono-O-TMS-mono-O-TBS-metiltestosterona (superior) i mono-O-TMS-mono-O-TBS-MED-m3 (inferior).

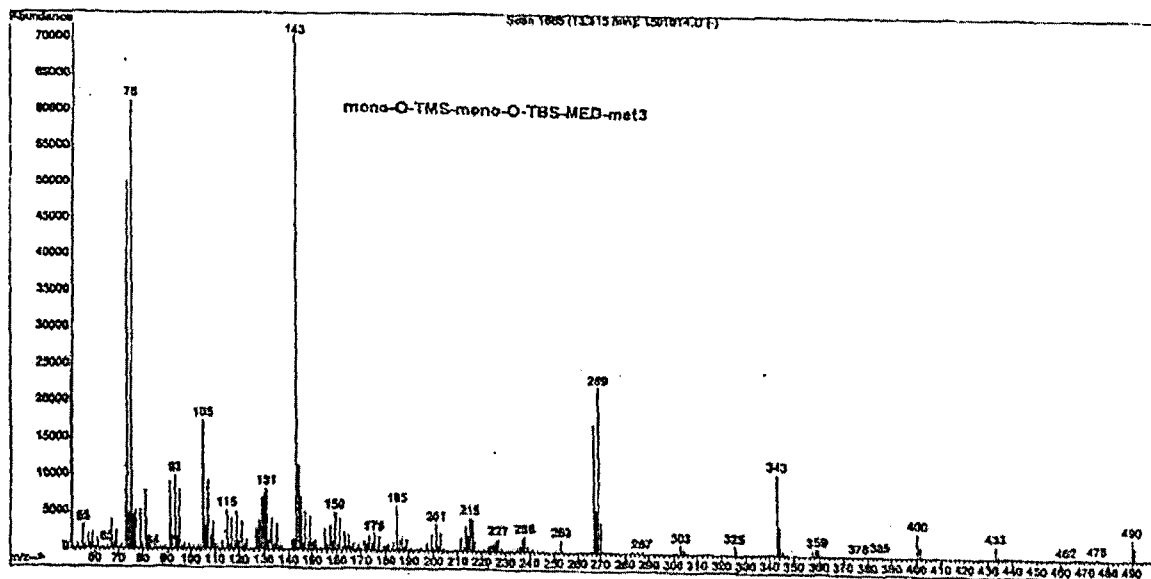
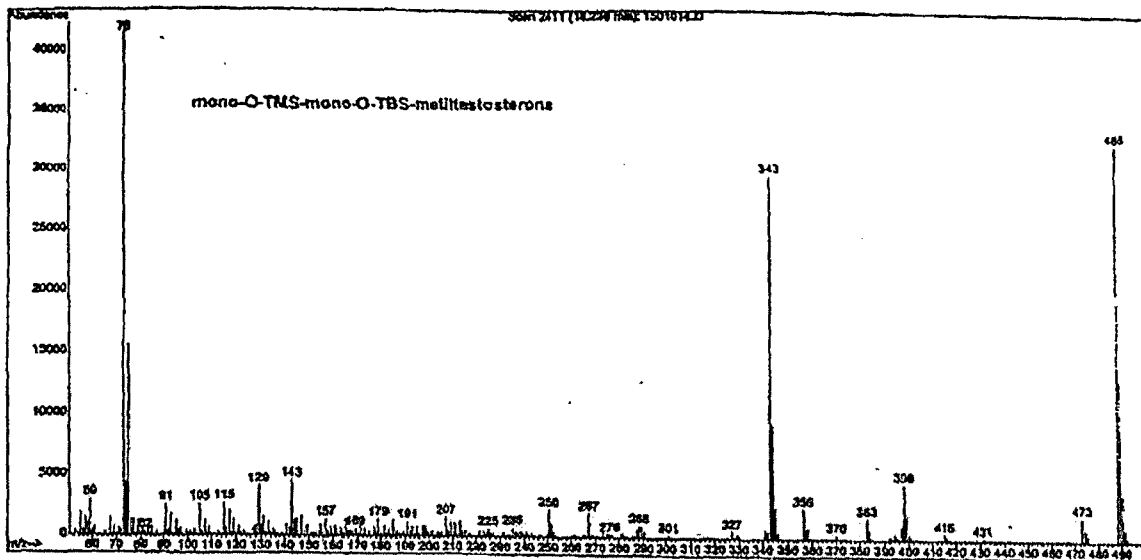


Figura 5.5. Espectres de masses dels derivats bis-TBS-mono-O-TMS-STA-m1 (superior) i bis-O-TBS-NAN-met1 (inferior).

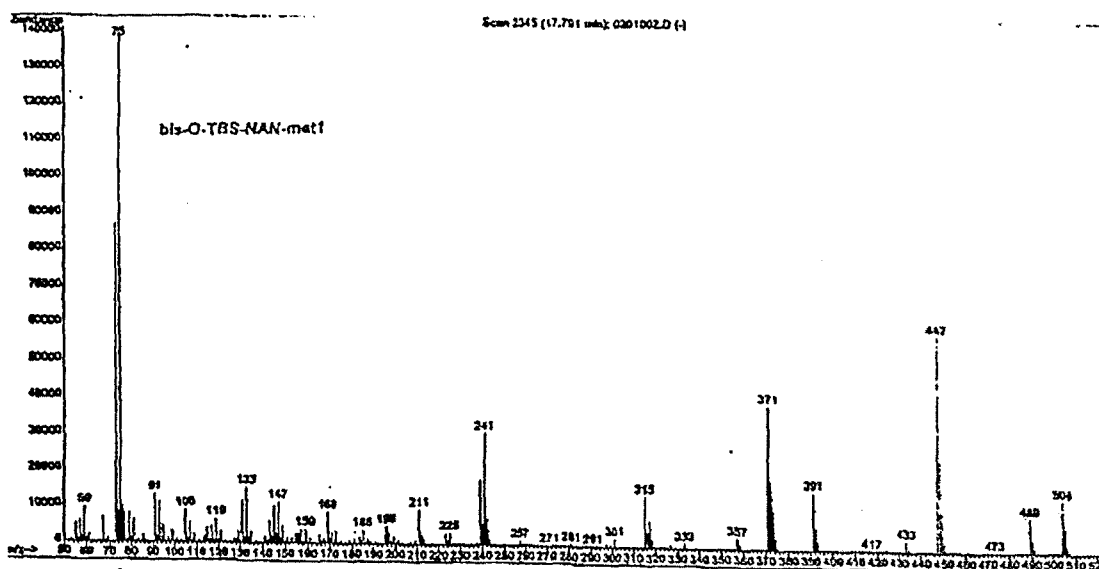
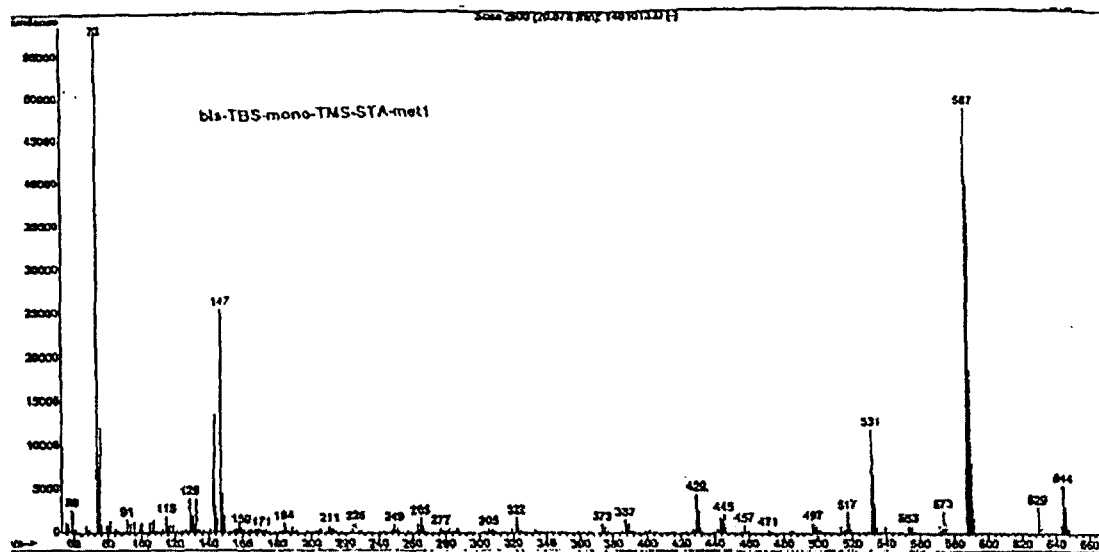
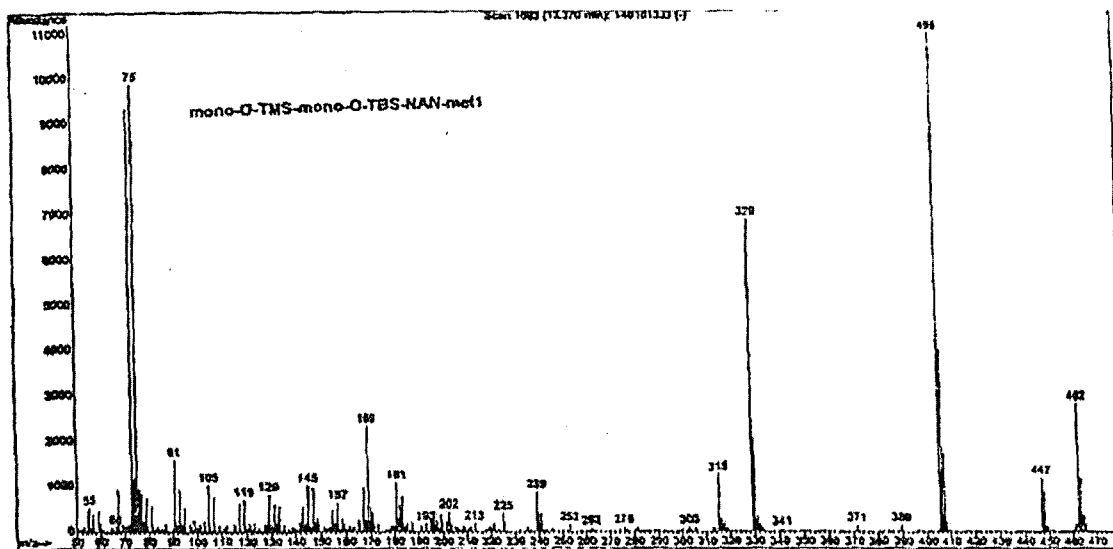
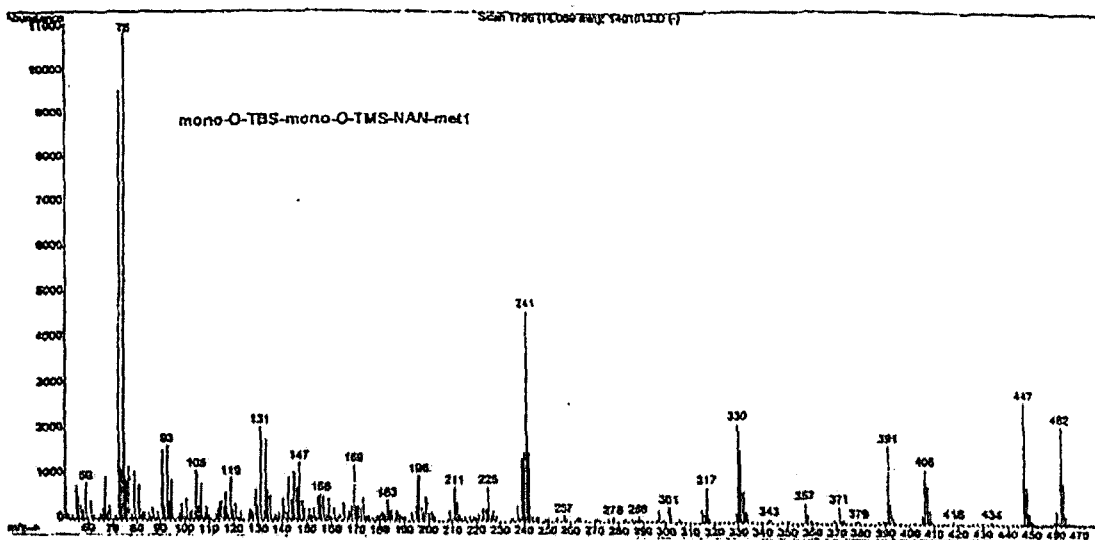


Figura 5.6. Espectres de masses dels dos derivats mono-O-TMS-mono-O-TBS-NAN-m1 formats.



En les condicions dels experiments B i E no es va observar la formació de cap derivat de la metiltestosterona. Per a la resta de compostos, els principals derivats formats van ser: mono-O-TBS-MET-met2, mono-O-TBS-MET-met1, mono-O-TBS-MED-met3 bis-TBS-STA-met1 i bis-O-TBS-NAN-met1. En el cas de la NAN-met1 també es va formar el derivat mono-O-TBS; la seva abundància relativa respecte al derivat bis-O-TBS va disminuir en augmentar el temps de derivatització de 20 a 40 minuts. Per a la resta de substàncies no es van observar diferències entre ambdós experiments. A les figures 5-7 i 5-8 es presenten els cromatogrames obtinguts als experiments B i E respectivament, i a les figures 5-9, 5-10 i 5-11 els espectres d'alguns dels derivats obtinguts.

Els resultats obtinguts als experiments A i D van ser anàlegs als obtinguts als experiments B i E per tots els compostos, a excepció de la NAN-m1 (figures 5-12 i 5-13). Per a aquest metabòlit en les condicions més energètiques (experiment D) no es va observar la formació del mono-O-TBS derivat (figura 5-13).

5.1.4 DISCUSSIÓ

Als esteroides estudiats, la utilització de derivats terc-butil-dimetilsilil (O-TBS) no suposa una millora dràstica en la sensibilitat, respecte als derivats trimetilsilil (O-TMS) habitualment emprats. En el cas de la norandrosterona es pot assolir una total formació del derivat bis-O-TBS. Així el seu ús en els processos de confirmació podria *aportar més informació, ja que faria que els derivats identificats fossin diferents als inicialment identificats en el procés de cribatge.*

La formació de derivats mixtes TMS-TBS mitjançant la utilització consecutiva de dos reactius de derivatització diferents (MTBSTFA i MSTFA) porta a la formació de més d'un derivat, excepte en els casos del 17α -metil- 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol i del 3'-hidroxi-estanozolol. Conseqüentment només per aquest parell de compostos, la formació de derivats mixtes per a l'anàlisi de confirmació pot ser una alternativa vàlida en el procés de derivatització.

Figura 5.7. Cromatogrames obtinguts al analitzar patrons mitjançant GC/MS amb les condicions de l'experiment B. Superior: 500 ng de MET-m2, NAN-m1 i STA-m1. Inferior: 500 ng de MET-m1, MED-m3 i metiltestosterona.

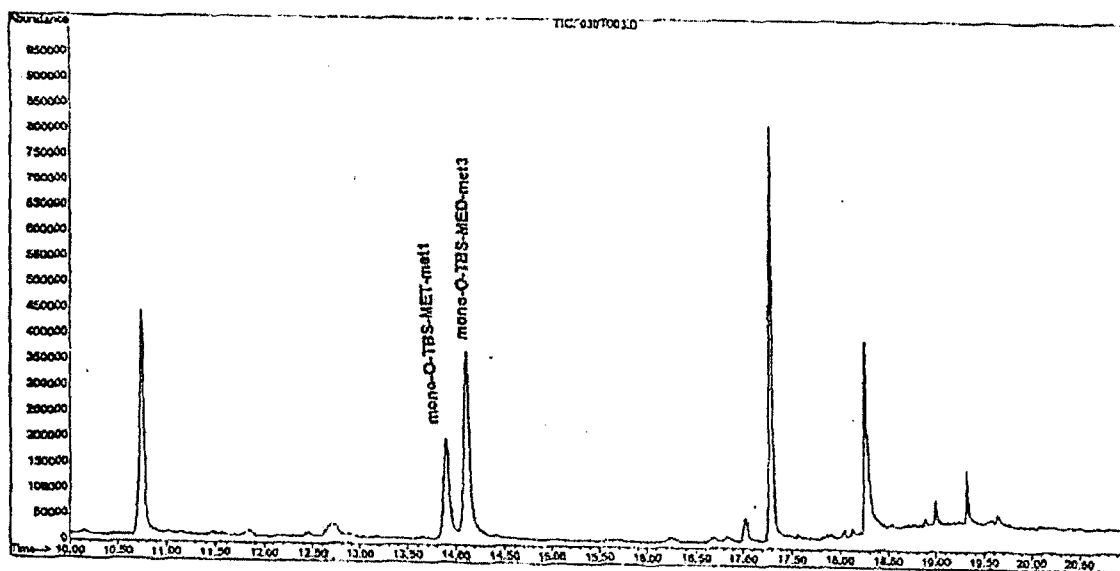
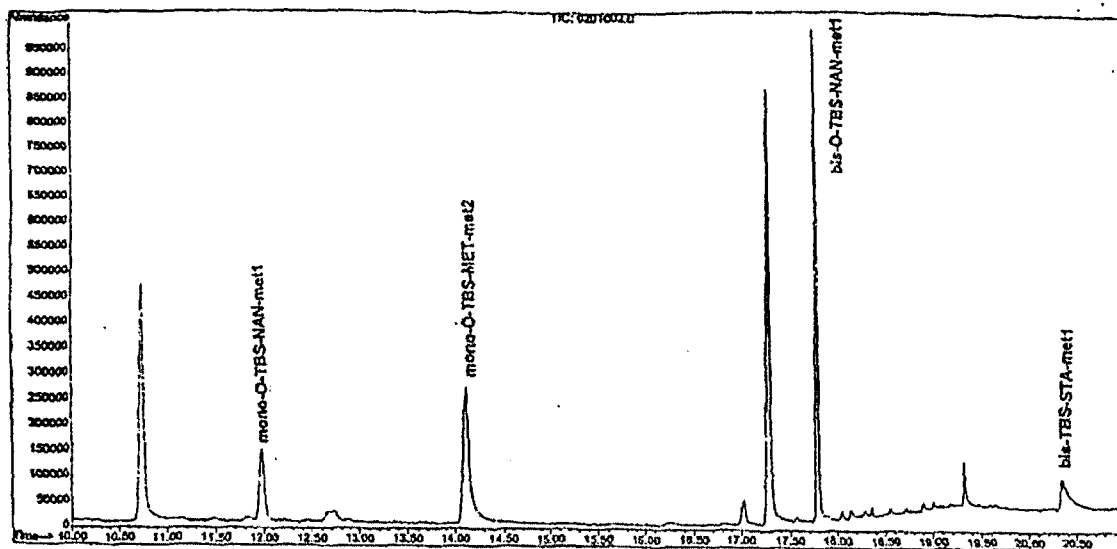


Figura 5.8. Cromatogrames obtinguts al analitzar patrons mitjançant GC/MS amb les condicions de l'experiment E. Superior: 500 ng de MET-m2, NAN-m1 i STA-m1. Inferior: 500 ng de MET-m1, MED-m3 i metiltestosterona.

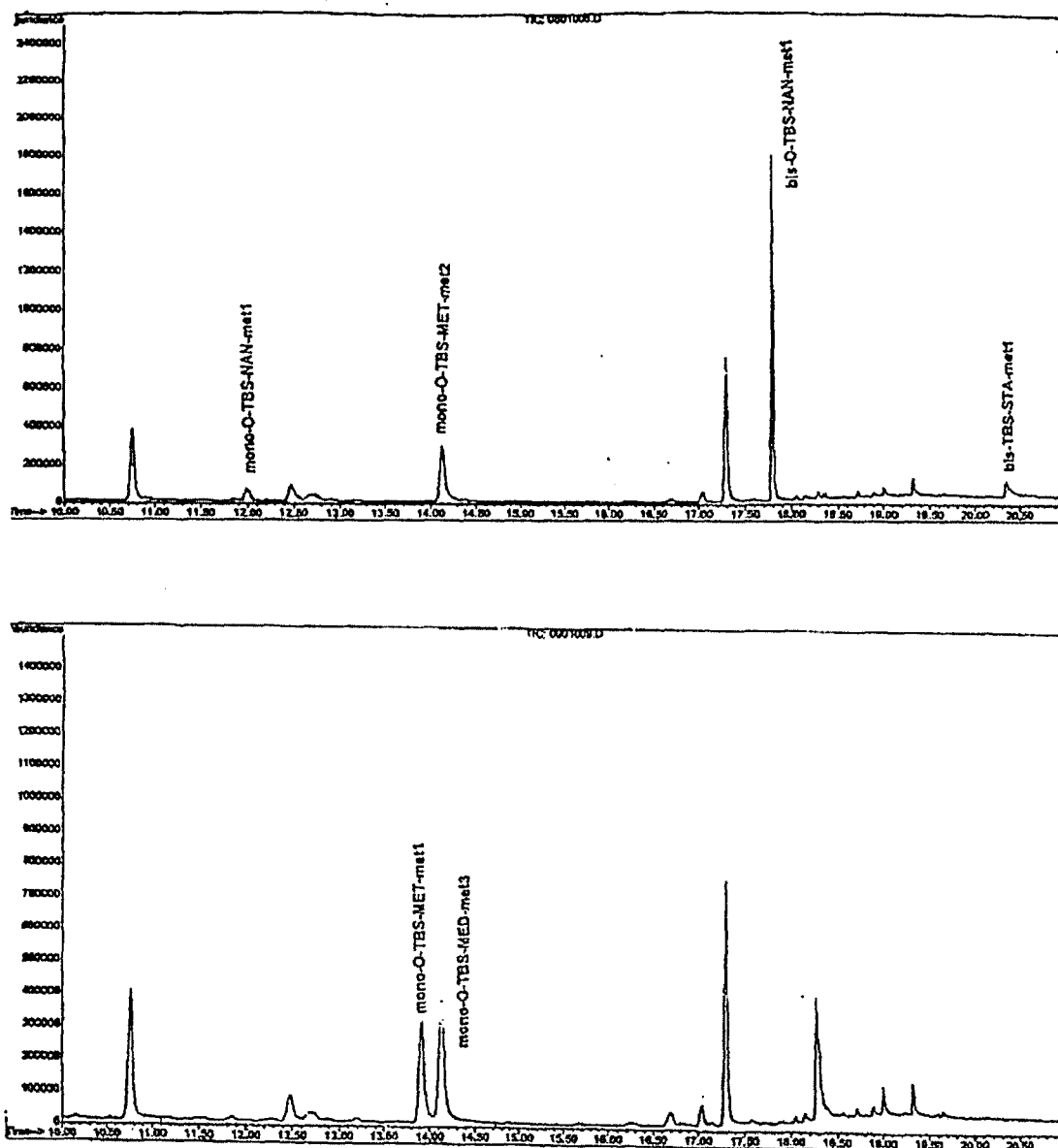


Figura 5.9. Espectres de masses dels derivats mono-O-TBS-MET-m1 (superior) i mono-O-TBS-MET-m2 (inferior).

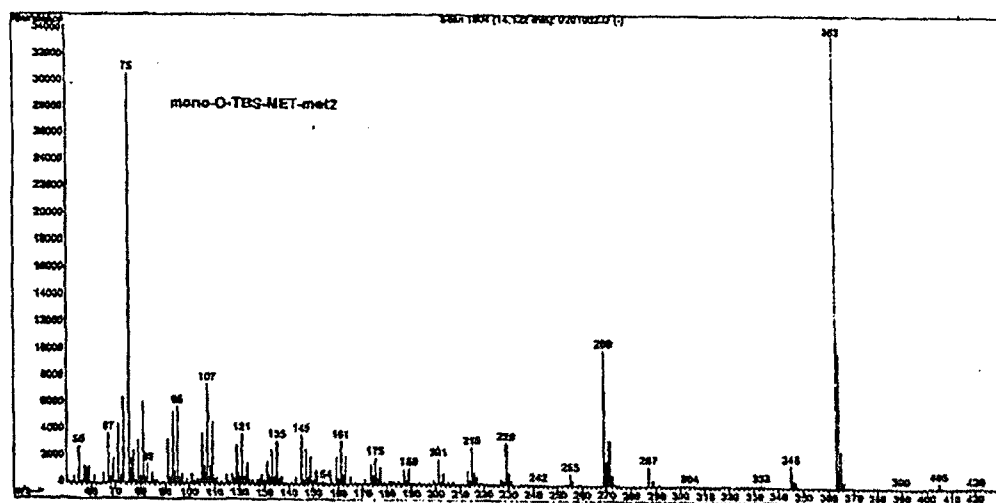
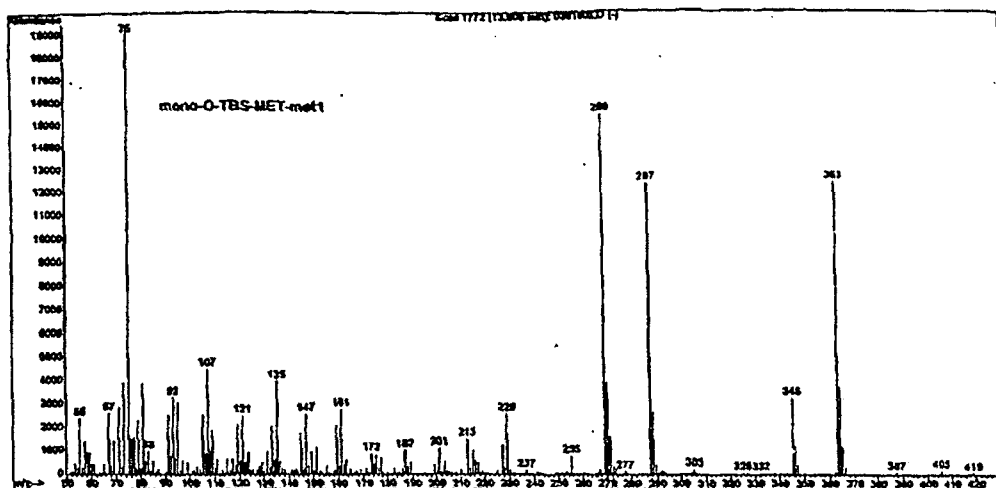


Figura 5.10. Espectres de masses dels derivats mono-O-TBS-MED-m3 (superior) i bis-TBS-STA-m1 (inferior).

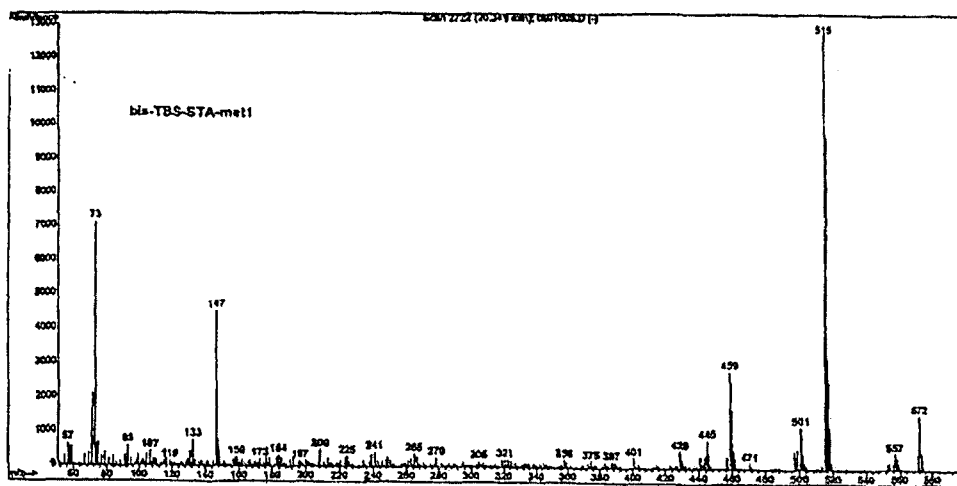
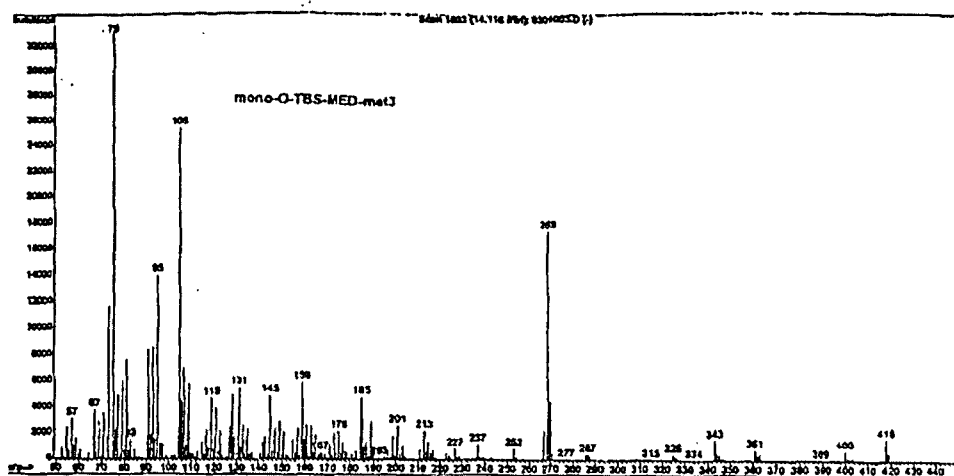


Figura 5.11. Espectre de masses del derivat mono-O-TBS-NAN-m1.

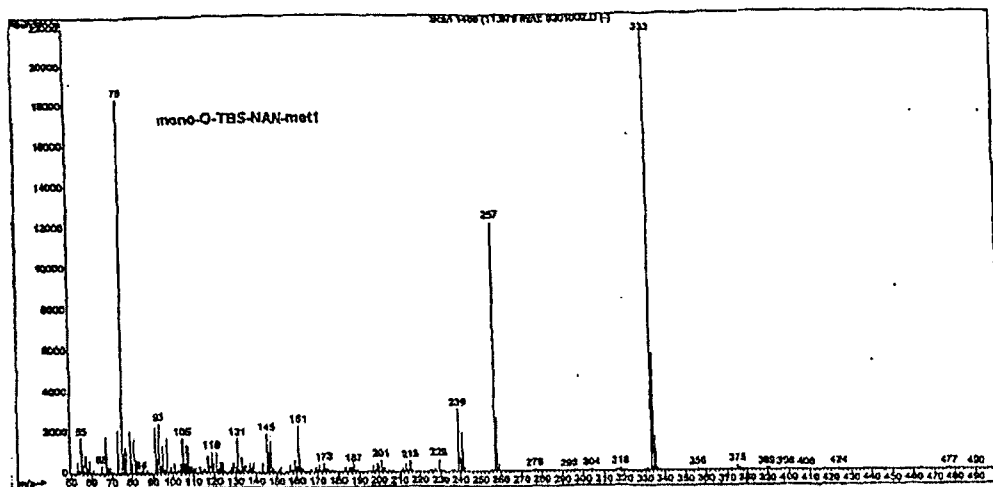


Figura 5.12. Cromatogrames obtinguts a l'anàlisi dels patrons en les condicions de l'experiment A. Superior: 500 ng de MET-m2, NAN-m1 i STA-m1. Inferior: 500 ng de MET-m1, MED-m3 i metiltestosterona.

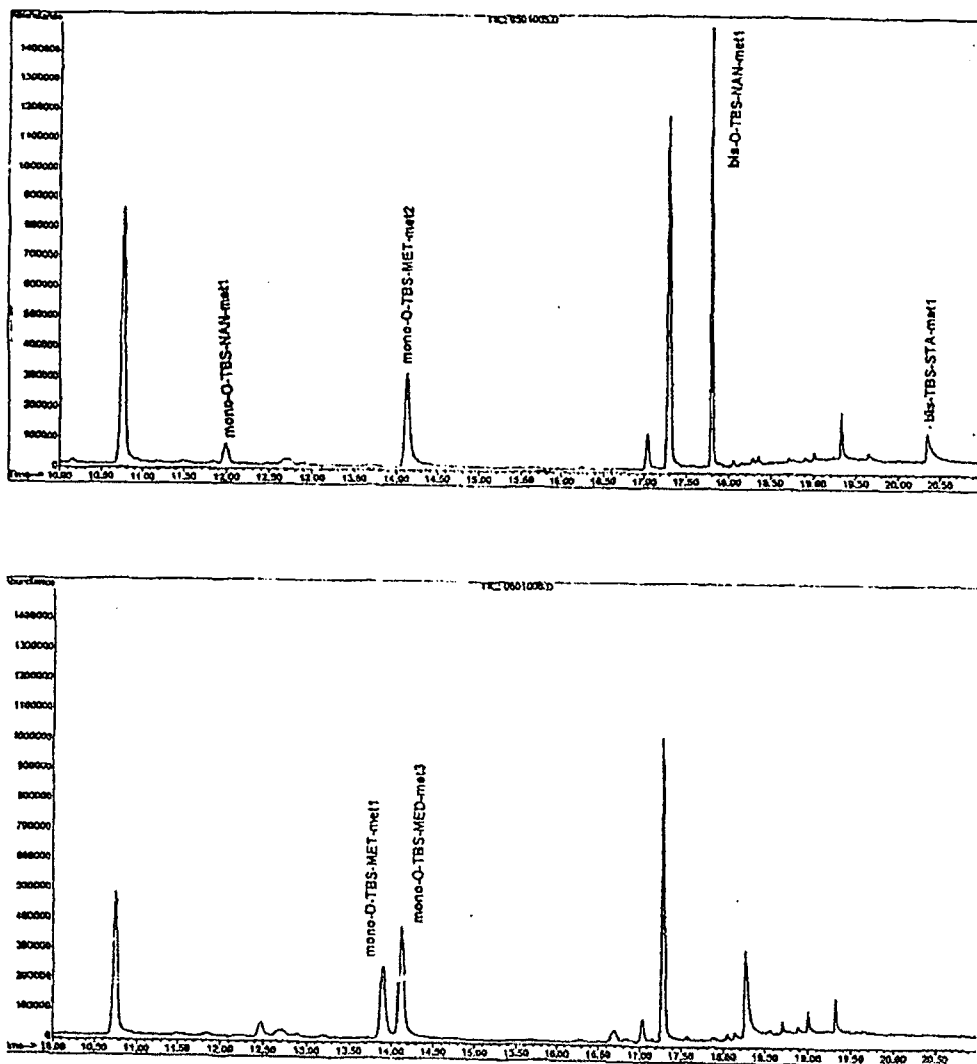
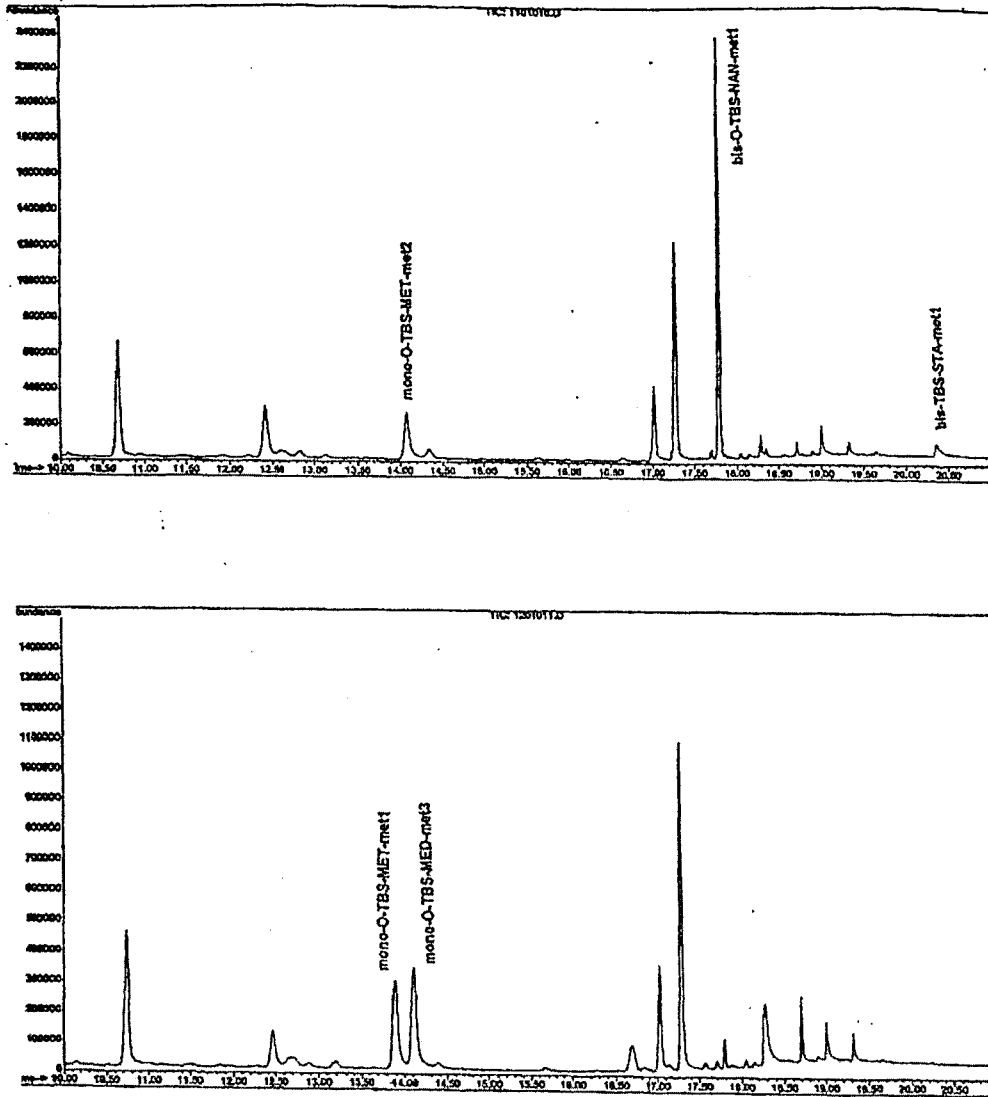


Figura 5.13. Cromatogrames obtinguts a l'anàlisi dels patrons en les condicions de l'experiment D. Superior: 500 ng de MET-m2, NAN-m1 i STA-m1. Inferior: 500 ng de MET-m1, MED-m3 i metiltestosterona.

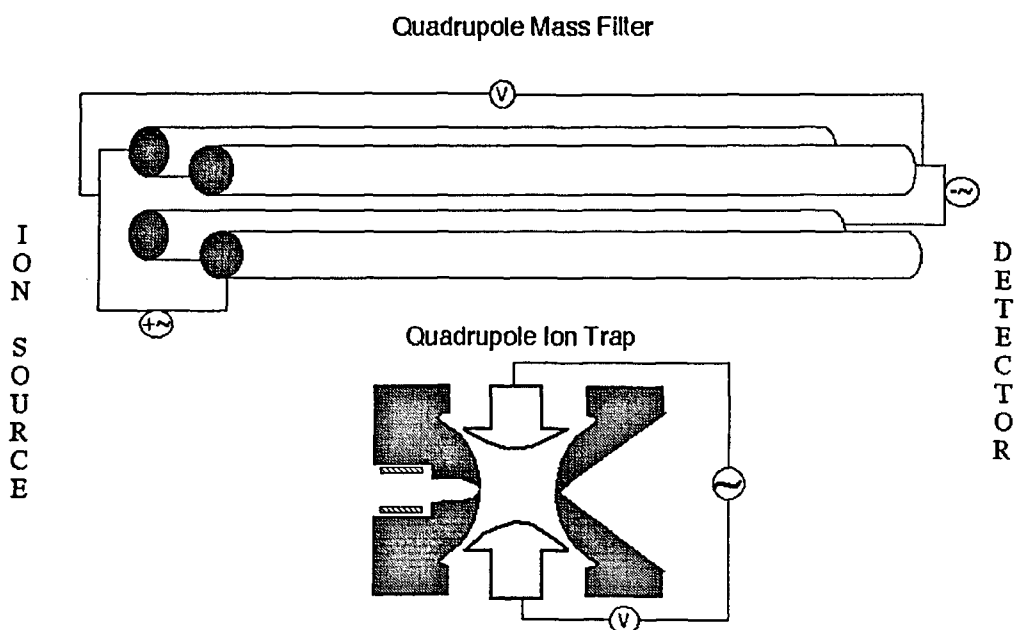


5.2. APLICACIÓ DE L'ESPECTRÒMETRE DE MASSES DE TRAMPA IÒNICA

5.2.1. ANTECEDENTS

A principis dels anys 1950s, Wolfgang Paul i col·laboradors van inventar dos instruments que eren capaços de determinar la relació carrega/massa (m/z) dels ions [Paul W, 1990]. El primer d'ells era el filtre de masses quadrupolar, el qual va ser ràpidament aplicat en la resolució d'un ampli espectre de problemes analítics. El segon instrument era la trampa iònica quadrupolar. Un diagrama dels dos espectròmetres de masses es presenta a la figura 5-1.

Figura 5-1. Diagrama compartiu, aproximadament a la mateixa escala, d'un analitzador quadrupolar i d'un analitzador de trampa iònica.



Com es pot observar a la figura 5-1, les trampes iòniques estan constituïdes bàsicament per tres elèctrodes hiperbòlics, el central en forma d'anell i els altres dos de forma convexa.

Les dificultats en treballar amb els elèctrodes hiperbòlics, afegit a una limitada eficàcia van fer que el interès en aquest tipus d'instruments es restringís principalment a la comunitats de físics. Un usuari destacat va ser Hans Dehmelt qui va rebre el premi Nobel de Física a l'any 1989 per la seva contribució en el desenvolupament de les

tècniques de trampa iònica que li van permetre estudiar amb gran precisió les propietats físiques de ions aïllats.

En aquells temps les trampes iòniques eren utilitzades en el mode d'operació anomenat *mass-selective stability*. En aquest mode, anàleg a l'utilitzat en un analitzador quadrupolar, les amplituds dels voltatges rf i dc aplicats a l'elèctrode en forma d'anell eran incrementades amb una relació rf/dc constant per permetre l'estabilitat, i d'aquesta forma l'emmagatzematge de ions d'un únic valor de m/z en la trampa iònica.

L'interès de la comunitat de químics en les trampes iòniques va ser minoritari, fins que a l'any 1983 George Stafford i altres col·laboradors a la companyia Finnigan MAT van fer dos avenços importants. Primer, van desenvolupar el mode d'operació anomenat *mass-selective instability* [Stafford GC, 1984]. La diferència fonamental aquest mode d'operació respecte als mètodes anteriors es que tots els ions creats durant un període de temps eren atrapats i posteriorment extrets de la trampa cap a un multiplicador d'electrons convencional. Així, tots els ions eren emmagatzemats, a diferència del mode *mass-selective stability* on només els ions d'un valor de m/z eren aïllats cada vegada. Aquest nou mode d'operació va simplificar la utilització de l'instrument. El segon gran descobriment per part del mateix grup d'investigadors va ser que la presència dins la trampa d'una petita quantitat d'un gas (normalment heli a una pressió aproximada de 1mtorr) produïa una millora substancial a la resolució de massa l'instrument per la contracció de les trajectòries dels ions cap al centre de la trampa i la reducció de l'energia cinètica dels ions [Louris JN, 1987]. Aquest fet permet que els ions amb una mateixa m/z formin un paquet que es extret mes ràpidament i de forma mes eficaç del que ho es un núvol difús de ions, millorant d'aquesta forma la resolució. Ambdós descobriments varen propiciar el desenvolupament d'un espectròmetre de masses de trampa iònica comercial.

Potser, la millor virtut dels analitzadors de trampa iònica es la capacitat de realitzar múltiples etapes de ionització i detecció dels ions formats (MS^n). A diferència dels instrument de triple quadrupol, fins a 12 d'aquestes etapes (MS^{12}) han estat descrites amb trampes iòniques.

L'increment en la selectivitat obtinguda en aïllar un ió d'interès (io precursor) i posteriorment fragmentar-lo per produir un espectre de masses d'ions producte,

resulta en una millora neta en la sensibilitat final. Aquesta característica es especialment útil quan l'extracte analitzat té una alta complexitat. Es per això, que ja s'han descrit alguns intents per aplicar aquesta tècnica a l'anàlisi dels agents anabolitzants en orina humana [Muñoz-Guerra J, 1997; Borres LD, 1996].

**FAST SCREENING OF ANABOLIC STEROIDS AND OTHER BANNED
DOPING SUBSTANCES IN HUMAN URINE BY GAS
CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY
CHROMATOGRAPHY**

J. Marcos, J.A. Pascual, X. de la Torre and J. Segura

Journal of Mass Spectrometry 2002; 37: 1059-1073

Marcos J, Pascual JA, de la Torre X, Segura J. [Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry.](#) J Mass Spectrom. 2002; 37(10): 1059-73.

Capítol 6.
DISCUSSIÓ

Perspectiva global

La capacitat de detectar el consum d'agents anabolitzants ha estat i és paral·lela al desenvolupament de noves tècniques analítiques. Des de principis dels anys 1970 s'han desenvolupat procediments cada cop més sofisticats per a la lluita contra el frau esportiu que el seu ús suposa. Avui dia, la recerca de noves estratègies analítiques encara continua amb els mateixos objectius: establir procediments més sensibles, específics i fiables.

L'augment en el número de substàncies utilitzades pels esportistes, així com la millora en els coneixements farmacològics dels seus entrenadors i metges, fa que la detecció de l'ús de compostos prohibits sigui cada dia més complicada.

Donada la gran repercussió que els resultats obtinguts tenen sobre el joc net i l'ètica en el món de l'esport, la qualitat d'aquests resultats ha de ser prioritària. Conseqüentment, les autoritats esportives internacionals han establert programes de control de qualitat i exigeixen el compliment de certs criteris analítics a l'hora de reportar casos positius.

Tot plegat, a més dels continus avenços en instrumentació analítica, fa que aquest sigui encara un camp ple de reptes per als químics analítics.

En aquesta tesi es presenten alternatives analítiques per a la detecció del consum d'agents anabolitzants en l'àmbit del control antidopatge. L'aproximació emprada ha implicat el desenvolupament de nous mètodes analítics basats en estratègies fins ara no abordades.

Algunes de les estratègies triades han permès evidenciar les dificultats en la seva utilització. És el cas de la utilització mètodes de cribatge mitjançant cromatografia d'immunoafinitat per alguns dels compostos d'interès, o la utilització de derivats *terc*-butil-dimetil-silil (TBS) en el procés de derivatització. Malgrat que aquestes estratègies són inviables per als processos de cribatge, els resultats obtinguts han permès plantejar modificacions en els processos de confirmació d'alguns dels agents anabolitzants estudiats. Així han estat desenvolupats mètodes per a la purificació per IAC dels metabòlits de la metiltestosterona, del 3'-hidroxiestanozolol i del 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol.

Com s'ha exposat en el capítol 3, l'aplicació de la cromatografia líquida capil·lar pot suposar una millora en la sensibilitat instrumental, especialment si es combina amb la injecció de volums similars als de cromatografia líquida convencional. Malgrat tot, aquesta millora està lligada a l'ús de detectors sensibles a la concentració, com ara els detectors UV. L'ús de detectors UV fa que l'aplicabilitat d'aquesta tècnica es limiti a procediments de cribatge, ja que per a confirmació és necessària la utilització de l'espectrometria de masses.

L'acoblament de la cromatografia líquida capil·lar amb l'espectrometria de masses per l'anàlisi d'aquests compostos no ha estat completament explorada. Alguns mètodes amb alta sensibilitat han estat descrits per a l'anàlisi de neurosteroides [Liu S, 2003].

Metodes de cribatge.

Com s'ha comentat al llarg d'aquesta memòria, a l'any 1998 i amb l'objectiu d'harmonitzar els criteris a l'hora de reportar casos positius, es va establir un límit de detecció de 2 ng/mL per als cinc agents anabolitzants amb major incidència en el món de l'esport.

La possibilitat de detectar rutinàriament aquestes concentracions havia estat demostrada durant els Jocs Olímpics del 1996 mitjançant l'ús de la GC/HRMS. Tanmateix, els elevats preus i costos de manteniment, així com la especificitat de l'experiència necessària per al seu ús, són alguns dels desavantatges que presenten els espectròmetres de masses d'alta resolució per aquest propòsit.

Es per aquest motiu que ens vàrem plantejar (capítol 5) investigar la possibilitat de abordar aquest problema analític mitjançant un espectròmetre de masses de trampa iònica operat en mode MS/MS i simultàniament estendre la metodologia, no només per aquests cinc compostos, sino per a la totalitat dels agents anabolitzants i altres compostos detectables concurrentment.

La metodologia finalment desenvolupada, a més d'assolir els límit de detecció per aquest cinc compostos, va permetre la detecció rutinària de més de 50 compostos i en poc més de set minuts.

Mètodes de confirmació.

Respecte als mètodes de confirmació, l'estratègia més adient consisteix en la obtenció d'un extracte més net. Els mètodes basats en la cromatografia d'immunoafinitat presentats en el capítol 4, han permès una clara millora en els límits de detecció. Tanmateix aquesta tècnica es veu limitada per la disponibilitat d'anticossos adequats i per les reactivitat encreuada d'alguns esteroides endògens, presents a la orina en concentracions molt superiors a les dels analits objecte de l'estudi.

Aquestes dues limitacions no es donen quan la millora en el procés de preparació de la mostra es realitza mitjançant el fraccionament per cromatografia líquida. La universalitat d'aquest tipus d'estratègia i la seva idoneïtat per a la obtenció d'extractes prou nets s'ha demostrat en el treball publicat i inclòs en el capítol 4 [J. Marcos, 2004]. La netedat assolida ha permès àdhuc l'anàlisi en mode *full scan* sense sostreure el soroll de fons..

Perspectiva futura.

Respecte a la detecció del consum de testosterona, l'alternativa més esperançadora consisteix en la detecció de relacions isotòpiques (d'isòtops estables) per espectrometria de masses. L'espectrometria de masses de relació isotòpica (IRMS) permet diferenciar entre la relació isotòpica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ de la testosterona natural i la d'aquella que és sintètica [Becchi M, 1994; Shackleton CHL, 1996].

Els esforços realitzats en els darrers anys de cara a fer d'aquesta tècnica una eina rutinària en els laboratoris antidopatge estant donant els seus fruits [Aguilera R, 2001]. Així als Jocs Olímpics de Sidney 2000 la tècnica, consistent en la separació dels compostos per cromatografia de gasos capil·lar seguida de combustió i l'anàlisi per espectrometria de masses de relació isotòpica del CO_2 format (GC/C/IRMS) va ser emprada per a l'anàlisi rutinari de les mostres, i es preveu que es faci el mateix amb les mostres recollides en els Jocs Olímpics d'Atenas 2004.

Un cop els mètodes per a la detecció del consum d'esteroides endògens mitjançant GC/C/IRMS siguin acceptats com a mètodes de referència, la utilització de mètodes indirectes per a la detecció del consum d'esteroides endògens, com per exemple la monitorització del perfils esteroïdals, pot passar a un segon pla.

En aquest escenari, els laboratoris podrien optar per realitzar els controls mitjançant dos mètodes de cribatge. Un mètode com el descrit en el capítol 5, permetria la detecció del consum d'agents anabolitzants exògens de forma molt ràpida i sensible per GC/MS/MS. Un segon mètode de cribatge per GC/C/IRMS permetria la detecció directa del consum d'esteroides anabolitzants endògens com per exemple la testosterona.

Malgrat tot, paràmetres com el quocient T/E encara continuaran sent de gran utilitat, i seria important continuar monitoritzant els perfils esteroïdals. Donat que els extractes analitzats per el mètode de GC/MS/MS son adequats per a l'establiment dels perfils esteroïdals, les mostres podrien ser re-analitzades amb un programa de temperatures més lent que permetés separar i quantificar adequadament tots els esteroides d'origen endogen.

D'altra banda, la cromatografia líquida, convencional o encara millor, capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem pot ser una de les eines bàsiques de futur en el camp del control antidopatge. La possibilitat d'analitzar directament els esteroides conjugats, fa que tant la hidròlisi com la derivatització siguin etapes innecessàries, simplificant enormement la preparació de les mostres [Kuورانne T, 2003, Bowers LD, 1996]. Tanmateix, avui dia encara no es troben desenvolupats mètodes per el cribatge exhaustiu de tots els metabòlics a monitoritzar degut a la manca de materials de referència adequats dels conjugats corresponents i a la dificultat en la ionització de molts dels esteroides lliures que no contenen el grup enona.

El desenvolupament de mètodes de confirmació també presenta alguns inconvenients associats a la necessitat de complir amb els requisits per a la identificació dels compostos. En especial la monitorització simultània de tres ions característiques i la estabilitat en la relació de les seves abundàncies relatives no ha estat encara assolides.

Capítol 7.
CONCLUSIONS

Quantificació de testosterona i epitestosterona per cromatografia líquida capil·lar.

1. S'ha implementat un sistema de cromatografia líquida capil·lar que permet treballar amb fluxes de l'ordre de 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ utilitzant una bomba convencional amb divisió de flux regulat a través de las dimensions d'un capil·lar restrictor.
2. S'ha instal·lat un sistema d'injecció de grans volumns (10-200 μl) compatibles amb la cromatografia líquida capil·lar que utilitza una micro-precolumna per a la retenció i el·lució dels analits connectada a una bomba auxiliar a través d'una vàlvula de selecció. La preparació de micro-precolumnes, realitzada en el propi laboratori, ha estat també objecte de desenvolupament en el present treball.
3. La utilització de la cromatografia líquida capil·lar ha permès assolir un increment net en la sensibilitat, comparat amb condicions anàlogues de cromatografia líquida convencional. Aquesta millora ha permès disminuir el volum de mostra necessari a una cinquena part (1 ml d'orina) i reconstituir els extractes finals en un volum 4 vegades superior (200 μl), el que suposa una millora substancial respecte als mètodes descrits a la literatura.
4. S'ha validat un nou procediment analític per a la determinació de testosterona i epitestosterona a la fracció conjugada de l'orina humana amb límits de detecció d'1.5 i 3.2 ng/ml respectivament. El nou mètode ha permès la determinació de testosterona a la fracció lliure amb un límit de detecció de 0.5 ng/ml d'acord amb els requeriments del Comité Olímpic Internacional (COI) per al control de la integritat de la mostra.

Mètodes alternatius en la preparació de les mostres

5. S'han identificat els components endògens que interaccionen amb quatre diferents anticossos, comercialment disponibles en forma de gels d'immunoafinitat. Igualment, s'han calculat les capacitats de retenció màxima i s'han comprovat les seves estabilitats al llarg del temps.
6. S'ha desenvolupat un mètode per a la confirmació de 3'-hidroxiestanozolol i dels dos metabòlics principals de la metiltestosterona (17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol i 17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol) a l'orina humana mitjançant l'ús successiu de dos

columnes d'immunoafinitat diferents. El nou mètode ha estat aplicat amb èxit en la confirmació de 34 mostres amb concentracions properes a 2 ng/ml.

7. S'ha desenvolupat un mètode d'IAC per a la confirmació de 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol a l'orina humana. El nou mètode ha estat aplicat amb èxit en la confirmació de 9 mostres amb concentracions properes a 2 ng/ml.
8. S'ha desenvolupat un procediment d'HPLC per a l'aïllament dels diferents agents anabolitzants, particularment per als cinc compostos amb especials requeriments de sensibilitat. La dràstica millora en la netedat de l'extracte ha permès que en les subseqüents anàlisis per GC/MS es puguin adquirir espectres de masses complets.
9. El nou procediment d'HPLC s'ha validat per a la determinació de clenbuterol, 3'-hidroxiestanozolol, 17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol, 17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol, norandrosterona, noreticolanona i 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol en orina humana. La seva utilització ha permès la determinació inequívoca de concentracions baixes (2 ng/ml) de tots aquests compostos, d'acord amb els requeriments de les autoritats esportives internacionals (IOC-WADA).
10. En les condicions d'HPLC establertes, s'han obtingut els temps de retenció d'altres esteroides anabolitzants, de forma que el mateix mètode pugui ser aplicat en l'aïllament d'altres compostos d'interès en el camp de l'anàlisi antidopatge.

Aplicació de noves estratègies instrumentals

11. S'han obtingut els espectres de masses dels derivats *terc*-butil-dimetilsilil corresponents al: 3'-hidroxiestanozolol, norandrosterona, 17 α -metil-5 β -androstan-3 α ,17 β -diol i 17 β -metil-5 β -androst-1-ene-3 α ,17 α -diol. Igualment s'han obtingut els espectres de masses dels derivats mixtos *terc*-butil-dimetilsilil i trimetilsilil.
12. La utilització d'espectròmetres de masses de trampa iònica en mode de MS/MS ha permès assolir un increment net en la sensibilitat, comparat amb espectròmetres de masses quadrupolars. A més, l'elevada selectivitat d'aquesta tècnica ha permès reduir notablement el temps d'anàlisi.

13. S'han optimitzat les condicions de fragmentació en un analitzador de trampa iònica per més de 50 compostos d'interès pel camp del control antidopatge.
14. S'ha desenvolupat un mètode de cribatge per a la detecció de 55 substàncies exògenes prohibides, entre elles els agents anabolitzants més abusats, en 7.4 minuts, el que suposa una millora substancial respecte als mètodes prèviament descrits a la literatura. Els límits de detecció assolits per cadascun dels compostos compleixen amb els requisits establerts en el control antidopatge.
15. S'han obtingut valors adequats de reproductibilitat en els temps de retenció i en la resposta durant la validació qualitativa del mètode. L'elevada especificitat del mètode també ha estat demostrada no observant-se cap interferència en l'anàlisi d'orines negatives.

Capítol 8.
BIBLIOGRAFIA

Aguilera R, Chapman TE, Starcevic B, Hatton CK, Catlin DH. Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios. *Clin Chem* 2001; 47(2): 292-300.

Allen M, Rahkila P, Marniemi J. Serum lipids in power athletes self-administering testosterone and anabolic steroids. *Int J Sports Med* 1985; 6: 139-144.

Ayotte C, in: M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, S. Rauth (Eds.), *Proceedings of the 10th Cologne Workshop on Dope Analysis*, Verlag Sport and Buch Strauss, Edition Sport, Cologne, 1993, pp 185-196.

Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Anabolic-Androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86(11): 5108-5117.

Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament MM, Casabianca H, James P. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. *Rapid Comm Mass Spectrom* 1994; 8: 304-308.

Bi H, Masse R. Studies on anabolic steroids. 12. Epimerization and degradation of anabolic 17 β -sulphate-17 α -methyl steroids in human: qualitative and quantitative GC/MS analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42:533-46.

Birch JA. Hydroaromatic steroid hormones. I. 10-Nortestosterone. *J. Chem Soc* 1950; 367-8.

Bowers LD, Sanullah. Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1996; 687: 61-68.

Brooks RV, Firth R, Summer NA. Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. *Br J Sports Med* 1975;9:89-92.

Brooks RV, Jeremiah G, Webb WA, Wheeler M. Detection of anabolic steroid administration to athletes. *J. Steroid Biochem*, 1979; 11:913-7.

- Buyse J, Decuypere E, Huyghebaert GL., Herremans M, Poultry Sci. 70 (1990) 993-1002.
- Catlin DH, Hatton CK, Starcevic SH. Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine. Clin Chem 1997; 43(7): 1280-1288.
- Catlin DH, Hatton CK. Use and abuse of anabolic and other drugs for athletic enhancement, Adv. Int. Med., 36, 381, 1990.
- Celotti F, Negri Cesi P. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscle, of their possible mechanism of action and of their use in athletes. J Steroid Biochem Mol Biol 1992; 43: 469-477.
- Chung BC, Choo HY, Kim TW, Eom KD, Kwon OS, Suh J. Analysis of anabolic steroids using GC/MS with selected ion monitoring. J Anal. Toxicol. 1990; 14: 91-5.
- Clinton RO, Manson AJ, Stonner FW, Beyler AL, Potts GO, Arnold A. Steroidal-[3,2-c]-pyrazoles. J. Am Chem Soc 1959;81:1513.
- Commission of the European Communities, Off. J. Eur. Commun., L223 (1987) 18.
- Commission of the European Communities, Off. J. Eur. Commun., L351 (1989) 59.
- Creagh TM, Rubin A, Evans DJ. Hepatic tumors induced by anabolic steroids in an athlete. J Clin Pathol 1988; 41: 441-443.
- Crooks SRH., Elliott CT, Thompson CS, McCaughey W.J. Comparison and evaluation of the specificity and binding capacity of commercial and in house affinity columns used in sample preparation for analysis of growth-promoting drugs. J. Chromatogr. B 1997;690: 161-172.
- D.H.Catlin, D.A. Cowan, R. De la Torre, M.Donike, D.Fraisse, H.Oftebro, C.K.Hatton, B.Starcevic, M.Becchi, X. De la Torre, H.Norli, H.Geyer , C.J. Walker. Urinary testosterone (T) to epitestosterone (E) ratios by GC/MS. I. Initial comparison of uncorrected T/E in six international laboratories. J. Mass Spectrometry 1996; 31: 397-402.
- Damasceno L, Ventura R, Ortuno J, Segura J. Derivatization procedures for the detection of β_2 -agonist by gas chromatography/mass spectrometric analysis. J. Mass Spectrom. 2000; 35: 1285-1294.

David K, Dingemans E, Freud J, Lacquer E. Über kristallines männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder Cholesterin bereitetes Androsteron. Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem. 1935;233:281-2.

De la Torre R. Fármacos beta-adrenérgicos, estructura química y actividad farmacológica. A: Barturen F i Meana JJ, eds. Drogas y deporte: Farmacología del doping. Bilbao: Universidad de Deusto, 1995: 65-74.

De la Torre X. Detecció del consum de testosterona. Tesi Doctoral. 1997.

Deboer D, Dejong EG, Maes RAA, Van Rossum J. The methyl-5 α -dihydrotestosterones mesterolone and drostanolone; gas chromatographic/mass spectrometric characterization of the urinary metabolites. Steroid Biochem Mol Biol 1992; 42: 411-9.

Dehennin L, Matsumoto AM. Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alterations of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sport. J Steroid Biochem Mol Biol 1993;44:179-89.

Dickman S. East Germany: Science in the disservice of the state, Science, 254, 26, 1991.

Donike M, Barwald KR, Klostermann K, Schanzer W, Zimmermann J. Detection of exogenous testosterone. In Heck H, Hollmann W, Liesen H, eds. Sport: Leistung und Gesundheit, Kongressbd. Dtsch Sportärztekongress. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1983:293-8.

Donike M, Jaenicke L, Stratmann D, Hollmann W. Gas-chromatographischer Nachweis von stickstoffhaltigen Pharmaka in wässrigen. Lösungen mit dem Stickstoffdetektor. J Chromatogr 1970; 52: 237-250.

Donike M, Zimmermann J, J. Chromatogr., 202 (1980).

Engel LL, Alexander J, Wheeler M. J Biol Chem, 231 (1958) 159.

Fiems LO., Cottyn BG., Boucque CV, in: L.O. Fiems, B.G. Cottyn, D.I. Demeyer (Eds.), Animal Biotechnology and the Quality of Meat Production, Elsevier, Oxford, 1991, pp 31-48.

Forbes GB, Porta CR, Herr BE, Griggs RC. Sequence of changes in body composition induced by testosterone and reversal of changes after drug is stopped. *JAMA* 1992; 267: 397-399.

Galletti F, Gardi R. Metabolism of 1-dehydroandrostanes in man. I. Metabolism of 17β -hydroxyandrosta-1,4-dien-3-one, 17β -cyclopent-1'-enylxyandrosta-1,4-dien-3-one (quinbolone) and androsta-1,4-diene-3,17-dione. *Steroids* 1971; 18:39-50.

Gaskell SJ, Brownsey BG, *Clin Chem.* (Winston-Salem, NC), 29 (1983) 677.

Hage SH. Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. B* 1998;715:3-28.

Hickson RC, Ball KL, Falfuto MT. Adverse effects of anabolic steroids. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1989; 4(4): 254-271.

Hollard D, Sotto JJ, Bachelot C, Michallet M, Ribaud P, Schaerer R, Wagnet JC. Trial of androgens therapy in the treatment of non-lymphoblastic acute leukemia. First results. *Nouvelle Presse Med* 1976; 5: 1289-1293.

Huie MJ. An acute myocardial infarction occurring in an anabolic steroid user. *Med Sci Sports Exerc* 1994; 26(4): 498-413.

Ishak KG. Hepatic lesions caused by anabolic and contraceptive steroids. *Semin Liver Dis* 1981; 2: 116-128.

Kellie AE. Structure and nomenclature. A: Makin HLJ, ed. *Biochemistry of Steroid Hormones*. Oxford: Blackwell Scintific Publications, 1972.

Korenman SG, Wilson H, Lipsett MB. Isolation of 17-alpha-hydroxyandrost-4-en-3-one (epitestosterone) from human urine. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 1004-6.

Kouri EM, Lucas SE, Pope HG, Oliva PS. Effects of supraphysiologic doses of testosterone on human aggressive and non-aggressive responding. A: Harris LS, ed. *Problems of drug dependence, NIDA Reseach monograph n° 162*. Washington: Government Printing Office 1995.

Kuuranne T, Kotiaho T, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Leinonen A, Westwood S, Kostianen R. Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatography/mass spectrometry screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. *J Mass Spec* 2003; 38: 16-26.

Lamb DR. Anabolic steroid in athletics: How well do they work and how dangerous are they? *Am J Sports Med* 1984; 12: 31-38.

Lazar A, R.E. King, *FDA By-lines*, 7 (2) (1976) 85.

Liu S, Sjoval J, Griffiths WJ. Neurosteroids in rat brain: extraction, isolation, and analysis by nanoscale liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 2003; 75(21): 5835-5846.

Louris JN, Cooks RG, Syka JEP., Kelley PE, Stafford GC, Todd JFJ. (1987) *Analytical Chemistry* 59, 1677-1685.

Macdonald BS, Sykes PJ, Adhikary PM, Harkness RA. The identification of 17 α -hydroxy-17-methyl-1,4-androstadien-3-one as a metabolite of the anabolic steroid drug 17 β -hydroxy-17-methyl-1,4-androstadien-3-one in man. *Steroids* 1971; 18: 753-66.

Machnik M, Geyer H, Horning S, Breidbach A, Delahaut P, Schanzer W. Long-term detection of clenbuterol in human scalp hair by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1999; 723: 147-155.

Malone DA Jr, Dimeff RG, Lombardo JA, Sample RH. Psychiatric effects and psychoactive substance use in anabolic-androgenic steroid users. *Clin J Sport Med* 1995; 5(1) 25-31.

Martineau L, Horan MA, Rothwell NJ, Little RA. *Clin. Sci.* 1992; 83:615.

Masse R, Ayotte C, Bi H, Dugal R. Studies on anabolic steroids. III. Detection and characterization of stanozolol urinary metabolites in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1989; 497: 17-37.

Masse R, Ayotte C, Dugal R. Studies on anabolic steroids. I. Integrated methodological approach to the gas chromatographic/ mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine. *J. Chromatogr.*, 489, 23, 1989.

- Masse R, Ayotte C. *J Chromatogr Biomed Appl* 1989; 497: 17.
- Mc Nutt RA, Ferenchick GS, Kirilin PC. Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weightlifter using anabolic steroids. *Am J. Cardiol* 1988; 62: 164.
- Moore WV. Anabolic steroid use in adolescence. *JAMA* 1988; 260: 3484-3486.
- Morgan DJ, *Clin. Pharmacokinet.* 1990; 18: 270.
- Muñoz-Guerra J, Carreras D, Soriano C, Rodríguez C, Rodríguez AF. Use of the ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry for detection and confirmation of anabolic substances at trace levels in doping analysis. *J Chromatogr B* 1997; 704 (1-2) 129-141.
- Paul W. (1990), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 739.
- Polettini A. *J. Chromatogr. B* 1996; 687:27.
- Prohibited classes of substances and prohibited methods 2003, substitutes Appendix A in Olympic Movement Anti-Doping Code. IOC, Lausanne, Switzerland, 1999.
- Rongone EL, Segaloff A. In vivo metabolism of Δ^1 -17 α -methyltestosterone in man. *Steroids* 1963; 1:170-84.
- Rongone EL, Segaloff A. Isolation of urinary metabolites of 17 α -methyltestosterone. *J Biol Chem* 1962; 237: 1066-7.
- Ruzicka L, Goldberg MW, Rosenberg HR. Sexualhormone X. Herstellung des 17-Methyltestosteron und anderer Androstenund Androstanderivative. Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und männlicher Hormonwirkung. *Helv Chim Acta* 1935; 18: 1487-98.
- Saugy M, Cardis C, Robinson N, Schweizer C. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14: 111.
- Schaffler K, Schuster D, *Arzneimittelforschung* 35 (1985) 1299-1302.

Schänzer W, Delahaut P, Geyer H, Machnik M, Horning J. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 1996; 687: 93.

Schanzer W, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Analitica Chimica Acta*. 1993; 275: 23.

Schanzer W, Donike M. Metabolism of boldenone in man: gas chromatographic-mass spectrometric identification of urinary excreted metabolites and determination of excretion rates. *Biol. Mass Spectrom* 1992; 21:3-16.

Schanzer W, Opfermann G., Donike M. *J. Steroid Biochem.*, 36 (1990) 153.

Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry*. 1996; 42(7): 1001

Segura J. Doping control in sports medicine. *Therapeutic Drug Monitoring* 1996; (18): 471.
Segura J. IOC Statistics 2002. Comunicació personal.

Shackleton CHL, Phillips A, Chang T, Li Y. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstenediols. *Steroids* 1997; 62: 379.

Shackleton CHL. Profiling steroid hormones and urinary steroids. *J Chromatogr* 1986; 379: 91-156.

Shinohara Y, Isurugi K, Hashimoto T. Stable isotope dilution analysis of human urinary metabolites of 17α -methyltestosterone. *J Chromatogr B* 2000; 741: 271-278.

Stafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ. (1984) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 60, 85-98.

Tchaikowsky V, Morozow V, Rogozkin V. Radioimmunoassay of anabolic steroids: possibilities and perspectives. In: *Doping control of athletes, Proceedings of the International Symposium, Moscow, 1979*.

Van Ginkel LA, van Blitterswijk H, Zoontjes P.W, van den Bosch D, Stephany R.W. J. Chomatogr. 1988;445:385.

Vischer E, Meystre C, Wettstein A. Herstellung weiterer 1-Dehydrosteroido auf mikrobiologischem Wege. Helv Chim Acta 1955; 38:1502-6.

Weiler JM, Allergic and Respiratory Disease in Sports Medicine. Marcel Dekker: New York, 1997.

Wilson H, Lipsset MB. Metabolism of epitestosterone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 26 (1966) 902-914.

Wilson JD. Androgen abuse by athletes. Endocrine reviews 1988; 9:181-199.

