Rev. Cub. Med. Dep. & Cul. Fís. 2004; Vol. 1, Núm. 2

ISSN: 1728-922X artículo original

Procedimiento para el análisis de esteroides anabólicos excretados en forma libre y otros compuestos

Procedure for anabolic steroids analyse excreted in free form and others compounds

Ariana Rodríguez Fernández[1]; Margarita Teresa Correa Vidal[2]; Dayamín Martínez Brito[3]

[1] Aspirante a investigador, Laboratorio Antidoping Cuba. Instituto de Medicina del Deporte.
[2] Investigador agregado, Laboratorio Antidoping Cuba. Instituto de Medicina del Deporte.
[3] Aspirante a investigador, Laboratorio Antidoping Cuba. Instituto de Medicina del Deporte. avlopez43@inder.cu

RESUMEN

En este trabajo se utilizo el método de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas, comprobándose su efectividad en el análisis y la detección de esteroides anabólicos excretados en forma libre y otros compuestos. Dicho método se usara en el Laboratorio Antidoping del Instituto de Medicina del Deporte.

Palabras claves: Esteroides, anabólicos, doping, análisis.

ABSTRACT

In this study was utilized the Gaseous Chromatography method adjusted to Mass Spectrometry, proving its effectiveness in analysis and detection of anabolics steroids excreted in free form and another compounds. The aforementioned method will be used at the Sports Medicine Institute Antidoping Laboratory.

Key words: Steroids, anabolics, doping, analysis, gaseous chromatography

INTRODUCCIÓN

El uso de los esteroides anabólicos por atletas (con el objetivo de apoyar su entrenamiento de fuerza), comenzó a principios de la década del 50 y se ha incrementado a través de los anos a pesar de la advertencia acerca de sus reacciones adversas potenciales y su prohibición por el COI a partir de 1975.1

1. Detección de esteroides

El primer método empleado para la detección de esteroides fue radio inmunoensayo (RIA), en 19752. Se uso antisuero contra la metandienona con actividad cruzada con otros 17- metil esteroides. Esta tecnica se utilizo en los Juegos Olimpicos de Montreal 1976 y Moscu 1980. Las confirmaciones de casos positivos fueron por Cromatografia de Gases acoplado a Espectrometria de Masas (CG/EM), con métodos creados en 19763, esta tecnica es utilizada en la actualidad. Estos compuestos y sus metabolitos se excretan por la orina de forma libre o en forma de conjugados de glucuronido fundamentalmente. Los excretados de forma libre son extraídos de la matriz mediante una extracción líquido- líquido mientras que los que se excretan en forma de conjugados se someten a una extracción en fase sólida y posteriormente a una hidrólisis enzimática para separar los grupos glucuronidos de la molécula 4.

Detección de agentes anabolizantes excretados en forma libre y de otros compuestos

Este procedimiento se aplica a muestras de orina y permite la detección de esteroides anabolizantes excretados en forma libre (ejemplo: Metandienona, Fluoximesterona, Danazol) y otros compuestos no esteroidales (ejemplo: Amiloride, Mesocarb).

Experimental

Materiales y reactivos

Agentes derivatizantes: N-metil-N-trimetilsililheptafluorobutiramida (MSHFBA), Trimetilsililimidazol (ISIM) y N- metil-bis-heptafluorobutiramida (MBHFBA), sintetizados en MACHERY- NAGEL. Stanazolol p.c como patron interno

Extracción y derivatización

La extracción se realizo con acetato de etilo a pH 9, la fase orgánica se evaporo a sequedad y se derivatizó con mezcla MSHFBA/TSIM 100:2 a 80o por 5 minutos y MBHFB a 80o por 30 minutos, para obtener compuestos mas volátiles, facilitándose su análisis por CG/EM 5,6,7,8.

Condiciones experimentales

Las muestras fueron analizadas por CG-EM, Agilent 5973 (Hewlett Packard), con columna capilar SPB-5 de 15m. El gas portador fue helio con un flujo inicial de 1.5 ml/min. El análisis de realizo con temperatura programada de 200oC a 300oC con gradiente de 30oC/min. Los compuestos fueron analizados por el método de monitoreo selectivo de iones (SIM) con 70eV de energía de ionizacion. 5,6,7,8.

Las 6 muestras analizadas provienen de un Test control enviados por el Laboratorio de Barcelona.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Con el objetivo de determinar el tiempo de retención relativo y los iones a monitorear, se analizo una mezcla de patrones obteniéndose el resultado que se muestra en la Tabla 1.

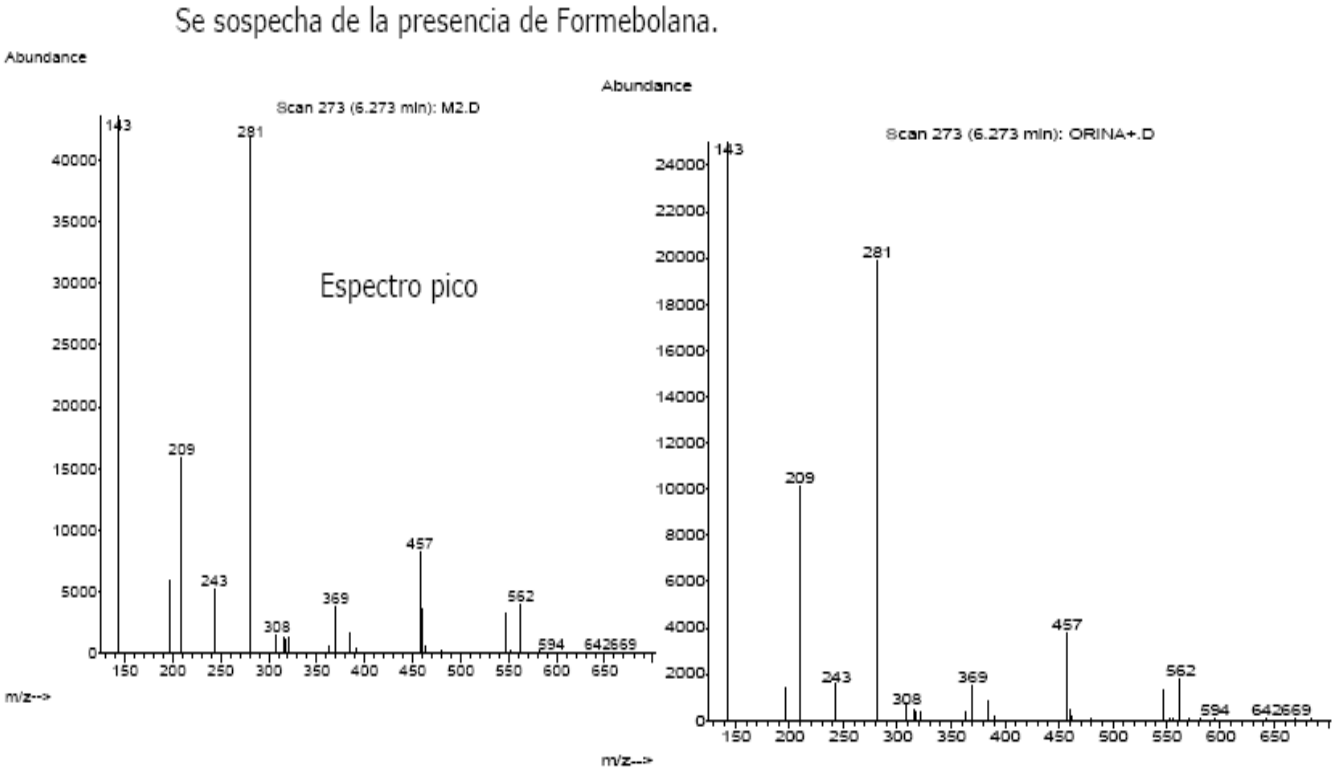
Tabla 1: Tiempos de retención relativos (TRR ± 0.02) e iones monitorizados para cada uno de los compuestos de interés.

Compuesto	Derivado	TRR	m/z
Amiloride	Tris-TMS	0.57	388, 390, 403
Artefacto Mesocarb	N- HFB	0.58	91, 119, 230
Metandienona met-2	Mono-O-TMS	0.81	282, 194
Oxandrolona met-1	Mono-O-TMS	0.83	308, 321, 363
Danazol met-1	Mono-O-TMS	0.86	369, 196, 384
Fluoximesterona met-1	Tetrakis-O-TMS	0.89	462, 552, 642
Oxandrolona	Mono-O-TMS	0.89	308, 321, 363
Metandienona met-1	Bis- O-TMS	0.92	281, 209, 460
Fluoximesterona met-1	Tris-O-TMS	0.92	570, 480, 390
Clorometandienona met-1	Bis- O-TMS	1.01	243, 315, 317
Stanozolol met-1	Bis- O-TMS, N-HFB	1.09	669, 684, 594
Formebolona met-1	Tris-O-TMS	1.11	457, 562, 547

De las 6 muestras del Test (M1, M2, M3, M4, M5, M6), en tres de ellas M1, M4 y M5 no fue detectado ningún pico de interés.

En las muestras M2, M3 y M6 se encontraron picos cromatográficos sospechosos, sus espectros y los tiempos de retención relativo fueron comparado con los espectros de los compuestos patrones reflejados en la Tabla 1 y con los de una orina positiva que poseía dichos compuestos.

Muestra M2:

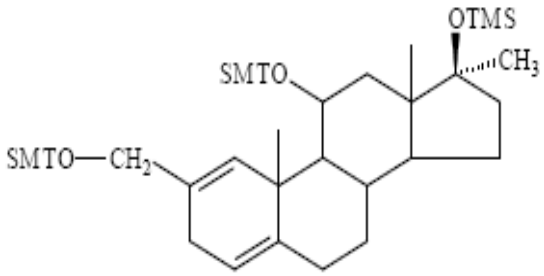


.

Como se puede observar, el espectro del pico sospechoso en la muestra problema coincide con el espectro de la Formebolona, hay coincidencia en los tiempos de retención (6.273min) y en el tiempo de retención relativo (1.11).

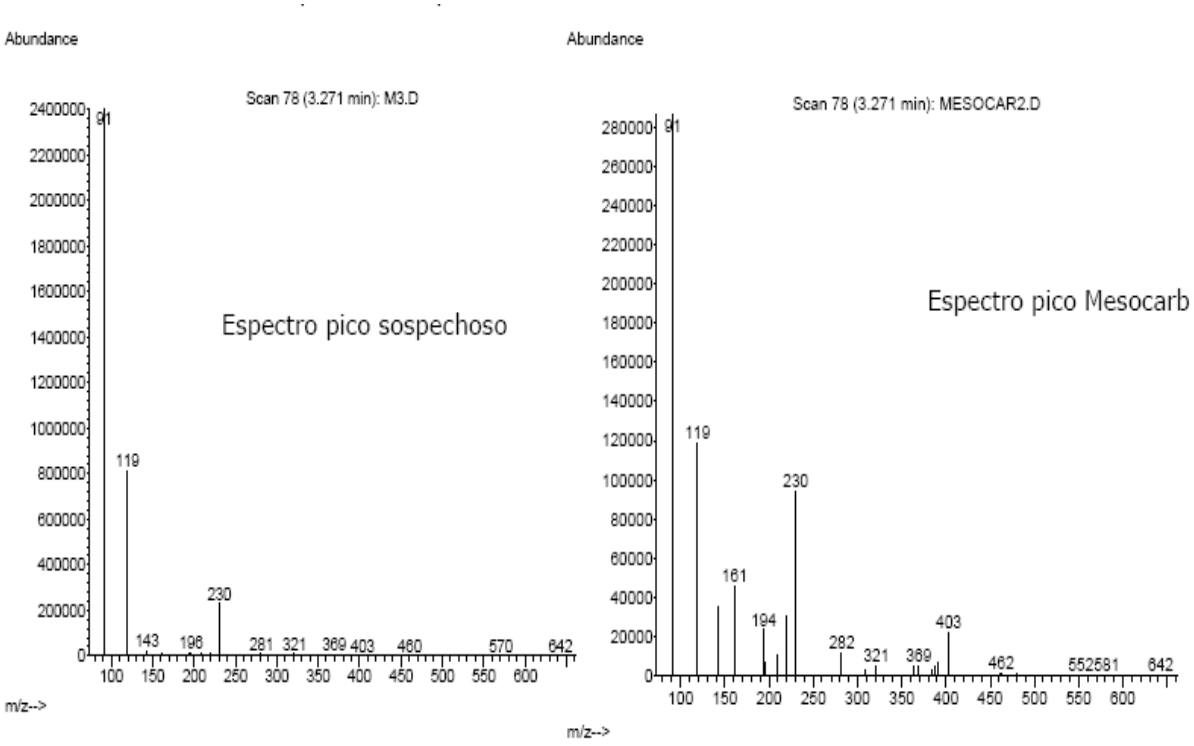
El espectro de una sustancia es característico y sus iones son producto de la fragmentación de la molécula.

Estructura del derivado Tris-O-TMS de la Formebolona (metabolito 1). Iones característicos del espectro 457/562/547



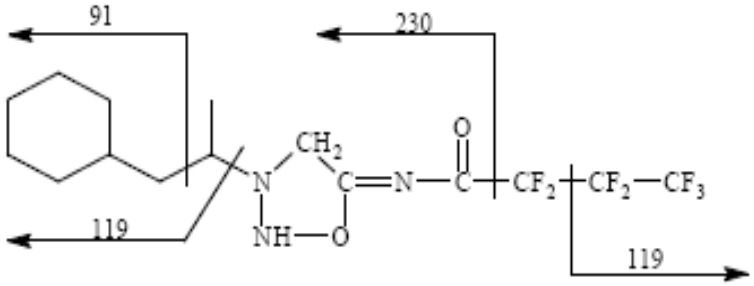
M+: 562 (Peso molecular)
M+- CH3: 547
M+- OTM-CH3: 457

Muestra 3: Se sospecha de la presencia de Mesocarb.



El espectro del pico sospechoso en la muestra problema M3 coincide con el espectro del Mesocarb, también hay coincidencia en los tiempos de retención (3.271min) y en el tiempo de retencion relativo (0.58).

Posible estructura del derivado N-HFB del Mesocarb (Artefacto).

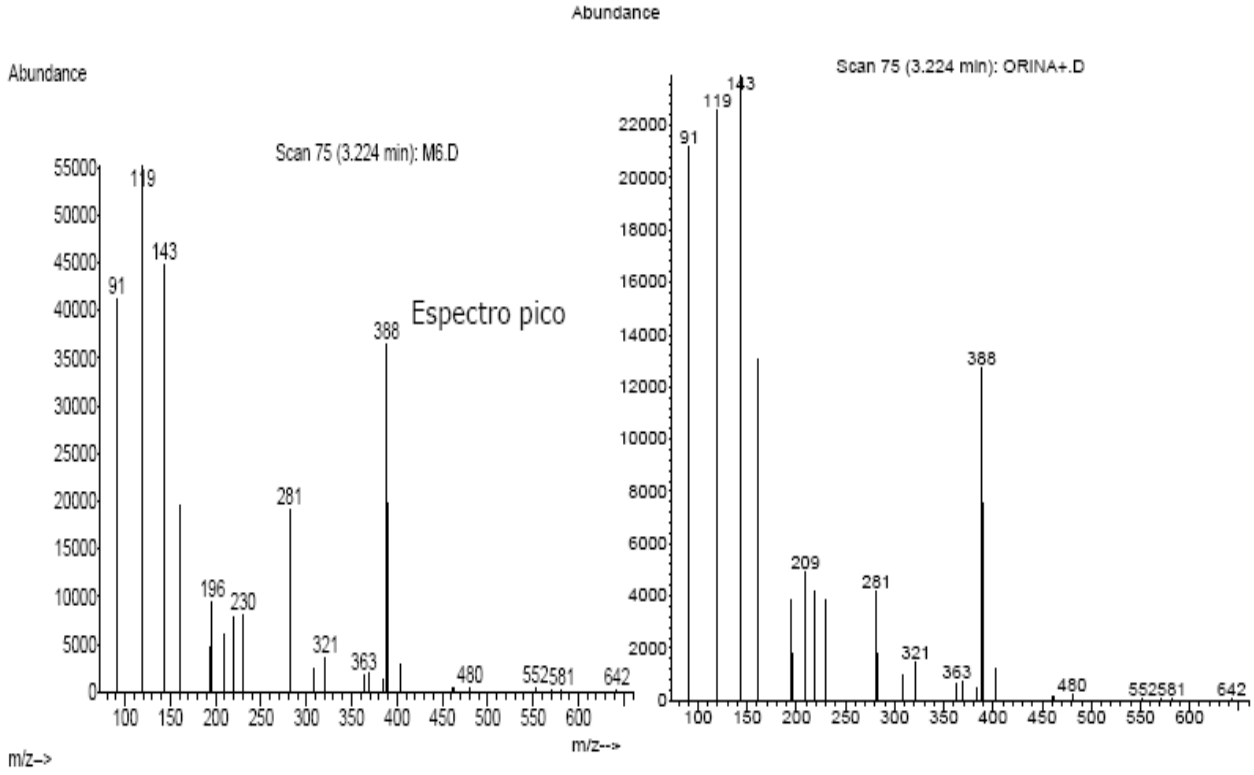


Iones característicos del espectro 91/ 119/230

Estos iones se indican en la fragmentacion de la estructura.

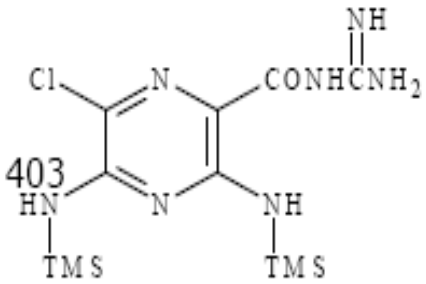
Muestra 6

En esta muestra se sospecha de la presencia de dos sustancias: Amiloride (diuretico detectado por este procedimiento) y Stanazolol (metabolito 1).



El tiempo de retención del pico sospechoso de Amiloride es el mismo que el de esta sustancia (3.224 min), así como el tiempo de retención relativo (0.57). Coinciden también los iones característicos (388/ 390/ 403).

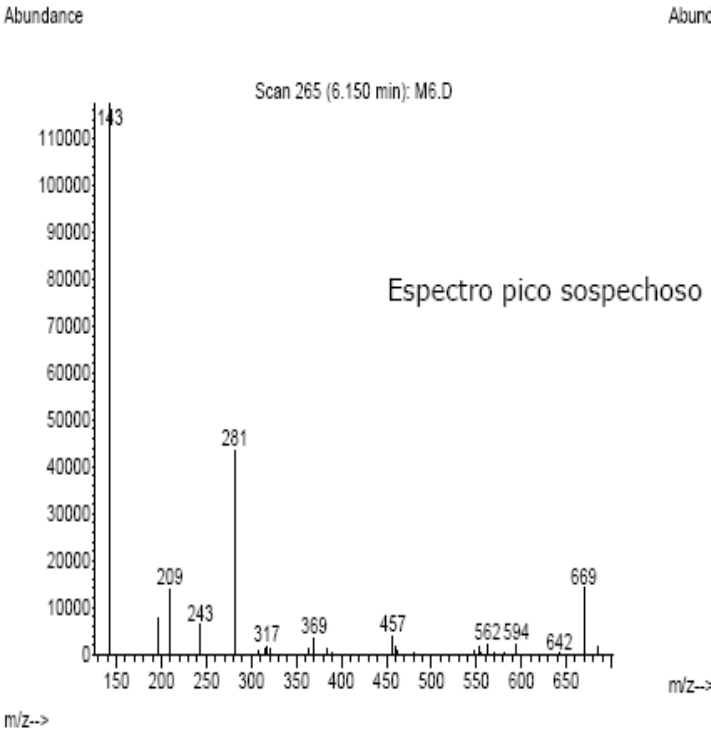
Estructura del derivado Bis-N-TMS del Amiloride



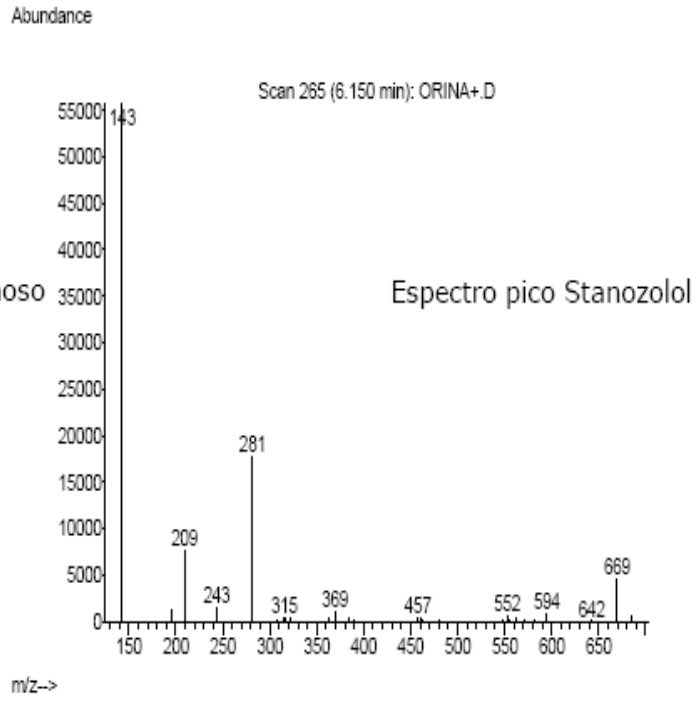
Iones característicos del espectro 388/ 390/

M^+: 403 (Peso molecular)

$M^+ - CH_3$: 388 – 390 (por la presencia del Cl)



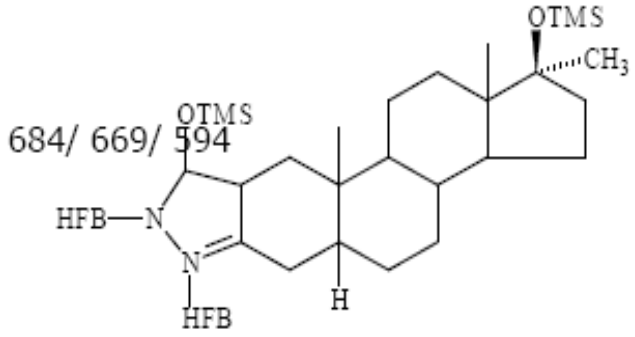
Espectro pico sospechoso



Espectro pico Stanozolol

Como se observa, el espectro del pico sospechoso en la Muestra 6 coincide con el espectro del Stanozolol (metabolito 1), también hay coincidencia en los tiempos de retención (6.150 min) y en el tiempo de retención relativo (1.09).

Estructura del derivado Bis-O-TMS N-HFB del Stanozolol (metabolito 1).



Iones característicos del espectro

M^+: 684 (Peso molecular)

M^+- CH_3: 669

M^+- OTM: 594

CONCLUSIONES

El establecimiento del método extractivo, derivatización y análisis permitió la identificación inequívoca de los compuestos: Formebolona, Mesocarb, Amoloride y Stanozolol, lo que demuestra la efectividad del metodo para la detección de esteroides excretados en forma libre y otros compuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Ctlin D. (1998) “Anabolic Androgenic Steroids”, “Drug Abuse Handbook”,CRC Press LLC, 653.

2- Brooks, R.V. Firth, R.G., and Suumer, N.A. (1975) “Detection of anabolic steroids by radio immuno assay”, Brit. J. Sports Med., 9, 89.

3- Donike M. (1975) “zum Problem des Nachweises der anabolen Steroide: Gas chromatographische und massenspezifische Moglichkeiten”, Sportazt und Sportmedizin, 1, 1.

4- Schanzer W. and Donike M. (1993) “Metabolism of anabolic steroids in Man: Synthesis and Use of Reference Substances for Identification of Anaboilc Steroid Metabolites”, “10th Cologne Workshop on dope Analysis 7th to 12th June 1992”, Koln: Sport und Buch Strauβ, Ed. Sport, 97.

5- Breidbach a., Sigmund G., Donike M. (1995) “Combination of Screening Procedures- Mesocarb detection as an Example”, “Recent Advances in doping Analysis (2)”, Verlag Sport und Buch Strauβ- Edition Sport, 301.

6- Grosse D., Thieme R., Lang R., Mueller R. (1999) “ Formebolone detection”, “Recent Advances in Doping Analysis (7)”, Verlag Sport und Buch Strauβ, 143.

7- Karova D., Anguelova M., Halatcheva N. (2000) “ Amiloride- Detection and Excretion Study under Condition of Steroid Screening Procedure”, “Recent Advances in Doping Analysis (8)”, Verlag Sport und Buch Strauβ, 197.

8- Laboratorio de Barcelona, Procedimiento Normalizado.