

**Desarrollo de un método para la detección de glucurónidos de esteroides anabólicos androgénicos en orina humana en lugares de trabajo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución**

**Development of a liquid chromatography – high resolution accurate mass spectrometry method for the detection of glucuronides of anabolic-androgenic steroids in human urine in the workplace**

José Rangel Hasbún<sup>1</sup>, Tania Garro Vargas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Microbiólogo químico clínico, Laboratorio de Toxicología, Ministerio de Seguridad Pública, Costa Rica.

<sup>2</sup>Microbióloga química clínica, Área de Salud de Cartago, Caja Costarricense de Seguro Social, Costa Rica.

Correspondencia: jrangelh@gmail.com

Recibido: 21/09/2020; aceptado para publicación: 21/02/2021.

### **Resumen**

El interés por detectar la presencia del consumo de esteroides anabólicos androgénicos en lugares de trabajo ha aumentado en la última década. Para satisfacer esta demanda, se desarrolló un método rápido y sencillo para la detección de glucurónidos de tres esteroides anabólicos androgénicos en orina utilizando una preparación de muestra basada en el método «*dilute and shoot*» y un análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, por lo que el método se podría implementar en laboratorios de alto volumen. El método fue desarrollado para la detección del uso activo de esteroides anabólicos androgénicos; se utilizó un punto de corte de 50 ng/ml para los tres compuestos estudiados. Se logró demostrar una buena linealidad ( $r^2 > 0.99$ ) para todos los compuestos, pero con un rango lineal corto (10–100 ng/ml). Los límites de detección se encontraron entre el intervalo de 2–10 ng/ml, con una reproducibilidad en el punto de corte inferior a 16% para todos los compuestos. A pesar de que se contó con una cantidad limitada de patrones disponibles, las propiedades de la espectrometría de masas de alta resolución y masa exacta permitió la detección de compuestos que son isobáricos con varios glucurónidos y agliconas de esteroides anabólicos androgénicos en muestras confirmadas positivas, lo cual sugiere que el método podría tener un rango de aplicación más amplio.

**Palabras clave:** esteroides anabólicos androgénicos, glucurónidos, toxicología laboral, espectrometría de masas

## **Abstract**

The interest in testing for the presence of anabolic-androgenic steroids in the workplace has been on the rise. The development of a fast and simple “dilute and shoot” method for the direct detection of the glucuronides of 3 anabolic-androgenic steroids in urine by liquid chromatography-mass spectrometry, which can be implemented in high throughput laboratories, is described. The method focuses on the detection of active use of anabolic-androgenic steroids, using a 50 ng/mL cut-off for the three compounds. All analytes demonstrated good linearity ( $r^2 > 0.99$ ), albeit with a narrow linear range (10 – 100 ng/mL). Limits of detection were between 2 - 10 ng/mL, with reproducibility at the cut-off lower than 16 % for all compounds. Although the number of standards available was limited, the use of high resolution-accurate mass mass spectrometry allowed the detection of compounds that are isobaric to various anabolic-androgenic steroid glucuronides and aglycones in confirmed positive urine samples, suggesting a wider applicability for the method.

**Keywords:** anabolic-androgenic steroids, glucuronides, toxicology, chromatography-mass spectrometry.

## **Introducción**

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que se basa en la capacidad del instrumento de manipular moléculas con carga eléctrica y separarlas de acuerdo con el valor de una magnitud llamada relación masa carga ( $m/z$ ) para su identificación. Cuando esta técnica se acopla a un método de separación, como lo son la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía líquida (LC), permite analizar muestras biológicas complejas y lograr la identificación y cuantificación de uno o varios analitos que dicha muestra contiene (1).

En los últimos veinte años, la espectrometría de masas ha dejado de ser considerada como una técnica exclusivamente de investigación y ha empezado a ser utilizada como una herramienta en los laboratorios clínicos para el diagnóstico de pacientes. Los avances en el desarrollo de esta tecnología han permitido que los equipos, hoy en día, sean cada vez más compactos, fáciles de usar y asequibles. Muchos laboratorios clínicos han tomado la decisión de implementar técnicas basadas en MS para sus análisis de rutina, ya que este tipo de equipos (especialmente el LC-MS) tienen la capacidad de detectar decenas o

centenas de analitos en un mismo análisis utilizando relativamente pocos materiales, lo cual disminuye los costos de operación (2).

Estos avances tecnológicos en la rama de la espectrometría de masas han llevado al desarrollo de una técnica llamada espectrometría de masas de alta resolución y masa exacta (HRAM). Esta técnica permite determinar la  $m/z$  de una partícula con exactitud hasta el cuarto o quinto decimal, lo cual permite identificar un analito utilizando su masa atómica exacta. Es una práctica común indicar la masa atómica de los átomos como un número entero, por ejemplo, indicando que la masa del hidrógeno es 1 ( $^1\text{H}$ ), la del nitrógeno es 14 ( $^{14}\text{N}$ ) y la del oxígeno es 16 ( $^{16}\text{O}$ ). Pero en realidad, las masas atómicas de estos tres átomos son 1.00784, 14.00307 y 15.99491, respectivamente. Si se utilizan estas pequeñas diferencias, es posible diferenciar compuestos que tienen pesos moleculares muy similares, como se muestra en la Tabla 1. Esta capacidad de resolución permite identificar diferentes compuestos con pesos similares, incluso en aquellos casos en que no se logran separar completamente por el método cromatográfico utilizado.

Tabla 1. Fórmula química y masa exacta de cuatro compuestos con masas atómicas similares

Compuesto	Fórmula química	Masa	Masa exacta
Dióxido de carbono	$\text{CO}_2$	44	44.0095
Óxido nitroso	$\text{N}_2\text{O}$	44	44.0128
Acetaldehído	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	44	44.0526
Propano	$\text{C}_3\text{H}_8$	44	44.0956

Los esteroides anabólicos androgénicos (EAA) son un grupo de compuestos que causan virilización y crecimiento del tejido muscular. Algunos de estos compuestos son endógenos, como la testosterona, mientras que otros son exógenos. Entre este último grupo se incluyen una gran variedad de compuestos que fueron sintetizados y estudiados

desde la década de 1950. Tanto las propiedades masculinizantes como las anabólicas de los EAA parecen estar reguladas por un mismo receptor celular, lo cual ha dificultado los intentos por separar estos dos efectos (3).

La actividad anabólica de los EAA los hace atractivos para los individuos que desean aumentar su masa muscular o mejorar su rendimiento en actividades deportivas (4, 5). Sin embargo, se ha demostrado que la administración constante de dosis suprafisiológicas de testosterona causa un desbalance hormonal que puede llevar a la atrofia de las gónadas en los varones o a la aparición de rasgos masculinos, tales como hirsutismo o cambios permanentes en la voz, en las mujeres. El uso de EAA puede causar también problemas cardiovasculares tales como hipertrofia ventricular izquierda, trombosis y aterogénesis (6); además, enfermedades hepáticas como la ictericia por colestasis y la peliosis hepática (7); se pueden sumar cambios psicológicos que pueden llevar a un incremento en la agresividad y comportamiento hostil (8). Asimismo, se cree que el uso de las EAA puede incidir negativamente en la función cognitiva del individuo (9).

Diferentes estudios y encuestas han demostrado que la mayoría de las personas que usan EAA no están involucradas en deporte competitivo, sino que utilizan las EAA de manera recreacional con el fin de mejorar su percepción corporal (10). Una serie de encuestas realizadas a este grupo de personas que usan los EAA de manera recreacional mostraron que más del 95% de estos individuos utilizan varios EAA concomitantemente, en cantidades que superan los 500 mg por semana, mientras que más del 25% de los individuos indicaron consumir más de 1 500 mg de EAA por semana (11).

Las personas que utilizan EAA de manera recreativa constituyen una proporción no despreciable de la población laboral. El uso de EAA por parte de los empleados generalmente no es deseable, ya que los efectos secundarios de su abuso podrían tener un impacto tanto en la salud como en el desempeño del trabajador. El uso de EAA podría ser

particularmente problemático en el caso de los empleados que tienen puestos que se consideran críticos para la seguridad, en los cuales el trabajador es responsable por la vida de otras personas -como ocurre con los transportistas (12), o tiene autorización para utilizar la fuerza o para estar armado, como es el caso de los cuerpos policiales (13).

Las pruebas para determinar la presencia de EAA en fluidos biológicos han sido desarrolladas e implementadas casi que exclusivamente como parte de los programas antidopaje deportivos. Desde la década de 1980, la GC-MS ha sido considerada el estándar de oro tanto para los métodos de tamizaje como para los confirmatorios, ya que esta metodología tiene una alta exactitud en ensayos cuantitativos para la determinación de EAA (14). Sin embargo, el análisis de los EAA por medio de GC-MS se ve dificultado debido a que estos son compuestos hidrofóbicos que normalmente son excretados en orina conjugados a un grupo glucurónido o sulfato (15). Para poder analizar estos compuestos mediante GC-MS se deben realizar pasos de derivatización o hidrólisis, los cuales alargan el tiempo de preparación de muestra y pueden introducir variabilidad o artefactos (16-18).

El uso de LC puede ayudar a superar estas limitaciones, ya que con esta técnica se puede analizar compuestos conjugados directamente sin necesidad de derivatizar ni hidrolizar (19). Al eliminar estos dos pasos, es posible incrementar la reproducibilidad de la técnica y al mismo tiempo disminuir sustancialmente el tiempo de preparación de muestra.

El proceso de preparación de muestras para la detección de EAA mediante LC-MS generalmente incluye un paso de purificación de muestra, cuyo propósito es remover los componentes de matriz que pueden afectar el desempeño de la columna de LC, y concentrar el analito. Los métodos más populares para esta purificación son la extracción en fase sólida (SPE) y la extracción líquido-líquido (LLE). Sin embargo, el uso de una o ambas de estas técnicas para el análisis de EAA debe ser considerado cuidadosamente,

ya que estos métodos pueden concentrar esteroides endógenos y otras sustancias interferentes que pueden llevar a la supresión de iones, lo cual complicaría el análisis (20). Un método alternativo sencillo para la preparación de muestras, llamado *dilute and shoot* en inglés, consiste simplemente en diluir la muestra en un diluyente apropiado e inyectarla directamente en el LC-MS. Esta metodología no solo evita concentrar compuestos interferentes, sino que reduce los potenciales efectos de matriz al diluir su concentración. Sin embargo, la concentración del analito también se reduce, por lo que se requiere de un instrumento con alta sensibilidad para detectar compuestos que estén presentes en baja concentración.

Históricamente, el desarrollo de métodos para la detección de EAA ha sido llevado a cabo por laboratorios involucrados en programas antidopaje, por lo que la mayoría de los métodos que han sido publicados se enfocan en cumplir las guías establecidas por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, por sus siglas en inglés), las cuales imponen límites de detección muy bajos: entre 2 y 5 ng/ml para la mayoría de los compuestos. Estos métodos con límites de detección tan bajos pueden no ser aptos en otras esferas, por ejemplo, en la toxicología laboral, donde las cargas de trabajo generalmente son altas y donde los clientes desean detectar el uso activo de los compuestos y no su uso pasado. Con el fin de llenar este vacío, se desarrolló un método de detección de EAA que fuese sencillo, de bajo costo y de alto rendimiento.

## **Materiales y métodos**

### *Reactivos y químicos*

Los patrones de glucurónido de testosterona (TG), glucurónido de 3'-hidroxiestanozolol (3STANG) y glucurónido de 19-norandrosterona (NANm1G) fueron donados por el Drug Control Centre de King's College London.

Los patrones de testosterona (T), estanozolol (STAN), trembolona (TREN), metandienona (MED), mesterolona (MES) y metenolona (MTN) provinieron de Steraloids (Newport, RI, EEUU). Los patrones de epitestosterona (E), nandrolona (NAN) y boldenona (BOLD) provinieron de Cerilliant (Austin, TX, EEUU). El estándar interno d3-testosterona (d3T) provino del National Measurement Institute (Pymble, Australia).

Se utilizó metanol grado HPLC, agua grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC, acetato de amonio grado reactivo, ácido fórmico grado analítico, todos marca Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido), mientras que el acetato de sodio grado BioXtra utilizado fue marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). También se usó beta-glucuronidasa de *Haliotis rufescens* marca Kura Biotech (Puerto Varas, Chile).

Se preparó orina libre de esteroides utilizando un método descrito anteriormente (21) con algunas modificaciones. Los cartuchos de extracción en fase sólida Oasis HLB 3cc (Waters, Milford, MA, EEUU) se acondicionaron con 1 ml de metanol, seguido de 1 ml de agua destilada. La orina fue pasada por el cartucho y recolectada. La orina fue analizada con el método desarrollado para determinar la presencia de posibles compuestos que interfirieran con los compuestos de interés.

Para el estudio de especificidad se utilizó una gran variedad de compuestos: dextropropoxifeno, benzoilecgonina, metadona, EDDP, metacualona, tramadol, THC-COOH, diazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, lorazepam, anfetamina, MDMA y 6-acetilmorfina marca Cerilliant (Austin, TX, EEUU); buprenorfina, norbuprenorfina y LSD marca Lipomed (Arlesheim, Suiza); morfina, codeína, dihidrocodeína, alprenolol, atenolol, bisoprolol, labetalol, metoprolol, nadolol, pindolol, sotalol, propanolol, timolol y acebutolol marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU); 7-hidroxi-noscapina marca RTI International (Research Triangle Park, NC, EEUU); y 3-hidroxi-papaverina marca Edinburgh Pharmaceutical Processes LTD (Edinburgo, Reino Unido).

### *Equipos*

La separación de analitos se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Thermo Accela con una bomba, degasificador, compartimento de columna y automuestreador Accela (Thermo Scientific, Bremen, Alemania). Se utilizó una columna Thermo Scientific Accucore C18 de 100 mm de largo, 2.1 mm de diámetro y partículas de 2.6  $\mu\text{m}$  a 30 °C. El detector de masas utilizado fue un espectrómetro de masas Orbitrap Thermo Exactive con una fuente de ionización por electrospray calentado (HESI, Thermo Scientific, Bremen, Alemania). El instrumento fue utilizado con polaridad positiva/negativa intercambiable, en modo *scan* con un rango de 100-1 000 m/z, a una resolución de 50 000. Se utilizó nitrógeno como gas envolvente (a 50 unidades arbitrarias), como gas auxiliar (a 10 unidades arbitrarias) y como gas de colisión. Para suplir el nitrógeno se utilizó un generador de nitrógeno Nitrogen 50 (Hi-Line, Staffordshire, Reino Unido). La temperatura del capilar se mantuvo a 250 °C, el voltaje del capilar utilizado fue de +/- 60 V, y el voltaje del espray fue de +/- 4.5 kV. El espectrómetro de masas se calibró diariamente utilizando soluciones de calibración positiva y negativa (Thermo Scientific Pierce, Rockford IL, EEUU), infundiendo la solución directamente en la fuente a un flujo de 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Los datos se procesaron utilizando el software Xcalibur (Thermo Scientific, Bremen, Alemania). La tolerancia utilizada al procesar los datos fue de 5 ppm.

Como fase móvil A se utilizó agua con ácido fórmico al 0.01%, mientras que la fase móvil B consistió de metanol con ácido fórmico al 0.01%. Se utilizó un flujo de 500  $\mu\text{l}/\text{min}$  y la programación de la gradiente fue la siguiente (se indica el porcentaje de fase orgánica): 0 min, 60%; 0.5 min, 60%; 4.5 min, 67%; 4.7 min, 100 %; 5.7 min, 100%; 5.8 min, 60%; 7.5 min, 60%.



### *Preparación de muestras*

Las muestras de orina se almacenaron entre 2-8 °C antes de su uso. A cada alícuota de 100 µl de orina se le agregó 20 µl de una solución de d3T en metanol 250 ng/ml como estándar interno. Luego, se diluyó la alícuota 1:5 con una mezcla de fases móviles A y B 50:50. Los viales con la muestra se taparon y se mezclaron utilizando un vórtex.

### *Optimización del método*

Se varió el nivel de resolución y la cantidad y tipo de análisis que el analizador Orbitrap realiza con el fin de determinar su efecto en la sensibilidad de los ensayos. Para esto, se estudió la intensidad de los iones y la cantidad de *scan* por pico al inyectar una mezcla de tres patrones de glucurónidos de esteroides utilizando cuatro combinaciones diferentes: A) resolución a 50 000 y 4 tipos de análisis *scan* (*scan* completo en modo positivo, *scan* completo en modo negativo, *scan* completo MS<sup>2</sup> en modo positivo con HCD en 35, y *scan* completo MS<sup>2</sup> en modo negativo con HCD en 35); B) resolución a 25 000 y los cuatro tipos de análisis *scan* descritos en (A); C) resolución a 50 000 y dos tipos de análisis *scan* (*scan* completo en modo positivo, *scan* completo en modo negativo); y D) resolución a 25 000 y los dos tipos de análisis *scan* descritos en (C).

### *Validación del método*

Al método se le determinó el límite de detección (LOD), límite inferior de cuantificación (LLOQ), la linealidad, la reproducibilidad, los efectos de matriz y la selectividad.

El LOD se estableció analizando cuatro corridas independientes, cada una de tres grupos de cinco muestras de orina libre de esteroides a la cual se le agregó cada compuesto en concentraciones de 2, 5 y 10 ng/ml. La concentración más baja a la cual fue posible detectar cada compuesto en las 20 muestras con una proporción señal/ruido (S/N) igual o superior a tres fue seleccionada como el LOD para ese compuesto.

El LLOQ se calculó analizando dos corridas independientes, cada una de tres grupos de cinco muestras de orina libre de esteroides a la cual se le agregó cada compuesto en concentraciones de 10, 15 y 25 ng/ml. La concentración más baja a la cual fue posible cuantificar cada compuesto en las 15 muestras con un coeficiente de variación (%CV) igual o inferior a 20% fue seleccionada como el LLOQ para ese compuesto.

La linealidad del método se determinó preparando cinco curvas de calibración para cada analito. Las concentraciones de los estándares de las curvas de calibración tuvieron un rango de 2 a 200 ng/ml.

La reproducibilidad se estableció analizando cuatro corridas independientes realizadas por dos analistas. Cada corrida consistió en diez muestras de orina libres de esteroides a las cuales se le agregó cada compuesto a una concentración de 50 ng/ml.

Los efectos de matriz se estudiaron analizando 10 muestras de orina libre de esteroides a las cuales se le agregó cada compuesto a una concentración de 50 ng/ml, y luego comparando el promedio de las áreas de los picos de estas muestras con el promedio de las áreas de los picos de una solución 50:50 de fase móvil A:B a la cual se le agregó cada compuesto a una concentración de 50 ng/ml.

La selectividad se determinó agregándole a una muestra de orina libre de esteroides cada compuesto a una concentración de 25 ng/ml junto con los compuestos indicados en la Tabla 2. Luego se intentó buscar picos interferentes cerca del tiempo de retención de los picos de interés o diferencias en la integración esperada de las áreas de los picos de interés.

Tabla 2. Compuestos utilizados para probar la especificidad del método. Los grupos de compuestos fueron agregado a muestras separadas

Grupo	Compuestos	Concentración (ng/mL)
LSD	Ácido lisérgico dietilamida	25
Multi-método	Propoxifeno, benzoilecgonina, metadona, EDDP, metacualona, tramadol	16 700
Buprenorfina	Buprenorfina, norbuprenorfina	1 200
THC	11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol	2 000
Benzodiazepinas	Diazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, lorazepam	12 500
Anfetaminas	Anfetamina, 3,4-metilendioximetanfetamina	25 000
6-monoacetilmorfina	6-monoacetilmorfina, 7-hidroxi-6-acetilmorfina	1 000
Opiáceos	Morfina, codeína, dihidrocodeína	50 000
Beta bloqueadores	Aloprenolol, atenolol, bisoprolol, labetalol, metoprolol, nadolol, pindolol, sotalol, propanolol, timolol, acebutolol	250

#### *Aplicación del método a muestras reales*

El análisis se realizó a 26 muestras de orina codificadas y anónimas que ya habían sido analizadas en un laboratorio externo para detectar la presencia de EAA mediante GC-MS. Se compararon los resultados obtenidos mediante ambos métodos.

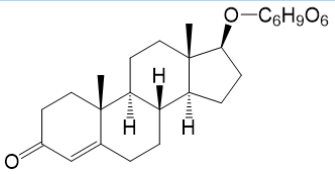
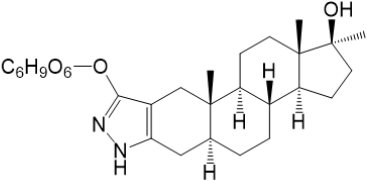
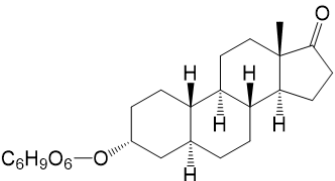
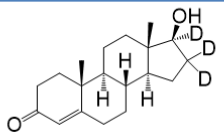
### **Resultados y discusión**

#### *Selección de iones a detectar*

La ionización de TG, 3STANG, NANm1G y el estándar interno (d3T) se logró con la fase móvil utilizada. Se estudiaron tres iones positivos ( $[M+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  y  $[M+Na]^+$ ) y tres iones negativos ( $[M-H]^-$ ,  $[M+HCOO]^-$  y  $[M+OAc]^-$ ) para cada glucurónido. En el caso de TG y d3T,  $[M+H]^+$  fue el ion más abundante y  $[M-H]^-$  fue el segundo más abundante. La alta abundancia de  $[M+H]^+$  se debe a la presencia de la cetona conjugada en el carbono 3, la cual confiere una alta afinidad a protones. En el caso de 3STANG y NANm1G, los iones más abundantes fueron  $[M+H]^+$  y  $[M-H]^-$ , respectivamente. La

abundancia del ion  $[M+H]^+$  de 3STANG es causada por la afinidad a los protones que tiene el pirazol, mientras que la presencia de  $[M-H]^-$  para los tres compuestos se debe a la deprotonación del glucurónido, el cual es un grupo ácido (Tabla 3). Estos datos obtenidos son congruentes con lo que se ha reportado previamente (17, 21, 22).

Tabla 3. Estructura, ion detectado y masa exacta del ion de los 3 glucurónidos de EAA utilizados en el estudio

Compuesto	Estructura	Ion más abundante	Masa exacta ion
<b>TG</b>		$[M+H]^+$	465.2483
<b>3STANG</b>		$[M+H]^+$	521.2857
<b>NANm1G</b>		$[M-H]^-$	451.2337
<b>d3T</b>		$[M+H]^+$	292.2350

### Optimización de MS

Como parte de la optimización, se varió la resolución y la cantidad y tipo de análisis que realiza el analizador Orbitrap para determinar cómo estos parámetros afectan la sensibilidad del método. Debido a que el Orbitrap requiere de cierta cantidad de tiempo para analizar los iones que se encuentran dentro de la trampa antes de eliminarlos y rellenar la trampa con el siguiente paquete de iones, la cantidad de análisis que realiza el analizador afecta la cantidad de *scans* que se pueden obtener por pico (23). Una disminución en la cantidad de *scans* por pico puede reducir la sensibilidad del ensayo ya

que se reduce la posibilidad de que logre determinar con exactitud el punto más alto del pico de interés, lo cual aumenta la S/N.

El método requiere que se realicen experimentos tanto en modo positivo como en modo negativo ya que, de acuerdo con lo discutido anteriormente, hay analitos de interés para los cuales se puede detectar una señal más intensa en el modo positivo y otros en el modo negativo. Si adicionalmente se realiza fragmentación, el método haría cuatro experimentos por ciclo, lo cual reduce la cantidad de *scans* que se realizan por pico. La resolución del instrumento también se puede ajustar dependiendo de lo que requiere el método, pero se debe tomar en cuenta que un aumento en la resolución disminuye la cantidad de *scans* por pico.

Al programar el instrumento para realizar cuatro experimentos con una resolución de 50 000, se logró obtener 4-7 *scans* por pico, mientras que el uso de dos experimentos con una resolución de 25 000 permitió adquirir 9-12 *scans* por pico. Sin embargo, no se observó una diferencia en la intensidad de la señal ni en el S/N al analizar dos calibradores diferentes con las diferentes combinaciones de número de experimentos y resolución, por lo que se decidió mantener los cuatro experimentos en el método final, ya que se considera que el obtener la información adicional que se genera al fragmentar los analitos es más beneficioso que un posible aumento leve en la sensibilidad del método.

También se estudió el efecto de la matriz en la exactitud de masa del instrumento. Se comparó la exactitud de masa de patrones que se agregaron a tres diferentes matrices: orina, orina filtrada y una solución 50:50 de fase móvil A y B. La comparación se realizó al utilizar el algoritmo de predicción de fórmula química presente en el software Xcalibur. No hubo diferencia en el error de masa al comparar los patrones de los analitos en las tres matrices, y todos los errores de masas fueron inferiores a 1.75 ppm.

Este método, con un gradiente de 7.5 min, fue el protocolo más rápido que se logró encontrar en la literatura para la detección de este tipo de compuestos, y es al menos dos veces más rápido que la mayoría de los métodos disponibles (17, 24, 25). El método utiliza una técnica de preparación de muestras tipo *dilute and shoot*, lo cual disminuye aún más el tiempo de análisis ya que no se requiere de un protocolo de preparación de muestras extenso.

Las características de los protocolos de preparación de muestras y de separación de este método ayudan a disminuir los costos para implementar este método en un laboratorio de alto volumen. Una separación rápida permite reducir la cantidad de fase móvil que se requiere para cada muestra y aumenta la cantidad de muestras que se pueden analizar por unidad de tiempo, mientras que la preparación de muestras sencilla elimina la necesidad de contar con reactivos y materiales costosos para realizar una extracción.

#### *Validación de método*

A diferencia de los métodos utilizados en programas antidopaje, donde el interés es detectar el uso reciente y pasado de determinada sustancia, el presente método se desarrolló con el fin de detectar únicamente el uso activo de EAA, lo cual es apropiado para la aplicación en programas de toxicología laboral. La Agencia Mundial Antidopaje (WADA) estipula que los ensayos para la detección de EAA deben tener un límite de cuantificación en el rango de 2-5 ng/ml (26). Estos límites tan bajos no son útiles en métodos de tamizaje de programas de toxicología laboral, en los cuales se desea detectar aquellas muestras de personas que están utilizando las sustancias activamente.

Diversos estudios que han medido los niveles de TG en orina de la población en general han determinado que la concentración normal de este compuesto endógeno puede variar entre <1 a 90 ng/ml (21, 27, 28). Otro estudio que analizó muestras que tuvieran una proporción de testosterona a epitestosterona (T/E) mayor a seis, lo cual sugiere

fuertemente que hay administración exógena de testosterona, encontró que la concentración media de TG en estas orinas era de 123 ng/ml (29). Un estudio en el cual se le administró tabletas de [<sup>13</sup>C]nandrolona a los sujetos encontró concentraciones máximas de NANm1 por encima de 12 000 ng/ml luego de administrar una dosis de 25 mg, y al analizar muestras de orina tomadas 100 horas después de ingerida la dosis se encontraron concentraciones superiores a los 100 ng/ml (30). Otro estudio donde se administró una dosis oral de 20 mg de estanozolol a un sujeto reportó una concentración máxima de 329 ng/ml, y concentraciones superiores a 60 ng/ml 60 horas después de tomada la dosis (31). En estos dos últimos estudios se realizó una hidrólisis a las muestras de orina para eliminar el conjugado de los EAA, sin embargo, se ha reportado que cerca del 100% de una dosis exógena de cualquiera de estos dos compuestos se excreta conjugada (32, 33). Las dosis que se administraron en estos dos estudios fueron muy inferiores a las dosis que se ha reportado que utilizan las personas que abusan de EAA (11), por lo que se esperaría que las concentraciones de glucurónidos de EAA que se encuentren en la orina de las personas que abusan de las EAA sean muy superiores a las que se reportaron en estos estudios. Tomando esto en cuenta, el punto de corte del método se estableció en 50 ng/ml para los tres compuestos, con el fin de ayudar a distinguir uso activo de uso pasado.

El límite de detección del ensayo se determinó analizando muestras a las cuales se les agregó patrones en concentraciones entre 2-20 ng/ml. El compuesto con el LOD más alto fue TG, mientras que NANm1G tuvo el más bajo (Tabla 4). La linealidad del ensayo para los tres compuestos cubre un rango pequeño, pero este rango incluye el punto de corte, y los coeficientes de correlación para los tres compuestos son mayores a 0.99. La correlación del método después de los 100 ng/ml no es la esperable, sugiriendo que es

más adecuado utilizar el método de manera semicuantitativa, lo cual es congruente con el hecho de que el propósito del método es ser un tamizaje.

Tabla 4. Valores obtenidos en la validación del método para los tres compuestos. SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, LOD: límite de detección, LLOQ: límite de cuantificación inferior.

	COMPUESTO		
	TG	3STANG	NANm1G
<b>Rango (ng/mL)</b>	10-100	10-100	10-100
<b>Coefficiente correlación</b>	0.994	0.993	0.996
<b>Pendiente</b>	0.0046	0.0104	0.0066
<b>SD (pendiente)</b>	0.001	0.003	0.001
<b>CV% (pendiente)</b>	20.5	27.4	18.7
<b>Intercepto</b>	-0.0063	0.0227	0.0089
<b>SD (intercepto)</b>	0.0163	0.0173	0.0056
<b>CV% (intercepto)</b>	-258.9	75.9	63.0
<b>Reproducibilidad (CV%)</b>	15.5	11.8	10.4
<b>Efectos matriz (%)</b>	+17	+49	+54
<b>LOD (ng/mL)</b>	10	5	2
<b>LLOQ (ng/mL)</b>	25	15	10
<b>Tiempo de retención</b>	1.30	1.96	2.51
<b>SD (tiempo de retención)</b>	0.0	0.02	0.0

La reproducibilidad del tiempo de retención fue aceptable para los tres compuestos. 3STANG presentó una mayor variabilidad en la reproducibilidad de su tiempo de retención, lo cual ha sido reportado anteriormente y se ha asociado al pH del extracto de la matriz de la muestra de orina (22).

El estudio realizado para determinar los efectos de la matriz mostró que los tres compuestos presentan el fenómeno de realce de iones (*ion enhancement*), lo cual es congruente con lo que se ha reportado previamente (17). Los efectos de matriz se estudiaron utilizando muestras de orina confirmadas negativas para EAA en lugar de orina filtrada u orina sintética. Dado que el método es tipo *dilute and shoot*, todos los



compuestos de la orina, incluyendo los esteroides endógenos, están presentes en la muestra, lo cual puede aumentar los efectos de matriz. Debido a que el TG está presente en la orina como una sustancia endógena, los efectos de matriz se calcularon tomando la cantidad de TG presente en una muestra a la cual se le agregó patrón de TG y restándole la cantidad de TG presente en una alícuota de la muestra sin adicionarle patrón. Este método se podría mejorar utilizando un patrón deuterado de TG (21). Otra opción que se ha descrito es el uso de un factor de dilución más alto para la muestra, lo cual teóricamente debería diluir también los efectos de matriz (34). El uso de un factor de dilución más alto también afectaría el LOD del ensayo, ya que la concentración del analito se disminuiría. Sin embargo, dado que el método descrito tiene LOD mucho más bajos que los puntos de corte, sería posible investigar el uso de un factor de dilución mayor en el futuro.

La selectividad se determinó agregando a muestras de orina los patrones de las moléculas de interés junto con patrones de una gran variedad de sustancias no relacionadas (Tabla 2). No se observaron picos de interés en las muestras analizadas. La mayoría de los compuestos no afectaron el área de los picos de los analitos de manera significativa (Tabla 5). A pesar de que en algunos casos la respuesta del analito aumentó en más de 20%, se debe tener en cuenta que los datos se obtuvieron de una única corrida. Es necesario estudiar la selectividad más a fondo para determinar si estos casos son valores atípicos o no, e investigar las posibles causas de este aumento en la respuesta.

Tabla 5. Selectividad del ensayo: porcentaje de error en la medición del analito de interés al cual se le han agregado diferentes posibles compuestos interferentes

<b>Grupo</b>	<b>TG (% error)</b>	<b>3STANG (% error)</b>	<b>NANm1G (% error)</b>
6-MAM	-15.3	22.3	18.4
Benzodiacepinas	14.9	12.2	-6.6
Opiáceos	-5.5	-17.3	13.6
Buprenorfina	12.6	21.7	-4.4
THC	-18.8	-10.8	0.3
Anfetaminas	30.6	-11.8	2.4
Multi-método	-11.3	0.3	-9.8
LSD	-3.7	23.9	3.5
Beta bloqueadores	31.6	-7.6	15.2

#### *Aplicación del método a muestras reales*

Se aplicó el método desarrollado en el presente estudio a 26 muestras de orina que previamente habían sido analizadas por un método confirmatorio para detectar EAA mediante GC-MS en un laboratorio externo. El LOD del método GC-MS es de 2 ng/ml para los tres analitos de interés. Trece de las muestras fueron confirmadas negativas y trece positivas por al menos un EAA mediante el método del laboratorio externo. De las muestras positivas, 8 de ellas resultaron positivas por al menos uno de los tres EAA que se incluyeron en el presente estudio (las muestras con T/E elevado se consideraron como positivas por TG). Sin embargo, el laboratorio externo únicamente reportó el tipo de EAA que se encontró en la muestra, y no el compuesto específico (por ejemplo, «positivo por nandrolona, 19-norandrostenediona, o metabolitos de 19-norandrostenediona»), ni tampoco estaba disponible la concentración a la cual se detectó cada compuesto.

La Tabla 6 muestra la correlación entre los resultados cualitativos del nuevo método LC-MS (utilizando un punto de corte de 50 ng/ml para cada compuesto) y el método GC-MS del laboratorio externo. El hecho de que los datos disponibles de los resultados del

laboratorio externo sean escasos dificulta la interpretación de estos datos. En el caso de TG, la interpretación se complica aún más debido a que el laboratorio externo clasifica un resultado positivo siguiendo los lineamientos de WADA: se reporta que una muestra tiene un resultado analítico adverso si su T/E es mayor o igual a seis. La testosterona es una sustancia endógena, así que no se puede considerar un resultado analítico adverso el simple hecho de que se detecte su presencia en una muestra. Sin embargo, debido a que el uso de testosterona exógena eleva el T/E, esta proporción se puede utilizar como marcador de abuso de este compuesto. Para el presente estudio no se contó con glucurónido de epitestosterona (EG), por lo que no fue posible calcular el TG/EG para las muestras. Sin embargo, al analizar las muestras por el método LC-MS y utilizar el filtro para la masa exacta de TG, se observó la presencia de un segundo pico con un tiempo de retención mayor al TG, lo cual sugiere fuertemente que podría tratarse de EG.

Tabla 6. Correlación de los resultados cualitativos obtenidos con el método de tamizaje mediante LC-MS y el método confirmatorio por GC-MS efectuado por un laboratorio externo. POS: resultado positivo, NEG: resultado negativo.

TG		LC-MS	
		POS	NEG
GC-MS	POS	2	2
	NEG	4	18

3STANG		LC-MS	
		POS	NEG
GC-MS	POS	1	3
	NEG	0	22

NANm1G		LC-MS	
		POS	NEG
GC-MS	POS	4	1
	NEG	0	21

Dos de las muestras que resultaron positivas por TG mediante el método GC-MS tuvieron un resultado negativo en el análisis LC-MS. Esto podría ocurrir si la muestra tuviera un T/E mayor a seis, pero una concentración de T menor al punto de corte del ensayo LC-MS. Otras cuatro muestras resultaron negativas en el ensayo GC-MS pero obtuvieron un resultado positivo mediante LC-MS. Es posible que estas muestras tengan

concentraciones endógenas de T por encima de 50 ng/mL, pero con un T/E menor a seis, por lo que se reportan como negativas en el ensayo GC-MS. Los resultados del análisis de T por ambos métodos fueron congruentes para las restantes 20 muestras.

Los resultados del análisis de 3STANG muestran que tres de las muestras resultaron positivas por GC-MS pero negativas por LC-MS. Estas discrepancias se podrían atribuir a que estos métodos tienen un LOD diferente. El método GC-MS del laboratorio externo se basa en las guías WADA por lo que tiene un LOD de 2 ng/ml para todos los analitos. Mientras tanto, el método LC-MS tiene un LOD de 5 ng/ml para 3STANG y un punto de corte de 50 ng/ml. Es posible que las tres muestras con resultado aparentemente discrepante tengan una concentración de 3STANG por encima del LOD del método GC-MS pero debajo del punto de corte del método LC-MS, causando que el primero reporte un resultado positivo y el segundo un resultado negativo. Los datos obtenidos mediante LC-MS apoyan esta teoría, ya que se detectó una concentración baja de 3STANG en dos de las muestras discrepantes (6 ng/ml y 9 ng/ml, respectivamente) utilizando en método LC-MS.

Una situación similar ocurrió con los resultados de NANm1G, ya que una de las muestras resultó positiva mediante el método GC-MS y negativa por LC-MS. A esta muestra se le detectó una concentración baja de NANm1G (7 ng/ml), la cual está por debajo del punto de corte del método LC-MS, pero por encima del LOD del método GC-MS.

También es importante notar que el ensayo GC-MS incluye un paso de hidrólisis durante la preparación de la muestra, con lo cual se elimina el glucurónido de los EAA. Existe la posibilidad de que este paso de hidrólisis también elimine el grupo conjugado de las moléculas que han sido conjugadas con un grupo sulfato, lo cual aumentaría la cantidad de analito disponible para detectar mediante el ensayo GC-MS al compararlo con el ensayo LC-MS.

A pesar de la dificultad que existe para sacar conclusiones de la información obtenida al comparar los resultados cualitativos de ambos métodos, los resultados del ensayo LC-MS se ven prometedores. Un método de tamizaje debe tener la capacidad de determinar eficientemente las muestras negativas, aun cuando esto aumente la posibilidad de reportar unos cuantos falsos positivos. El método LC-MS reportó una cierta cantidad de falsos negativos al compararlo con el método GC-MS, pero podía ser que esto fuera causado por el hecho de que los dos métodos que se compararon tenían puntos de corte diferentes, tal y como se discutió anteriormente. Se necesita llevar a cabo el análisis por el método LC-MS de una mayor cantidad de muestras cuyo resultado se haya confirmado por un método cuantitativo para poder determinar las causas de estos falsos negativos. El análisis de una mayor cantidad de muestras confirmadas también permitiría determinar si el punto de corte de 50 ng/ml para TG es apropiado, ya que parece ser que la concentración normal endógena de esta hormona de una parte importante de la población tamizada es mayor que este punto de corte. De ser así, podría ser necesario aumentar el punto de corte para disminuir la cantidad de falsos positivos que se reportan con el método LC-MS. También se podría disminuir los falsos positivos si se introduce el uso de EG, ya que esto permitiría el cálculo de TG/EG, el cual es un mejor indicador de la posible presencia de testosterona exógena que el uso de TG solamente.

Los instrumentos de alta resolución/masa exacta (HRAM) tales como aquellos basados en el Orbitrap son herramientas poderosas que pueden permitir la búsqueda de la presencia de compuestos específicos posterior al análisis, ya que el instrumento analiza y almacena un *scan* completo de las masas exactas. Estos datos se pueden revisar posteriormente para buscar compuestos específicos, incluso algunos que no hayan sido considerados al momento de realizar el análisis. La capacidad que tienen estos

instrumentos para resolver compuestos isobáricos con errores de masa en el rango de ppm permite la identificación presuntiva de un compuesto a raíz de su masa exacta.

Esta habilidad se probó al analizar las muestras que fueron reportadas como positivas por el método GC-MS, ya que algunas de estas muestras se reportaron como positivas por uno o varios EAA diferentes a los tres esteroides que se incluyeron en el presente estudio. Mediante el uso del software Xcalibur, se calculó la masa exacta de estos EAA para los cuales no se contaba con patrones, y se buscó su presencia en los archivos de resultados de las muestras. En la mayoría de los casos, fue posible detectar un pico con la masa exacta correspondiente al EAA que se había reportado como positivo mediante el método GC-MS. Sin embargo, al no contar con los patrones correspondientes, no fue posible determinar si el tiempo de retención era el correcto para así poder confirmar la presencia de estos EAA mediante LC-MS.

Con el fin de obtener más información acerca de estos compuestos que se detectaron buscando la masa exacta de los glucurónidos de EAA, se llevó a cabo un experimento de hidrólisis. Una alícuota de cada muestra se hidrolizó con  $\beta$ -glucuronidasa y fue analizada por el método LC-MS en conjunto con una segunda alícuota de cada muestra sin hidrolizar. Al comparar los resultados se observó que, en la mayoría de los casos, los picos de las masas exactas correspondientes a los glucurónidos de EAA se detectaron en la alícuota sin hidrolizar, pero desaparecieron en la alícuota hidrolizada y, en su lugar, apareció un pico con la masa exacta correspondiente al EAA sin glucurónido. Este fenómeno se confirmó en el caso de la trenbolona, ya que para el estudio se contó con el patrón de su metabolito de fase I, epitrenbolona (TRENm). En este caso, en la muestra hidrolizada el pico con la masa exacta del glucurónido de epitrenbolona (TRENmG) disminuyó considerablemente, y apareció un pico con la masa exacta de TRENm con el mismo tiempo de retención que el patrón de TRENm (Figura 1).

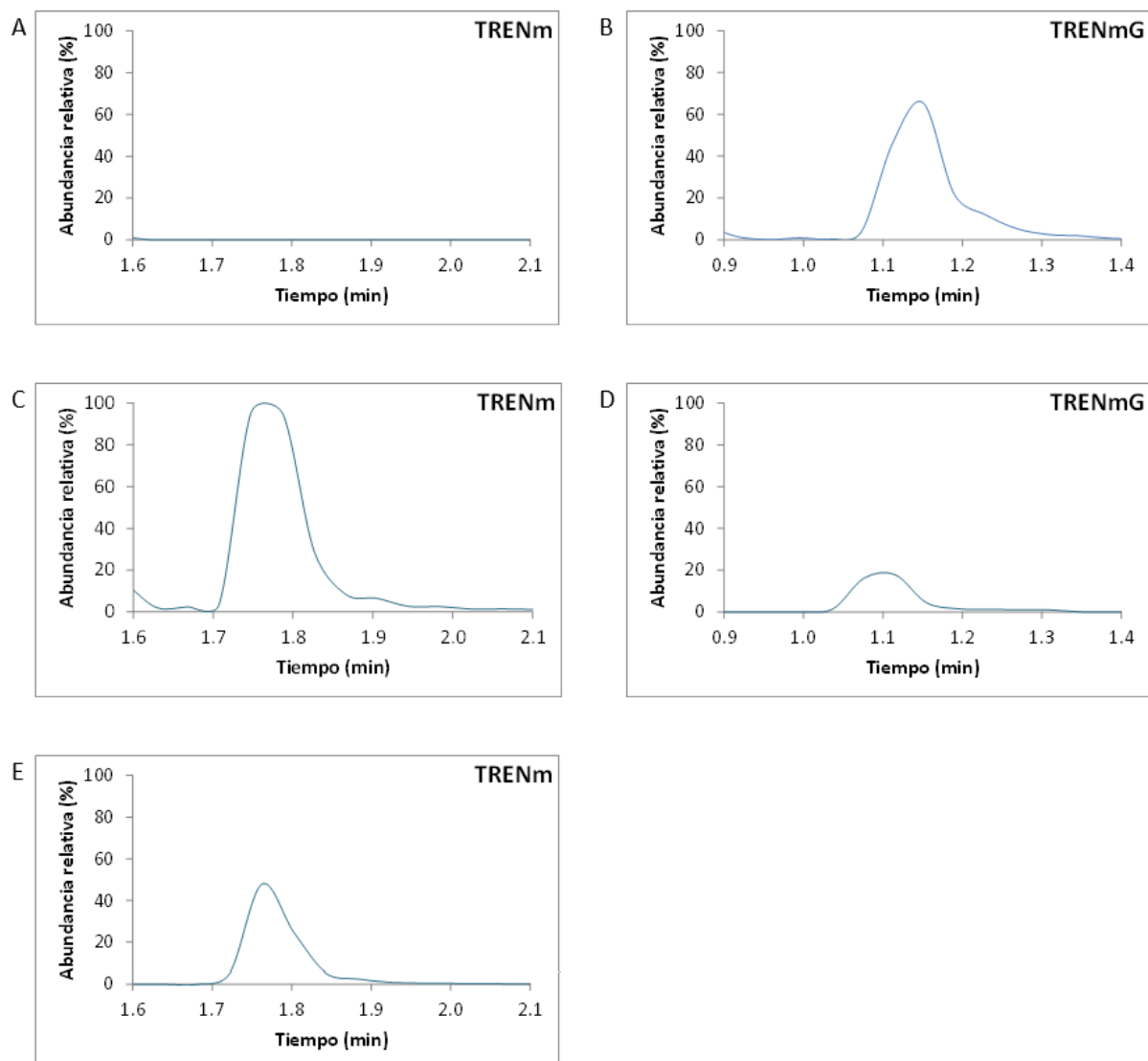
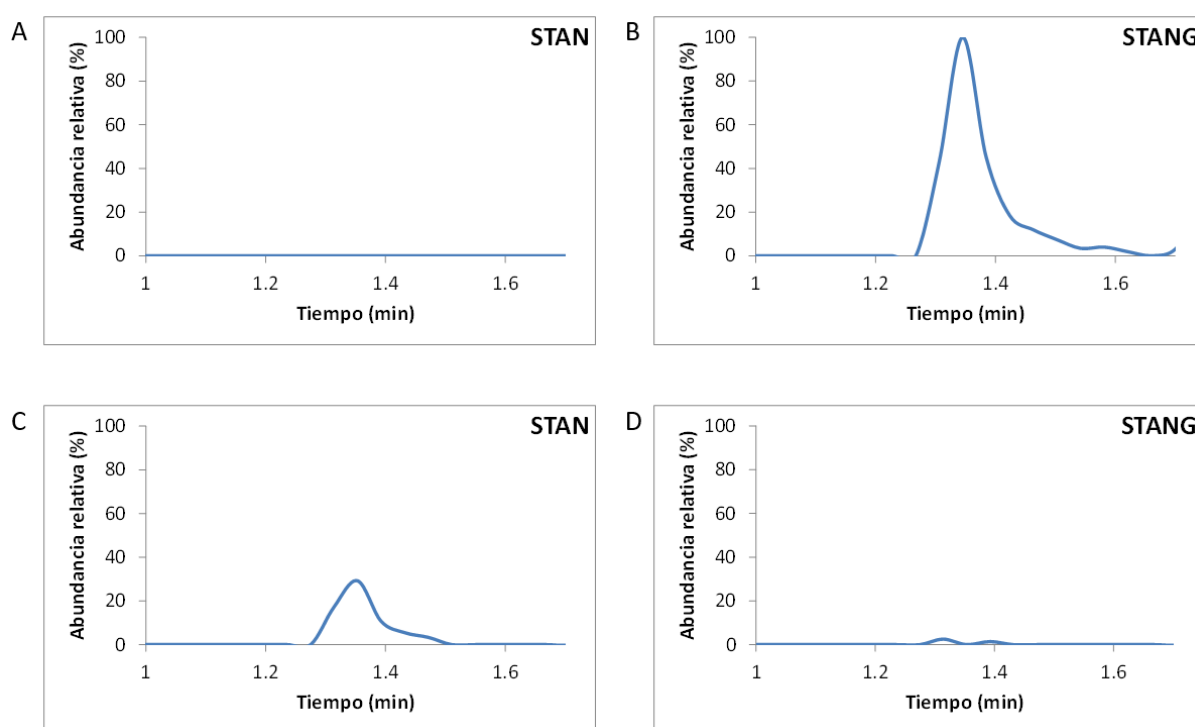


Figura 1. Cromatogramas obtenidos de la masa exacta del ion  $[M+H]^+$  de TRENm ( $m/z$  271.1963) y TRENmG ( $m/z$  447.2013) en muestras sin hidrolizar (A y B), muestras hidrolizadas (C y D) y un patrón de TRENm (E), utilizando una tolerancia de 5 ppm

Adicionalmente, se estudió la fragmentación de los glucurónidos de EAA para determinar si era posible detectar un fragmento con una pérdida de  $m/z$  176, correspondiente a la masa del grupo glucurónido, lo cual sugeriría fuertemente que se removió este grupo de la molécula. Se realizó una búsqueda de la masa exacta de los glucurónidos de EAA en los archivos de datos de los *scan* completos sin fragmentación, y paralelamente se buscó la masa exacta del EAA sin glucurónido en el archivo de datos del *scan* completo  $MS^2$

con el HCD encendido. En la mayoría de las muestras positivas se encontró un pico con la masa exacta correspondiente al EAA sin glucurónido en el archivo de datos respectivo, lo cual sugiere que los picos detectados en los  $m/z$  especificados eran verdaderamente glucurónidos de EAA o un glucurónido de una especie isobárica (Figura 2). Se obtuvieron resultados similares de los experimentos de hidrólisis y fragmentación para compuestos que son isobáricos con los metabolitos de otros EAA tales como drostanolona y boldenona, lo cual sugiere que el método se podría aplicar a un rango más amplio de EAA.

Figura 2. Cromatogramas de la masa exacta del ion  $[M+H]^+$  de STAN ( $m/z$  329.2587) y STANG (STANG,  $m/z$  505.2908) en experimentos MS sencillo (A y B) y  $MS^2$  con HCD en 35 (C y D), utilizando una tolerancia de 5 ppm



Algunas de las muestras positivas presentaron más de un pico para una masa exacta específica, lo cual podría llevar a interpretaciones ambiguas si no se cuenta con patrones de los analitos. Esto es especialmente problemático al analizar esteroides en orina, ya que esta matriz tiene una gran cantidad de esteroides endógenos y muchos de ellos son isobáricos, difiriendo entre sí por la ubicación específica de dobles enlaces o grupos



metilos, o bien por la disposición espacial de la molécula. Sin embargo, la detección de especies isobáricas también puede proveer información adicional acerca de la administración exógena de EAA, ya que el metabolismo de un esteroide en específico generalmente va a producir varios metabolitos isobáricos. Un ejemplo de esto es el estanozolol, el cual es metabolizado a estanozolol-O-glucurónido, estanozolol-N-glucurónido y 17-epiestanozolol-N-glucurónido, entre otros. Estos tres metabolitos son isobáricos y se ha demostrado su presencia en orina después de la administración de una dosis de estanozolol (35). Lo mismo fue observado al analizar con el método LC-MS muestras que habían sido confirmadas positivas por estanozolol con el método GC-MS, detectándose tres picos diferentes al aplicar el filtro de masa exacta de STANG. También aparecen tres picos homólogos en los mismos tiempos de retención cuando se aplica el filtro de masas exacta de STAN al archivo de datos del *scan* completo con MS<sup>2</sup>. Esto sugiere fuertemente que los tres picos observados son metabolitos de estanozolol, y posiblemente son los tres metabolitos que han sido descritos previamente (Figura 3).

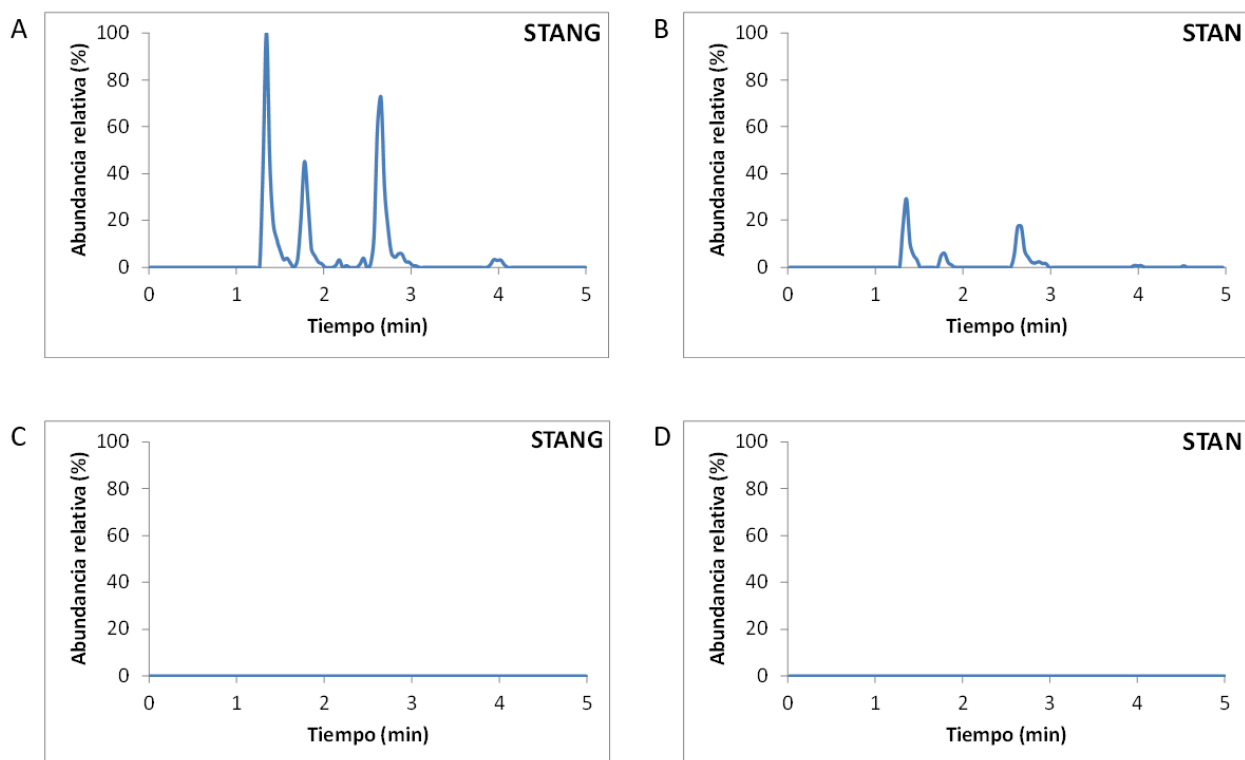


Figura 3. Cromatogramas de la masa exacta del ion  $[M+H]^+$  de STANG ( $m/z$  505.2908) en el experimento MS sencillo y STAN ( $m/z$  329.2587) en el experimento MS<sup>2</sup> (HCD = 35) de una muestra confirmada positiva (A y B, respectivamente), y una muestra negativa (C y D, respectivamente), utilizando una tolerancia de 5 ppm

Resulta importante probar el método con una mayor variedad de metabolitos fase II de EAA, ya que la poca disponibilidad de este tipo de compuestos para el presente estudio limitó el número de analitos que se pudieron incluir. La inclusión de EG como analito es de suma importancia para detectar el abuso de testosterona y permitiría limitar la cantidad de falsos positivos.

### Conflictos de interés

Los autores no presentan conflictos de interés.

### Referencias

1. Harris D, Lucy C. *Quantitative chemical analysis*. 10th ed. New York: Freeman Custom Publishing; 2019.

2. Uttam G, Hammett-Stabler C. *Clinical applications of mass spectrometry: methods and protocols*. New York, N.Y: Humana Press; 2010.
3. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*. 2008;154(3):502–21.
4. Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, et al. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med*. 1996; 335(1):1–7.
5. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, et al. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281(6):1172–81.
6. Melchert RB, Welder AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Med Sci Sports Exerc*. 1995; 27(9):1252–62.
7. See KL, See M, Gluud C. Liver pathology associated with the use of anabolic-androgenic steroids. *Liver*. 1992; 12(2):73–9.
8. Bronson FH. Effects of prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 53(2):329–34.
9. Kanayama G, Kean J, Hudson JI, Pope HG. Cognitive deficits in long-term anabolic-androgenic steroid users. *Drug Alcohol Depend*. 2013; 130(1-3):208–14.
10. Kanayama G, Hudson JI, Pope HG. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: a looming public health concern? *Drug Alcohol Depend*. 2008; 98(1-2):1–12.
11. Parkinson AB, Evans NA. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(4): 644–51.
12. Penning R, Veldstra JL, Daamen AP, Olivier B, Verster JC. Drugs of abuse, driving and traffic safety. *Curr Drug Abuse Rev*. 2010; 3(1):23–32.
13. Humphrey KR, Decker KP, Goldberg L, Pope HG, Gutman J, Green G. Anabolic Steroid Use and Abuse by Police Officers: Policy and Prevention. *Police Chief*. 2008; 75(6):66.
14. Honour JW. Mass spectrometry for steroids. *Ann Clin Biochem*. 2014;51(Pt 3): 309–11.
15. Schänzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem*. 1996 Jul; 42(7):1001–20.
16. Badoud F, Grata E, Perrenoud L, Avois L, Saugy M, Rudaz S, et al. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry I. *Screening analysis. J Chromatogr A*. 2009;1216(20):4423–33.
17. Balcells G, Pozo OJ, Esquivel A, Kotronoulas A, Joglar J, Segura J, et al. Screening for anabolic steroids in sports: Analytical strategy based on the detection of phase I and phase II intact urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2015;1389:65–75.
18. Hauser B, Schulz D, Boesch C, Deschner T. Measuring urinary testosterone levels of the great apes-problems with enzymatic hydrolysis using Helix pomatia juice. *Gen Comp Endocrinol*. 2008;158(1):77–86.
19. Jeon BW, Yoo HH, Jeong ES, Kim HJ, Jin C, Kim DH, et al. LC-ESI/MS/MS method for rapid screening and confirmation of 44 exogenous anabolic steroids in human urine. *Anal Bioanal Chem*. 2011; 401(4):1353–63.
20. Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Delbeke FT. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in

- urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(4):1209–24.
21. Pozo OJ, Van Eenoo P, Van Thuyne W, Deventer K, Delbeke FT. Direct quantification of steroid glucuronides in human urine by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008;1183(1-2):108–18.
  22. Tudela E, Deventer K, Van Eenoo P. Sensitive detection of 3'-hydroxy-stanozolol glucuronide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013;1292:195–200.
  23. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. 4th ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
  24. Tudela E, Deventer K, Geldof L, Van Eenoo P. Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2015; 7(2):95–108.
  25. Hintikka L, Kuuranne T, Leinonen A, Thevis M, Schänzer W, Halket J, et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of glucuronide-conjugated anabolic steroid metabolites: method validation and interlaboratory comparison. *J Mass Spectrom.* 2008; 43(7):965–73.
  26. World Anti-Doping Agency. *Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances.* Disponible en: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2019mrpl>. 2019. Accedido 03/07/2020.
  27. Cho S-H, Lee J, Choi MH, Lee W-Y, Chung BC. Determination of urinary androgen glucuronides by capillary electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2009; 23(4):426–33.
  28. Moon J-Y, Kwon W, Suh S, Cheong JC, In MK, Chung BC, et al. Reference ranges for urinary levels of testosterone and epitestosterone, which may reveal gonadal function, in a Korean male population. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;140:100–5.
  29. Borts DJ, Bowers LD. Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000; 35(1):50–61.
  30. Baume N, Avois L, Schweizer C, Cardis C, Dvorak J, Cauderay M, et al. [13C]Nandrolone excretion in trained athletes: interindividual variability in metabolism. *Clin Chem.* 2004; 50(2):355–64.
  31. Choo H-YP, Kwon O-S, Park J. Quantitative Determination of Stanozolol and Its Metabolite in Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol.* 1990;14(2):109–12.
  32. Le Bizec B, Bryand F, Gaudin I, Monteau F, Poulain F, Andre F. Endogenous nandrolone metabolites in human urine: preliminary results to discriminate between endogenous and exogenous origin. *Steroids.* 2002; 67(2):105–10.
  33. Schänzer W, Opfermann G, Donike M. Metabolism of stanozolol: Identification and synthesis of urinary metabolites. *J Steroid Biochem.* 1990; 36(1-2):153–74.
  34. Deventer K, Pozo OJ, Verstraete AG, Van Eenoo P. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *TrAC Trends Anal Chem.* 2014;55:1–13.
  35. Schänzer W, Guddat S, Thomas A, Opfermann G, Geyer H, Thevis M. Expanding analytical possibilities concerning the detection of stanozolol misuse by means of

high resolution/high accuracy mass spectrometric detection of stanozolol glucuronides in human sports drug testing. *Drug Test Anal.* 2013; 5(11-12):810–8.