



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Determinación de la relación
Testosterona/Epitestosterona en orina humana por
Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

JÓSE MANUEL LÓPEZ CHÁVEZ



MÉXICO, D.F.

2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Silvia de Jesús Mendoza Arellano
Vocal: Víctor Manuel Ugalde Saldivar
Secretario: Miguel Ángel Delgadillo Marín
Primer suplente: Adrian De Santiago Zarate
Segundo suplente: José Guadalupe De la Rosa Canales

El presente trabajo se desarrolló en la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte. Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje.

Asesor:

cDr. Miguel Angel Delgadillo Marin

Supervisor Técnico:

M. en C. Antonio Hernández Martínez

Sustentante:

José Manuel López Chávez

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Dios:

Por permitirme llegar hasta esta etapa de la vida y concluir un objetivo más en mi preparación académica.

A mi asesor cDr. Miguel Ángel Delgadillo Marín, mi supervisor técnico M en C. Antonio Hernández Martínez, a la Dr. Evangelina Camacho Frías y a los maestros que fueron jurado:

Por invertir su tiempo en las revisiones y correcciones de mí trabajo durante el tiempo que dediqué a su desarrollo ya que con su ayuda, enriquecieron mi tesis.

A Javier García García:

Mi gran amigo que invirtió en mi su tiempo, experiencia y paciencia para enseñarme el funcionamiento y mantenimiento de los equipos de Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas, por explicarme el fundamento de varios métodos, por orientarme para resolver los problemas que se presentaron en el desarrollo de mi trabajo y por estar al pendiente de mi trabajo.

Pero sobre todo por sus consejos de vida, palabras de apoyo, solidaridad y demás gestos de bondad y amistad que me obsequió.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, en especial a: Maricela Domínguez Rodríguez, Denisse Reyes García, Ricardo Pavel Santiago Membrillo, Karina Mercado Soberanes, Ana Laura Pérez Pacheco, Daniel Nicolás Cóna y Rodrigo Vián Carrión:

Por su apoyo, consejos, capacitación y paciencia durante mi proceso de preparación el tiempo que trabajé en el laboratorio y por todos los detalles que todos tuvieron conmigo.

Al Director del laboratorio nacional de control y prevención del dopaje Dr. Benjamín Velasco Bejarano y a la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte:

Por haberme dado la oportunidad y las facilidades de realizar mi proyecto de tesis en las instalaciones del laboratorio.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a:

Mis amados padres:

Jovita Chávez Gudiño y Manuel López Hernández que se han esforzado enormemente para que mis hermanas y yo tengamos una licenciatura y una vida mejor de la que ellos tuvieron, por su amor y por apoyarnos siempre en todos los aspectos de la vida y ayudarnos a levantarnos cuando lo necesitábamos. Espero siempre hacerlos sentirse orgullosos.

Lisbeth López Chávez:

Mi hermana mayor quien ha sido para mí un ejemplo a seguir y que me ha apoyado y aconsejado cuando la he necesitado y que se convirtió en una meta a superar.

Andrea Yasmín López Chávez:

Mi hermana menor a quien espero ser un ejemplo y una meta a superar en todos los aspectos y que me ha hecho esforzarme en mis estudios para poder ayudarla cuando lo necesite.

Mis primos Agustín y Alejandro Hernández Chávez:

Con quienes compartí gran parte de mi infancia y adolescencia y que me cuidaron como su hermano menor, por compartir sus gustos, intereses, consejos y vivencias conmigo y por ser un gran apoyo y ejemplo de vida.

ÍNDICE

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN	1
---------------------	---

CAPITULO 2

ANTECEDENTES	3
---------------------	---

2.1 Historia de los juegos olímpicos	3
--------------------------------------	---

2.1.1 Los juegos olímpicos y la religión	3
--	---

2.1.2 Ceremonias de victoria	4
------------------------------	---

2.1.3 Atletas	4
---------------	---

2.1.4 Eventos deportivos	4
--------------------------	---

2.2 Historia de los juegos olímpicos actuales	5
---	---

2.2.1 El Comité Olímpico Internacional	6
--	---

2.3 Historia del dopaje	6
-------------------------	---

2.3.1 Los primeros intentos de dopaje	7
---------------------------------------	---

2.3.2 Los comité olímpicos en el dopaje	8
---	---

2.4 Regulaciones actuales en el deporte	9
---	---

2.4.1 La Agencia Mundial Antidopaje	9
-------------------------------------	---

2.4.2 Programa mundial antidopaje	9
-----------------------------------	---

2.4.3 El código mundial antidopaje	10
------------------------------------	----

2.4.4 Definición de dopaje conforme a la Agencia Mundial Antidopaje.	10
--	----

2.5 Los estándares internacionales	11
------------------------------------	----

2.5.1 La lista de sustancias y métodos prohibidos (2012)	11
--	----

Capítulo 3	Pág
QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES	15
3.1 Estructura de los esteroides	15
3.2 Biosíntesis de las hormonas suprarrenales	17
3.2.1 Los esteroides androgénicos	18
3.3 Efectos negativos del uso de esteroides	21
3.4 Importancia del citocromo P-450 en el metabolismo de xenobióticos	23
3.4.1 Reacciones y regularización enzimática del CYP	24
3.5 Metabolismo de la testosterona	24
3.6 Reacciones de eliminación	25
3.6.1 Glucuronidación	26
Capítulo 4	
TECNICAS ANALÍTICAS	28
4.1 La Cromatografía	28
4.2 Cromatografía de gases	28
4.3 Espectrometría de masas	29
Capítulo 5	
MÉTODOS INSTRUMENTALES UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE ESTEROIDES	32
5.1 Inmunoensayos	32
5.2 Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC/MS)	33
5.3 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia(HPLC)	34
5.3.1 Componentes del HPLC	36

	Pág
5.4 Principales métodos de cuantificación	37
5.4.1 Calibración absoluta	37
5.4.2 Calibración relativa	38
Capítulo 6	
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	39
6.1 Extracción en fase sólida	40
6.2 Extracción líquido-líquido	41
6.3 Hidrólisis	41
6.4 Derivatización	41
Capítulo 7	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
Capítulo 8	
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	44
8.1 Hipótesis	44
8.2 Objetivo general	44
8.2.1 Objetivos particulares	44
Capítulo 9	
MATERIAL Y EQUIPOS	45
9.1 Material	45
9.2 Reactivos y disoluciones	45

9.3 Equipos	46
9.3.1 HPLC	46
9.3.2 GC/MS	46
Capítulo 10	
METODOLOGÍA	
10.1 Verificación de la concentración de las disoluciones patrón de testosterona deuteradas y epitestosterona deuteradas (utilizadas como estándares internos para la determinación de la relación testosterona/epitestosterona) por HPLC con detector de Ultravioleta (HPLC-UV)	47
10.1.1 Método instrumental para el análisis de HPLC-UV	47
10.2 Preparación de las muestras para el procedimiento de rutina	48
10.2.1 Preparación de las muestras para el procedimiento de confirmación	48
10.2.2 Diagrama de flujo de la preparación de las muestras para el procedimiento de confirmación	49
10.3 Método de análisis instrumental para GC/MS	50
Capítulo 11	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
11.1 Verificación de disoluciones de testosterona y epitestosterona usados como estándar interno (EI) en la cuantificación de dichas sustancias	51
11.2 Optimización del método de extracción	52
11.2.1 Extracción líquido-líquido	52
11.2.2 Extracción en fase sólida	54
11.3 Validación del método propuesto	56

11.4 Análisis de muestras reales	60
Capítulo 12	
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	67

1. INTRODUCCIÓN

Los esteroides androgénicos anabólicos son uno de los grupos de compuestos más ampliamente usados para mejorar el desempeño del deportista. Este tipo de compuestos son derivados de la hormona masculina testosterona, sintetizada en los años 30's y que a partir de entonces se han obtenido, mediante síntesis orgánica, una gran variedad de compuestos derivados.^[1]

Los esteroides están clasificados dentro de un grupo de sustancias prohibidas por las organizaciones deportivas Internacionales, así como por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en inglés), quienes se encargan de realizar la lucha contra el dopaje. En este sentido, la WADA publica una lista de sustancias prohibidas conocida "La Lista Prohibida". Los esteroides anabólicos no fueron incluidos en la primer lista de sustancias prohibidas publicada por el Comité Olímpico Internacional (COI) en 1967. Sin embargo, hicieron su aparición por primera vez como un nuevo grupo en 1976, antes de los juegos olímpicos de Montreal. Desde entonces, los esteroides anabólicos son el grupo de compuestos más detectados en los análisis de dopaje.^[2]

Dentro del grupo de las sustancias anabólicas, la sustancia más ampliamente utilizada con fines de dopaje continúa siendo el esteroide endógeno testosterona (T), según lo reportado por la WADA.^[2]

Las estrategias de control de dopaje aplican, en primer lugar, una metodología general a cada muestra. En el caso de la testosterona, ya que es un esteroide endógeno que se puede suministrar de forma exógena (versiones sintéticas de la T), se ha establecido que si la relación de la concentración testosterona/epitestosterona (T/E) es superior a 4, posiblemente el atleta haya consumido testosterona exógena y, de acuerdo a la WADA, se debe corroborar el valor obtenido de esta relación de concentración mediante un método de análisis más específico y sensible para este analito.^{[3][4]}

Los laboratorios de control del dopaje reconocidos por la WADA a nivel mundial, tienen implementados sus propios métodos y técnicas de identificación de las sustancias consideradas prohibidas por dicha agencia.

El laboratorio nacional de control y prevención del dopaje de la comisión nacional de cultura física y deporte (CONADE), está en proceso de acreditación por la WADA por lo que es importante la realización de validación de los métodos analíticos de identificación de las sustancias dopantes para de esta forma, ser el único laboratorio a nivel nacional que cuente con la certificación y acreditación para la realización de controles antidopaje en deportistas de alto rendimiento por medio de la realización de pruebas validadas y así poder competir con los diferentes laboratorios especializados en el tema del dopaje.

Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es la implementación, optimización y validación, de un método de confirmación para la determinación de la relación T/E en muestras de orina humana para el control de dopaje en atletas, utilizando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).

2. ANTECEDENTES

2.1 Historia de los juegos olímpicos

Según los registros históricos, los primeros juegos olímpicos de la antigüedad se remontan al 776 a.C. Se dedicaban a los dioses del Olimpo y se organizaron en la antigua Olimpia, que se encuentra en la parte occidental del Peloponeso que según la mitología griega, es la isla de Pelops, el fundador de los Juegos Olímpicos. ^[5]

Una sola carrera a pie alrededor de unos 200 metros a lo largo del estadio era el único evento deportivo hasta la Olimpiada XV, cuando otros tipos de deportes comenzaron a abrirse paso: La lucha y el pentatlón en 708 a.C.; el boxeo en el 688 a.C. y las carreras de carros en el año 680 a.C. ^[6]

2.1.1 Los juegos olímpicos y la religión

Los juegos olímpicos estaban estrechamente vinculados a las fiestas religiosas del culto de Zeus, pero tenían un carácter laico y su objetivo era mostrar las cualidades físicas y la evolución de las actuaciones realizadas por los jóvenes, así como fomentar las buenas relaciones entre las ciudades de Grecia. Según los especialistas, los juegos olímpicos deben su pureza y su importancia a la religión. ^[5]

En el año 349 a.C. el emperador romano Teodosio el Grande, un devoto cristiano, decretó fin a los juegos olímpicos y la celebración de los dioses griegos. Dichos juegos habían durado más de un millar de años, pero resurgieron de nuevo en el siglo XIX ^[6]

2.1.2 Ceremonias de victoria

El vencedor olímpico recibía sus primeros premios inmediatamente después de la competencia. Tras el anuncio del nombre del ganador por el heraldo, un juez griego colocaba una rama de palma en sus manos, mientras los espectadores gritaban y arrojaban flores a él. Además, el vencedor portaba cintas rojas atadas en la cabeza y las manos en señal de victoria.

La ceremonia oficial tenía lugar el último día de los juegos, en el elevado vestíbulo del templo de Zeus. El heraldo anunciaba el nombre del campeón olímpico, el nombre de su padre, y su patria. Por último, se colocaba la corona de olivo sagrado en la cabeza del ganador.

2.1.3 Atletas

A través de los 12 siglos de los juegos olímpicos, muchos atletas compitieron en el estadio y en el hipódromo de la zona de la antigua Olimpia. Todos los ciudadanos varones griegos libres tenían derecho a participar, independientemente de su condición social. Solo las mujeres solteras podían participar.

2.1.4 Eventos deportivos

Los antiguos juegos olímpicos fueron inicialmente:

- Pentatlón que incluía el atletismo, salto de longitud y lanzamiento de disco.
- Lucha.
- Boxeo.
- Pancraccio (combinación entre lucha y boxeo).
- Eventos ecuestres que incluían las carreras de caballos y carreras de carros. ^[5]

2.2 Historia de los juegos olímpicos actuales

Al Barón de Coubertin, de origen francés, quien dedicó su vida a la educación física, se le da crédito por el restablecimiento de los juegos olímpicos. Sin embargo, a través de los años hubo más de 40 actividades que han jugado fuera de tema olímpico. Se cree que de Coubertin fue testigo de los juegos del festival olímpico en el estadio de Chelsea en Londres: solo había atletas amateurs y medallas en lugar de premios en efectivo. Con el paso del tiempo, los atletas pasaron de ser aficionados a profesionales, sobre todo con la llegada de atletas patrocinados por el estado y también por varias federaciones internacionales que han elegido a los deportistas que podían participar, con la aprobación del Comité Olímpico Internacional (COI). El barón de Coubertin organizó en 1889 el Congreso de Educación Física en París, y en 1892 empezó a forjar la idea de un renacimiento de los Juegos Olímpicos, pero atrajo poca atención. A pesar de repetidos rechazos, no sólo de sus propios compatriotas, sino de los británicos y estadounidenses. El 23 de junio de 1894 presidió una reunión de 79 delegados en representación de 12 países, que por unanimidad votaron a favor de la restauración de los juegos olímpicos.

Presionado por Coubertin, el COI decidió que en 1896, Atenas fuera la sede y él mismo el rey de Grecia abrió los primeros Juegos Olímpicos modernos en 1896. Para los eventos tradicionales de pista y campo, que incluyen el maratón y el decatón, una serie de deportes se han añadido de modo que hoy en día hay varios deportes en el programa de los juegos de verano.

Los juegos eran estrictamente para los hombres. Fue hasta el año 1900 en los Juegos de Verano de París, cuando por primera vez hubo participación de mujeres. Con la ayuda del COI, ha aumentado significativamente la participación de mujeres. Los Juegos Olímpicos de Invierno fueron inaugurados en 1924 en Chamonix, Francia. Los Juegos de Invierno son mucho más pequeños, se limitan a los deportes que se desarrollan sobre hielo o nieve. ^[6]

2.2.1 El Comité Olímpico Internacional

El Comité Olímpico Internacional (COI) es la autoridad suprema del movimiento olímpico. Actúa como un intermediario para la colaboración entre todas las partes de la familia olímpica, de los Comités Olímpicos Nacionales, las Federaciones Deportivas Internacionales, los atletas, los Comités Organizadores de los Juegos Olímpicos, organismos de las Naciones Unidas. El COI guía al éxito a través de una amplia gama de programas y proyectos. Asegura la celebración regular de los Juegos Olímpicos y alienta la promoción de los valores olímpicos. ^[7]

2.3 Historia del dopaje

La palabra “Dopaje” debe su origen a dos teorías. Una de ellas se relaciona con la palabra holandesa *doop*, que originalmente significa “líquido espeso utilizado como lubricante o alimento”. La otra considera que su raíz deriva de un dialecto hablado por los aborígenes del suroeste de África y luego transmitido al idioma bóer, y significa “licor fuerte típico tomado como estimulante durante los cultos de la población de Kafa”.

El fin de siglo XIX, marcado por el desarrollo de las carreras ciclistas e hípcas daría a la palabra “*Doping*” el sentido preciso en que hoy la entendemos. La palabra es al parecer mencionada por primera vez en 1889 en Estados Unidos Americanos significando “mezcla de opio y narcóticos administrada a los caballos”. Para algunos también podría existir una relación con la DOPA y la dopamina.

2.3.1 Los primeros intentos de dopaje

Fue en los juegos Olímpicos de Italia 1961 que se experimentó el control antidopaje por primera vez, pero la primera legislación para combatir el abuso de fármacos en el deporte se introdujo hasta 1963 en Francia y dos años después en Bélgica e Italia.

En la olimpiada de Tokio se realizó de forma extraoficial cierto control antidopaje, detectándose un positivo ante el que nada pudo hacerse por no haber reglamentación.

Los controles antidopaje de los atletas empezaron en 1968 en los juegos olímpicos de México donde se dió el primer caso de dopaje, cuando el pentatleta sueco Hans-Gunnar Liljenwall dio positivo a alcohol. ^[6]

En los últimos veinte años, los controles antidopaje se han convertido en una rutina practicada no sólo a nivel de juegos olímpicos, sino durante las competencias organizadas por la mayoría de las federaciones nacionales e internacionales. ^[8]

En la **Tabla 2.1** se muestra un resumen de los casos de dopaje más significativos en el deporte.

Tabla 2.1 Eventos más significativos en la historia del dopaje

Hace siglos.	Los incas consumían un masticado de coca (Erythroxilon spp), que ayuda a combatir la fatiga; por otro lado los guerreros nórdicos, comieron hongos que contienen muscarina antes de la batalla.
Antigüos deportistas olímpicos.	El pan remojado en el opio, las setas, la estricnina.
Principios de 1900	Nadadores y ciclistas tomando estimulantes.

La Segunda Guerra Mundial	Anfetaminas para contrarrestar la fatiga entre los soldados y pilotos.
1950	Los esteroides anabólicos androgénicos fueron introducidos en el dopaje; Síntesis de Dianabol inspirada en la gente en el deporte.
1959	Estudios clásicos controlados muestran que las anfetaminas mejoran el rendimiento en disciplinas como nadar y correr a distancia.
1960 Olimpiadas	Primera víctima mortal de dopaje documentada-anfetamina inducida por golpe de calor.
1964	El Comité Olímpico Internacional (COI) prohíbe el dopaje de los atletas olímpicos.
1966–72	Alemania del Este establece un sistema secreto nacional de la hormona de dopaje de los hombres y las mujeres con metandrostenolona y el estado fabrica oral-turinabol.
1967	Muerte por dopaje durante el Tour de Francia, la COI adopta una política de análisis de drogas.
1970	Los diuréticos son utilizados para alcanzar el "derecho" de peso y para diluir la orina antes de la prueba de drogas.
1973	El campeón olímpico Connolly testimonia el uso conjunto de los esteroides anabólicos entre los atletas a EE.UU. ante el comité del Senado.
1974	Los esteroides anabólicos androgénicos (EAA) se incluyen en la lista de dopaje.
Hasta 1980	Anfetaminas, la cocaína, la cafeína y estroscina dominan los casos de dopaje.
1980	El uso de esteroides anabólicos androgénicos se extendió a muchos deportes.
1980	β-bloqueantes son utilizados para mejorar el tiro, aparece un mal uso de la hormona del crecimiento.
1988	Primera medalla de oro olímpica en atletismo despojada por dopaje con EAA.
2000	Tetrahydrogestrinona (THG o "el claro"), un EAA diseñado para escapar a la detección de análisis de dopaje, es desarrollado.
2007	Marion Jones reconoce haber tomado "el claro", una droga que mejora el rendimiento, le son retiradas sus medallas.

Tomado de ^[9]

2.3.2 Los comités olímpicos en el dopaje

El COI, las Federaciones Internacionales y los Comités Olímpicos Nacionales conservan sus competencias y responsabilidades respectivas para aplicar los reglamentos en materia de dopaje, según sus propios procedimientos y en cooperación con la Agencia Internacional Independiente Antidopaje. En

consecuencia, las decisiones de primera instancia dependen exclusivamente de la competencia de las Federaciones Internacionales o de los Comités Olímpicos Nacionales y dentro de los Juegos Olímpicos, del COI. ^[8]

2.4 Regulaciones actuales en el deporte

2.4.1 La Agencia Mundial Antidopaje

La primera conferencia mundial sobre el dopaje en el deporte celebrada en Lausana, Suiza, duró del 2 hasta 4 febrero de 1999, la cual produjo la declaración de Lausana sobre el dopaje en el deporte. Este documento establece la creación de una asociación internacional antidopaje que sea operativo, para los juegos de la XXVII Olimpiada en Sydney en el año 2000.

De conformidad con los términos de la declaración de Lausana, se creó la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, por sus siglas en inglés) el 10 de noviembre de 1999, en Lausana, y actualmente promueve y coordina la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel Internacional. La WADA se creó como una fundación de la iniciativa de la COI, con el apoyo y la participación de las organizaciones intergubernamentales, gobiernos, autoridades públicas y otros organismos públicos y privados que luchan contra el dopaje en el deporte.

La agencia es de carácter independiente y está integrada por representantes de la igualdad del movimiento olímpico y las autoridades públicas. ^[10]

2.4.2 Programa mundial antidopaje

La WADA coordina el desarrollo y la implementación del programa mundial antidopaje, el cual fue aprobado en un congreso internacional en Helsinki en 2002. Este está constituido por el código mundial antidopaje, Los estándares Internacionales y los documentos técnicos. ^[10]

2.4.3 El código mundial antidopaje

En el código mundial antidopaje se establecen las normas y principios antidopaje, el papel de la educación y la investigación en la lucha contra el dopaje, define las reglas y responsabilidades de las partes involucradas y proporciona las directrices para la implementación, modificación y el cumplimiento de los puntos establecidos en el código. Así mismo se amplía la definición de dopaje.

Con respecto al análisis de las muestras, el código establece que el análisis se debe realizar en un laboratorio aprobado por la WADA. ^[10]

2.4.4 Definición de dopaje conforme a la Agencia Mundial Antidopaje

El doping es definido como la violación, a una o más normas antidoping, según lo dispuesto en el artículo 2.1 al artículo 2.8 del código mundial anti-dopaje. Existen ocho violaciones al código, sin embargo, solo trataremos la violación al artículo 2.1 del código.

El artículo 2.1 habla sobre la presencia de una sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta y menciona que: “corresponde a cada deportista asegurarse de que ninguna sustancia prohibida se introduzca en su cuerpo”. Los atletas son responsables de que cualquier sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores estén presentes en sus muestras.

En consecuencia con esto, no es necesario que la intención, culpa, negligencia o el desconocimiento por parte del deportista con el fin de establecer una violación al código de antidopaje, en especial del artículo 2.1 ^[11]

2.5 Los Estándares Internacionales

El código mundial antidopaje trabaja en conjunción con cinco estándares internacionales con el objetivo de armonizar diferentes aspectos técnicos y operativos del antidopaje, llamados: La lista prohibida, pruebas, laboratorios, excepciones de uso terapéutico (TUE) y, la protección de la privacidad e información personal.

Estos estándares han sido sujetos a largas consultas entre las partes interesadas de la WADA y son mandatorios para la armonización y cumplimiento del Código.^[12]

2.5.1 La lista de sustancias y métodos prohibidos (2012)

Desde el 2004, como un mandato del código, la WADA es responsable de la preparación y publicación anual de la lista prohibida, la cual es una piedra angular del código y un componente clave para la armonización, identificando las sustancias y métodos prohibidos en competición, fuera de competencia y en deportes en particular.^[13] la lista prohibida se renueva anualmente en octubre de cada año y entra en vigor el 1º de enero del año siguiente.^[11]

La lista prohibida se divide en:

➤ Sustancias prohibidas durante y fuera de competencia

I.S1. Agentes anabólicos.

II.S2. Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias relacionadas.

III.S3. β – 2 Agonistas.

IV.S4. Hormonas antagonistas y moduladores.

V.S5. Diuréticos y otros agentes enmascarantes.

I. Solo en competencia:

II. S6. Estimulantes

III. S7. Narcóticos.

IV. S8. Cannabinoides.

V. S9. Glucocorticoides.

➤ Métodos Prohibidos dentro y fuera de competencia:

I. M1. Acarreadores de oxígeno.

II. M2. Manipulación física o química.

III. M3. Doping genético.

➤ Sustancias Prohibidas en deportes específicos:

I. P1. Alcohol.

II. P2. β – Bloqueadores.

En relación a los agentes anabólicos la lista comprende:

1. Esteroides anabolizantes androgénicos (EAA)

a. EAA exógenos*, entre ellos:

1-androstendiol (5 α -androst-1-en-3 β ,17 β -diol); **1-androstendiona** (5 α -androst-1-en-3,17-diona); **bolandiol** (19-norandrostendiol); **bolasterona**; **boldenona**; **boldiona** (androsta-1,4-dieno-3,17-diona); **calusterona**; **clotebol**; **danazol** (17 α -etinil-17 β -hidroxiandrost-4-eno[2,3-d]isoxazol); **dehidroclorometiltestosterona** (4-cloro-17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-ona); **desoximetiltestosterona** (17 α -metil-5 α -androst-2-en-17 β -ol); **drostanolona**; **estanozolol**; **estenbolona**; **etilestrenol** (19-nor-17 α -pregna-4-en-17-ol); **fluoximesterona**; **formebolona**;

furazabol (17 β -hidroxi-17 α -metil-5 α -androstano[2,3-c]-furazan); **gestrinona**; **4-hidroxitestosterona** (4,17 β -dihidroxiandrost-4-en-3-ona); **mestanolona**; **mesterolona**; **metandienona**; (17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-ona); **metandriol**; **metasterona** (2 α ,17 α -dimetil-5 α -androstan-3-ona-17 β -ol); **metenolona**; **metildienolona** (17 β -hidroxi-17 α -metilestra-4,9-dien-3-ona); **metil-1-testosterona** (17 β -hidroxi-17 α -metil-5 α -androst-1-en-3-ona); **metilnortestosterona** (17 β -hidroxi-17 α -metilestr-4-en-3-ona); **metiltestosterona**; **metribolona** (metiltrienolona, 17 β -hidroxi-17 α -metilestra-4,9,11-trien-3-ona); **mibolerona**; **nandrolona**; **19-norandrostendiona** (ester-4-en-3,17-diona); **norboletona**; **norclostebol**; **noretandrolona**; **oxabolona**; **oxandrolona**; **oximesterona**; **oximetolona**; **prostanazol** (17 β -hidroxi-5 α -androstano[3,2-c]pyrazol); **quimbolona**; **1-testosterona** (17 β -hidroxi-5 α -androst-1-en-3-ona); **tetrahydrogestrinona** (18 α -homo-pregna-4,9,11-trien-17 β -ol-3-ona); **trembolona** y otras sustancias con estructura química o efectos biológicos similares.

b. EAA endógenos administrados exógenamente:**

androstendiol (androst-5-en-3 β ,17 β -diol); **androstendiona** (androst-4-en-3,17-diona); **dihidrotestosterona** (17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona); **prasterona** (dehidroepiandrosterona, DHEA); **testosterona**,

y los siguientes metabolitos e isómeros:

5 α -androstan-3 α ,17 α -diol; **5 α -androstan-3 α ,17 β -diol**; **5 α -androstan-3 β ,17 α -diol**; **5 α -androstan-3 β ,17 β -diol**; **androst-4-en-3 α ,17 α -diol**; **androst-4-en-3 α ,17 β -diol**; **androst-4-en-3 β ,17 α -diol**; **androst-5-en-3 α ,17 α -diol**; **androst-5-en-3 α ,17 β -diol**; **androst-5-en-3 β ,17 α -diol**; **4-androstendiol** (androst-4-en-3 β ,17 β -diol); **5-androstendiona** (androst-5-en-3,17-diona);

epidihidrotestosterona; Epiestosterona; 3 α -hidroxi-5 α -androstano-17-ona; 3 β -hidroxi-5 α -androstano-17-ona; 19-norandrosteroona; 19-noretioolanoona.

2. Otros agentes anabolizantes, que incluyen pero no se limitan a:

Clenbuterol, moduladores selectivos del receptor de andrógeno (SARMs), tibolona, zeranol, zilpaterol.

Para efectos de esta sección:

* “exógeno” se refiere a una sustancia que, por lo común, el cuerpo no puede producir de forma natural.

** “endógeno” se refiere a una sustancia que el cuerpo puede producir de forma natural.

3. QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES

3.1 Estructura de los esteroides

Los esteroides anabólicos pueden ser considerados derivados sintéticos de la hormona masculina testosterona (T). La estructura general de este tipo de sustancias está basada en el núcleo perhidrociclofenantreno **figura No. 3.1a**. Los átomos de carbono son numerados como se muestra en la **figura No. 3.1b**. La mayoría de los esteroides anabólicos y sus metabolitos presentan un grupo hidroxilo o un grupo ceto en las posiciones C₃ y C₁₇. Adicional a esto, presentan un doble enlace entre C₄-C₅ y dos grupos metilo en las posiciones C₁₃ y C₁₀, a estos metilos les corresponde las posiciones C₁₈ y C₁₉ respectivamente. Como un ejemplo se muestra la estructura de la testosterona.^[13]

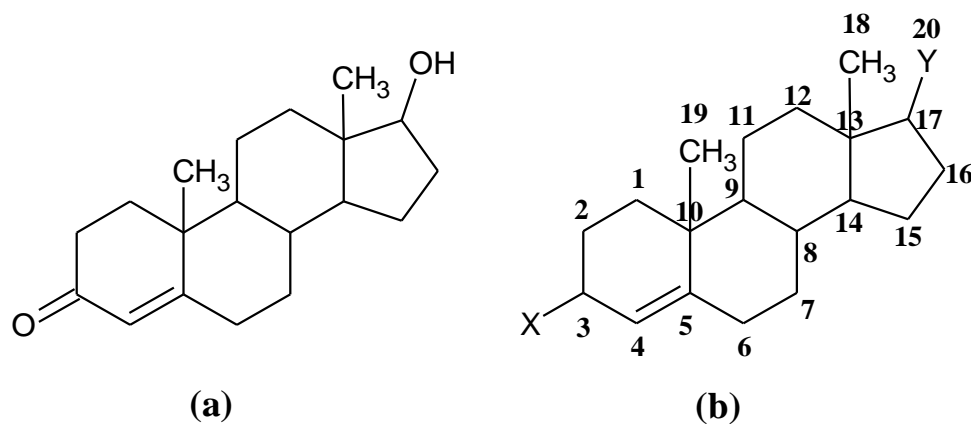


Figura No.3.1: (a) Estructura de la testosterona) (b) Estructura general de los esteroides anabólicos.

La testosterona es el principal esteroide andrógono biológicamente activo que se encuentra en la sangre de los seres humanos, sin embargo, su concentración en mujeres es en promedio veinte veces menor que en el hombre. ^[1] Los efectos anabólicos de la testosterona buscados por los deportistas consisten en un aumento en la síntesis de proteínas del músculo, mismas que agilizan el rápido desarrollo de masa muscular en un menor tiempo. También se produce un aumento en la síntesis de adenosintrifosfato (ATP), fuente de energía necesaria para la contracción muscular. De esta forma se aumenta la cantidad de energía disponible, la intensidad y duración del entrenamiento.

El colesterol es el precursor de las cinco clases principales de hormonas esteroideas: *progestágenos*, *glucocorticoides*, *mineralocorticoides*, *andrógenos* y *estrógenos* (figura 3.2). ^[13]

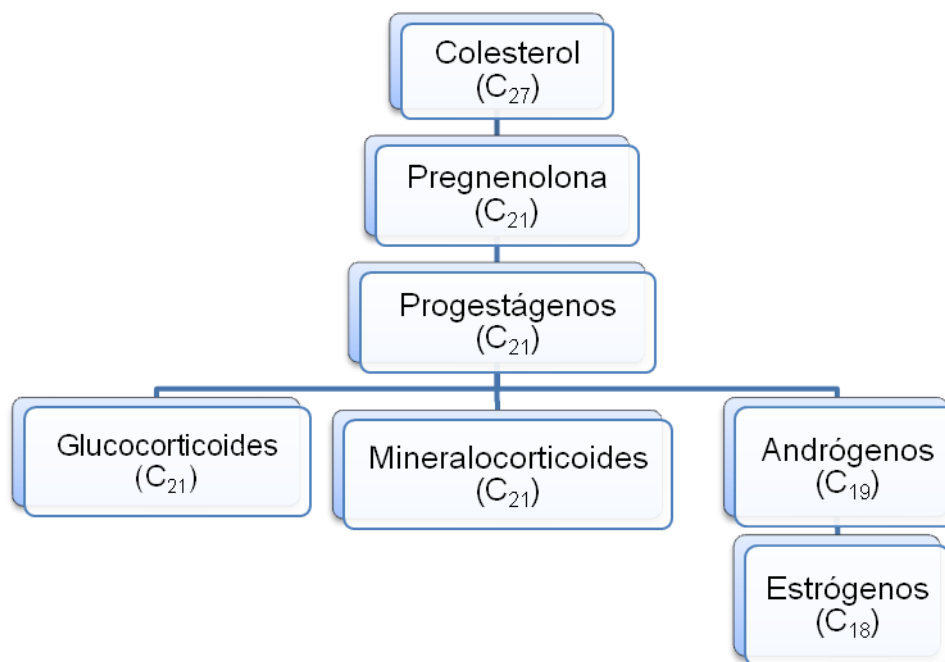


Figura 3.2.- Relaciones biosintéticas entre los tipos de hormonas esteroideas y el colesterol. ^[13]

Estas hormonas son poderosas moléculas señales que regulan multitud de funciones del organismo.

La *progesterona*, un progestágeno, prepara los revestimientos del útero para la implantación del óvulo fecundado. También es esencial para el mantenimiento del embarazo.

Los **andrógenos**, (como la testosterona) son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de tipo masculino, mientras que los *estrógenos* (como la estrona) son necesarios para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios del tipo femenino.

Los **glucocorticoides** (como el cortisol) promueven la gluconeogénesis y la formación del glucógeno, aumentan la degradación de grasas y proteínas e inhiben la respuesta inflamatoria.

Los **mineralocorticoides** (principalmente aldosterona) actúan sobre los túbulos distales del riñón donde incrementan la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ y H^+ , lo que provoca un aumento de volumen y la presión sanguíneos.

Los principales lugares de síntesis de estos tipos de hormonas son: el cuerpo lúteo para los progestágenos, los ovarios para los estrógenos, los testículos para los andrógenos; y la corteza suprarrenal para los glucocorticoides y los mineralocorticoides. ^[13]

3.2 Biosíntesis de las hormonas suprarrenales

El acetato es el precursor primario para la síntesis de todos los esteroides. La vía implica la síntesis inicial del colesterol, el cual, después de una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones, es convertido en

Δ^5 -pregnenolona. La pregnenolona es el esteroide del cual derivan todas las demás hormonas esteroides (**figura 3.3**)

La pregnenolona es convertida en el citosol a progesterona por una deshidrogenasa o en 17-hidroxiprogesterona por una 17-hidroxilasa específica. Como se muestra en la **figura 3.3** estos dos esteroides son convertidos en toda una gama de hormonas activas en el retículo endoplásmico y las mitocondrias mediante oxigenasas y deshidrogenadas específicas que requieren de oxígeno molecular y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El resultado de estas reacciones enzimáticas combinadas es la adición de grupos hidroxilo o cetónicos en las posiciones C₁₁, C₁₇ o C₂₁.^[14]

3.2.1 Los esteroides androgénicos

Andrógeno (esteroides C₁₉) es el nombre genérico para cualquier compuesto, natural o sintético, que estimula o controla el desarrollo y mantiene las características masculinas.

La testosterona, principal hormona masculina, es sintetizada por la actividad de las células intersticiales (células de Leyding) del testículo a partir del colesterol pasando por la pregnenolona, progesterona e hidroxiprogesterona, la cual entonces es convertida en el cetoesteroide C₁₉, androstenediona, el precursor inmediato de la testosterona (**figura 3.3**)^[14]

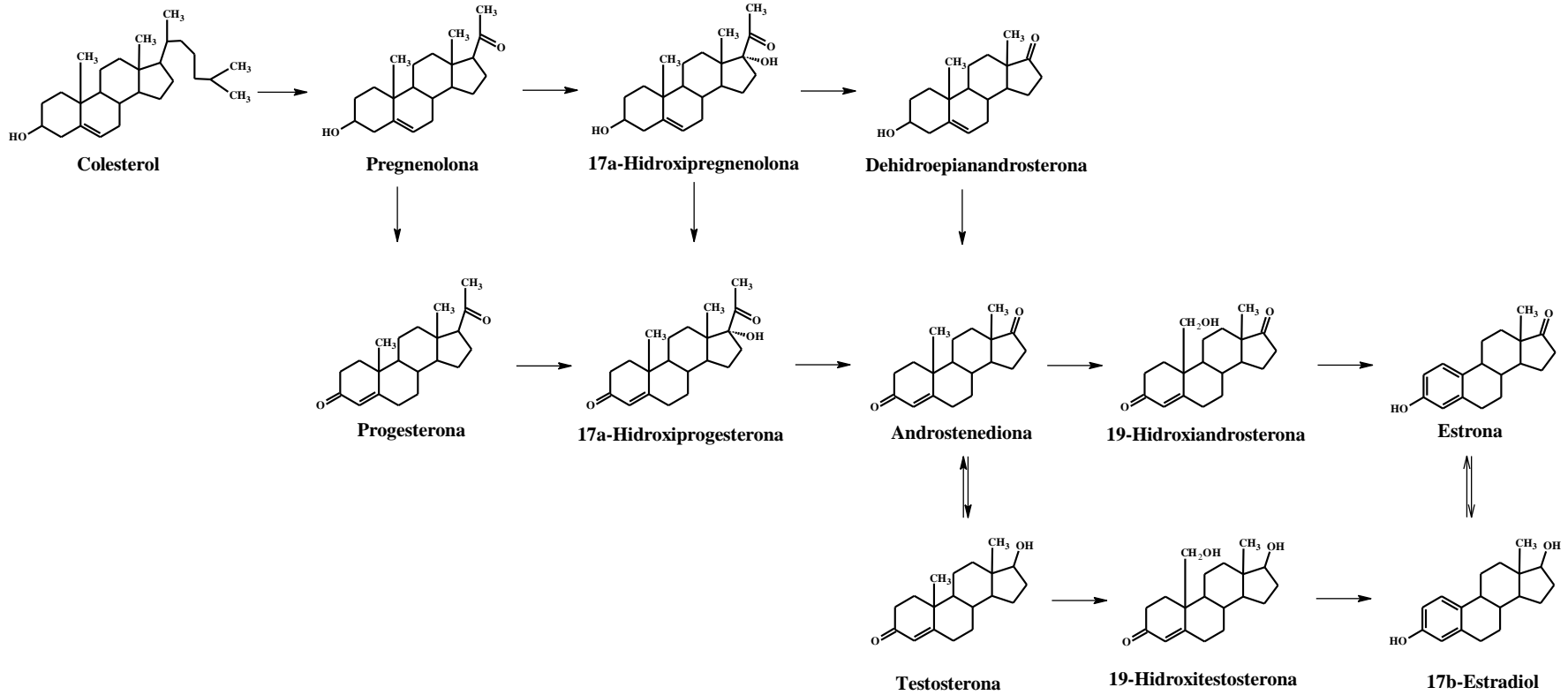


Figura 3.3: Biosíntesis de los andrógenos y estrógenos. ^[14]

La testosterona es responsable de las características sexuales secundarias del hombre las cuales son: vello facial y corporal, voz gruesa, desarrollo del órgano sexual y tendencia agresiva. Posee propiedades anabólicas y androgénicas. Las anabólicas aportan mejoras en el desarrollo muscular y en la fuerza, es por eso que algunos deportistas consumen estas sustancias buscando mejoras en su desempeño atlético.

Los esteroides androgénicos anabolizantes (EAA) son compuestos sintéticos, los cuales son similares estructuralmente a la hormona sexual masculina, la testosterona, por lo que son definidos como derivados sintéticos de dicha molécula.

La principal razón de su desarrollo, fue con el objetivo de producir una sustancia, que incluyera solamente el alto efecto anabólico de ésta y que al mismo tiempo, excluyera los efectos androgénicos de la misma. Debido a esto, los nuevos compuestos desarrollados se distinguen porque algunos tienen propiedades más anabólicas que androgénicas y/o viceversa.

Para determinar si un esteroide es más anabólico o androgénico, la misma testosterona sirve como parámetro: Los esteroides que son menos anabólicos que la testosterona son llamados “esteroides anabólicos” mientras que los esteroides que son igual o más androgénicos que la testosterona son llamados “esteroides androgénicos”.

Aparte de los efectos mencionados, también se produce un aumento en la síntesis de fosfato de creatina, un compuesto nitrogenado esencial para la formación de ATP, la fuente básica de energía que permite la contracción muscular, cuanto mayor sea la reserva de fosfato de creatina, mayor será la reserva de energía disponible para el entrenamiento y más rápida será la recuperación, con lo cual se podrá elevar la intensidad y duración del entrenamiento.

También se produce un significativo aumento del volumen sanguíneo que puede llegar hasta el 20 %, y puede ser responsable de un mayor aporte de nutrientes y elementos reparadores durante el reposo.

Otros efectos benéficos para el deportista son:

- Aumento en la retención de nitrógeno, produciéndose lo que se llama balance positivo de nitrógeno y que es sinónimo de crecimiento muscular.
- Aumento de las reservas energéticas en forma de glucógeno, que es esencial para el desarrollo de actividades que exigen grandes esfuerzos de corta duración.
- Disminución de los procesos catabólicos que son consecuencia de la hormona llamada cortisol y que el cuerpo produce en forma natural para mantener el equilibrio celular.
- Aumento en la síntesis de proteínas del músculo actina y miosina

Todo esto se traduce en un estado anabólico aumentado y por lo tanto se potencia el desarrollo muscular. ^[15]

3.3 Efectos negativos del uso de esteroides

En condiciones normales, el organismo sintetiza testosterona en el testículo y de aquí la hormona produce modificaciones en los tejidos periféricos y da la forma de los caracteres sexuales secundarios. Cuando la concentración de testosterona en la sangre alcanza cierta cantidad, el testículo detiene la producción de dicha hormona. Si el consumo de esteroides es prolongado, la falta de actividad de síntesis y secreción del testículo va atrofiando sus funciones hasta llegar a la esterilidad. La esterilidad producida por el consumo de anabolizantes no siempre es reversible; todo depende de las dosis, del tipo de esteroides consumidos y del tiempo que dure el consumo.

Otra de las consecuencias del consumo de esteroides anabolizantes es que éstos no distinguen el músculo que va a crecer. Por lo que también el músculo cardiaco y el miocardio se hipertrofian. Son varios los efectos indeseables de los esteroides anabolizantes y están promovidos fundamentalmente por su acción androgénica. Podemos mencionar los siguientes:

- **Retención de agua.** Muy común en la mayoría de los casos y potencialmente peligrosa si alcanza cierto grado, ya que es causa de hipertensión. Para contrarrestar dicho efecto, se acostumbra a tomar un diurético.
- **Acné.** Es frecuente entre los usuarios con predisposición a padecer dicho trastorno. En ocasiones, se ven afectadas amplias áreas del pecho y la espalda.
- **Ginecomastia.** Se trata del crecimiento anormal de las glándulas mamarias en el varón y que es consecuencia de altos niveles de estrógenos. Dicha elevación se debe al consumo de esteroides que son susceptibles de transformarse en estrógeno dentro del organismo.
- **Hepatitis colostática.** Inflamación del hígado con alteración de la función hepática que se refleja por un aumento de las enzimas hepáticas llamadas transaminasas. En un estadio inicial, los síntomas son poco frecuentes, pero con el tiempo puede producirse ictericia, cansancio elevado y pérdida de peso.
- **Agrandamiento de la próstata.** El uso continuo de esteroides se ha asociado al agrandamiento benigno de la próstata que en principio no trae mayores complicaciones, pero puede ocurrir la formación de una neoplasia prostática.
- **Calvicie prematura.** Los esteroides que poseen un alto ritmo de conversión en dihidrotestosterona y puede darse tanto en hombres como en mujeres de forma irreversible, en especial si se posee una especial predisposición a la calvicie.

➤ **Virilización.** En el caso de las mujeres puede producirse un aumento del vello facial y corporal, acentuación de los rasgos masculinos y modificación anatómica de la laringe, con lo que la voz se endurecerá. Estos efectos pueden resultar permanentes aunque se suspenda la administración de esteroides. ^[16]

3.4 Importancia del citocromo P-450 (CYP) en el metabolismo de xenobióticos

Mediante el catabolismo, fundamentalmente a nivel hepático, los esteroides experimentan transformaciones químicas que los inactivan e incrementan su solubilidad en agua facilitando su excreción renal.^[15] El sistema del citocromo P450, se localiza principalmente en el retículo endoplasmático del hígado e intestino delgado de los mamíferos, es también importante para la desintoxicación de sustancias extrañas (xenobióticos), mediante un metabolismo oxidativo. Una de las funciones más relevantes del citocromo P450 en los seres humanos es su papel en el metabolismo de los fármacos. ^[17]

3.4.1. Reacciones y regulación enzimática del CYP

Entre las oxidaciones catalizadas por el P-450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, *N*- y *S*-oxidaciones, epoxidaciones, *O*-, *N*- y *S*-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones. Otra de las características más significativas del P-450 es su inducibilidad por los propios xenobióticos.

Las primeras alusiones en este sentido se remontan a los años 50-60, al observarse que pacientes que eran tratados con ciertos fármacos desarrollaban una tolerancia al mismo de manera que eran necesarias dosis crecientes para producir el mismo efecto. Este hecho fue constatado en estudios con animales de experimentación y se comprobó la existencia de tipos o grupos de inductores que

actuaban de forma selectiva sobre diferentes enzimas P-450.^[18] En la **figura 3.4** se muestran ejemplos de las reacciones catalizadas por el citocromo P-450 en la testosterona.^[19]

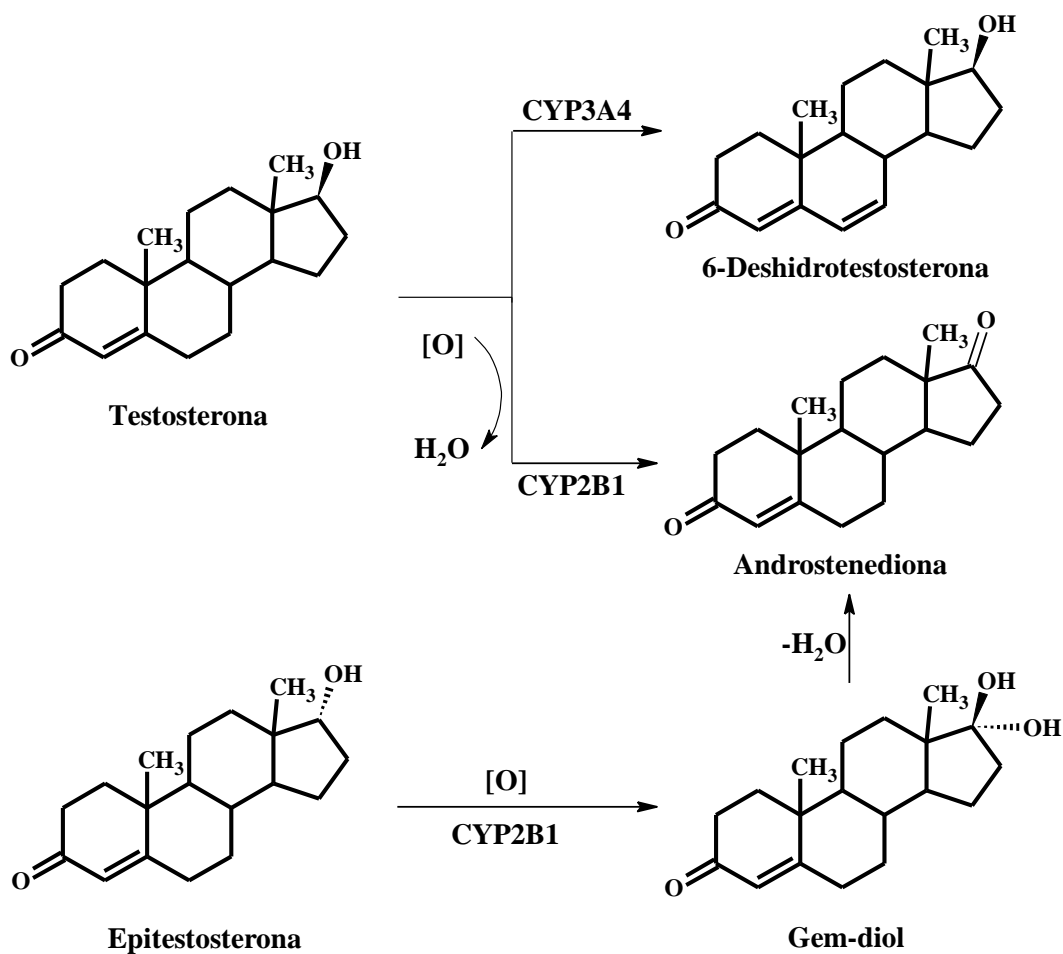


Figura 3.4. Reacciones de deshidrogenación catalizadas por el citocromo P-450 sobre la testosterona.^[19]

3.5 Metabolismo de la testosterona

La testosterona tiende a eliminarse del organismo por medio de la formación de metabolitos más polares mediante la conjugación con el ácido glucurónico y la formación de sulfatos solubles en agua, reacción que es llevada a cabo por el citocromo P450. (**figura 3.5**).

Este citocromo cataliza hidroxilaciones de numerosos sustratos mediante un conjunto de reacciones en los que las sustancias potencialmente tóxicas y normalmente hidrófobas se convierten en derivados hidrosolubles menos tóxicos que pueden excretarse con mayor facilidad.^[20]

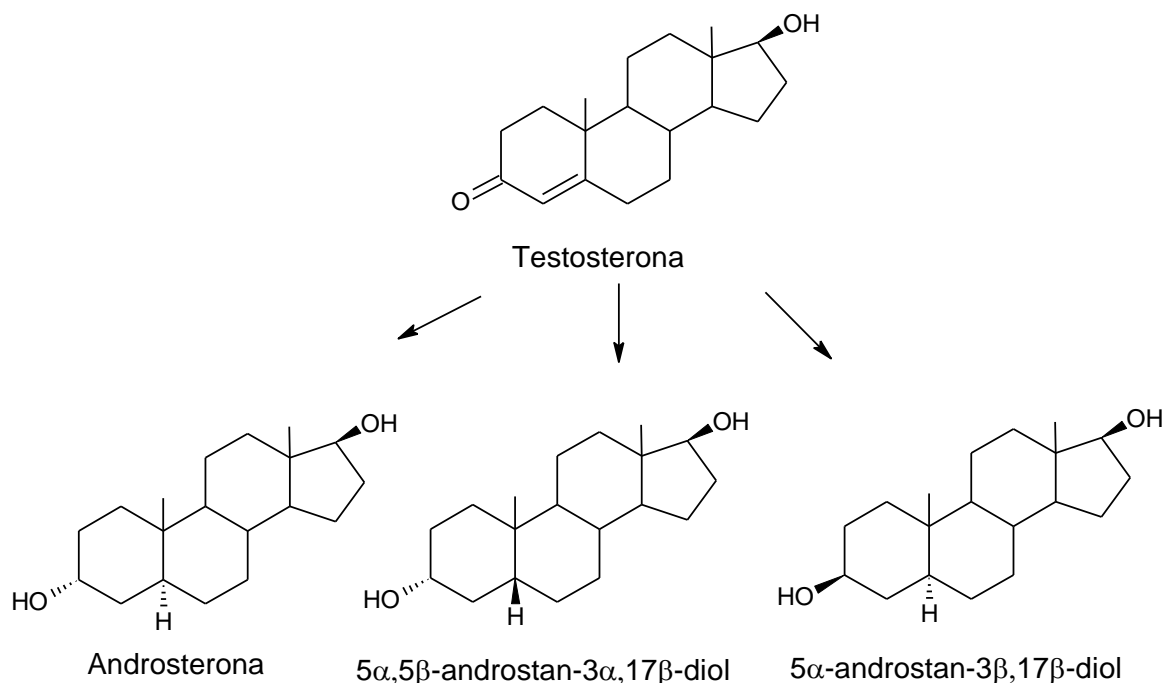


Figura 3.5.- Metabolismo de la testosterona.^[20]

3.6 Reacciones de eliminación

Las reacciones consisten en agregar un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de las reacciones de la fase I, o bien, a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación. El resultado que se logra con estas reacciones es un gran incremento de la solubilidad en agua del xenobiótico.^[21] Las biotransformaciones oxidantes, reductoras e hidrolíticas que sufren los xenobióticos en los procesos de fase I, no necesariamente producen metabolitos hidrofílicos.

En muchos casos, un grupo de enzimas complementarias de tipo transferasas completan ese trabajo posteriormente y catalizan las llamadas reacciones de fase II, en las que se unen pequeñas moléculas polares endógenas como ácido glucurónico, sulfato, glicina, etcétera, a los metabolitos producidos en la fase I, para formar productos más hidrosolubles que se excretan. Algunas de estas reacciones sin embargo, como la acetilación y la metilación, no conducen a un aumento de la hidrosolubilidad, pero sirven para suprimir o atenuar una determinada acción biológica. ^[22]

3.6.1 Glucuronidación

La reacción consiste en unir el glucurónido a un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del xenobiótico. La enzima que cataliza la reacción es la uridina difosfato (UDP) glucuronil transferasa y el donador del grupo polar es el ácido UDP glucurónico. La enzima se encuentra localizada en el retículo endoplásmico, a diferencia de las otras enzimas de la fase II que se localizan en el citosol. Los compuestos glucuronidados son muy solubles en agua por lo que su excreción es por medio de la orina y bilis.

Existe un número muy grande de xenobióticos que son sustrato de esta enzima en donde se encuentran los esteroides.

Esta ruta de eliminación es la más importante para la mayoría de los productos endógenos. La glucosa 1-fosfato, que se origina en el metabolismo de los carbohidratos, se activa a uridina-difosfato- α -D-glucosa (UDPG) y posteriormente se oxida por deshidrogenasas para dar el ácido uridina-difosfato- α -D-glucurónico (UDPGA) o ácido glucurónico "activo". Las transferasas catalizan su reacción con una gran variedad de grupos funcionales nucleofílicos. La formación de glucurónidos implica la inversión del centro anomérico α del ácido glucurónico a la configuración β . En la **figura 3.6** se señalan las reacciones de glucuronidación y sulfonación catalizadas por la UDPGA y la fosfoadenosil fostafo (PAPS) respectivamente. ^[22]

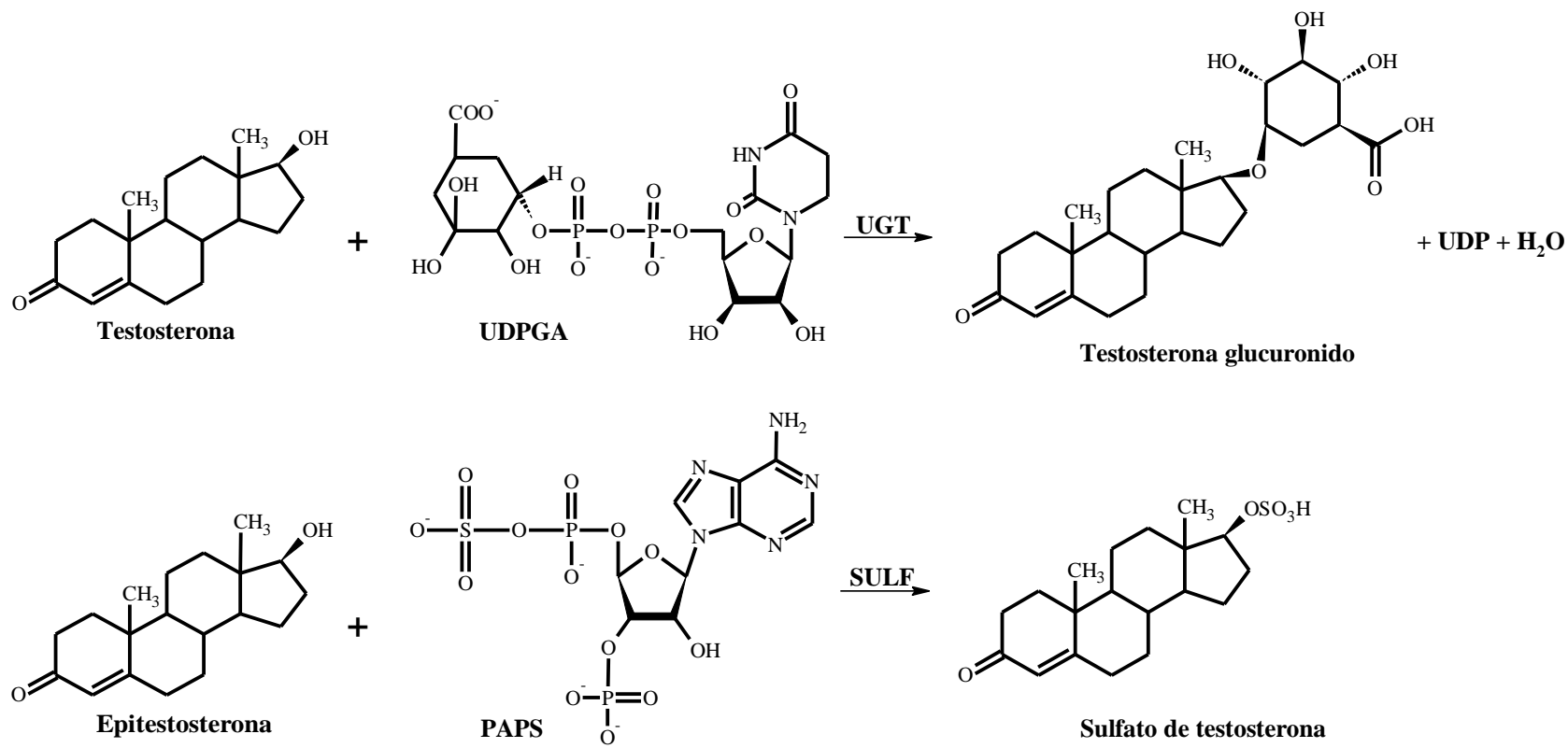


Figura 3.6. Reacciones de glucuronidación y sulfonación catalizadas por la UDPGA y PAPS respectivamente. ^[22]

4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.1 La cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. En 1906 el botánico ruso Tswett utilizó la cromatografía en columna para separar extractos vegetales coloreados, y a este proceso le dió el nombre de cromatografía. Pero el mayor desarrollo se produce en 1930 con Lederer cuando consigue separar los colorantes de la yema de huevo. ^[23]

4.2 Cromatografía de gases

En cromatografía de gases se hace pasar el analito en gas o vapor a través de la columna, arrastrado por una fase móvil, llamada el *gas portador*. ^[23] A diferencia de otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. ^[24] La fase móvil normalmente es He, N₂ ó H₂ y la fase estacionaria normalmente es un líquido no volátil, pero también puede ser un sólido.

La cromatografía ha llegado a ser el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí. Además se puede emplear para la identificación cualitativa y para la determinación cuantitativa de las especies separadas. La cuantificación se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones. ^[23]

Un cromatógrafo de gases consiste básicamente en un inyector (split/splitless), un horno en el cual se encuentra la columna capilar, un detector y una computadora. El detector de un cromatógrafo de gases puede ser: de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés), detector de captura de electrones (ECD, por sus siglas en inglés), detector de nitrógeno-fósforo (NPD, por sus siglas en inglés), o espectrómetro de masas (MS por sus siglas en inglés), entre otros.

La desventaja de la cromatografía de gases es que no es posible saber la estructura o la masa molecular de los compuestos o mezcla de compuestos presentes en la muestra, debido a que los tiempos de retención de los analitos están en función de los equilibrios de distribución por afinidad que se presentan en la columna y varían de acuerdo a las condiciones cromatográficas y a la columna utilizada.

4.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una herramienta versátil y muy utilizada para identificar y conocer la masa molar de los componentes presentes en una muestra y determinar sus concentraciones. ^[24] Un espectrómetro de masas es un potente detector para el análisis cualitativo y cuantitativo de analitos en cromatografía de gases y de líquidos. En la **figura 4.1** se ejemplifica el primer paso en el análisis de la espectrometría de masas el cual es producir moléculas en fase gaseosa para posteriormente formar iones que serán acelerados y separados en su relación masa carga (m/z).^{[25][23]}

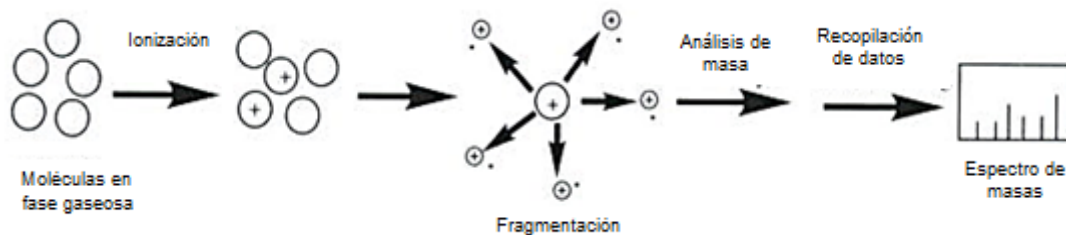


Figura 4.1.- Concepto básico de la espectrometría de masas. ^[25]

Un análisis por espectrometría de masas implica las siguientes etapas:

- (1) Fragmentación,
- (2) Conversión de los fragmentos en un flujo de iones,
- (3) Separación de los iones formados según su relación masa/carga (m/z) y,
- (4) Recuento del número de iones de cada tipo o medida de la corriente iónica. ^[24]

Así, un espectrómetro de masas consiste en varias unidades funcionales las cuales se muestran en la **figura 4.2**. Estas unidades son:

- Un sistema de entrada que transfiere la muestra a la fuente de ionización.
- Un sistema de vacío.
- Una fuente de ionización.
- Un analizador de masas.
- Un detector que calcula la abundancia relativa de la masa de los iones.
- Un sistema que registra, procesa, almacena y muestra los datos.

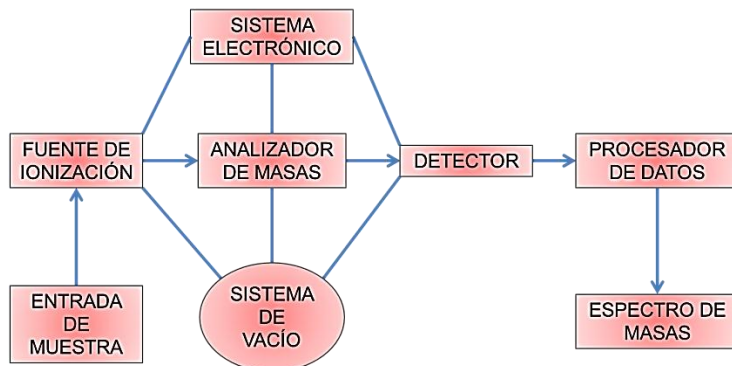


Figura 4.2.- Componentes básicos de un espectrómetro de masas. ^[25]

La Espectrometría de Masas ofrece numerosas ventajas frente a otros detectores, entre las ventajas se encuentran:

1. Límites de detección que son, para muchos elementos, tres órdenes de magnitud mejores que en los métodos ópticos.
2. Espectros notablemente sencillos que generalmente son únicos y con frecuencia fácilmente interpretables, y
3. Capacidad para medir relaciones isotópicas. ^{[25][26]}

5. MÉTODOS INSTRUMENTALES UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE ESTEROIDES

El control de dopaje eficaz es el producto final de una serie de eventos que involucra el reconocimiento o del consumo de sustancias para aumentar el desempeño físico del deportista, la clasificación de la acción deseada por el deportista, así como de los efectos adversos de la sustancia y la búsqueda de medios para erradicar su uso.

En el ámbito de los esteroides, el control anti-dopaje requirió de la aplicación de la disponibilidad, o el desarrollo de tecnologías capaces de demostrar de manera concluyente la presencia de una sustancia prohibida en el sistema de un atleta. Se sabe que el abuso de esteroides se produjo en la década de 1950, y era común en la década de 1960, pero las sanciones sólo pudieron ser ejecutadas con la disponibilidad de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) en la década de 1970. Finalmente hubo una técnica disponible que podría producir una "huella digital" de un fármaco o sus metabolitos en un muestra de orina y confirmar el abuso por parte del deportista para aumentar su desempeño físico.

A lo largo de la historia del control antidopaje, se han utilizado diversas técnicas para la preparación de las muestras de orina y diferentes técnicas instrumentales para la identificación y cuantificación de esteroides como la electroforesis y diversas técnicas cromatográficas que a continuación se mencionan. ^{[1][5][6][8]}

5.1 Inmunoensayos

Los métodos inmunológicos o inmunoensayos son métodos analíticos basados en la reacción Antígeno- Anticuerpo (Ag-Ac). Se entiende como antígeno (Ag) cualquier molécula que puede ser reconocida específicamente por cualquiera de los componentes del sistema inmunitario (SI) que protege al organismo de una

amplia variedad de agentes infecciosos. En un sentido más restrictivo un Ag es cualquier molécula capaz de inducir la producción de anticuerpos (Ac) específicos.^[27]

El primer método empleado para la detección de esteroides fue el radio inmunoensayo (RIA) en 1975. Se usó antisuero contra la metandienona con actividad cruzada con otros 17-metil esteroides. Esta técnica se utilizó en los juegos olímpicos de Montreal 1976 y Moscú 1980.^[28]

En ese momento radioinmunoensayo (RIA) fue el único método práctico disponible para analizar varios esteroides anabólicos en un gran número de muestras.^[29]

5.2 Cromatografía de gases/ espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica de separación que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras de matriz compleja como la orina^[30]

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass

Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC/MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. ^[31]

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual. ^[32]

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. ^[30]

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIM (“selected ion monitoring”). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con

el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias. ^[32]

5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de ésta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria y en la ciencia.

Inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina; y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente no polar como el hexano. El componente menos polar eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es conocida como cromatografía de fase normal.

Cuando la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo lineal y la fase móvil es polar (como el agua, el metanol o el Acetonitrilo) este tipo de cromatografía es conocida como cromatografía de fase reversa. En este caso los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución. ^{[23][24]}

5.3.1 Componentes del HPLC

Los componentes fundamentales de un HPLC son los siguientes:

- Recipientes de vidrio ó acero inoxidable para la fase móvil.
- Helio.
- Sistema de bombeo.
- Sistema de inyección de la muestra.
- Columna para cromatografía de líquidos.
- Detectores. ^[24]

En la **figura 5.1** muestra un esquema de los componentes fundamentales de un HPLC con sus componentes-

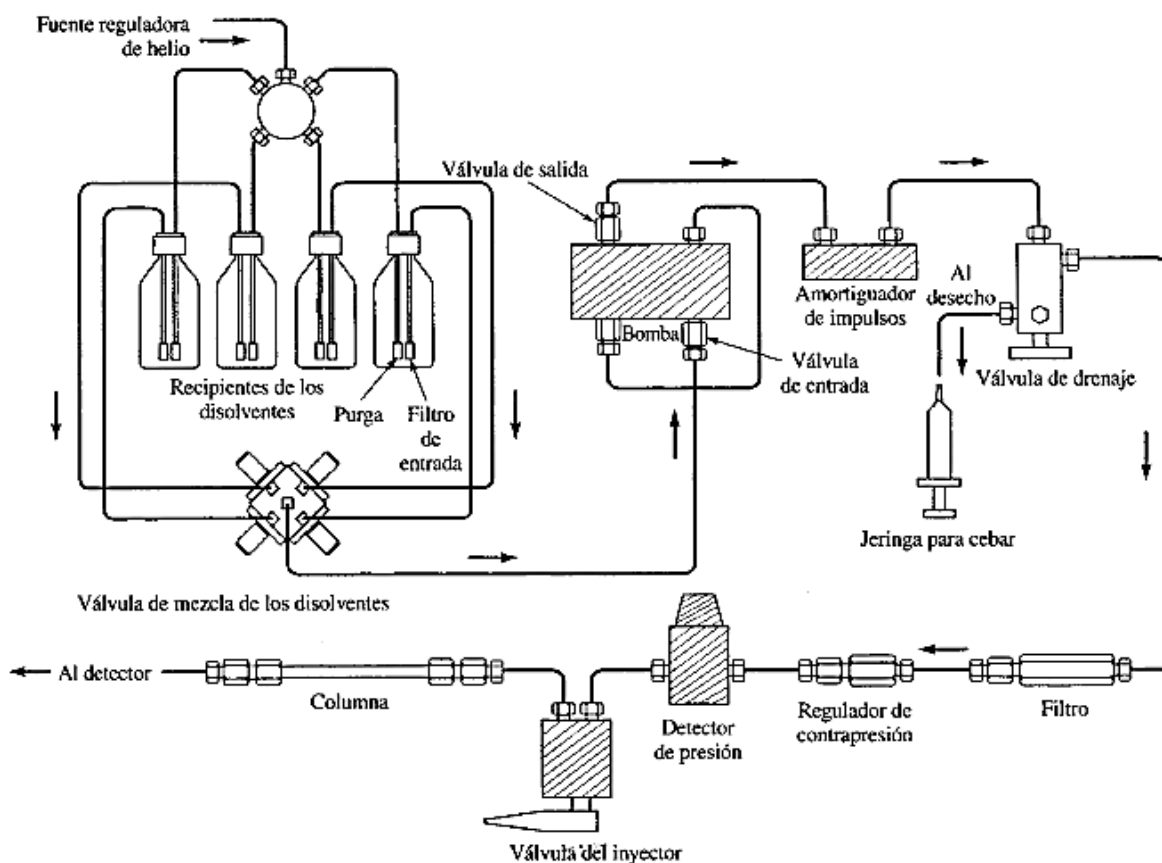


Figura 5.1.-Esquema de un HPLC^[24]

5.4 Principales métodos de cuantificación.

Para lograr un análisis cuantitativo de los componentes separados de una muestra existen métodos de análisis entre los que se pueden mencionar:

- Calibración absoluta (método del estándar externo).
- Calibración relativa (método del estándar interno).^[36]

5.4.1 Calibración absoluta.

Para realizar el cálculo de composición, se inyectan masas exactas del componente puro al cromatógrafo y se determina el área. Se realiza una gráfica relacionando el área del pico con la masa (**figura 5.2**), se obtendrá entonces una curva de calibración que debe ser lineal.^[36]



Figura 5.2.- Gráfico de la calibración absoluta.^[36]

Las desventajas de este método son que la inyección de la muestra debe ser repetible y que las condiciones del sistema no deben cambiar de una inyección a otra. La repetibilidad entre inyecciones se favorece con sistema automatizado de inyección.^[36]

5.4.2 Calibración relativa

La relación de masas o concentraciones conocidas de un patrón de la muestra y de un estándar interno deben ser preparadas e inyectadas al cromatógrafo para luego determinar las relaciones de área. Estas relaciones de áreas son graficadas en función de las relaciones de masa o concentraciones (**figura 5.3**)^[36]

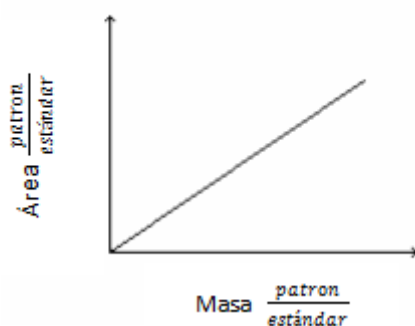


Figura 5.3.- Gráfico de la calibración relativa.^[36]

La ventaja de este método es, que es que es independiente del volumen de inyección de la muestra lo que es sumamente importante para aquellas técnicas cromatográficas que utilizan un método de introducción de muestra no automatizado.

Las características de un estándar interno son:

- Que no se encuentre presente en la muestra.
- Debe separarse de los otros analitos de interés.
- Debe eluir cercano al analito de interés.
- Debe usarse una concentración similar a la del analito de interés.
- Debe tener propiedades fisicoquímicas similares al analito de interés
- Debe ser de las mismas características estructurales que el analito de interés.
- Mejora la repetibilidad de los resultados.^[36]

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El análisis de sustancias prohibidas se realiza en muestras de orina de los deportistas. Los analitos blanco, en el caso de los esteroides, son los analitos que se excretan sin conjugar, conocidos como fracción libre y como glucuronidos, fracción conjugada.

Previo al análisis de la muestra en los instrumentos analíticos, se realiza una limpieza de las muestras realizando una extracción en fase sólida (EFS) de las alícuotas de las muestras, que consisten en 2.5 mL de orina, esta se hidroliza enzimáticamente, usando la enzima β -glucuronidasa de *E. coli* para obtener los esteroides. Posteriormente se realiza la extracción de estos de la matriz biológica realizando una extracción líquido-líquido.

Por otro lado, la muestra tiene que ser compatible con el análisis por GC/MS por lo que es esencial que los compuestos existentes en la muestra sean suficientemente volátiles a presión atmosférica para pasar a través del cromatógrafo de gases, por lo que es necesario recurrir a métodos de derivatización cuando los compuestos a analizar no son volátiles, esto es, métodos de conversión de ciertos compuestos en otros que sean compatibles con el método analítico de GC/MS.^[33] Esto se realiza también para evitar interferencias incrementando la masa molecular de los compuestos de interés, así como de mejorar el comportamiento cromatográfico al igual que las propiedades espectrométricas de los esteroides anabólicos.^[34]

La mayoría de los laboratorios utilizan el compuesto *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSFTA) como agente derivatizante antes de la separación mediante GC. La trimetilsilación es llevada a cabo con una mezcla que contiene *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), yoduro de amonio y

ditioeritrol. Bajo estas condiciones tanto los grupos hidroxilo como los ceto son derivatizados. [35]

A continuación se describen brevemente las técnicas usadas para la preparación de la muestra.

6.1 Extracción en fase sólida (EFS)

Se basa en la participación selectiva de uno o más componentes en dos fases, una de las cuales es un sólido adsorbente. La segunda fase es generalmente un líquido. El sólido adsorbente suele estar contenido en tubos desechables con forma de jeringa y están disponibles comercialmente en muchos tamaños llamados cartuchos (**figura 6.1**).

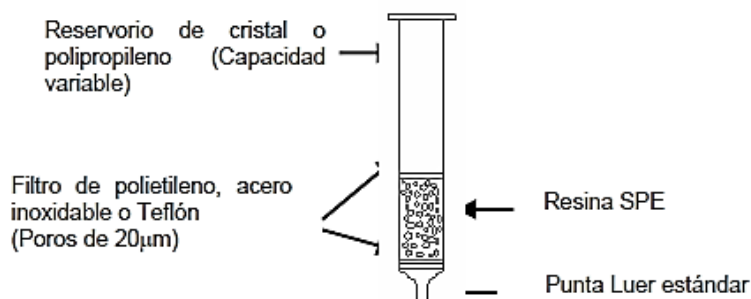


Figura 6.1.-Extracción en fase sólida. [23]

En este tipo de extracción es fundamental la selección de la fase sólida, en función de la fase sólida podemos clasificar la extracción EFS en diferentes tipos:

- Fase reversa.
- Fase normal.
- Intercambio iónico.

6.2 Extracción líquido-líquido (ELL)

Los primeros métodos de análisis de esteroides implica generalmente la extracción como el primer paso. El principal inconveniente de extracción líquido-líquido es la formación de emulsión, aunque la centrifugación es una de las operaciones básicas más importantes en la separación de mezclas homogéneas líquidas y se define como el proceso de separación en el cual un soluto se reparte o distribuye entre dos fases diferentes puestas en contacto. En el análisis de control de dopaje se aplica para aislar los compuestos de interés o analitos de la matriz urinaria. ^[29]

6.3 Hidrólisis

La hidrólisis de glucurónidos de esteroides se lleva a cabo habitualmente mediante la enzima β -glucuronidasa que es una hidrolasa, aunque una hidrólisis eficaz también puede lograrse por una oxidación con peryodato que elimina el residuo glucurónico.

La hidrólisis enzimática de los esteroides sulfatados también puede llevarse a cabo utilizando la enzima sulfatasa que se puede obtener de diversas fuentes, entre ellas por ejemplo de *Helix Pomatia*, tal enzima también posee actividad β -glucuronidasa. ^[29]

6.4 Derivatización

La presencia de grupos hidroxilo sin derivatizar puede deteriorar la resolución debido a la adsorción cromatográfica durante el proceso de cromatografía.

La mayoría de los métodos que utilizan la cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y medición de esteroides y sus metabolitos con bajos límites de detección requieren la formación

de derivados antes del análisis. El trimetilsilil éter (TMS) y otros alquilsilil éteres (tal como ter-butildimetilsilil éter) son adecuados para derivatizar los grupos hidroxilo.^[29]

El análisis directo puede resultar difícil si los compuestos interaccionan entre sí o con la columna. Estas interacciones pueden causar una resolución pobre y/o picos asimétricos que causan una integración y cuantificación difícil o poco práctica. Esta interferencia puede reducirse con la conversión a productos derivados. Los compuestos que coeluyen puede separarse muchas veces usando los métodos de derivatización adecuados.

Los compuestos que contienen grupos funcionales (-COOH, -OH, -NH y -SH) se suelen derivatizar antes de su análisis por cromatografía de gases. Estos grupos funcionales tienden a formar puentes de hidrógeno que afectan a la volatilidad, pueden interactuar negativamente con la fase estacionaria de la columna y pueden ser térmicamente inestables. La sililación, acilación y la alquilación son las técnicas de derivatización usadas para alterar estos grupos funcionales mejorando sus características térmicas y cromatográficas. El procedimiento ideal de derivatización deberá:

- Efectuar la modificación deseada.
- Ser cuantitativa, o, como mínimo, reproducible.
- Forman productos que sean rápidamente distinguibles y separables de los materiales iniciales.
- Proceder rápidamente con técnicas simples de laboratorio que deberán ser selectivas y aplicables a compuestos similares.
- Usar reactivos y reacciones que no presenten riesgos inusuales.^{[34][35]}

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A lo largo de la historia, los atletas han buscado obtener resultados de sus entrenamientos en un tiempo relativamente corto, por lo que algunos han optado por tomar la “*vía rápida*” la cual es el uso de sustancias prohibidas entre ellas, los esteroides anabolizantes o algunos de sus precursores. Dichos esteroides, lejos de causar un beneficio en el deportista, repercuten en su salud. Por lo que la WADA y el COI han optado por prohibir el uso de esteroides entre otras sustancias de abuso.

De acuerdo a la Agencia Mundial Antidopaje, las principales sustancias de abuso utilizadas por parte de los deportistas, son los esteroides anabolizantes y dentro de este grupo de sustancias, las principales son la testosterona y nandrolona.

Para saber si un deportista consumió testosterona o alguno de sus precursores, se necesita calcular la relación testosterona/ epitestosterona en un primer ensayo y en caso de que el resultado analítico de ese primer ensayo sea superior al límite establecido por la Agencia Mundial Antidopaje, se tiene que realizar un segundo análisis de confirmación de dicha relación y por ello es necesario contar con un método validado para la determinación de dicho parámetro.

Es por eso que el presente trabajo se enfocará a la implementación y optimización de una metodología analítica para la identificación y cuantificación de la testosterona y la epitestosterona, para de esta forma, emitir resultados confiables en cuanto al análisis de estos analitos en las muestras de orina de los deportistas.

8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

8.1 Hipótesis

Desarrollar, optimizar y validar un método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/EM) para el análisis de la testosterona y epitestosterona con mayor sensibilidad y especificidad que el método de rutina (Screening) que permitirá obtener resultados confiables y reproducibles para la determinación de la relación de la concentración de testosterona/ epitestosterona como lo exige la Agencia Mundial Antidopaje, en el control de dopaje de atletas de alto rendimiento.

8.2 Objetivo General

Desarrollar, optimizar y validar, un método de confirmación para la determinación de la relación T/E en muestras de orina humana para el control de dopaje en atletas, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

8.2.1 Objetivos Particulares

- Optimizar el procedimiento de preparación de muestra para la determinación y cuantificación de testosterona y epitestosterona en orina humana.
- Optimizar una metodología por HPLC con detector UV para la verificación de la concentración de disoluciones de estándares de testosterona y de epitestosterona.
- Optimizar una metodología por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para el análisis de las muestras.
- Validar la metodología analítica para la determinación específica de la relación testosterona/epitestosterona en orina humana por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/EM).

9. MATERIAL Y EQUIPOS

9.1 Material

- Tubos de ensaye.
- Gradillas.
- Pipetas de volumen variable.
- Matraces volumétricos de 1, 5, 25 y 50 mL
- Agitadores Vortex.
- Agitador oscilatorio.
- Estufa.
- Centrífuga.
- Baño criogénico.
- Evaporador.
- Baño seco.
- Procesador para extracción en fase sólida.
- Columnas para extracción en fase sólida Bond Elut C8, capacidad de 5 mL.
- Columnas para extracción en fase sólida Nexus C8, capacidad de 5 mL.
- Viales y tapas para cromatografía de 2.5 mL
- Insertos para viales de cromatografía de gases.
- Columna ZORBAX RXC18 (250 mm de longitud, diámetro interno de 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm) para HPLC.
- Columna HP ULTRA 1 (25 m de longitud, 0.200 de diámetro interno y tamaño de partícula de 0.11 μm) para GC.

9.2 Reactivos y disoluciones

- Orina de niño no mayor a 12 años.
- Orina control T/E 4:1.
- Disolución de metiltestosterona a 10, 20, 30, 60, 80, 120 $\mu\text{g/mL}$ y ng/mL .
- Disolución T/E d_3 80/20 $\mu\text{g/mL}$.

- Disolución de T/E 4/1.
- Boldenona 20 ng/mL y 80 ng/mL.
- Buffer de fosfatos 1 M pH 7.0
- β -glucuronidasa de *E. coli*.
- Disolución de NaOH 5 M.
- Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.0
- Disolución de K_2CO_3 al 5 % (p/v).
- Metanol para HPLC.
- Terc-butilmetiléter.
- n-Hexano.
- n-Pentano.
- MSTFA:NH₄I:Ditioeritritol (1000:2:1, v:p:p).
- Agua calidad Milli-Q.
- Acetonitrilo para HPLC.

9.3 Equipos

9.3.1 HPLC

- Cromatógrafo de Líquidos HPLC (Agilent modelo 1100 con detector de UV con arreglo de diodos).
- Software Chem Station versión A 10.02

9.3.2 GC/EM

- Cromatógrafo de gases modelo 7890 A, acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975 C, marca Agilent-Technologies.
- Software Chem Station versión E.02.01.1177

10. METODOLOGÍA

10.1 Verificación de la concentración de las disoluciones patrón de testosterona deuteradas y epitestosterona deuteradas (utilizadas como estándares internos para la determinación de la relación T/E) por HPLC con detector UV.

10.1.1 Método instrumental para el análisis de HPLC-UV

Se usó cromatografía de líquidos HPLC (Agilent modelo 1100 con detector de UV).

Se usó una columna ZORBAX RXC18 (250 mm de longitud, diámetro interno de 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm).

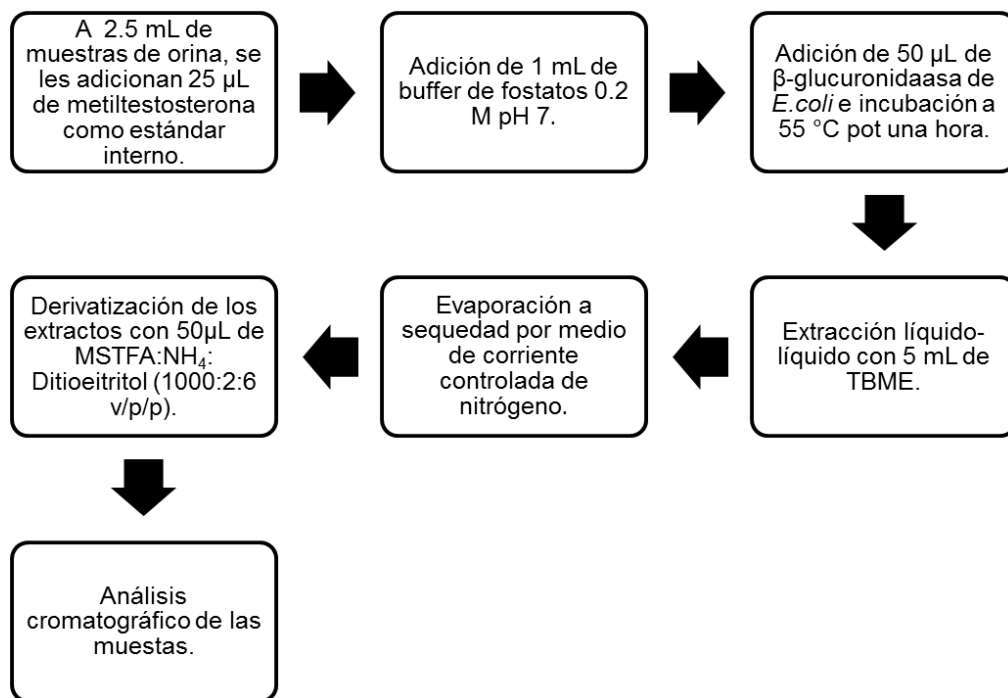
La elución fue isocrática usando como fase móvil CH₃CN-H₂O 60:40 (v/v).

Flujo de la fase móvil 1mL/min.

Detección de UV a 254 nm.

Volumen de inyección de 5 µL.

10.2 Preparación de las muestras para el procedimiento de rutina.

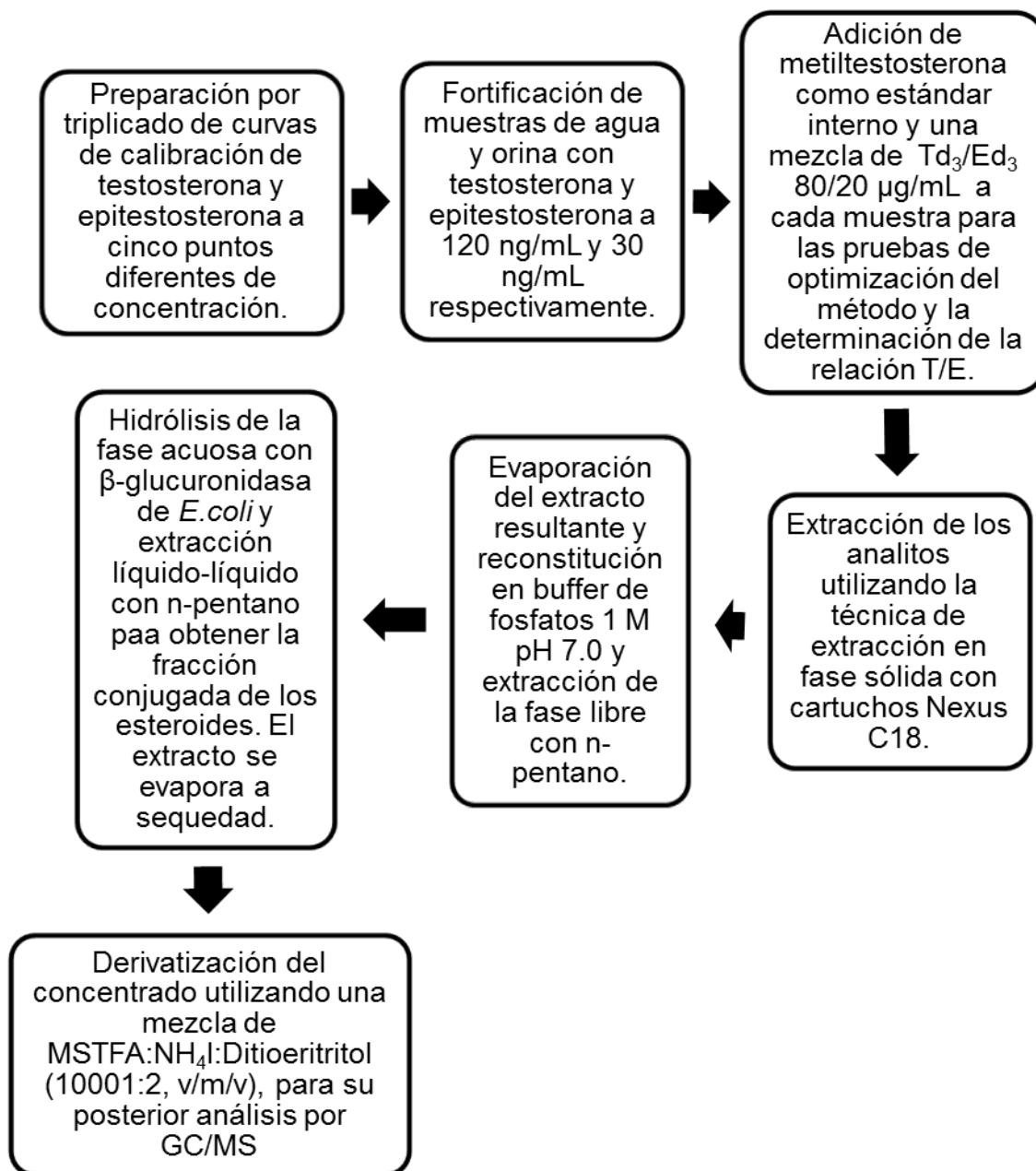


10.2.1 Preparación de las muestras para el procedimiento de confirmación.

A las muestras de 2.5 mL de agua fortificadas y de orina humana se les agregó el respectivo estándar interno (EI) (metiltestosterona a 10 µg/mL para las pruebas de optimización del método y una mezcla Td₃/Ed₃ 80/20 µg/mL para la determinación de la relación T/E. Posteriormente, para la extracción de los analitos de interés se utilizó la técnica de extracción en fase sólida (EFS), usando cartuchos Nexus C18, los cuales fueron eluidos con 2 mL de metanol. El eluato se evaporó y reconstituyó en 1 mL en buffer de fosfatos 1M pH=7 y la fracción se extrajo libre con n-pentano. La fase acuosa se sometió a una hidrólisis enzimática con β-glucuronidasa de *E. coli* y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido utilizando n-pentano para obtener la fracción conjugada de los esteroides. Por último el extracto se evaporó a sequedad (por corriente de N₂ a 45 °C y 15 psi) y

se derivatizó utilizando una mezcla de MSTFA:NH₄I:ditioeritritol (1000:1:2, v/m/v), para su posterior análisis por GC/MS.

10.2.1 Diagrama de flujo de la preparación de las muestras para el procedimiento de confirmación.



Las muestras fueron cuantificadas por el método de estándar interno (EI) utilizando Td_3 y Ed_3 como EI.

Se utilizó metiltestosterona como referencia para el tiempo de retención de la T y E.

Se realizó la corrección por contribución isotópica de T y E no deuterada en el EI deuterado en el cálculo de las concentraciones de T y E.

10.3 Método de análisis instrumental para CG/EM

El análisis se hizo por CG/EM, utilizando un cromatógrafo de gases modelo 7890 A, acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975 C, ambos de la marca Agilent-Technologies.

Se empleó una columna HP ULTRA 1 (25 m de longitud, 0.200 de diámetro interno y tamaño de partícula de 0.11 μ m).

El gas acarreador utilizado fue helio con un flujo de 0.8 mL/min.

El programa de temperatura fue el siguiente:

Temperatura inicial 181 °C (0 min) seguido de un incremento de 3 °C/min hasta temperatura final de 230 °C (0 min), posteriormente 10 °C/min hasta la temperatura final de 310 °C (0 min).

La temperatura del inyector fue de 280 °C.

El volumen de inyección fue de 2 μ L.

La relación Split fue de 1/10.

Tiempo del análisis fue de 22 minutos.

La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C.

El método de adquisición fue “selective ion monitoring” (SIM).

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1 Verificación de disoluciones de testosterona y epitestosterona usadas como estándar interno (EI) en la cuantificación de dichas sustancias

Para la verificación de las disoluciones de testosterona deuterada (Td_3) y epitestosterona deuterada (Ed_3) (método del estándar interno), se prepararon por triplicado curvas de calibración absolutas (**ver anexo 1 y anexo 2**) utilizando materiales de referencia certificados de testosterona y epitestosterona, y a partir llevaron como estándar interno una solución de boldenona a 20 y 80 ng/mL de concentración de las curvas de calibración las cuales, (**figura 11.1 y figura 11.2**) se calcularon las concentraciones reales de las disoluciones de T y E, y de la mezcla de T y E deuteradas. Los resultados se muestran en la **tabla 11.1**

Figura 11.1.- Gráfico de la curva de calibración de la testosterona por HPLC.

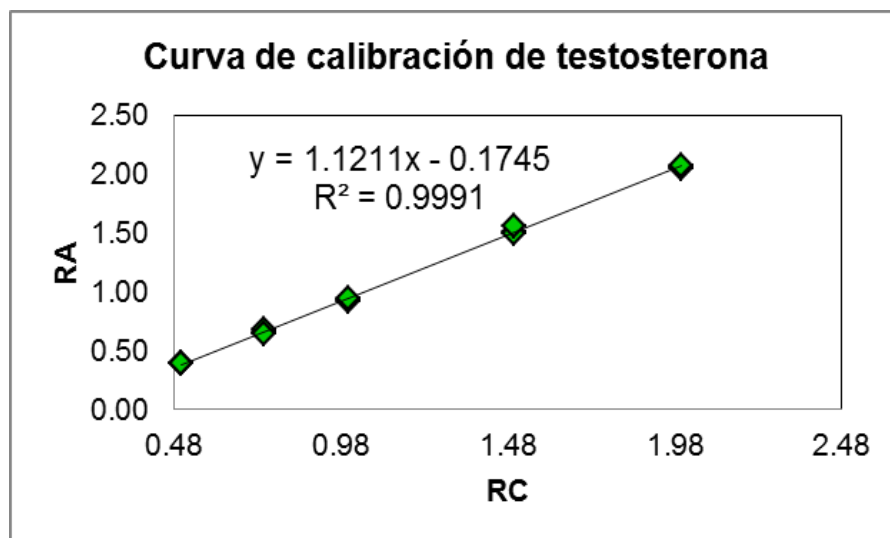
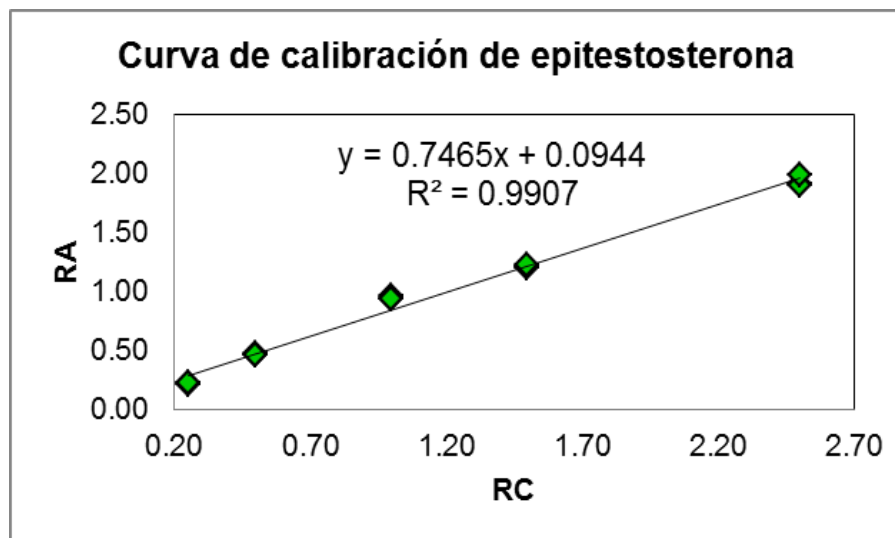


Figura 11.2.- Gráfico de la curva de calibración de la epitestosterona por HPLC.



Los coeficientes de correlación (r^2) de las curvas de calibración de testosterona y epitestosterona son mayores a 0.99, lo cual indica que las curvas de calibración realizadas por triplicado a 5 puntos de concentración para cada compuesto son lineales y presentan baja dispersión de resultados.

Tomando que los puntos de respuesta de T y E se verificaron diversas disoluciones existentes en el laboratorio de testosterona y epitestosterona con el objeto de conocer su concentración real de cada analito y en su caso ajustar la concentración de las mismas para poder utilizarlas en el presente procedimiento.

11.2 Optimización del método de extracción

11.2.1 Extracción líquido-líquido

Para la extracción líquido-líquido de T, E y el EI se compararon tres disolventes orgánicos: *ter*-butilmetiléter, *n*-hexano y *n*-pentano. El estudio se realizó por

triplicado para cada disolvente utilizando como estándar interno metiltestosterona a 120 y 30 ng/mL de concentración respectivamente. Al analizar los triplicados de cada disolvente orgánico, se encontró que el n-pentano dió un mejor rendimiento de extracción de la testosterona y la epitestosterona, así como una mejor repetibilidad (**tabla 11.1 y figura 11.3**). Adicionalmente, con este disolvente se obtuvieron menos interferencias en todo el análisis. En el **anexo 3**, se muestran el cromatograma total de iones (TIC) de los extractos.

En todos los casos los porcentajes de coeficientes de variación (% C.V.) son menores al 11 %.

Tabla 11.1. Relación de áreas de analito/ EI obtenidas por la extracción con disolventes orgánicos.

Disolvente/ Analito	ÁREAS RELATIVAS			
	Testosterona	% CV	Epitestosterona	% CV
n-pentano	2.20	2.46	0.46	6.61
n-hexano	2.18	3.86	0.43	6.41
TBME	2.76	14.2	0.44	10.5

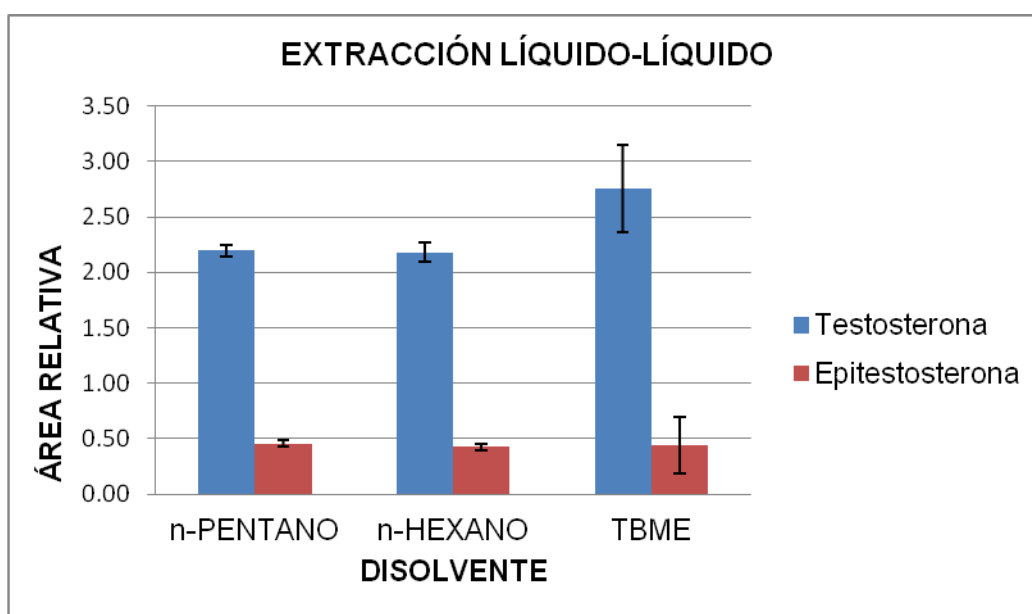


Figura 11.3. Gráfico comparativo de las extracciones realizadas con los disolventes orgánicos.

En el gráfico comparativo tenemos las áreas relativas de los dos esteroides testosterona y epitestosterona para los tres disolventes orgánicos y encontramos que tanto el n-pentano y el n-hexano presentan áreas relativas similares para los dos esteroides, y en cambio la extracción con TMBE como disolvente, presenta mayor relación de áreas relativas (área del ion más abundante del compuesto entre el área del EI), pero al analizar las desviaciones estándar (D.E.) y los coeficientes de variación porcentual (% C.V.) se tiene que el n-pentano posee una menor D.E. y también, un menor % C.V. Además de que el cromatograma de la extracción de éste disolvente, fue el que presentó un menor número de interferencias de acuerdo a los resultados obtenidos tanto experimentalmente como en la imagen del cromatograma para cada disolvente.

11.2.2 Extracción en fase sólida

Por otro lado, se comparó la EFS con dos cartuchos diferentes: Bond Elut (C8) y NEXUS (C18) contra la extracción líquido-líquido (ELL) utilizando n-pentano ya que fue el disolvente extractante con mayores rendimientos de extracción.

Como parte de la optimización del procedimiento de extracción de los esteroides, se analizaron triplicados de muestras de agua calidad Milli-Q fortificadas con testosterona y epitestosterona y triplicados de muestras de orina humana reales usando como estándar interno (EI) metiltestosterona todo esto fue realizado para todas las muestras con las cuales se evaluó el rendimiento de extracción..

Los extractos se analizaron por GC-MS y se observó que el ión fragmento más abundante y característico de la T y E es: $m/z = 432$ y para la metiltestosterona es $m/z = 446$ (**anexo 4**), de esta forma se determinó el área relativa como criterio de mejor rendimiento del procedimiento de extracción. Los resultados se presentan en la **Tabla 11.3**.

En las gráficas de las **Figura 11.4** y **Figura 11.5**, se observa que los esteroides presentan una mayor afinidad hacia los cartuchos Nexus (C18) ya que el ión más abundante de la T y E presenta un área relativa mayor en comparación con los

cartuchos Bond Elut (C8) y con el área relativa obtenida para la extracción Líquido-Líquido con n-pentano.

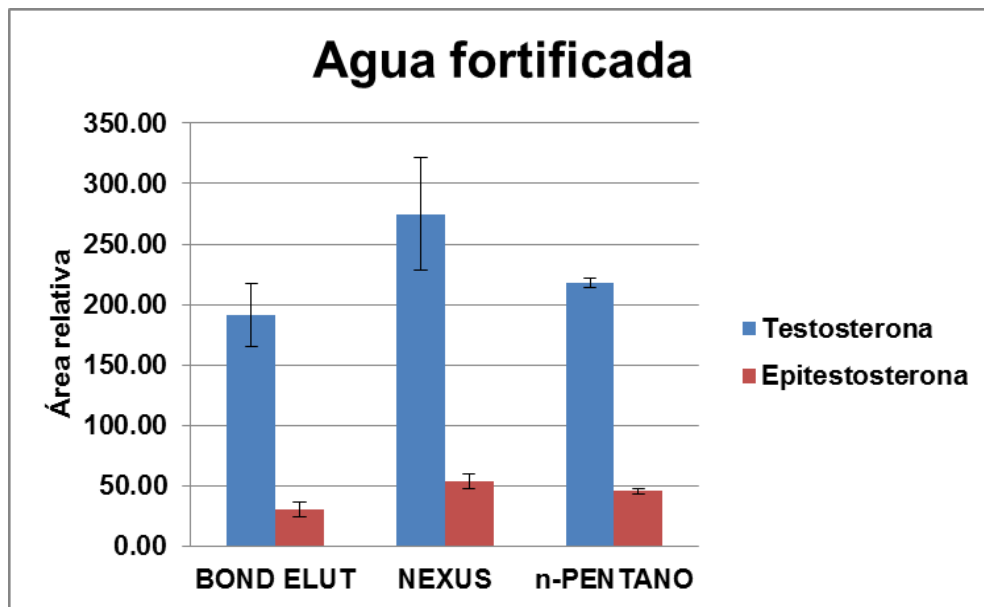


Figura 11.4.- Comparación de las áreas relativas de los iones de testosterona y epitestosterona obtenidos por EFS y ELL en agua fortificada

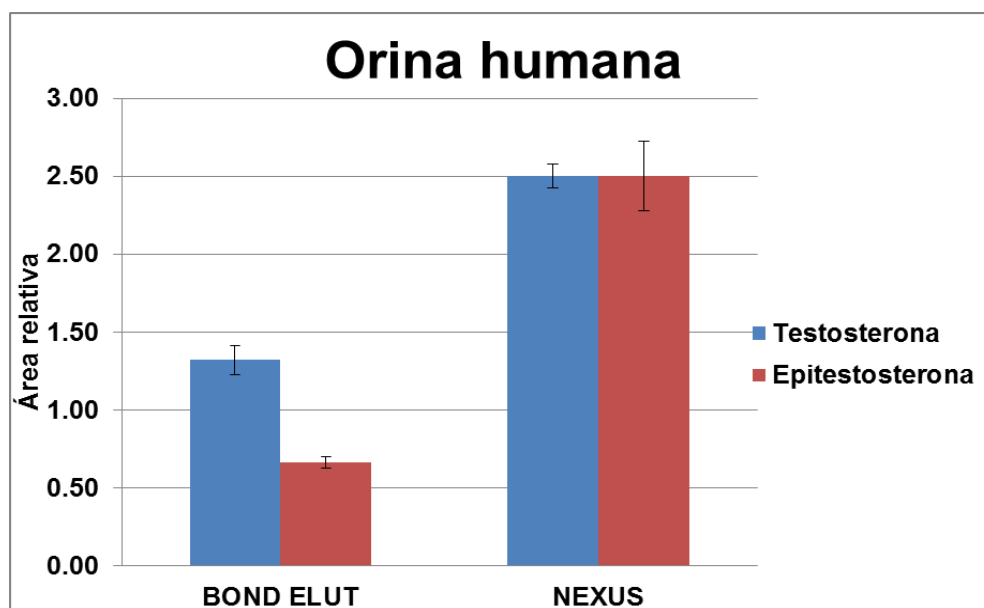


Figura 11.5.- Comparación de las áreas relativas de los iones de testosterona y epitestosterona obtenidos por EFS en orina humana.

Tabla 11.3. Relación de áreas analito/EI, obtenidas para la optimización del método de extracción en fase sólida.

	ION	TESTOSTERONA			EPITESTOSTERONA		
		BOND ELUT	NEXUS	n-PENTANO	BOND ELUT	NEXUS	n-PENTANO
AGUA FORTIFI CADA	432	191.25	274.82	217.82	30.4	54.05	45.6
ORINA HUMANA	432	1.32	2.5	-	0.66	2.5	-

11.3 Validación del método propuesto

Por otra parte, utilizando las concentraciones reales de las disoluciones de T y E deuteradas, calculadas a partir de la curva de calibración preparada con estándares certificados, así como con las mejores condiciones para el procedimiento de extracción (n-pentano como disolvente orgánico para la ELL y cartuchos NEXUS (C18) para la EFS), se realizó un ensayo de validación del método analítico de confirmación propuesto para la determinación de la relación T/E, del cual se obtuvieron resultados adecuados para los siguientes criterios de validación del método: linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), precisión y exactitud.

Para el criterio de linealidad, se prepararon tres curvas de calibración (una por día) a 6 puntos de concentración con metiltestosterona como EI a 125 ng/mL de concentración. Cada punto de concentración de las curvas se inyectó en el GC/MS por triplicado. Las hojas de cálculo para cada compuesto (testosterona y epitestosterona) se muestran en el **anexo 5**.

En la **figura 11.6 y 11.7**, se muestran las gráficas de las curvas de calibración de la testosterona y epitestosterona respectivamente.

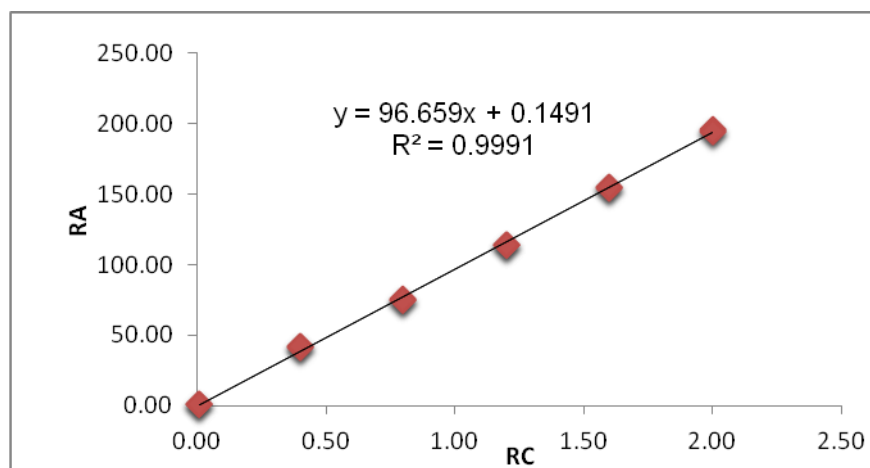


Figura 11.6.- Gráfico de la curva de calibración de la testosterona por GC/EM.

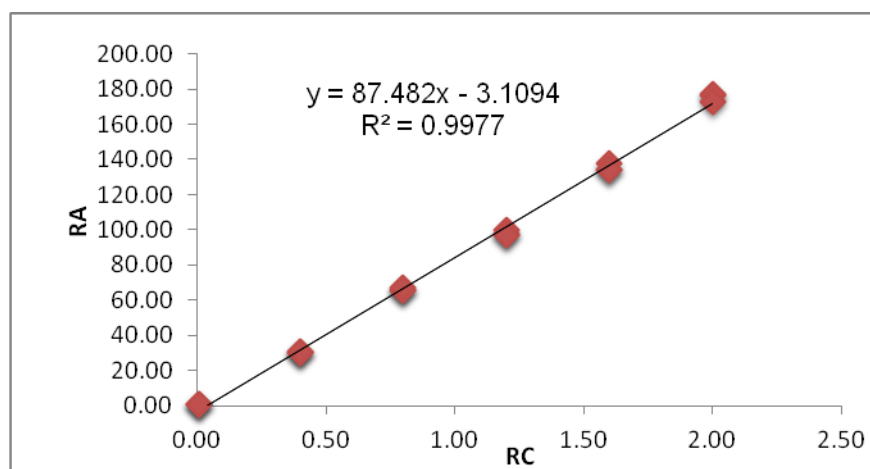


Figura 11.7.- Gráfico de la curva de calibración de la epitestosterona por GC/EM.

Como se puede observar, en ambas curvas de calibración, los coeficientes de correlación (r^2), son 0.9991 y 0.997 por lo que cumplen con los criterios de linealidad requeridos (0.99) por la Agencia Mundial Antidopaje.

Para calcular el límite de detección (LD), se utilizaron los resultados de las inyecciones de las muestras que fueron preparadas por triplicado y de dicho triplicado se multiplicó por 3 veces la desviación estándar obteniendo como resultado para la testosterona un valor de 0.06 ng/mL y para la epitestosterona un valor de 0.16 ng/mL. En cuanto al límite de cuantificación (LC), dicho parámetro se determinó al multiplicar por 10 veces la desviación estándar de los triplicados del

punto más bajo de la curva obteniendo como resultados 0.2 y 0.54 ng/mL para la testosterona y la epitestosterona respectivamente.

La exactitud reportada como % de recuperación (% R), se determinó a partir de la inyección en el GC/EM de septuplicados de muestras de orina de niño@ las cuales fueron fortificadas con testosterona a 120 ng/mL y epitestosterona a 30 ng/mL y fueron sometidas a todo el proceso de preparación de muestra, destacando como pasos críticos, la adición del EI, hidrólisis enzimática, extracción líquido-líquido, evaporación controlada bajo corriente de nitrógeno y derivatización. (**tabla 11.4**)

Simultáneamente se preparó un triplicado con las mismas concentraciones de EI de T y E en el cual no se llevó a cabo el procedimiento de preparación de muestra, solo fueron derivatizados e inyectados por GC/EM y se tomó como el 100 % para el cálculo del % R (**tabla 11.5**), obteniendo un % R de 100.54 y 103.58 % para la testosterona y epitestosterona respectivamente.

La precisión, expresada como % C.V, se determinó a partir de la inyección en el GC/EM de septuplicados de orinas de referencia. Dichas orinas, fueron fortificadas con testosterona a 120 ng/mL y epitestosterona a 30 ng/mL y fueron sometidas a todo el proceso de preparación de muestra, destacando como pasos críticos, la adición del EI, hidrólisis enzimática, extracción líquido-líquido, evaporación controlada bajo corriente de nitrógeno y derivatización (**tabla 11.6**).

A partir de los septuplicados anteriores se obtiene un % C.V. de 2.15 y 4.65 % para testosterona y epitestosterona respectivamente.

Las curvas de calibración preparadas de T y E para la determinación del LD, LC, % R y % C.V. se presentan en el **anexo 6**.

Los resultados del ensayo de validación se muestran en la **tabla 11.7**, donde se obtiene que el método cumple con los criterios de validación exigidos por la Agencia Mundial Antidopaje.

Tabla 11.4.- Concentraciones de T y E en muestras de orina fortificadas, calculadas por medio de una curva de calibración por GC/EM

	T [ng/mL]	E [ng/ml]
MUESTRA 1	120.8	31.92
MUESTRA 2	122.35	32.27
MUESTRA 3	120.79	31.52
MUESTRA 4	120.43	32.26
MUESTRA 5	120.39	31.05
MUESTRA 6	120.26	31.94
MUESTRA 7	120.14	30.4
PROMEDIO	120.74	31.62
DE	0.75	0.69
% CV	0.62	2.18

Tabla 11.5.- Concentraciones de T y E deuterados presentes en disoluciones patrón derivatizadas (sin matriz) (PADE) calculadas en una curva de calibración por GC/EM.

	[T] ng/mL	[E] ng/mL
PADE 1	120.02	30.17
PADE 2	119.93	31.08
PADE 3	120.3	30.34
PROMEDIO	120.08	30.53
DE	0.19	0.48
% CV	0.16	1.58

Tabla 11.6.- Concentraciones de T y E presentes en las orinas fortificadas (ORE) calculadas en una curva de calibración para cada analito por GC/EM.

	T [ng/mL]	E [ng/mL]
ORE 1	119.08	31.28
ORE 2	116.38	29.56
ORE 3	123.56	29.39
ORE 4	122.90	32.41
ORE 5	119.56	32.36
ORE 6	120.44	29.66
ORE 7	121.28	31.48
PROMEDIO	120.46	30.88
DE	2.58	1.44
%CV	2.15	4.65

Tabla 11.7. Ensayo de validación preliminar del método analítico de confirmación para la determinación de la relación T/E.

VALIDACIÓN						
Compuesto	Linealidad	Ecuación de la recta $y=mx+b$	LD ng/mL	LC ng/mL	Exactitud % Recuperación (n=7)	Precisión (n=7) % C.V
T	1 a 250 ng/mL $R^2= 0.9991$	$96.659x+0.1491$	0.06	0.2	100.54	2.15
E	5 a 250 ng/mL $R^2= 0.9977$	$87.482x-3.1094$	0.16	0.54	103.58	4.65

11.4 Análisis de muestras reales

Finalmente, una vez obtenidas las mejores condiciones para el método de confirmación, se analizaron ocho muestras reales que habían sido previamente evaluadas por el procedimiento de rutina. En la **tabla 11.8** se muestran los resultados (**anexo 7**), en los cuales se observa que se tiene mayor sensibilidad para el método de confirmación en comparación con el método de rutina (screening), ya que se obtuvieron valores más confiables para las concentraciones de T y E, así como una baja dispersión entre los triplicados, lo cual a su vez demuestra que el uso de estándares internos deuterados (**Anexo 8**) mejoró la precisión y exactitud del método implementado en comparación con el método de screening, donde no se utilizan análogos deuterados para la estimación de la cuantificación de dichos analitos.

Por último, también se incluyen tres muestras las cuales no cumplen con el requisito de tener una relación T/E > 4 como lo establece la WADA para que sea necesario analizarlas por nuestro procedimiento de confirmación.

Tabla 11.8 Comparación entre las concentraciones y la relación T/E obtenidas por el método de screening y el método de confirmación propuesto.

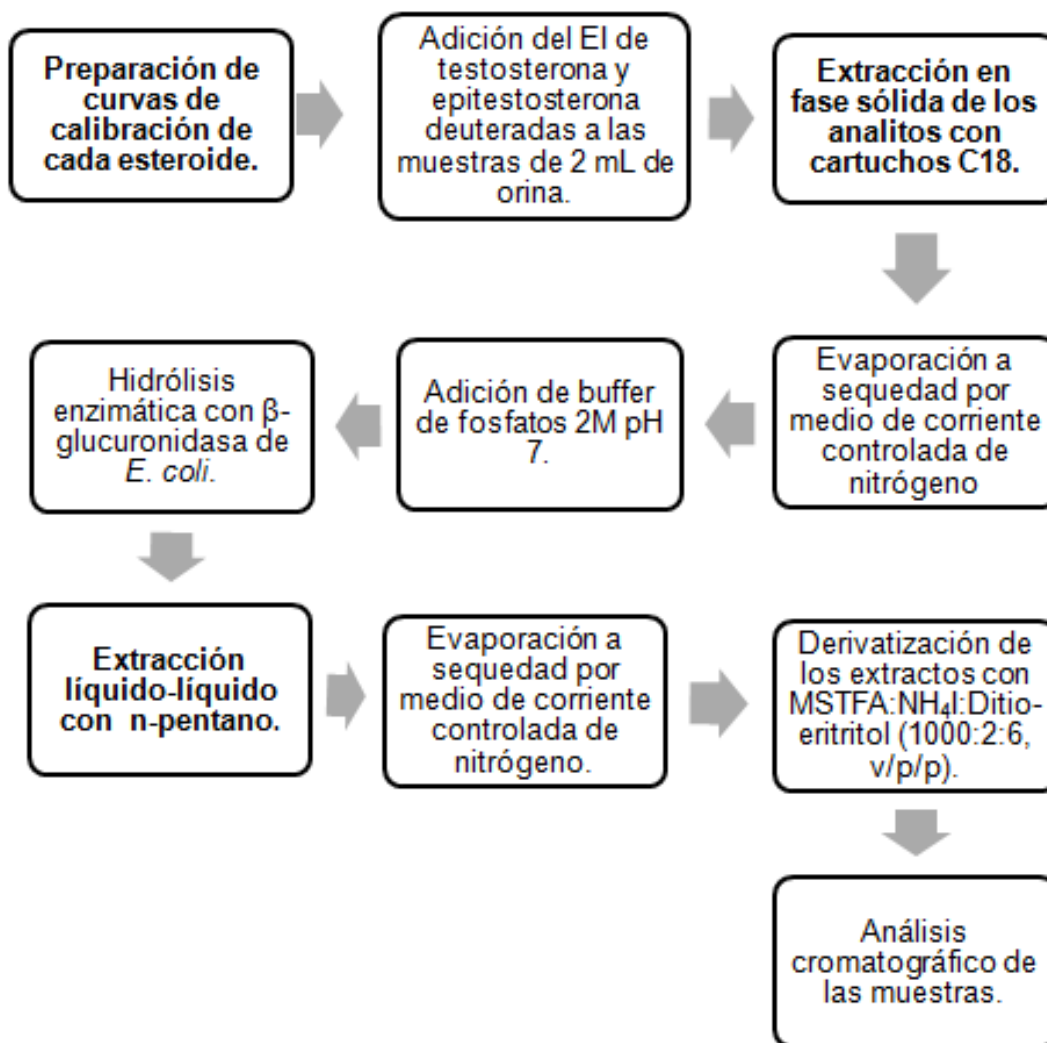
ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES (T/E)						
	MÉTODO DE RUTINA (n=1)			MÉTODO DE CONFIRMACIÓN PROPUESTO (n=3)		
	[E] (ng/mL)	[T] (ng/mL)	[T]/[E]	[E] (ng/mL)	[T] (ng/mL)	[T]/[E]
Muestra 1	3.9	88.4	22.6	7.2	156.1	21.8
Muestra 2	4.4	49.2	11.1	9.8	85.3	8.7
Muestra 3	5.3	450.7	84.9	3.15	221.23	70.3
Muestra 4	8.48	56.5	6.67	4.19	24.21	5.7
Muestra 5	0.5	5.2	10.4	1.28	11.1	8.6
Muestra 6	8.48	56.5	6.67	8.53	39	4.5
Muestra 7	2.5	33.8	14.6	0.26	3.4	11.9
Muestra 8	8.48	56.5	6.67	0.86	5.25	6.13
Muestra 9*	3.05	4.43	1.45	R T/E < 4		
Muestra 10*	2.9	5.3	1.82	R T/E < 4		
Muestra 11*	7.4	12.5	1.68	R T/E < 4		

*Muestras que no fueron analizadas por el procedimiento de confirmación por no presentar una relación de la concentración testosterona/epitestosterona mayor a 4 en el método de rutina.

12. CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones experimentales de proceso de muestras de orina humana para la determinación de la relación de la concentración de T/E.

Las condiciones óptimas determinadas son las siguientes:



- Se optimizó el procedimiento de extracción de T y E en muestras de orina humana, observando que el n-pentano presenta una elevada afinidad hacia los esteroides anabolizantes ya que con él se obtuvieron rendimientos de extracción adecuados (mayores al 80 %) y un menor número de interferencias en los cromatogramas, por lo que también es un disolvente con mayor selectividad para los analitos de interés
- Así mismo, los cartuchos de extracción en fase sólida Nexus (C₁₈) demostraron tener mayor afinidad hacia los esteroides analizados, ya que con dichos cartuchos se obtuvieron extractos con menor número de interferencias y el rendimiento de extracción fue mayor en comparación con los cartuchos Bond Elut C8 (ver tabla 11.3)
- Se realizó la verificación de la concentración de los estándares internos de Td₃ y Ed₃ utilizados para la determinación de la relación T/E, por medio de curvas de calibración preparadas a partir de estándares certificados trazables de T y E, con lo cual fue posible verificar las concentraciones reales de dichas disoluciones y con ello mejorar la precisión y exactitud de la metodología propuesta.
- Se logró la validación de la metodología para la confirmación de la relación de T/E obteniendo límites de detección y cuantificación adecuados, así como una correcta precisión y exactitud para el método propuesto, lo cual permite su uso como método de confirmación para la determinación de la relación de la concentración T/E por GC/MS el cual además de presentar dichos parámetros que lo hacen ser un método más específico para identificación de estos compuestos, incluye el uso de estándares deuterados de testosterona y epitestosterona los cuales le dan al método una mayor sensibilidad comparado con el método de rutina sobre dichos analitos (Ver tabla 11.7)

13. BIBLIOGRAFÍA

[1] Jean L. Fourcroy Pharmacology, Doping and Sports A scientific guide for athletes, coaches, physicians, scientists and administrators. Ed. Routledge New York USA 2009.

[2] Reporting and Evaluation Guidance for Testosterone, Epitestosterone, T/E ratio and other Endogenous Steroids World Anti-Doping Agency Laboratory Committee 13 August,2004.

[3] Reporting and management of elevated T/E ratios; World Anti-Doping Agency Version 1 March 2006.

[4] Screening for testosterone abuse in male athletes using the measurement of urinary LH, a revision of the paradigm Catrin Goebel Drug Testing and Analysis 1,511-517 2009.

[5] <http://www.olympic.org/ancient-olympic-games> Consultada el día 19 de Diciembre de 2011.

[6] Pharmacology, Doping and Sports A scientific guide for athletes, coaches, physicians, scientists and administrators. Jean L. Fourcroy; Ed. Routledge 2009 New York E.U.A

[7] <http://www.olympic.org/about-ioc-institution> Consultada el día 19 de Diciembre de 2011.

[8] Nutrición en el deporte: ayudas ergogénicas y dopaje, José Mataix Verdú Javier González Gallego, Pilar Sánchez Collado Ediciones Díaz Santos 2007; Madrid, España.

[9] SJÖQVIST, Folke; GARLE, Mats; RANE, Anders Horacio; et. al. "Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society", en Vol. 371, Mayo 31 2008.

[10] http://www.wadama.org/static/PDF/OtherLanguages/Codigo_2009_Modelo_Normas_Antidopaje_CONs_WADA.pdf Consultada el día 03 de Enero de 2012

[11] http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf. Consultado el 3 de Febrero del 2012)

[12] <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/> Consultado el 3 de Febrero del 2012

[13] Bioquímica Jeremy M. Berg; John L; Tymoczko Lubert; 5a Edición Ed. Reverté S.A; Barcelona España 2005.

[14] Bioquímica de Harper, Martin, Mayes Rodwell. Ed. El manual moderno 1984.

[15] Hormonas Esteroides Adrenales; Brandan, Nora C, Llanos, Isabel Cristina, Miño, Claudia Alejandra, Ragazzoli, Maximiliano A, Ruiz Díaz, Daniel A. N; 2008; Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.

[16]

http://books.google.com.mx/books?id=nM8ED6gYou0C&pg=PA931&lpg=PA931&dq=biosintesis+de+las+hormonas+suprarrenales&source=bl&ots=HoRokbBoxj&sig=i8aOYG6eVbbarjvd5SVivgMt_xE&hl=es&sa=X&ei=CeUNT9XfBcmuiQKq0KC8DQ&sqj=2&ved=0CEoQ6AEwBQ#v=onepage&q=biosintesis%20de%20las%20hormonas%20suprarrenales&f=false; Consultada el día 02 de Enero de 2012.

[17] Lehninger Principios de Bioquímica David L. Nelson; Michael M. Cox; Claudi M. Cuchillo; 4ª Edición; Ediciones Omega; Barcelona España; 2005.

[18] Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes, *Life Sciences*, **39**, 2493-518; 1986.

[19] Toxicology Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's Ed. McGraw-Hill 2007 PP. 1117

[20] Modificaciones del perfil hormonal sexual como resultado de la administración conjunta de dos sustancias que inhiben el metabolismo de la testosterona Gloria Gallo I., Lucrecia Rodríguez R., Diana Malaver Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1), 59-77, 2009

[21] <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c2-3-4-2.html> Consultada el día 4 de Febrero de 2012.

[22] Introducción a la Química Farmacéutica María del Carmen Avendaño López McGraw Hill 1999.

[23] Análisis Químico Cuantitativo; Daniel C. Harris, 3ª Edición; Ed. Reverté S.A. España 2006.

[24] Principios de Análisis Instrumental; Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman. 5ª Edición, Edi. Mc Graw Hill. España 2001.

[25] Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry; Chhabil Dass; Wiley Interscience 2001.

[26] Javier García García Alternativas analíticas para la detección de sustancias consideradas como dopantes. 2012

[27]

<http://www.aea.gob.es/media/126627/metodos%20inmunologicos.pdf>. Consultada el día 10 de Febrero de 2012.

[28] R.V. Brooks, R.G. Firth and N.A. Sumner, Br. J. Sports Med., 9 (1975) 89)

[29] Steroid Analysis H.L.J. Makin D.B. Gower, Second Edition, Ed. Springer 2010 London UK.

[30] Procedimiento para el análisis de esteroides anabólicos excretados en forma libre y otros compuestos. Ariana Rodríguez Fernández, Margarita Teresa Correa Vidal, Dayamiín Martínez Brito. Instituto de Medicina del Deporte. Cuba

[31]

http://books.google.com.mx/books?id=g3o_PUTmr3wC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false Consultada el día 26 de Mayo de 2012.

[32] <http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf> Consultada el día 26 de Mayo de 2012.

[33] Mass spectrometry of lipids handbook of lipid research. Murphy R. C. New York. 1993.

[34] Anal Bioanal Chem. 2007 Aug;388(7):1539-43. Epub 2007 Jan 27.

[35] Donike, M. (1969) N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, Journal of Chromatography, **42**, 103-104.

[36] Rubinson y Rubinson Análisis Instrumental Ed. Prentice Hall; 200; Madrid, España.

14. ANEXOS

Anexo 1.- Hoja de cálculo de la curva de calibración por HPLC de la epitestosterona para la cuantificación de las concentraciones de las disoluciones de epitestosterona.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.

Determinación: **Curva de calibración por HPLC**

Fecha: **07/03/2012**

Analito: **Epitestosterone**

Estándar interno: **Boldenone**

Límite de corte (µg/mL): **11A**

PNT: **11A**

Lote: **11A**

Submuestra: **11A**

Curva de calibración

Muestra	EI	Ion	NA	ANALITO	Ion	NA	t _{RR}	RC Analito/EI	RA Analito/EI	ΔRA, y el valor medio	Evaluación (% < 10 %)
	C (µg/mL)	t _R (min)	Área	C (µg/mL)	t _R (min)	Área					
BLO1											
CA11	20	3.056	311	5.0	4.142	66	1.3554	0.250	0.213	1.671	Se acepta réplica
CA12	20	3.057	285	5.0	4.148	64	1.3569	0.250	0.223		
CA13	20	3.071	291	5.0	4.177	65	1.3601	0.250	0.222		
CA21	20	3.069	269	10.0	4.172	127	1.3594	0.500	0.472	1.547	Se acepta réplica
CA22	20	3.064	284	10.0	4.163	130	1.3587	0.500	0.458		
CA23	20	3.068	259	10.0	4.172	120	1.3598	0.500	0.463		
CA31	20	3.080	288	20.0	4.201	276	1.3640	1.000	0.960	1.812	Se acepta réplica
CA32	20	3.072	291	20.0	4.183	273	1.3617	1.000	0.936		
CA33	20	3.076	298	20.0	4.192	278	1.3628	1.000	0.933		
CA41	20	3.082	289	30.0	4.206	345	1.3647	1.500	1.193	1.250	Se acepta réplica
CA42	20	3.091	291	30.0	4.228	350	1.3678	1.500	1.204		
CA43	20	3.083	310	30.0	4.200	379	1.3623	1.500	1.221		
CA51	20	3.094	284	50.0	4.234	545	1.3685	2.500	1.917	2.542	Se acepta réplica
CA52	20	3.096	280	50.0	4.238	532	1.3689	2.500	1.897		
CA53	20	3.097	299	50.0	4.240	592	1.3691	2.500	1.981		
	x	3.1	288.5		4.1931		1.363	1.15	0.95		
	s	0.0135	13.7		0.03183		0.004	0.828	0.62		
	%CV	0.437	4.7		0.759		0.325				

<i>Regresión Lineal</i>				<i>Desviación estándar</i>			
Ordenada al origen		0.094		$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	
Pendiente		0.747					
r^2		0.991					
n =	15.00	s_x	0.062	CA11	- 0.90	- 0.74	0.67
S_{xx}	9.60	s_y	0.020	CA12	- 0.90	- 0.73	0.66
S_{yy}	5.40	s_{xy}	0.0281	CA13	- 0.90	- 0.73	0.66
S_{xy}	7.17			CA21	- 0.65	- 0.48	0.31
				CA22	- 0.65	- 0.49	0.32
				CA23	- 0.65	- 0.49	0.32
				CA31	- 0.15	0.01	0.00
				CA32	- 0.15	- 0.02	0.00
				CA33	- 0.15	- 0.02	0.00
				CA41	0.35	0.24	0.08
				CA42	0.35	0.25	0.09
				CA43	0.35	0.27	0.09
				CA51	1.35	0.96	1.30
				CA52	1.35	0.94	1.27
				CA53	1.35	1.03	1.39

Curva de calibración de epitestosterona

$y = 0.7465x + 0.0944$
 $R^2 = 0.9907$

Anexo 2.- Hoja de cálculo de la curva de calibración por HPLC de la testosterona para la cuantificación de las concentraciones de las disoluciones de testosterona.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.

Determinación: **Curva de calibración por HPLC**

Fecha: **07/03/2012**

Analito: **Testosterone**

Estándar interno: **Boldenone**

Límite de corte (µg/mL): **NA**

PNT: **NA**

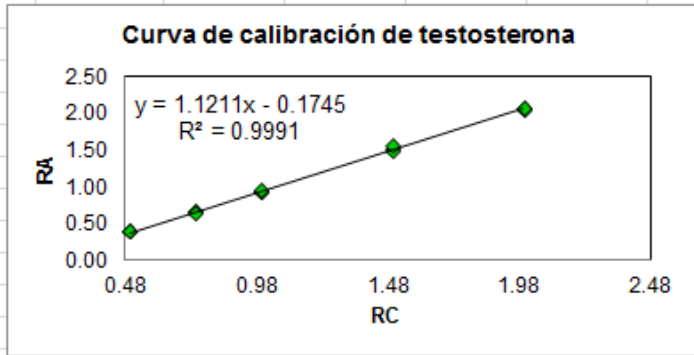
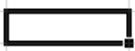
Lote: **NA**

Submuestra: **NA**

Curva de calibración

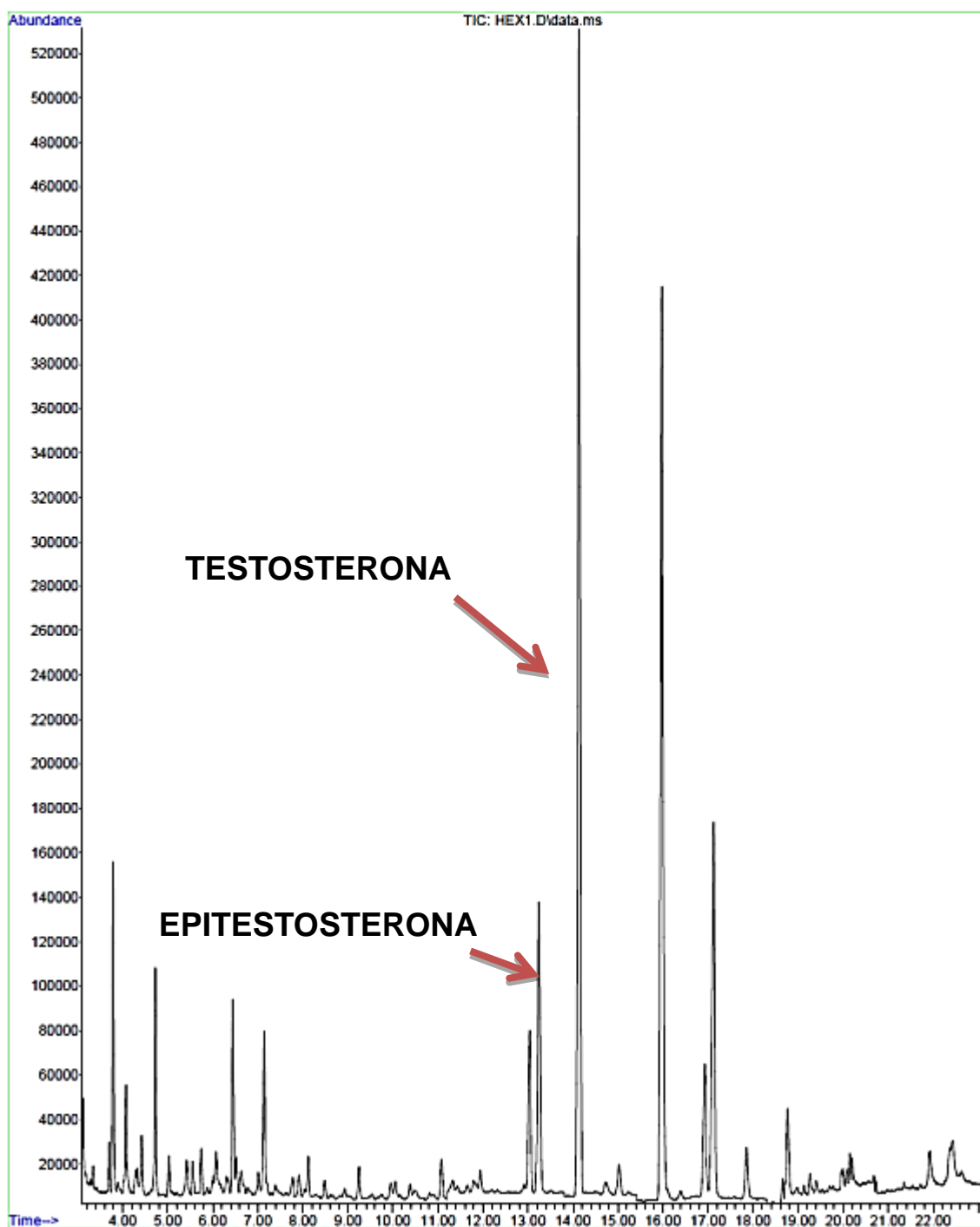
Muestra	EI	Ion	NA	ANALITO	Ion	NA	t _{RR}	RC Analito/EI	RA Analito/EI	ΔRA _i y el valor medio	Evaluación (% < 10 %)
	C (µg/mL)	t _R (min)	Área	C (µg/mL)	t _R (min)	Área					
BLO1											
CA11	80	3.094	1,063	40.0	3.598	415	1.1629	0.500	0.390	0.633	Se acepta réplica
CA12	80	3.095	1,175	40.0	3.600	462	1.1632	0.500	0.393		
CA13	80	3.096	1,199	40.0	3.602	474	1.1634	0.500	0.395		
CA21	80	3.096	1,121	60.0	3.600	740	1.1628	0.750	0.660	2.321	Se acepta réplica
CA22	80	3.095	1,156	60.0	3.600	781	1.1632	0.750	0.676		
CA23	80	3.096	1,134	60.0	3.602	732	1.1634	0.750	0.646		
CA31	80	3.094	1,077	80.0	3.598	995	1.1629	1.000	0.924	1.438	Se acepta réplica
CA32	80	3.094	1,067	80.0	3.598	994	1.1629	1.000	0.932		
CA33	80	3.094	1,054	80.0	3.598	999	1.1629	1.000	0.948		
CA41	80	3.093	1,064	120.0	3.596	1,610	1.1626	1.500	1.513	2.530	Se acepta réplica
CA42	80	3.092	1,110	120.0	3.596	1,663	1.1630	1.500	1.499		
CA43	80	3.092	1,142	120.0	3.596	1,785	1.1630	1.500	1.564		
CA51	80	3.094	1,124	160.0	3.595	2,316	1.1619	2.000	2.061	0.583	Se acepta réplica
CA52	80	3.093	1,174	160.0	3.597	2,405	1.1629	2.000	2.048		
CA53	80	3.093	1,095	160.0	3.597	2,270	1.1629	2.000	2.073		
	\bar{x}	3.094	1,116.9		3.5982		1.163	1.15	1.11		
	s	0.0013	46.4		0.00218		0.000	0.557	0.63		
	%CV	0.043	4.2		0.061		0.030				

<u>Regresión Lineal</u>				<u>Desviación estándar</u>		
Ordenada al origen	-	0.175		$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})$
Pendiente		1.121				
r^2		0.999				
n =	15.00	s_r	0.020	CA11	-	0.47
S_{xx}	4.35	s_m	0.010	CA12	-	0.47
S_{yy}	5.47	s_b	0.0122	CA13	-	0.47
S_{xy}	4.88			CA21	-	0.18
				CA22	-	0.18
				CA23	-	0.19
				CA31	-	0.03
				CA32	-	0.03
				CA33	-	0.03
				CA41		0.14
				CA42		0.13
				CA43		0.16
				CA51		0.80
				CA52		0.79
				CA53		0.81

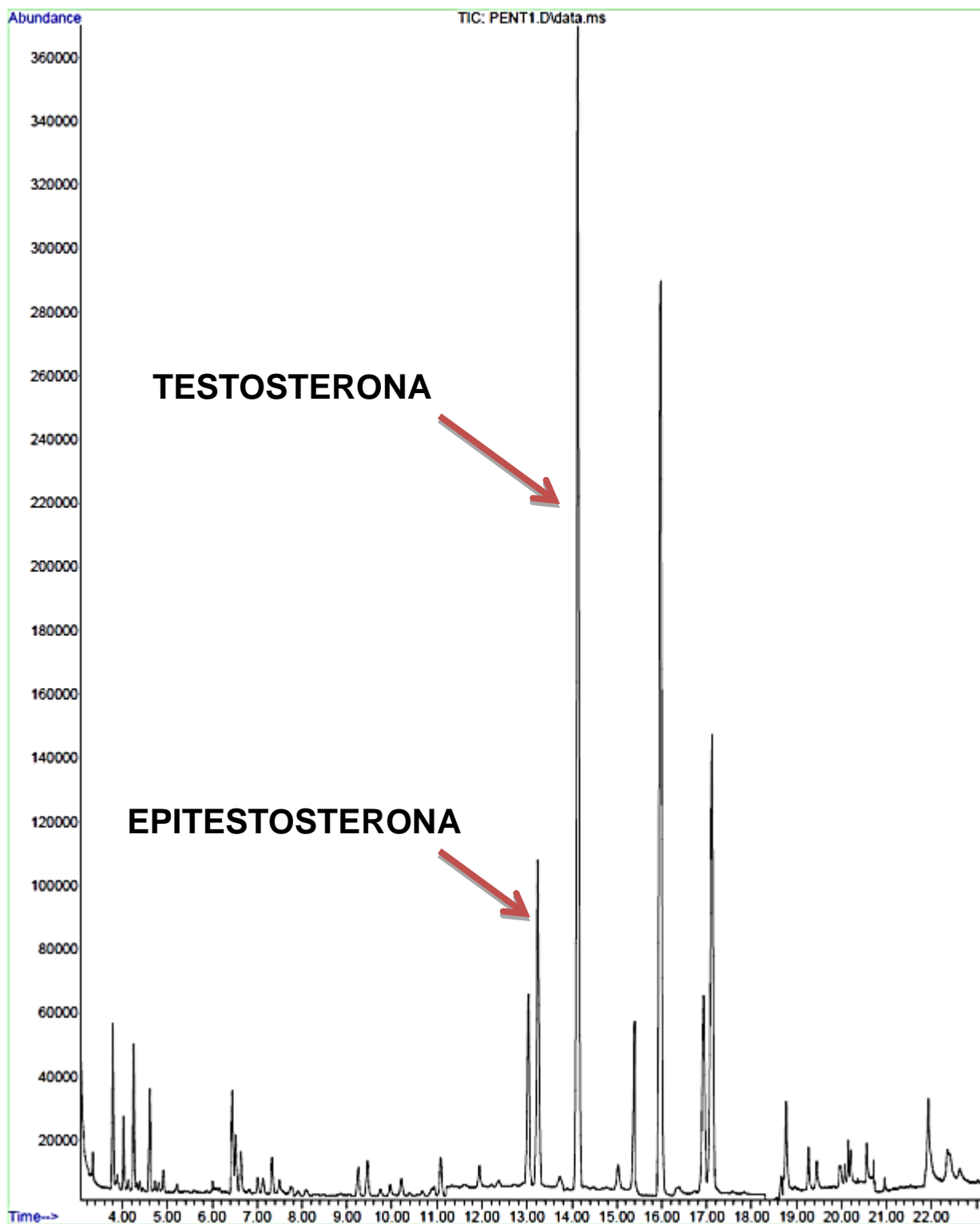


Anexo 3.- Cromatograma Total de Iones (TIC) de los extractos obtenidos con: n-Hexano, n-Pentano y TBME respectivamente.

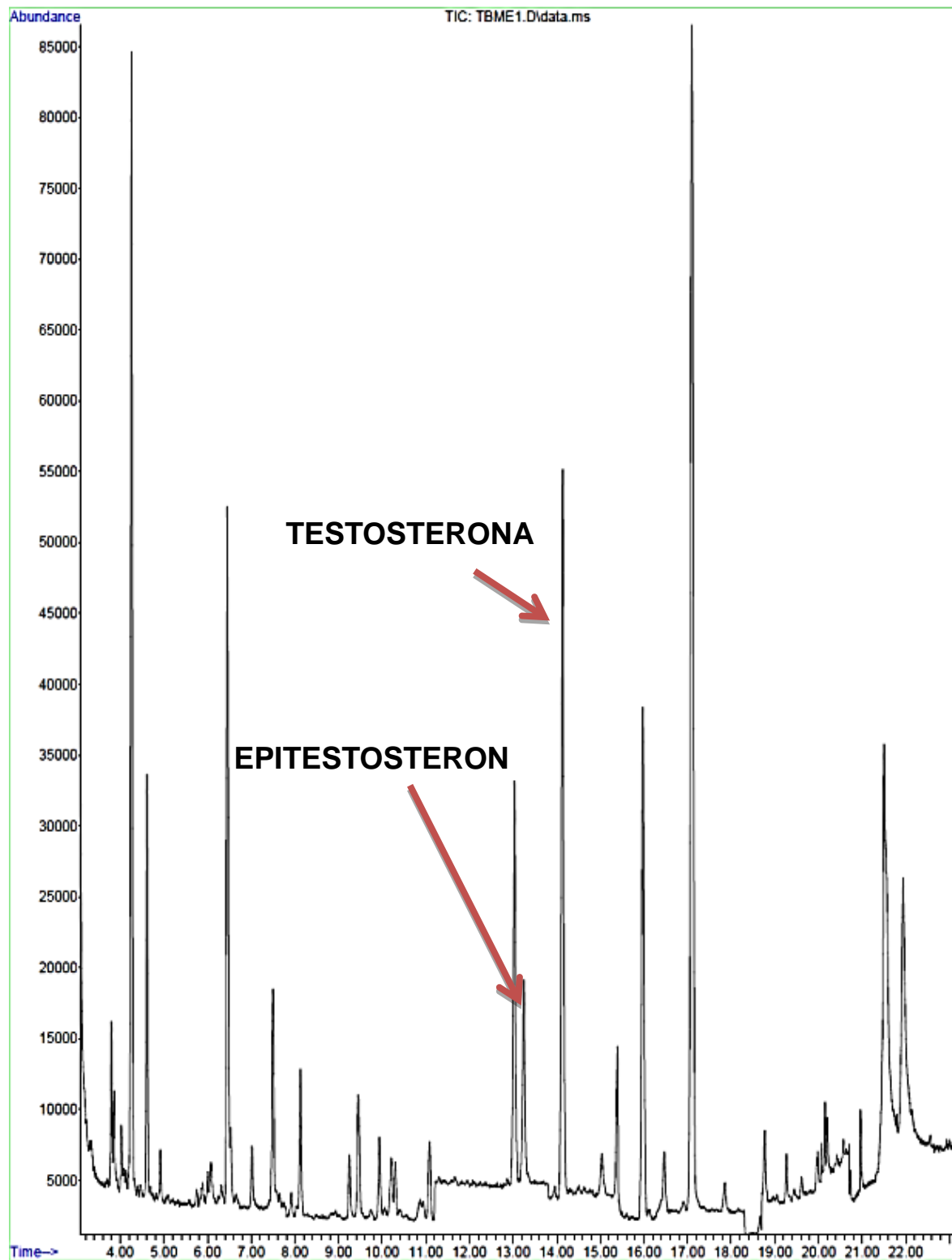
File :C:\msdchem\1\TESIS MLC\PRUEBAS DE DISOLVENTES\HEX1.D
Operator : MLC
Acquired : 15 Mar 2012 16:09 using AcqMethod S0410805.M
Instrument : GC MS 08
Sample Name: HEX1
Misc Info :
Vial Number: 11



File :C:\msdchem\1\TESIS MLC\PRUEBAS DE DISOLVENTES\PENT1.D
Operator : MLC
Acquired : 15 Mar 2012 14:31 using AcqMethod S0410805.M
Instrument : GC MS 08
Sample Name: PENT1
Misc Info :
Vial Number: 7

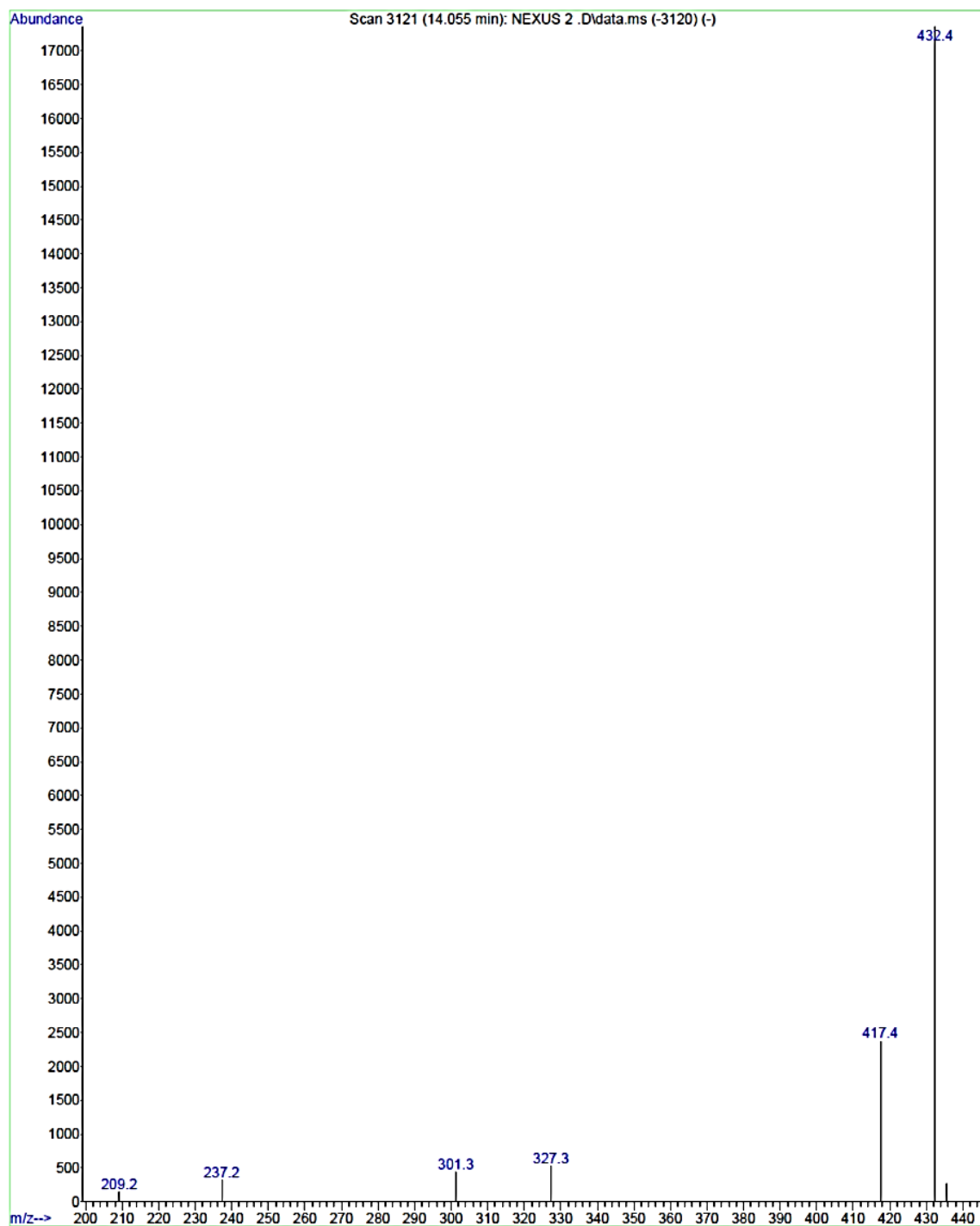


File :C:\msdchem\1\TESIS MLC\PRUEBAS DE DISOLVENTES\TBME1.D
Operator : MLC
Acquired : 15 Mar 2012 12:53 using AcqMethod S0410805.M
Instrument : GC MS 08
Sample Name: TBME1
Misc Info :
Vial Number: 3



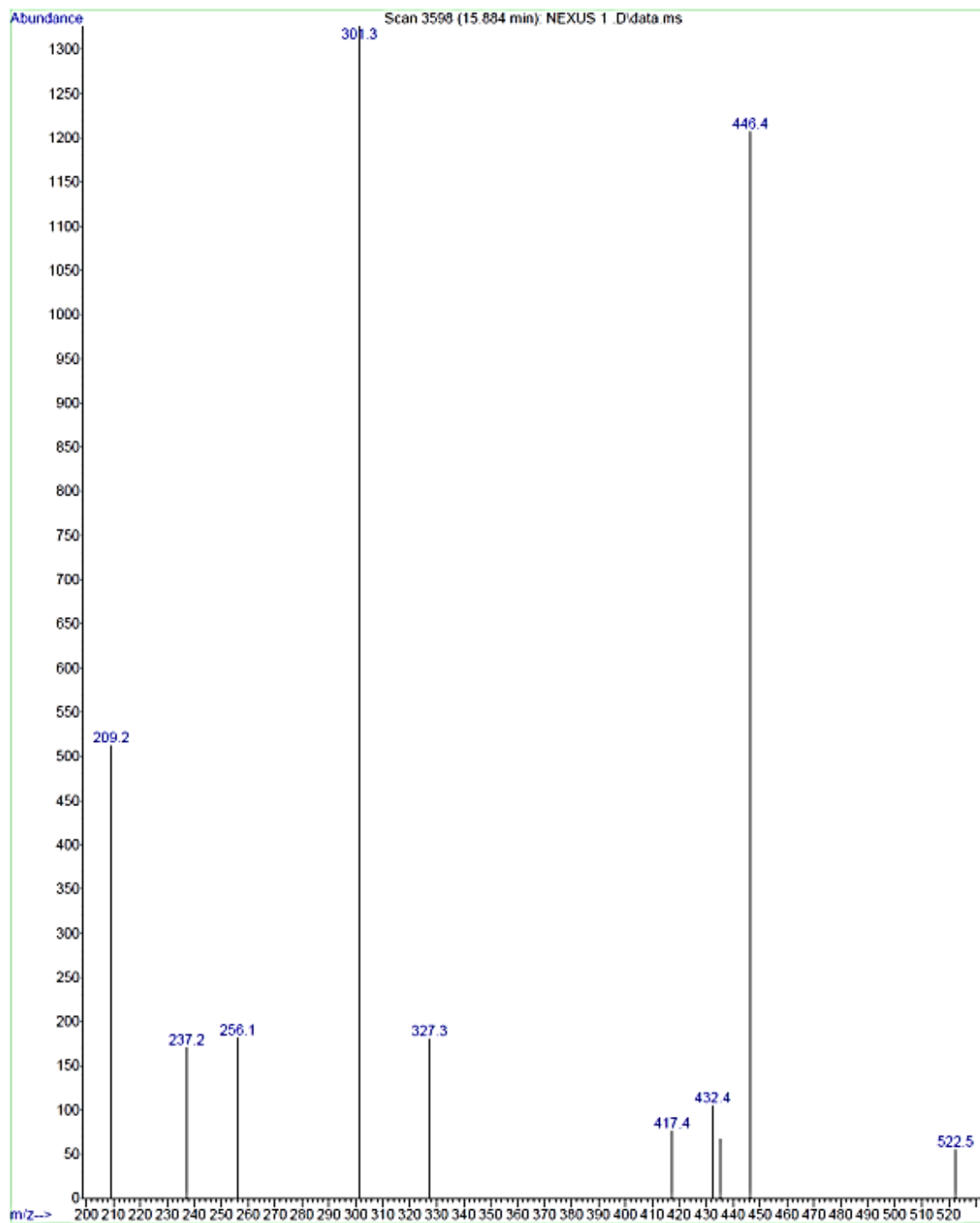
Anexo 4.- Espectro de masas de la testosterona, epitestosterona TMS.

File :C:\msdchem\1\TESIS MLC\PRUEBAS DE EXTRACCION\NEXUS 2 .D
Operator : MLC
Acquired : 21 Mar 2012 17:52 using AcqMethod MC017V01.M
Instrument : GCMS-10
Sample Name: NEXUS 2 EFS
Misc Info :
Vial Number: 15



Anexo 4.- Espectro de masas de la metiltestosterona-TMS.

File :C:\msdchem\1\TESIS MLC\PRUEBAS DE EXTRACCION\NEXUS 1 .D
Operator : MLC
Acquired : 21 Mar 2012 17:26 using AcqMethod MC017V01.M
Instrument : GCMS-10
Sample Name: NEXUS 1 EFS
Misc Info :
Vial Number: 14



Anexo 5- Hojas de calculo de las curvas de calibración de testosterona y epitestosterona para la Linealidad, Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.

Determinación: Curva de calibración por GC/MS-10

Analito: TESTOSTERONE

PNT: NA

Fecha: 15/05/2012

Estándar interno: METHYLTESTOSTERONA

Lote: NA

Límite de corte (µg/mL): NA

Submuestra: NA

Curva de calibración

Muestra	El	Ion	446	ANALITO	Ion	432	t _{RR}	RC Analito/El	RA Analito/El	ΔRA _i y el valor medio	Evaluación (% < 10 %)
	C (ng/mL)	t _R (min)	Área	C (ng/mL)	t _R (min)	Área					
BLO1											
CA11	125	15.938	13,976	1	14.097	12,425	0.8845	0.008	0.889	1.831	Se acepta réplica
CA12	125	15.927	12,901	1	14.089	11,205	0.8846	0.008	0.869		
CA13	125	15.919	12,358	1	14.089	10,647	0.8850	0.008	0.862		
CA21	125	15.942	19,159	50.0	14.116	784,944	0.8855	0.400	40.970	1.006	Se acepta réplica
CA22	125	15.942	18,702	50.0	14.109	784,893	0.8850	0.400	41.968		
CA23	125	15.950	18,576	50.0	14.116	782,012	0.8850	0.400	42.098		
CA31	125	15.923	19,563	100.0	14.097	1,484,857	0.8853	0.800	75.901	0.841	Se acepta réplica
CA32	125	15.927	19,344	100.0	14.101	1,453,354	0.8854	0.800	75.132		
CA33	125	15.931	18,886	100.0	14.108	1,412,136	0.8856	0.800	74.772		
CA41	125	15.912	8,688	150.0	14.082	990,734	0.8850	1.200	114.035	0.171	Se acepta réplica
CA42	125	15.911	8,263	150.0	14.078	942,816	0.8848	1.200	114.101		
CA43	125	15.908	8,085	150.0	14.074	918,309	0.8847	1.200	113.582		
CA51	125	15.927	17,392	200.0	14.105	2,690,189	0.8856	1.600	154.680	0.212	Se acepta réplica
CA52	125	15.934	17,109	200.0	14.109	2,640,670	0.8855	1.600	154.344		
CA53	125	15.931	17,166	200.0	14.105	2,660,777	0.8854	1.600	155.003		
CA61	125	15.915	21,512	250.0	14.101	4,224,187	0.8860	2.000	196.364	0.586	Se acepta réplica
CA62	125	15.915	21,052	250.0	14.097	4,107,005	0.8858	2.000	195.089		
CA63	125	15.911	20,579	250.0	14.093	3,996,560	0.8857	2.000	194.206		
	\bar{x}	15.926	16,295.1		14.0981		0.885	1.00	96.94		
	s	0.0124	4,464.8		0.01219		0.000	0.701	67.78		

Regresión Lineal

Ordenada al origen

0.149

Pendiente

96.659

r^2

0.999

n =

18.00

s_r

2.643

S_{xx}

7.28

s_m

0.980

S_{yy}

68099.93

s_b

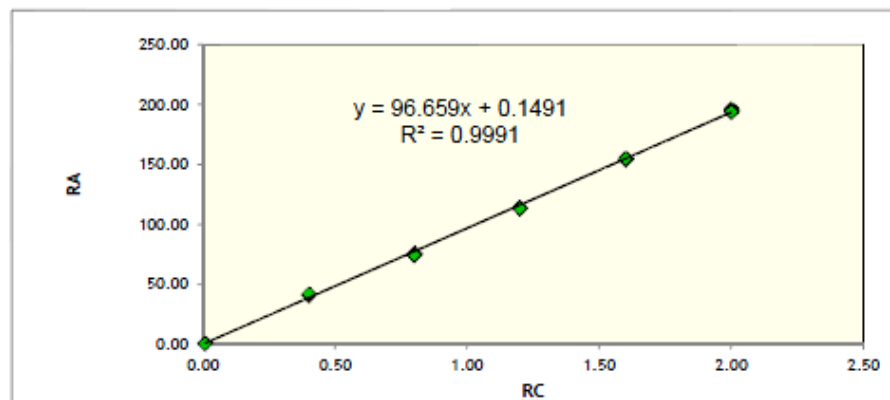
1.1076

S_{xy}

703.61

Desviación estándar

	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
CA11	0.99	96.05	95.41
CA12	0.99	96.07	95.43
CA13	0.99	96.08	95.43
CA21	0.60	55.97	33.65
CA22	0.60	54.97	33.05
CA23	0.60	54.84	32.98
CA31	0.20	21.04	4.24
CA32	0.20	21.80	4.39
CA33	0.20	22.17	4.46
CA41	0.20	17.10	3.40
CA42	0.20	17.16	3.41
CA43	0.20	16.64	3.31
CA51	1.00	99.43	99.29
CA52	1.00	98.15	98.02
CA53	1.00	97.27	97.14



ANÁLISIS CUANTITATIVO

Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.

Determinación: Curva de calibración por GC/MS-10

Fecha: 15/05/2012

Análito: EPITESTOSTERONE

Estándar interno: METHYLTESTOSTERONA

Límite de corte (µg/mL): NA

PNT: NA

Lote: NA

Submuestra: NA

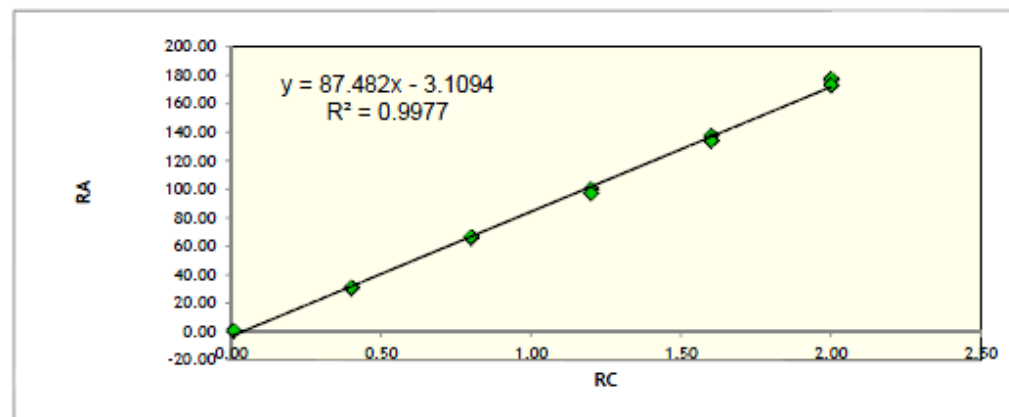
Curva de calibración

Muestra	EI	Ion	446	ANALITO	Ion	432	t _{RR}	RC Analito/EI	RA Analito/EI	ΔRA _i y el valor medio	Evaluación (% < 10 %)
	C (ng/mL)	t _R (min)	Área	C (ng/mL)	t _R (min)	Área					
BLO1											
CA11	125	15.923	21,435	1	13.203	14,332	0.8292	0.008	0.669	2.302	Se acepta réplica
CA12	125	15.919	20,577	1	13.199	13,128	0.8291	0.008	0.638		
CA13	125	15.911	19,267	1	13.199	13,027	0.8296	0.008	0.676		
CA21	125	15.915	16,488	50.0	13.207	499,603	0.8298	0.400	30.301	0.886	Se acepta réplica
CA22	125	15.923	15,499	50.0	13.203	479,746	0.8292	0.400	30.953		
CA23	125	15.908	15,003	50.0	13.203	465,636	0.8300	0.400	31.036		
CA31	125	15.927	18,882	100.0	13.215	1,241,643	0.8297	0.800	65.758	0.914	Se acepta réplica
CA32	125	15.927	18,333	100.0	13.215	1,210,317	0.8297	0.800	66.018		
CA33	125	15.927	17,591	100.0	13.215	1,174,995	0.8297	0.800	66.795		
CA41	125	15.919	13,032	150.0	13.199	1,305,933	0.8291	1.200	100.210	2.017	Se acepta réplica
CA42	125	15.911	12,982	150.0	13.203	1,264,915	0.8298	1.200	97.436		
CA43	125	15.912	12,547	150.0	13.203	1,217,558	0.8298	1.200	97.040		
CA51	125	15.927	19,040	200.0	13.219	2,620,231	0.8300	1.600	137.617	1.647	Se acepta réplica
CA52	125	15.927	19,084	200.0	13.215	2,562,206	0.8297	1.600	134.259		
CA53	125	15.927	18,605	200.0	13.219	2,498,386	0.8300	1.600	134.286		
CA61	125	15.923	14,728	250.0	13.211	2,601,627	0.8297	2.000	176.645	0.968	Se acepta réplica
CA62	125	15.915	14,255	250.0	13.211	2,528,914	0.8301	2.000	177.405		
CA63	125	15.915	14,128	250.0	13.207	2,445,014	0.8298	2.000	173.062		
	\bar{x}	15.920	16,748.7		13.2081		0.830	1.00	84.49		
	s	0.0067	2,790.6		0.00697		0.000	0.701	61.39		
	%CV	0.042	16.7		0.053		0.037				

Regresión Lineal

Ordenada al origen	-	3.109	
Pendiente		87.482	
r^2		0.998	
n =	18.00	s_y	6.116
S_{xx}	7.28	s_m	2.267
S_{yy}	56289.75	s_b	2.5631
S_{xy}	639.25		

	Desviación estándar		$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	
CA11	0.99	83.82	83.26
CA12	0.99	83.85	83.29
CA13	0.99	83.81	83.25
CA21	0.60	54.19	32.59
CA22	0.60	53.54	32.19
CA23	0.60	53.45	32.14
CA31	0.20	18.73	3.77
CA32	0.20	18.47	3.72
CA33	0.20	17.69	3.56
CA41	0.20	15.72	3.12
CA42	0.20	12.95	2.57
CA43	0.20	12.55	2.49
CA51	1.00	92.16	92.03
CA52	1.00	92.92	92.79
CA53	1.00	88.57	88.45



Anexo 6.- Curva de Calibración de testosterona y epitestosterona por GC/EM para evaluar el % de Recuperación y % C.V.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.

Determinación: TESTOSTERONA CURVA DEL 16/07/2012
 Fecha: 16/07/2012

Analito: TESTOSTERONA
 Estándar interno: T/E D3
 Limite de corte (µg/mL):

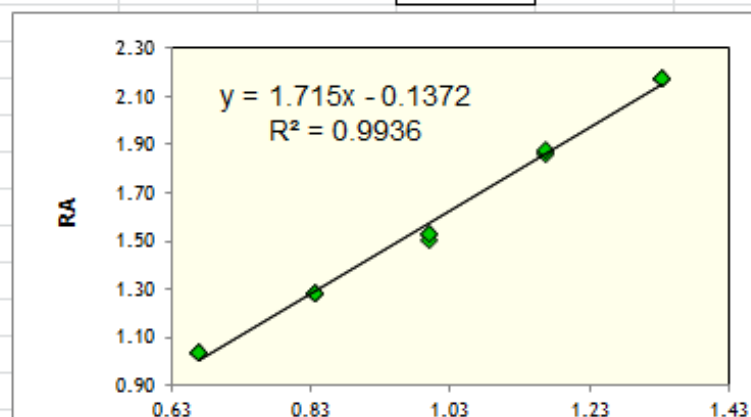
PNT: NA
 Lote: NA
 Submuestra: NA

Curva de calibración

Muestra	EI	Ion	435	ANALITO	Ion	432	t _{RR}	RC Analito/EI	RA Analito/EI	ΔRA _i y el valor medio	Evaluación (% < 10 %)
	C (µg/mL)	t _R (min)	Area	C (µg/mL)	t _R (min)	Area					
BLO1											
CA11	120	13.913	1,188,787	80.0	13.955	1,233,782	1.0030	0.667	1.038	0.129	Se acepta réplica
CA12	120	13.913	1,165,846	80.0	13.955	1,213,306	1.0030	0.667	1.041		
CA13	120	13.917	1,156,617	80.0	13.955	1,202,340	1.0027	0.667	1.040		
CA21	120	13.913	1,208,616	100.0	13.955	1,548,187	1.0030	0.833	1.281	0.090	Se acepta réplica
CA22	120	13.909	1,194,759	100.0	13.955	1,533,348	1.0033	0.833	1.283		
CA23	120	13.909	1,163,693	100.0	13.951	1,494,081	1.0030	0.833	1.284		
CA31	120	13.913	1,434,652	120.0	13.955	2,198,905	1.0030	1.000	1.533	0.731	Se acepta réplica
CA32	120	13.909	1,442,716	120.0	13.959	2,169,195	1.0036	1.000	1.504		
CA33	120	13.913	1,348,000	120.0	13.955	2,060,399	1.0030	1.000	1.528		
CA41	120	13.913	1,263,207	140.0	13.959	2,363,312	1.0033	1.167	1.871	0.624	Se acepta réplica
CA42	120	13.909	1,278,018	140.0	13.955	2,375,890	1.0033	1.167	1.859		
CA43	120	13.909	1,258,083	140.0	13.955	2,368,300	1.0033	1.167	1.882		
CA51	120	13.909	1,220,522	160.0	13.955	2,650,191	1.0033	1.333	2.171	0.128	Se acepta réplica
CA52	120	13.905	1,192,288	160.0	13.951	2,593,123	1.0033	1.333	2.175		
CA53	120	13.909	1,167,515	160.0	13.947	2,542,036	1.0027	1.333	2.177		
	\bar{x}	13.911			13.9545		1.003	1.00	1.58		
	s	0.0030	94,239.0		0.00297		0.000	0.244	0.42		
	%CV	0.021	#;DIV/0!		0.021		0.024				

Regresión Lineal

				<u>Desviación estándar</u>			
Ordenada al origen		-	0.137	$x_r - \bar{x}$	$y_r - \bar{y}$	$(x_r - \bar{x}) * (y_r - \bar{y})$	
Pendiente			1.715				
r^2			0.994				
n =	15.00	s_r	0.035	CA11	- 0.33	- 0.54	0.18
S_{xx}	0.83	s_m	0.038	CA12	- 0.33	- 0.54	0.18
S_W	2.47	s_b	0.0393	CA13	- 0.33	- 0.54	0.18
S_{xy}	1.43			CA21	- 0.17	- 0.30	0.05
				CA22	- 0.17	- 0.29	0.05
				CA23	- 0.17	- 0.29	0.05
				CA31	-	- 0.05	-
				CA32	-	- 0.07	-
				CA33	-	- 0.05	-
				CA41	0.17	0.29	0.05
				CA42	0.17	0.28	0.05
				CA43	0.17	0.30	0.05
				CA51	0.33	0.59	0.20
				CA52	0.33	0.60	0.20
				CA53	0.33	0.60	0.20



ANÁLISIS CUANTITATIVO

Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.

Determinación: EPITESTOSTERONA 16/07/2012
 Fecha: 16/07/2012

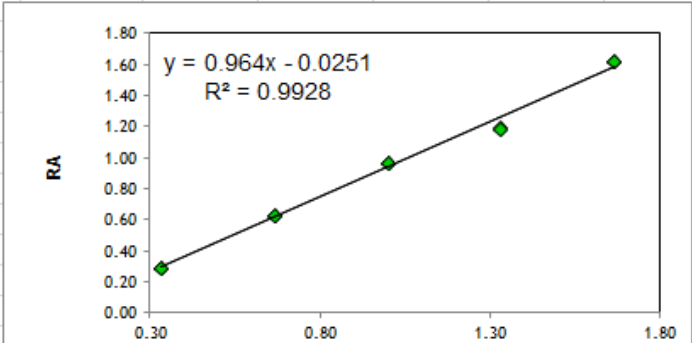
Analito: Epitestosterone
 Estándar interno: T/E D3
 Límite de corte ($\mu\text{g/mL}$): NA

PNT: NA
 Lote: NA
 Submuestra: NA

Curva de calibración

Muestra	EI	Ion	435	ANALITO	Ion	432	t_{RR}	RC Analito/EI	RA Analito/EI	ΔRA_i y el valor medio	Evaluación (% < 10 %)
	C ($\mu\text{g/mL}$)	t_R (min)	Área	C ($\mu\text{g/mL}$)	t_R (min)	Área					
BLO1											
CA11	30	13.012	316,061	10.0	13.046	92,074	1.0026	0.333	0.291	0.093	Se acepta réplica
CA12	30	13.012	308,723	10.0	13.050	89,963	1.0029	0.333	0.291		
CA13	30	13.011	305,700	10.0	13.046	88,859	1.0027	0.333	0.291		
CA21	30	13.019	356,443	20.0	13.061	223,736	1.0032	0.667	0.628	0.208	Se acepta réplica
CA22	30	13.019	335,951	20.0	13.054	211,648	1.0027	0.667	0.630		
CA23	30	13.019	327,218	20.0	13.058	205,618	1.0030	0.667	0.628		
CA31	30	13.015	277,324	30.0	13.046	268,960	1.0024	1.000	0.970	0.158	Se acepta réplica
CA32	30	13.015	272,833	30.0	13.046	263,683	1.0024	1.000	0.966		
CA33	30	13.015	267,812	30.0	13.050	259,408	1.0027	1.000	0.969		
CA41	30	13.012	350,217	40.0	13.050	415,907	1.0029	1.333	1.188	0.133	Se acepta réplica
CA42	30	13.019	331,735	40.0	13.050	394,839	1.0024	1.333	1.190		
CA43	30	13.019	322,443	40.0	13.046	383,105	1.0021	1.333	1.188		
CA51	30	13.015	328,612	50.0	13.046	531,187	1.0024	1.667	1.616	0.125	Se acepta réplica
CA52	30	13.015	322,743	50.0	13.050	521,933	1.0027	1.667	1.617		
CA53	30	13.012	315,131	50.0	13.042	510,465	1.0023	1.667	1.620		
	\bar{x}	13.015	315,929.7		13.0494		1.003	1.00	0.94		
	s	0.0031	26,274.6		0.00504		0.000	0.488	0.47		
	%CV	0.023	8.3		0.039		0.031				

<u>Regresión Lineal</u>				<u>Desviación estándar</u>			
Ordenada al origen	-	0.025		$x_r - \bar{x}$	$y_r - \bar{y}$	$(x_r - \bar{x})(y_r - \bar{y})$	
Pendiente		0.964					
r^2		0.993					
n =	15.00	s_r	0.041	CA11	- 0.67	- 0.65	0.43
S_{xx}	3.33	s_m	0.023	CA12	- 0.67	- 0.65	0.43
S_{yy}	3.12	s_b	0.0251	CA13	- 0.67	- 0.65	0.43
S_{xy}	3.21			CA21	- 0.33	- 0.31	0.10
				CA22	- 0.33	- 0.31	0.10
				CA23	- 0.33	- 0.31	0.10
				CA31	-	0.03	-
				CA32	-	0.03	-
				CA33	-	0.03	-
				CA41	0.33	0.25	0.08
				CA42	0.33	0.25	0.08
				CA43	0.33	0.25	0.08
				CA51	0.67	0.68	0.45
				CA52	0.67	0.68	0.45
				CA53	0.67	0.68	0.45



Anexo 7.- Hojas de cálculos de tres muestras reales de orina analizadas por el método desarrollado para la confirmación de la relación de la concentración de testosterona y epitestosterona.

EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN TESTOSTERONE/EPITESTOSTERONE A PARTIR DE LOS PATRONES DEUTERADOS

DATOS GENERALES								
FECHA	12/03/2012	ATENCIÓN Cumplimentar una hoja de cálculo por cada muestra Rellenar solamente las casillas de color y Comparar con los valores cuando proceda	Screening:	LOTE:	M12S4110014			
COMPUESTO	T/E		[E]=		5.3 ng/ml			
LOTE DE ANÁLISIS	NA		[T]=		450.7 ng/ml			
MUESTRA	3		T/E=		84.9			
VOLUMEN MUESTRA (ml)	2							
SPECIFIC GRAVITY	1.021							
S.G. FACTOR	0.952							
ISTD deuterado			CONCENTRACIONES Y RATIOS					
	Volumen (ul)	Conc. (ng/ml)	T/E	[E]	[E] _{1,020}	[T]	[T] _{1,020}	[T]/[E]
T-D3/E-D3	10	4.000	69.92	2.99	2.84	208.73	198.79	69.92
E-D3		5.000	70.34	3.62	3.45	254.47	242.35	70.34
T-D3		20.000	70.64	3.31	3.15	233.66	222.53	70.64
			70.30	3.30	3.15	232.29	221.23	70.30
			0.36	0.32	0.30	22.90	21.81	0.36

EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN TESTOSTERONE/EPITESTOSTERONE A PARTIR DE LOS PATRONES DEUTERADOS

DATOS GENERALES								
FECHA	28/03/2012	ATENCIÓN Cumplimentar una hoja de cálculo por cada muestra Rellenar solamente las casillas de color y Comparar con los valores cuando proceda	Screening:	LOTE:	1			
COMPUESTO	T/E		[E]=		8.48 ng/ml			
LOTE DE ANÁLISIS	NA		[T]=		56.5 ng/ml			
MUESTRA	4		T/E=		6.67			
VOLUMEN MUESTRA (ml)	2							
SPECIFIC GRAVITY	1.021							
S.G. FACTOR	1.000							
ISTD deuterado			CONCENTRACIONES Y RATIOS					
	Volumen (ul)	Conc. (ng/ml)	T/E	[E]	[E] _{1,020}	[T]	[T] _{1,020}	[T]/[E]
T-D3/E-D3	20	4.000	5.75	5.72	5.72	32.87	32.87	5.75
E-D3		10.000	5.87	3.05	3.05	17.92	17.92	5.87
T-D3		40.000	5.76	3.79	3.79	21.85	21.85	5.76
			5.79	4.19	4.19	24.21	24.21	5.79
			0.07	1.38	1.38	7.75	7.75	0.07

EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN TESTOSTERONE/EPITESTOSTERONE A PARTIR DE LOS PATRONES DEUTERADOS

DATOS GENERALES			ATENCIÓN		Screening:	LOTE:	1	
FECHA	25/06/2012		Completar una hoja de cálculo por cada muestra		[E]=	8.48	ng/ml	
COMPUESTO	T/E		Rellenar solamente las casillas de color		[T]=	56.5	ng/ml	
LOTE DE ANÁLISIS	NA		y Comparar con los valores cuando proceda		T/E=	6.67		
MUESTRA	6							
VOLUMEN MUESTRA (ml)	2							
SPECIFIC GRAVITY	1.021							
S.G. FACTOR	1.000							
			CONCENTRACIONES Y RATIOS					
			T/E	[E]	[E] _{1,020}	[T]	[T] _{1,020}	[T]/[E]
			4.50	9.62	9.62	43.33	43.33	4.50
			4.46	8.59	8.59	38.29	38.29	4.46
			4.79	7.39	7.39	35.36	35.36	4.79
			4.58	8.53	8.53	39.00	39.00	4.58
			0.18	1.12	1.12	4.03	4.03	0.18
ISTD deuterado			Verificación patrón deuterado					
	Volumen (ul)	Conc. (ng/ml)	Fecha última verificación contribución isotópica	26/06/2012	Fecha última verificación relación (T/E)-D3	26/06/2012		
			Lote ISTD	4				
T-D3/E-D3	5	4.000	D0 Test	0.00171	T-D3/E-D3	4.000		
E-D3		2.000	D0 Epit	0.00266	T-D3	4.000		
T-D3		8.000						

Anexo 8.- Cromatograma de extracto de iones para testosterona y epitestosterona con sus respectivos El deuterados.

