

# VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ESTEROIDES ANDROGÉNICOS EN ORINA DE BOVINOS POR CROMATOGRFÍA GASEOSA ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS

## VALIDATION METHOD FOR RESIDUE ANALYSIS OF ANDROGENIC STEROIDS IN BOVINE URINE BY GASCHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY

Ángel Totoricagüena, Silvio Barletta y Carlos Alli (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria - Senasa, Argentina)

### Resumen

Los esteroides androgénicos están prohibidos para su uso en animales productores de alimentos según la Resolución N.º 447/2004 del Senasa y la Directiva 96/23/CE del Consejo Europeo.

El método de análisis por cromatografía gaseosa acoplado a un espectrómetro de masas simple Quadropolo (GC-MS) fue validado para confirmar y cuantificar 17 $\beta$ -19 Nortestosterona (b-NTT), 17 $\alpha$ -19 Nortestosterona ( $\alpha$ -NTT), 17 $\beta$ -Boldenona ( $\beta$ -BLD) y Metiltestosterona (MTST) en muestras de orina de los animales, utilizando 17 $\beta$ -Testosterona-d3 (TST-D3) y 17 $\beta$ -Boldenona-d3 (BLD-D3) como estándares internos. El método de validación se llevó a cabo de acuerdo con la decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE y los requisitos y reglamentos de Senasa.

**Palabras clave:** GC-MS, 17 $\beta$ -19 Nortestosterona, 17 $\alpha$ -19 Nortestosterona, 17 $\beta$ -Boldenona, Metiltestosterona, 17 $\beta$ -Testosterona-d3, 17 $\beta$ -Boldenona-d3.

### Abstract

Androgenic Steroids are prohibited for use in food producing animals according to Resolution N° 447/2004 by Senasa (Argentina) and Council Directive 96/23/EC.

A GC-MS (Single Quad) method was validated to measure 17 $\beta$ -19 Nortestosterone ( $\beta$ -NTT), 17 $\alpha$ -19 Nortestosterone ( $\alpha$ -NTT), 17 $\beta$ -Boldenone ( $\beta$ -BLD) and Metiltestosterone (MTST) in animal urine samples using 17 $\beta$ -Testosterone-d3 (TST-D3) and 17 $\beta$ -Boldenone-d3 (BLD-D3) as internal standards. The validation method was performed according to the Commission Decision 2002/657/EC requirements and regulations of Senasa.

**Keywords:** GC-MS, 17 $\beta$ -19 Nortestosterone, 17 $\alpha$ -19 Nortestosterone, 17 $\beta$ -Boldenone, Metiltestosterone, 17 $\beta$ -Testosterone-d3, 17 $\beta$ -Boldenone-d3.

### Introducción

Los anabólicos androgénicos son esteroides derivados de la testosterona, hormona sexual masculina que se encuentra en forma natural en el organismo. Estos esteroides tienen efectos en diferentes zonas y tejidos del organismo. El término “anabólico” se debe al desarrollo del crecimiento muscular que esas sustancias promueven, mientras que el término “androgénico” se debe a las características sexuales masculinas que aportan. En la Figura 1, podemos ver las estructuras químicas de los androgénicos mencionados en este trabajo.

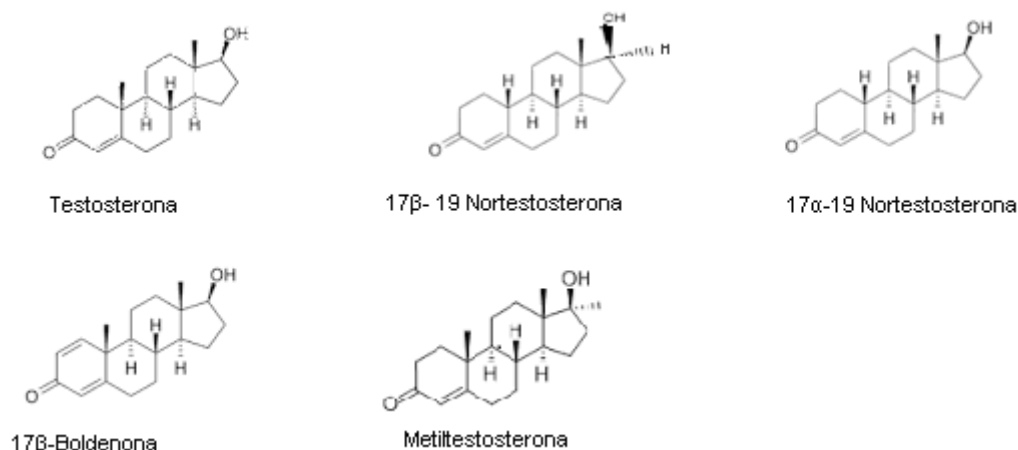


Figura 1: Estructuras químicas de los androgénicos analizados

El esteroide 17β-19 Nortestosterona (también conocido como Nandrolona) se ha utilizado durante un largo período de tiempo en humanos y, en un plazo menor, en medicina veterinaria. El hallazgo de esta sustancia se consideraba una prueba de administración exógena hasta 1984, cuando se comprobó la ocurrencia endógena en sementales y, unos años después, en jabalíes. También en la actualidad se demostró la producción natural de la β-NTT en cerdos y de la α-NTT en vacas preñadas y terneros recién nacidos.

Estas sustancias no presentan Límite Máximo de Residuos (LMR), para lo cual en la validación se siguieron las recomendaciones de Límites Mínimos de Performance Exigidos en el documento CRL Guidance Paper (diciembre de 2007) para los laboratorios de la Comunidad Europea.

Los parámetros evaluados en la validación de este método se realizaron según lo establecido en la Resolución N.º 138/2002 del Senasa y sus disposiciones modificatorias (N.º 125/2006 y N.º 06/2004), que están alineadas con la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE.

## Materiales y métodos

### Muestras

La validación se realizó en orina bovina, libre de los androgénicos estudiados en el presente trabajo, sin sólidos en suspensión y conservada a -15 °C.

### Materiales de laboratorio

- Indicador de pH en tiras reactivas para los rangos de 0-14 y 5,2-7,2
- Jeringas verificadas de 50, 100 y 250 µl
- Matraces aforados calibrados de 10, 25 y 50 ml
- Micropipeta rango de 10 a 100 µl y 20 a 200 µl
- Pipetas aforadas de 2, 5, 10 y 25 ml verificadas
- Probetas graduadas de 100, 500 y 1000 ml
- Pipetas Pasteur
- Tubos graduados de vidrio para centrifuga de 15 ml con fondo cónico
- Tubos Falcón de polipropileno de 50 ml con tapa a rosca
- Vaso de precipitados de 50, 100 y 250 ml

### Soluciones de trabajo

- Buffer Acetato de Sodio 2M, pH= 5,2
- Metanol: Agua (40:60)
- Metanol: Agua (50:50)
- Hidróxido de Sodio 1M

- Enzima -Glucuronidasa (Tipo H-1 Helix pomatia) 1400U/ml en Buffer Acetato de Sodio 2M, pH= 5,2
- Derivatizante, Anhídrido Heptafluorobutírico (HFAA): Acetona (1:4)

Todos los reactivos utilizados son de calidad para análisis.

### Instrumental utilizado

Se utilizó un espectrómetro de masas modelo 5975C acoplado a un cromatógrafo gaseoso, modelo 7890A, ambos de la marca Agilent Technologies con inyector automático.

Condiciones cromatográficas:

Temperatura inyector: 220 °C.

Temperatura interfase: 290 °C.

Programa de temperatura: temperatura inicial de 100 °C por un tiempo de un minuto. Primera rampa de 10 °C/minuto, temperatura intermedia de 205 °C durante cinco minutos; una segunda rampa de 8 °C/minuto, temperatura intermedia de 260 °C por cinco minutos; y una última rampa de 30 °C/minuto hasta los 280 °C por cinco minutos.

Volumen inyección: 3 µl.

Flujo Helio: 0,7 ml/minuto (en la columna con presión de 7.4 psi).

Temp. MS Source/ MS Quad: 230 °C/ 150 °C.

EMV Delta: 506 V.

Energía de ionización: 70eV.

### Estándares analíticos

Se utilizó MTST de marca Dr. Ehrenstorfer, la  $\alpha/\beta$ -NTT,  $\beta$ -BLD y los dos estándares internos marca National Measurement Institute de Australia ( $\beta$ -NTT y  $\beta$ -BLD son glucurónidos); las concentraciones de las soluciones de fortificación:  $\alpha$ -NTT y MTST de 400 ng/ml,  $\beta$ -NTT y  $\beta$ -BLD de 200 ng/ml como droga libre; la solución de trabajo de los estándares internos (SI): TST-D3 de 800 ng/ml y para BLD-D3 de 200 ng/ml.

### Procedimiento de extracción o clean up del método

Se colocan 10 ml de orina en un tubo Falcon, se ajusta el pH a un valor de 5,2 con ácido acético glacial, se agrega 1 ml de la solución de enzima (1400 U) y se agita con vortex por treinta segundos. Se incuba a 37 °C durante toda la noche para que se produzca la hidrólisis enzimática. Se deja que la muestra tome temperatura ambiente mientras se acondicionan columnas de HLB (200 mg y 6 ml de capacidad) con 5 ml de metanol y luego con 5 ml de agua bidestilada. Se siembra la muestra cuantitativamente. Se lava con 10 ml de agua bidestilada y luego con 10 ml de metanol (agua 40:60), dejando secar la columna durante tres minutos con vacío. Como último lavado se agregan 10 ml de hexano y se seca durante tres minutos con vacío.

La elución se realiza con 6 ml de metanol en tubos de vidrio de 15 ml de capacidad, se llevan a evaporar a sequedad en un baño seco a (55 ± 5 °C) bajo corriente de aire. Se reconstituye con 0,2 ml de Metanol, se vortea durante un minuto y se agregan 3 ml de Buffer Acetato 2 M pH= 5,2 y se vortea durante treinta segundos para una posterior purificación en columnas de C18 (500 mg y 3 ml de capacidad). Se acondicionan las columnas de C18 con 10 ml de metanol y luego con 10 ml de agua bidestilada y se siembra la muestra cuantitativamente. Se lava con 10 ml de agua bidestilada y luego con 10 ml de metanol (agua 50:50), dejando secar la columna durante tres minutos con vacío. Por último, se agregan 10 ml de hexano y se descartan, secando durante tres minutos la columna; finalmente, se eluye con 4 ml de éter etílico, recogiendo el eluato en tubos de vidrio de 15 ml. Se realiza posteriormente una limpieza del eluato con una extracción líquido-líquido con 1 ml de solución Hidróxido de Sodio 1 M, se vortea durante un minuto y se descarta la fase acuosa, repetir esta purificación. Se colocan los tubos en baño seco hasta sequedad a (40 ± 3 °C) bajo corriente de aire, se reconstituye con 500 µl de metanol y se vortea durante un minuto para pasar a vial y llevar a sequedad nuevamente.

Se reconstituye con 50 µl de solución derivatizante, se vortea durante un minuto y se coloca en baño termostático durante sesenta minutos a una temperatura de (60 ± 2 °C), luego se evapora nuevamente a sequedad a una temperatura de (55 ± 5 °C) bajo corriente de aire para luego reconstituirse con 30 µl de isooctano e inyectarse en el cromatógrafo gaseoso para su posterior análisis.

### Resultados

Para la selección de los iones para cuantificación y cualificación se realizó previamente un método de SCAN, se inyectó cada analito por separado y a una

concentración de 1 µg/ml. En la Figura 2, se puede ver el SCAN de la β-BLD, mientras que en la Tabla 1 se presentan los iones seleccionados:

Tabla 1: Iones seleccionados para cada androgénico

Analito	Ión Cuantificador	Iones Cualificadores
α/β-NTT	666	453, 318, 306
β-BLD	464	678, 369, 343
MTST	465	480, 369, 355
BLD D3		681
TST D3		683

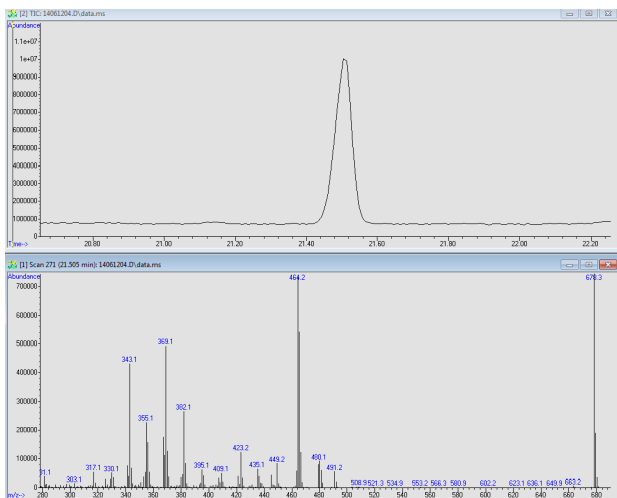


Figura 2: SCAN de la β-BLD

### Linealidad

La curva de calibración se realiza sobre matriz, que se somete al mismo proceso extractivo antes de ser inyectada.

El rango analítico se seleccionó de forma tal que el primer punto de la curva de calibración y nivel de los fortificados cumpla con el Límite Mínimo de Performance Exigido (Concentración Nominal de Referencia [CNR]), y que en ese punto se cumplan también los criterios de cualificación (Relación de Areas entre los iones cualificadores con el cuantificador) de un analito por GC-MS.

Se procesaron un blanco de matriz con el agregado solo de la solución de SI y cinco niveles de concentración; cada nivel se inyectó por triplicado. Los volúmenes de fortificación son: 25, 50, 100, 150 y 200 µl de la solución de androgénicos y 50 µl de la solución de estándar interno (según Materiales y Métodos/Estándares analíticos). Las curvas se presentan en la Figura 3 y en la Figura 4.

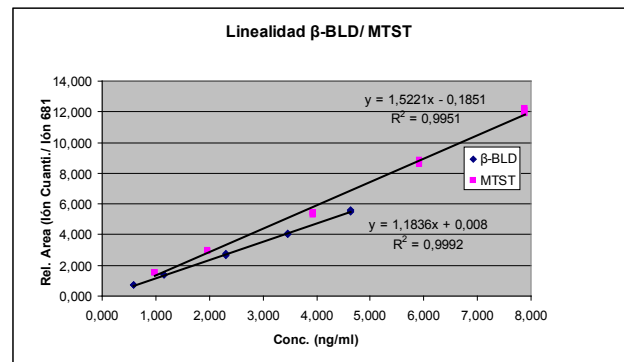


Figura 3: Curva de linealidad de β-BLD y MTST

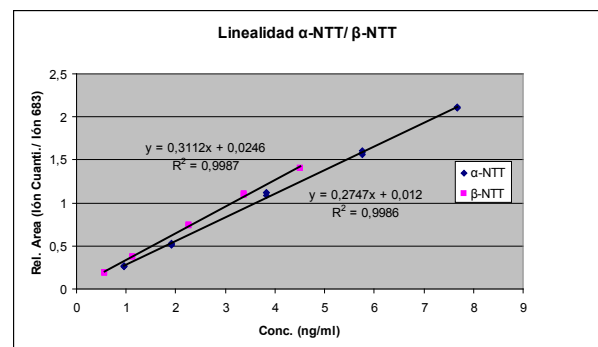


Figura 4: Curva de linealidad de α-NTT y β-NTT

### Repetibilidad y reproducibilidad

Se realizaron dos tandas por dos analistas distintos en semanas diferentes; cada una de ellas, fue procesada con su curva de calibración respectiva y cinco niveles de concentración diferentes. En la Tabla 2, se presentan los parámetros obtenidos para cada uno de los anabólicos estudiados.

En la Figura 5, se observa el monitoreo de iones seleccionados (SIM) para cada analito.

Tabla 2: Parámetros obtenidos de la validación para cada androgénico

Análito	Rango Analítico (ng/ml)	Recuperación% Promedio	LD o CC $\alpha$ (ng/ml)	CC $\beta$ (ng/ml)
$\alpha$ -NTT	0,96 – 7,67	96,2	0,32	0,55
$\beta$ -NTT	0,56 – 4,51	95,8	0,12	0,26
$\beta$ -BLD	0,58 – 4,63	100,4	0,11	0,13
MTST	0,99 – 7,88	99,5	0,19	0,34

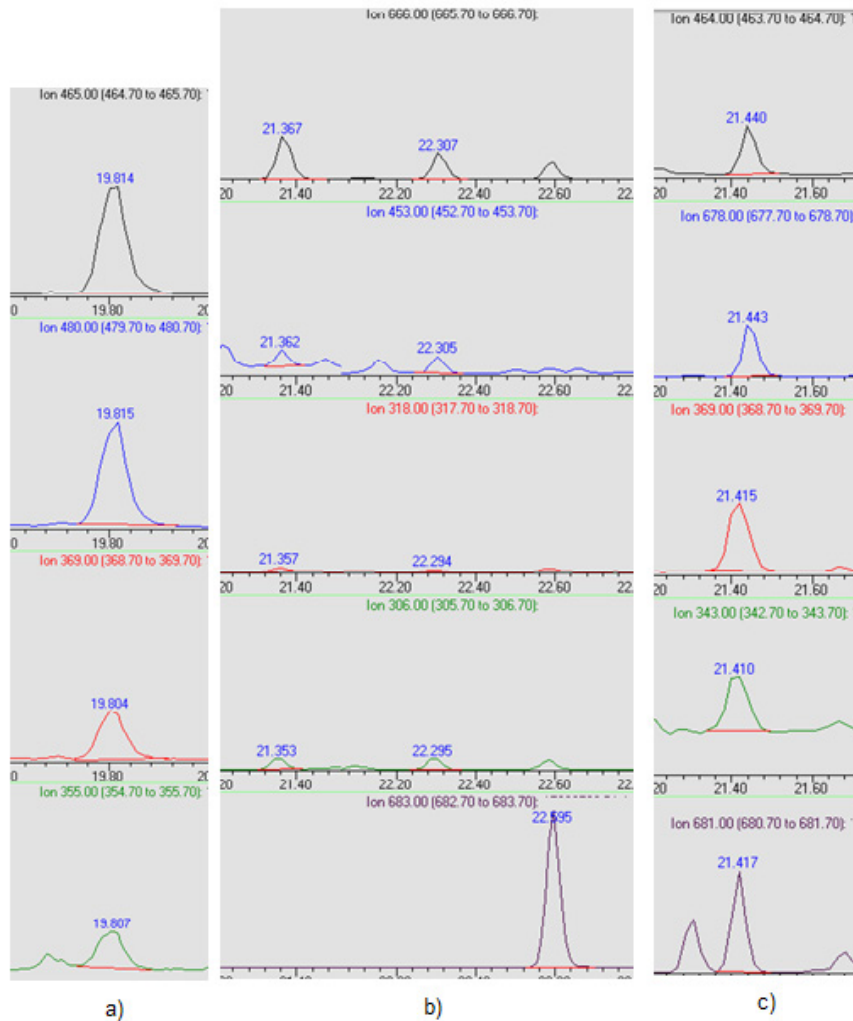


Figura 5: a) SIM de MTST. b) SIM de  $\alpha$ -NTT. c) SIM para  $\beta$ -BLD.

En la Tabla 3, se observan los valores de reproducibilidad para cada nivel de concentración, la reproducibilidad global del método y la incertidumbre expandida utilizando un  $k=2$  para obtener un nivel de confianza de 95 %.

Tabla 3: Repetibilidad y reproducibilidad de cada androgénico para cada nivel de fortificación y por cada analista

		Nivel 1 (CV%)	Nivel 2 (CV%)	Nivel 3 (CV%)	Nivel 4 (CV%)	Nivel 5 (CV%)	CV% Global	Incertidumbre%
α-NTT	Analista 1	10,24	9,73	12,33	1,45	6,13	9,62	19,24
	Analista 2	2,05	3,25	5,29	1,86	7,92		
	Total	14,40	6,68	9,10	5,29	6,40		
β-NTT	Analista 1	7,59	8,39	9,41	0,78	3,20	9,01	18,03
	Analista 2	1,01	2,87	3,83	3,05	4,00		
	Total	15,66	5,71	6,69	4,58	3,25		
β-BLD	Analista 1	2,27	2,31	2,80	2,98	3,77	5,47	10,94
	Analista 2	0,95	1,35	3,94	2,59	1,14		
	Total	2,26	4,09	3,44	2,76	2,56		
MTST	Analista 1	5,76	5,33	9,73	3,17	5,65	7,73	15,45
	Analista 2	6,53	14,25	2,54	8,60	5,87		
	Total	9,21	9,73	6,50	6,18	5,98		

#### Verificación del Mínimo Nivel de Confirmación

Se realizaron veinte muestras fortificadas a una concentración equivalente al nivel más bajo del rango analítico con su curva de calibración a fin de comprobar la detección en ese valor de concentración, como también para demostrar que en ese punto se procede a identificar la sustancia mediante la cualificación de los iones seleccionados para tal fin.

Se observó la detección con su correspondiente cualificación y cuantificación de la totalidad de las muestras analizadas, como puede observarse en la Tabla 4.

#### Selectividad

Se procesaron veinte muestras de orina de origen bovino de diferentes orígenes, fortificadas con el estándar interno y su respectiva curva de calibración, con el fin de analizar posibles interferencias en la metodología elegida.

En el análisis de resultados posterior, no se observaron interferencias en ninguno de los iones elegidos para cada analito en el tiempo de retención correspondiente.

#### Robustez

El estudio de robustez se realizó en ocho muestras con su curva de calibración respectiva, variando cinco parámetros del procedimiento extractivo de acuerdo al Test de Youden y Steiner. Los parámetros elegidos para el estudio pueden verse en la Tabla 5 y la distribución de las muestras para su análisis según la Tabla 6.

Tabla 4: Verificación del Mínimo Nivel de Confirmación para cada androgénico

Muestra N°	α-NTT		b-NTT		b-BLD		MTST	
	Conc. Hallada ng/ml	%Rec.	Conc. Hallada ng/ml	%Rec.	Conc. Hallada ng/ml	%Rec.	Conc. Hallada ng/ml	%Rec.
1	0,795	83,0	0,617	109,5	0,569	98,4	0,819	83,1
2	0,846	88,2	0,593	105,1	0,547	94,6	0,888	90,1
3	0,848	88,5	0,594	105,3	0,569	98,5	0,908	92,1
4	0,828	86,4	0,606	107,5	0,552	95,4	0,906	91,9
5	0,769	80,3	0,587	104,1	0,582	100,7	0,846	85,9
6	0,682	71,2	0,635	112,7	0,588	101,7	0,956	97,0
7	0,849	88,6	0,616	109,3	0,558	96,4	0,859	87,2
8	0,784	81,9	0,578	102,5	0,517	89,4	0,937	95,1
9	0,628	65,6	0,528	93,7	0,541	93,5	0,899	91,2
10	0,878	91,6	0,606	107,4	0,643	111,2	1,069	108,4
11	0,907	94,6	0,619	109,9	0,551	95,3	1,026	104,1
12	0,820	85,6	0,541	96,0	0,568	98,3	0,934	94,8
13	0,841	87,7	0,615	109,1	0,586	101,3	0,901	91,4
14	0,777	81,1	0,598	106,1	0,568	98,2	0,894	90,7
15	0,803	83,8	0,605	107,4	0,538	93,0	0,919	93,3
16	0,771	80,5	0,563	99,9	0,553	95,6	0,837	85,0
17	0,651	68,0	0,511	90,6	0,527	91,2	0,839	85,1
18	0,830	86,6	0,613	108,7	0,543	93,8	0,842	85,4
19	0,774	80,8	0,571	101,2	0,532	92,1	0,960	97,5
20	0,851	88,8	0,617	109,4	0,577	99,7	0,942	95,6

Tabla 5: Parámetros para el estudio de la robustez

<b>A</b>	10 ml Orina Bovino
<b>a</b>	10 ml Orina Equino
<b>B</b>	Lavar con 10 ml MeOH:Agua (40:60)
<b>b</b>	Lavar con 10 ml MeOH:Agua (60:40)
<b>C</b>	Eluir columna HLB con 6 ml MeOH
<b>c</b>	Eluir columna HLB con 4 ml MeOH
<b>D</b>	Reconstituir con 3 ml de Buffer pH 5,2
<b>d</b>	Reconstituir con 2 ml de Buffer pH 5,2
<b>E</b>	Lavar columna C18 con 12 ml MeOH:Agua (50:50)
<b>e</b>	Lavar columna C18 con 8 ml MeOH:Agua (50:50)

Tabla 6: Distribución de las muestras de acuerdo a los parámetros elegidos para la ensayo de robustez

Valor de la variable	MUESTRAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
<b>Resultados</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

El análisis de los resultados indicó que para  $\alpha$ -NTT no se registraron puntos críticos; para  $\beta$ -NTT son puntos críticos la reconstitución con Buffer pH= 5,2 y el lavado de la columna de C18 con metanol: agua (50:50); para  $\beta$ -BLD el único punto estable (no crítico) es el lavado de la columna de HLB con metanol: agua (60:40) y para MTST los puntos críticos resultaron el tipo de orina y el lavado de la columna de C18 con metanol: agua (50:50).

## Conclusión

Todos los parámetros ensayados y evaluados con sus resultados respectivos en la validación cumplen con lo establecido en la Resolución N.º 138/2002 y sus disposiciones modificatorias (N.º 125/2006 y N.º 06/2004), y están de acuerdo con los lineamientos de la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE.

Respecto de los analitos que en el ensayo de robustez resultaron un punto crítico para la variable tipo de orina, origen bovino o equino, debe realizarse la curva de calibración sobre orina de origen equino a fin de determinar si la metodología propuesta es aplicable.



## Bibliografía

- Comisión Europea (2002), Decisión 2002/657/CE “Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados” [en línea]. Disponible en: <eur-lex.europa.eu>.
- Community Reference Laboratories (7 diciembre 2007), Guidance Paper “CRLs View on State of the Art Analytical Methods for National Residue Control Plans” [en línea]. Disponible en: <<https://eurl-fougeres-veterinaryresidues.anses.fr>>.
- Consejo Europeo (1996), Directiva 96/23/CE “Relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE” [en línea]. Disponible en: <eur-lex.europa.eu>.
- Daeseleire, E.; Vandeputte, R. y C. Van Peteghem (1998), “Validation of Multi-residue Methods for the Detection of Anabolic Steroids by GC-MS in Muscle Tissues and Urine Samples from Cattle”, Laboratory of Food Analysis (Belgium) *Analyst* 123, pp. 2595-2598.
- Instituto Argentino de Normalización y Certificación (2005), Norma ISO/IEC 17025 - IRAM 301 “Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración”.
- Schmidt, N. A.; Borburgh, H. J.; Penders, T. J. y C. W. Weykamp (1985), “Steroid Profiling”, *Clin. Chem.* 31 (4), pp. 637-639.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina (2004), Resolución 447/2004 “Prohíbese el uso de productos veterinarios anabolizantes en animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano”.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2004), Disposición 06/2004 “Control de productos de origen animal”, Dirección de Laboratorios y Control Técnico [en línea]. Disponible en: <<https://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/seminario/SENASA.pdf>>.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2006), Disposición 125/2006 “Control de residuos en productos de origen animal”, Dirección de Laboratorios y Control Técnico [en línea]. Disponible en: <<https://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/seminario/SENASA.pdf>>.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2002). *Resolución 138/2002 “Control de productos de origen animal”*.
- Sterk, S.; Herbold, H.; Blokland, M.; van Rossum, H.; van Ginkel, L. y R. Stephany (1998), “Nortestosterone: endogenous in urine of goats, sheep and mares?”, *Analyst* 123, pp. 2633-2636.