

DetECCIÓN DE AGENTES ANABOLIZANTES A NIVEL DE PICOGRAMO MEDIANTE EL USO DEL ESPECTROMETRO DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO

Ana Belén Soldevilla Navarro y Jesús A. Muñoz-Guerra Revilla

La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases o líquida es por su selectividad y certeza en la identificación, el método de detección que la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) exige que se utilice en los Laboratorios de Control de Dopaje. En la Lista de Sustancias Prohibidas se citan, agrupados por su acción farmacológica, más de 400 principios activos que deben ser detectados como tales o en forma de metabolitos. Del total de compuestos más del 90% tienen un peso molecular (tamaño) menor de 500 Daltons, lo cual permite que sean analizados por medio de cromatografía. Para el análisis de sustancias como las proteínas, mucho más pesadas 30.000 Daltons (Eritropoietina, Hormona de Crecimiento), se recurre a otras metodologías basadas en el inmunoanálisis. Factores como la complejidad de la matriz objeto de análisis, los bajos niveles de concentración que se requiere detec-

tar y el incremento progresivo de la Lista de Sustancias Prohibidas, inciden en que las metodologías de detección queden obsoletas y que, por lo tanto, se deban actualizar a medida que surge nueva instrumentación. Solo de este modo los laboratorios pueden cumplir con el alto nivel de excelencia que se necesita en el Control del Dopaje.

Recientemente se ha introducido en el mercado una nueva plataforma de análisis, el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo. Desde hace unos meses en el Laboratorio de Control de Dopaje de la AEA se analiza con un método que basado en el empleo del citado sistema de análisis ha permitido ampliar la ventana de detección para el consumo de agentes anabolizantes. Por ejemplo, para el clenbuterol se pueden llegar a detectar niveles cercanos a 0.05 ngr/ml.



LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Desde el descubrimiento de los iones positivos en 1886 por E. Goldstein, los avances de J.J. Thompson, y la construcción del primer espectrómetro de masas con enfoque de velocidad por F.W. Aston en 1919, la espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas que ha experimentado un mayor grado de desarrollo.

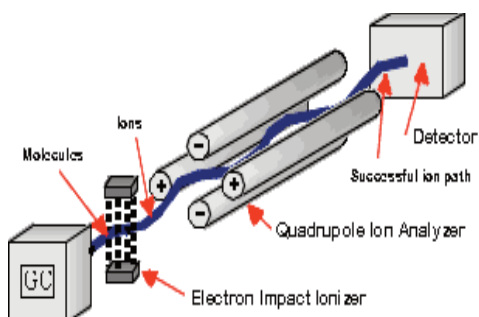


Figura 1

La espectrometría de masas se basa en la producción de iones estables a partir del bombardeo con electrones cargados electrónicamente de la molécula de soluto que eluye de la columna cromatográfica, el tipo de iones formados, ordenados por tamaño (masa/carga) y su abundancia, da lugar al espectro de masas que por su especificidad se conoce como la "huella digital de la sustancia" objeto de control. El grado de especificidad que se puede alcanzar por espectrometría de masas permite identificar un determinado analito en un medio donde hay infinidad de especies similares en concentraciones muy superiores a las del analito de interés.

La formación de los iones tiene lugar en la fuente de ionización del espectrómetro de masas. Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación

masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos o magnéticos. La señal producida por la llegada de los iones es recibida y ampliada por el multiplicador, que posteriormente es procesada por un software específico desarrollado para el tratamiento de la información generada por el espectrómetro. La representación gráfica de la relación masa/carga frente al número de iones o abundancia, da lugar al espectro de masas.

La separación de los iones en función de su tamaño se efectúa en el analizador, atendiendo al modo en que estos iones son aislados, se definen diferentes tipos de analizadores, entre ellos, los más habituales son; cuadrupolo, sector magnético, tiempo de vuelo y triple cuadrupolo.

En un **analizador tipo cuadrupolo** el número de iones que de cada peso molecular se han formado se mide mediante el filtrado selectivo, los iones al pasar por una campo eléctrico de polaridad alternante va dejando pasar cada especie consecutivamente. Este tipo de equipos por su robustez y gran relación coste/prestaciones es y será por mucho tiempo la herramienta base de los Laboratorios de Control de Dopaje para el análisis de agentes anabolizantes, habitualmente este tipo de equipos permite alcanzar una sensibilidad de 10 ng/mL y los iones son discriminados por masa nominal, es decir por su tamaño medido sin decimales. En la Figura 1 se muestra un esquema de este tipo de equipo.

El **analizador de sector magnético** basa la separación en la variación de dirección que experimenta un haz de partículas cargadas cuando pasa por un campo magnético. Tras el paso por el campo magnético los haces de iones descom-

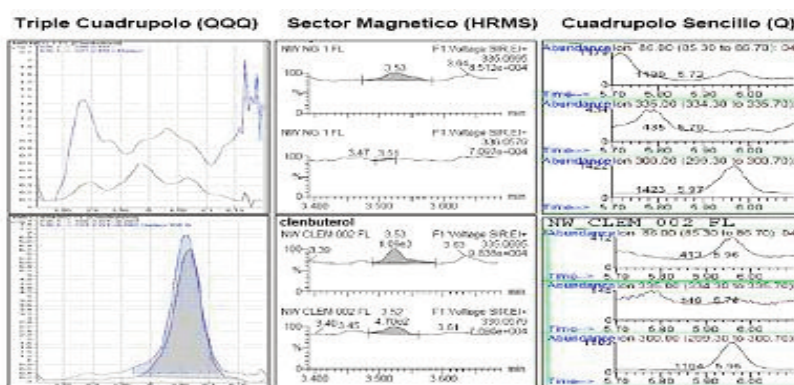


Figura 2

puestos en tantos haces como tamaño de iones, son selectivamente enfocados hacia el detector para ser contados y de este modo construir el espectro de masas. A diferencia del analizador anterior este tipo de sistemas requieren un operador experimentado que pueda aprovechar todo el potencial que la técnica ofrece.

Pasa a página 4

ANÁLISIS DE AGENTES ANABOLIZANTES POR GC/MS (TRIPLE CUADRUPOLO), SENSIBILIDAD

Desgraciadamente el Clenbuterol se ha convertido en protagonista de muchas noticias relacionadas con el dopaje, este compuesto esta dentro de la Lista de sustancias prohibidas clasificado como agente anabolizante, y junto con los esteroides anabolizantes AMA establece que con independencia de la concentración detectada, siempre que se cumplan ciertos criterios de identificación, el compuesto y/o sus metabolitos deben ser informados como “resultado analítico adverso”. La dependencia de la sensibilidad del método de ensayo frente a las prestaciones del equipo de análisis y la capacitación del analista, factores que suelen ser consecuencia directa de la inversión económica en el laboratorio, han provocado que al no existir un nivel mínimo de concentración para informar se hayan generado ciertas diferencias en capacidad de detección entre los 35 Laboratorios Acreditados por AMA, esta diferencia de sensibilidad puede llegar a ser de hasta 40 veces.

Con la implementación en el Laboratorio de Control de Dopaje de la AEA del sistema de análisis por GC-MS/MS (triple cuadrupolo) se ha incrementado en gran medida la capacidad de detección para los agentes anabolizantes. En la ac-

tualidad es uno de los pocos laboratorios capaz de detectar ciertos analitos por debajo de 50 pg/mL, En la figura 2, se muestra el análisis de dos muestras, una negativa y otra contaminada con clenbuterol a nivel de 0.02 ng/ml (20 pg/mL). En la figura 3, el análisis corresponde a una muestra donde se han adicionado esteroides en una concentración de 2ng/ml. Ambos análisis se han efectuado por los tres sistemas de análisis disponibles en el LCD. Como se puede comprobar con el sistema triple cuadrupolo la detección a los niveles indicados esta garantizada experimentando una notable mejoría frente a los otros dos analizadores, lo cual implica un incremento substancial de la ventana de detección.

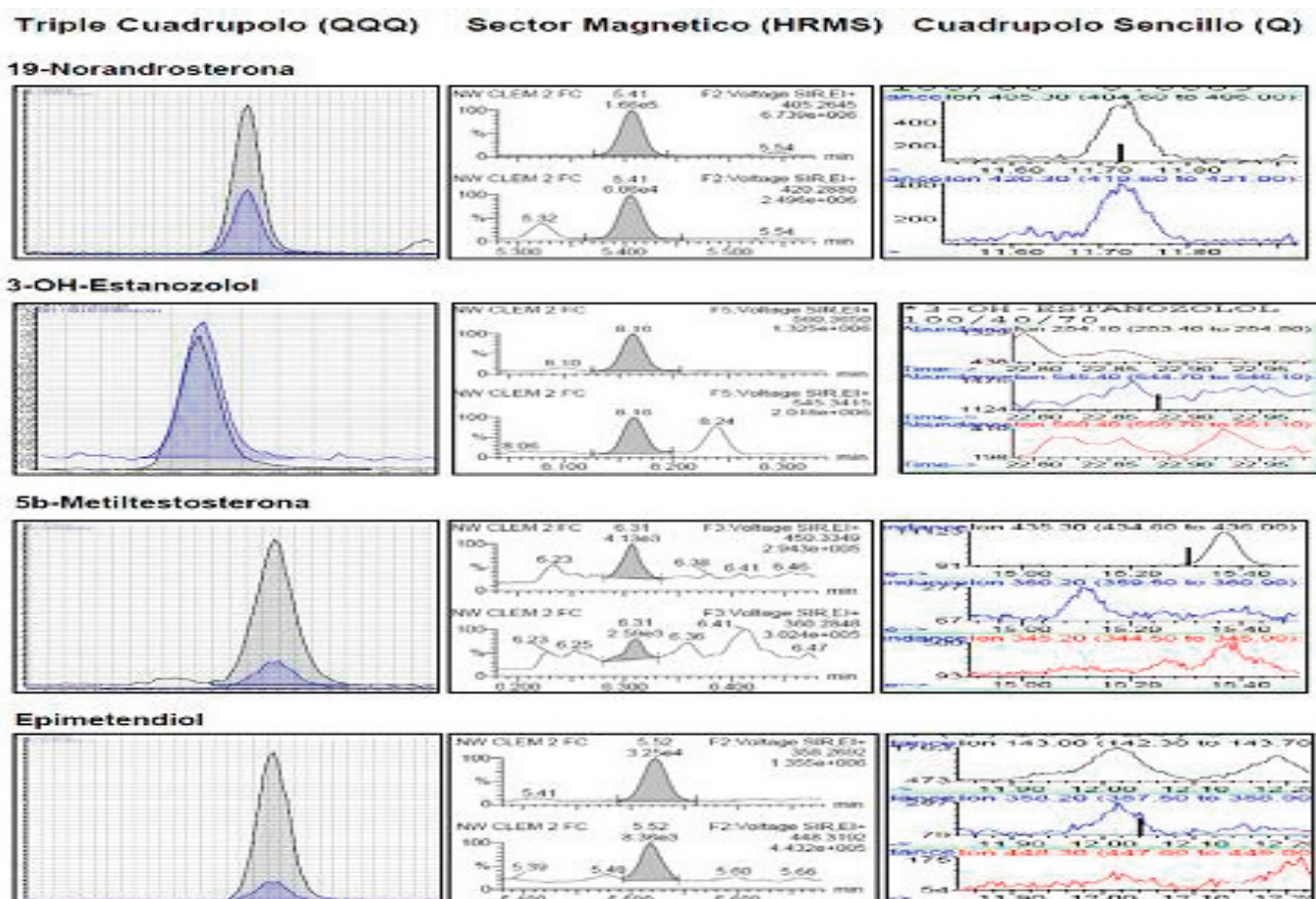


Figura 3

LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

▣ Viene de la página 2

Son sistemas costosos, relativamente robustos y que se caracterizan por su elevadísima selectividad, los iones se diferencian por masa exacta, es decir los haces de iones son clasificados hasta cuatro números decimales, la consecuencia es un incremento importante de selectividad y como consecuencia más poder de detección, en el Laboratorio el límite de

detección con este tipo de sistema esta en torno a 1 ng/mL. Un analizador de triple cuadrupolo es básicamente una evolución del sistema de cuadrupolo sencillo,

en este caso se integran en el analizador tres cuadrupolos conectados en serie. En el cuadrupolo 1 (Q1) se selecciona un ion precursor, que pasa al Q2 (o celda de colisión) donde se vuelve a descomponer en iones producto, que son selectivamente filtrados en el cuadrupolo (Q3), de tal modo que lo que se obtiene es un espectro de masas de iones producto. Este tipo de sistemas se caracteriza por su robustez y su elevada selectividad, por ello les convierte en la herramienta de futuro para el análisis de agentes anabolizantes en el Control de Dopaje. Con este equipo en el Laboratorio de Control de Dopaje de la AEA se han alcanzado niveles de detección de esteroides hasta 20 veces menores al mínimo requerido por AMA. En la figura 4 se muestra un esquema de este equipo.

El Laboratorio de la AEA cuenta con los tres tipos de sistemas y esta previsto la adquisición de un nuevo triple cuadrupolo. Con esta

adquisición se garantizará un incremento notable de la ventana de detección para esteroides, que podría llegar a ser de más de un mes desde la última administración.

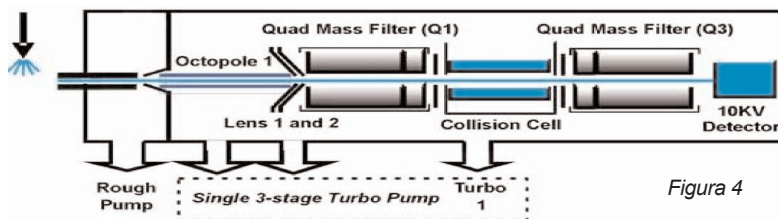


Figura 4

Llamadas ...

Artículo reciente sobre la detección de anabolizantes por un equipo tipo triple cuadrupolo

“A Fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography –triple quadrupole mass spectrometry”. Peter Van Eenoo, Wim Van Gansbeke, Nik De Brabanter, Koen Deventer, Frans T. Delbeke. Journal of Chromatography A. (Article in Press)

Guía útil para conocer más de cerca la problemática del dopaje

<http://deportelimpio.fundacionmiguelindurain.com>

Polémica reciente con el clenbuterol

<http://www.rtve.es/deportes/20101109/caso-contador-proceso-se-alarga-mas-previsto/369098.shtml>

Más sobre la teoría de análisis por espectrometría de masas

www.anachem.umu.se/cgi-bin/jumpstation.exe?MassSpectrometry,
<http://www.spectroscopynow.com>.
<http://www.e-seem.org>

EN EL PRÓXIMO NÚMERO ...

Caracterización del perfil esteroideo, importancia de la cuantificación exacta