



UNIVERSIDAD DE JAÉN
**FACULTAD CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA Y ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN DE SUSTANCIAS DOPANTES EN
ORINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE
TIEMPO DE VUELO**

**PRESENTADA POR:
JUAN CARLOS DOMÍNGUEZ ROMERO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JUAN FRANCISCO GARCÍA REYES
DR. D. ANTONIO MOLINA DÍAZ**

JAÉN, 27 DE FEBRERO DE 2015

ISBN 978-84-8439-945-2

Los doctores D. Antonio Molina Díaz, Catedrático de Universidad del Área de Química Analítica y D. Juan Francisco García Reyes, Profesor Titular del Área de Química Analítica del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada "*Detección de sustancias dopantes en orina mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo*", realizada por D. Juan Carlos Domínguez Romero, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Jaén, ha sido desarrollada bajo su inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén.

En Jaén, Diciembre de 2014

Fdo. Antonio Molina Díaz

Fdo. Juan Francisco García Reyes





Agradecimientos

En primer lugar, debo agradecer a la Junta de Andalucía la financiación recibida a través del proyecto de investigación FQM-2614 que ha hecho posible este trabajo, a la Universidad de Jaén y al departamento de Química Física y Analítica.

Dos personas fundamentales para que esto haya salido adelante han sido mis directores de tesis, Antonio Molina y Juan Francisco García, gracias por haber confiado en mí, por creer en mí desde el primer día y por todo el compromiso, trabajo y esfuerzo con el que habéis conseguido llevarme hasta este objetivo, sin vosotros esto no hubiera sido posible, y especialmente los tres últimos años desde que dejé de trabajar en la UJA, que habéis estado ayudándome y animándome hasta que lo hemos conseguido, de verdad que lo que habéis hecho no tiene precio, agradezco también a Esther Martínez y M^a Luisa del Moral del departamento de Biología Experimental, cuyo trabajo con los animales fue fundamental para esta tesis.

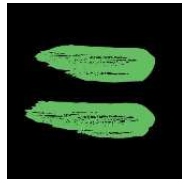
Me quiero acordar también de mis compañeros en el laboratorio, José Robles, Bienvenida, Patricia y Velia, he aprendido de cada uno de vosotros, y espero que vosotros también os hayáis llevado algo de mí. También de todos los que han pasado por nuestro laboratorio para trabajar y formarse, que siempre han dejado algo de ellos, Ana González, Paula, László, Aniko, Tania, Ana Latoszek, Zanhya, Marina y Fernando, la gente del departamento que habéis estado a nuestro lado, Natividad, Juan Jesús, Manuel Montejo y Fernando, y los profesores László y Mihaly, que también me dieron la oportunidad de conocer su Universidad y utilizar su instrumentación.

Un recuerdo también para toda la gente que ha intentado ponerme la zancadilla y sabotearme, no lo habéis conseguido sino que me habéis dado más fuerza para seguir hacia adelante, y el tiempo pone a todo el mundo en su sitio.

Tengo que agradecer a Manuel Melguizo todo lo que he aprendido de él, que me ha enseñado más de la vida que de química, y cada conversación ha servido para hacerme un poco más grande.

Mis amigos de la Universidad, qué puedo decir de vosotros, Pachy, Calahorro y Peñas, sabéis que para mí sois como hermanos, sois lo mejor, Lules e Isa, que os quiero un montón y sois unas santas por aguantarlos, Luisa y Sergio, Bea y Laura Chapado, gracias a todos por los ratos tan buenos que hemos compartido y por el apoyo que nos hemos dado en lo bueno y en lo malo. Tener amigos como vosotros hace que la vida sea mucho mejor.

Por supuesto tengo que agradecer a mi familia por todo lo que soy, mis padres Pepe y Puri, que me han dado la educación y estudios para convertirme en lo que hoy soy, mis hermanos José Andrés y Julián Jesús y mi hermanita Puri, que tanto me quieren, Inma, Estefanía y Joaquín, que son parte de nuestra muy amplia familia, Miguel, Loli y María, que también son mi familia, a Yago por su amor y cariño incondicional, y, evidentemente, a la persona más importante de mi vida, Laura, que me llevas queriendo tanto años y haces que cada día me levante con alegría y fuerza para vivirlo junto a ti.



ÍNDICE

ÍNDICE

Resumen/*Summary*

1

I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

13

I.1. El dopaje

13

I.2. Normativas antidopaje de la WADA

17

I.3. Sustancias y métodos prohibidos por la WADA

22

I.4. Controles antidopaje

67

I.5. Historia del desarrollo de metodologías analíticas de control anti-doping

72

I.6. Espectrometría de masas: fundamentos e instrumentación

80

I.7. La espectrometría de masas en control anti-doping

106

I.8. Antecedentes de métodos de control antidoping empleando cromatografía de líquidos/espectrometría de masas

111

I.8.1. El problema analítico en control antidopaje: aspectos analíticos de la determinación de sustancias dopantes en fluidos biológicos

111

I.8.2. Metodologías multi-clase para la detección de sustancias prohibidas en controles antidoping

115

I.8.3. Antecedentes: metodologías para el estudio del metabolismo de sustancias dopantes mediante espectrometría de masas

124

II. OBJETIVOS

149

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

153

III.1. Estudio comparativo de distintos métodos de tratamiento de muestra para el análisis de sustancias dopantes en orina mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas

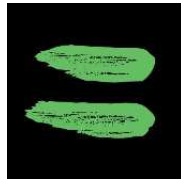
155

III.1.1. Resumen

157

III.1.2. Artículo científico 1: <i>“Comparative evaluation of seven different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by liquid chromatography/mass spectrometry”</i> , Domínguez-Romero <i>et al.</i> , Journal of Chromatography A, 2014.	159
III.2 Desarrollo de un método de análisis cualitativo y cuantitativo para la determinación de sustancias dopantes en orina mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo	207
III.2.1. Resumen	209
III.2.2. Artículo científico 2: <i>“Screening of 200 multiclass sport drugs in urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry”</i> , Domínguez-Romero <i>et al.</i> , Talanta 2015.	213
III.3. Detección sistemática de metabolitos de sustancias dopantes mediante estrategias basadas en el empleo de LC-TOFMS	273
III.3.1. Resumen	275
III.3.2. Artículo científico 3: <i>“Combined data mining strategy for the systematic identification of sport drug metabolites in urine by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry”</i> , Domínguez-Romero <i>et al.</i> , Analytica Chimica Acta, 2013.	277
III.4. Estudio del metabolismo en orina de β_2 -agonistas clenbuterol, salbutamol y terbutalina mediante LC-TOFMS	317
III.4.1. Resumen	319
III.4.2. Artículo científico 4: <i>“Detection of main urinary metabolites of β_2 agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high-resolution mass”</i> , Domínguez-Romero <i>et al.</i> , Journal of Chromatography B, 2013.	321

III.5. Identificación de metabolitos de tamoxifén en orina mediante UHPLC-TOFMS	347
III.5.1. Resumen	349
III.5.2. Artículo científico 5: “ <i>Study of tamoxifen urinary metabolites in rat by ultra-high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry</i> ”, Domínguez-Romero <i>et al.</i> , Biomedical Chromatography, 2015. DOI 10.1002/bmc.3411	351
<hr/>	
IV. CONCLUSIONES	381
<hr/>	
V. ANEXOS	385
Anexo 1: Lista de publicaciones de la tesis doctoral	387
Anexo 2: Lista de comunicaciones a congresos derivadas de la tesis	389
Anexo 3: Lista de otros artículos relacionados con el contenido de la tesis.	393
<hr/>	



RESUMEN

RESUMEN

En los últimos diez años, la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS) ha reemplazado a la cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) para un gran número de ensayos en los laboratorios de control antidopaje. Entre otras ventajas, la LC-MS permite evitar algunas etapas de tratamiento de muestra incluyendo la etapa de derivatización obligatoria en muchas ocasiones si se emplea GC-MS. Dentro del abanico de posibilidades de LC-MS, la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) ofrece unas características que encajan a la perfección con la filosofía del control antidoping. Por una parte, ofrece una sensibilidad muy elevada en modo *full-scan* lo que permite detectar cualquier sustancia a niveles de concentración muy bajos, sin tener que seleccionar iones. Además, el analizador de tiempo de vuelo ofrece la posibilidad de medir las masas exactas de los iones con errores de desviación de masa tan bajos, que se puede obtener la composición elemental de las especies detectadas, lo que se puede emplear como criterio de identificación para nuevas sustancias dopantes y de sus metabolitos sin disponer de patrones a priori. Esta tesis pretende explorar la potencialidad de la técnica LC-TOFMS para el control antidoping, tanto para el análisis de sustancias prohibidas conocidas incluidas en las listas de los organismos oficiales como otras sustancias ilegales que se puedan emplear pero que aún no se han descrito.

La Tesis doctoral se divide en dos partes diferenciadas:

- (i) El desarrollo y optimización de un método para el análisis de la lista de sustancias prohibidas, incluyendo todos los estudios métodos de preparación de muestra evaluados y comparados para este fin.

- (ii) El estudio de estrategias basadas en LC-TOFMS para la detección sistemática de metabolitos de sustancias dopantes

La tesis incluye 5 trabajos de investigación originales, que se describen a continuación:

En el **artículo 1** (apartado III.1) , se ha llevado a cabo un estudio comparativo de siete métodos de tratamiento de muestra para análisis multi-categoría de sustancias dopantes en orina. Los métodos estudiados incluyen la extracción en fase sólida (con 5 tipos de cartucho diferentes: poliméricos mixtos hidrofóbicos/hidrofílicos (tipo HLB y PLEXA), C₁₈, mixtos catiónicos (MCX) y mixtos-aniónicos (MAX)), extracción líquido-líquido empleando metil-terc-butil éter, y extracción líquida asistida por un sorbente (*sorbent supported liquid extraction*) empleando cartuchos ChemElut®.

En el **artículo 2** (apartado III.2), se ha estudiado la potencialidad del acoplamiento LC-TOFMS para análisis simultáneo de 200 sustancias dopantes en orina tanto para propósitos de screening/detección (empleando sólo un ión) como para confirmación (empleando dos iones característicos para cada compuesto de interés mediante el empleo de fragmentación inducida por colisiones en la región de transporte de iones (*in source* CID).

En el **artículo 3** (apartado III.3) se propone el uso de una estrategia para la búsqueda y detección sistemática de metabolitos de sustancias dopantes mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución en modo de adquisición *full-scan*. La metodología propuesta está basada en el empleo de cromatogramas de ion extraído de iones diagnóstico (fragmentos) obtenidos mediante fragmentación en la región de transporte de iones (*in-source* CID) sin aislamiento del ión precursor (información específica de la molécula de partida), junto con el uso de cromatogramas de

ion extraído de especies derivadas teniendo en cuenta los cambios de masa exacta originados por modificaciones (biotransformaciones) del metabolismo de fase I y fase II.

En el **artículo 4** (apartado III.4) se ha llevado a cabo un estudio cualitativo del metabolismo del clenbuterol, salbutamol y terbutalina, a través del tratamiento y administración de una única dosis en ratas y posterior análisis de la orina durante las siguientes 72 horas. Para el estudio, se ha empleado cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS)

En el **artículo 5** (apartado III.5) se ha llevado a cabo un estudio cualitativo del metabolismo del Tamoxifén (TMX), a través del tratamiento y administración de una única dosis de TMX en ratas y posterior análisis de la orina durante las siguientes 72 horas. Para el estudio del metabolismo se empleó cromatografía de líquidos de alta resolución empleando columnas de 1.8 micras de tamaño de partícula y elevada presión de trabajo (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (UHPLC-TOFMS) con fuente de ionización de electrospray en modo de ionización positivo. Se empleó como estrategia el uso de cromatogramas de ion extraído de especies derivadas teniendo en cuenta los cambios de masa exacta originados por modificaciones (biotransformaciones) del metabolismo de fase I y fase II típico de los fármacos. Aparte del método UHPLC-TOFMS, se llevaron a cabo estudios de fragmentación empleando un Q-TOF y aislamiento de ion precursor con la finalidad de aportar información estructural complementaria. Previamente al análisis, se llevo a cabo una etapa de tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida con cartuchos poliméricos PLEXA.



SUMMARY

SUMMARY

In the last years, liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) has replaced chromatography/mass spectrometry (GC-MS) as the main technique in antidoping laboratories. LC-MS provides some advantages in ease of sample treatment compared to gas chromatography (GC), although GC methods are still in use particularly for class-specific applications. The requirements and features of sport drug testing map well against the potential of liquid chromatography high resolution mass spectrometry using time-of-flight analyzer (LC-TOFMS). The main advantage of this approach in comparison with targeted measurements based on the acquisition of fixed parent/fragment ion transitions is the comprehensive acquisition of the entire data, which provides the possibility to retrospectively scrutinize the analytical data for formerly unknown compounds or new species that eventually become relevant from the point of view of sport drug testing.

The presented PhD Thesis formulates two main goals:

- (a) The development of a screening method for the identification and quantitation of 200 sport drugs in urine, including a thorough evaluation of sample treatment, and mass spectrometric identification aspects.
- (b) the application of class-specific fragmentation information for the nontargeted detection of related species such as metabolites

The PhD Thesis comprises five original research articles, as follows:

In **article 1** (section III.1) , the suitability, usefulness and performance of seven different extraction protocols based on SPE (with different sorbents), LLE and solid-supported liquid extraction (SLE) for large-scale multiclass sport drug testing in urine. The efficiency of the different extraction procedures in

terms of recovery/extraction efficiency and accuracy was tested for up to 189 doping agents, which were selected as representative from different groups including 34 steroids and related metabolites, 14 glucocorticosteroids and related metabolites, 24 diuretics and masking agents, 11 stimulants and related metabolites, 9 beta-agonists, 16 beta-blockers, 6 Selective Estrogen Receptors Modulators (SERMs), 24 narcotics, cannabinoids and metabolites, and 22 related multiclass drugs of abuse/sport drugs.

In **article 2** (section III.2), a screening method for the determination of 200 sport drugs in urine using LC-TOFMS has been developed and fully validated at WADA MRPLs. The proposed methodology comprises a generic single-stage sample preparation with commercial polymeric SPE cartridges followed by LC-TOFMS analysis. A dedicated study and evaluation of the fragmentation displayed using in-source CID fragmentation was performed and contrasted with the fragmentation exhibited using a dedicated collision cell with a Q-TOF instrument.

In **article 3** (section III.3), a strategy based on the combined use of two complementary data mining tools is proposed for the screening and systematic detection and identification of urinary drug metabolites by liquid chromatography full-scan high resolution mass spectrometry. The proposed methodology is based on the use of accurate mass extraction of diagnostic ions (compound-dependent information) from in-source CID fragmentation without precursor ion isolation along with the use of automated mass extraction of accurate-mass shifts corresponding to typical biotransformations (non compound-dependent information) that xenobiotics usually undergo when metabolized. The combined strategy was evaluated using LC-TOFMS with a suite of 10 sport drugs representative from different classes (propranolol, bumetanide, clenbuterol, ephedrine, finasteride,

methoxyphenamine, methylephedrine, salbutamol and terbutaline), after single doses administered to rats.

In **article 4** (section III.4), the excretion of urinary metabolites of β_2 -Agonists drugs clenbuterol, terbutaline and salbutamol have been studied in rats after a single dose administration using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC-TOFMS). For identification of the metabolites, urine collected was processed with solid-phase extraction prior to LC-TOFMS analyses using electrospray in the positive ion mode and pseudo MS/MS experiments from in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation (without precursor ion isolation). The strategy applied for the identification of metabolites was based on the search of typical biotransformations with their corresponding accurate mass shift and the use of common diagnostic fragment ions from the parent drugs.

Article 5 (section III.5), addresses a study of Tamoxifen (TMX) urinary metabolites in rats after a single dose administration by using solid-phase extraction followed by ultra-high-pressure liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOFMS). The identification procedure was based on applying a predefined set of typical biotransformations to the parent molecule (TMX), with their corresponding molecular formula modifications and accurate mass shifts.



INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

I.1. EL DOPAJE

La Real Academia Española define el dopaje en su diccionario como *“la administración de fármacos o sustancias estimulantes para potenciar artificialmente el rendimiento del organismo con fines competitivos”* ^[1]. Sin embargo, no es fácil dar una definición universal sobre el dopaje, y a lo largo de los años se han publicado diferentes definiciones de dopaje más o menos precisas, en 1963 se celebró el Primer Coloquio Europeo de Medicina, donde se definió el dopaje de esta manera: *“Se considera dopaje la utilización de sustancias y medios que, destinados a incrementar artificialmente el rendimiento ante una competición, pudieran perjudicar la integridad física y psíquica del deportista”* ^[2]. Esta definición era muy imprecisa, además que sólo se consideraría una sustancia como dopante si perjudicara la integridad del deportista. Poco más tarde, en 1965, la Ley Francesa contra el Dopaje lo define de esta forma: *“Es considerado como doping el hecho de administrar a sabiendas antes o en curso de una competición deportiva sustancias destinadas a aumentar artificialmente y pasajeraamente las posibilidades físicas de un deportista y susceptibles de perjudicar su salud”* ^[3], aunque sigue siendo poco precisa y considerando que debe ser perjudicial para la salud. La primera definición que se reconoció oficialmente fue en 1963, cuando el Comité de Educación Extraescolar del Consejo de Europa lo definió de esta manera: *“Doping es la administración a una persona sana, o la utilización por ella misma y por cualquier medio, de una sustancia extraña al organismo o de una sustancia fisiológica utilizada en cantidades o por vías anormales, con el único fin de aumentar artificialmente y de forma ilegal el rendimiento de esa persona al participar en una competición. También puede considerarse como práctica del dopaje determinados procedimientos psicológicos destinados a potenciar la forma*

física de un deportista” ^[4]. Esta definición elimina cualquier referencia al perjuicio en la salud, pero introduce los procedimientos psicológicos como posible dopaje. Esta definición la sustituyó el Consejo de Europa en 1984 por esta otra: *“El dopaje en el deporte consiste en emplear, infringiendo los reglamentos de las organizaciones deportivas competentes, sustancias o categorías de sustancias que están prohibidas”* ^[2, 5]. En 1986, el Comité Olímpico Internacional (COI) define el dopaje como *“La prohibición del uso en el deporte de métodos y agentes dopantes incluidos en diversos grupos farmacológicos”* ^[6]. Años más tarde, en 1989, el Consejo de Europa lo define de esta manera: *“El dopaje en el deporte es la administración a los deportistas, o el uso por ellos mismos, de clases farmacológicas de agentes dopantes o de métodos de dopaje, prohibidos por las organizaciones deportivas internacionales competentes, y que como tales figuran en las listas aprobadas por el Grupo de Seguimiento del Convenio”* ^[7]. En España, en 1992, la Comisión Nacional Antidopaje hace esta definición: *“Dopaje es el consumo, por deportistas o animales deportivos de sustancias dopantes, o el uso de métodos de dopaje, con el fin de modificar artificialmente su rendimiento en una competición”* ^[8].

Todas estas definiciones no son del todo precisas y pueden dar lugar a interpretaciones de ellas, por ello, la agencia mundial antidopaje, WADA por sus siglas en inglés (World Anti Doping Agency), proporciona una definición más amplia, basada en las normas antidopaje publicadas en el Código Mundial Antidopaje, y evitando cualquier tipo de interpretación , definiendo el dopaje como *“una o varias infracciones de las normas antidopaje establecidas en los artículos 2.1 al 2.8 del código mundial antidopaje”* ^[9] que son los siguientes:

- Presencia de una sustancia prohibida o sus metabolitos o marcadores en una muestra.

- Uso o intento de uso de una sustancia prohibida o un método prohibido.

- Negarse a someterse o no someterse sin justificación válida a una recogida de muestras tras una notificación hecha conforme a las normas antidopaje aplicables, o evitar de cualquier otra forma la recogida de muestras.
- Violación de los requisitos en lo que respecta a la disponibilidad del deportista para la realización de controles fuera de competición, incluido el no proporcionar información sobre su paradero, así como los controles que se consideren fallidos en base a las normas establecidas. Cualquier combinación de tres controles fallidos y/o fallos en la presentación en un periodo de 18 meses según lo determinado por las organizaciones antidopaje con jurisdicción sobre el deportista constituirá una violación de las reglas antidopaje.
- Falsificación o intento de falsificación de cualquier elemento del proceso de recogida de muestras o de análisis de muestras.
- Posesión de sustancias prohibidas o métodos prohibidos.
- Tráfico o intento de tráfico de alguna sustancia prohibida o método prohibido.
- Administración o intento de administración de una sustancia prohibida o método prohibido a algún deportista, o la asistencia, incitación, contribución, instigación, encubrimiento o cualquier otro tipo de complicidad en relación con una infracción de la norma antidopaje o cualquier otra tentativa de infracción.
- Complicidad
- Asociación Prohibida

Esta definición es actualmente la referencia, y evita cualquier tipo de subjetividad o interpretación, e incluye como dopaje no sólo a la administración o consumo de sustancias prohibidas, sino también su posesión o tráfico, así como cualquier intento de evitar un control antidopaje.

Sin embargo, la palabra dopaje es mucho más antigua que todas estas definiciones, se cree que probablemente deriva de la palabra holandesa “dop”, que es el nombre de una bebida alcohólica hecha con la piel de la uva usada por los guerreros Zulu para mejorar su habilidad y fuerza en combate. El término “doping” apareció por primera vez en 1889 en un diccionario inglés, y describía originalmente una mezcla que contenía opio que se usaba para “dopar” a los caballos. Más tarde, el término “dope” se extendió en sentido más amplio a otras mezclas con propiedades estimulantes, pero la historia del dopaje es mucho anterior a estas definiciones. Ya en la Grecia Antigua se ofrecían a los atletas complementos para mejorar su fuerza física, alimentándolos con carnes o testículos de animales antes de comenzar los juegos para incrementar su fuerza y resistencia. También en la Roma clásica se administraban drogas para mejorar la fuerza y destreza de los atletas.

Tras los eventos que sacudieron al mundo del ciclismo en el verano de 1998 (Caso Festina), el Comité Olímpico Internacional (COI) decidió convocar una conferencia sobre dopaje, reuniendo las partes involucradas en la lucha contra el dopaje. La Conferencia Mundial sobre dopaje se celebraría en Lausana entre los días 2 y 4 de Febrero de 1999, y de ella salió la Declaración de Lausana sobre el Dopaje en el Deporte. Este documento facilitó la creación de un organismo internacional independiente que fuese completamente operativo para el inicio de los juegos de la XXVII Olimpiada en Sídney en el año 2000 ^[10].

De acuerdo con los términos de la declaración de Lausana, la Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en inglés World Antidoping Agency) fue

establecida el día 10 de Noviembre de 1999 para promover y coordinar la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel internacional. La WADA fue establecida como una fundación bajo la iniciativa del COI con el respaldo y participación de organizaciones intergubernamentales, autoridades públicas y deportivas, así como otros entes públicos y privados involucrados con la lucha contra el dopaje.

El lema de la WADA es “Juego Limpio”. Junto con el logotipo, el signo verde de igualdad dentro del cuadrado negro, Juego Limpio expresa el espíritu universal del deporte practicado naturalmente dentro de unas reglas y sin el uso de mejoras artificiales. El signo igual representa la justicia y la equidad, mientras el cuadrado negro representa las reglas que todos los atletas acuerdan respetar. Los colores de la WADA también tienen su significado, el negro indica la justicia impartida por el árbitro mientras el verde evoca la imagen de la salud, la naturaleza y el campo de juego tradicional.



Figura 1. Historia del logo de la WADA

I.2. NORMATIVAS ANTIDOPAJE DE LA WADA

La organización internacional responsable de las normativas antidopaje es la Agencia Mundial Antidopaje (WADA). El Programa Mundial Antidopaje abarca todos los elementos necesarios para lograr una armonización óptima de los programas y de las buenas prácticas contra el dopaje a nivel nacional e internacional. Sus elementos principales son los siguientes:

Nivel 1: El Código Mundial Antidopaje ^[9]. El código es el documento fundamental y universal en el que se basa el Programa Mundial Antidopaje en los deportes. El propósito del Código es promover la lucha contra el dopaje mediante la armonización universal de los principales elementos relacionados con la lucha antidopaje. El Código es lo suficientemente preciso para lograr una armonización completa sobre cuestiones en las que se requiere uniformidad, aunque lo bastante general en otras áreas para permitir cierta flexibilidad en lo que respecta a la forma en que se aplican los principios antidopaje admitidos.

Nivel 2: Los estándares internacionales. Los estándares internacionales para las distintas áreas técnicas y operativas dentro del Programa Mundial Antidopaje se desarrollarán mediante consultas con los signatarios y los gobiernos, y serán aprobados por la WADA. El propósito de los estándares es lograr una armonización entre las organizaciones antidopaje responsables de las partes técnicas y operativas específicas de los programas antidopaje. El respeto de los estándares internacionales es obligatorio para la observancia del Código. El comité Ejecutivo de la WADA podrá revisar en su momento los estándares internacionales tras consultar de forma adecuada a los signatarios y a los gobiernos. Salvo que se disponga de otra forma en el Código, los estándares internacionales y cualquier otra actualización entrarán en vigor en la fecha indicada en los estándares internacionales o en la actualización.

Existen 5 estándares internacionales diseñados para armonizar diferentes aspectos técnicos y operativos del antidopaje. Estos estándares son mandatorios para la armonización y cumplimiento del código. Son los siguientes:

La Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos (la lista) ^[11]: Desde el año 2004 la WADA es responsable de la preparación y publicación anual de la lista. Es una piedra angular del Código y un componente clave para la armonización,

identificando las sustancias y métodos prohibidos en competición, fuera de competición y en deportes concretos.

Uso de Exención Terapéutica (TUE) ^[12]: Como cualquier otra persona, los deportistas pueden sufrir enfermedades o condiciones que requieran el uso de ciertos medicamentos. En el caso de que estos medicamentos se encuentren en la lista, un TUE puede otorgar al deportista la autorización para consumir la medicina requerida.

Pruebas ^[13]: El Estándar Internacional para Pruebas armoniza la planeación para una efectiva toma de muestras, con la intención de mantener la integridad e identidad de las muestras, desde la notificación al atleta hasta su transporte para el análisis.

Laboratorios ^[14]: El Estándar de Laboratorios busca asegurar la producción de resultados válidos de pruebas, reunir datos de evidencia y lograr resultados y reportes uniformes y armonizados por parte de todos los laboratorios acreditados.

Protección de la Privacidad y la Información Personal (PPPI) ^[15]: El propósito del Estándar Internacional para la Protección de la Privacidad y la Información Personal es asegurar que todas las partes relevantes involucradas en antidopaje en el deporte se adhieren a un set de protección mínima de la privacidad cuando colectan y usan información personal del deportista, como por ejemplo información relativa a su paradero, controles antidopaje y exenciones terapéuticas

Nivel 3: Los modelos de buenas prácticas. Se desarrollarán modelos de buenas prácticas basados en el Código para proporcionar soluciones lo más adaptadas posible a las distintas áreas de la lucha antidopaje. Estos modelos serán recomendados por la WADA, estarán a disposición de los signatarios cuando éstos lo soliciten, pero no serán obligatorios. Además de la documentación, la WADA podrá poner a la disposición de los signatarios asistencia para la formación. LA

WADA ofrece estos modelos a las autoridades públicas y deportivas para facilitar la implementación del Código en sus normas y regulaciones. Estos modelos se pueden clasificar en 2 grupos:

Modelos de Reglas: Dos modelos de reglas han sido desarrollados, una para las Federaciones Internacionales y otra para las Organizaciones Nacionales Antidopaje. Escritas en colaboración con las autoridades públicas y deportivas, estas reglas permiten una gran flexibilidad en su uso para las organizaciones

Directrices: La WADA ha publicado también las directrices que se relacionan con las actividades antidopaje. Sin ser mandatorias, buscan facilitar actividades como el manejo de resultados, pruebas fuera de competición, ubicación de los atletas y toma de muestras de sangre y orina.

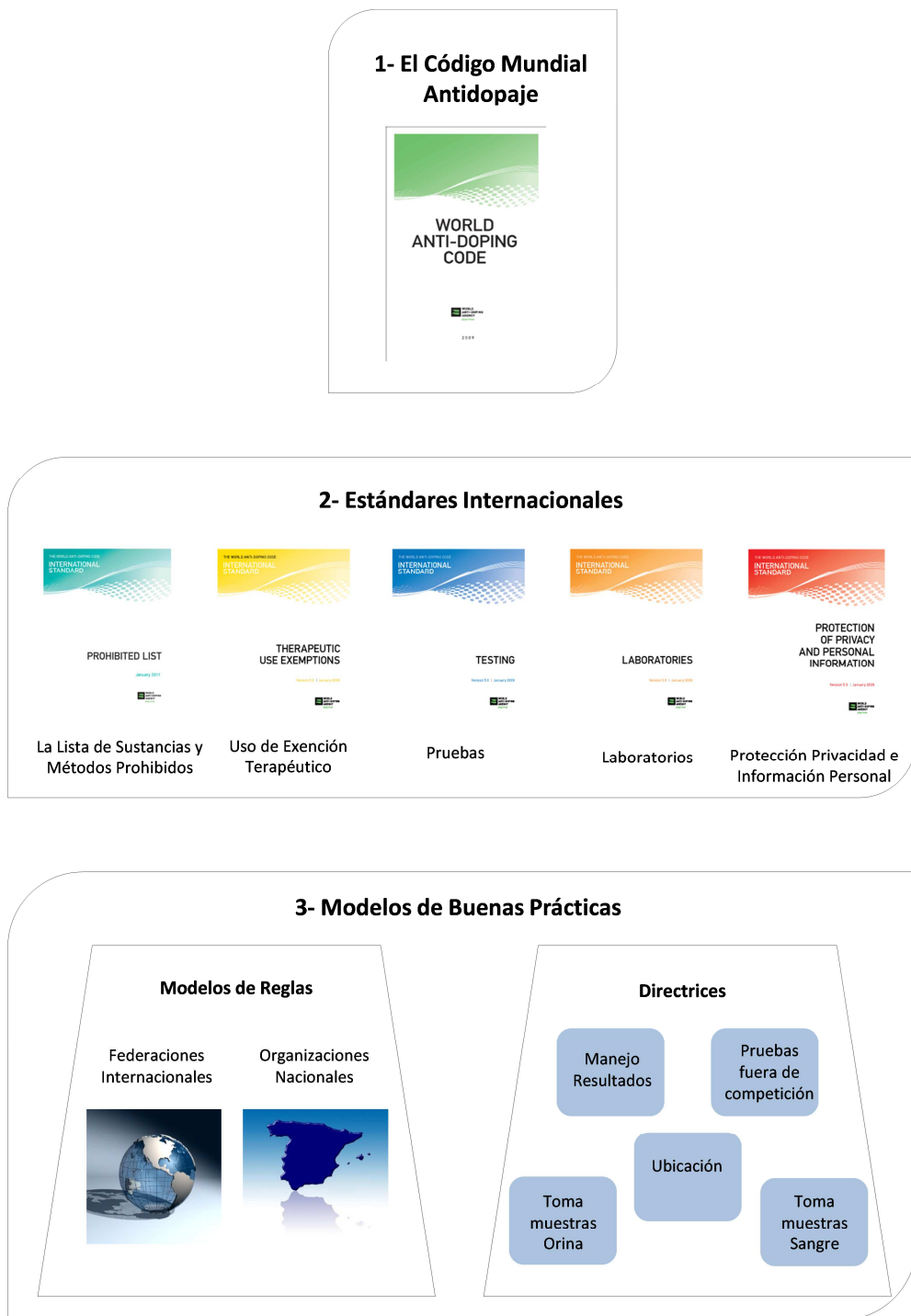


Figura 2. Representación de los tres niveles del Programa Mundial Antidopaje

I.3. SUSTANCIAS Y MÉTODOS PROHIBIDOS POR LA WADA

La agencia mundial antidopaje publica anualmente una lista de sustancias y métodos prohibidos tanto en competición como fuera de ella, esta lista separa 3 grupos de sustancias y métodos prohibidos, las que están prohibidos en todo momento, tanto en competición como fuera de ella, las que están prohibidos sólo en competición pero su uso se tolera fuera de ella, y las sustancias que están prohibidas sólo en ciertos deportes. La lista está organizada de la manera que se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Grupos de sustancias y métodos prohibidos por la WADA

Sustancias y métodos prohibidos <u>en todo momento</u>	
(en y fuera de la competición)	
S0	<i>Sustancias no aprobadas</i>
S1	<i>Agentes anabolizantes</i>
S2	<i>Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias afines</i>
S3	<i>β-2 Agonistas</i>
S4	<i>Moduladores hormonales y metabólicos</i>
S5	<i>Diuréticos y otros agentes enmascarantes</i>
M1	<i>Aumento de la transferencia de oxígeno</i>
M2	<i>Manipulación química y física</i>
M3	<i>Dopaje genético</i>
Sustancias prohibidas <u>en competición</u>	
S6	<i>Estimulantes</i>
S7	<i>Narcóticos</i>
S8	<i>Cannabinoídes</i>
S9	<i>Glucocorticosteroides</i>
Sustancias prohibidas en <u>ciertos deportes</u>	
P1	<i>Alcohol</i>
P2	<i>β-bloqueantes</i>

S0- Sustancias no aprobadas

La WADA considera como sustancias no probadas a cualquier fármaco no incluido en ninguna de las secciones de la lista y sin aprobación vigente por ninguna autoridad gubernamental regulatoria de la salud para uso terapéutico en humanos (por ejemplo, fármacos en desarrollo clínico o preclínico o discontinuadas, drogas de diseño, medicinas veterinarias). Todo fármaco englobado dentro de esta categoría como “sustancia no probada” está prohibido en todo momento.

S1- Agentes anabolizantes

Los agentes anabolizantes son compuestos capaces de incrementar los procesos anabólicos en el organismo, consiguiendo aumentar la masa muscular a través de un aumento en la síntesis de proteínas del músculo aumentando el diámetro de las fibras musculares. Se distinguen 2 grupos de agentes anabolizantes, los **esteroides anabolizantes androgénicos** y **otros agentes anabolizantes**.

Los **esteroides anabolizantes androgénicos**, desde un punto de vista químico son derivados de la testosterona, que es una hormona natural, comparten con ella el núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, formado únicamente por carbono e hidrógeno formando cuatro anillos fusionados, tres de seis miembros y uno de cinco, con un total de 17 átomos de carbono. En los esteroides, esta estructura básica, o “core” se modifica mediante la adición de grupos funcionales (carbonilos e hidroxilos principalmente), cadenas hidrocarbonadas, y dobles enlaces dentro de la estructura básica. Dentro de los esteroides se hace una distinción entre exógenos, esto es, que por lo común no se producen de forma natural en el organismo, y endógenos, que el cuerpo puede producir forma natural, pero administrados de manera exógena.

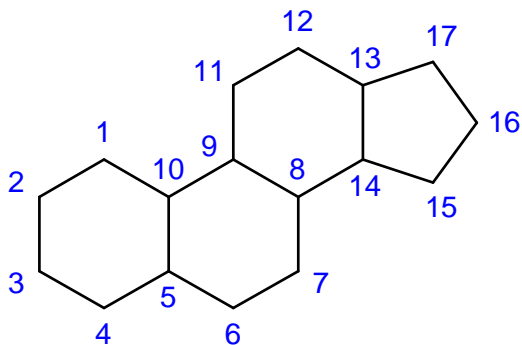


Figura 3. Estructura de ciclopentanoperhidrofenantreno, estructura básica de los esteroides

Entre los **exógenos** la WADA incluye en la lista los siguientes: **1-androstenediol, 1-androstenediona, bolandiol, bolasterona, boldenona, boldina, calusterona, clostebol, danazol, dehidroclorometiltestosterona, desoximetiltestosterona, drostanolona, estanozol, estenbolona, etilestrenol, fluoximesterona, formebolona, furazabol, gestrinona, 4-hidroxitestosterona, mestanolona, mesterolona, metandienona, metandriol, metasterona, metenolona, metildienolona, metil-1-testosterona, metilnortestosterona, metiltestosterona, metribolona, mibolona, nandrolona, 19-norandrostendiona, norboletona, norclostebol, noretandrolona, oxabolona, oxandrolona, oximesterona, oximetolona, prostanazol, quimbolona, 1-testosterona, tetrahydrogestrinona y trembolona.**

Además de éstos, están prohibidas cualquier otra sustancia con estructura similar o efectos biológicos similares, esto se introduce debido al creciente número de esteroides sintéticos con actividad anabolizante, dejando la puerta abierta para que cualquier compuesto que comparta la estructura básica o “core” sea considerado prohibido.

Los **esteroides anabolizantes endógenos** pero administrados de forma exógena prohibidos son los siguientes: androstendiol, androstendiona, dihidrotestosterona,

prasterona y testosterona, además están prohibidos todos los metabolitos de la testosterona.

Además de los esteroides hay **otros compuestos con actividad anabolizante** prohibidos, estos incluyen pero no se limitan a los siguientes: clenbuterol, moduladores selectivos del receptor de andrógeno (SARMs por sus siglas en inglés Selective Androgen Receptor Modulators), tibolona, zeranol y zilpaterol ^[11].

El **mecanismo de acción** de los esteroides se puede explicar desde un **nivel celular**, a través de enzimas que convierten los esteroides en los tejidos diana, y desde un **nivel molecular** debido a las diferencias en la distribución de correguladores de receptores androgénicos. Al respecto de la modulación a **nivel celular**, en los tejidos diana del aparato reproductor y de la piel, la testosterona se puede considerar como una prohormona, siendo fácilmente convertida por la 5 α -reductasa al andrógeno más potente DHT (5 α -dihidrotestosterona). En otros tejidos, como los tejidos adiposos y algunas partes del cerebro, la testosterona se convierte en el estrógeno estradiol. En huesos, el mecanismo de acción de los anabolizantes androgénicos no ha sido totalmente elucidado, pero tanto el efecto directo de la testosterona y el efecto a través de la aromatización a estradiol son importantes. La actividad y expresión de la aromatasa es significativa en el músculo, pero si la conversión de andrógenos a estrógenos dentro de este tejido es fisiológicamente importante para mediar en algunos de los efectos miotróficos de los andrógenos todavía no está determinado. La modulación de los efectos de los andrógenos también ocurre a **nivel molecular** debido a las diferencias en la distribución de los correguladores de receptores de andrógenos en varios tejidos. El receptor androgénico pertenece a una gran familia de receptores nucleares que consta de un dominio de enlace al ADN, un dominio de enlace ligando y al menos dos dominios de activación transcripcional, AF1 y AF2. Una hipótesis es que la modulación del receptor androgénico puede ocurrir como resultado de

moduladores receptores de andrógenos selectivos (“SARMs” por sus siglas en inglés Selective Androgen Receptor Modulators) de anabolizantes esteroides y no-esteroides, incluyendo cambios conformacionales específicos en el complejo receptor de andrógenos, que afecta a su vez a la interacción posterior con varios correguladores en diferentes tejidos ^[16].

Los esteroides anabolizantes tienen una serie de **efectos negativos**, por lo que están limitados a tratamientos clínicos. Los efectos negativos se pueden clasificar en 5 grupos: cardiovasculares, endocrinos, hepáticos, psiquiátricos y musculoesqueléticos:

Efectos cardiovasculares: El mal uso de los esteroides anabolizantes puede acarrear varios problemas de salud importantes, como hipertensión sistémica, aumento del espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (hipertrofia cardíaca), alteración de la función diastólica y arteriosclerosis, pudiendo llegar a producir la muerte súbita del deportista debido a su abuso.

Tabla 2. Casos documentados de deportistas fallecidos de infarto tras un consumo abusivo de AAS

Deportista y (Edad)	Referencia
Levantador de peso (22 años)	[17]
Levantador de peso (30 años)	[18]
Levantador de peso (37 años)	[19]
Culturista (28 años)	[20]
Culturista (31 años)	[21]
Culturista (20 años)	[22]
Culturista (23 años)	[23]
Culturista (28 años)	[24]
Culturista (32 años)	[25]
Culturista (29 años)	[25]

Efectos endocrinos: El sistema endocrino también se afecta considerablemente por la administración de esteroides anabolizantes, en particular respecto a la biosíntesis de testosterona y las hormonas reguladores pertenecientes al eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. El uso continuado de esteroides anabolizantes en hombres está relacionado con atrofia testicular, azoospermia (carencia de espermatozoides en el semen) e infertilidad, normalmente reversibles, pero que pueden llegar a persistir durante meses después del cese de la administración. Además, también resulta en una mayor disponibilidad de estrógenos, lo que provoca feminización de los hombres en términos de tono de voz y de ginecomastia irreversible (aumento del volumen de las mamas) ^[26].

Efectos hepáticos: La principal consecuencia del mal uso de esteroides anabolizantes en el hígado es la hepato-toxicidad, en especial la asociada con los

esteroides 17-alquilados, produciendo adenomas hepáticos o carcinomas hepatocelulares. Además se pueden presentar lesiones estructurales y cavidades llenas de sangre ^[27, 28].

Efectos psiquiátricos: El abuso de esteroides anabolizantes está relacionado con cambios de humor, comportamiento agresivo y depresión. Estos efectos son de corta duración tras el cese en la administración. No se ha demostrado un riesgo de dependencia física, pero no se puede descartar ^[29, 30].

Efectos musculo-esqueléticos: La administración de esteroides anabolizantes ha demostrado causar desórdenes estructurales en el alineamiento de las fibras de colágeno en los tendones. La combinación de daños en los tendones con el aumento de la masa muscular puede conducir a mayores riesgos de rotura durante la actividad física ^[27].

S2- Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias afines

Las hormonas **peptídicas, factores de crecimiento y sustancias afines** son especies que están compuestas por derivados de aminoácidos y que están en la lista Prohibida. Se incluyen dentro de este grupo aquellas sustancias cuya estructura química o efectos biológicos, o factores de liberación de las mismas, sean similares a los de los nombres de las sustancias están en lengua inglesa, tal como aparecen en los listados de la WADA. Entre paréntesis en lengua española y las siglas por las que se las conoce, tal como aparecen en el listado del Consejo Superior de Deportes español:

1) **Erythropoiesis-Stimulating Agents (Agentes estimulantes de la eritropoiesis):** **Erythropoietin** (Eritropoietina, EPO); **Darbepoietin** (Darbepoietina, dEPO); **hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizers** (estabilizadores del factor inducible por hipoxia, FIH); **methoxy polyethylene glycol-epoetin beta (CERA)** (metoxi-polietilenglicol epoetina beta, CERA), **peginesatide (Hematide)** (peginesatida, (Hematide)).

2) **Chorionic Gonadotrophin CG** (Gonadotrofina coriónica; CG) y **Luteinizing Hormone** (Hormona Luteneizante, LH). Tanto la CG, como la LH están solamente prohibidas en los hombres.

3) **Corticotrophins** (corticotrofinas)

4) **Growth Hormone; hGH** (Hormona del crecimiento, hGH); **Insulin-like Growth Factors; IGF-1** (Factores de crecimiento análogos a la insulina como, por ejemplo, IGF-1); **Mechano Growth Factors; MGFs** (Factores de crecimiento mecánicos, MGFs); **Platelet-Derived Growth Factor; PDGF** (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF), **Fibroblast Growth Factors; FGFs** (Factores de crecimiento derivado de los fibroblastos, FGFs), **Vascular-Endothelial Growth Factor; VEGF**(Factor de crecimiento endotelial, FCEV) y **Hepatocyte Growth Factor; HGF** (Factor de crecimiento de los hepatocitos, HGF), así como cualquier otro factor de crecimiento que afecte a la síntesis o la degradación de las proteínas de los músculos, los tendones o los ligamentos, a la vascularización, a la utilización de la energía, a la capacidad de regeneración con variación del tipo de fibra.

Y otras sustancias con estructura química similar o efectos biológicos similares.

Las hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias afines también se **producen de forma natural en el cuerpo humano**. Para declarar un positivo con las hormonas pépticas, factores de crecimiento y sustancias afines se siguen unos criterios parecidos a los empleados con los esteroides anabolizantes endógenos. Por ejemplo, se considerará que un **resultado es adverso cuando**:

1) La **concentración** en la **orina** de esas sustancias, alguno de sus metabolitos, o algunos de sus marcadores pertinentes se **desvíe del rango de referencia** sin que el deportista haya podido **demostrar objetivamente** que se debe a una **causa natural** o debido a una **enfermedad**,

2) O bien se detecte algún **análogo, mimético, marcador de diagnóstico o factores de liberación** de alguna de las sustancias incluidas en este grupo farmacológico,

3) O bien, la presencia de **cualquier otra sustancia con estructura química** o algún/os **efecto/s biológico/s similar/es**, o de **marcador/es** de diagnóstico o de factores de liberación de alguna de las hormonas detalladas, o de cualquier otro hallazgo que indique que la sustancia detectada tiene una **procedencia exógena**.

La **eritropoietina (EPO)** es una hormona sintetizada principalmente en las células intersticiales peritubulares de los riñones que estimula la producción de glóbulos rojos en la médula ósea. Aproximadamente un 1% del total de los glóbulos rojos del organismo se tiene que producir diariamente en la médula ósea porque esa misma cantidad de glóbulos rojos se destruye en la médula espinal, el bazo y el hígado. Se cree que la EPO se produce sobre todo en el riñón porque el riñón puede regular de este modo y al mismo tiempo el número de glóbulos rojos que circula por la sangre y el volumen del líquido extracelular y del plasma sanguíneo. Cuando se produce una anemia se estimula la producción natural de EPO que puede llegar a producir 10 veces más glóbulos rojos que en condiciones normales ($2-3 \times 10^{11}$ células por día, en condiciones normales) ^[31], y cuando se produce una policitemia (enfermedad caracterizada por presentar una elevada producción de glóbulos rojos) o se realizan varias transfusiones de sangre a una persona, se inhibe la producción natural de EPO y se disminuye la producción de glóbulos rojos.

A mediados de los años 80 se consiguió aislar y clonar el gen humano de la EPO. Esto permitió producir EPO humana "recombinada" de modo artificial con la técnica de "recombinación del DNA". La EPO producida artificialmente tiene los mismos efectos que la producida de modo natural por el organismo. Las primeras EPO artificiales tenían una vida media muy corta y debían inyectarse con frecuencia (3 veces por semana) para tener efecto. Sin embargo, posteriormente

se consiguieron fabricar otras EPO de vida más larga (ejemplo: darbepoietina (dEPO) ; “Aranesp” o epoietina alpha, beta, omega, delta), conocidas como “epoietina” que permiten conseguir los mismos efectos con una sola inyección semanal. Aunque este tipo de EPO es más cómoda de usar, se detecta mucho más fácilmente en la orina. También hay otras “epoietinas”, genéricas ligeramente distintas a las originales o copias, que también están prohibidas.

En el año 2001 se aprobó la utilización con fines médicos de una nueva proteína estimulante de la eritropoietina denominada “darbopoietina alfa o “NESP”. Esta sustancia se produce por tecnología recombinante en células de ovario modificadas de hamster. Los primeros positivos se detectaron en los Juegos Olímpicos de Invierno de 2002 (las esquiadoras de fondo rusas Larisa Lazutina y Olga Danilova y el esquiador de fondo y medallista alemán nacionalizado español Johann Mühlegg). En el año 2010 se ha comercializado en India el primer genérico de la darbopoietina, que se denomina “CRESP”.

En el año 2007, el laboratorio suizo ROCHE comercializó el CERA (Activador continuo del receptor de la eritropoietina), bajo el nombre comercial de MIRCERA, para tratar a los enfermos de insuficiencia renal. Este producto es un activador continuo del receptor de la eritropoietina, obtenido por síntesis química. La actividad del CERA en los receptores es diferente a la de la eritropoietina, y se caracteriza por una asociación más lenta y una disociación más rápida con los receptores, una actividad específica reducida *in vitro* con una actividad aumentada *in vivo*, así como una semivida más larga. Estas propiedades le distinguen de las anteriores EPO porque con su larga semivida de eliminación, las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas del CERA permiten su administración una vez al mes, en vez de varias veces por semana. La semivida de eliminación del CERA tras su administración I.V. es de 15 a 20 veces más larga que la de la eritropoietina recombinante humana. La detección por primera vez de la EPO-CERA a partir de

julio de 2008 permitió detectar positivos por esta sustancia en el Tour de Francia de 2008 a cuatro ciclistas. Este nuevo procedimiento de detección de la EPO-CERA permitió que el Comité Olímpico Internacional volviese a analizar en su laboratorio de Lausana todas las muestras congeladas de los Juegos Olímpicos de Pekín 2008 en busca de esta nueva sustancia. El reanálisis de las muestras detectó positivo por EPO-CERA en 6 nuevos deportistas, entre los que destacaron el ciclista italiano Davide Rebellin (medalla de plata en ciclismo de fondo en carretera en Pekín'08) y el atleta de 1.500 metros de Bahrein, aunque de origen marroquí Rashid Ramzi (campeón olímpico en Pekín'08).

Diferentes estudios realizados con jóvenes poco entrenados, pero también con deportistas muy entrenados de nivel regional han encontrado que la administración de dosis pequeñas de EPO humana recombinada durante pocas semanas, se acompaña de una mejora significativa de los valores del consumo máximo de oxígeno (entre un 5 y un 10%), del tiempo de agotamiento durante el ejercicio de intensidad máxima y de adaptaciones cardiocirculatorias durante el ejercicio de intensidad submáxima (disminución de la frecuencia cardíaca). Estos resultados indican que la administración de EPO se acompaña de una mejora significativa de la marca deportiva en los ejercicios de larga duración.

La **hormona del crecimiento (GH)** es una hormona formada por glúcidos y proteínas (glicoproteica) que se sintetiza y se segrega en las células de una región del cerebro denominada hipófisis. La GH actúa en varios aspectos del metabolismo y del crecimiento humano, bajo una compleja red de mecanismos neurales, metabólicos y hormonales.

La función de esta hormona en el organismo humano está íntimamente unida tanto al proceso de crecimiento de los tejidos, como al metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Básicamente, niveles fisiológicos de GH estimulan la utilización de grasas y la síntesis de proteínas, inhiben la utilización de

la glucosa, y favorecen el crecimiento de los tejidos porque retienen nitrógeno y aumentan el transporte de aminoácidos hacia el interior de los tejidos.

Además, en los últimos 15 años se ha hecho evidente que muchos de los efectos de la GH están mediados por dos hormonas conocidas como "insulin-like growth factors" (IGF), o somatomedinas: la IGF-I y la IGF-II. Parece que las acciones de la GH están mediadas por complejas interrelaciones, sólo parcialmente conocidas, con varias hormonas (por ejemplo, con la insulina).

Las razones por las que algunos deportistas utilizan GH desde hace dos últimas décadas se pueden resumir en dos puntos: 1) porque piensan que es más efectiva que los esteroides anabolizantes a la hora de optimizar su composición corporal, su fuerza y su rendimiento físico; y 2) porque al menos hasta el año 2004 evitaban el riesgo de dar positivo en los controles de dopaje, ya que las técnicas cada vez más precisas para detectar los esteroides anabolizantes androgénicos aumentan las posibilidades de descalificación por uso de los mismos. Por otro lado, la IGF-I ha emergido en el mundo del deporte a partir del año 1994 y parece ser que se está utilizando en proporciones nada desdeñables. En este sentido, Da Parry investigó el consumo de IGF-I en un grupo de 189 culturistas y halterófilos, y encontró que un 14.3% de estos sujetos afirmaban haber consumido IGF-I. El deportista, basándose, por un lado, en testimonios de compañeros satisfechos con los resultados obtenidos, y, por otro lado, en los efectos fisiológicos conocidos de estas hormonas, utiliza la GH y la IGF-I (o ambas al mismo tiempo) buscando, principalmente, los siguientes objetivos concretos: 1) la estimulación de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético, 2) el aumento de la utilización de grasas y descenso generalizado de la grasa corporal, y 3) la mejor recuperación después de lesiones musculoesqueléticas.

El test de detección de la GH exógena en sangre fue utilizado por primera vez en los Juegos Olímpicos de Atenas en 2004, tras varios años de investigación sobre el

mismo que ha costado cerca de 6 millones de dólares. Hasta ahora, se ha utilizado muy poco porque requiere la producción de anticuerpos que, actualmente son costosos y solamente se fabrican en algunos laboratorios de investigación. Cuando se comercialicen estos anticuerpos y se produzcan en cantidades industriales, los test de detección de GH serán más numerosos. Además, se está experimentando con otro test para que, combinado con el primero, permita mejorar la detección de GH en orina. Además, como la GH se conserva muy bien y durante mucho tiempo en muestras de sangre congeladas, se están conservando muestras de sangre en los laboratorios para poder analizarlas cuando haya un nuevo método de detección o se haya mejorado el actual.

La GH se ha estado analizando en sangre y no en orina, porque los niveles de hGH en orina son extremadamente pequeños (menores del 1% de los niveles encontrados en sangre) y porque implantar un método de detección de GH en la orina sería mucho más caro y difícil que el ya de por sí caro y difícil método que se ha implantado en sangre. Sin embargo, a partir del año 2011 la AMA aconseja que si la concentración de GH en orina es mayor de 5 mIU por mililitro, se debe estudiar en tests posteriores de dopaje porque puede poder indicar el uso ilegal de GH de origen exógeno.

La **IGF-1** (de la palabra Insulin Growth Factor, Factor de Crecimiento análogo a la Insulina) es una hormona con una estructura química bastante similar a la de la insulina, cuya producción es estimulada por la hormona del crecimiento y que aumenta la síntesis de proteínas en el músculo, favoreciendo el aumento de la masa muscular. Además, la IGF-1 administrada a grandes dosis puede tener los mismos efectos que la insulina. La IGF-1 se suele utilizar en los laboratorios de las compañías farmacéuticas para acelerar el crecimiento de los cultivos celulares. También se ha intentado utilizar en ensayos clínicos con humanos pero, por el

momento, los resultados no son buenos porque se acompañan de efectos secundarios importantes.

Algunos deportistas creen que el aumento de la masa muscular que se produce con la utilización de IGF-1, se acompaña de un aumento de la fuerza muscular, de la síntesis de proteínas y de una disminución de la grasa corporal. No existen evidencias de que la administración de IGF-1 se acompañe de una mejora de la marca en deportistas. De todos modos se piensa que para que se produjera una mejora de la marca, en el caso de que se produzca, se necesitaría utilizar dosis muy elevadas que se acompañarían de efectos negativos sobre la salud como, por ejemplo, la hipoglucemia.

La **Hormona Gonadotrofina Coriónica (CG)** es una hormona que se produce de modo natural en la placenta durante el embarazo y puede aumentar la producción natural de esteroides naturales masculinos y femeninos. Como la inyección de CG estimula la producción de testosterona, algunos deportistas creen que la CG debe tener los mismos efectos que los esteroides anabolizantes androgénicos sobre la marca. Otros deportistas que utilizan esteroides anabolizantes, consumen CG para estimular la producción de testosterona y de espermatozoides por el testículo y así contrarrestar dos de los efectos secundarios de la utilización de esteroides anabolizantes (disminución del tamaño de los testículos y disminución o falta de producción de espermatozoides). Cuando la utilizan los varones, los efectos secundarios son similares a los de los utilizadores de esteroides anabolizantes androgénicos.

Las **Gonadotrofinas** de origen hipofisario y sintético son hormonas pituitarias secretadas por una región del cerebro llamada hipófisis e incluye hormonas como, por ejemplo, **la hormona luteinizante (LH)** que: 1) estimula en la mujer, los ovarios para que se produzca la ovulación y también estimula la producción de testosterona, y 2) en el hombre estimula los testículos para producir testosterona.

Como la inyección de LH estimula la producción de testosterona en hombres, algunos deportistas creen que la LH debe tener los mismos efectos que los esteroides anabolizantes androgénicos sobre la marca. Los efectos secundarios de la LH son similares a los de los utilizadores de esteroides anabolizantes androgénicos.

S3. β -2 Agonistas

Los **agonistas selectivos de los β 2-adrenoreceptores** (o los **β -2 agonistas**), se conocen más comúnmente como "mitigadores" del asma o **broncodilatadores**. Son drogas que relajan los músculos y abren las vías respiratorias (bronquios) de los pulmones, que reducen su tamaño durante un ataque de asma. Las drogas más conocidas de este grupo son el **salbutamol** (ej. Ventolin, Volmax) y la **terbutalina** (Bricanyl).

Todos los β -2 agonistas (Bambuterol, clomifeno, fenoterol, formoterol, gestrinona, formoterol, orciprenalina, reproterol, salbutamol, salmeterol, terbutalina y otras sustancias con estructura química similar y efectos farmacológicos similares) están prohibidos excepto el salbutamol (dosis máxima 1600 microgramos por 24 horas), formoterol (dosis máxima 36 microgramos por 24 horas) y el salmeterol administrados por inhalación de acuerdo al régimen terapéutico recomendado por el fabricante. La presencia urinaria de salbutamol en una concentración mayor de 1000 ng/mL o de formoterol en una concentración mayor de 30 ng/mL se presume de no ser consecuencia del uso terapéutico de la sustancia y por tanto se considerará un Resultado Analítico Adverso a menos que el deportista demuestre por medio de un estudio farmacocinético controlado que el resultado anormal fue consecuencia del uso de una dosis terapéutica por inhalación no mayor que la indicada anteriormente^[11].

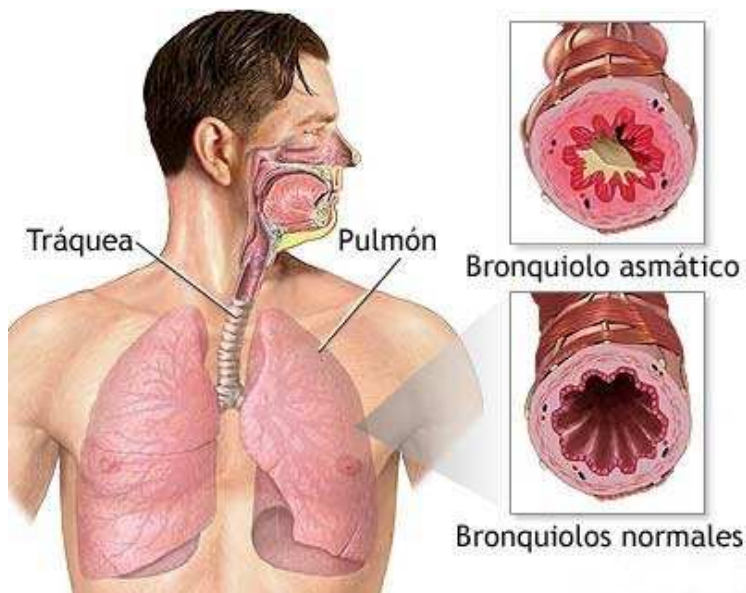


Figura 4. Efecto de los β -2 agonistas instalados sobre los bronquiolos

El tratamiento **antiasmático** con los **β -2 agonistas inhalados** es necesario para los **asmáticos**, pero no se debe utilizar por los atletas de élite no asmáticos debido al efecto sistémico posible y a los efectos secundarios de los **β -2 agonistas inhalados**. Los efectos secundarios más comunes de los **β -2 agonistas** son: **temblor de manos, inquietud, nerviosismo y dolor de cabeza**. También pueden causar **ruborización y palpitaciones** ^[32, 33].

Otro efecto negativo muy importante es la **disminución** de la **densidad ósea**, que puede conducir a fracturas y lesiones severas ^[34, 35].

S4. Moduladores Hormonales y Metabólicos

Las **hormonas** son moléculas **mensajeras** liberadas por las **glándulas endocrinas** para regular **funciones específicas** del cuerpo como el nivel de glucosa en sangre o el crecimiento muscular. Las hormonas se unen a los receptores en la membrana celular o se unen a los receptores en el núcleo de célula. En este contexto, los

antagonistas hormonales y los moduladores son sustancias que influyen en estos, **inhibiendo o estimulando** los receptores específicos y además **acelerando o retardando** reacciones selectivas enzimáticas.

Las siguientes clases están prohibidas en la lista:

Inhibidores de la aromatasa, que incluyen pero no se limitan a: **aminoglutetimida, androsta-1,4,6-trien-3,17-diona (androstatriendiona), 4-androsten-3,6,17 triona (6-oxo), anastrozol, exemestano, formestano, letrozol, testolactona.**

Moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs por sus siglas en inglés: Selective Estrogen Receptor Modulators), que incluyen pero no se limitan a: **raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno.**

Otras sustancias **antiestrogénicas**, que incluyen pero no se limitan a: **clomifeno, ciclofenil, fulvestrant.**

Agentes **modificadores de las funciones de la miostatina**, que incluyen pero no se limitan a: **inhibidores de miostatina.**

Moduladores metabólicos: agonistas del **Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas δ (PPAR δ)** (p.ej. GW 1516) y los agonistas del eje **PPAR δ -proteína quinasa activada por la AMP (AMPK)** (p.ej. AICAR).

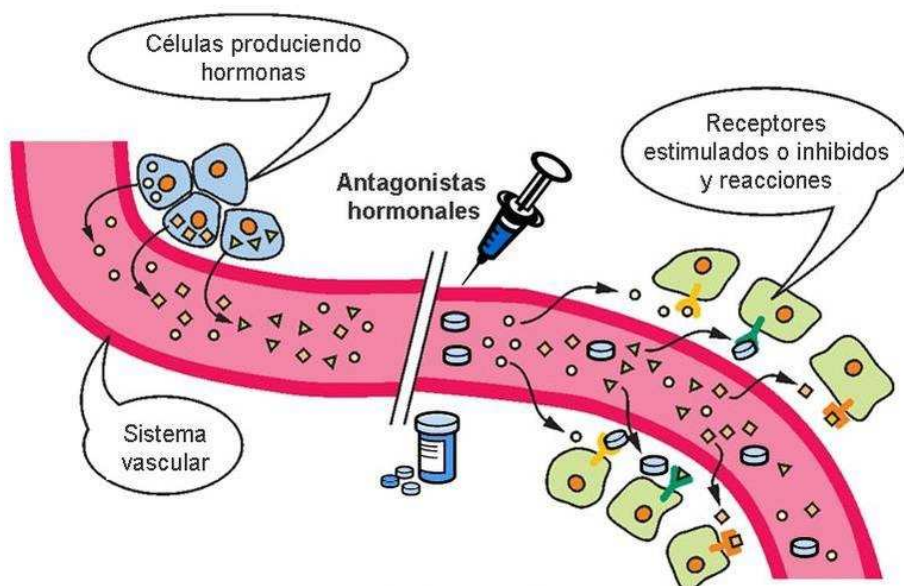


Figura 5. Mecanismo de acción de los antagonistas hormonales

Los antagonistas hormonales y moduladores, especialmente los moduladores de **receptores selectivos de estrógenos (SERMs)**, son mayormente usados para tapar el abuso de **esteroides anabólicos androgénicos (AAS)**. No se usan para incrementar el rendimiento deportivo.

Se conocen los siguientes **efectos secundarios** biomédicos: **rubor, sangrado vaginal, dolor abdominal, dolor de cabeza, visión deteriorada**, aumento del riesgo de **trombosis**, aumento del riesgo del **carcinoma endometrial** (por **tamoxifenos**). El abuso de los **antagonistas hormonales** y de los **moduladores** es una intervención seria en el **sistema endocrino** humano. Especialmente las influencias en la proliferación celular y la regulación celular acentúan el riesgo de enormes enfermedades.

55. Diuréticos y otros agentes enmascarantes

Los **diuréticos** son fármacos que estimulan la **excreción** renal de **agua y electrolitos**, como consecuencia de su acción perturbadora sobre el transporte iónico a lo largo de la nefrona. Su objetivo fundamental es conseguir un balance negativo de agua, pero los **diuréticos** no actúan directamente sobre el agua, sino a través del **sodio** (diuréticos **natriuréticos**) o de la **osmolaridad** (diuréticos **osmóticos**). Los agentes **enmascarantes** son compuestos que se toman con el propósito de ocultar o enmascarar la presencia de drogas ilegales específicas, que son ocultadas durante las pruebas de dopaje. Los agentes **enmascarantes** tienen el potencial de deteriorar o encubrir la sustancia prohibida en la orina. Los **diuréticos** se pueden considerar como agentes **enmascarantes** debido a la dilución de la orina, que da lugar a menores niveles de la sustancia prohibida que es excretada del cuerpo.

Entre los diuréticos se incluyen: **acetazolamida, ácido etacrínico, amilorida, bumetanida, canrenona, clortalidona, espironolactona, furosemida, indapamida, metolazona, tiazidas** (p. ej., **bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida**), **triamterene**, y otras sustancias con **estructura química o efectos biológicos similares** (a excepción de la **drospirenona**, el **pamabrom** y la **dorzolamida y brinzolamida** por vía tópica, que **no están prohibidas**). Como agentes **enmascarantes** están incluidos los siguientes: **Diuréticos, desmopresina, expansores del plasma** (p. ej., **glicerol**; administración endovenosa de **albúmina, dextrano, hidroxietilalmidón y manitol**), **probenecida**; y otras sustancias con **efectos biológicos similares**. La aplicación local de **felipresina** en anestesia dental **no está prohibida**.

El uso *en y fuera de la competición*, según corresponda, de cualquier cantidad de una sustancia **umbral** (**formoterol, salbutamol, morfina, catina, efedrina, metilefedrina y pseudoefedrina**) en **combinación** con un diurético u otro agente

enmascarante requiere la obtención de una **Autorización de Uso Terapéutico** para dicha sustancia además de aquella otorgada para el diurético u otro agente enmascarante^[11].

Los diuréticos se pueden clasificar en 5 grandes clases:

I. INHIBIDORES DE LA REABSORCIÓN DE SODIO:

a. Diuréticos Tiazídicos (derivados de las Benzotiadiazinas y congéneres):

Hidroclorotiazida,

Clortalidona, Xipamida, Piretanida, Metolazona, Politiazida, Bendroflumetiazida, Hidroflumetiazida.

b. Diuréticos de alta eficacia: *Furosemida, Bumetanida, Acido Etacrínico, Indapamida, Antihipertensivos.*

c. Diuréticos Ahorradores de Potasio: *Amilorida, Triamtirene, Espironolactona.*

II. DIURÉTICOS OSMÓTICOS

Manitol, Urea.

III. DIURÉTICOS INHIBIDORES DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA

Acetazolamida, Diclorfenamida, Etoxizolamida, Metazolamida.

IV. DIURÉTICOS QUE INCREMENTAN EL FLUJO SANGUÍNEO RENAL

Teofilina, Cafeína, Aminosometradina.

V. OTROS DIURÉTICOS

Sales Acidificantes: Cloruro de amonio, de Calcio y nitrato de amonio.

Desde un punto terapéutico los más importantes son **los inhibidores de la reabsorción de sodio**, su **mecanismo de acción** depende del tipo de diurético (tiazídicos, de alta eficacia y ahorradores de potasio).

Las **tiazidas** son inhibidores débiles de la **anhidrasa carbónica (AC)**, además las tiazidas incrementan significativamente la **excreción del ion bicarbonato** (CO_3H^-). También aumentan marcadamente la excreción urinaria de **Na+CL**. El **efecto principal** de los tiazídicos se desarrolla en el nefrón distal, **inhiben la reabsorción activa de sodio** en la rama ascendente gruesa cortical del Asa de Henle, y en la primera porción del túbulo distal. El sodio se liga al cloro y juntos arrastran agua. A su vez las tiazidas **aumentan** también la **excreción de Potasio**.

Los **diuréticos de alta eficacia**, o llamados también **diuréticos del asa**, actúan **inhibiendo la reabsorción tubular del Na y Cl**, en el segmento medular y cortical de la rama ascendente gruesa del asa de Henle. La acción se relaciona con una **inhibición de la enzima Na-KATPasa**. La **furosemida** y **bumetanida**, también **inhiben** a la **anhidrasa carbónica**, pero esta acción es muy débil para ser importante. También aumentan el flujo sanguíneo renal, y el riego sanguíneo de la médula renal, pudiendo así interferir con el mecanismo multiplicador de contracorriente, que necesita que la médula renal, sea hipertónica. De cualquier manera, estos diuréticos, **aumentan** definitivamente la **excreción de sodio, cloruro, potasio, y agua**.

Los **diuréticos ahorradores de potasio** tienen una moderada **acción natriurética, diurética** y un importante efecto **ahorrador de potasio**. Su mecanismo de acción se desarrolla en el **T. colector, segmento cortical**, que es el sitio de mayor **eliminación de potasio**, tanto por transporte activo como pasivo. Estos agentes producen una **disminución** de la **reabsorción de sodio** en el fluido colector, en

consecuencia ocurre una **inhibición** de la formación de un **potencial negativo intraluminal**, necesario para la secreción o eliminación del potasio. Así se **elimina** moderadamente **sodio, cloro y agua** y se **retiene potasio** ^[36].

Los **diuréticos** tiene la capacidad de aumentar la producción y la secreción de la orina y son utilizados con frecuencia por los atletas para **excretar drogas prohibidas** o para **perder peso rápidamente** ^[37]. Sin embargo, las pérdidas de fluido por el tracto urinario causadas por esta droga pueden llevar al **agotamiento del volumen intravascular**. El exceso de la terapia con diuréticos conjuntamente con el aumento de la epidrosis, lleva generalmente a la **deshidratación** y a la **hipovolemia**, que es una de las causas principales del **hipokalemia**. Al contrario que en los pacientes médicos, los atletas no retienen un exceso de agua, así el uso de los diuréticos da lugar a una **pérdida anormal y peligrosa** de **agua** y de **electrólitos**. Los atletas con **deshidratación** inducida por diuréticos, realizándose en calor, son más susceptibles al **golpe de calor**. El uso de diuréticos lleva comúnmente a **niveles corporales bajos** del **potasio** (hipokalemia). La **hipokalemia** causa principalmente un **funcionamiento anormal neurológico** y **arritmias cardíacas**, incluso **paro cardíaco**. Además, son comunes los síntomas como **debilidad muscular** y **calambres musculares**. Los niveles de concentración de potasio en suero se pueden correlacionar con síntomas clínicos específicos^[38]:

Tabla 3. Síntomas clínicos relacionados con la concentración de ión potasio en suero

Concentración de K ⁺ en Suero	Síntoma clínico
3.0-2-6 mmol/L	Sensibilidad o dolor muscular, calambres ocasionales
< 2.5 mmol/L	Degradación muscular
< 2.0 mmol/L	Muerte de las células musculares

Por otra parte, el abuso de diuréticos como la **espironolactona**, el **triamtereno** y la **amilorida** pueden llevar a una **concentración extremadamente alta** de **potasio** en la sangre. La hiperkaliemia puede llevar a **arritmias malignas**. En general, todos los diuréticos tienen los mismos **efectos secundarios, deshidratación, hipovolemia, calambres musculares e hipotensión**^[39].

Un peligro del abuso de diuréticos por parte de deportistas es una **termorregulación deteriorada**, basada en la **deshidratación** producida por el efecto conjunto de los diuréticos y la sudoración durante el ejercicio, el aumento de la temperatura corporal durante el ejercicio debido a una baja sudoración y el flujo sanguíneo en la sangre, junto con la falta de electrolitos, especialmente potasio, puede conducir a **problemas** de salud **muy graves** e incluso a la **muerte**^[40]

M1. Aumento de la transferencia de oxígeno

El **aumento de la transferencia del oxígeno** incluye el **dopaje sanguíneo** y el uso de **transportadores artificiales del oxígeno**. El **dopaje sanguíneo** es la **administración de glóbulos rojos** a un atleta para **aumentar** la capacidad de **transportar el oxígeno** por su sangre, aumentando la **entrega de oxígeno** a los músculos, particularmente en condiciones de ejercicio físico exigente.



Figura 6. Bolsas de sangre

El **dopaje sanguíneo** incluye el uso de un **autólogo, homólogo o heterólogo** de la **sangre** o los productos de los **glóbulos rojos** de **cualquier origen** y se prohíbe en el deporte. Además, el **aumento artificial de la absorción, el transporte o la entrega de oxígeno**, incluye pero no limita a los productos químicos **perfluorados**, **efaproxiral (RSR13)** y los productos de **hemoglobina modificada** (p. ej., productos basados en **sustitutos de la hemoglobina** o en **hemoglobina microencapsulada**) excluyendo el oxígeno suplementario

Entre los **ejemplos** se incluyen la **inyección** de un atleta con los **glóbulos rojos de otra persona**; **extraer la propia sangre** dos o tres meses antes de la competición, almacenarla, y después **devolverla** al cuerpo, compensando la pérdida del volumen sanguíneo y finalmente resultando en **un incremento del volumen de sangre**.

Los principales **efectos secundarios** del **dopaje sanguíneo** incluyen: la **formación de coágulos sanguíneos**, **sobrecarga** del sistema circulatorio, daños en el riñón por **reacciones alérgicas** y **transmisión de enfermedades** infecciosas como el VIH. Más efectos secundarios pueden ser: **erupción**, **fiebre** y **choque** debido a una **reacción alérgica**, **choque metabólico**, **reacciones hemolíticas agudas** con **daño del riñón** si se utiliza la sangre incorrectamente marcada, reacciones de **acción retardada** debidas a la transfusión dando por resultado **fiebre** e **ictericia** (potencialmente peligrosas para la vida) y transmisión de **enfermedades infecciosas (hepatitis viral y SIDA)**.

Los **efectos secundarios** de los **transportadores artificiales del oxígeno** varían significativamente e incluyen: **fiebre**, **menor número de plaquetas**, **hipertensión**, **vasoconstricción**, **irritabilidad gastrointestinal**, **entrega deteriorada del oxígeno** a los tejidos, **daños en el riñón** y **sobrecarga de hierro**. Además, los **transportadores del oxígeno** basados en la **hemoglobina** reducen el **óxido nítrico** que media en la **vasodilatación** de las **arteriolas** y los **capilares**. La **toxicidad renal**, inducida por la filtración de los **monómeros** de la **hemoglobina** y de la **necrosis** consecutiva del **túbulos**, representa una **reacción adversa potencialmente fatal** de estas sustancias. Los **productos de la sangre** derivados de la hemoglobina de **origen humano** o **bovino**, podría contener **agentes infectantes** como **virus** o inducir **efectos inmunogénicos** en el receptor.

Los **efectos adversos** asociados al uso de **perfluorocarbonos** incluyen **síntomas** similares a una **gripe** con **fiebre** y **mialgias**. Los **perfluorocarbonos** se han ligado también a la **obstrucción hepática** o del **bazo** con fallos consecutivos y debilitación de las defensas inmunes. Más efectos secundarios son: **reacciones alérgicas**, **incremento** de la **temperatura corporal** hasta los **40°C**, **fiebre** y **frio**, **diarrea**, **toxicidad** en el **hígado**, **pulmón** y **riñón** (las **lesiones** suelen ser **irreversibles** en la mayoría de los casos), **infecciones sanguíneas** si las preparaciones tienen

impurezas bacteriológicas, graves condiciones como **embolismo** y **trombosis** (trombocitopenia), riesgo **de transmisión del virus del SIDA** si se comparten las agujas, **formación de burbujas de aire** en los vasos sanguíneos.

M2. Manipulación Química y Física

La **manipulación química y física** es el uso de sustancias o de métodos para **alterar una muestra de orina**. Por ejemplo, usando **orina de otra persona** para las muestras o **epitestosterona** o **bromantano**. Concretamente, la **manipulación química y física** consiste en el uso de **sustancias y/o de métodos** que **pueden** o que **intentan falsificar** la **integridad** y la **validez** de las **muestras** recogidas durante los controles de dopaje. La **manipulación química y física** de las muestras está **prohibida**. Incluye pero no se limita a la **cateterización**, a la **substitución** de la **orina y/o** a la **adulteración** de la **orina** (p. ej. **proteasas**). Se han llegado a lanzar al mercado **penes artificiales** de gran realismo para utilizar con **orina limpia o sintética** para falsear la toma de muestras de orina.

Las **infusiones intravenosas y/o** inyecciones de más de 50 mL cada 6 horas están **prohibidas** excepto aquellas legítimamente recibidas en el curso de admisiones hospitalarias o exámenes clínicos. La secuencial **extracción, manipulación y reintroducción** de **cualquier cantidad de sangre** total en el sistema circulatorio está prohibida.

Los **efectos secundarios** de la manipulación química y física de las muestras de orina son **limitados** y pueden variar con respecto a la clase de manipulación. Algunos de los métodos usados para la manipulación de la muestra de orina tienen efectos secundarios dañinos. La **cateterización** puede causar **cistitis** debido a la **infección** de la **vejiga** y a la **inflamación** de la **zona urinaria inferior**. La substitución de la orina puede también conllevar una variedad de **infecciones**.

M3. Dopaje genético

Un **gen** es la unidad biológica de la herencia y códigos simplificados para la fabricación de una proteína. En algunos casos estos genes son **defectuosos** y llevan información incorrecta que conlleva a una carencia de la síntesis o viceversa. En este caso, la **terapia genética** intenta **reparar** el gen defectuoso. Pero si esto es posible se debe considerar un **abuso** del **aumento** de las **proteínas musculares**, por ejemplo. Por lo tanto, la capacidad para emplear mal la **terapia genética** en el deporte indujo a la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) que pusiera el dopaje genético en la Lista Prohibida, definiéndolo como: “el uso **no terapéutico** de **células, genes o elementos genéticos**, o de la **modulación** de la **expresión génica**, con el fin de **incrementar el rendimiento** atlético” ^[11]

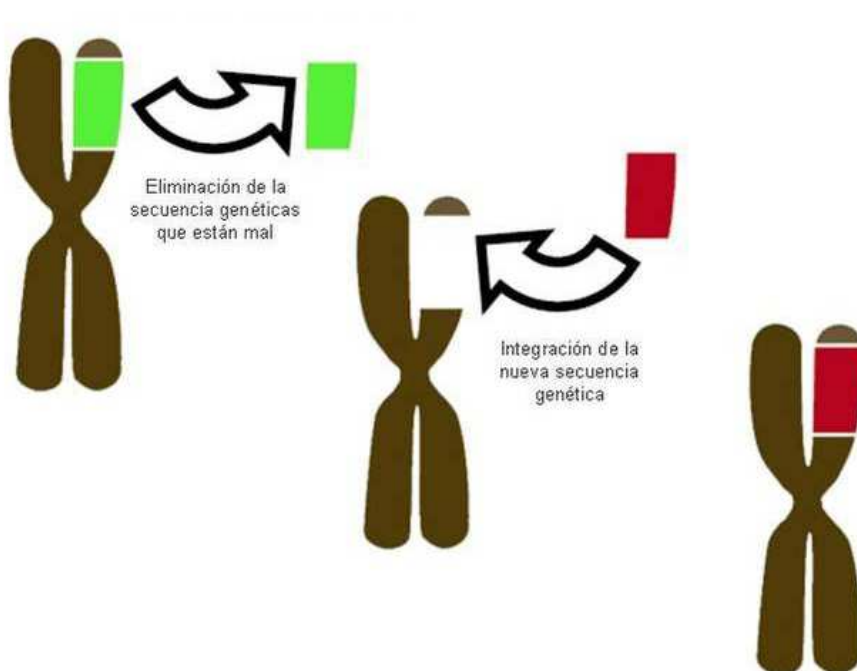


Figura 7. Modo de acción de la terapia genética

No obstante, no es nada fácil detectar que se han manipulado genes. En el contexto de la actividad física varios genes llevan la información del aumento de resistencia o de proteínas que incrementan la masa muscular.



Figura 8. Incremento en la masa muscular de un ratón genéticamente dopado

La **terapia genética** está todavía lejos de ser un **tratamiento médico aprobado** y establecido. La ocurrencia de demasiadas complicaciones dentro de varios ensayos indica la carencia de control. Ahora mismo es **imposible** establecer el estado

exacto de los **efectos secundarios** que el dopaje genético puede presentar ya que las técnicas usadas son todavía indefinidas y los ensayos son **impredecibles**. Los **efectos secundarios** pueden depender de un gran número de factores, incluyendo el gen transferido y el método de transferencia. Se sabe que en primer lugar hay **efectos nocivos a corto plazo** como las **inmunorrespuestas** severas que pueden llevar a la **muerte**, o el desarrollo de **condiciones** como la **leucemia**. En segundo lugar, hay efectos a **largo plazo** derivados de la **falta de control** en la **expresión génica**. Un gen integrado produce sustancias dependiendo de si son necesarias o no, p. ej. el aumento de los **factores de crecimiento** no se podrían parar y podrían aumentar el **riesgo de tumores**. Un abuso de **EPO** con drogas es **reversible** si se para la toma, pero si el abuso de **EPO** se une a la integración de **genes adicionales de la EPO** en los **eritrocitos, aumentan para toda la vida**. Aumentan por lo tanto los problemas **tromboembólicos cardiovasculares**.

S6. Estimulantes

Los **estimulantes** aumentan la **actividad** de una parte del **sistema nervioso central** llamada sistema simpático, que es la encargada de hacer que estemos en un estado de alerta. Los estimulantes pueden **mejorar** el **humor** y el **estado de alerta**, eliminar o **disminuir la sensación de fatiga** e **incrementar** el **rendimiento físico**. Sin embargo, los estimulantes muestran un efecto moderado sobre rendimiento y solamente cuando las dosis aplicadas de estas sustancias eran altas.

Todos los estimulantes (incluidos ambos isómeros ópticos cuando corresponda) **están prohibidos**, a **excepción** de los derivados de **imidazol de uso tópico** y los estimulantes **incluidos** en el **Programa de Seguimiento 2012 (bupropión, cafeína, fenilefrina, fenilpropanolamina, nicotina, pipradol, sinefrina** no se consideran Sustancias Prohibidas) ^[11]

Los estimulantes incluidos en la lista de la WADA se dividen en dos grupos::

1- Estimulantes no específicos:

Adrafinil, amifenazol, anfepramona, anfetamina, anfetaminil, benfluorex; benzfetamina, benzilpiperazina, bromantán, clobenzorex, cocaína, cropropamida, crotetamida, dimetilanfetamina, etilanfetamina, famprofazona, fencamina, fendimetrazina, fenetilina, 4-fenilpiracetam (carfedón), fenfluramina, fenmetrazina, fenproporex, fentermina, furfenorex, mefenorex, mefentermina, mesocarb, metanfetamina (d-), p-metilanfetamina; metilendioxianfetamina, metilendioximetanfetamina, modafinil, norfenfluramina, prenilamina; prolintano.

Un estimulante que no esté explícitamente mencionado en esta lista es considerado una Sustancia Específica

2- Estimulantes específicos:

Adrenalina*, catina, efedrina***, estricnina, etamiván, etilefrina, fenbutrazato, fencamfamina, fenprometamina, heptaminol, isometepto, levmetanfetamina, meclofenoxato, metilefedrina***, metilfenidato, metilhexaneamina (dimetilpentilamina), niquetamida, norfenefrina, octopamina, oxilofrina, parahidroxianfetamina, pemolina, pentetrazol, propilhexedrina, pseudoefedrina**** selegilina, sibutramina, tuaminoheptano, y otras sustancias con estructura química o efectos biológicos similares.**

* La administración local (p. ej., nasal, oftalmológica) de adrenalina o su co-administración con agentes de anestesia local no está prohibida.

** Se prohíbe la catina cuando su concentración en orina supere los 5 microgramos por mililitro.

*** Se prohíben tanto la efedrina como la metilefedrina cuando su concentración en orina supere los 10 microgramos por mililitro.

**** Se prohíbe la pseudoefedrina cuando su concentración en orina supere los 150 microgramos por mililitro.

Hay muchos **efectos** biológicos **secundarios** de los estimulantes en parte relacionados con su estructura química, las **anfetaminas** causan un aumento de la **alerta mental**, de la **presión arterial**, del **ritmo cardíaco**, de la **glucosa en sangre**, de los niveles de **ácidos grasos libres**, y de la **tensión muscular**. Pueden desencadenar **enfermedades cardiovasculares** (hipertensión e infarto), intolerancia de la glucosa o **muerte**. Los efectos secundarios generales incluyen **dolor de cabeza**, **irritabilidad**, **ansiedad**, **depresión**, **agresión**, **convulsiones**, **insomnio**, **náusea**, **vértigos y confusión**. El uso prolongado de altas dosis de anfetaminas puede producir **pérdida de peso**, **paranoia**, **psicosis**, **compulsivo y daños neuronales**. Su continuo uso puede conllevar a una **dependencia física y psicológica** ^[41]. La **cocaína** aumenta la **alerta mental**, el **ritmo del corazón** y la **presión arterial** asociada con el **estrechamiento** de los **vasos sanguíneos**. Cuando la pureza es alta puede llevar a la **muerte**. Las muertes son generalmente atribuidas al **infarto de miocardio**, **vasoespasmos coronarios** e incremento en la **demanda de oxígeno**. A corto plazo, los efectos de la cocaína incluyen **alerta mental**, **euforia**, **paranoia**, **irritabilidad y ansiedad**. Las aplicaciones prolongadas de la cocaína causan **adicción**, **alteraciones del humor**, **desasosiego**, **alucinaciones**, **comportamientos irracionales y violentos** ^[42]. La **nicotina** aumenta el **ritmo cardíaco**, la **presión arterial**, la **reactividad autonómica**, la **vasoconstricción**, los **niveles de lípidos** en la sangre, la **glucosa plasmática**, la **insulina**, y el **cortisol**. La nicotina produce un **estado de alerta**, **euforia**, sensaciones del **placer** y es altamente **adictiva**. La **cafeína** aumenta **ritmo cardíaco**, el **volumen sistólico**, la **presión arterial**, **contractibilidad** de músculos

esqueléticos, el **metabolismo** y **consumición** de **oxígeno**. La cafeína también causa insomnio, **temblor**, **deshidratación corporal**, **síntomas de tolerancia y síndrome de abstinencia**. Otros **efectos secundarios generales** del consumo de **estimulantes** pueden ser **dolores de cabeza**, **ansiedad**, **desilusión**, **alucinaciones**, **repetición compulsiva de movimientos**, **paranoia**, **taquicardias** y **arritmias**.

S7. Narcóticos

Los **narcóticos** se consideran sustancias y drogas que **pueden cambiar estado psíquico y físico** de un organismo en un amplio rango, **desde** el **sueño** y la **inmovilización total** hasta la **euforia** y la **excitación**. El conocimiento popular de la palabra narcótico, por lo tanto, se **relaciona** más con los **síntomas observados** que a la acción específica de sustancias narcóticas. Un **narcótico** es una **droga adictiva** que **reduce dolor**, **induce sueño** y **puede alterar el humor o el comportamiento**. En la medicina, un narcótico analgésico significa opiáceo, y se refiere a todas las sustancias naturales, semisintéticas y sintéticas que actúan farmacológicamente como la morfina, el componente primario del opio natural.

En la lista de la WADA aparecen los siguientes narcóticos prohibidos ^[11]:

Buprenorfina, dextromoramida, diamorfina (heroína), fentanil y sus derivados, hidromorfona, metadona, morfina, oxycodona, oximorfona, pentazocina, petidina.



Figura 9. Flor del opio

Los **opiáceos** actúan a través de los **opiáceos endógenos** - **endorfinas, enkefalinas y las dinorfinas**, que modulan la actividad del **Sistema Nervioso Central**. La **heroína** y la **morfina** se unen a los **mismos receptores** que esos opiáceos endógenos que conllevan a una reducción de la excitabilidad neuronal. Las drogas basadas en el opio actúan solamente de manera sintomática. El **uso médico** primario de la **morfina** es **disminuir el dolor**. La morfina no se acumula en el organismo. La **codeína**, se clasifica como un **analgésico** relativamente **suave** y se aplica como **droga antitusiva y analgésica**. El uso de analgésicos es frecuente en el deporte, especialmente entre los atletas que se ocupan de deportes violentos. El **aumento del umbral de la tolerancia del dolor** causado por los opiáceos, permite un mejor rendimiento deportivo. Como resultado de la **disminución del sentido del dolor**, el incremento del esfuerzo ejercido por un atleta podría **conllevar** a algunas **lesiones y daños en el organismo** de los atletas. Además, los **analgésicos narcóticos** pueden **reducir la ansiedad** e **incrementar el rendimiento** en los

acontecimientos deportivos en los cuales el exceso de ansiedad podría afectar adversamente a un control motor preciso (disparar con pistolas, tiro con arco, etc.)

Los **efectos secundarios** de opiáceos sobre el **Sistema Nervioso Central** incluyen los síntomas siguientes: **Calma** (somnolencia, imposibilidad de concentración, bloqueo mental), **disforia** (menor actividad física, apatía, letargo), **euforia**, **depresión respiratoria** (disminución de la respiración hasta su detención), **menor volumen de orina**, **menor temperatura corporal** (acción depresiva en el hipotálamo), **náuseas y vómitos**, **reducción de las pupilas**, **menor nivel de temblor muscular** (aumentando la actividad de neuronas inhibitorias mediada por los receptores GABA), **bradicardia** (disminución del ritmo cardiaco), **dependencia física y psíquica** ^[43, 44, 45].

La **intoxicación** por los **opiáceos** causa una **reducción** de las **pupilas**, **somnolencia**, **coma**, **piel seca y fría**, **alteraciones** en la **respiración**, **disminución** del **ritmo cardíaco**, de la **presión arterial** y de la **temperatura corporal**. La **muerte** puede darse como resultado de la **insuficiencia cardiovascular** y **respiratoria** inmediatamente después de la inyección intravenosa de morfina.

Los opiáceos son drogas con **gran potencial de dependencia física y psíquica**. La **tolerancia** a la **morfina** se desarrolla **rápidamente**. Sin embargo, la **heroína penetra** el Sistema Nervioso Central mucho **más rápidamente** que la morfina, **desarrollando dependencia** a la misma en un breve periodo de tiempo. En contraste con la heroína, la **codeína no causa** generalmente **dependencia** física o psíquica. La repentina **retirada de drogas opiáceas**, o el uso de antagonistas opiáceos, causa un **síndrome de abstinencia** en una persona adicta. Después de 2-3 días de abstinencia se pueden observar los síntomas negativos siguientes: **aumento del ritmo cardíaco**, **presión arterial**, **temperatura corporal**, **sudor**, **temblores musculares**, **espasmos**, **dolor**, **insomnio**, **sofocos**, **vértigos**, **desasosiego**, **náuseas**, **vómitos** y **diarrea**.

S8 Cannabinoides

Los **cannabinoides** son un grupo de sustancias naturales presentes tanto en la planta **Cannabis Sativa** como en sus **análogos sintéticos o metabolitos**. Químicamente son **derivados** del **dibenzopireno** o los **monoterpenoides**. El Cannabis Sativa consiste en unos 420 compuestos químicos de los cuales los más importantes son: el **Δ 9-tetrahidrocannabinol** (Δ 9-THC), el **Δ 8-tetrahidrocannabinol** (Δ 8-THC), el **cannabinol** y el **cannabidiol**. El **Δ 9-tetrahidrocannabinol** natural (**cannabis, hachís, marihuana**) o **sintético** y los **canabimiméticos** (p. ej., "**Spice**" (que contiene **JWH018, JWH073, HU-210**) están **prohibidos** ^[11].

Los cannabinoides se utilizan principalmente bajo la forma de **hachís, aceite del hachís o marihuana**, siendo su forma de consumo principalmente **fumada** en forma de cigarrillos o pipa. El cannabis es ampliamente utilizado por poseer las características de **alteración del humor** y de la **relajación**. Tienen **efectos desmotivadores** sobre el entrenamiento y el deporte competitivo. En los **deportes que exigen velocidad, agilidad y atención** (esquí, deportes de motor, etc.) la **disminución del rendimiento psicomotor** suscita el problema de la **seguridad**. Más que por una mejora de rendimiento deportivo, la **prohibición** del uso de cannabinoides en el deporte se basa en la preocupación de la **seguridad durante el entrenamiento y la competición**, la **idealización positiva a atletas de élite** en sociedad y en sostener la **ilegalidad** del uso de los **cannabinoides** en muchos países.

Además de **efectos psicológicos**, la marihuana **induce taquicardia, broncodilatación** y un mayor **flujo de sangre a las extremidades**. Fumar hachís o marihuana puede inducir el desarrollo de **bronquitis y patologías pulmonares**. Varios de los efectos de los cannabinoides sobre el **Sistema Nervioso Central** incluyen: **euforia, ataques de pánico, comprensión deteriorada, alteración de la**

sensación de tiempo, paranoia, ansiedad, alteración cognitiva, aprendizaje deteriorado, memoria, percepción, juicio, despersonalización, confusión, amnesia, y alucinaciones.

S9 Glucocorticosteroides

Los **glucocorticoides** son **hormonas esteroideas** producidas naturalmente o compuestos sintéticos que **inhiben** el proceso de **inflamación**. Los glucocorticoides se utilizan **para parar los procesos de inflamación**. Los glucocorticoides y los mineralocorticoides **son comúnmente conocidos** como **corticoesteroides**. Todos **comparten** el mismo **esqueleto esteroide** pero se **diferencian** en el **grupo ligado al C17** o en la dirección de este grupo. La **hidrocortisona**, una medicina antiinflamatoria es el **glucocorticosteroide más usado**. Además de los corticoesteroides naturales, (**cortisol, deoxicortona e hidrocortisona**) se han desarrollado los **esteroides sintéticos**. El glucocorticoide más estudiado y usado es el **cortisol**.

Están **prohibidos TODOS** los **glucocorticoesteroides** que se administren por vía **oral, intravenosa, intramuscular o rectal**, esto incluye pero no se limita a **beclometasona, betametasona, budesonida, desonida, desoximetasona, dexametasona, fludrocortisona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona acetonide, fluocortolona, fluorometolona, fluticasona, metilprednisolona, mometasona, parametasona, parametasona acetato, prednisolona, prednisona, triamcinolona, triamcinolona acetonide**, y cualquier otro glucocorticosteroide ^[11].

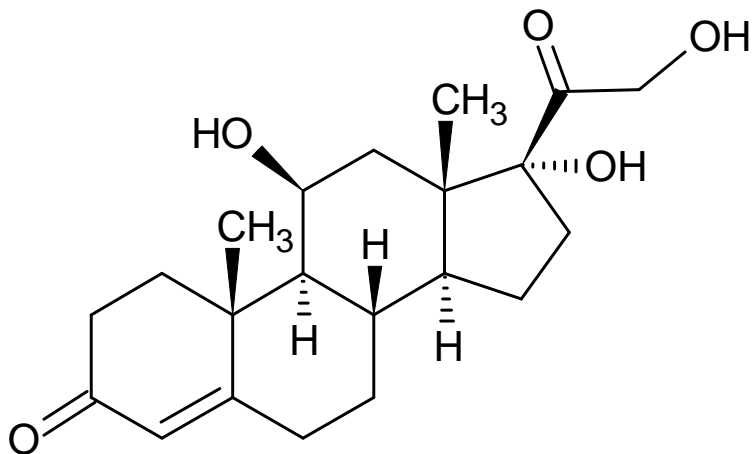


Figura 10 Estructura química del cortisol

El uso prohibido de **glucocorticosteroides** en el deporte se da por sus **efectos relajantes** sobre las **vías respiratorias** y, en **dosis más elevadas**, por sus **efectos analgésicos**. Las vías respiratorias abiertas y la disminución del umbral del dolor permiten a los atletas un **entrenamiento mejor y más rendimiento deportivo**.

Cuando están **administrados** a través de la **circulación sanguínea**, los glucocorticosteroides tienen efectos sobre diversos sistemas corporales. Los posibles **efectos secundarios** agudos incluyen: **retención de líquidos, hiperglucemia y alteración del humor**. Los potenciales efectos secundarios crónicos incluyen: **infecciones sistémicas debidas a la inmunosupresión y problemas musculoesqueléticos** (ej. **osteoporosis, ablandamiento del tejido conectivo y debilitamiento de músculos, de huesos y de ligamentos**). Pueden también inducir: **afecciones dermales, cataratas, cardiovasculares** (hipertensión), **metabólicas** (inhibición del crecimiento, incremento del apetito y del peso o diabetes) y/o **desordenes psiquiátricos** (depresión).

Los **efectos tóxicos** después de la supresión de glucocorticosteroides también se han descritos, como el **fallo renal agudo** debido al **bloqueo** del eje **hipotálamo-**

hipófisis-adrenal, y también otros efectos secundarios debido a **dosis suprafisiológicas** podrían ser el **síndrome de Cushing** (o hipercortisolismo)

P1 Alcohol

El **alcohol** (etanol), es una sustancia exógena incluida en la lista de la WADA a partir del 2008. Está restringido en varios deportes y solamente durante la competición. El alcohol es un **depresor del Sistema Nervioso Central** que retrasa las acciones del cerebro y del cuerpo. El propósito del abuso de alcohol es la **reducción de la ansiedad, reducción del temblor y relajación**. Por lo tanto, el alcohol se consume en deportes que necesitan mucha concentración. **No es posible incrementar el rendimiento** mediante el consumo de alcohol.

El **alcohol** (etanol) sólo está **prohibido En Competición** en los siguientes deportes:

Automovilismo (FIA)

Deportes aéreos (FAI)

Kárate (WKF)

Motociclismo (FIM)

Motonáutica (UIM)

Tiro con arco (FITA)

La **detección** se realizará por **análisis del aliento y/o de la sangre**. El **umbral** de violación de norma antidopaje (valores hematológicos) es de **0.10 g/L** ^[11]. No hay **efectos secundarios específicos de dopaje** conocidos por el abuso de alcohol. Los **efectos biomédicos** secundarios se clasifican en dos opciones principales, efectos secundarios **agudos** y efectos secundarios **crónicos**. Los efectos secundarios **agudos** son: **vómitos, embriagación, hiperventilación, intoxicación alcohólica,**

vértigos, sentidos limitados, dolor de cabeza, diarrea, riesgo de vomitar y aspiración, estado de excitación, coma. Los efectos secundarios **crónicos** son: **hepatitis alcohólica, sentidos limitados, intoxicación alcohólica, efectos secundarios renales, hígado graso, cirrosis del hígado, efectos secundarios neuronales, riesgo de apnea y fallo cardiaco.**

P2 Betabloqueantes

Los **betabloqueantes** se pueden utilizar para tratar algunos tipos de **enfermedades cardíacas**. Son un tipo de droga usado para varias indicaciones, pero particularmente para el tratamiento de **arritmias cardíacas** y como **cardioprotector** después de un infarto de miocardio. Los betabloqueantes aumentan la capacidad de **relajación del corazón**, disminuyen la producción de sustancias nocivas producidas por el cuerpo en respuesta a un paro cardíaco y **disminuyen el ritmo cardíaco**. Los **betabloqueantes** son las drogas que se unen a los **beta-adrenoceptores** y de tal modo **bloquean la unión** a estos receptores de la **noradrenalina** y la **adrenalina**. Es decir los betabloqueantes **evitan la activación** de estos **receptores**.

A menos que se especifique lo contrario, los betabloqueantes sólo están **prohibidos En Competición** en los **siguientes deportes**:

Automovilismo (FIA)

Billar (todas las disciplinas) (WCBS)

Bolos (CMSB)

Bridge (FMB)

Dardos (WDF)

Deportes aéreos (FAI)

Esquí / Snowboard (FIS) en saltos, acrobacias y halfpipe estilo libre de esquí, y halfpipe y Big Air de snowboard

Golf (IGF)

Motonáutica (UIM)

Nueve y Diez Bolos (FIQ)

Tiro (ISSF, CPI) (prohibidos también Fuera de la Competición)

Tiro con arco (FITA) (prohibidos también Fuera de la Competición)

Los betabloqueantes incluyen, pero no se limitan a ^[11]:

Acebutolol, alprenolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, bunolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, labetalol, levobunolol, metipranolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol.

Los betabloqueantes **bloquean la acción** de las **catecolaminas endógenas**, de la **epinefrina (adrenalina)** y de la **norepinefrina (noradrenalina)** a través de los **receptores β -adrenérgicos** ^[46]. Los betabloqueantes inhiben estas acciones simpáticas mediadas por la epinefrina, pero sus efectos son menos importantes en temas de descanso. **Reducen el efecto** sobre **ritmo cardíaco** del **entusiasmo/esfuerzo físico** y la fuerza de la **contracción**, la **dilatación** de los **vasos sanguíneos** y la **abertura de bronquios**. Así los betabloqueantes no selectivos tienen efectos **antihipertensivos**.

Modo de acción

Beta-receptores

...están en la superficie de las células inervadas por el sistema nervioso simpático

...median ciertas respuestas fisiológicas a la adrenalina

Bloqueantes de Beta-receptores

...bloquean la actividad de los beta receptores

...reduce el ritmo y la fuerza de las contracciones de corazón y disminuye la presión sanguínea

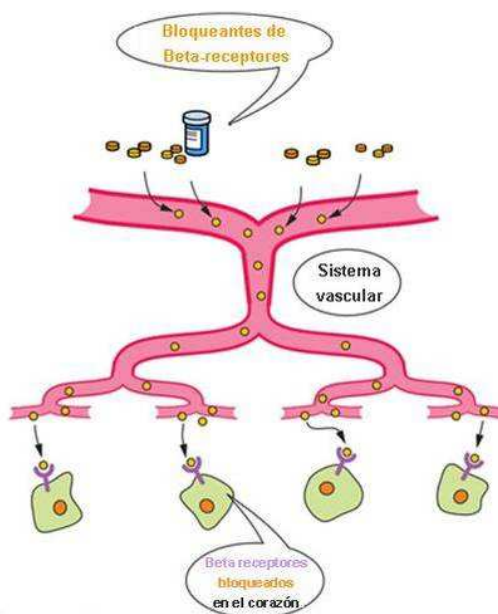


Figura 11 Mecanismo de acción de los betabloqueantes.

Los **betabloqueantes** pueden **impedir** la **relajación del músculo bronquial** y por tanto deberían suprimirse en los **asmáticos**. **Reacciones adversas** asociadas con el uso de betabloqueantes incluyen: **Nauseas, diarreas, broncoespasmos, disnea, frio** en las **extremidades, bradicardia, hipotensión, fallos cardiacos, bloqueo cardiaco, fatiga, visión anormal, disminución de la concentración, alucinaciones, insomnio, mareos nocturnos, depresión clínica, disfunción sexual, disfunción eréctil y/o alteración del metabolismo de los lípidos y la glucosa y reducción de la liberación nocturna de la melatonina** ^[47].

El pasaporte Biológico

El principio fundamental del **Pasaporte Biológico del Atleta** se basa en el **seguimiento** de algunas **variables biológicas** que, indirectamente, **revelan los efectos del dopaje**, a diferencia de la tradicional detección directa de dopaje. El monitoreo biológico **durante toda la carrera deportiva** de un atleta debe hacer mucho más difícil de implementar cualquier procedimiento prohibido.

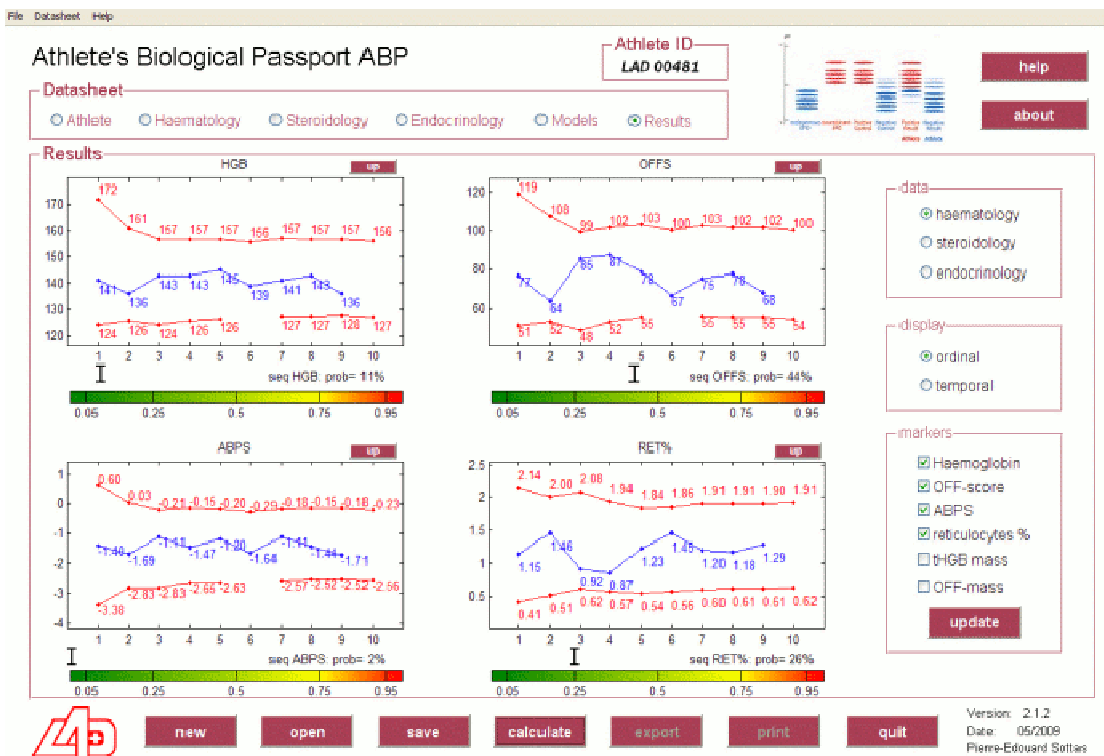


Figura 14 Ejemplo de un pasaporte biológico

El Pasaporte Biológico del Atleta se utiliza para cumplir con el **doble objetivo** de buscar posibles **violaciones de reglas** previstas en el artículo 2.2 del Código Mundial Antidopaje - El uso o intento de uso de un deportista de una sustancia prohibida o prohibido un Método – y **de apoyar más inteligente la selección** de los atletas **para el control de dopaje** convencional.

El concepto de un pasaporte de atleta ha sido discutido por la WADA desde 2002. Cobró mayor ímpetu a raíz de las preguntas formuladas por la WADA durante los Juegos Olímpicos de Invierno 2006 acerca del "no inicio" de suspensiones de los atletas por sus federaciones tras un control de salud que reportaron altos niveles de hemoglobina. Se expresaron algunas preocupaciones en el momento con respecto a los resultados y su posible relación con el dopaje.

Consciente de los diferentes enfoques en los perfiles sanguíneos de seguimiento entre los diferentes deportes, la WADA convocó una reunión para fomentar el intercambio de información y desarrollar un consenso sobre el tema. Los participantes (representantes de las Federaciones Deportivas Internacionales, incluyendo FIS, IBU, ISU, UCI, y la IAAF) acordaron que el **análisis de las variables de la sangre** deben considerarse como **parte del proceso de lucha contra el dopaje** en sí, ya que puede **ayudar a identificar perfiles anormales**, y que la WADA debe tomar la iniciativa de convocar nuevas reuniones de expertos relevantes en el campo de la hematología.

El grupo, a través de una serie de reuniones, llegó al consenso de que el **análisis longitudinal de las variables sanguíneas** del atleta debe estar registrado en una base de datos, y deben ser utilizados en las **pruebas** de destino y **sanción** cuando se **observen valores anormales**.

El Comité Ejecutivo de la WADA aprobó las **Pautas de Funcionamiento del Pasaporte Biológico del Atleta** el **1 de diciembre de 2009**. Estas normas entraron en vigor inmediatamente, y cualquier organización antidopaje puede ahora adoptar el modelo de la WADA para implementar un programa de monitoreo biológico.

Aunque el concepto es simple, en el que los distintos modelos ya han sido validados para su uso generalizado en otros campos científicos, como la

epidemiología, la medicina legal o incluso control veterinario, varias consideraciones clave tuvieron que ser tomadas antes de su uso generalizado en el ámbito de la lucha antidopaje. Con el fin de responder a la complejidad de esta situación, la WADA desarrolló una estrategia multi-nivel que incluyó el examen de las cuestiones jurídicas y la naturaleza de las posibles decisiones disciplinarias, así como un estudio de factibilidad e implementación de estrategias que tengan en cuenta las características y especificidades de los diferentes deportes.

I.4. CONTROLES ANTIDOPAJE

En todo el mundo se llevan a cabo **controles antidopaje** de acuerdo con el Código Mundial Antidopaje y el Estándar Internacional de Controles desarrollados por la AMA en consulta con sus interesados. Se **pueden practicar controles** a los deportistas que compiten a nivel internacional y nacional en **cualquier momento y lugar**. El control puede realizarse **en competición o fuera** de una situación de competición, por ejemplo **en el hogar o lugar de entrenamiento** del deportista, **sin aviso previo**. Se pueden tomar **muestras de orina y/o sangre**. Todos los controles los efectúan **personal** de control antidopaje **con formación y acreditación específicas**.

El control antidopaje paso a paso ^[48]

1 Selección de deportistas

La selección de los deportistas se rige por los requisitos de la Organización Antidopaje competente. La selección puede ser **aleatoria**; según **criterios establecidos** (p. ej., orden de llegada a la meta); o puede tratarse de un **control dirigido**.

2 Notificación

Un **Agente de Control Antidopaje (ACA)** o Acompañante **notificará** al deportista que ha sido seleccionado para un control antidopaje. En general, dicha notificación se realiza **en persona**. Se enseña al deportista la identificación oficial y la autorización bajo la que se llevará a cabo la toma de muestras.

El ACA o Acompañante **informará** al deportista de sus **derechos y deberes**, entre los que se incluye el derecho a contar con la **presencia de un representante** durante todo el proceso. Se pedirá al deportista que firme el **formulario**

confirmando que ha **recibido notificación** del control antidopaje. En el caso de un **menor** o de un deportista **discapacitado**, también se puede **notificar a una tercera parte**.

3 Presentación en el Centro de Control Antidopaje

El **deportista** deberá **presentarse** en el centro de control antidopaje **inmediatamente después** de **recibir** la **notificación**. El ACA **puede permitir** al deportista que se **retrase** en acudir al centro de control antidopaje por **actividades** como una **rueda de prensa** o **acabar** una sesión de **entrenamiento**; sin embargo, el deportista **estará acompañado** por un ACA o un Acompañante **desde** el momento de la **notificación** hasta que **finalice el proceso** de toma de muestras. Se solicitará al deportista que muestre una **identificación con fotografía** y se le dará ocasión de **hidratarse**. Los deportistas son responsables de lo que deciden beber. Pueden tomar su propia bebida o escoger entre una selección de bebidas no alcohólicas y sin cafeína precintadas.

4 Selección del recipiente de toma de muestras

Se **ofrece** al deportista un **surtido de recipientes** de toma de muestras **precintados** individualmente y éste **escoge uno**. El deportista **comprueba** que el equipo esté **intacto** y **no** haya sido **manipulado**. El deportista **deberá controlar** en todo momento el **recipiente** de toma de muestras.

5 Toma de la muestra

Durante la toma de la muestra **sólo se permite** que estén **presentes** en el cuarto de aseo el **deportista** y un **agente de control antidopaje** del **mismo sexo**. Los **menores** o los deportistas **discapacitados** pueden contar también con la **presencia** de su **representante** en el cuarto de aseo. Sin embargo, **no se permite al representante** que **presencie** la **toma de la muestra**. Su objetivo es asegurarse de

que el agente de control antidopaje observa correctamente la toma de la muestra. Es necesario que los **deportistas se quiten todas las prendas desde la rodilla hasta medio torso y desde las manos hasta los codos**. Esto permite que el agente de control antidopaje **observe directamente cómo la orina abandona el cuerpo del deportista**. Estas estipulaciones pretenden garantizar que se trata de la propia orina del deportista y ayudar a evitar la posible manipulación de la muestra de orina. El atleta controla su muestra en todo momento durante el proceso, a menos que se requiera ayuda a causa de una discapacidad del deportista.

6 Volumen de orina

El ACA deberá asegurarse a la vista del deportista, que se provea un **volumen de orina** de no menos de **90 mL**. Si la **cantidad de orina no llega a los requisitos mínimos**, el deportista realizará a continuación un **proceso de muestra parcial**.

Cuando se proporciona **menos de 90 mL** de orina, el deportista seguirá el proceso de muestra parcial hasta que se **proporcione el volumen requerido**. Durante este proceso se **precintará** y se **asegurará** la muestra o muestras parciales utilizando **el equipo de toma de muestra parcial**. La **muestra parcial precintada** deberá permanecer **bajo control del deportista o del ACA**. Mientras espera a proporcionar una muestra o muestras adicionales, el deportista debe permanecer bajo observación continua y se le dará ocasión de hidratarse. Cuando el deportista esté listo para proporcionar otra muestra, el proceso de toma de muestras continúa tal y como se ha descrito anteriormente.

Cuando se haya proporcionado el **volumen requerido de orina**, el deportista escogerá un **nuevo recipiente** de toma de muestras precintado y **combinará sus muestras**, empezando por la primera muestra parcial proporcionada y siguiendo con cada muestra parcial posterior hasta que se alcance el volumen deseado. A

continuación se **precinta la muestra** de acuerdo con los pasos descritos a continuación.

7 Selección del estuche de toma de muestras

Una vez deportista ha proporcionado el volumen requerido de orina, se le ofrecerá un surtido de **estuches de toma de muestras precintados** individualmente entre los que escogerá uno. El deportista comprueba que el equipo **esté intacto y que no haya sido manipulado**. El deportista abrirá el estuche y comprobará que concuerden todos los **códigos de identificación** de la muestra en las botellas, las tapas y el contenedor

8 División de la muestra

El deportista **divide** la muestra, vertiendo él mismo la orina, a menos que se requiera ayuda a causa de una discapacidad del deportista. El deportista **vierte el volumen requerido** de orina en la **botella B**. A continuación, el **resto de la orina** se vierte en la **botella A**. Se solicitará al deportista que **deje una pequeña cantidad de orina** en el recipiente de toma de muestras para que el Agente de Control Antidopaje pueda medir la **densidad relativa** de acuerdo con las directivas de laboratorio pertinentes.

9 Precintado de las muestras

El deportista precinta las botellas A y B. El representante del deportista y el Agente de Control Antidopaje deberán comprobar que las botellas estén debidamente precintadas.

10 Medición de la densidad relativa

El ACA mide la **densidad relativa** utilizando la orina residual que se ha dejado en el recipiente de toma de muestras. Se registran los valores en el formulario de

control antidopaje. Si la muestra **no cumple** los **requisitos de densidad relativa**, **puede solicitarse** al deportista que proporcione **muestras adicionales** según exija la Organización Antidopaje.

11 Cumplimentación del Formulario de Control Antidopaje

Se solicita al deportista que facilite **información** sobre todo **medicamento o suplemento** con o sin receta que haya tomado recientemente. Dichos medicamentos se registran en el formulario de control antidopaje. El deportista tiene derecho a **anotar comentarios** e inquietudes sobre cómo se ha **realizado la sesión de control antidopaje**. El deportista deberá **confirmar** que toda la **información** del formulario de control antidopaje sea **correcta**, incluido **el código de identificación de la muestra**. La **persona** que haya **presenciado** la toma de la muestra, el **representante** del deportista, el **Agente de Control Antidopaje** y el **deportista firmarán el formulario** de control antidopaje al final del proceso de toma de muestras. Se facilita al deportista una **copia del formulario** de control antidopaje. La copia del formulario de control antidopaje para el laboratorio **no contiene ninguna información** con la que se pudiera **identificar al deportista**.

12 El proceso de laboratorio

Se empaquetan las muestras para su envío a fin de garantizar que se pueda trazar la **seguridad** de la muestra. Se envían las muestras al **laboratorio acreditado por la AMA**. El laboratorio **inspeccionará** las muestras a su llegada para asegurarse de que no hay indicios de **manipulación**. El laboratorio acreditado por la AMA observará el **Estándar Internacional para Laboratorios** al procesar una muestra, asegurándose de que **la cadena de custodia** se mantiene en todo momento. Se **analiza la muestra A** para detectar sustancias que figuren en la lista de **Prohibiciones**. La **muestra B** se **almacena de forma segura** en el laboratorio y puede utilizarse para **confirmar un Resultado Analítico Adverso** de la **muestra A**.

El laboratorio informará de los resultados del análisis de la muestra a la organización antidopaje competente y a la AMA.

I.5. HISTORIA DEL DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE CONTROL ANTIDOPAJE

El empleo de prácticas dopantes en animales –principalmente en caballos- ha sido considerado un hito en las prácticas de dopaje en la historia reciente y propició un impulso al desarrollo de métodos de control y detección. En 1666, se redactó el primer Decreto en Inglaterra que prohibía la administración de sustancias a caballos con la finalidad de mejorar su rendimiento en las carreras^[49]. A finales del Siglo XVIII, se estableció la pena de muerte en el caso en el que los caballos muriesen^[50]. Por esto, los primeros intentos de detectar sustancias dopantes mediante bioensayos y métodos analíticos fueron llevados a cabo para el control las carreras de caballos en lugar de deportes humanos.

En 1910, el Club Equestre Austriaco contrató a un científico polaco llamado Alfons Boukowski, para poner a punto un método que permitiese la detección de alcaloides como la morfina y la heroína en saliva equina^[51]. Después, el Prof. Fränkel de la Universidad de Viena perfeccionó el método de saliva, que fue posteriormente publicado por G. Lander, jefe del laboratorio de Club Equestre de Inglaterra, en 1930, incluyendo varias etapas de extracción y preconcentración seguidas de una etapa de derivatización formando un precipitado o bien un producto coloreado para su inspección visual^[52]. Para este método se requería de un gran volume de saliva, por lo que se procedía al lavado de la boca del equino con una disolución de ácido acético 0.16 M durante 5 minutos. Después, se llevaban a cabo numerosas etapas de extracción secado y purificación empleando metanol, cloroformo y benceno. La presencia de alcaloides (cocaína, quinina, morfina y heroína) era visualizada por la formación del precipitado al depositar 5-10 µL del extracto de saliva en un tubo de ensayo capilar y añadiendo diferentes

reactivos como yodo, ácido tánico, cloruro de oro o ácido fosfomolibdico. Dependiendo del analito y del reactivo utilizado se obtenían unos límites de detección entre 0.05 y 20 µg, calculados con patrones diluidos. La aplicación a muestras reales de saliva fue realizada con blancos de animales no expuestos a los tratamientos y con muestras de animales a los que se les había administrado las diferentes drogas, probando así la especificidad del método y la habilidad para la detección “inequívoca” entre resultados positivos y negativos. Estos ensayos con saliva se hicieron cada vez más sofisticados con métodos de extracción optimizados y ensayos de detección más sensibles. Por ejemplo, la familia de los opiáceos era detectada con el reactivo de Marquis (formaldehído y ácido sulfúrico), a través de la formación de un color rojo oscuro/púrpura en presencia de opiáceos, especialmente morfina y heroína. La quinina (ensayo con bromuro y amoníaco), cocaína y atropina (métodos de cristalización) fueron otros de los ensayos optimizados.

Los antecedentes de prácticas recientes de dopaje en humanos se remontan al menos al año 1865, cuando los nadadores de las carreras celebradas en los canales de Amsterdam competían bajo los efectos de sustancias dopantes ^[53]. Por otra parte, el empleo sistemático de estimulantes, narcóticos y nitroglicerina en ciclismo se remonta a la inhumana competición de los “seis días” que se empezó a disputar en 1879. Los ciclistas empleaban cócteles que consistían en café enriquecido con una cantidad extra de cafeína, que se complementaba con cocaína y estricnina durante el desarrollo de la competición. Además se empleaban terrones de azúcar (previamente sumergidos en éter) y cápsulas de nitroglicerina para potenciar y mejorar la respiración. Otras bebidas “milagro” eran suministradas a los ciclistas conteniendo atropina y alcanfor. En la mayoría de los casos sin ningún tipo de supervisión médica, por lo que las desgracias y fatalidades en forma de víctimas mortales no suponían ninguna sorpresa. Hay muchos casos descritos de atletas que fallecieron de forma prematura durante finales del siglo

XIX e inicios del XX, que pueden ser atribuidos al empleo de sustancias dopantes. Los principales deportes en los que estaban extendidas estas prácticas eran el ciclismo, el atletismo, el boxeo y el fútbol. Incluso medallistas de oro en JJ.OO como el maratoniano Thomas Hickey (1904) lo fueron bajo el consumo de sustancias como la estricnina sin recibir ningún tipo de sanción.

A principios del siglo XX, se empleaban multitud de sustancias para el dopaje de caballos incluyendo estimulantes, narcóticos, extractos de hierbas y otros xenobióticos de carácter orgánico e inorgánico ^[54], siendo la prevalencia de prácticas de dopaje en caballos de competición en Estados Unidos de aproximadamente un 50% ^[55]. Estas cifras se redujeron conforme se mejoraban los ensayos y se endurecía la norma que prohibía el uso de estas sustancias. Por otra parte, la actividad frenética de la industria farmacéutica con la introducción de nuevas sustancias de forma paulatina suponía un reto para los científicos dedicados a la lucha contra el dopaje, particularmente con la introducción de las anfetaminas y sus derivados, que supusieron una nueva era en el mundo del dopaje tanto en deportes de animales como en humanos.

Después de la Segunda Guerra Mundial, el uso de estimulantes como las anfetaminas y sus derivados aumentó de forma destacada especialmente en ciclismo y fútbol ^[56]. Los serios efectos adversos en la salud de los deportistas propiciaron que diversos países europeos como Francia, Bélgica e Italia estableciesen leyes antidopaje en 1965 ^[57, 58]. Esto propulsó el desarrollo de nuevas metodologías empleando el estado del arte de la tecnología disponible en aquella época.

Métodos no cromatográficos. El metabolismo, disposición y análisis de los fármacos ha sido de gran interés tanto en el caso de aplicaciones clínicas como para control antidopaje. Las principales propiedades físico-químicas de los analitos fueron empleadas para distinguir e identificar los distintos analitos en orina,

sangre o saliva dando a una serie de métodos analíticos basados en métodos colorimétricos, cromatográficos y de cristalización. Entre 1930 y 1960, sólo algunos de los métodos descritos eran específicos para control antidoping. En la mayoría de los casos los métodos servían para propósitos clínicos o de análisis forense.

Los primeros intentos de detección de estimulantes empleaban microscopía, la determinación del punto de fusión de cristales o el índice de refracción. Posteriormente se estudiaron ensayos más sofisticados empleando reactivos como cloruro de plata y oro o bien ensayos nefelométricos para la detección de alcaloides tras una complejación previa. La principal dificultad eran la necesidad de emplear volúmenes relativamente grandes de las muestras biológicas y la necesidad de muchas etapas de preparación y purificación de la muestra.

Los primeros ensayos colorimétricos mostraban una sensibilidad razonable ^[59], uno de los primeros ensayos para determinar benzedrina (mezcla racémica de D- y L-anfetamina) en orina fue descrito en 1938 ^[60], empleando una extracción en medio básico en éter seguida de reacción con ácido pícrico para dar un producto coloreado amarillo, cuya intensidad se relacionaba empleando patrones en el rango de 0 a 20 µg/mL. El método era válido para feniletilamina, efedrina, anfetamina, metanfetamina y mescalina, con un límite de detección aproximado de 0.5 µg/mL. El principal problema era la escasa selectividad, ya que diversas aminas endógenas daban señal para este ensayo, por lo que cada orina tenía unos valores de blancos diferentes para cada individuo. Posteriormente estos métodos fueron mejorados empleando varias etapas de extracción y purificación, ajustando los valores de pH para extraer selectivamente los analitos de interés y empleando incluso reacciones de derivatización con naranja de metilo, diazotaciones o ácido pícrico. Se obtenían resultados satisfactorios empleando fotometría con límites de detección de aproximadamente 1 µg/mL ^[61, 62, 63, 64, 65].

Métodos con cromatografía en papel o en capa fina. Aunque los métodos anteriores proporcionaban una sensibilidad aceptable y cierta tolerancia a interferencias, la introducción de los métodos cromatográficos supuso un enorme paso adelante en la lucha contra el dopaje. Gracias a las diferentes técnicas cromatográficas, se establecieron métodos para un gran número de compuestos, destacando la separación con cromatografía de papel de alcaloides y estimulantes [66, 67, 68, 69] y diuréticos [70]. La parte de preparación de muestra y extracción fue adaptada de los métodos colorimétricos anteriores, y los extractos finales eran sometidos a la etapa de cromatografía en papel, seguida de una etapa de detección y visualización de analitos empleando diferentes reveladores como el reactivo de Dragendorff (nitrato de bismuto y yoduro potásico en medio ácido) [71], el azul de prusia o una disolución alcohólica de verde de bromocresol.

La cromatografía en papel fue rápidamente reemplazada por la cromatografía en capa fina (TLC) tanto para análisis forense como para control antidopaje, sobre todo para la detección de narcóticos relacionados con la morfina, anfetaminas y sus derivados [72, 73, 74, 75] y diuréticos [76]. En estos procedimientos, se mantenían la parte de preparación de muestra (empleando entre 5 y 200 mL de orina según disponibilidad). Después de diversas etapas de extracción y purificación, se llevaban a cabo separaciones con TLC empleando una o dos dimensiones (desarrollos) [77, 78], con el revelado y visualización empleando reactivos dispersados en aerosol o empleando espectrofotometría UV [79] después de eluir selectivamente la fracción o mancha correspondiente al analito a identificar. Los principales reveladores que se emplearon fueron: ninhidrina, difenilcarbazona/acetato de plata/sulfato de mercurio(II), yoduro de plata, yodo y yoduro potásico, verde de bromocresol y nitrato de plata en medio amoniacal, cada uno de ellos presentando ventajas para la detección selectiva o específica de algunas de las familias de sustancias prohibidas que se analizaban y proporcionando unos límites de detección de entre 0.1 y 1 µg de analito por mL de orina [80].

Métodos basados en cromatografía de gases. El empleo de la cromatografía de gases (GC) para la separación y detección de compuestos relevantes en los controles antidopaje se inició a finales de la década de los cincuenta e inicio de los sesenta ^[81, 82, 83, 84, 85]. Las columnas empleadas eran de acero inoxidable de 1 a 3 metros de largo o de vidrio (0.3-0.6 cm de diámetro externo), rellenas con distintas fases estacionarias (ej. E % Carbowax 6000 y 5 % KOH; 2 % Carbowax 20M y 5 % KOH, etc.) para llevar a cabo la separación eficiente de los diferentes analitos empleando detectores de ionización de llama (FID), de nitrógeno-fósforo (NPD) o de captura de electrones (ECD). Inicialmente, los estimulantes y los alcaloides (anfetamina, metanfetamina, cafeína, cocaína, efedrina, etc.) y sus metabolitos hidroxilados de muestras biológicas fueron las principales especies estudiadas e implementadas en análisis de rutina. Mientras que las etapas de preparación de muestra y extracción apenas cambiaban con respecto a los métodos clásicos, rápidamente se produjo una evolución de los métodos cromatográficos con la finalidad de mejorar el rendimiento de los mismos en lo que respecta a resolución cromatográfica, selectividad, reproducibilidad y capacidad de diferenciación de isómeros. En muchos casos, éstas mejoras venían dadas al emplear una etapa de derivatización empleando trimetil-silil ésteres, acilaciones o alquilaciones ^[86]. En particular, la formación de trimetil-silil ésteres es la estrategia que más se empleó, permitiendo límites de detección de 1 µg/mL, siendo éste método la base del primer programa de control anti-dopaje exhaustivo de la época moderna llevado a cabo en los JJ.OO. de Munich en 1972 ^[87, 88]. Mejoras posteriores incluyendo el uso de columnas capilares incrementaron sustancialmente la selectividad y sensibilidad de los métodos haciendo de la cromatografía de gases una herramienta esencial en aquella época. Sin embargo, la enorme complejidad de las muestras analizadas y el aumento de sustancias dopantes de nuevas familias hizo necesario el empleo de detectores más sofisticados que los empleados hasta entonces y propiciaron la

futura combinación de la cromatografía de gases con los espectrómetros de masas.

Métodos basados en cromatografía de líquidos. El empleo de GC requiere la volatilización de los analitos en el inyector previamente a la separación en la columna. En el caso de los compuestos termolábiles, esto suponía una limitación muy severa e incluso después de etapas de derivatización, no se conseguían resultados satisfactorios para algunas familias de sustancias prohibidas. Esto propició el desarrollo de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), que en su modalidad de fase reversa, con o sin etapas de derivatización, permitía expandir la lista de sustancias prohibidas controladas incluyendo los diuréticos ^[89, 90, 91], derivados hidroxilados de estimulantes ^[92, 93, 94, 95], esteroides anabolizantes y corticosteroides ^[96, 97, 98, 99, 100, 101] y analgésicos ^[102, 103, 104]. Los principales métodos para la detección de estas sustancias eran la espectroscopía de absorción en la región ultravioleta (UV) y la fluorescencia, dependiendo de la naturaleza de los analitos o de sus productos derivatizados.

Los diuréticos son una clase muy heterogénea de compuestos, aunque la mayoría de ellos pueden ser medidos con detección UV sin derivatizar con unos límites de detección razonables, entre 0.01 y 2.0 µg/mL. En el caso concreto de triamterene, amilorida, bumetanida y furosemina, la fluorescencia nativa que presentan permite una detección más sensible y selectiva. Por lo que respecta a las anfetaminas, aunque éstas se pueden analizar mediante GC, los métodos HPLC empleando derivatización o sin ella, permiten mejoras en sensibilidad. El análisis de anabolizantes esteroideos es de gran importancia en control antidoping y durante los años 80 y 90 se desarrollaron numerosos métodos que ofrecían notables ventajas con respecto a los métodos inmunológicos empleados hasta entonces. Por último, dentro de los analgésicos, los derivados opiáceos están prohibidos en deportes y también en caballos de competición, por lo que se

desarrollaron métodos que permitían la detección de 10-100 ng/mL de analitos como naproxeno, ketoprofeno y morfina. Muchos de estos ensayos están todavía en uso aunque realmente no sirven para control antidoping, aunque ofrezcan valores de límites de detección por debajo de los MRPLs, ya que las normas actuales exigen unos niveles de especificidad que sólo pueden ser cumplidos por la espectrometría de masas.

Métodos inmunológicos o inmunoensayos. Los (radio)inmunoensayos son de gran interés en endocrinología y campos relacionados debido a su capacidad cualitativa y cuantitativa para determinar trazas de hormonas peptídicas. Aunque la mayoría de los compuestos que se ensayan ahora no estaban prohibidos cuando se desarrollaron los métodos inmunológicos, varios de los métodos descritos todavía son de gran utilidad como los ensayos para la detección de insulina ^[105, 106, 107], corticotropina ^[108, 109], hormona del crecimiento humana (hGH) ^[110, 111, 112], gonadotropina coriónica humana (hCG) ^[113, 114], hormona luteinizante (LH) ^[115, 116] o eritropoietina y derivadas (EPO) ^[117], y además los métodos actuales están basados en las mismas estrategias y metodologías.

Por lo que respecta al empleo de inmunoensayos para la detección de sustancias prohibidas de bajo peso molecular, los primeros ensayos se publicaron en 1975. No obstante, debido al gran rendimiento de las técnicas híbridas (GC-MS) el interés en este tipo de ensayos bajó significativamente. Sin embargo, para biomoléculas de elevado peso molecular como las hormonas, los métodos de espectrometría de masas empleados entonces presentaban dificultades por lo que los inmunoensayos tuvieron una gran aceptación para la detección del uso fraudulento de hCG y LH ^[118, 119, 120], así como más recientemente la detección de las hormonas hGH ^[121, 122, 123, 124, 125] y EPO ^[126, 127, 128, 129] incluso en orina.

I.6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS: FUNDAMENTOS E INSTRUMENTACIÓN

La espectrometría de masas es una poderosa herramienta analítica que se utiliza para la identificación de compuestos desconocidos y la cuantificación de compuestos conocidos. La espectrometría de masas es una técnica sensible que puede usarse con técnicas de separación, tales como cromatografía, para analizar mezclas complejas.

Una vez que una molécula es introducida en el espectrómetro de masas, la molécula es ionizada, y en ocasiones fragmentada, y a continuación los iones pueden ser separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados. El analizador de masas, el detector y, dependiendo de la forma de introducción de muestra, la fuente de ionización se encuentran en alto vacío (10^{-4} a 10^{-8} torr), el alto vacío del sistema hace posible el libre movimiento de los iones desde la fuente de ionización hasta el detector sin colisionar con otros iones, moléculas de muestra, aire o agua.

Actualmente es la técnica de detección más empleada en los métodos de control antidopaje para el control de la lista de sustancias prohibidas de la WADA.

Un espectrómetro de masas consta de tres partes fundamentales: la fuente de iones, el analizador de iones (o de masas) y el detector, y normalmente la forma de introducir la muestra en el espectrómetro de masas es mediante una técnica separativa, principalmente cromatografía de gases (GC/MS) y cromatografía de líquidos (LC/MS) aunque en menor medida pero aún en uso electroforesis capilar (CE/MS).

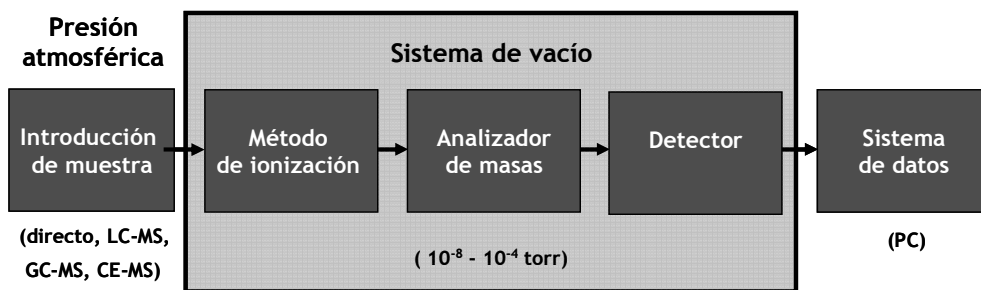


Figura 12. Esquema de un espectrómetro de masas

Fuentes de ionización

La fuente de ionización depende del método de introducción de muestra, diferenciaremos entre las fuentes utilizadas para GC/MS y las utilizadas para LC/MS y CE/MS, así como las utilizadas para el análisis directo.

Fuentes de ionización usadas en GC/MS

En el análisis por GC/MS, la fuente de iones se encarga de transformar la corriente gaseosa que abandona el cromatógrafo de gases en una corriente de iones. Para ello, se utilizan fuentes de ionización en fase gaseosa, puesto que primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. Las dos fuentes de iones que se utilizan en GC/MS son las de impacto electrónico y de ionización química:

Impacto electrónico (EI).

En el proceso de impacto electrónico, el bombardeo de las moléculas gaseosas con electrones da resultado a la ionización. Para formar los electrones de alta energía, se aplica un voltaje a un filamento de renio, haciendo que éste se caliente, los electrones se liberan de la superficie del filamento mediante emisión térmica. La emisión se controla mediante la corriente a través del filamento, la cantidad de

flujo de corriente a través del filamento determina cuántos electrones son emitidos, esta corriente de emisión se regula dependiendo del instrumento. El filamento se fija a un voltaje negativo, y este voltaje es el que da a los electrones la energía que determina su aceleración en la cámara de ionización, es lo que se llama energía electrónica, y generalmente está fijada a 70eV

La energía de los electrones es generalmente mucho mayor que la de los enlaces moleculares, cuando los electrones de alta energía impactan con la molécula, y como resultado del impacto con el electrón, la molécula pierde un electrón, resultando una especie llamada ión molecular que tiene carga positiva, la molécula ionizada aún contienen un exceso de energía electrónica que va a causar que se vuelva inestable y se parta en fragmentos, que pueden seguir rompiéndose en fragmentos más pequeños. Esta fragmentación es muy reproducible al ser dependiente de la energía electrónica (70eV), es por ello que existen bases de datos comerciales de espectros obtenidos mediante impacto electrónico de decenas de miles de compuestos orgánicos, siendo una gran herramienta para la identificación de compuestos desconocidos.

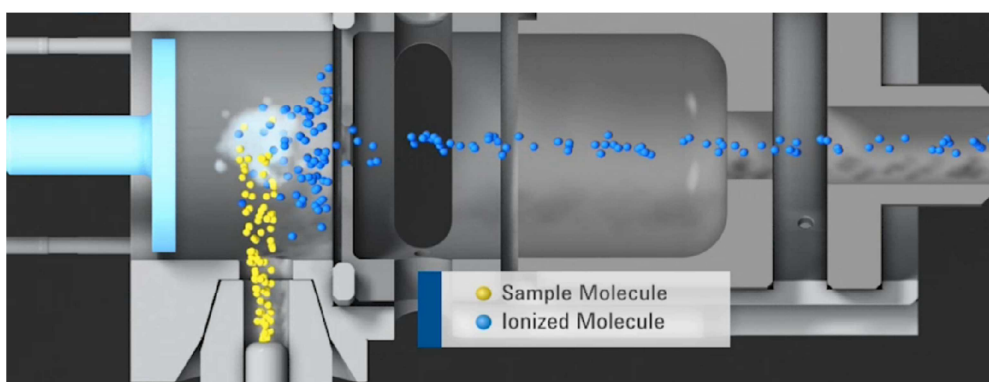


Figura 13. Esquema de una fuente de ionización por impacto electrónico

Ionización química (CI).

Hay diferencias significativas entre la fuente de ionización química y la de impacto electrónico, y, para ciertas aplicaciones, la ionización química ofrece varias ventajas.

Mientras que el impacto electrónico es un proceso directo en que la energía se transfiere por colisiones entre los electrones y las moléculas de muestra, la ionización química es un fenómeno químico. En la ionización química, un gas o mezcla de ellos (generalmente metano) y la muestra gaseosa se ionizan por un haz de electrones. Los iones de la muestra se forman por interacciones químicas entre los iones de gas reactivo (metano) y las moléculas de la muestra.

La relación entre el gas reactivo y la muestra es muy alta, en el orden de 1000 a 1 o más, lo que asegura suficientes reacciones ión-molécula y minimiza la ionización directa de la muestra por impacto electrónico. La presión del gas reactivo es relativamente alta (en el orden de 1 torr), debido al gran número de moléculas de gas reactivo frente a moléculas de muestra, la inmensa mayoría de los iones formados por el haz de electrones son del gas reactivo, estos iones del gas reactivo reaccionan entre ellos y con las moléculas de muestra, resultando finalmente en una transferencia de protones a la muestra (ionización química positiva (PCI)) que da como resultado el ión de la muestra $[M+H]^+$:

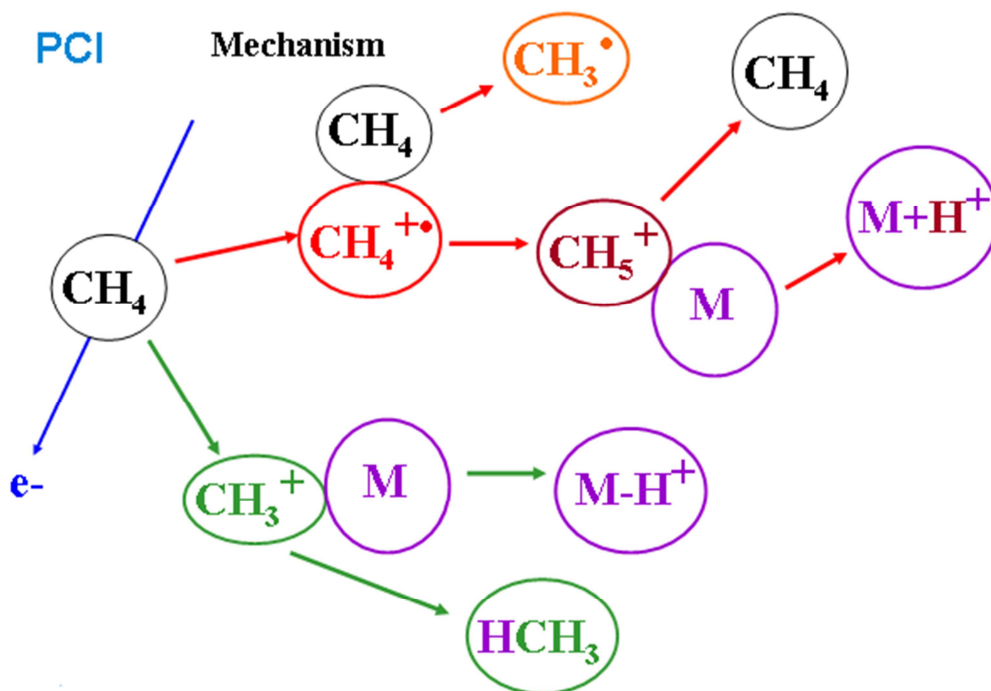


Figura 14. Mecanismo de ionización química positiva

Mediante la ionización química también se pueden conseguir iones negativos (ionización química negativa (NCI)) mediante mecanismos de acoplamiento electrónico (con o sin disociación) y de formación de par iónico.

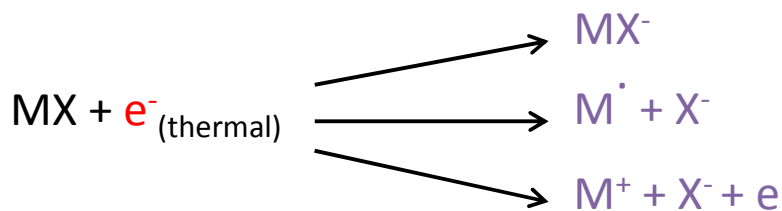
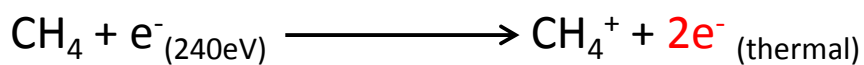


Figura 15. Mecanismo de ionización química negativa

Fuentes de ionización usadas en LC/MS y CE/MS

En el caso de la cromatografía de líquidos, la fuente debe convertir los altos volúmenes de fase móvil utilizados en la separación en una corriente iónica gaseosa, produciendo una evaporación del disolvente y la ionización de los analitos de forma simultánea. Las fuentes más utilizadas actualmente son las fuentes de ionización a presión (*API – atmospheric pressure ionization*), estas fuentes son una familia de técnicas que incluyen Electropray (ESI), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y Fotoionización a presión atmosférica (APPI), siendo ampliamente la más utilizada la fuente electropray, aunque cada selección del tipo de fuente depende de la polaridad de los analitos a analizar:

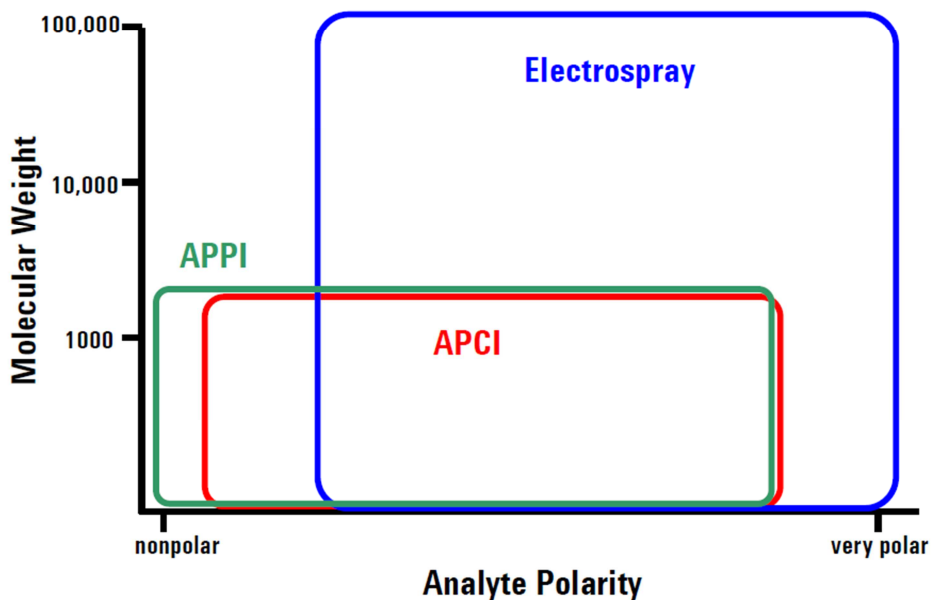


Figura 16. Rangos de polaridad/peso molecular utilizables según el tipo de fuente de ionización

Electrospray (ESI).

Es la fuente de ionización más usada y en LC/MS, presenta una serie de ventajas y desventajas en su aplicación:

Ventajas:

Es la ionización más suave disponible

Es la interfase LC/MS con mejor sensibilidad

Válida para analitos termolábiles

Rango de masas extendido para analitos con múltiples cargas

Trabaja en un amplio rango de compuestos de polaridad moderada a alta

Bajo mantenimiento

Deventajas:

La química en disolución influye en el proceso de ionización

Trabaja solamente con analitos con cierta polaridad

Son posibles los iones aducto (diferentes a M+H) en algunos compuestos

Pérdida de sensibilidad a flujos de trabajo altos (<1mL/min)

En el proceso de ionización por electrospray, primero la fase móvil y los analitos son nebulizados (rotos en pequeñas gotas), a continuación una corriente de nitrógeno calentado evapora el disolvente de la fase móvil (desolvatación) bajo la influencia de campos electrostáticos de alto potencial, incrementando la relación carga/volumen, la densidad de carga en las gotas se incrementa hasta que se alcanza el límite de Raleigh (10^8 V/cm³), que es la máxima carga que una gota puede contener manteniendo al mismo tiempo su volumen, cuando la carga excede este límite las gotas experimentan explosiones de coulomb y se rompen en gotas más pequeñas, finalmente, bajo la influencia de potenciales electrostáticos en la cámara de ionización, el ión de analito es desorbido de la gota, generando iones pseudomoleculares [M+H⁺].

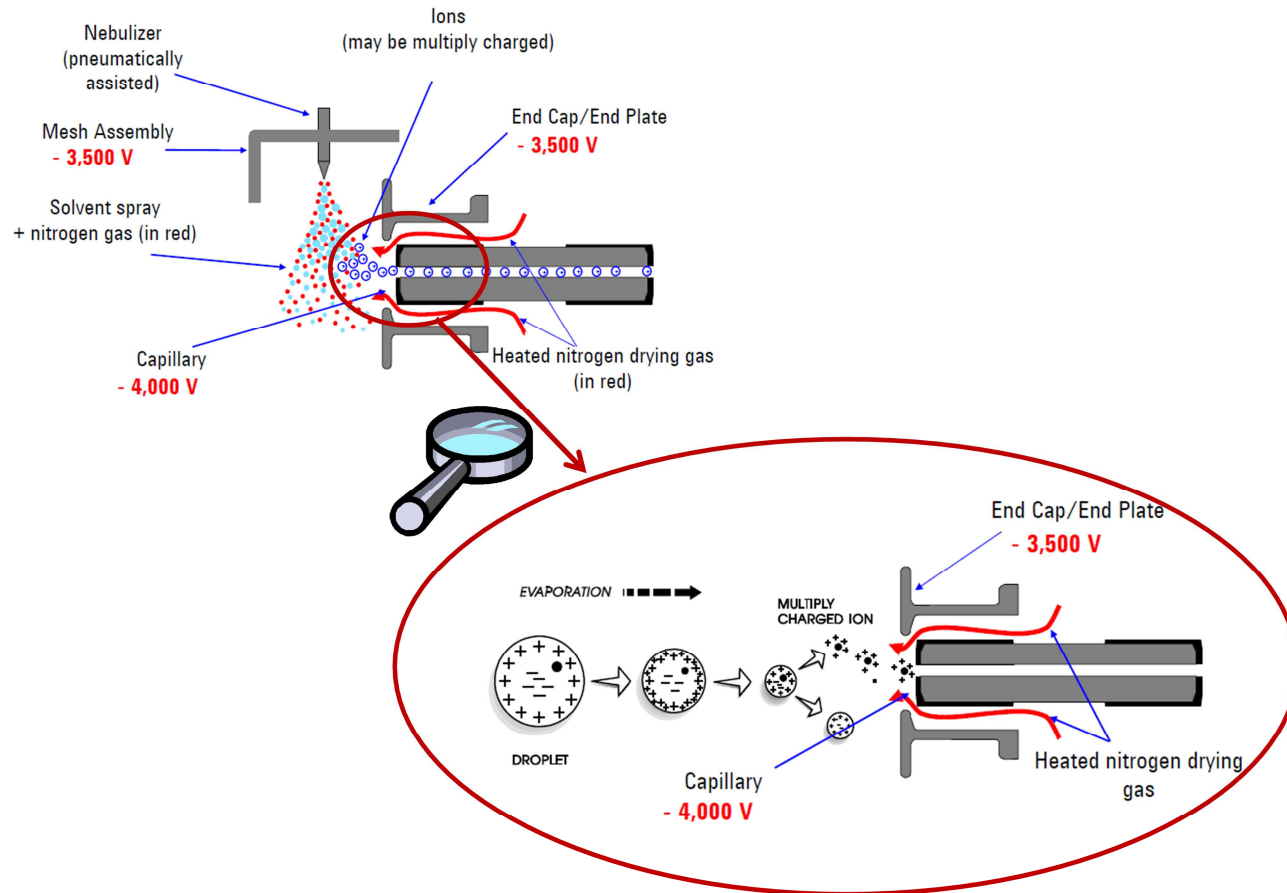


Figura 17. Esquema y mecanismo de la fuente de ionización ESI

Ionización química a presión atmosférica (APCI).

La fuente APCI es complementaria al uso de la fuente ESI para analitos menos polares, las ventajas de esta fuente son su buena sensibilidad para compuestos de peso molecular y polaridad intermedios, es menos sensible a los efectos de química en disolución que la fuente ESI y permite mayores flujos hasta 1.5mL/min sin pérdidas de sensibilidad, sin embargo, no se puede utilizar con compuestos termolábiles y requiere cierta volatilidad del compuesto.

En el proceso de ionización, al igual que en la fuente ESI, inicialmente la fase móvil y el analito son nebulizados, las pequeñas gotas son vaporizadas y la muestra vaporizada y los analitos entran en la región corona entre el capilar y la aguja, las moléculas de disolvente son ionizadas en la región de descarga de la corona, volviéndose iones gaseosos reactivos, que reaccionan con las moléculas de analito ionizándolas (similar al proceso de ionización de ionización química en GC/MS), generando iones pseudomoleculares $[M+H^+]$

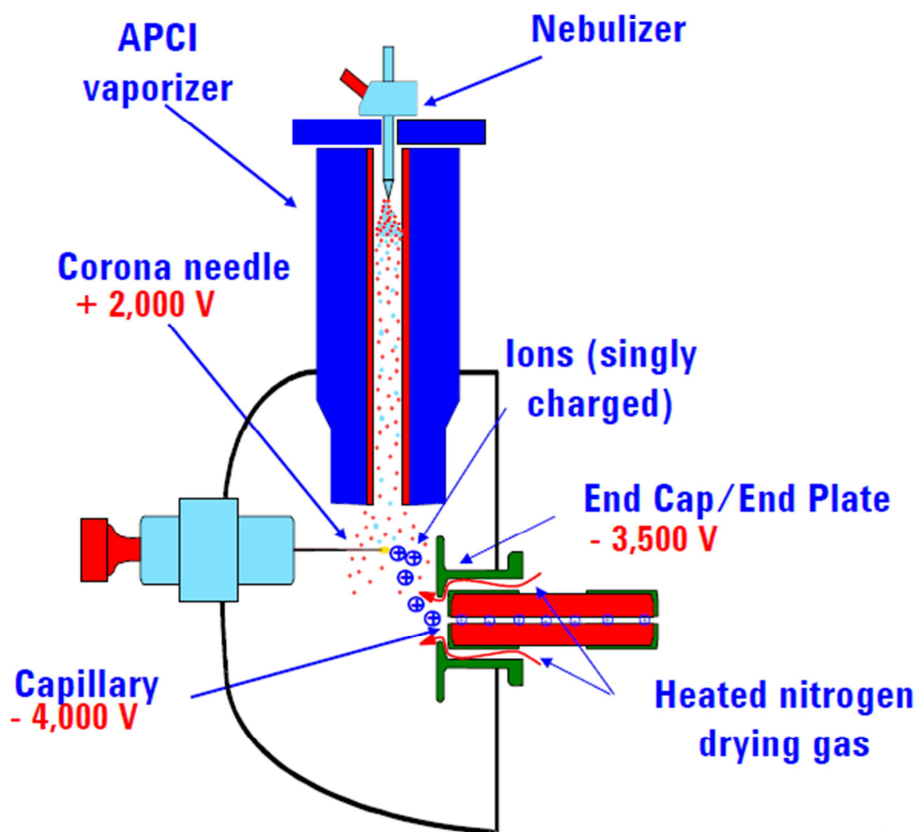


Figura 18. Esquema de la fuente de ionización APCI

Esta técnica de ionización funciona bien con moléculas pequeñas, polares o no polares (PCBs, ácidos grasos, ftalatos), que contienen heteroátomos (benzodiazepinas, plaguicidas, carbamatos) y no se puede utilizar con compuestos térmicamente inestables (esteroides, aminoglicósidos, explosivos) o que presenten múltiples cargas en disolución (proteínas, péptidos u oligonucleótidos)

Fotoionización a presión atmosférica (APPI)

La fuente APPI se utiliza para ionizar compuestos que no ionizan bien mediante ESI o APCI como PAHs, y proporciona mejor sensibilidad en algunos compuestos como THC, ácido benzoico o vitaminas liposolubles.

En el proceso de ionización, de nuevo la fase móvil y el analito son nebulizados, las pequeñas gotas son vaporizadas y la muestra vaporizada y los analitos entran en la región la lámpara UV y el capilar, donde se va a producir la fotoionización directa de los analitos o bien a través de especies dopantes (la fase móvil), generando iones moleculares $[M]^+$

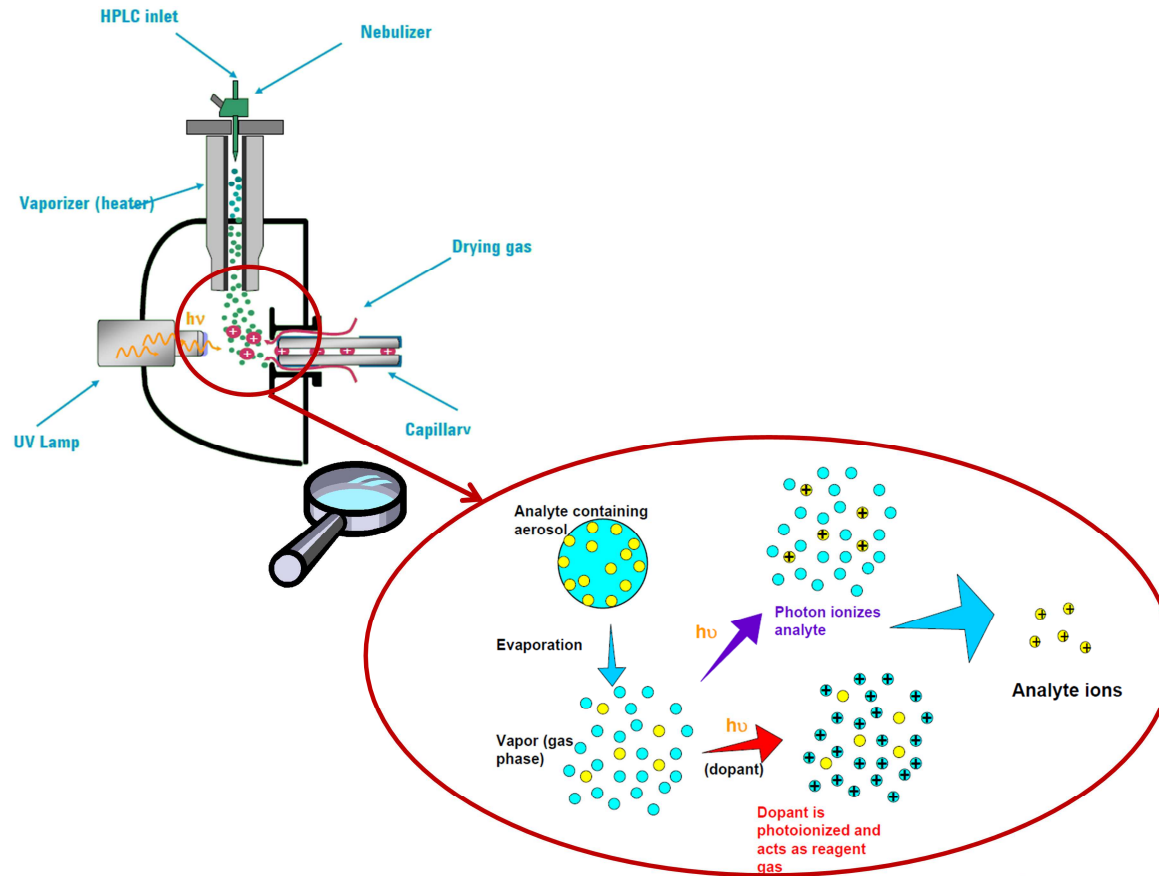


Figura 19. Esquema y mecanismo de la fuente de ionización APPI

Fuentes multimodales.

Son fuentes de ionización que combinan ionización ESI y APCI en una sola fuente ya que casi todos los compuestos ionizan en combinación de ESI y APCI. Se utilizan para métodos de screening que requieran detectar un rango amplio de compuestos sin necesidad de repetir la inyección ya que puede operar en modo ESI, en modo APCI o en modo combinado ESI+APCI.

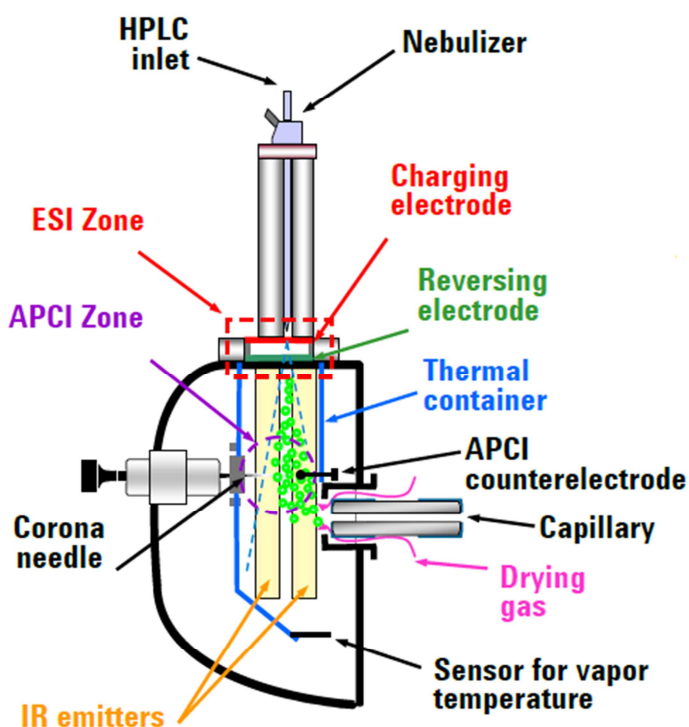


Figura 20. Esquema de la fuente de ionización multimodo

Analizadores de masas

Una vez producida la ionización los iones son transportados al analizador, donde van a ser separados según su relación masa/carga (m/z), a lo largo de los años se han fabricado distintos tipos de analizadores, basados en diferentes principios para

lograr la separación de los iones, aunque todos utilizan campos eléctricos y/o magnéticos para lograrlo. Actualmente los tres analizadores que realmente se utilizan a nivel analítico son el analizador cuadrupolar (Q), el analizador de tiempo de vuelo (TOF) y la trampa de iones orbital Orbitrap (OT), teniendo cada uno de ellos diferente poder de resolución, que es un parámetro que se define como la capacidad de distinguir entre dos iones con relación m/z próxima:

$$R = m/\Delta m$$

donde Δm es la diferencia de masa entre dos picos adyacentes que están resueltos, y m es la masa nominal del primer pico (a veces se utiliza en su lugar la masa media de los dos picos). Se considera que dos picos están separados si la altura del valle entre ellos no es mayor de una determinada fracción de su TOF y OT son de alta (o muy alta) resolución.

Analizador de masas cuadrupolar (Q)

El cuadrupolo consiste en cuatro barras ordenadas simétricamente, el interior de las barras puede ser cilíndrico o hiperbólico, la forma de su superficie define la forma de del campo eléctrico que controla los iones. El cuadrupolo puede ser tradicional, con 4 barras independientes metálicas mantenidas en su lugar con cerámicas, o bien un cuadrupolo monolítico, en que las cuatro superficies hiperbólicas están hechas con una sola pieza de cuarzo cuya superficie interior tiene un recubrimiento conductivo.



Figura 21. Cuadripolo tradicional (arriba) y cuadripolo monolítico (abajo)

Las barras del cuadripolo están situadas en pares, cada par de barras tiene un potencial total positivo o negativo, los pares positivo y negativo están colocados uno frente al otro, las cuatro barras del cuadripolo tienen un puente eléctrico entre cada par de barras, eléctricamente, los pares de barras tienen potenciales opuestos (+ y -).

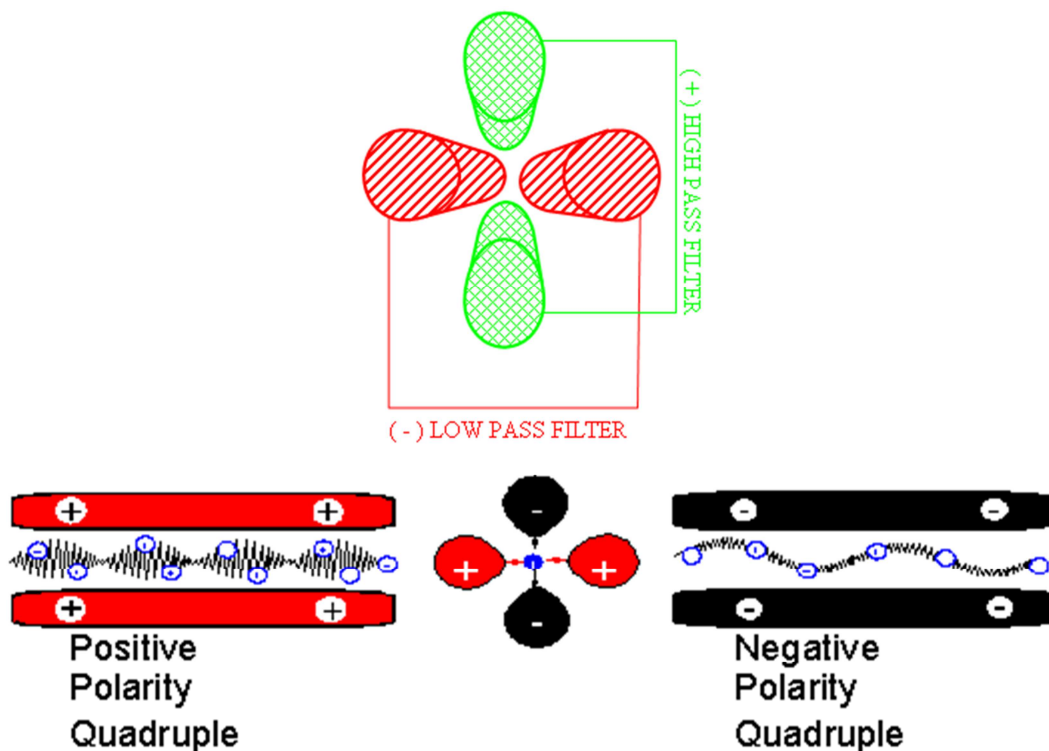


Figura 22. Esquema de un cuadrupolo y del movimiento de los iones en su interior

Los iones pasan a través de las lentes de entrada al cuadrupolo, donde se encuentran un complejo campo eléctrico que hace que se muevan a través del cuadrupolo, la amplitud del campo eléctrico determina la masa de los iones que van a alcanzar el detector. Los iones con una masa diferente a la seleccionada por el cuadrupolo oscilarán cada vez más alejados del camino axial, hasta golpear o pasar a través de las barras del cuadrupolo. El campo eléctrico del cuadrupolo es una combinación de potenciales RF y DC, que hacen cambiar a los iones de trayectoria. Al aplicar los valores de RF y DC correctos al cuadrupolo, un ión particular de una m/z seleccionada pasa a través del cuadrupolo, cuanto mayor amplitud de RF y DC de aplique mayor será la masa seleccionada.

El modo de trabajo de los analizadores cuadrupolares puede ser SCAN o SIM, en modo SCAN se hace un barrido de masas en un rango seleccionado, mientras que

en modo SIM se selecciona una sola masa que va a pasar a través del cuadrupolo, ignorando todas las demás

Los analizadores cuadrupolares son de baja resolución, esto es, pueden diferenciar iones que difieren en su masa en una unidad, son instrumentos de bajo coste, facilidad de uso y muy robustos, principalmente se han acoplado a GC, aunque también existe equipos LC/MS pero presentan ciertas limitaciones de sensibilidad y resolución.

Tiempo de vuelo (TOF)

El analizador de tiempo de vuelo es probablemente el método de medida de masa más sencillo de conceptualizar, aunque hay complejidades ocultas cuando se trata de aplicaciones de mayor resolución. El funcionamiento se basa en la medida del tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo de vuelo cuando se les aplica una energía constante, de esta forma el tiempo de vuelo varía de forma inversamente proporcional con la masa del ión. Las características inherentes de los TOF-MS son sensibilidad extrema (todos los iones se detectan), casi ilimitado rango de masa y velocidad de análisis (instrumentos modernos pueden obtener espectros completos en segundos), esto hace que sean uno de los métodos más deseables de análisis de masas.

En el TOF todos los iones reciben la misma energía cinética inicial mediante un pulso de extracción, a medida que pasan por la zona de vuelo se separan según sus masas, los iones ligeros viajan más rápido mientras que los más pesados viajan más lento, la ecuación que rige la separación TOF es:

$$\frac{m}{z} = 2eEs \left(\frac{t}{d} \right)^2$$

m/z es la relación masa/carga del ión

E es el potencial del pulso de extracción

S es la longitud del tubo de vuelo sobre el que se aplica E

D es la longitud de la zona del campo libre de deriva

t es el tiempo de vuelo medido del ión

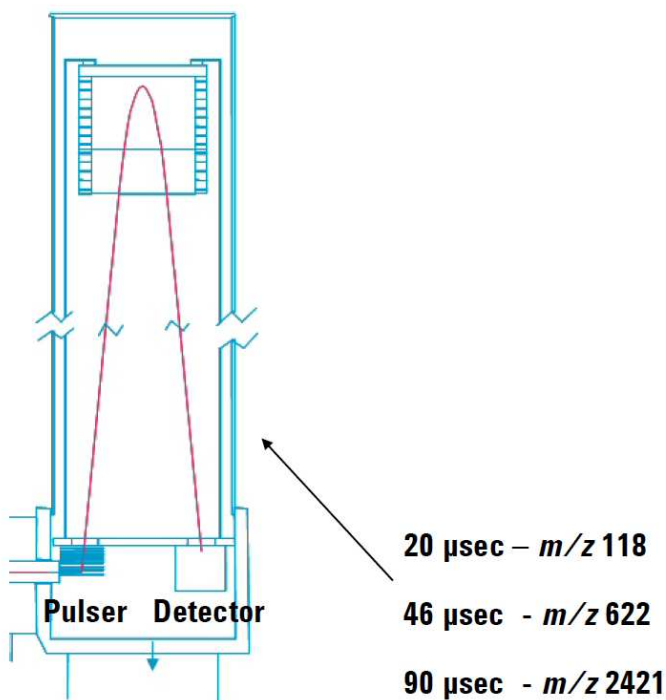


Figura 23. Esquema del analizador TOF

Teóricamente, a todos los iones se les da la misma energía cinética inicial por el pulso de extracción y luego derivan a lo largo del campo libre de deriva donde serán separados de forma que todos los iones de la misma m/z llegan al detector al mismo tiempo. En la práctica, el impulso no es percibido por todos los iones con la misma intensidad, por lo que existe una distribución de energía cinética para cada m/z discreta, esto disminuye la resolución pero es relativamente fácil de corregir por la aplicación de un reflector en el extremo de la zona de deriva, éste consiste en una serie de campos eléctricos que repelen los iones de vuelta a lo largo del tubo de vuelo -por lo general en un ángulo ligeramente desplazado- lo que resulta en una reorientación de los iones con la misma m/z .

Los analizadores de tiempo de vuelo presentan una resolución de masa de 15000-30000, obteniéndose errores de masa por debajo de 1ppm, para calcular el error de masa se aplica esta fórmula:

$$\text{Error de masa (ppm)} = (m_{\text{medida}} - m_{\text{calculada}}) \times 10^6 / m_{\text{calculada}}$$

Para hacer una idea de la precisión de los TOF, 1ppm de error para m/z 622 supone lo siguiente:

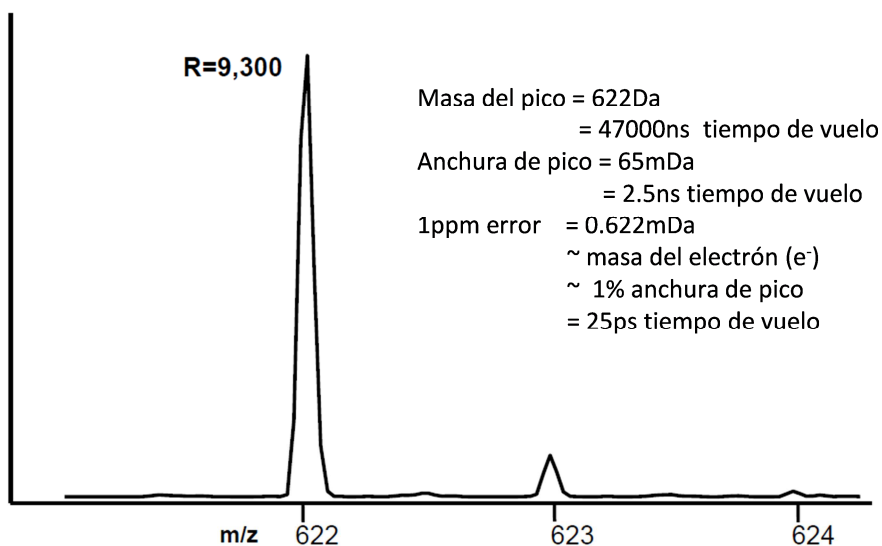


Figura 24. Datos del error de masa de 1ppm

Los instrumentos de tiempo de vuelo se han convertido en los últimos años en esenciales para las aplicaciones de análisis biológicos, especialmente con el acoplamiento con fuentes de ionización MALDI y ESI ya que permiten la creación de bases de datos para la identificación automática de compuestos basadas en su tiempo de retención y masa exacta, así como la detección de compuestos “*non target*” e incluso desconocidos.

Trampa de iones orbital tipo "Orbitrap"

El orbitrap (OT) ^[130] es una trampa de iones electrostática que usa la Transformada de Fourier (FT) para obtener el espectro de masas ^[131, 132]. La parte externa es un electrodo con la forma de un barril cortado en dos partes iguales, con un pequeño intervalo de separación. El electrodo central tiene forma de huso. El diámetro máximo del electrodo central es de 8 mm y el del electrodo externo de 20 mm. Los iones son inyectados tangencialmente a través de los intersticios de las dos partes del electrodo externo. Estos iones inyectados con una alta energía cinética comienzan a oscilar en la trampa en forma de complicadas espirales alrededor del electrodo central, bajo la influencia de un campo electrostático. Una importante propiedad del orbitrap es que la frecuencia es directamente proporcional a la relación m/z e independiente de la energía cinética de los iones inyectados. La corriente inducida por los iones oscilantes es medida y convertida mediante Transformada de Fourier en frecuencias individuales e intensidades, generando el espectro de masas.

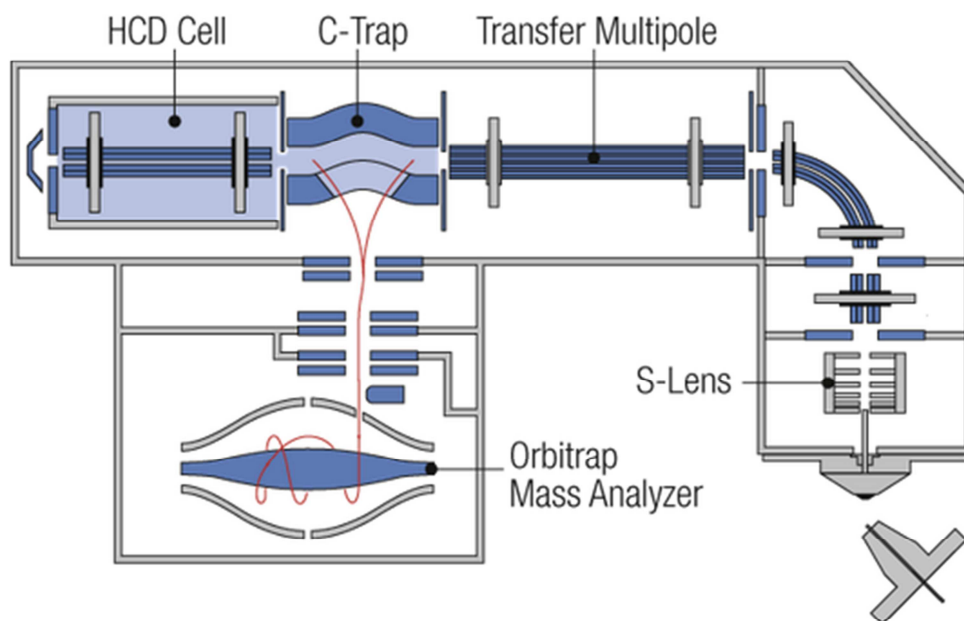


Figura 25. Esquema del instrumento Orbitrap

Estos instrumentos operan en full scan y a muy alta resolución (> 100000 FWHM). Al igual que todas las trampas de iones, las prestaciones dependen del tiempo de adquisición, el tiempo normal de adquisición durante un ciclo en el orbitrap es de 1 segundo. Este tipo de analizadores se suelen utilizar en los instrumentos LC-MS.

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La espectrometría de masas en tándem, o como generalmente se le denomina MS/MS, permite una mejor selectividad y sensibilidad, así como la obtención de iones fragmento para identificar un compuesto. Los únicos analizadores de masas que permiten por sí mismos realizar MS/MS son las trampas de iones, que trabajan de forma secuencial, primero seleccionan unos iones que confina, para después fragmentarlos mediante el impacto con un gas a determinada energía y

posteriormente detectarlos. Para conseguir la fragmentación con otros analizadores es necesaria la combinación de varios de ellos, con un primer analizador (generalmente un cuadrupolo) se seleccionan los iones que se quieren fragmentar en la celda de colisión, donde un gas a cierta energía produce la fragmentación, y seguidamente estos iones producto son analizados por un segundo analizador (normalmente cuadrupolo o TOF) y posteriormente detectados.

Comercialmente se han desarrollado diferentes tipos de espectrómetros de masas híbridos utilizando diferentes combinaciones de analizadores:

Instrumentos de sector múltiple. Existen varias configuraciones posibles, siendo las más utilizadas las de triple sector: magnético-eléctrico-magnético (B-ESA-B) ó eléctrico-magnético-eléctrico (ESA-B-ESA). En esta última, los dos primeros sectores pueden ser utilizados como un espectrómetro de masa de alta resolución, seleccionando el ión precursor (también llamado ión padre); el tercer sector eléctrico analiza los iones fragmento.

Triple cuadrupolo (QqQ). El nombre de triple cuadrupolo procede de los primeros instrumentos de este tipo que constaban de tres cuadrupolos, el primero y el tercero funcionando como analizadores de masas y el segundo como celda de colisión, en la actualidad estos equipos constan de dos cuadrupolos y una celda de colisión, generalmente hexapolar, pero se ha mantenido el nombre histórico.

El primer cuadrupolo selecciona los iones que van a pasar a la celda de colisión (iones precursores), donde los iones son focalizados y transmitidos mientras que se fragmentarán mediante colisiones con un gas a presión y energía controlada (CID → Collision Induced Dissociation), los iones fragmentados (iones producto) pasan al segundo cuadrupolo que selecciona los productos de interés que van a llegar al detector. Dependiendo de la actuación de los dos cuadrupolos y de la

celda de colisión hay diferentes modos de trabajo con un triple cuadrupolo, que serán descritos más adelante (Product Ion Scan, Precursor Ion Scan, Neutral Loss Scan, Single and Multiple Reaction monitoring)

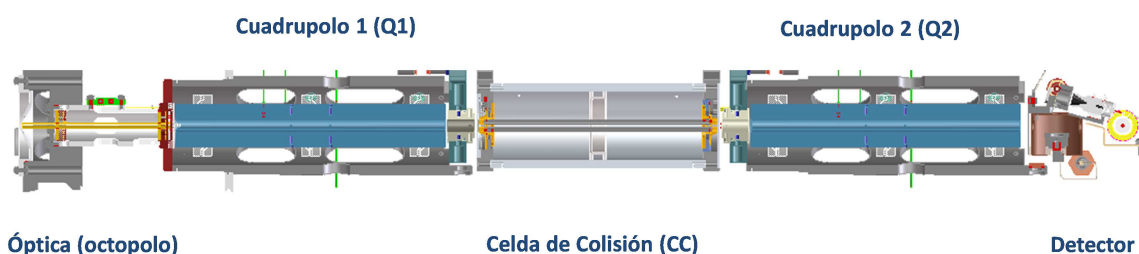


Figura 26. Esquema del instrumento QqQ

Los instrumentos de triple cuadrupolo son muy utilizados debido a su robustez, facilidad de operación, relativo bajo coste y capacidad de uso para análisis de rutina, siendo muy utilizados para el análisis de matrices sucias minimizando la preparación de muestra gracias a su sensibilidad y selectividad. Hoy en día son el paradigma de la sensibilidad, consiguiendo los límites de detección más bajos que cualquier otra técnica por lo que son la referencia en multitud de análisis, incluyendo los análisis de residuos en alimentos, análisis forenses y antidopaje, análisis de contaminantes medioambientales e investigación médica y farmacéutica

Q-TRAP. Estos instrumentos híbridos se podrían describir como un triple cuadrupolo en el que el tercer cuadrupolo ha sido sustituido por una trampa lineal. Ofrecen una gran velocidad de barrido de masas que permite realizar múltiples experimentos MS/MS simultáneamente. Por lo tanto, es posible obtener información estructural de los compuestos analizados y se puede operar en los mismos modos de trabajo que en un triple cuadrupolo.

Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (Q-TOF). En estos instrumentos, los iones producidos en la fuente son introducidos en el cuadrupolo (Q), donde algunos de ellos son seleccionados para una posterior fragmentación en un hexapolo que actúa como celda de colisión. Los iones fragmento que abandonan el hexapolo son focalizados hacia el analizador de tiempo de vuelo (TOF), donde son separados en función de su relación masa-carga con gran exactitud. Como resultado, se obtiene un espectro MS/MS de iones fragmento de alta resolución, muy útil para identificación de desconocidos, metabolitos, proteínas, etc.

Instrumentos híbridos más sofisticados son LTQ-FTICR y LTQ-Orbitrap, de elevado coste y aún no muy extendidos. Ambos instrumentos ofrecen la posibilidad de monitorizar iones precursores e iones fragmento con alta resolución y exactitud, de gran utilidad en análisis estructural.

Modos de trabajo típicos de los analizadores de masas

Los analizadores de masas pueden trabajar en dos modos, “*full scan*”, en el que se separan todos los iones en función de su relación m/z y son conducidos al detector, y “*selected ion monitoring, SIM*”, en el que se selecciona un ión concreto. En los instrumentos MS/MS según combinación de los distintos modos de trabajo se pueden realizar distintos experimentos, en el caso de los instrumentos de triple cuadrupolo, se pueden hacer los siguientes modos de trabajo:

Product Ion Scan. Q1 trabaja en modo SIM y el Q2 en modo SCAN:

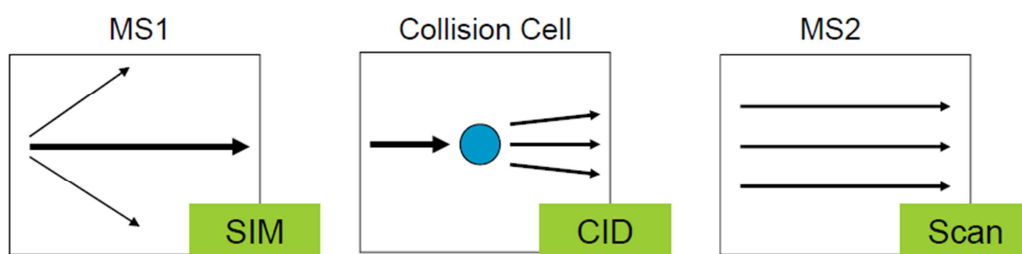


Figura 27. Modo de trabajo Product Ion Scan

Se usa principalmente para el desarrollo de métodos, la identificación de analitos y la elucidación estructural

Precursor Ion Scan. Q1 trabaja en modo SCAN y el Q2 en modo SIM:

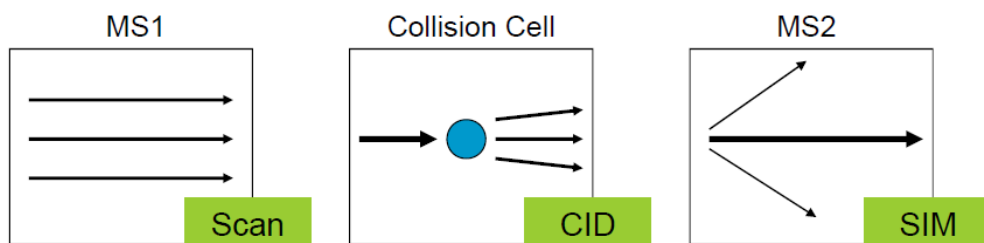


Figura 28. Modo de trabajo Precursor Ion Scan

Se usa principalmente cuando una subestructura es conocida y se analizan un grupo de compuestos que generan el mismo fragmento, por ejemplo en la

búsqueda de metabolitos cuando el patrón de fragmentación del compuesto “padre” es conocido.

Neutral loss scanning. En este modo de trabajo, Q1 y Q2 trabajan en SCAN, de forma que se establece una diferencia de masa fija entre ambos cuadrupolos:

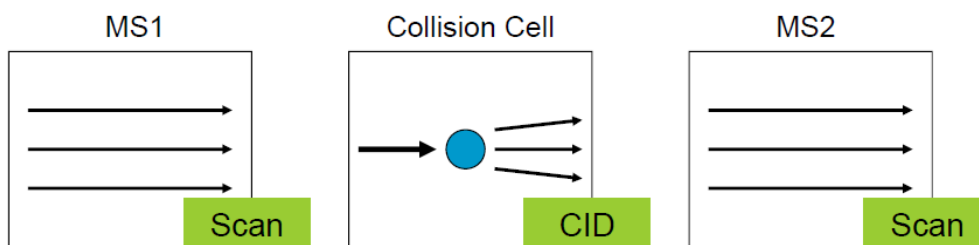


Figura 29. Modo de trabajo Neutral Loss Scan

Es posible ver una pérdida de masa de una molécula de interés, por ejemplo NO_2 (m/z 46) que proviene de las nitrosaminas

Multiple Reaction Monitoring (MRM). Ambos cuadrupolos trabajan en modo SIM:

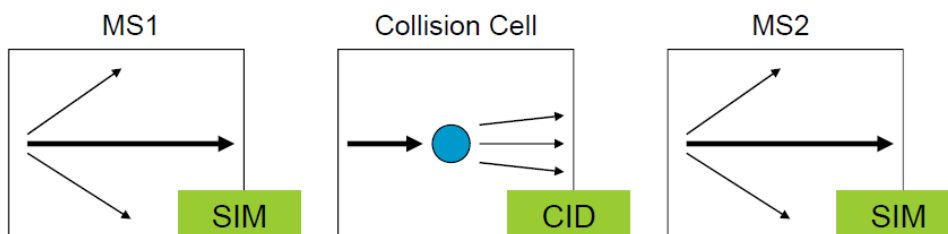


Figura 30. Modo de trabajo Multiple Reaction Monitoring

Una (o varias) masa es seleccionada en el Q1, en la celda de colisión se generan fragmentos que son analizados con el Q2. Esta es el modo de trabajo en el 90% del trabajo de rutina con un QqQ.

I.7. LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN CONTROL ANTI-DOPAJE

La espectrometría de masas permite la caracterización de compuestos orgánicos y productos naturales en muestras complejas como las muestras biológicas. La primera instrumentación basada en la combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas como detector se describió en 1959 ^[133].

Los primeros métodos para control antidopaje descritos empleando espectrometría de masas datan de 1967. Beckett y colaboradores ^[134] midieron anfetamina y sus derivados en muestras de orina fortificadas empleando un GC-MS de sector magnético sencillo, que permitía el escaneo del espectro de masas entre 10 y 450 uma en 12 segundos, permitiendo la detección de menos de 4 µg de analito por mililitro de orina. Empleando diferentes parámetros de detección e ionización por impacto electrónico, el espectro de masas tanto de metilanfetamina como de anfetamina era adquirido para emplearse como método de confirmación.

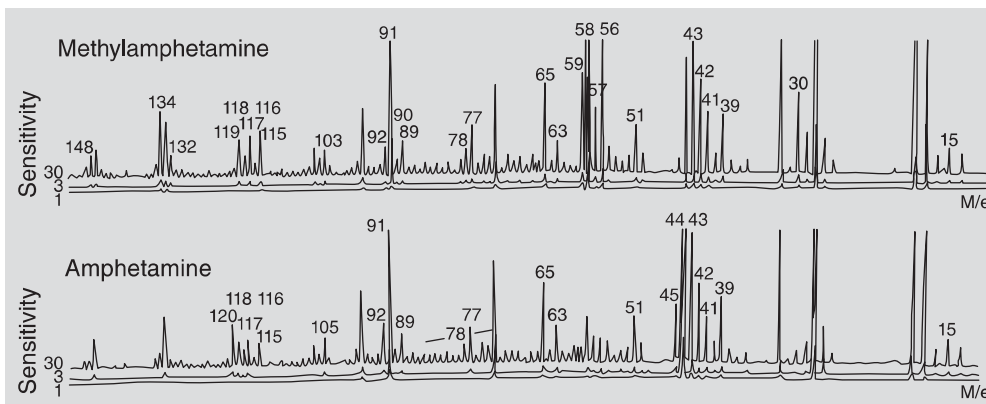


Figura 31. Espectro de masas obtenido mediante EI-GC/MS de anfetamina y metilanfetamina utilizando un espectrómetro de masas de sector magnético Hitachi-Perkin Elmer RMU-6E, Adaptado de Beckett y col (1967)

El empleo de GC-MS para control antidoping en rutina tuvo su inicio en los JJ.OO de Munich de 1972, donde se detectaron varios positivos de anfetaminas, efedrina, fenmetrazina y niquetamida. Como muestra de la robustez del empleo de

GC-MS, en la **Figura 31**, se incluyen los espectros de masas registrados en Munich durante los JJ.OO y en un ensayo en 2008, donde se puede apreciar que no hay diferencias significativas entre ambos. Con la idea de mejorar las propiedades cromatográficas de los métodos para los análisis de sustancias dopantes, se han descrito varias posibilidades para la derivatización de estimulantes ^[135, 136] y esteroides ^[137], aunque en algunos casos, pueden ser medidos también con GC-MS sin derivatizar.

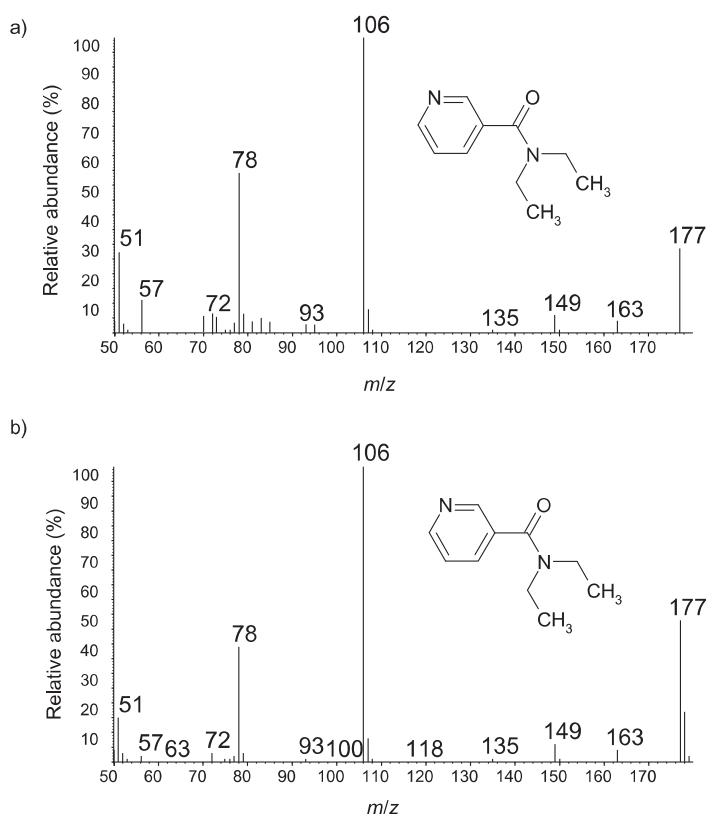


Figura 32. Espectro de masas de impacto electrónico de niquetamida obtenido de a) una muestra de orina ensayada en los JJOO de Munich 1972 y b) un patrón de referencia analizado en 2008 en un laboratorio oficial. Adaptado de M. Thevis "Mass Spectrometry in Sport Drug Testing", 2010.

En 1975, la lista de sustancias prohibidas del COI fue ampliada incluyendo los esteroides anabolizantes androgénicos (AAS), lo que propició el desarrollo de nuevos métodos de control ^[138] que fueron implementados en los JJ.OO de

Montreal en 1976. De un total de 1786 muestras, 275 fueron seleccionadas para el control de los AAS empleando un procedimiento de análisis mediante GC-MS, que incluía una hidrólisis enzimática, preconcentración con extracción en fase sólida y formación de trimetilsilil derivados. Se empleó un doble sector magnético de alta resolución como analizador de masas. Ocho de las muestras ensayadas se consideraron positivas de anabolizantes, incluyendo tres medallistas de levantamiento de peso.

No fue hasta principios de los años 80, cuando el empleo de equipos GC-MS de sobremesa con analizador de cuadrupolo se popularizó en los laboratorios oficiales de control antidopaje. Esto ocurrió por ejemplo en los mundiales de fútbol de 1982 en España, en los mundiales de atletismo celebrados en Finlandia en 1983 y en los juegos panamericanos de 1983 celebrados en Venezuela. En este último caso, los equipos GC-MS permitieron descubrir uno de los mayores escándalos relacionados con el dopaje hasta la fecha. Se emplearon dos GC-MS Hewlett-Packard 5996, con columna capilar OV-1 (17 metros de largo x 0.2 mm diámetro interno) con fuente de impacto electrónico funcionado tanto en modo de adquisición SIM (*selected ion monitoring*) como en *full-scan*. La preparación de muestra incluía extracción en fase sólida, hidrólisis enzimática, extracción líquido-líquido y finalmente formación de trimetil-silil ésteres. Un total de 19 deportistas incluyendo 11 levantadores de peso, 1 ciclista y 4 atletas de pista dieron positivo. De estos positivos, 15 se debieron a los AAS, mientras que 4 de ellos eran por estimulantes (dos positivos de efedrina y dos de fencamina).

Durante la década de los ochenta los métodos de control antidopaje fueron mejorando de forma paulatina en paralelo con las mejoras en instrumentación científica y de los nuevos avances médicos con el desarrollo de nuevos fármacos. Un nuevo nivel de calidad en términos de ensayos analíticos fue alcanzado en los JJ.OO de Los Ángeles en 1984. Por primera vez se ensayaron todas las muestras (1510) para el control de AAS por GC-MS. Once positivos fueron encontrados (efedrina (1), nandrolona (8), testosterona (1) y metenolona (1))^[139].

Cuatro años después en Seúl 1988, el laboratorio de control antidoping dispuso de 12 novedosos GC-MS HP 5890/5970B junto con prototipos HP5988A, que servían para su acoplamiento con GC o para HPLC (vía interfase *termospray*)^[140], lo que permitió el análisis de corticosteroides. Además, los ensayos de metabolitos de larga duración de AAS supusieron un gran avance, y permitieron por ejemplo la detección de consumo de stanozolol (un AAS de síntesis) por parte de Ben Johnson y en otros dos casos. Esta metodología fue descrita e implementada previamente a los JJ.OO de Seúl por Donike y Schänzer. Además de los positivos por stanozolol, se encontraron positivos por cafeína, permolina y furosemida (4).

El laboratorio de control antidopaje de Barcelona 1992 contó con 13 GC-MS (HP5970/HP5971) y dos LC-MS HP59980B (con interfase *particle beam*). En total, se detectaron 5 positivos (clenbuterol (2), estricnina (1), mesocarb (1) y norefedrina (1)).

En 1994, en los JJ.OO de invierno de Lillehammer (Noruega), se empleó por primera vez un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas de alta resolución con doble sector magnético con geometría *Nier-Johnson* invertida (HP5890/Finnigan MAT95), por su elevada sensibilidad y selectividad en analitos como el clenbuterol y los metabolitos de stanozolol y matendieone^[141]. En este evento también se empleó por primera vez un sistema GC-MS de relaciones isotópicas (GC-C-IR-MS) para distinguir el abuso de sustancias dopantes que ya se

encuentran de forma natural en el humano como la testosterona ^[142]. Estos ensayos de relaciones isotópicas se han ido afinando y mejorando a lo largo de los años ^[143, 144], obteniéndose un método exhaustivo para el control de AAS sintéticos endógenos empleando GC-IRMS en los JJ.OO de Nagano en 1998.

En 2001, en los mundiales de esquí nórdico de Lahti (Finlandia) fue la primera vez que los polisacáridos expansores del volumen de plasma fueron controlados ^[145, 146]. Se empleó GC-MS y se detectó la presencia de estos compuestos en muchos de los medallistas finlandeses que fueron desposeídos de los triunfos. Por este motivo, en los siguientes JJ.OO de invierno de Salt Lake City de 2002, este ensayo se siguió incluyendo en los controles y pese a que se mejoraron las características y rendimiento del método mediante el empleo de LC-MS/MS ^[147, 148] y MALDI-TOFMS ^[149] no se detectó ningún positivo por este tipo de compuestos durante este evento.

Durante los JJ.OO de Atenas 2004, los equipos GC-HRMS de doble sector magnético (Micromass Autospec Ultima) fueron pieza clave en la detección del mayor número de positivos por sustancias prohibidas hasta entonces. Los positivos se debieron a la manipulación de muestras de orina y principalmente a positivos por AAS (stanozolol, testosterona, nandrolone, methyltestosterona), clenbuterol, catina, y furosemida. Por otra parte, pese a que los ensayos de sustancias peptídicas (hormonas y proteínas) para control antidoping fueron descritos por primera vez en 1993 ^[150], no fue hasta 2004 cuando se incluyeron dentro de la rutina de ensayos practicados empleando un equipo LC-MS de trampa de iones ^[151].

Los avances en espectrometría de masas en los últimos 10 años han sido muy destacados, incluyendo el desarrollo y comercialización de equipos que presentan una sensibilidad y selectividad mucho mayores lo que permite la mejora drástica de los métodos para la detección de sustancias prohibidas de forma más rápida y

eficiente y no sólo moléculas de bajo peso molecular, sino también especies como proteínas y hormonas peptídicas. Actualmente, la espectrometría de masas presenta un papel esencial en los laboratorios de control antidopaje de todo el mundo ^[152].

I.8. ANTECEDENTES DE MÉTODOS DE CONTROL ANTIDOPING EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS/ESPECTROMETRÍA DE MASAS

I.8.1. El problema analítico en control antidopaje: aspectos analíticos de la determinación de sustancias dopantes en fluidos biológicos

La detección y confirmación de sustancias dopantes en matrices biológicas es muy compleja, no sólo por que se necesitan equipamientos que son sofisticados, si no debido a que la transformación parcial o total de las sustancias en el organismo da lugar a la aparición de entidades químicas diferentes (metabolitos de fase I y conjugados con ácido glucurónico y sulfatos entre otros). Además, se necesita disponer de patrones de referencia de las sustancias dopantes y sus posibles metabolitos.

Las metodologías analíticas que se han empleado para el análisis de sustancias dopantes son cromatografía de gases (GC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y radioinmunoensayo (RIA). A mediados de los ochenta, se introdujo la técnica basada en el acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS), que permitió la detección de nuevos anabolizantes como el stanolozol en los JJ.OO. de Seúl en 1988 y supuso un salto cualitativo enorme en las herramientas analíticas para la lucha contra el dopaje.

Entre las sustancias dopantes, el grupo más importante y usado es el de los anabolizantes esteroides, que suelen ser derivados sintéticos de la testosterona. Estas sustancias favorecen el crecimiento muscular y pueden mejorar el rendimiento de los deportistas. En todas las sustancias dopantes y particularmente en el caso de los anabolizantes, la detección es muy compleja, debido al metabolismo de los mismos y al elevado número de compuestos existentes presentes que hacen que se requieran técnicas analíticas basadas en

espectrometría de masas ^[153, 154]. Además, los distintos principios activos existentes en cada una de las clases de sustancias dopantes suelen presentar estructuras químicas similares entre sí o incluso el mismo peso molecular ^[155]. Por otra parte, para algunos casos concretos se requiere una sensibilidad muy elevada (detectar entre 2 y 10 ng/mL en orina) ^[156].

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) es en la actualidad la técnica más empleada para la determinación de agentes dopantes en laboratorios de control antidopaje ^[157]. Ésta técnica proporciona suficiente selectividad y sensibilidad para el propósito perseguido. Sin embargo, la presencia de grupos funcionales polares en la estructura de los agentes dopantes hace obligatoria la introducción de una **etapa de derivatización**, basada normalmente en la formación de trimetilsilil derivados ^[158, 159, 160, 161]. De esta forma se mejoran carencias en el análisis de compuestos con grupos funcionales como COOH, -NH, NH₂ ó OH, (la mayoría) aunque este procedimiento no siempre origina resultados satisfactorios. Por ejemplo, la tetrahidrogestrinona (THG) no se puede detectar mediante GC-MS usando una etapa de derivatización ^[162]. Estos procesos de derivatización pueden dar lugar también a la formación de productos indeseados durante el proceso de reacción, que originan errores en las etapas de confirmación y cuantificación ^[163].

Estas tediosas etapas de derivatización se evitan cuando se emplea la **cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS)**, técnica que se ha comenzado a utilizar en los laboratorios de dopaje oficiales en el último lustro ^[153]. Empleando LC-MS, se evitan procedimientos de hidrólisis ácida, básica o enzimática. Se mantiene la información de especiación de la sustancia que puede ser útil y además la interpretación de los espectros de masas resulta mucho más sencilla y mejora la productividad del laboratorio. No obstante, la literatura disponible en el empleo de esta técnica para el análisis de sustancias dopantes es relativamente escasa en comparación con la experiencia en GC-MS ^[164].

Se han descrito métodos basados en el empleo de analizadores de cuadrupolo sencillo^[165], trampa de iones^[166, 167] y triple cuadrupolo^[168]. La LC-MS con estos analizadores ofrecen ventajas frente a la GC-MS, pero, el número de compuestos que se pueden determinar en un análisis de forma sensible, está limitado por la rapidez de barrido de los analizadores (“duty cycle”), que sólo permiten el control de un número limitado de iones -en modo “selected ion monitoring (SIM)”- o bien de transiciones MS/MS, en modo de monitorización selectiva de transiciones (*multiple reaction monitoring*) (MRM)). El método desarrollado hasta ahora para un número mayor de sustancias dopantes empleando LC-MS/MS, es para 90 compuestos incluyendo corticoides y anabolizantes, usando un triple cuadrupolo en modo MRM^[169] y empleando una sola transición por compuesto, cuando lo normal son utilizar dos^[170]. Por lo tanto, esta aproximación presenta ciertas **limitaciones**. Antes de realizar el análisis es imprescindible preseleccionar las masas de los iones (y conocer los tiempos de retención) de las especies de interés (esto también ocurre en GC-MS). Esto es una limitación muy severa en el campo de aplicación del control antidoping, porque:

El número de sustancias prohibidas (incluidos principios activos y sus metabolitos) es muy elevado –varios centenares-, y esto no permite que se pueda llevar a cabo un análisis de todos los compuestos de forma simultánea en una sola inyección.

En las prácticas de dopaje, es muy frecuente que las sustancias prohibidas que se emplean en competición sean poco comunes, de forma que es difícil conseguir patrones de referencia de las sustancias activas, previamente a la detección en muestras de deportistas.

Como ejemplo, los esteroides anabolizantes de síntesis química de la compañía Balco (p.e. THG, tetrahidrogestrinona). Esto hace que sea imposible de detectar por métodos de GC-MS y LC-MS basados en la selección de transiciones o iones a priori.

En este sentido, la **cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS)** ofrece unas características que encajan a la perfección con la filosofía del control antidoping. Por una parte, ofrece una sensibilidad muy elevada en modo full-scan para todo tipo de compuestos con límites de detección a nivel de picogramos (prácticamente como un triple cuadrupolo en modo SRM). Esta sensibilidad se disfruta en todo el rango de masas (p.ej. m/z 50-1000), lo que significa que se puede detectar cualquier sustancia a niveles de concentración muy bajos, sin tener que seleccionar iones. Además, el número de compuestos diferentes que se pueden determinar es en principio ilimitado. En ensayos en nuestro laboratorio, se han desarrollado métodos que permiten el análisis de más de 300 xenobióticos en menos de 20 minutos ^[171]. Por otro lado, el analizador de tiempo de vuelo ofrece la posibilidad de medir las **masas exactas de los iones** con errores de desviación de masa tan bajos, que se puede obtener la composición elemental de las especies detectadas, lo que se emplea como criterio de identificación para nuevos xenobióticos y sus metabolitos sin disponer de patrones *a priori*.

En esta Tesis Doctoral se propone pretende explorar la potencialidad de la técnica **LC-TOFMS** para el control antidoping, tanto para el análisis de **sustancias prohibidas conocidas** incluidas en las listas de los organismos oficiales como **otras sustancias ilegales** que se emplean pero que **aún no se han descubierto**.

Los antecedentes y literatura disponible del empleo de estas técnicas basadas en espectrometría de masas avanzada (LC-TOFMS) al inicio de la misma eran escasos pero a la vez prometedores. Hasta 2008, se habían descrito tres métodos multi-clase para el análisis de algunos de corticoides ^[172] y esteroides ^[173, 174] incluidos en las listas oficiales de sustancias prohibidas.

I.8.2. Metodologías multi-clase para la detección de sustancias prohibidas en controles antidoping

En la última década, la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS(/MS)) se ha convertido en una herramienta esencial en los métodos de control antidopaje, reemplazando a los métodos anteriores basados en ensayos inmunológicos o en cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS(/MS)) ^[175, 176, 177, 178].

En particular, la necesidad de llevar a cabo etapas de desconjugación/hidrólisis y de derivatización de los analitos previa a la etapa de GC-MS así como la escasa selectividad proporcionada por los ensayos inmunológicos –al menos comparada con la espectrometría de masas- han propiciado el desarrollo y generalización del uso de métodos LC-MS(/MS).

El aumento constante del número de candidatos a ser considerados como sustancias prohibidas ha propiciado la investigación y desarrollo de métodos de análisis exhaustivos, específicos y sensibles basados en LC-MS(/MS), utilizando columnas cromatográficas con tamaño de particular reducido (1.8 µm) que operan a elevadas presiones junto con sofisticados detectores empleando espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas de alta resolución o bien espectrometría de masas en tándem de alta resolución ^[179].

Previa a la etapa de detección, en análisis de orina es necesario llevar a cabo una etapa de tratamiento de muestra, que puede incluir etapas de hidrólisis enzimática, derivatización o extracción, aislamiento y preconcentración de las sustancias dopantes.

En la siguiente Tabla se detallan algunos de los métodos descritos para el análisis de sustancias dopantes prohibidas de la lista de la WADA:

Tabla 4. Descripción de algunos de los principales métodos de preparación de muestra para el análisis de sustancias prohibidas mediante LC/MS

Analitos incluidos	Método de preparación de muestra	Características del método de detección	Ref.
Extracción líquido-líquido			
34 diuréticos, estimulantes y otros agentes dopantes	Extracción líquido-líquido con acetato de etilo a pH 9.5 (con NaCl): 4 mL de orina + 1g NaCl+ 0.1 mL tampón NH ₄ Cl (100 µL), 20 minutos de extracción, evaporación a sequedad y reconstitución con 100 µL de H ₂ O:acetonitrilo (90:10, v/v). Factor de preconcentración: 40:1	Detección: UPLC-MS/MS (+/-) QQQ [Quattro Premier XE] Columna: C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm Fases móviles: A (H ₂ O, 0.01 % ácido fórmico); B (acetonitrilo, 0.01 % ácido fórmico) Tiempo: 5 min.; Volumen de inyección: 5 µL Recuperaciones: debido a las diferentes familias las recuperaciones oscilaron entre menos del 10 % y el 100 %. Se obtuvieron recuperaciones bajas en el caso de analitos polares como benzoyllecgonine, chlorothiazide, metabolito deesmolol, metabolito de finasteride metabolito y ácido ritanílico Límites de detección entre 50 to 200 ng/mL, de forma que todos los analitos cumplen lo mínimos establecidos (MRPLs) por la WADA.	[180]
28 agentes dopantes de distintas familias	Extracción líquido-líquido a pH básico (3 mL de orina), después de una hidrólisis enzimática (1 h- 50°C) a pH 7.4. La extracción se lleva a cabo con tampón carbonato (pH 9) y 10mL of tert-butil metil eter durante 6 minutos. La fase orgánica se lleva a casi sequedad y se reconstituye con 50µL of fase móvil. Factor de preconcentración: 60:1	Detección: HPLC/MS/MS y UPLC-MS/MS (+) QQQ [AB Sciex API 4000] Columnas: C18, 50 mm x 2.1 mm (5 µm); Volumen de inyección: 15 µL C18 50 mm x 2.1 mm, 1.8 µm; Volumen de inyección: 5 µL Fases móviles: A (H ₂ O, 0.1 % ácido acético); B (acetonitrilo, 0.1 % ácido acético) Tiempo: 7 min Recuperaciones: 73-89 %. Límites de detección: entre 1 y 30 ng/mL para los glucocorticoides y los esteroides y entre 100 y 200 ng/mL para el caso de los estimulantes. Método validado a MRPLs.	[181]
123 agentes dopantes de distintas familias	Extracción líquido-líquido de orina después de hidrólisis enzimática. 5 mL de orina a pH 7.0 eran hidrolizados con glucuronidasa. Después, el pH se ajusta a pH 9 con tampon bicarbonate y se lleva la extracción liquid-líquido con eter dietílico, empleando sulfato sódico anhidro para potenciar el efecto "salting-out". Finalmente se centrifuga la muestra y se lleva a sequedad con una corriente de nitrógeno. Se reconstituye con 100 µL de 9:1 fase móvil A/fase móvil B (v/v). Para GC-MS se lleva a cabo una derivatización formando trimetilsilil éteres Factor de preconcentración: 50:1	Detección: LC-TOFMS (ESI (+), 64 analitos)[Agilent 6210] y GC-TOFMS (59 analitos) Columna: C18: 100 x 2.1 mm (1.8 µm). Fases móviles: A (H ₂ O, 0.01 % ácido fórmico y 5 mMNH ₄ COOH); B ((90/10, CH ₃ CN/H ₂ O (v/v)). Tiempo: 11.5 min + 2.5 min; Volumen de inyección: 5 µL Recuperaciones: No disponibles Límites de detección: Cumplen con MRPLs aunque no se proporcionan en detalle. Los niveles aproximados son de 10 ng/mL para agentes anabolizantes, 30 ng/mL para corticoids, 500 ng/mL para estimulantes y β - bloqueantes, 250 ng/mL para diuréticos y 200 ng/mL para narcóticos.	[182]

I. Introducción y Justificación

29 sustancias dopantes incluyendo agentes con actividad antiestrogénica, β_2 agonistas, y esteroides anabolizantes de diferentes familias.	Extracción líquido-líquido de orina después de hidrólisis enzimática. 3 mL de orina a pH 7.0 eran hidrolizados con glucuronidasa. Después, el pH se ajusta a pH 9 con tampon bicarbonato y se lleva la extracción líquido-líquido con 5 mL de eter dietílico. Finalmente se centrifuga la muestra y la fase orgánica se lleva a sequedad con una corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituye con 100 μ L de fase móvil (30/70, CH ₃ OH/H ₂ O). Factor de preconcentración: 30:1	Detección: HPLC-Orbitrap-MS con fuente APCI [LTQ-Orbitrap] Columna: C18 monolítica (Onyx), 100 mm x 3 mm Fases móviles: A (H ₂ O); B (MeOH) Tiempo: 10 min; Volumen de inyección: 50 μ L Recuperaciones: 23-99 %. Solamente el efraproxiral, salbutamol, zilpaterol y clenbuterol tuvieron recuperaciones por debajo del 65 %. Límites de detección: mejores de 100 μ g/ml en todos los casos.
241 sustancias prohibidas incluyendo metabolitos	Extracción líquido-líquido de orina después de hidrólisis enzimática. 2.5 mL de orina a pH 7.0 eran hidrolizados con enzima glucuronidasa. Después, el pH se ajusta a pH 9-10 con tampon bicarbonato y se lleva la extracción líquido-líquido con 5 mL de eter dietílico empleando sulfato sódico anhidro para potenciar el efecto "salting-out". Finalmente se centrifuga la muestra, se acidifica con una disolución de ácido acético en acetona y la fase orgánica se lleva a sequedad con una corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituye con 100 μ L de fase móvil (80:20 A/B (v/v)). Factor de preconcentración: 25:1	Detección: LC-TOFMS (ESI(+)) [Agilent 6520] Columna: C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.8 μ m Fases móviles: A (H ₂ O, 0.01 % ácido fórmico y 5 mMNH ₄ COOH); B ((90/10, CH ₃ CN/H ₂ O (v/v)). Tiempo: 12.5 min; Volumen de inyección: 5 μ L Recuperaciones: Sólo se llevaron a cabo experimentos con los analitos con patrones disponibles. De un total de 189 analitos estudiados, las recuperaciones obtenidas fueron mejores al 20 % para 176 analitos. En el caso del salbutamol, atenolol, piretanide, benzoylcegonine y heptaminol, las recuperaciones fueron por debajo del 20 %, pero se seguían detectando por debajo del MPRL. Límites de detección: (44 no validados porque son metabolitos identificados en orina si patrones. De ellos, 26 sustancias prohibidas no eran detectados al nivel requerido por la WADA. El efecto matriz obtenido es relativamente alto.
44 sustancias dopantes polares (estimulantes, narcóticos, β -bloqueantes, etc.)	Extracción líquido-líquido (2 mL de orina) con 5 mL de tert-butilmetil éter. Evaporación a sequedad y reconstitución con 50 μ L de fase móvil. Factor de preconcentración: 40:1.	Detección: LC-MS/MS (ESI (+/-)) QQQ [AB Sciex API 4000] Columna: HILIC, Zorbax Rx-Sil 150 mm x 2.1 mm, 5 μ m Fases móviles: A (H ₂ O, con diferentes % de ácido fórmico o acetato amónico); B (acetonitrilo con diferentes % de ácido fórmico ácido acético) Tiempo: 8 minutos; Volumen de inyección: 10 μ L Recuperaciones: N/D Límites de detección: Los mejores resultados se obtuvieron con la columna HILIC a 35 °C, con un porcentaje de 90 % de acetonitrilo a pH 4.5 con 5 mM de acetato de amonio y 0.1 % de ácido acético.

Extracción en fase sólida

124 sustancias prohibidas incluyendo estimulantes, β -bloqueantes, narcóticos, agentes con actividad antiestrogénica, cannabinoides y diuréticos

Extracción en fase sólida empleando cartuchos de modo mixto (intercambio catiónico y C_8)[Isolute HXC-5]. 1 mL de muestra de orina previamente hidrolizada con β -glucuronidasa se ajustaba a pH 6, y se cargaba en el cartucho, incluyendo posteriormente una etapa de lavado con disolución diluida de ácido clorhídrico. La elución se llevó a cabo con 1 mL de MeOH y 1 mL de MeOH-NH₃ (98:2, v/v). Las fracciones se evaporan a sequedad y se reconstituyen con 150 μ L de acetonitrilo/0.1% ácido fórmico (1:9, v/v).

Factor de preconcentración: 6.66.

Detección: LC-TOFMS (ESI(+)) [Bruker MicroTOF]

Columna: C18, 100 mm x 2 mm, 3 μ m

Fases móviles: A (H₂O, 0.01 % ácido fórmico y 5 mMNH₄COOH); B (CH₃CN).

Tiempo: 21 min (+6 min re-equilibrado); Volumen de inyección: 10 μ L.

Recuperaciones: Entre el 33 y el 98 % (valor medio del 58 %).

Límites de detección: De los 124 compuestos, 97 fueron detectados al nivel MPRL de la WADA.

En el caso del rimiterol, amiphenazole y pentazocine, al ser compuestos muy hidrofílicos, no eran retenidos en el cartucho SPE y por tanto no se recuperaban. Por otra parte, tanto la heroína como el clenbuterol presentaron recuperaciones muy bajas (3 y 9 % respectivamente) y no pudieron ser medidos al MRPL exigido.

Esteroides anabolizantes, corticosteroides y otras drogas (orina de caballo) (> 90 compuestos)

Uso combinado de extracción en fase sólida y extracción líquido-líquido.

Extracción en fase sólida empleando cartuchos de modo mixto (intercambio catiónico fuerte (SCX) y C_8)[Isolute HXC-5]. 3 mL de muestra de orina previamente hidrolizada con β -glucuronidasa se ajustaba a pH 6, y se cargaba en el cartucho, incluyendo posteriormente una etapa de lavado con tampón fosfato y ácido acético. La elución se llevó a cabo con 3 mL de diclorometano/acetato de etilo y 1 mL de MeOH-NH₃ (4:1, v/v). Las fracciones se evaporan a sequedad y se reconstituyen con 50 μ L de metanol/ H₂O, 10 mMNH₄COOH (1:9, v/v).

Sobre el residuo acuoso final se llevaba a cabo una extracción líquido-líquido con 1,2-dicloroetano para la extracción de drogas de carácter ácido

Factor de preconcentración: 60:1

Detección: LC-MS/MS (ESI (+)) QQQ [Thermo TSQ Quantum]

Columna: C8, 33 mm x 2.1 mm, 3 μ m

Fases móviles: A (H₂O, 10 mMNH₄COOH); B (CH₃CN).

Tiempo: 10 min (+6 min re-equilibrado); Volumen de inyección: 5 μ L.

Recuperaciones: 40-80 %.

Límites de detección: Por debajo de 5 ng/mL en la mayoría de los casos

I. Introducción y Justificación

197 sustancias dopantes	<p>Dos etapas de extracción en fase sólida empleando dos cartuchos de modo mixto (intercambio catiónico [Isolute IST-HCX-5] e intercambio aniónico (HAX). 1 mL de muestra de orina previamente hidrolizada con β-glucuronidasa se ajustaba a pH 6, y se cargaba en el cartucho, incluyendo posteriormente una etapa de lavado con disolución diluida de ácido clorhídrico. La disolución desechada se trataba en el Segundo cartucho (HAX). La elución se llevó a cabo con 1 mL de MeOH y 1 mL de MeOH-NH₃ (98:2, v/v). Las fracciones eluidas de los dos cartuchos se combinaron, se evaporaron y se reconstituyeron con 150 μL de fases móviles A/B (1:9, v/v).</p> <p>Factor de preconcentración: 6.66.</p>	<p>Detección: LC-TOFMS (ESI (+/-) [Bruker MicroTOF] Columna: C18, 50 mm x 2.1 mm, 1.8 μm Fases móviles: A (H₂O, 0.1 % ácido fórmico/2.5 mM formiato amónico); B (90% acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico/2.5 mM formiato amónico) Tiempo: 8 minutos ; Volumen de inyección: 3 μL Recuperaciones: Promedio del 80 % (salvo chlorothiazide y ácido etacrínico alrededor del 10 %) Límites de detección: se cumplan los MRPLs en 197 de los 207 compuestos ensayados</p>	¹
56 sustancias dopantes	<p>Extracción en fase sólida empleando un cartucho Oasis MCX. 3 mL de orina (después de hidrólisis enzimática) eran cargados. La etapa de lavado se hace con 1 mL de ácido acético 1 M, y 3 mL de acetone/tampon acetato (pH 4.8). La elución se llevó a cabo con 3 mL de acetato de etilo con un 3 % de disolución amoniacal.</p>	<p>Detección: UPLC-TOFMS [Bruker MicroTOF] Columna: C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm Fases móviles: A (H₂O, 0.1 % ácido fórmico); B (acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico) Tiempo: 13 minutos; Volumen de inyección: 20 μL Recuperaciones: N/D Límites de detección: Todos los analitos se detectaron al nivel requerido except clenhexyl, procateterol y reproterol.</p>	¹
182 sustancias dopantes de diferentes familias	<p>Extracción en fase sólida empleando cartuchos de modo mixto (Plexa PCX). 1 mL de orina (tras hidrólisis enzimática) era cargada en el cartucho. Después se llevó a cabo una etapa de lavado con 1 mL de 2 % de ácido fórmico, 1 mL de agua y 1 mL de 20 % MeOH en agua. La etapa de elución se llevaba a cabo con 3 mL de MeOH:acetonitrilo (50:50, v/v) con un 3 % de hidróxido de amonio.</p>	<p>Detección: UPLC-HRMS (+/-) "all-ion mode" [Thermo Exactive Orbitrap MS] Columna: C18, 50 mm x 2.1 mm, 1.7 μm Fases móviles: A (H₂O, 0.3 % ácido fórmico); B (acetonitrilo, 0.3 % ácido fórmico) Tiempo: 10 minutos; Volumen de inyección: 10 μL Recuperaciones: N/D Límites de detección: por debajo de los MRPLs en todos los casos</p>	¹

Base de datos con 431 especies incluyendo drogas y sustancias dopantes	<p>Extracción en fase sólida empleando cartuchos de modo mixto (intercambio catiónico fuerte (SCX) y C₈)[Isolute HCX-5]. 1 mL de muestra de orina previamente hidrolizada con β-glucuronidasa se ajustaba a pH 6, y se cargaba en el cartucho, incluyendo posteriormente una etapa de lavado con 1 mL de tampon fosfato y 1 mL ácido acético 1 M. La elución de la fracción de compuestos ácidos se llevó a cabo con 3 mL de hexano/acetate de etilo. La fracción de compuestos básicos se eluye con 3 mL de acetate de etilo con 2 % de disolución de amoniaco Las fracciones juntas se evaporan a sequedad y se reconstituye con 150 µL de metanol/ H₂O, 0.1 % ácido fórmico (1:9, v/v). Factor de preconcentración: 6.66.</p>	<p>Detección: LC-TOFMS (ESI (+/-) In-source CID [Bruker MicroTOF] . Empleo de una base de datos con fragmentos con hasta 3 iones por analito para el 64.5 % de los compuestos con 3 fragmentos, 81.4 % con dos o tres fragmentos, 14.% con solo 1 fragmento y 3.7 % de los compuestos sin fragmentos. Columna: C18, 100 mm x 2 mm, 3 µm Fases móviles: A (H₂O, 0.1 % ácido fórmico/ 2 mM acetato de amonio); B (MeOH) Tiempo: 28 minutos; Volumen de inyección: 10 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: N/D.</p>
235 sustancias dopantes en orina de caballo	<p>Extracción en fase sólida empleando cartuchos C18. 5 mL de orina (tras hidrólisis enzimática) eran cargados en el cartucho SPE. Después, se lavaba con 3 mL de agua y 3 mL de hexane y finalmente los compuestos de interés se elúan con 3 mL de una mezcla diclorometanol/etanol (99:1, v/v). Después de evaporar a sequedad, el extracto se recomponía con 100 µL de una mezcla agua/acetronitrilo (80:20, v/v)</p>	<p>Detección: LC-HRMS (ESI(+/-) [Thermo Exactive Orbitrap]/ToXID software Columna: C18, 150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm Fases móviles: A (H₂O, 0.1 % ácido fórmico); B (acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico) Tiempo: 30 minutos; Volumen de inyección: 20 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: N/D (datos sólo para 20 compuestos)</p>
103 sustancias dopantes de diferentes familias (estimulantes, narcóticos, diuréticos, etc.)	<p>Extracción en fase sólida empleando cartuchos de modo mixto Oasis MCX (30 mg) para compuestos neutros o básicos y Oasis MAX para compuestos ácidos Para los primeros, una alícuota de orina (500 µL) era diluída con 0.5 M HCl era cargada en el cartucho de SPE previamente acondicionado. Después de una etapa de lavado con 1 mL de HCl 0.12 M la elución se llevaba a cabo con 250 µL de MeOH y 250 µL de metanol con 4 % de disolución amoniaca. Para los compuestos de tipo ácido, una alícuota de orina (500 µL) era diluída con 0.5 M HCl era cargada en el cartucho de SPE previamente acondicionado. Después de una etapa de lavado con 1 mL de disolución de amoniaco al 4 % y 250 µL de MeOH y 250 µL de metanol, la etapa de elución se llevaba a cabo con 250 µL de metanol con 2 % de ácido fórmico</p>	<p>Detección: UPLC-TOFMS (ESI (+/-) QQQ [Waters QTOF Premier] Columna: C18, 100 mm x 2.1 mm (1.7 µm). Fases móviles: A (H₂O, 0.1 % ácido fórmico); B (acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico) Tiempo: 4.5 minutos; Volumen de inyección: 5 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: N/D</p>

“Dilute and shoot” / Inyección directa tras dilución

34 diuréticos and 9 sustancias dopantes de distintas clases

Comparación de inyección directa (dilución) y extracción líquido-líquido (LLE)

LLE: 1 mL de orina + 1 mL tampón fosfato (pH 7) con 4 mL de acetato de etilo. Centrifugación y evaporación a casi sequedad (40 ° C). Redisolución en 200 µL de fase móvil A.

Factor de preconcentración: 5:1

Inyección directa: 1 mL de orina se centrifuga y se toman 10 µL que se diluyen con fase móvil y patrón interno (240 µL) (dilución: 1:25)

Detección: LC-MS/MS (ESI (+) QQQ [Thermo Quantum Discovery]

Columna: C18, 50 mm x 2.1 mm, 3.5 µm

Fases móviles: A (H₂O, 0.001 % ácido fórmico y 1mM acetato de amonio); B (metanol, 0.001 % ácido fórmico y 1mM acetato de amonio)

Tiempo: 9.6 minutos ; Volumen de inyección: 50 µL

Recuperaciones: N/D

Límites de detección: entre 10 y 62.5 ng/mL (excepto finasteride 1 ng/mL) para el método LLE. Entre 10 y 250 ng/mL para el método directo (cumplendo MRPLs),

Se estudiaron los efectos matriz en el método LLE y éstos variaban del -52 % (supresión) al +17 % de incremento de señal dependiendo de cada analito. Por lo que respecta a la inyección directa, los resultados fueron desastrosos. La supresión de señal eran de hasta el 91 % mientras que para compuestos ácidos o básicos se producían unas oscilaciones de los tiempos de retención muy notorias e inaceptables para la validación del método.

Cuando se llevaba a cabo la dilución 1:25, los efectos de supresión de señal eran menores, pero en algunos casos llegaban hasta el 85 % de supresión. La deriva de los tiempos de retención si que se resolvía con la dilución.

Es algo extraño que los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan mucho con los de Girón y *col* [Anal. Chim. Acta 721 (2012) 137-146] que reportan un resultados mucho más optimistas con valores de dilución menores a los ensayados en este trabajo. El hecho de que éste último estudio se haya llevado a cabo con diferente instrumentación (aunque empleando una fuente de ionización de la misma casa comercial) no ayuda a resolver estas diferencias anómalas. Como conclusion, la inyección directa con dilución es una aproximación con ventajas como la rapidez, sencillez, bajo cose y la escasa manipulación de muestra, lo que evita errores. Además, analitos muy hidrofílicos o con estructura zwitteriónica (ej. benzoylcgonina y ácido ratinílico) no se pierden. En cambio, los límites de detección son peores (al menos 25 veces) y además no hay ninguna etapa de eliminación de interferencias ni de preconcentración. La robustez del método no es satisfactoria salvo que se hagan diluciones de 1:25 en adelante, para así evitar las derivas de los tiempos de retención y minimizar los efectos drásticos de supresión de señal que se observan cuando no se diluye. Otro aspecto importante es la robustez del sistema en cuanto a sucidad de la fuente de ionización y columnas, que necesitan un mantenimiento más frecuente. Sólo en el caso de que se disponga de equipos de última generación y elevada sensibilidad se puede justificar el uso de esta estrategia.

130 sustancias prohibidas incluyendo estimulantes, cannabinoides y diuréticos	Dilución (1:2) e inyección directa de orina y adición de un patrón interno empleando un sistema automatizado de muestreo y dilución	<p>Detección: LC-MS/MS (ESI (+) QQQ [Micromass Quattro Premier] Columna: C18, 50 mm x 2.1 mm (1.7 µm). Fases móviles: A (H₂O, 10 mM % acetato de amonio); B (MeOH) Tiempo: 6 min + 1.5 min post-run; Volumen de inyección: 5 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: 1-50 ng/mL (se cumplen MRPLs) Se estudiaron los efectos matriz y estos iban de 50 % de supresión (hydrochlorothiazide) a 30 % de incremento de señal (benthiazide) debido a la matriz dependiendo de cada analito</p>
120 sustancias dopantes de diferentes familias	Inyección directa (dilución 1:2)	<p>Detección: UPLC-HRMS (+/-) [Thermo Exactive Orbitrap MS] Columna: C18, 50 mm x 2.1 mm, 1.8 µm Fases móviles: A (H₂O, 0.001 % ácido acético/1 mM de acetato de amonio); B (acetonitrilo, 0.001 % ácido acético/1 mM de acetato de amonio) Tiempo: 10 minutos; Volumen de inyección: 210 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: por debajo de los MRPLs en todos los casos. Valores de entre 25 y 250 ng/mL para los diuréticos y de 5-500 ng/mL para los estimulantes Efectos matriz relativamente bajos (56 % de supresión en el peor de los casos) para ser un método sin ninguna etapa de purificación de la muestra. Los resultados son diferentes a los descritos por Deventer y col JCA, 2009</p>
103 sustancias dopantes (estimulantes, narcóticos, diuréticos, etc)	Inyección directa (dilución 1:2) 500 µL de orina centrifugada previamente se diluían con 500 µL de agua milli-Q y se añadía el patrón interno.	<p>Detección: UPLC-TOFMS (ESI (+/-) QQQ [Waters QTOF Premier] Columna: C18, 100 mm x 2.1 mm (1.7 µm). Fases móviles: A (H₂O, 0.1 % ácido fórmico); B (acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico) Tiempo: 9 min (6 min + 3 post-run); Volumen de inyección: 10 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: 1-500 ng/mL Los efectos matriz observados oscilaron entre el 40 y el 80 % de supresión. En 52 de los 103 analitos, la supresión de señal era mayor del 40 %, y en 7 casos, era superior al 80 %. Los resultados por tanto no son consistentes con otros trabajos con el mismo factor de dilución empleando distinta instrumentación, lo que sugiere que el diseño de la fuente de ionización puede influir en el efecto matriz y en la robustez general del método. Se llevaron a cabo tres experimentos para la evaluación de los efectos matriz: dilución 1:2, 1:5 y 1:10. En el caso de la dilución 1:2, el 84 % de los compuestos presentaban efecto matriz. En la dilución 1:5, el 63 % presentaba efecto matriz pero ya había un 7 % de compuestos que no eran detectados al nivel MRPL requerido. Por último, con dilución 10:1, el 70 % presentaban efecto matriz y el 14 % no se detectaban al nivel requerido.</p>

I. Introducción y Justificación

63 sustancias dopantes (estimulantes, narcóticos, diuréticos, etc.)	Inyección directa (dilución 1:2)	Detección: LC-MS/MS (ESI (+/-) QQQ [AB Sciex 5500 QTRAP] Columna: C18, 50 mm x 2 mm, 3 µm Fases móviles: A (H ₂ O, 5 mM acetato de amonio/0.1 % ácido acético); B (acetonitrilo) Tiempo: 10.75 min; Volumen de inyección: 5 µL Recuperaciones: N/D Límites de detección: 1-70 ng/mL dextran: 30mg/ml, HES: 10mg/ml. No hay datos válidos de efectos matriz.	[1]
43 sustancias dopantes (32 ácidas y 11 neutras)	SPE-LC-MS/MS <i>on-line</i> Inyección directa de la muestra previa centrifugación y dilución 1:2. Se produce una etapa de SPE <i>on-line</i> en una columna SPE HLB (2.1 mm x 20 mm, 25 µm)	Detección: LC-MS/MS (ESI (+/-) QQQ [AB Sciex 4000 QTRAP] Columna: C18 monolítica, 100 mm x 4.6 mm Tiempo: 6 min; Volumen de inyección: 300 µL Límites de detección: 80 % de los compuestos ensayados se detectaban a 10 ng/mL.	[1]

I.8.3. Antecedentes: metodologías para el estudio del metabolismo de sustancias dopantes mediante espectrometría de masas

El metabolismo de los fármacos es un proceso complejo, que implica múltiples caminos enzimáticos que resultan en una variedad de metabolitos con concentraciones muy dispares.^[200] El conocimiento del metabolismo y excreción de agentes dopantes es de particular interés en el análisis antidopaje, donde la información relacionada con el tiempo en que un fármaco o sus metabolitos pueden ser detectados es esencial. El descubrimiento de nuevos metabolitos con larga persistencia en el organismo puede incrementar el análisis retrospectivo, y, por lo tanto, su inclusión en métodos de screening representa una valiosa contribución para los laboratorios de control antidopaje. Para ello, métodos exhaustivos capaces de abordar la identificación sistemática de metabolitos de una forma automática son de gran interés.

La cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC/MS) tiene un papel muy importante en la investigación del metabolismo. Varios reviews en literatura subrayan los principios y utilidades de diferentes espectrómetros de masas para la identificación de metabolitos^[201, 202]. En los laboratorios de control antidopaje modernos, el uso de LC/MS se ha convertido en obligado para cumplir con las necesidades de rapidez, robustez, sensibilidad y detección específica de los métodos de análisis antidopaje^[203]. Diferentes métodos de LC/MS basados en el uso de analizadores de trampa de iones, triple cuadrupolo, tiempo de vuelo u orbitrap se han usado para la detección en orina de diferentes sustancias prohibidas como corticosteroides, diuréticos o beta-bloqueantes^[204, 205].

Respecto al metabolismo de agentes dopantes, la técnica LC/MS se ha demostrado particularmente útil y versátil para la identificación y caracterización de productos metabólicos derivados de sustancias prohibidas. En particular, la cada vez mayor

disponibilidad de la espectrometría de masas de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (MS/MS o MSⁿ) proporcionan una valiosa información para ayudar a asignar estructuras a los posibles metabolitos.

El uso de espectrometría de masas de alta resolución en full scan genera una enorme cantidad de datos, ofreciendo la ventaja de permitir el análisis simultáneo de un número virtualmente ilimitado de analitos sin afectar a las prestaciones del método cuando se incrementa el número de analitos incluidos en el método. Las características de estos instrumentos encajan muy bien con los requerimientos de los estudios metabólicos. Sin embargo, a pesar de que el desarrollo de la instrumentación de espectrometría de masas de alta resolución ha mejorado la calidad de los procesos de identificación de metabolitos, el procesado e interpretación de los resultados aún es el principal cuello de botella en la identificación de metabolitos ^[206], siendo la experiencia y el conocimiento del investigador clave en la obtención de unos resultados de calidad. Dependiendo de la matriz, la enorme cantidad de datos puede incluso causar problemas en el paso de identificación de los compuestos que puede estar obstaculizado por interferencias de matriz.

Por esta razón se han propuesto diferentes estrategias de “data mining” para realizar el objetivo de buscar/filtrar los datos de masa exacta obtenidos mediante LC/MS para facilitar la detección de metabolitos ^[207, 208]. Entre ellos, las herramientas *in-silico* para la predicción/detección de metabolitos ^[209], el uso de modos de escaneo de iones precursores y pérdidas neutras de masa ^[210, 211], algoritmos de filtrado por patrones isotópicos ^[212], filtros de defectos de masa (MDF) ^[213, 214], y algoritmos de substracción del background tolerantes con cambios de tiempos de retención ^[214, 215, 216] han sido propuestos.

En este sentido, la necesidad del conocimiento previo del compuesto padre puede ser usado como un criterio válido para clasificar estas herramientas de “data

mining”. Mientras que por ejemplo, los experimentos de pérdida neutra de masa constante no requieren el conocimiento del compuesto padre, porque las pérdidas neutras esperadas son monitorizadas (p.e. la pérdida de 176Da de un glucurónido), en el caso de los experimentos de escaneo del ión precursor, el operador debe conocer el patrón de fragmentación del ión padre antes de realizar el experimento [217].

En esta tesis, una estrategia basada en el uso combinado de dos herramientas complementarias de “data mining” ha sido propuesta para el screening y la detección sistemática de metabolitos urinarios de agentes dopantes mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. La metodología propuesta está basada en la obtención de iones diagnóstico (información dependiente del compuesto) a partir de experimentos de fragmentación inducida por colisiones en la fuente (In source-CID) sin aislar el ión precursor, combinado con el uso de la extracción automática de variaciones de masa exacta correspondientes a biotransformaciones típicas (información no-dependiente del compuesto) que los xenobióticos pueden sufrir normalmente cuando se metabolizan. La metodología puede ser considerada como una exhaustiva aproximación “top-down/bottom-up” ya que la identificación de los metabolitos puede obtenerse de las variaciones de masa exacta a partir del compuesto padre inalterado (proximación “top-down”), mientras que el uso de iones diagnóstico (fragmentos comunes en una clase o familia de compuestos) puede ser usado también como marcador para la identificación de metabolitos (aproximación “bottom-up”) comenzando por el núcleo o “core” de la estructura del metabolito que puede ser común con la del compuesto padre.

Esta estrategia combinada se ha evaluado utilizando LC-TOFMS con un set de diez agentes dopantes representativos de diferentes clases de sustancias prohibidas después la administración a ratas de una única dosis terapéutica.

Referencias

- 1 Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua. <http://www.rae.es/rae.html> . ,
- 2 Consejo de Euroa, Primer coloquio Europeo de medicina deportiva sobre el dopaje, 1963. ,
- 3 Ley 65.412 del 1 de Junio de 1965 de la República Francesa sobre el Doping, 1965. ,
- 4 Comité de educación extraescolar del Consejo de Europa, 1963. ,
- 5 Consejo de Europa. Carta Europea contra el dopaje en el deporte, 1984. ,
- 6 Comité Olímpico Internacional (COI), 1986. ,
- 7 Consejo de Europa, 1. ,
- 8 Consejo Superior de Deportes. Comisión Nacional Antidopaje, 1992. ,
- 9 The World Anti-Doping Code. www.wada-ama.org. ,
- 10 Historia de la Agencia Mundial Antidopaje. www.wada-ama.org/en/About-WADA/History/WADA-History/. ,
- 11 The 2012 prohibited list. www.wada-ama.org. ,
- 12 Therapeutic use Exemptions. www.wada-ama.org. ,
- 13 Testing. www.wada-ama.org. ,
- 14 Laboratories. www.wada-ama.org. ,
- 15 Protection of Privacy and Personal Information. www.wada-ama.org. ,
- 16 Kickman, A. T. In *Doping in Sports* Thieme,D., P. Hemmersbach; Springer:2010; pp 40-42.

- 17 Mc Nutt, R.; Ferenchick, G.; Kirlin, P.; Hamlin, N. Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids; *Am J Cardiol.* **1988**, *62*, 164-165.
- 18 Luke, J.; Farb, A.; Virmani, R.; Sample, R. Sudden cardiac death during exercise in a weight-lifter using anabolic androgenic steroids: pathological and toxicological findings; *J Forensic Sci.* **1991**, *35*, 1441-1447.
- 19 Faenchick, G.; Adelman, S. Myocardial infarction associated with anabolic steroid use in a previously healthy 37-years-old weight lifter; *Am Heart J.* **1992**, *124*, 507-508.
- 20 Huie, M. An acute myocardial infarction occurring in an anabolic steroid user; *Med Sci Sports Exerc.* **1994**, *26*, 408-413.
- 21 Appleby, M.; Fisher, M.; Martin, M. Myocardial infarction, hyperkalemia, and ventricular tachycardia in a young male body-builder; *Int J Cardiol.* **1994**, *44*, 171-174.
- 22 Dickerman, R.; Schaller, F.; Prather, I.; McConathy, W. Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids; *Cardiology.* **1995**, *86*, 172-173.
- 23 Hausmann, R.; Hammer, S.; Betz, P. Performance enhancing drugs and sudden death - a case report and review of the literature; *Int J Legal Med.* **1998**, *111*, 261-264.
- 24 Madea, B.; Grellner, W. Long-term cardiovascular effects of anabolic steroids; *Lancet.* **1998**, *352*, 33-34.
- 25 Fineschi, V.; Baroldi, G.; Monciotti, F.; Paglicci, L.; Turillazzi, E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study; *Arch Pathol Lab Med.* **2001**, *125*, 253-255.
- 26 Wu, F. Endocrine aspects of anabolic steroids; *Clin Chem.* **1997**, *43* (7), 1289-1292.
- 27 Hartigens, F.; Kuipers, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes; *Sport Med.* **2004**, *34*, 513-554.
- 28 Korkia, P.; Stimson, G. V. Indications of prevalence, practice and effects of anabolic steroid use in Great Britain; *Int J Sports Med.* **1997**, *18*, 557-562.
- 29 Bahrke, M. S.; Yesalis, C. E.; Wright, J. E. Psychological and behavioural effects of endogenous testosterone and anabolic-androgenic steroids; *Sport Med.* **1996**, *22*, 367-390.

- 30 Middleman, A. M.; Faulkner, A. H.; Woods, E. R. High-risk behaviours among high school students in Massachusetts who use anabolic steroids; *Pediatrics*. **1995**, *96*, 268-272.
- 31 Jelkmann, W. **Biology of erythropoietin**; *Clin Invest*. **1994**, *72*, S3-S10.
- 32 Prather, I. D.; Brown, D. E.; North, P. M.; Wilson, J. R. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med Sci Sports Exerc*. **1995**, *27*, 1118-1121.
- 33 Kendall, M. J. and Haffner, C. A. In *The Role of Beta Receptor Agonist Therapy in Asthma Mortality* Beasley, R., N. E. Pearce; CRC:London, 1993; pp 163-199.
- 34 Bonnet, N.; Benhamou, C. L.; Beaupied, H.; Laroche, N.; Vico, L.; Dolleans, E.; Courteix, D. Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats; *J Appl Physiol*. **2007**, *102*, 1502-1509.
- 35 Bonnet, N.; Benhamou, C. L.; Brunet-Imbalut, B.; Arlettaz, A.; Horcajada, M. N.; Richard, O.; Vico, L.; Collomp, K.; Courteix, D. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats; *Bone*. **2005**, *37*, 622-633.
- 36 Malgor, L. A. and Valsecia, M. E. In *Farmacología Médica. Volumen 2, Capitulo 12* Malgor, L. A., M. E. Valsecia; pp 1-13.
- 37 Hickson Jr, J. F.; Johnson, T. E.; Lee, W.; Sidor, R. J. Nutrition and the precontest preparations of a male bodybuilder; *J Am Diet Assoc*. **1990**, *90*, 163-199.
- 38 Caldwell, J. E. Diuretic therapy and exercise performance; *Sports Med*. **1987**, *4*, 290-304.
- 39 Kaplan, N. M. Our appropriate concern about hypokalemia; *Am J Med*. **1984**, *77*, 1-4.
- 40 Claremont, A. D.; Costill, D. L.; Fink, W.; Van Handel, P. Heat tolerance following diuretic induced dehydration; *Med Sci Sports*. **1976**, *8*, 239-243.
- 41 Hong, R.; Matsumaya, E.; Nur, K. Cardiomyopathy associated with the smoking of crystal methamphetamine; *JAMA*. **1991**, *265*, 1152-1154.
- 42 Cregler, J.; Mark, H. Medical complications of cocaine abuse; *N Engl J Med*. **1986**, *315*, 1495-1500.

- 43 Lotsch, J.; Ditterich, W.; Hummel, T.; Kobal, G. Antinociceptive effects of the kappa-opioid-receptor agonist RP 60180 compared with pentazocine in an experimental human pain model; *Clin Neuropharmacol.* **1997**, *20*, 224-233.
- 44 Mather, L. E.; Meffin, P. J. Clinical pharmacokinetics of pethidine; *Clin Pharmacokinet.* **1978**, *3*, 352-368.
- 45 Walsh, S. L.; Preston, K. L.; Bigelow, G. E.; Stitzer, M. L. Accute administration of buprenorphine in humans: partial agonist and blockade effects; *J Pharmacol Exp Ther.* **1995**, *274*, 361-372.
- 46 Nagatomo, T.; Koike, K. Recent advances in structure, binding sites with ligands and pharmacological function of beta-adrenoceptors obtained by molecular biology and molecular modeling; *Life Sci.* **2000**, *66*, 2419-2426.
- 47 Van Baak, M. A. Beta-andrenoceptor blockade and exercise. An update; *Sports Med.* **1988**, *5*, 209-225.
- 48 Folleto de Control al Dopaje. www.wada-ama.org ,
- 49 Prokop, L. Zur Geschichte des Dopings und seiner Bekämpfung; *Sportarzt und Sportmedizin.* **1970**, *21*, 125-132.
- 50 Clarke, E. G. The doping of racehorses; *Med Leg J.* **1962**, *30*, 180-185.
- 51 Roeske, W. Alfons Bukowski (1858-1921); *Archiwum Historii Medycyny.* **1968**, *31*, 167-191.
- 52 Lander, G. D. The micro-detection of alkaloids; *Analyst.* **1930**, *55*, 474-476.
- 53 Prokop, L. The struggle against doping and its history; *J Sports Med Phys Fitness.* **1970**, *10*, 45-48.
- 54 Wildsorf, G.; Graf, G. Historische Aspekte zur Entwicklung der Dopingforschung beim pferd an der Veterinärmedizinischen Bildungsstätte in Berlin 1925-1945; *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.* **1998**, *111*, 222-227.
- 55 Addis-Smith, L. F. The changing pattern of doping in horse racing and its control; *New Zeal Vet J.* **1961**, *9*, 121-128.
- 56 Venerando, A. Doping: Pathology and ways to control it; *Med Sport.* **1963**, *3*, 972-983.

- 57 Donohoe, T. and Johnson, N. In *Foul Play-Drug Abuse in Sports* Anonymous ; Basil Blackwell:Oxford, 1986;
- 58 Kcasind, D. In *Doping und seine Wirkstoffe* Anonymous ; Spitta Verlag GmbH:Köls, 2004;
- 59 Deckert, W. Ein neues, leicht ausführbares Schnellverfahren zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen von Morphin in Harn, Blut und anderem biologischen Material; *Arch Exper Pathol Pharmacol*. **1936**, *180*, 656-671.
- 60 Richter, D. A color reaction for benzedrine; *Lancet*. **1938**, *234*, 1275.
- 61 Mc Nacly, W. D.; Bergman, W. L.; Polli, J. F. The quantitative determination of amphetamine; *J Lab Clin Med*. **1947**, *32*, 913-917.
- 62 Brodie, B. B.; Udenfried, S. The estimation of basic organic compounds and a technique for the appraisal of specificity; *J. Biol. Chem*. **1945**, *158*, 705-714.
- 63 Beyer, K. H.; Skinner, J. T. The detoxication and excretion of beta phenylisopropylamine (benzedrine); *J. Pharmacol. Exp. Therap*. **1940**, *68*, 419-432.
- 64 Schoen, K. A. A rapid and simple method for the determination of ephedrine; *J Americ Pharm Assoc*. **1944**, *33*, 116-118.
- 65 Keller, R. E.; Ellenbogen, W. C. The determination of d-amphetamine in body fluids; *J Pharmacol Exp Ther*. **1952**, *106*, 77-82.
- 66 Munier, R.; Machebouef, M. Microchromatographie de partage des alcaloides et de diverses bases azotees biologiques; *Bulletin De la Societe de Chemie Biologique*. **1949**, *31*, 1144-1162.
- 67 Munier, R.; Machebouef, M. Microchromatographie de partage sur papier des alcaloides et de diverses bases azotees biologiques.3. Exemples de separations de divers alcaloides par la technique en phase solvante acide (familles de laotropine, de la cocaine, de la nicotine, de la sparteine, de la strychnine et de la corynanthine); *Bulletin De la Societe de Chemie Biologique*. **1951**, *33*, 846-856.
- 68 Mannering, G. J.; Dixon, A. C.; Carroll, N. V.; Cope, O. B. Paper chromatography applied to the detection of opium alkaloids in urine and tissues; *J Lab Clin Med*. **1954**, *44*, 292-300.

- 69 Vidic, E. Eine Methode zur Identifizierung papierchromatographisch isolierter Arzneistoffe; *Archiv Für Toxikologie. Fuehner Wielands Sammlung von Vergiftungsfällen*. **1955**, 16, 63-73.
- 70 Pilsbury, V. B.; Jackson, J. V. Identification of the thiazide diuretic drugs; *J. Pharm Pharmacol*. **1966**, 18, 713-720.
- 71 Jatzkewitz, H. Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln um Harn; *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. **1953**, 292, 94-100.
- 72 Dole, V. P.; Kim, W. K.; Eglitis, I. Extraction of narcotic drugs, tranquilizers, and barbiturates by cation-exchange paper, and detection on a thin-layer chromatogram by a series of reagents; *Psychopharmacol Bull*. **1966**, 3, 45-48.
- 73 Mulle, S. J. Determination of narcotic analgesics in human biological materials; *Anal.Chem*. **1964**, 36, 1907-1914.
- 74 Debackere, M.; Laruelle, L. Isolation, detection and identification of some alkaloids or alkaloid-like substances in biological specimens from horses with special reference to doping; *J. Chromatogr*. **1968**, 35, 234-247.
- 75 Heaton, A. M.; Blumberg, A. G. Thin-layer chromatographic detection of barbiturates, narcotics, and amphetamines in urine of patients receiving psychotropic drugs; *J. Chromatogr*. **1969**, 41, 367-370.
- 76 Sohn, D.; Simon, J.; Hanna, M. A. The detection of thiazide diuretics in urine. Column extraction and thin-layer chromatography; *J. Chromatogr. B*. **1973**, 87, 570-575.
- 77 Yoshimura, H.; Oguri, K.; Tsukamoto, H. Detection of morphine in urine.II. An improved method by thin-layer chromatography utilizing potassium platinum iodine as the reagent for both coloration and fluorescence; *Chem Pharm Bull*. **1966**, 14, 1286-1290.
- 78 Heyndrickx, A.; De Leenheer, A. P. Toxicological analysis of weckamines (amphetamine, pervitin, preludin and ritalin) in pharmaceutical compounds and urine of persons suspected from doping; *J Pharm Belg*. **1967**, 22, 109-126.
- 79 Harms, D. R. Identification of morphine and codeine in the urine by thin-layer chromatography and ultraviolet spectrophotometry; *Am J Med Technol*. **1965**, 31, 1-8.

- 80 Kaistha, K. K.; Tadrus, R.; Janda, R. Simultaneous detection of a wide variety of commonly abused drugs in a urine screening program using thin-layer identification techniques; *J. Chromatogr.* **1975**, *107*, 359-379.
- 81 Lloyd, H. A.; Fales, H. M.; Highet, P. R. Separation of alkaloids by gas chromatography; *J Am Chem Soc.* **82**, 1960, 3791.
- 82 Parker, K. D.; Fontan, C. R.; Kirk, P. L. Separation and identification of some sympathomimetic amines by gas chromatography; *Anal. Chem.* **1962**, *34*, 1345-1346.
- 83 Parker, K. D.; Fontan, C. R.; Kirk, P. L. Rapid gas chromatographic method for screening of toxicological extracts for alkaloids, barbiturates, sympathomimetic amines and tranquilizers; *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 356-359.
- 84 Brochmann-Hanssen, E.; Svendsen, A. B. Gas chromatography of sympathomimetic amines; *J Pharm Sci.* **1962**, *51*, 393.
- 85 Brochmann-Hanssen, E.; Svendsen, A. B. Gas chromatography of sympathomimetic amines by gas liquid chromatography; *J Pharm Sci.* **1962**, *51*, 938-941.
- 86 Donike, M. N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten amide; *J. Chromatogr.* **1969**, *42*, 103-104.
- 87 Hemmersbach, P. History of mass spectrometry at the Olympic Games; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 839-853.
- 88 Müller, R. K. Chromatographic techniques-The basis of doping control; *J. Chromatogr. B.* **1995**, *674*, 1-11.
- 89 Harraez-Hernández, R.; Campins-Falcó, P.; Sevillano-Cabeza, A. Estimation of diuretic drugs in biological fluids by HPLC; *Chromatographia.* **1992**, *33*, 177-185.
- 90 Ventura, R.; Nadal, T.; Alcalde, P.; Pascual, J. A.; Segura, J. Fast screening method for diuretics, probenecid and other compounds of doping interest; *J. Chromatogr. A.* **1991**, *655*, 233-242.
- 91 Ventura, R.; Segura, J. Detection of diuretic agents in doping control; *J. Chromatogr. B.* **1996**, *687*, 127-144.

- 92 Dye, D.; East, T.; Bayne, W. F. High-performance liquid chromatographic method for post-column, in-line derivatization with o-phthalaldehyde and fluorometric detection of phenylpropanolamine in human urine; *J. Chromatogr. A.* **1984**, *284*, 457-461.
- 93 Farrel, B. M.; Jefferies, T. M. An investigation of high-performance liquid chromatographic method for the analysis of amphetamines; *J. Chromatogr.* **1983**, *272*, 111-128.
- 94 Salais, K.; Nielen, M. W.; Brinkman, U. A.; Frei, R. W. Screening of amphetamines by gradient microbore liquid chromatography and precolumn technology; *J. Chromatogr.* **1987**, *393*, 57-68.
- 95 Hayakawa, K.; Hasegawa, K.; Imaizumi, N.; Wong, O. S.; Miyazaki, M. Determination of amphetamine-related compounds by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence and fluorescence detections; *J. Chromatogr. A.* **1989**, *464*, 343-352.
- 96 Frischkorn, C. G.; Frischkorn, H. E. Investigations of anabolic drug abuse in athletic and cattle feed. II. Specific determination of methandienone (Dianabol) in urine in nanogram amounts; *J. Chromatogr.* **1978**, *151*, 331-338.
- 97 Heftmann, E.; Hunter, I. R. High pressure liquid chromatography of steroids; *J. Chromatogr.* **1979**, *165*, 283-299.
- 98 Fitzpatrick, F. A.; Siggia, S. High-resolution liquid chromatography of derivatized non-ultraviolet absorbing hydroxysteroids; *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 2310-2314.
- 99 Siggia, S.; Dishman, R. A. Analysis of steroid hormones using high resolution liquid chromatography; *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 1223-1229.
- 100 Kawasaki, T.; Maeda, M.; Tsuji, A. Determination of 17-oxosteroid glucuronides and sulfates in urine and serum by fluorescence high-performance liquid chromatography using dansyl hydrazine as a prelabeling reagent; *J. Chromatogr.* **1982**, *233*, 61-68.
- 101 Canalis, E.; Reardon, G. E.; Caldarella, A. M. A more specific, liquid chromatographic method for free cortisol in urine; *Clin Chem.* **1982**, *28*, 2418-2420.
- 102 Jane, I.; Taylor, J. F. Characterisation and quantitation of morphine in urine using high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection; *J. Chromatogr.* **1975**, *109*, 37-42.

- 103 Duggin, G. G. Phenacetin estimation from biological samples by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr.* **1976**, *121*, 156-160.
- 104 Jefferies, T. M.; Thomas, W. O.; Partfitt, R. T. Determination of ketoprofen in plasma and urine by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr.* **1979**, *162*, 122-124.
- 105 Yalow, R. S.; Berson, S. A. Radiobiology: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods; *Nature.* **1959**, *184*, 1648-1649.
- 106 Yalow, R. S.; Berson, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man; *J Clin Invest.* **1960**, *39*, 1157-1175.
- 107 Samols, E.; Ryder, J. A. Studies on tissue uptake of insulin in man using a differential immunoassay for endogenous and exogenous insulin; *J Clin Invest.* **1961**, *40*, 2092-2102.
- 108 Yalow, R. S.; Glick, S. M.; Roth, J.; Berson, S. A. Radioimmunoassay of human plasma; *J Clin Endocr Metab.* **1964**, *24*, 1219-1225.
- 109 Felber, J. P.; Aubert, M. L. Radioimmunoassay for plasma ACTH; *Horm Metab Res.* **1971**, *3*, 73-77.
- 110 Ehrlich, R. M.; Randle, P. J. Immunoassay of growth hormone in human serum; *Lancet.* **1961**, *2*, 73-77.
- 111 Utiger, R. D.; Parker, M. L.; Daughaday, W. H. Studies on human growth hormone. I. A radio-immunoassay for human growth hormone; *J Clin Invest.* **1962**, *41*, 254-261.
- 112 Li, C. H.; Moudgal, N. R.; Papkoff, H. Immunochemical investigations of human pituitary growth hormone; *J Biol Chem.* **1960**, *235*, 1038-1042.
- 113 Brody, S.; Carlstroem, G. Human chorionic gonadotropin in abnormal pregnancy. Serum and urinary findings using various immunoassay techniques; *Acta Obstet Gyn Scan.* **1965**, *44*, 32-44.
- 114 Benuzzi-Badoni, M.; Lemarchand-Beraud, T.; Gómez-Vuilleumier, J.; Aubert, M. L.; Felber, J. P. A quick radioimmunoassay for plasma HCG and LH determination with preliminary results; *Helv Med Acta.* **1971**, *25*, 490-503.

- 115 Rizkallah, T.; Taymor, M. L.; Park, M.; Batt, R. An immunoassay method for human luteinizing hormone of pituitary origin; *J Clin Endocr Metab.* **1965**, *25*, 943-948.
- 116 Thomas, K.; Ferin, J. A new rapid radioimmunoassay for HCG (LH, ICSH) in plasma using dioxan; *J Clin Endocr Metab.* **1968**, *28*, 1667-1670.
- 117 Birgegard, G.; Miller, O.; Caro, J.; Erslev, A. Serum erythropoietin levels by radioimmunoassay in polycythaemia; *Scan J Haematol.* **1982**, *29*, 161-167.
- 118 Stenman, U. H.; Unkila-Kallio, L.; Korhonen, J.; Alfthan, H. Immunoprocudures for detecting human chorionic gonadotropin: Clinical aspects and doping control; *Clin Chem.* **1997**, *43*, 1293-1298.
- 119 Delbeke, F. T.; Van Eenoo, P.; De Backer, P. Detection of human chorionic gonadotrophin misuse in sports; *Int J Sports Med.* **1998**, *19*, 287-290.
- 120 De Boer, D.; De Jong, E. G.; Van Rossum, J. M.; Maes, R. A. Doping control of testosterone and human chorionica gonadotrophin: A case study; *Int J Sports Med.* **1991**, *12*, 46-51.
- 121 Wu, Z.; Bidlingmaier, M.; Dall, R.; Strasburger, C. J. Detection of doping with human growth hormone; *Lancet.* **1999**, *353*, 895.
- 122 Bidlingmaier, M.; Strasburger, C. J. Technology insight: detecting growth hormone abuse in athletes. *Nature Clinical Practice; Endocrinol Metab.* **2007**, *3*, 769-777.
- 123 Bidlingmaier, M.; Wu, Z.; Strasburger, C. Problems with GH doping in sports; *J Endocrinol Inv.* **2003**, *26*, 924-931.
- 124 Holt, R. I.; Sonksen, P. H. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport; *Brit J Pharmacol.* **2008**, *154*, 542-556.
- 125 Healy, M. L.; Dall, R.; Gibeny, J. Toward the development of a test for growth hormone (GH) abuse: A study of extreme physiological ranges of GH-dependent markers in 813 elite athletes in the postcompetition setting; *J Clin Endocr Metab.* **2005**, *90*, 641-649.
- 126 Lasne, F.; Martin, L.; Crepin, N.; De Ceaurriz, J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones; *Anal Biochem.* **2002**, *311*, 119-126.

- 127 Lasne, F.; De Ceaurriz, J. Recombinant erythropoietin in urine; *Nature*. **2000**, *405*, 635.
- 128 Lasne, F.; Thioulouse, J.; Martin, L.; de Ceaurriz, J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: Interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis; *Electrophoresis*. **2007**, *28*, 1875-1881.
- 129 Segura, J.; Pascual, J. A.; Gutiérrez-Gallego, R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 1521-1529.
- 130 Perry, R.; Graham Cooks, R. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications; *Mass Spec Rev.* **2008**, *27*, 661-669.
- 131 Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: high-performance technique of mass analysis; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156-1162.
- 132 Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. The orbitrap: a new mass spectrometer; *J Mass Spec.* **2005**, *40*, 430-443.
- 133 Gohlke, R. S. Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography; *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 535-541.
- 134 Beckett, A. H.; Tucker, G. T.; Moffat, A. C. Routine detection and identification in urine of stimulants and other drugs, some of which may be used to modify performance in sport; *J Pharm Pharmacol.* **1967**, *19*, 273-294.
- 135 Anggard, E.; Hankey, A. Derivatives of sympathomimetic amines for gaschromatography with electron capture detection and mass spectrometry; *Acta Chem Scand.* **1969**, *23*, 3110-3119.
- 136 Donike, M. N-Trifluoracetyl-O-trimethylsilylphenolalkylamine-Darstellung und massenspezifischer gaschromatographischer Nachweis; *J. Chromatogr.* **1975**, *103*, 91-112.
- 137 Donike, M. Zum problema des Nachweises der anabolen Steroide: Gaschromatographische und massenspezifische Möglichkeiten; *Sportarzt und Sportmedizin.* **1975**, *26*, 1-6.

- 138 Ward, R. J.; Shackleton, C. H.; Lawson, A. M. Gas chromatographic-mass spectrometric methods for the detection and identification of anabolic steroid drugs; *Br. J. Sport Med.* **1975**, *9*, 93-97.
- 139 De Rose, E. H. Doping in athletes-an update; *Clin Sport Med.* **2008**, *27*, 8-9.
- 140 Park, J. Doping test report of 10th Asian Games in Seoul; *J Sport Med Phys Fit.* **1991**, *31*, 303-317.
- 141 Schänzer, W.; Delahaut, P.; Geyer, H.; Machnik, M.; Horning, S. Long-term detection and identification of metandienone and stanozolol abuse in athletes by gas chromatography-high resolution mass spectrometry; *J. Chromatogr. B.* **1996**, *687*, 93-108.
- 142 Becchi, M.; Aguilera, R.; Fraizon, Y. Gas chromatography/combustión/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 304-308.
- 143 Shackleton, C. H.; Philips, A.; Chang, T.; Li, Y. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstenediols; *Steroids.* **1997**, *62*, 379-387.
- 144 Aguilera, R.; Becchi, M.; Casabianca, H.; Hatton, C. K.; Catlin, D. H.; Starcevic, B.; Pope Jr., H. G. Improved method detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids; *J Mass Spec.* **1996**, *31*, 161-176.
- 145 Thevis, M.; Opfermann, G.; Schänzer, W. Detection of the plasma volumen expander hydroxyethyl starch in human urine; *J. Chromatogr. B.* **2000**, *744*, 345-350.
- 146 Thevis, M.; Opfermann, G.; Schänzer, W. Mass Spectrometry of partially methylated alditol acetates derived from hydroxyethyl starch; *J Mass Spec.* **2000**, *35*, 77-84.
- 147 Guddat, S.; Thevis, M.; Thomas, A.; Schänzer, W. Rapid screening of polysaccharide-based plasma volumen expanders dextran andhydroxyethyl starch in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Biomed. Chromatogr.* **2008**, *22*, 695-701.
- 148 Deventer, K.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. Detection of hydroxyethylstarch (HES) in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. B.* **2006**, *834*, 217-220.

- 149 Gutiérrez-Gallego, R.; Segura, J. Rapid screening of plasma volumen expanders in urine using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1324-1330.
- 150 Bowers, L. D. and Fregien, K. In *Recent Advances in Doping Analysis* Donike, M., H: Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, S. Rauth; Cologne, 1993; pp 175-184.
- 151 Thevis, M.; Ogorzalek-Loo, R. R.; Loo, J. A.; Schänzer, W. Doping control analysis of bovine hemoglobin-based oxygen therapeutics in human plasma by LC-Electrospray ionization-MS/MS; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3287-3293.
- 152 Thevis, M.; Thomas, A.; Schänzer, W. Current role of LC-MS(/MS) in doping control; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 405-420.
- 153 Thevis, M.; Schanzer, W. **Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays**; *Mass Spec Rev.* **2007**, *26*, 79-107.
- 154 Pozo, O. J.; Van Eenoo, P.; Deventer, K.; Delbeke, F. T. **Ionization of anabolic steroids by adduct formation in liquid chromatography electrospray mass spectrometry**; *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 497-516.
- 155 Schanzer, W.; Donike, M. **Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites** ; *Anal Chim Acta.* **1993**, *275*, 23-48.
- 156 Anonymous WADA., *Technical Document TD 2004MRPL version 1.0, Minimum required performance limits for detection of prohibited substances*; http://wada-ama.org/rtcontent/document/perf_limits_2.pdf .
- 157 Maurer, H. H. **Hyphenated mass spectrometric techniques—indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control**; *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1399-1413.
- 158 Dehenin, L.; Bonnaire, Y.; Plou, P. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas-chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. B.* **1999**, *721*, 301-307.
- 159 Jiménez, C.; Ventura, R.; Segura, J. **Detection in urine of efaproxiral (RSR13), a potential doping agent, by a routine screening procedure based on methylation followed by gas chromatography/mass spectrometry**; *Anal Chim Acta.* **2004**, *505*, 227-229.

- 160 Marcos, J.; De la Torre, X.; González, J. C.; Segura, J.; Pascual, J. A. **Liquid chromatography clean-up method to improve identification of anabolic agents in human urine by gas chromatography–mass spectrometry**; *Anal Chim Acta*. **2004**, *522*, 79-88.
- 161 Mateus-Avis, L.; Mangin, P.; Saugy, M. **Use of ion trap gas chromatography–multiple mass spectrometry for the detection and confirmation of 3'hydroxystanozolol at trace levels in urine for doping control**; *J. Chromatogr. B*. **2005**, *816*, 193-201.
- 162 Catlin, D. H.; Sekera, M. H.; Ahrens, B. D.; Starcevic, B.; Chang, Y. C.; Hatton, C. K. **Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine**; *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2004**, *18*, 1245-1249.
- 163 Van de Kerkhof, D. H.; Van Ooijen, R. D.; De Boer, R.; Fokkens, R. H.; Nibbering, N. M.; Zwikker, J. W.; Thijssen, J. H.; Maes, R. A. **Artifact formation due to ethyl thio-incorporation into silylated steroid structures as determined in doping analysis**; *J. Chromatogr. A*. **2002**, *954*, 199-206.
- 164 Van Poucke, C.; Detavernier, C.; Van Cauwenberghe, R.; Van Peteghem, C. **Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography–tandem mass spectrometry** ; *Anal Chim Acta*. **2007**, *586*, 35-42.
- 165 Fluri, K.; Rivier, L.; Dienes-Nagy, A.; You, C.; Maître, A.; Schweizer, C.; Saugy, M.; Mangin, P. **Method for confirmation of synthetic corticosteroids in doping urine samples by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry**; *J. Chromatogr. A*. **2001**, *926*, 87-95.
- 166 Guan, F.; Uboh, C.; Soma, L.; Hess, A.; Luo, Y.; Tsang, D. S. **Sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of beclomethasone dipropionate and its metabolites in equine plasma and urine**; *J. Mass Spectrom*. **2003**, *38*, 823-838.
- 167 Leinonen, A.; Kuurane, T.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. **Screening of free 17-alkyl-substituted anabolic steroids** in human urine by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry; *Steroids*. **2004**, *69*, 101-109.
- 168 Deventer, K.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. **Screening for anabolic steroids in doping analysis by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry**; *Biomed. Chromatogr*. **2006**, *20*, 429-433.

- 169 Ho, E. N.; Leung, D. K.; Wan, T. S.; Yu, N. H. **Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry**; *J. Chromatogr. A*. **2006**, *1120*, 38-53.
- 170 Anonymous *Commission of the European Communities (2002) Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.* ,
- 171 Mezcuca, M.; Malato, O.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A. R. **Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry**; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 913-929.
- 172 Touber, M. E.; Van Engelen, M. C.; Georgakopoulos, C.; Van Rhijn, J. A.; Nielen, M. W. **Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry**; *Anal Chim Acta*. **2006**, *586*, 137-146.
- 173 Nielen, M. W.; Bovee, T. F.; Van Engelen, M. C.; Rutgers, P.; Hamers, A. R.; Van Rhijn, J. H.; Hoogenboom, L. R. **Urine testing for designer steroids by liquid chromatography with androgen bioassay detection and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry identification**; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 424-431.
- 174 Kolmonen, M.; Leinonen, A.; Pelander, A.; Ojampera, I. **A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry**; *Anal Chim Acta*. **2007**, *585*, 94-102.
- 175 Thevis, M. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing- Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*, Wiley ed.; 2010.
- 176 Thevis, M.; Thomas, A.; Schanzer, W. **Current role of LC-MS(/MS) in doping control**; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 405-420.
- 177 Thieme, D.; Grosse, J.; Lang, R.; Müller, R. K.; Wahl, A. **Screening, confirmation and quantitation of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry**; *J. Chromatogr. B*. **2001**, *757*, 49-57.

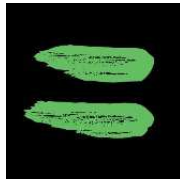
- 178 Thevis, M.; Fermann, G.; Schanzer, W. **High speed determination of beta-receptor blocking agents in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry**; *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 393-402.
- 179 Thevis, M.; Thomas, A.; Pop, V.; Schänzer, W. Ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations; *J. Chromatogr. A.* **2013**, *1292*, 38-50.
- 180 Ventura, R.; Roig, M.; Monfort, N.; Sáez, P.; Berfés, R.; Segura, J. High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents; *Eur.J.Mass Spectrom.* **2008**, *14*, 191-200.
- 181 Mazzarino, M.; Botrè, F. A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2439-2446.
- 182 Georgakopoulos, C. G.; Vonaparti, A.; Stamou, M.; Kiouisi, P.; Lyris, E.; Angelis, Y. S.; Tsoupras, G.; Wuest, B.; Nielen, M. W.; Panderi, I.; Koupparis, M. Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2439-2446.
- 183 Virus, E. D.; Sobolevsky, T. G.; Rodchenkov, G. M. Introduction of HPLC/Orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 949-957.
- 184 Vonaparti, A.; Lyris, E.; Angelis, Y. S.; Panderi, I.; Koupparis, M.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Peters, R. J.; Nielen, M. W.; Georgakopoulos, C. G. Preventive doping control screening analysis of prohibited substances in human urine using rapid-resolution liquid chromatography/high resolution time-of-flight mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 1595-1609.
- 185 Mazzarino, M.; Franco, I.; De la Torre, R.; Botré, F. Screening and confirmation analysis of stimulants, narcotics and beta-androgenic agents in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry; *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 8156-8167.
- 186 Kolmonen, M.; Leinonen, A.; Pelander, A.; Ojampera, I. A general screening method for doping agents in human urine by solid-phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry; *Anal Chim Acta.* **2007**, *585*, 94-102.

- 187 Ho, E. N.; Leung, D. K.; Wan, T. S.; Yu, N. H. Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1120*, 38-53.
- 188 Kolmonen, M.; Leinonen, A.; Kuurane, T.; Pelander, A.; Ojampera, I. Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for high-throughput screening in doping analysis; *Drug Test. Anal.* **2009**, *1*, 250-266.
- 189 Peters, R. J.; Oosterink, J. E.; Stolker, A. A.; Georgakopoulos, C. G. Generic sample preparation combined with high-resolution liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for unification of urine screening in doping-control laboratories; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 2583-2598.
- 190 Musenga, A.; Cowan, D. A. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control; *J. Chromatogr. A.* **2013**, *1288*, 82-95.
- 191 De Castro, A.; Gergov, M.; Ostman, P.; Ojampera, I. Combined drug screening and confirmation by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry with reverse database search; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1265-1278.
- 192 Moulard, Y.; Bailly-Chouriberry, L.; Boyer, S.; García, P.; Popot, M. A.; Bonnaire, Y. Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control; *Anal Chim Acta.* **2011**, *700*, 126-136.
- 193 Badoud, F.; Grata, E.; Perrenoud, L.; Saugy, M.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis; *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 4109-4119.
- 194 Deventer, K.; Pozo, O. J.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison between liquid-liquid extraction and direct injection; *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216*, 5819-5827.
- 195 Thorngren, J. O.; Östervall, F.; Garle, M. A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 980-992.

- 196 Jiménez-Girón, A.; Devenker, K.; Roels, K.; Van Eenoo, P. Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC-HRMS for doping control; *Anal Chim Acta*. **2012**, *721*, 137-146.
- 197 Badoud, F.; Grata, E.; Perrenoud, L.; Avois, L.; Saug, M.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry I. Screening analysis; *J. Chromatogr. A*. **2009**, *1216*, 4423-4433.
- 198 Guddat, S.; Solymons, E.; Orlovius, A.; Thomas, A.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Thevis, M.; Schanzer, W. High-throughput screening for various classes of doping agents using a new "dilute-and-shoot" liquid chromatography tandem mass spectrometry multi-target approach; *Drug Test. Anal.* **2011**, *3*, 836-850.
- 199 Stanley, S. M.; Wee, W. K.; Lim, B. H.; Foo, H. C. Direct-injection screening for acidic drugs in plasma and neutral drugs in equine urine by differential gradient LC-LC coupled MS/MS; *J. Chromatogr. B*. **2007**, *848*, 292-302.
- 200 Clarke, N. J.; Rindgen, D.; Korfmacher, W. A.; Cox, K. A. Systematic LC/MS metabolite identification in drug Discovery; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 431A-439A.
- 201 Prasad, B.; Garg, A.; Takwani, H.; Singh, S. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry; *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 360-387.
- 202 Ma, S.; Chowdhury, S. K. Analytical strategies for assessment of human metabolites in preclinical safety testing; *Anal. Chem.* **2011**,
- 203 Thevis, M.; Thomas, A.; Schänzer, W. Current role of LC-MS(/MS) in doping control; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 405-420.
- 204 Thevis, M.; Schänzer, W. Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays; *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 79-107.
- 205 Pozo, O. J.; Van Eenoo, D., K.; Delbeke, F. T. Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS; *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 657-671.
- 206 Zhu, M.; Zhang, H.; Humphreys, W. G. Drug Metabolite Profiling and Identification by high resolution mass spectrometry; *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 25419-25425.

- 207 Peters, R. J. B.; Stolker, A. A. M.; Mol, H. G. J.; Lommen, A.; Lyris, E.; Angelis, Y.; Vonaparti, A.; Stamou, M.; Georgakopoulos, C.; Nielen, M. W. F. Screening in veterinary drug analysis and Sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry; *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1250-1268.
- 208 Lommen, A. **MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing**; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3079-3086.
- 209 Peters, R. J. B.; van Engelen, M. C.; Touber, M. E.; Georgakopoulos, C.; Nielen, M. W. F. **Searching for in silico predicted metabolites and designer modifications of (cortico)steroids in urine by high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry**; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2329-2337.
- 210 Pozo, O. J.; Van Thuyne, W.; Deventer, K.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. **Elucidation of urinary metabolites of fluoxymesterone by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry**; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 394-408.
- 211 Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Kuuranne, T.; Auriola, S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies; *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 357-372.
- 212 Zhu, P.; Tong, W.; Alton, K.; Chowdhury, S. An accurate-Mass-Based Spectral-Averaging Isotope-Pattern-Filtering Algorithm for Extraction of Drug Metabolites Possessing a Distinct Isotope Pattern from LC-MS Data; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5910-5917.
- 213 Zhang, H.; Zhang, D.; Ray, K. A software filter to remove interference ions from drug metabolites in accurate mass liquid chromatography/mass spectrometric analyses; *J. Mass Spectrom.* , *38*, 1110-1112.
- 214 Zhang, H.; Yang, Y. An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application for detection of glutathione-trapped reactive metabolites; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1181-1190.
- 215 Zhang, H.; Ma, L.; He, K.; M. Zhu, M. An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application to the detection of troglitazone metabolites in rat plasma, bile, and urine; *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1191-1200.

- 216 Zhu, P.; Ding, W.; Tong, W.; Ghosal, A.; Alton, K.; Chowdhury, S. A retention-time-shift-tolerant background subtraction and noise reduction algorithm (BgS-NoRA) for extraction of drug metabolites in liquid chromatography/mass spectrometry data from biological matrices; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1563-1572.
- 217 Pozo, O. J.; Deventer, K.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. Efficient Approach for the Comprehensive Detection of Unknown Anabolic Steroids and Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1709-1720.



OBJETIVOS

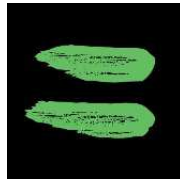
II. OBJETIVOS

La necesidad de mejorar la metodologías actuales de análisis de sustancias dopantes (tanto las conocidas como las nuevas que se emplean que todavía no se han detectado ni caracterizado) hace necesario el uso de técnicas de detección basadas en espectrometría de masas avanzada. El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la potencialidad de la técnica LC-TOFMS para la mejora e innovación de los métodos de detección empleados en control antidopaje. Se pueden distinguir tres objetivos principales en esta tesis doctoral:

a) Ampliar el conocimiento que existe actualmente en el desarrollo de métodos multi-clase para un amplio número de sustancias dopantes estudiando en detalle la idoneidad de diferentes métodos de tratamiento de muestra para el análisis mediante LC-MS.

b) Evaluar el potencial de la técnica LC-TOFMS para el análisis de sustancias dopantes conocidas incluidas en las listas oficiales, a través de una base de datos (de pares de tiempo de retención/ medidas de masa exacta) para su *screening* y confirmación en orina.

c) Establecer nuevas estrategias analíticas basadas en el acoplamiento LC-TOFMS para la identificación de sustancias dopantes no conocidas o no incluidas en las listas oficiales mediante el uso de LC-TOFMS y estrategias basadas en el empleo de iones diagnóstico así como en los cambios de masa exacta originadas por modificaciones (biotransformaciones) del metabolismo de fase I y fase II típico de fármacos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Comparative evaluation of seven different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by liquid chromatography–mass spectrometry



Juan C. Domínguez-Romero, Juan F. García-Reyes, Antonio Molina-Díaz*

Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2014

Received in revised form 26 July 2014

Accepted 29 July 2014

Available online 4 August 2014

Keywords:

Liquid chromatography

Mass spectrometry

Sport drug testing

Sample treatment

Solid-phase extraction

ABSTRACT

Sample preparation is a critical step in large-scale multiclass analysis such as sport drug testing. Due to the wide heterogeneity of the analytes and the complexity of the matrix, the selection of a correct sample preparation method is essential, looking for a compromise between good recoveries for most of the analytes and cleanliness of the extract. In the present work, seven sample preparation procedures based on solid-phase extraction (SPE) (with 5 different cartridges), liquid–liquid extraction (LLE) and sorbent-supported liquid extraction (SLE) were evaluated for multiclass sport drug testing in urine. The selected SPE sorbents were polymeric cartridges Agilent PLEXA™ and Oasis HLB™, mixed mode cation and anion exchange cartridges Oasis MAX™ and MCX™, and C18 cartridges. LLE was performed using *tert*-butyl methyl ether and SLE was carried out using Agilent Chem Elut™ cartridges. To evaluate the proposed extraction procedures, a list of 189 compounds were selected as representative from different groups of doping agents, including 34 steroids, 14 glucocorticosteroids, 24 diuretics and masking agents, 11 stimulants, 9 beta-agonist, 16 beta-blockers, 6 Selective Estrogen Receptors Modulators (SERMs), 24 narcotics and 22 other drugs of abuse/sport drugs. Blank urine samples were spiked at two levels of concentration, 2.5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ and extracted with the different extraction protocols ($n=6$). The analysis of the extracts was carried out by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. The use of solid-phase extraction with polymer cartridges provided high recoveries for most of the analytes tested and was found the more suitable method for this type of application given the additional advantages such as low sample and solvent consumption along with increased automation and throughput.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

III.1. Estudio comparativo de distintos métodos de tratamiento de muestra para el análisis de sustancias dopantes en orina mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas

III.1.1. Resumen

La etapa de tratamiento de muestra en el desarrollo de métodos de control antidopaje es muy importante y compleja debido al gran número de sustancias y su heterogeneidad. Los analitos a determinar presentan gran variedad de propiedades físico-químicas por lo que el mecanismo de extracción propuesto debe ser genérico (poco selectivo). Además, teniendo en cuenta que el análisis se suele llevar a cabo mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS), hay que tener en cuenta otros factores -aparte de la eficiencia de la extracción- como la limpieza de los extractos y los posibles efectos matriz principalmente de supresión de señal debido a la presencia de matriz en el extracto final.

En este capítulo, se ha llevado a cabo un estudio comparativo de siete métodos de tratamiento de muestra para análisis multi-categoría de sustancias dopantes en orina. Los métodos estudiados incluyen la extracción en fase sólida (con 5 tipos de cartucho diferentes: poliméricos mixtos hidrofóbicos/hidrofílicos (tipo HLB y PLEXA), C₁₈, mixtos catiónicos (MCX) y mixtos-aniónicos (MAX)), extracción líquido-líquido empleando metil-terc-butil éter, y extracción líquida asistida por un sorbente (*sorbent supported liquid extraction*) empleando cartuchos ChemElut®. Para examinar los tratamientos de muestra, un total de 189 compuestos representativos de diferentes clases de agentes dopantes fueron seleccionados, incluyendo 34 esteroides, 14 glucocorticoides, 24 diuréticos y agentes enmascarantes, 11 estimulantes, 9 β -agonistas, 16 β -bloqueantes, 6 Moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs), 24 narcóticos y otras 22 sustancias de

diferentes categorías. Las muestras de orina ensayadas se fortificaron a dos niveles de concentración ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $25 \mu\text{g L}^{-1}$) y se realizaron 6 réplicas para cada uno de los tratamientos y niveles de concentración. La determinación de las sustancias dopantes para el cálculo de las recuperaciones se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS). De todos los tratamientos de muestra ensayados, los dos que empleaban cartuchos poliméricos genéricos de tipo hidrofóbico/lipofílico (Oasis HLB[®] y PLEXA[®]) proporcionaron resultados muy satisfactorios para prácticamente todos los compuestos estudiados. Sólo, se obtuvieron resultados por debajo de 30 % de recuperación en algunos compuestos muy polares, que presentaban baja retención en este tipo de cartuchos. Por el contrario, el resto de métodos empleados (extracción líquido-líquido y/o líquida asistida por sorbentes, y mediante cartuchos apolares (C_{18}) o de tipo principalmente aniónico y catiónico), el porcentaje de compuestos recuperados era proporcionalmente mucho mas bajo. Por otra parte tanto la limpieza de los extractos como los efectos matriz (menores al 30 % en la mayoría de los casos) mostrados por estos métodos SPE seleccionados era adecuada para análisis mediante LC-MS, teniendo en cuenta el factor de preconcentración empleado (4:1).

Introduction

Sample preparation is a critical step that must be carefully studied in large-scale multiclass analysis such as sport drug testing, which is usually associated with liquid chromatography mass spectrometry-based determination ^[1]. The wide heterogeneity of the analytes (in terms of polarity, pKa or size) and the complexity of the matrices, makes the sample preparation step critical. It is essential to obtain a compromise between good recoveries for most of the analytes and cleanliness of the extract. In the case of doping analysis in urine, the sample preparation methods can be grouped into 3 basic methodologies: liquid-liquid extraction (LLE) with different solvents, solid-phase extraction (SPE) using different classes of sorbents, and “dilute-and-shoot” methods ^[2-19].

LLE has been widely used for the analysis of sport drugs in urine, using different extraction solvents as tert-butyl methyl ether ^[2-4] or diethyl ether ^[5-10]. This extraction protocols produce clean extracts, but have the inconvenience of the limited number of compounds that are easily extractable, since many of the doping drugs have polar groups in their structure, so this extraction procedure is normally used for the analysis of small group of compounds, specially steroids ^[6,7,9], corticosteroids ^[4,5] or β 2-agonists and β -blockers ^[2,3], although some authors have developed multi-class screening methods using LLE ^[8,10].

Dilute-and-shoot methods are based on the dilution of the urine sample with an appropriate solvent, reducing the matrix effect ^[16-19]. This technique has the advantage of the fast and cheap sample preparation, without the use of solid sorbents or expensive solvents, but has some drawbacks such as reduced analyte detectability (because increase of limits of detection due to the dilution factor – and thus the absence of preconcentration step-, and also due to remarkable matrix effects if the dilution factor is too low), retention time shifts which reduce identification capabilities and also peak shape ^[16]. The dilution fold varies between

1:1^[11-13,17,19] -usually involving higher matrix effects-, to 1:10^[14,18] or even 1:25^[15,16], in order to reduce matrix effects. Most of the dilute-and-shoot methods that work nicely are intended for easily ionisable substances for which the required detection levels in urine are high^[16].

SPE presents certain advantages versus LLE, as the use of a lower volume of more environmentally friendly solvents, the ease of automation and the commercial availability of different sorbents for general or certain applications. Mixed mode cartridges have been widely used for urine analysis^[20-24] since they have a polymeric or C18 sorbent, which is also bonded with ion exchange groups, thus provide a dual retention mechanism. C18 cartridges are used for high throughput methods^[25] due to their ease of use because their non-polar retention mechanism, but are not recommended for polar compounds because recovery rates are low for these compounds. This is solved when using polymeric cartridges, that are filled with a polymeric sorbent with a reverse-phase retention mechanism designed for neutral, basic and acidic analytes, obtaining good recoveries for compounds from different groups and even glucuronide-conjugated metabolites^[26-28]. Marchi et al. made a comparative study of different extraction procedures with polymeric and mixed-mode ion exchange cartridges^[29], but limited to a group of 34 multiclass sport drugs in urine.

The aim of the present work is evaluate the suitability, usefulness and performance of seven different extraction protocols based on SPE (with different sorbents), LLE and solid-supported liquid extraction (SLE) for large-scale multiclass sport drug testing in urine. The efficiency of the different extraction procedures in terms of recovery/extraction efficiency and accuracy was tested for up to 189 doping agents, which were selected as representative from different groups including 34 steroids and related metabolites, 14 glucocorticosteroids and related metabolites, 24 diuretics and masking agents, 11 stimulants and related metabolites, 9 beta-agonists, 16 beta-blockers, 6 Selective Estrogen Receptors

Modulators (SERMs), 24 narcotics, cannabinoids and metabolites, and 22 related multiclass drugs of abuse/sport drugs.

Experimental

Chemicals and reagents

HPLC grade acetonitrile, methanol and methyl tert-butyl ether (MTBE) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Drug analytical standards of the 189 species included in the study were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX), Dr. Ehrenstorfer (Madrid, Spain), European Pharmacopeia, National Measurement Institute (Australia) and Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Individual stock solutions were prepared in methanol and were stored at -18°C. Formic acid, hydrochloric acid, ammonium hydroxide, sodium acetate, acetic acid, sodium chloride and sodium hydroxide were purchased from Fluka (Madrid, Spain). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA) was used throughout the study to obtain the HPLC water used during the analyses and to prepare all the solutions.

Bond Elut PLEXA™ SPE cartridges (200 mg, 6 mL) and Chem-Elut™ SLE cartridges (6 mL, unbuffered) were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Oasis HLB® (200 mg, 6 mL), Oasis MAX™ (150 mg, 6 mL) and Oasis MCX™ (150 mg, 6 mL) SPE cartridges were acquired from Waters (Millford, MA). Discovery DSC-18™ SPE cartridges (500 mg, 6 mL) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA). A Supelco (Bellefonte, PA) Visiprep™ SPE vacuum system was used for SPE experiments and a TurboVap LV nitrogen evaporator from Zymark (Hopkinton, MA) was used for solvent evaporation.

LC-TOFMS analysis

The separation of the analytes from the urine extract was carried out using an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system (consisting of vacuum degasser, auto sampler and a binary pump) (Agilent Infinity 1290, Agilent

Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a reversed-phase XDB-C18 rapid resolution analytical column of 4.6 mm x 50 mm and 1.8 μm particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). 20 μL of the extract were injected in each run. Mobile phases A and B were water with 0.1% formic acid and acetonitrile. The chromatographic method held the initial mobile phase composition (10% B) constant for 3 min, followed by a linear gradient to 100% B up to 15 min and kept for 3 min at 100% B. The flow rate used was 0.5 mL min⁻¹. The UHPLC system was connected to a time-of-flight mass spectrometer Agilent 6220 accurate mass TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an electrospray interface operating either in positive or negative ion mode, using the following operation parameters: capillary voltage, 4000 V; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas flow rate, 9.0 L min⁻¹; gas temperature, 325 °C; skimmer voltage, 65 V; octapole 1 rf, 250 V; fragmentor voltage (in-source CID fragmentation) 190V. Although the use of fast polarity switching mode is enabled in this type of instrumentation, a dedicated run was performed in each ionization mode. LC-MS accurate mass spectra were recorded across the range of m/z 50-1000 in positive ion mode, and m/z 50-1100 in negative ion mode. The instrument performed an internal calibration using the reference mixture provided by the manufacturer over the range 50-1100 m/z using a second sprayer with a reference solution containing the masses purine (m/z 121.0509) and hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine (HP-921) (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, m/z 922.0098). The instrument was operated in the 4GHz-high-resolution mode, providing a typical resolution of ca. 19000 at m/z 922. The full scan data were recorded with Agilent Mass Hunter Data Acquisition software (version B.04.00) and processed with Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.04.00). The details of the identification parameters used for the 189 species (elemental composition, accurate mass, ionization mode and retention time) are detailed in **Table 1**.

Sample preparation procedures

SPE Bond Elut PLbEXA polymeric cartridges

The cartridges were preconditioned with 4 mL of MeOH/MeCN (1:1) and 4 mL of HPLC grade MilliQ water. After the conditioning step, 2 mL of spiked urine buffered with 2 mL of formic acid/formate (50 mM) at pH 2.6 were passed through the SPE cartridge. 4 mL of 5% MeOH in MilliQ water were then added to rinse the cartridge prior to elution. The cartridges were dried under vacuum in order to remove the excess of water. The analytes were finally eluted with 4 mL of MeOH/MeCN (1:1 (v/v)). The extracts were evaporated to near dryness using a Turbo Vap LV from Zymark (Hopkinton, MA), with a water bath temperature of 37 °C and a N₂ pressure of 15 psi. The samples were then taken up with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) (preconcentration factor: 4:1). The reconstituted extracts were filtered through a 0.45µm syringe filter and then transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analysis.

SPE Oasis HLB and SPE Discovery DSC-18 cartridges

4 mL of MeOH and 4 mL of HPLC grade MilliQ water were added to the cartridges for conditioning. After the conditioning step, 2 mL of spiked urine buffered with 2 mL of formic acid/formate (50 mM) at pH 2.6, were passed through the SPE cartridge. The cartridges were then rinsed with 4 mL of 5% MeOH in MilliQ water and dried under vacuum. The analytes were eluted with 4 mL of MeOH. The extracts were evaporated to near dryness and taken up with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) (preconcentration factor: 4:1). The reconstituted extracts were filtered through a 0.45µm syringe filter and then transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analysis.

SPE Oasis MCX mixed mode cartridges

The cartridges were conditioned with 4 mL of MeOH and 4 mL of HPLC grade MilliQ water. 2 mL of spiked urine were diluted (1:1 (v/v)) with 2 mL of 5 % of 0.1M HCl aqueous solution, and loaded into the cartridge. After sample loading, the cartridges were rinsed with 4 mL of 5% 0.1M HCl. The cartridges were dried under vacuum, and the analytes were eluted with 4 mL of MeOH for neutral compounds and 4mL of 5% NH₄OH in MeOH for acidic compounds. The extracts were evaporated to near dryness and taken up with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) (preconcentration factor: 4:1). The reconstituted extracts were filtered through a 0.45µm syringe filter and then transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analysis.

SPE Oasis MAX mixed mode cartridges

The cartridges were conditioned with 4 mL of MeOH and 4 mL of HPLC grade MilliQ water and then 2 mL of spiked urine were diluted (1:1 (v/v)) with 2 mL of 50 mM pH 7 sodium acetate buffer, and passed through the SPE cartridge. The cartridges were washed with 4 mL of sodium acetate buffer 50mM pH 7 with 5% MeOH and then dried under vacuum in order to remove the excess water. Finally the analytes were eluted with 4 mL of MeOH for neutral compounds and 4mL of 2% formic acid in MeOH for acidic compounds. The extracts were evaporated to near dryness and taken up with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) (preconcentration factor: 4:1). The reconstituted extracts were filtered through a 0.45µm syringe filter and then transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analysis.

LLE with MTBE

To a volume of 2 mL of urine were added 2 g of NaCl as salting out agent and 5 mL of MTBE. The samples were shaken for 10 min, and then centrifuged for 5 min. The

organic layer was transferred into a test-tube and then evaporated until near dryness. The samples were then reconstituted with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) to achieve a preconcentration of 4:1; the reconstituted extracts were filtered through a 0.45 μ m syringe filter and then transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analysis.

SLE Chem Elut cartridges

2 mL of urine were placed onto the cartridges, after 3-5 minutes the aqueous sample is absorbed onto the solid support. The analytes were then extracted twice with 6 mL of tert-butyl methyl ether and evaporated until near dryness. The samples were then reconstituted with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) to achieve a preconcentration of 4:1; the reconstituted extracts were filtered through a 0.45 μ m syringe filter and then transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analysis.

Recovery studies

A pool of drug-free urine samples were checked for the presence of any of the 189 sport drugs tested. Six replicates of spiked urine samples were applied to measure extraction recovery and method repeatability. Extraction recovery was determined by analysing samples spiked before and after SPE (or LLE) extraction at two concentration levels (2.5 and 25 μ g L⁻¹). The results were obtained by comparing mean values of peak areas of analytes. Spiking after the extraction process corresponded to 100% recovery. Peaks with S/N ratio of ca 10:1 (below limit of quantitation) or lower were not considered, and constituted 0 % recovery. Repeatability of the methods tested was expressed as relative standard deviations (RSD (%)) of the peak areas. In the case of endogenous species such as testosterone, the peak area of the blank (non spiked urine) was considered (subtracted) to calculate the recovery rates.

Results and discussion

To evaluate the efficiency of the seven proposed extraction procedures, recovery studies of the selected 189 multiclass sport drugs were carried out at two concentration levels (2.5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$) using the LC-TOFMS method described, except in the case of butabarbital, Δ^9 -THC, hexobarbital, octopamine, phenobarbital and picrotin (with 25 and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$) and picrotoxinin (with 250 and 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$). The compounds were selected from different groups of banned substances included in the WADA list, these compounds were 9 β 2-agonists, 16 β -blockers, 24 diuretics and masking agents, 14 glucocorticosteroids and metabolites, 24 narcotics, cannabinoids and metabolites, 6 SERMs and estrogen agonists, 34 steroids and metabolites, 41 stimulants and metabolites, and 22 multiclass drugs. Identification data of all the compounds included in the study are presented in **Table 1**. Recovery values obtained for all analytes with the seven proposed extraction protocol are shown in **Table 3** (concentration level 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) and **Table 4** (concentration level 25 $\mu\text{g L}^{-1}$). The preconcentration factor (4:1) used was kept constant in all procedures. The overall summary of the results obtained with each procedure is included in **Table 2**. Since the aim of the work was focussed on comparing the extraction performance of different approaches for large-scale multiclass screening of sport drugs, the enzymatic hydrolysis step -which is a widely used and accepted procedure mandatory for the detection of several species which are massively metabolized- was not included in any of the approaches tested as it only release and convert phase II metabolites into their parent before the final extraction. The goal was not to develop, optimize and validate a single method, but to examine in detail and provide a view of the extraction coverage and effectiveness of different sample preparation approaches.

Table 1. Identification of the 189 studied sport drugs using liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry

Compound	Compound Class	Elemental composition	Exact mass	Retention time (min)	Detected ion	Theoretical <i>m/z</i>
16-β -Hydroxyfurazabol	Steroid	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₃	346.2256	13.23	C ₂₀ H ₂₉ N ₂ O ₂ ⁺	329.2224
17,17-Dimethyl-18-Androsta-1,4,13(14)-Trien-3-one	Steroid	C ₂₀ H ₂₆ O	282.1984	17.59	[M+H] ⁺	283.2056
17-α -Ethinyl estradiol	Estrogen agonist	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.1776	12.33	[M+H] ⁺	297.1849
17-α -Methyltestosterone	Steroid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.2246	12.62	[M+H] ⁺	303.2319
17- α -Hydroxyprogesterone	Steroid	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.2195	12.80	[M+H] ⁺	331.2268
17-Epioxandrolone (Oxandrolone Metabolite)	Steroid	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	306.2195	12.89	C ₁₉ H ₂₉ O ₂ ⁺	289.2162
19-Noretiocholanone	Steroid	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276.2089	13.00	C ₁₈ H ₂₇ O ⁺	259.2056
2-Aminoheptane	Stimulant	C ₇ H ₁₇ N	115.1361	6.93	[M+H] ⁺	116.1434
2-Hydroxymethyl-17α-methylandrosta-1,4-diene-11α,17β-diol-3-one (Formebolone Metabolite)	Steroid	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346.2144	9.35	[M+H] ⁺	347.2217
2α-Hydroxymethylethisterone	Steroid	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	342.2195	11.48	[M+H] ⁺	343.2268
2α-methyl-5α-andriostan-3α-ol-17-one (Drostanolone Metabolite)	Steroid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.2402	15.04	C ₂₀ H ₃₁ O ⁺	287.2369
4-Androsten-3,17-Dione	Steroid	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.1933	12.78	[M+H] ⁺	287.2006
4-Chloro-4-Androsten-3α-ol-17-one (Clostebol Metabolite)	Steroid	C ₁₉ H ₂₇ ClO ₂	322.1700	13.93	[M+H] ⁺	323.1772
4-Hydroxyandrostendione (Formestane)	Steroid	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302.1882	13.06	[M+H] ⁺	303.1955
4-Hydroxytestosterone	Steroid	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	304.2038	12.33	[M+H] ⁺	305.2111
Acebutolol	β-blocker	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄	336.2049	7.97	[M+H] ⁺	337.2122
Acepromazine	Narcotic	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ OS	326.1453	9.95	[M+H] ⁺	327.1526
Acetazolamide	Diuretic	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂	221.9881	3.58	C ₂ H ₅ N ₄ O ₂ S ₂ ⁺	180.9848

Acetylmorphine	Narcotic	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.1471	6.00	[M+H] ⁺	328.1543
α-Zearalanol	Estrogen agonist	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	322.1780	11.79	[M+H] ⁺	323.1853
Alprenolol	β-blocker	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	249.1729	9.43	[M+H] ⁺	250.1802
Althiazide	Diuretic	C ₁₁ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ S ₃	382.9835	10.91	[M+H] ⁺	383.9908
Altrenogest	Steroid	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310.1933	13.11	[M+H] ⁺	311.2006
Amcinonide	Glucocorticosteroid	C ₂₈ H ₃₅ FO ₇	502.2367	14.03	[M+H] ⁺	503.2440
Aminoglutethimide	Aromatase Inhibitor	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	232.1212	3.95	[M+H] ⁺	233.1285
Amphetamine	Stimulant	C ₉ H ₁₃ N	135.1048	3.75	C ₇ H ₇ ⁺	91.0542
Anastrozole	Aromatase Inhibitor	C ₁₇ H ₁₉ N ₅	293.1640	11.03	[M+H] ⁺	294.1713
Androsterone	Steroid	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.2246	13.84	C ₁₉ H ₁₉ O ⁺	273.2213
Atenolol	β-blocker	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266.1330	1.78	[M+H] ⁺	267.1703
Bambuterol	β ₂ -agonist	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₅	367.2107	8.62	[M+H] ⁺	368.2180
Beclomethasone	Glucocorticosteroid	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅	408.1704	10.93	[M+H] ⁺	409.1776
Bendroflumethiazide	Diuretic	C ₁₅ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	421.0378	11.84	[M+H] ⁺	422.0451
Benthiazide	Diuretic	C ₁₅ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ S ₃	430.9835	11.36	[M-H] ⁻	429.9771
Benzoyllecgonine (Cocaine Metabolite)	Stimulant	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289.1314	7.69	[M+H] ⁺	290.1387
B-Estradiol	Estrogen agonist	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.1776	11.85	C ₁₈ H ₂₃ O ⁺	255.1743
Betaxolol	β-blocker	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	307.2147	9.47	[M+H] ⁺	308.2220
Bis(4-Cyanophenyl)Methanol	Letrozole Metabolite (Aromatase Inhibitor)	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O	234.0793	11.46	[M+H] ⁺	235.0866
Bisoprolol	β-blocker	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	325.2253	8.94	[M+H] ⁺	326.2326
Boldenone	Steroid	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.1933	11.48	[M+H] ⁺	287.2006
Boldine	Broncodilatador	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.1471	7.22	[M+H] ⁺	328.1543
Brucine	Stimulant	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	394.1893	7.47	[M+H] ⁺	395.1965

Bumetanide	Diuretic	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	364.1093	12.23	[M+H] ⁺	365.1166
Bupropion	Stimulant	C ₁₃ H ₁₈ ClNO	239.1077	8.90	C ₉ H ₁₁ ClNO ⁺	184.0524
Butabarbital (25 and 250 µg/L)	Narcotic	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃	212.1161	9.84	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃ ⁺	157.0608
Cannabidiol	Cannabinoid	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	16.11	[M+H] ⁺	315.2319
Canrenone	Aldosterone Antagonist (Masking Agent)	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	340.2038	13.02	[M+H] ⁺	341.2111
Capsaicin	Analgesic	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	305.1991	12.92	[M+H] ⁺	306.2064
Carphedone	Stimulant	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218.1055	8.49	C ₁₁ H ₁₂ NO ⁺	174.0913
Carvedilol	β-blocker	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	406.1893	10.20	[M+H] ⁺	407.1965
Celecoxib	Anti-inflammatory	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ SO ₂	381.0759	13.85	[M+H] ⁺	382.0832
Celiprolol	β-blocker	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	379.2471	8.55	[M+H] ⁺	380.2544
Chlorothiazide	Diuretic	C ₇ H ₆ ClN ₃ O ₄ S ₂	294.9488	4.75	[M-H] ⁻	295.9562
Clenbuterol	Anabolic agent	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	276.0796	8.14	[M+H] ⁺	277.0869
Cloпамide	Diuretic	C ₁₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₃ S	345.0914	9.37	[M+H] ⁺	346.0987
Clostebol Acetate	Steroid	C ₂₁ H ₂₉ ClO ₃	364.1805	16.06	[M+H] ⁺	365.1878
Cocaethylene (Cocaine Metabolite)	Stimulant	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	317.1627	9.19	[M+H] ⁺	318.1700
Cocaine	Stimulant	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303.1471	8.59	[M+H] ⁺	304.1543
Codeine	Narcotic	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.1521	3.13	[M+H] ⁺	300.1594
Cotinine	Stimulant	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176.0950	1.37	[M+H] ⁺	177.1022
Cyclofenil	SERM	C ₂₃ H ₂₄ O ₄	364.1675	16.33	[M+H] ⁺	365.1747
Cyclothiazide	Diuretic	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₄ S ₂	389.0271	11.50	[M+H] ⁺	390.0344
Danazol	Steroid	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	337.2042	14.35	[M+H] ⁺	338.2115
Δ ⁹ -THC (25 and 250 µg/L)	Cannabinoid	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	17.47	[M+H] ⁺	315.2319
Dexamethasone	Glucocorticosteroid	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.1999	10.72	[M+H] ⁺	393.2072

Diethylnicotinamide (Nikethamide)	Stimulant	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	178.1106	4.23	[M+H] ⁺	179.1179
Dimethylphenethylamine	Stimulant	C ₁₀ H ₁₅ N	149.1204	5.22	C ₇ H ₇ ⁺	91.0542
Doxapram	Stimulant	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₂	378.2307	8.93	[M+H] ⁺	379.2380
EDDP (Methadone Metabolite)	Narcotic	C ₂₀ H ₂₄ N	278.1909	10.16	[M] ⁺	278.1909
Ephedrine	Stimulant	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.1154	2.79	C ₁₀ H ₁₄ N ⁺	148.1121
Epitestosterone	Steroid	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.2089	12.76	[M+H] ⁺	289.2162
Eplerenone	Diuretic	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.2042	10.87	[M+H] ⁺	415.2115
Esmolol	β-blocker	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄	295.1784	8.57	[M+H] ⁺	296.1856
Ethacrinic Acid	Diuretic	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	302.0113	12.77	[M+H] ⁺	303.0185
Ethiocholanone (Testosterone Metabolite)	Steroid	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.2246	13.56	[M+H] ⁺	291.2319
Ethisterone	Steroid	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312.2089	12.70	[M+H] ⁺	313.2162
Ethylamphetamine	Stimulant	C ₁₁ H ₁₇ N	163.1361	6.99	C ₇ H ₇ ⁺	91.0542
Ethylmorphine	Narcotic	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	313.1678	6.95	[M+H] ⁺	314.1751
Famprofazone	Stimulant	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O	377.2467	10.21	[M+H] ⁺	378.2540
Fenbutrazate	Stimulant	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	367.2147	11.01	[M+H] ⁺	368.2225
Fenfluramine	Stimulant	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	231.1235	9.21	[M+H] ⁺	232.1308
Fenspiride	α-Adrenergic blocker (Bronchodilator)	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	260.1525	4.83	[M+H] ⁺	261.1598
Fentanyl	Narcotic	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	336.2202	9.60	[M+H] ⁺	337.2274
Finasteride	Steroid	C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₂	372.2777	12.28	[M+H] ⁺	373.2850
Flumethasone	Glucocorticosteroid	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	410.1905	10.79	[M+H] ⁺	411.1978
Flunisolide	Glucocorticosteroid	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	434.2105	11.19	[M+H] ⁺	435.2177
Fluocinolone Acetonide	Glucocorticosteroid	C ₂₄ H ₃₀ F ₂ O ₆	452.2010	11.30	[M+H] ⁺	453.2083
Fluorometholone	Glucocorticosteroid	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	376.2050	11.54	[M+H] ⁺	377.2123

Fluoxymestorone	Steroid	C ₂₀ H ₂₉ FO ₃	336.2101	10.90	[M+H] ⁺	337.2173
Flurandrenolide	Glucocorticosteroid	C ₂₄ H ₃₃ FO ₆	436.2261	11.32	[M+H] ⁺	437.2334
Fluticasone Propionate	Glucocorticosteroid	C ₂₅ H ₃₁ F ₃ O ₅ S	500.1844	14.07	[M+H] ⁺	501.1917
Formoterol	β ₂ -agonist	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	344.1736	8.28	[M+H] ⁺	345.1809
Furosemide	Diuretic	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	330.0077	10.74	[M-H] ⁻	329.0004
Gestrinone	Steroid	C ₂₁ H ₂₄ O ₂	308.1776	12.54	[M+H] ⁺	309.1849
Glibenclamide	Antidiabetic	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	493.1438	13.35	[M+H] ⁺	494.1511
Glipizide	Antidiabetic	C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S	445.1784	11.46	[M+H] ⁺	446.1857
Heptaminol	Stimulant	C ₈ H ₁₉ NO	145.1467	1.53	[M+H] ⁺	146.1539
Heroin	Narcotic	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	369.1576	8.39	[M+H] ⁺	370.1649
Hexobarbital (25 and 250 µg/L)	Narcotic	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236.1161	10.91	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃ ⁺	157.0608
Hydrochlorothiazide	Diuretic	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	296.9645	5.73	[M-H] ⁻	295.9572
Hydrocortisone (Cortisol Metabolite)	Glucocorticosteroid	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.2093	9.98	[M+H] ⁺	363.2166
Hydroflumethiazide	Diuretic	C ₈ H ₈ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	330.9908	8.49	[M-H] ⁻	329.9836
Hydromorphone	Narcotic	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.1365	1.94	[M+H] ⁺	286.1438
Ibuprofen	Anti-inflammatory	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.1307	13.69	C ₁₂ H ₁₇ ⁺	161.1325
Indapamide	Diuretic	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S	365.0601	11.20	[M+H] ⁺	366.0674
Isoetharine	β ₂ -agonist	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239.1521	1.85	[M+H] ⁺	240.1594
Ketamine	Stimulant	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	237.0920	7.48	[M+H] ⁺	238.0993
Labetalol	β-blocker	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	328.1787	9.02	[M+H] ⁺	329.1860
Letrozole	Aromatase Inhibit.	C ₁₇ H ₁₁ N ₅	285.1014	11.13	C ₁₅ H ₉ N ₂ ⁺	217.0760
Lidocaine	Anesthetic	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	234.1732	7.10	[M+H] ⁺	235.1805
LSD	Narcotic	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	323.1998	8.86	[M+H] ⁺	324.2070
MDA	Stimulant	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179.0946	5.85	C ₁₀ H ₁₁ O ₂ ⁺	163.0754

MDEA	Stimulant	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	207.1259	7.43	C ₁₀ H ₁₁ O ₂ ⁺	163.0754
MDMA	Stimulant	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.1103	6.26	C ₁₀ H ₁₁ O ₂ ⁺	163.0754
Medroxyprogesterone	Steroid	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	344.2351	13.55	[M+H] ⁺	345.2424
Mefenorex	Stimulant	C ₁₂ H ₁₈ CIN	211.1128	8.70	[M+H] ⁺	212.1201
Meloxicam	Anti-inflammatory	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	351.0347	12.39	[M+H] ⁺	352.0420
Meperidine	Narcotic	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	247.1572	8.67	[M+H] ⁺	248.1645
Mesterolone	Steroid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.2402	13.57	[M+H] ⁺	305.2475
Metaproterenol (Orciprenaline)	β ₂ -agonist	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	211.1208	1.37	[M+H] ⁺	212.1281
Methadone	Narcotic	C ₂₁ H ₂₇ NO	309.2093	10.58	[M+H] ⁺	310.2165
Methamphetamine	Stimulant	C ₁₀ H ₁₅ N	149.1204	5.89	[M+H] ⁺	150.1277
Methandienone	Steroid	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300.2089	11.90	[M+H] ⁺	301.2162
Methoxyphenamine	Stimulant	C ₁₁ H ₁₇ NO	179.1310	7.53	[M+H] ⁺	180.1383
Methylephedrine	Stimulant	C ₁₁ H ₁₇ NO	179.1310	3.28	[M+H] ⁺	180.1383
Methylphenidate	Stimulant	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	233.1416	8.18	[M+H] ⁺	234.1489
Metricrane	Diuretic	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄ S ₂	275.0286	8.36	[M+H] ⁺	276.0359
Metolazone	Diuretic	C ₁₆ H ₁₆ CIN ₃ O ₃ S	365.0601	10.68	[M+H] ⁺	366.0674
Metoprolol	β-blocker	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267.1834	8.11	[M+H] ⁺	268.1907
Morphine	Narcotic	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.1365	1.50	[M+H] ⁺	286.1438
Nadolol	β-blocker	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	309.1940	6.39	[M+H] ⁺	310.2013
Nandrolone (19-Nortestosterone)	Steroid	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	274.1933	11.71	[M+H] ⁺	275.2006
Nateglinide	Antidiabetic	C ₁₉ H ₂₇ NO ₃	317.1991	13.45	[M+H] ⁺	318.2064
N-Desmethylselegiline (Selegiline Metabol.)	Stimulant	C ₁₂ H ₁₅ N	173.1204	7.29	C ₇ H ₇ ⁺	91.0542
Nicotine	Stimulant	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	162.1157	1.36	[M+H] ⁺	163.1230
Norcocaine (Cocaine Metabolite)	Stimulant	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289.1314	8.73	[M+H] ⁺	290.1387

Norcodeine (Codeine Metabolite)	Narcotic	$C_{17}H_{19}NO_3$	285.1365	2.76	$[M+H]^+$	286.1438
Norethandrolone	Steroid	$C_{20}H_{30}O_2$	302.2246	13.38	$[M+H]^+$	303.2319
Norethindrone	Steroid	$C_{20}H_{26}O_2$	298.1933	12.28	$[M+H]^+$	299.2006
Norfenfluramine (Fenfluramine Metabolite)	Stimulant	$C_{10}H_{12}F_3N$	203.0922	8.73	$C_8H_6F_3^+$	159.0416
Norfentanyl (Fentanyl Metabolite)	Narcotic	$C_{14}H_{20}N_2O$	232.1576	7.58	$[M+H]^+$	233.1648
Norgestrel	Steroid	$C_{21}H_{28}O_2$	312.2089	13.20	$[M+H]^+$	313.2162
Normorphine (Morphine Metabolite)	Narcotic	$C_{16}H_{17}NO_3$	271.1208	1.38	$[M+H]^+$	272.1281
Noroxycodone	Narcotic	$C_{17}H_{19}NO_4$	301.1314	4.10	$[M+H]^+$	302.1387
Octopamine (25 and 250 $\mu\text{g/L}$)	Stimulant	$C_8H_{11}NO_2$	153.0790	1.02	$C_8H_{10}NO^+$	136.0757
Oxilofrine	Stimulant	$C_{10}H_{15}NO_2$	181.1103	1.37	$[M+H]^+$	182.1176
Oxycodone	Narcotic	$C_{18}H_{21}NO_4$	315.1471	4.46	$[M+H]^+$	316.1543
Oxymorphone	Narcotic	$C_{17}H_{19}NO_4$	301.1314	1.65	$[M+H]^+$	302.1387
Penbutolol	β -blocker	$C_{18}H_{29}NO_2$	291.2198	10.58	$[M+H]^+$	292.2271
Pentobarbital	Narcotic	$C_{11}H_{18}N_2O_3$	226.1317	10.77	$[M+H]^+$	227.1390
Pentoxifylline	Anticoagulant	$C_{13}H_{18}N_4O_3$	278.1379	8.59	$[M+H]^+$	279.1452
Pentylentetrazole	Stimulant	$C_6H_{10}N_4$	138.0905	5.44	$[M+H]^+$	139.0978
Phenobarbital (25 and 250 $\mu\text{g/L}$)	Narcotic	$C_{12}H_{12}N_2O_3$	232.0848	9.67	$[M+H]^+$	233.0921
Phenylephrine	Stimulant	$C_9H_{13}NO_2$	167.0946	1.37	$C_9H_{12}NO^+$	150.0913
Picrotin (25 and 250 $\mu\text{g/L}$)	Stimulant	$C_{15}H_{18}O_7$	310.1053	9.02	$[M+H]^+$	311.1125
Picrotoxinin (250 and 2500 $\mu\text{g/L}$)	Stimulant	$C_{15}H_{16}O_6$	292.0947	10.18	$[M+H]^+$	293.1020
Pindolol	β -blocker	$C_{14}H_{20}N_2O_2$	248.1525	6.25	$[M+H]^+$	249.1598
Piretanide	Diuretic	$C_{17}H_{18}N_2O_5S$	362.0936	11.79	$[M+H]^+$	363.1009
Prednisolone	Glucocorticosteroid	$C_{21}H_{28}O_5$	360.1937	9.89	$[M+H]^+$	361.2010
Prednisone	Glucocorticosteroid	$C_{21}H_{26}O_5$	358.1780	9.99	$[M+H]^+$	359.1853

Probenecid	Diuretic	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	285.1035	12.51	[M+H] ⁺	286.1108
Propafenone	Antiarrhythmic Agent	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	341.1991	10.29	[M+H] ⁺	342.2064
Propoxyphene	Analgesic	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	339.2198	10.50	[M+H] ⁺	340.2271
Propranolol	β-blocker	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.1572	9.36	[M+H] ⁺	260.1645
Propylhexedrine	Stimulant	C ₁₀ H ₂₁ N	155.1674	8.61	[M+H] ⁺	156.1747
Repaglinide	Antidiabetic	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₄	452.2675	11.74	[M+H] ⁺	453.2748
Ritodrine	β ₂ -agonist	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287.1521	4.71	[M+H] ⁺	288.1594
Salbutamol	β ₂ -agonist	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239.1521	1.65	[M+H] ⁺	240.1594
Salicylamide	Analgesic	C ₇ H ₇ NO ₂	137.0477	7.96	[M+H] ⁺	138.0550
Salmeterol	β ₂ -agonist	C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	415.2723	10.58	[M+H] ⁺	416.2795
Selegiline (Deprenil)	Stimulant	C ₁₃ H ₁₇ N	187.1361	7.67	[M+H] ⁺	188.1434
Sotalol	β-blocker	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272.1195	2.03	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₂ S ⁺	255.1162
Spirolactone	Diuretic	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S	416.2021	12.86	C ₂₂ H ₂₉ O ₃ ⁺	341.2111
Stanozol	Steroid	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	328.2515	11.89	[M+H] ⁺	329.2587
Strychnine	Stimulant	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	334.1681	7.28	[M+H] ⁺	335.1754
Tamoxifen	SERM	C ₂₆ H ₂₉ NO	371.2249	12.39	[M+H] ⁺	372.2322
Terbutaline	β ₂ -agonist	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	225.1365	1.72	[M+H] ⁺	226.1438
Testosterone	Steroid	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.2089	12.16	[M+H] ⁺	289.2162
Tibolone	Steroid	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312.2089	13.66	[M+H] ⁺	313.2162
Timolol	β-blocker	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	316.1569	7.92	[M+H] ⁺	317.1642
Tolazamide	Antidiabetic	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	311.1304	12.09	[M+H] ⁺	312.1376
Tolbutamide	Antidiabetic	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	270.1038	11.80	[M+H] ⁺	271.1111
Torasemide	Diuretic	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	348.1256	9.52	[M+H] ⁺	349.1329
Toremifene	SERM	C ₂₆ H ₂₈ ClNO	405.1859	12.15	[M+H] ⁺	406.1932

Triamcinolone	Glucocorticosteroid	$C_{21}H_{27}FO_6$	394.1792	9.17	$[M+H]^+$	395.1864
Triamterene	Diuretic	$C_{12}H_{11}N_7$	253.1076	7.20	$[M+H]^+$	254.1149
Trichlormethiazide	Diuretic	$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$	378.9022	10.19	$[M-H]^-$	377.8949
Turinabol	Diuretic	$C_{20}H_{27}ClO_2$	334.1700	13.04	$[M+H]^+$	335.1772
Vanillic Acid Diethylamide	Stimulant	$C_{12}H_{17}NO_3$	223.1208	9.32	$[M+H]^+$	224.1281
Warfarin	Anticoagulant	$C_{19}H_{16}O_4$	308.1049	12.76	$[M+H]^+$	309.1121

Table 2. Recovery values obtained for the 189 tested compounds with the seven studied extraction protocols (spiking level 2.5 µg L⁻¹)

Compound	Class	SPE PLEXA		SPE HLB		SPE C18		SPE MCX		SPE MAX		LLE MTBE		SLE MTBE	
		Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)
16-β-Hydroxyfurazabol	Steroid	88	36	77	24	73	21	0	N/D	69	38	82	14	0	N/D
17,17-Dimethyl-18-androsta-1,4,13(14)-trien-3-one	Steroid	78	13	57	11	56	28	70	12	53	12	0	N/D	0	N/D
17-α-Ethinil estradiol	Strogen agonist	97.1	4.1	120.5	8.1	93.0	4.1	89.5	6.9	99	15	10	27	17.0	4.4
17-α-Methyltestosterone	Steroid	110.8	6.2	94.7	3.1	87.8	6.3	111.0	2.4	100.3	7.6	42	11	80.0	2.8
17-α-Hydroxyprogesterone	Steroid	100.4	6.4	88	10	111.5	4.4	104.8	6.1	100.4	5.8	71	19	78.1	3.4
17-Epioxandrolone	Oxandrolone														
	Metabolite (Steroid)	102.0	2.8	108.4	6.1	97.6	7.3	82	16	112.9	7.7	67.6	6.9	52	18
19-Norethiocholanone	Steroid	145.4	3.9	89.6	4.4	85	14	86	29	109	16	42	36	42	24
2-Aminoheptane	Stimulant	125	19	93.2	4.1	73.9	3.9	103.8	5.8	22	35	3	24	4	12
2-Hydroxymethyl-17α-methylandrosta-1,4-diene-11α,17β-diol-3-one	Formebolone														
2α-	Metabolite (Steroid)	139.1	1.8	105.2	4.6	98.3	2.4	0	N/D	0	N/D	126	36	57.9	5.4
Hydroxymethylethisterone	Steroid	106.7	9.0	92.07	5.83	95	15	97	45	105	18	0	N/D	68.6	2.6
2α-Methyl-5α-Androstan-3α-ol-17-one	Drostanolone														
	Metabolite (Steroid)	100	17	100.8	9.5	91	45	107	14	104.1	8.7	0	N/D	81	39
4-Androstene-3,17-dione	Steroid	110.3	4.9	67	21	98.1	5.8	90	11	108.0	8.7	75	16	85.6	7.9
4-Chloro-4-androsten-3α-ol-17-one	Clostebol Metabolite (Steroid)	113	29	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	84	46	0	N/D
4-Hydroxyandrostendione (Formestane)	Steroid	88.3	7.0	103.3	7.3	103	12	84	16	96	27	70	24	73.2	9.2
4-Hydroxytestosterone	Steroid	100.0	4.1	96.2	7.0	106.2	6.2	76	40	121.2	9.4	98	14	67	18
Acebutolol	β-blocker	111	11	0	N/D	116	39	94.6	4.3	0	N/D	0	N/D	3	18
Acepromazine	Narcotic	104.4	4.0	106.1	1.8	62	12	0	N/D	106.9	3.3	64	16	64.6	6.6
Acetazolamide	Diuretic	89	20	115	26	0	N/D	101	21	74	47	24	40	0	N/D
Acetylmorphine	Narcotic	102.8	6.6	97	11	76.0	8.0	98	14	116	12	48	10	46	10
α-Zearalanol	Strogen agonist	37.5	12	0	N/D	69	27	38	28	94	13	0	N/D	82	15
Alprenolol	β-blocker	103.6	4.1	98.6	4.8	84.0	4.3	0	N/D	101.3	8.7	49	13	41	12
Althiazide	Diuretic	119	19	71	22	80	22	0	N/D	10	42	87	30	80.4	5.6
Altrenogest	Steroid	107.3	5.72	111.3	6.7	83.8	3.7	95	13	101	10	82	25	78.4	4.4
Amcinonide	Glucocorticosteroid	100.5	4.1	94.4	4.4	88.3	1.7	80.5	9.1	97.4	8.0	40	32	94.4	7.6
Aminoglutethimide	Aromatase Inhibitor	89.6	8.25	96	13	89.0	7.0	0	N/D	93	10	108	16	46.7	9.5
Amphetamine	Stimulant	91.6	6.04	104	22	104	39	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D
Anastrozole	Aromatase Inhibitor	89.7	5.18	114.7	3.9	100.1	5.7	101.4	6.0	134.6	8.9	68	15	74.3	1.0

<i>Androsterone</i>	<i>Steroid</i>	77	11	75	18	97.0	8.4	111	16	105.1	8.2	0	N/D	0	N/D
<i>Atenolol</i>	<i>β-blocker</i>	101.4	7.6	109.3	12	110.0	4.3	82	13	10	18	0	N/D	0	N/D
<i>Bambuterol</i>	<i>β2-agonist</i>	96.2	5.2	102.2	9.1	95.2	6.5	87.2	8.6	110	10	3	20	0	N/D
<i>Beclomethasone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	102.8	5.3	98	13	0	N/D	75	23	99	26	0	N/D	77.8	2.9
<i>Bendroflumethiazide</i>	<i>Diuretic</i>	88	13	96	11	84.6	5.1	0	N/D	103	10	0	N/D	76.9	9.1
<i>Benthiazide</i>	<i>Diuretic</i>	103	17	77.7	6.1	87.5	7.6	92.3	7.6	46.4	9.8	65	27	42	48
<i>Benzoylcgonine</i>	<i>Cocaine Metabolite (Stimulant)</i>	91.7	3.0	96.9	2.9	91.8	4.8	100.9	6.4	56	48	0	N/D	0	N/D
<i>β-Estradiol</i>	<i>Strogen agonist</i>	119	12	78.5	8.1	109	25	0	N/D	100	11	0	N/D	78	10
<i>Betaxolol</i>	<i>β-blocker</i>	104.6	3.6	104	10	74	22	89.9	4.0	104.9	9.4	41.43	14	21.0	7.4
<i>Bis(4-cyanophenyl) methanol</i>	<i>Letrozole Metabolite (Aromatase Inhibitor)</i>	77	21	84.1	9.4	98	15	82	23	104	15	0	N/D	72.5	3.5
<i>Bisoprolol</i>	<i>β-blocker</i>	93.7	8.1	106.7	5.5	90.7	6.5	82.2	5.3	112.7	7.8	27	12	7	12
<i>Boldenone</i>	<i>Steroid</i>	99	11	103.4	4.9	108	10	104.0	9.4	104.2	9.8	84	12	69.8	4.6
<i>Boldine</i>	<i>Broncodilatador</i>	103.9	6.2	88	11	100.1	9.8	98	14	146	17	48	10	65.2	5.3
<i>Brucine</i>	<i>Stimulant</i>	111.1	9.7	106.7	6.2	78	12	81	10	107.2	7.3	0	N/D	0	N/D
<i>Bumetanide</i>	<i>Diuretic</i>	97	12	105.2	4.8	92.8	9.4	106	14	115.4	8.8	94	13	0	N/D
<i>Bupropion</i>	<i>Stimulant</i>	88.6	6.8	93.7	9.4	99.9	7.7	110.8	4.7	102.9	6.1	71.8	8.1	118.5	8.6
<i>Butabarbital</i>	<i>Narcotic</i>	126.9	8.9	85	27	102	14	0	N/D	101	14	0	N/D	90.0	6.9
<i>Cannabidiol</i>	<i>Cannabinoid</i>	60	26	0	N/D	68	14	67	36	50	29	0	N/D	46	14
<i>Canrenone</i>	<i>Aldosterone Antagonist (Masking Agent)</i>	122.2	6.7	130.8	9.6	104.6	4.8	115	14	123.8	7.7	68	14	73.8	5.2
<i>Capsaicin</i>	<i>Analgesic</i>	100.8	4.0	95.8	5.0	119.4	9.4	89.4	3.0	110	12	42	29	68.6	5.3
<i>Carphestone</i>	<i>Stimulant</i>	112	10	104.8	9.3	99	22	84	30	118	16	13	23	18	23
<i>Carvedilol</i>	<i>β-blocker</i>	101	12	90.6	5.0	87.7	4.7	89	29	96.8	9.1	0	N/D	30	51
<i>Celecoxib</i>	<i>Anti-inflammatory</i>	95.9	3.0	99.8	6.8	96.9	2.9	76	19	93	11	90	66	53	27
<i>Celiprolol</i>	<i>β-blocker</i>	81.6	1.5	115.2	4.3	92.9	6.8	86.7	7.8	114.8	6.8	2	49	0	N/D
<i>Chlorothiazide</i>	<i>Diuretic</i>	96.3	5.2	85.5	7.7	0	N/D	94	10	0	N/D	37	34	0	N/D
<i>Clenbuterol</i>	<i>Anabolic agent</i>	92	14	90.6	5.4	93.1	7.0	126	27	122	16	40	25	44.0	3.5
<i>Clopidamide</i>	<i>Diuretic</i>	111.6	5.3	98.3	5.6	94.6	4.8	108	18	122.3	9.1	74.9	9.0	71.8	5.0
<i>Clostebal acetate</i>	<i>Steroid</i>	79	12	103	10	97	17	99	25	88.9	8.6	0	N/D	44	34
<i>Cocaethylene</i>	<i>Cocaine Metabolite (Stimulant)</i>	92.7	7.1	94.9	6.7	80	13	105.2	5.7	124	16	68.9	9.8	122	11
<i>Cocaine</i>	<i>Stimulant</i>	103	14	95.1	1.3	101.1	7.5	115.8	4.8	129.4	6.7	52	14	128	22
<i>Codeine</i>	<i>Narcotic</i>	133	19	87	11	77	32	90	11	55	38	0	N/D	14	14
<i>Cotinine</i>	<i>Stimulant</i>	68	32	110	10	96	13	128	16	109	30	37	71	15	20
<i>Cyclofenil</i>	<i>Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM)</i>	103	10	88	18	71	12	0	N/D	64	17	0	N/D	0	N/D
<i>Cyclothiazide</i>	<i>Diuretic</i>	105	12	0	N/D	91.7	5.1	0	N/D	96	16	65	11	56	23

<i>Danazol</i>	<i>Steroid</i>	100.2	4.0	120	18	100.8	4.0	89	12	98.3	3.2	0	N/D	64.2	5.6
<i>Δ9-THC</i>	<i>Cannabinoid</i>	98	11	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D
<i>Dexamethasone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	103.0	4.0	107.9	6.2	78.3	13	104	11	108.5	7.3	82.4	6.3	79.2	8.5
<i>Diethylnicotinamide</i> (<i>Niketamide</i>)	<i>Stimulant</i>	132.4	5.2	93	13	115	15	98	12	98.9	7.6	58	20	55	14
<i>Dimethylphenethylamine</i>	<i>Stimulant</i>	83	18	92	12	88	11	96	15	61	22	0	N/D	0	N/D
<i>Doxapram</i>	<i>Stimulant</i>	128.4	7.6	95	12	100.8	6.0	113.6	6.2	102	13	77.1	9.8	63	11
<i>EDDP</i>	<i>Methadone</i> <i>Metabolite</i> (<i>Narcotic</i>)	127.8	6.3	115.5	3.4	11	12	67.1	4.0	125.9	7.9	32.0	4.1	37	26
<i>Ephedrine</i>	<i>Stimulant</i>	66	23	102	21	72.4	8.6	109.5	8.5	10	17	0	N/D	7	14
<i>Epitestosterone</i>	<i>Steroid</i>	98.6	7.4	95.3	4.3	91.7	6.4	77.1	8.6	93.7	9.2	36.4	7.1	76.1	8.5
<i>Eplerenone</i>	<i>Diuretic</i>	88.2	7.2	109.6	4.5	96.2	5.4	93.8	7.4	118.2	4.3	77	15	80.5	5.9
<i>Esmolol</i>	<i>β-blocker</i>	101.0	3.5	110.0	4.3	101.6	7.6	83.8	4.6	120.4	6.3	16.3	5.8	15.2	5.2
<i>Ethacrinic acid</i>	<i>Diuretic</i>	129.1	7.8	10	17	104	13	88	18	0	N/D	0	N/D	0	N/D
<i>Ethiocholanone</i>	<i>Testosterone</i> <i>Metabolite(Steroid)</i>	122.1	8.5	80	21	81	28	98	46	110.7	9.5	0	N/D	0	N/D
<i>Ethisterone</i>	<i>Steroid</i>	102.3	4.2	123.6	8.0	107.9	4.4	109.2	9.9	128	13	82.4	9.5	75.3	1.7
<i>Ethylamphetamine</i>	<i>Stimulant</i>	104.4	4.8	10	13	101	18	86.6	5.9	101	16	5	19	18	12
<i>Ethylmorphine</i>	<i>Narcotic</i>	90	11	118.0	3.0	81	11	93.3	5.6	109.9	9.7	2	27	25.0	7.5
<i>Famprofazone</i>	<i>Stimulant</i>	91.0	4.3	93.7	6.6	99.4	6.3	99.8	6.9	117	13	89.8	9.3	71.2	4.7
<i>Fenbutrazate</i>	<i>Stimulant</i>	93.1	4.3	98.9	4.9	106.2	6.2	102	21	120	15	80	13	63.66	5.0
<i>Fenfluramine</i>	<i>Stimulant</i>	91.4	3.0	102.1	7.8	93.1	6.4	87.3	7.3	112.6	8.5	52.0	9.5	83.2	3.3
<i>Fenspiride</i>	<i>α-Adrenergic blocker</i> (<i>Bronchodilator</i>)	98	11	99	10	97.9	7.9	88.4	5.7	94	18	0	N/D	24.6	5.0
<i>Fentanyl</i>	<i>Narcotic</i>	107	7.5	96.1	7.7	86	10	74	12	95.6	8.1	38.3	5.0	76.9	3.7
<i>Finasteride</i>	<i>Steroid</i>	106.2	4.0	96.6	2.7	84.8	4.4	101.4	2.8	127	46	46	13	72.8	3.3
<i>Flumethasone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	100.2	9.3	98	25	100.5	8.4	106	10	120	12	8	10	73.6	6.0
<i>Flunisolide</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	90.8	9.8	98.1	3.1	96	14	129	12	114	14	0	N/D	72.6	2.4
<i>Fluocinolone acetonide</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	110.4	6.2	97	11	92.8	6.2	75.8	6.3	82	13	34	36	82.2	5.3
<i>Fluorometholone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	89.2	3.5	108	11	95	15	88.1	6.9	126.5	8.3	56.7	9.9	78.4	9.4
<i>Floxymesterone</i>	<i>Steroid</i>	103.6	6.7	98	17	120	28	49	19	100	12	31	45	78.7	2.3
<i>Flurandrenolide</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	97	19	99	15	77	15	68	14	94	12	0	N/D	76.2	4.0
<i>Fluticasone propionate</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	114.0	7.0	128	20	92.9	4.4	75	14	89.2	5.6	64	52	65.2	5.4
<i>Formoterol</i>	<i>β2-agonist</i>	64	46	118.5	4.7	100.1	4.9	90.2	5.1	101.8	6.8	0	N/D	17	19
<i>Furosemide</i>	<i>Diuretic</i>	85	17	66	17	90	12	81	26	16	52	0	N/D	0	N/D
<i>Gestrinone</i>	<i>Steroid</i>	105.8	4.5	108.2	5.0	95.2	5.6	92	10	119.1	6.0	85	16	71.5	2.0
<i>Glibenclamide</i>	<i>Antidiabetic</i>	97.0	6.6	84.3	8.9	91.1	5.5	79.4	7.1	82.3	6.1	0	N/D	0	N/D
<i>Glipizide</i>	<i>Antidiabetic</i>	122.1	5.3	92.7	5.2	924	8.2	78.0	8.1	112.6	8.7	45	16	0	N/D
<i>Heptaminol</i>	<i>Stimulant</i>	12	19	75	13	114.6	6.6	131	10	0	N/D	0	N/D	6.3	52
<i>Heroin</i>	<i>Narcotic</i>	84	29	90.8	3.9	83.4	8.6	108	13	121	15	29	33	112	12
<i>Hexobarbital</i>	<i>Narcotic</i>	12.1	6.3	0	N/D	0	N/D	104	44	77	48	0	N/D	79.6	9.5

<i>Hydrochlorothiazide</i>	<i>Diuretic</i>	110	12	0	N/D	95	14	110	24	104	32	51	28	83.3	6.0
<i>Hydrocortison</i>	<i>Cortisol Metabolite</i>	99.3	5.2	107.5	5.3	116.2	3.9	128.4	3.8	109.6	5.8	103	13	52	13
<i>Hydroflumethiazide</i>	<i>Diuretic</i>	35	19	66	21	86.6	5.8	0	N/D	114.5	6.6	64	12	82.5	4.5
<i>Hydromorphone</i>	<i>Narcotic</i>	101	12	91	21	41	13	67	37	90.7	9.7	0	N/D	10.3	5.6
<i>Ibuprofen</i>	<i>Anti-inflamatory</i>	114	16	99.7	9.5	98	12	0	N/D	0	N/D	0	N/D	42	30
<i>Indapamide</i>	<i>Diuretic</i>	107.0	5.4	108.6	6.8	96.7	6.1	97	18	107	11	74	23	76.0	3.2
<i>Isoetharine</i>	<i>β2-agonist</i>	84.4	4.9	125.9	7.3	98	12	94.4	8.9	16	13	0	N/D	2	17
<i>Ketamine</i>	<i>Stimulant</i>	95.5	3.6	99.9	8.9	99.8	3.5	112	11	135	11	75	15	81.1	3.8
<i>Labetalol</i>	<i>β-blocker</i>	95.5	8.0	101	10	116	46	91	11	109	13	48	14	51	20
<i>Letrozole</i>	<i>Aromatase Inhibitor</i>	130	17	110	16	67.0	9.7	110	11	108	14	81	16	73.4	2.8
<i>Lidocaine</i>	<i>Anesthetic</i>	106.5	3.0	95.4	2.3	104.5	4.2	127	12	103.6	7.3	73	15	77.2	6.6
<i>LSD</i>	<i>Narcotic</i>	129.6	4.8	100.3	9.3	95.9	7.5	93.0	8.8	113	14	53.3	7.0	73.6	4.5
<i>MDA</i>	<i>Stimulant</i>	97	23	91	20	98	11	106	10	48	35	0	N/D	8	18
<i>MDEA</i>	<i>Stimulant</i>	88	31	103.1	4.9	102	42	98.6	8.0	82.8	9.5	0	N/D	14	14
<i>MDMA</i>	<i>Stimulant</i>	125.7	9.5	101.7	3.2	103	11	86	19	60	51	0	N/D	20	12
<i>Medroxyprogesterone</i>	<i>Steroid</i>	90.1	5.2	94.6	3.6	90.8	4.6	94.6	7.8	117.6	6.0	53	15	71.2	4.5
<i>Mefenorex</i>	<i>Stimulant</i>	76.1	4.0	108.1	7.8	93.35	8.2	109	13	92.3	6.2	45.5	7.2	80.6	6.1
<i>Meloxicam</i>	<i>Anti-inflamatory</i>	97.2	6.4	104.7	4.9	92.6	6.2	84.9	6.5	0	N/D	80	13	0	N/D
<i>Meperidine</i>	<i>Narcotic</i>	134.3	5.6	95.7	7.2	87	11	99.8	7.7	100.3	5.1	38.3	7.0	65	14
<i>Mesterolone</i>	<i>Steroid</i>	110.3	6.1	88	1	101.9	9.6	112.8	8.3	108.3	7.1	32	41	0	N/D
<i>Metaproterenol (Orciprenaline)</i>	<i>β2-agonist</i>	31	41	93	12	85.7	8.2	86	14	66.8	57	58	38	33	19
<i>Methadone</i>	<i>Narcotic</i>	101.4	4.8	98.7	8.4	91.4	24	100	13	120.8	9.0	69.2	7.1	69.2	3.4
<i>Methamphetamine</i>	<i>Stimulant</i>	112.8	7.7	100.8	6.7	92	10	106	14	42	11	0	N/D	0	N/D
<i>Methandienone</i>	<i>Steroid</i>	105.7	3.1	88.4	7.8	84	10	0	N/D	110.1	3.8	74	11	79.5	2.9
<i>Methoxyphenamine</i>	<i>Stimulant</i>	114	13	93	14	95.8	9.7	83.6	7.3	84	12	0	N/D	10	19
<i>Methylephedrine</i>	<i>Stimulant</i>	105.6	5.6	57	13	91	17	112	13	16	81	3	8	16.6	8.4
<i>Methylphenidate</i>	<i>Stimulant</i>	94.4	3.4	98.7	3.0	92.7	3.6	104	13	114	17	31	12	63	15
<i>Meticrane</i>	<i>Diuretic</i>	100	21	70	18	73	20	0	N/D	121.8	2.6	0	N/D	73.8	3.2
<i>Metolazone</i>	<i>Diuretic</i>	109.5	8.9	91.8	3.8	118.3	9.4	103.4	9.3	112.7	8.6	55.0	9.6	83.7	1.3
<i>Metoprolol</i>	<i>β-blocker</i>	103.6	3.6	95.3	8.9	104.2	5.9	131	13	122.6	8.4	0	N/D	8.9	9.7
<i>Morphine</i>	<i>Narcotic</i>	101	16	101	11	0	N/D	75	44	65	33	12	109	12	20
<i>Nadolol</i>	<i>β-blocker</i>	101	14	101.6	4.3	121	33	86.2	5.6	59	15	0	N/D	2	30
<i>Nandrolone (19-Nortestosterone)</i>	<i>Steroid</i>	91.1	6.8	94.8	5.4	99	12	13	11	117	15	93.2	7.5	77.5	4.9
<i>Nateglinide</i>	<i>Antidiabetic</i>	88.0	3.6	94.1	7.7	98.9	3.7	92.8	9.6	102.7	5.1	75.8	4.5	0	N/D
<i>N-Desmethylselegiline</i>	<i>Metabolite de Selegiline</i>	95.5	4.4	104	13	100.4	8.9	74	24	91	20	0	N/D	75.7	7.0
<i>Nicotine</i>	<i>Stimulant</i>	43	27	30	67	82	14	100	18	66	38	0	N/D	22	52
<i>Norcocaine</i>	<i>Cocaine Metabolite (Stimulant)</i>	100	11	91.2	5.8	83.4	4.4	89	14	124.4	6.7	30	18	93.4	5.5

<i>Norcodeine</i>	<i>Codeine Metabolite</i>														
	(Narcotic)	114.0	7.0	91	20	96	14	88	21	98	15	0	N/D	3.6	8.4
<i>Norethandrolone</i>	<i>Steroid</i>	92.5	4.9	107.0	4.5	97.9	5.3	95.0	4.5	117.5	4.3	61	17	80.4	5.0
<i>Norethindrone</i>	<i>Steroid</i>	95.7	5.3	88.7	6.9	83.1	7.6	105.5	6.5	101.8	4.1	52	11	79.0	1.6
<i>Norfenfluramine</i>	<i>Fenfluramine Metabolite</i>														
	(Stimulant)	107.4	3.8	87	21	107.24	5.9	109.6	3.9	85	19	32.0	7.2	26	15
<i>Norfentanyl</i>	<i>Fentanyl Metabolite(Narcotic)</i>	118	12	97.1	8.8	82	12	143.2	8.6	70.9	7.6	0	N/D	0	N/D
<i>Norgestrel</i>	<i>Steroid</i>	114.4	5.8	97.5	2.4	85.8	4.2	103.1	5.6	113.1	8.5	42	20	75.2	3.7
<i>Normorphine</i>	<i>Morphine Metabolite</i>														
	(Narcotic)	105	13	112	37	105.8	7.1	0	N/D	0	N/D	0	N/D	3	21
<i>Noroxycodone</i>	<i>Narcotic</i>	85	12	93.4	7.7	61	20	85	15	94	18	0	N/D	5	15
<i>Octopamine</i>	<i>Stimulant</i>	51	24	129	25	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D
<i>Oxilofrine</i>	<i>Stimulant</i>	86	25	85	29	0	N/D	0	N/D	0	N/D	25	32	0	N/D
<i>Oxycodone</i>	<i>Narcotic</i>	96.6	6.3	84	12	0	N/D	0	N/D	120	12	0	N/D	26.9	5.7
<i>Oxymorphone</i>	<i>Narcotic</i>	118	25	86	29	74	27	26	133	81	11	0	N/D	20.4	6.5
<i>Penbutolol</i>	<i>β-blocker</i>	106.0	4.9	95.7	2.5	86.5	7.8	106.6	6.5	99.8	8.1	71	15	67.4	7.8
<i>Pentobarbital</i>	<i>Narcotic</i>	76	15	101.3	8.5	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D
<i>Pentoxifylline</i>	<i>Anticoagulant</i>	94	11	105.5	9.6	112.1	5.8	125	12	100	16	122	20	49	17
<i>Pentylentetrazole</i>	<i>Stimulant</i>	94	19	96	14	94.5	3.7	102	18	125	11	54	13	59	14
<i>Phenobarbital</i>	<i>Narcotic</i>	105.0	9.4	0	N/D	0	N/D	0	N/D	66	29	0	N/D	92	42
<i>Phenylephrine</i>	<i>Stimulant</i>	56.2	8.6	0	N/D	0	N/D	0	N/D	22	22	28	43	0	N/D
<i>Picrotin</i>	<i>Stimulant</i>	100	17	107	25	0	N/D	0	N/D	120	14	0	N/D	0	N/D
<i>Picrotoxinin</i>	<i>Stimulant</i>	91.5	8.7	0	N/D	107	12	0	N/D	96	15	0	N/D	66	16
<i>Pindolol</i>	<i>β-blocker</i>	133	10	80.53	12.55	113	18	20	18	102	13	20	37	17	12
<i>Piretanide</i>	<i>Diuretic</i>	105.5	5.8	87.2	8.4	102.4	3.4	87.6	6.4	94.6	5.2	96	56	1	45
<i>Prednisolone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	130	35	106.8	4.6	68	19	128	28	85	25	47	11	85	19
<i>Prednisone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	101	19	103	11	100	13	117	18	101	15	56	18	81.5	5.6
<i>Probencid</i>	<i>Diuretic</i>	98.3	6.6	101.9	6.5	84.9	5.2	32	19	100	10	102	40	73.7	6.0
<i>Propafenone</i>	<i>Antiarrhythmic Agent</i>	93.5	4.5	100.6	4.2	83.8	5.2	91	18	105	20	71	12	52	16
<i>Propoxyphene</i>	<i>Analgesic</i>	96	17	110.6	7.4	90	12	111	11	96	11	76	2	75.9	8.6
<i>Propranolol</i>	<i>β-blocker</i>	96.4	5.8	96.9	3.4	90.2	5.0	96	12	107	15	49	12	40	14
<i>Propylhexedrine</i>	<i>Stimulant</i>	107.9	2.7	88.6	2.3	85	10	97.8	7.9	51	52	8	16	9	10
<i>Repaglinide</i>	<i>Antidiabetic</i>	107.5	4.7	94.6	4.0	100.0	6.2	85.6	7.2	107	10	35.4	5.4	0	N/D
<i>Ritodrine</i>	<i>β2-agonist</i>	119.3	5.3	88.6	4.6	78	22	68	24	98	15	7	20	25	12
<i>Salbutamol</i>	<i>β2-agonist</i>	52	23	91	21	101.6	1.8	86	40	10	28	0	N/D	0	N/D
<i>Salicylamide</i>	<i>Analgesic</i>	66	39	94	40	85	20	0	N/D	104	12	0	N/D	79.4	9.0
<i>Salmeterol</i>	<i>β2-agonist</i>	96.3	5.1	104.2	4.0	78	19	78	25	100	12	76	21	0	N/D
<i>Selegiline (Deprenil)</i>	<i>Stimulant</i>	92	10	107.3	4.6	0	N/D	86	14	0	N/D	86	20	81	12

<i>Sotalol</i>	<i>β-blocker</i>	71	18	107.7	8.4	84	18	82	20	9	108	0	N/D	3	47
<i>Spirolactone</i>	<i>Diuretic</i>	85.9	4.7	0	N/D	96.3	3.7	88.2	4.7	96	11	92	21	75.8	3.9
<i>Stanozol</i>	<i>Steroid</i>	107.1	2.5	104.4	5.3	109.9	5.7	69	10	108	12	0	N/D	66	10
<i>Strychnine</i>	<i>Stimulant</i>	92.4	5.0	91	14	81	15	102.6	7.1	117	15	0	N/D	21.9	5.3
<i>Tamoxifen</i>	<i>SERM</i>	78	16	122	11	23	59	65	22	51	13	65	54	46	26
<i>Terbutaline</i>	<i>β2-agonist</i>	77.8	7.4	88	16	100	11	107	59	0	N/D	0	N/D	2	30
<i>Testosterone</i>	<i>Steroid</i>	104.9	5.1	109.2	5.1	85.7	5.2	108.3	8.1	103	11	86	10	77.4	6.6
<i>Tibolone</i>	<i>Steroid</i>	94.0	5.3	93.3	5.3	102	15	86	19	93	15	0	N/D	67	20
<i>Timolol</i>	<i>β-blocker</i>	110.8	4.8	95.1	7.2	91.0	9.8	89.9	4.6	105	12	5	30	13	13
<i>Tolazamide</i>	<i>Antidiabetic</i>	112.8	3.6	106.9	3.8	98.0	6.6	111.5	7.5	116	11	44.3	2.0	19	46
<i>Tolbutamide</i>	<i>Antidiabetic</i>	89.5	7.2	103.2	2.2	96.7	4.2	91	13	118.7	7.3	72	12	6	12
<i>Torsemide</i>	<i>Diuretic</i>	112.2	4.0	93.0	9.8	109.4	6.2	108	15	89.8	8.9	57	14	2	45
<i>Toremifene</i>	<i>SERM</i>	68.6	8.2	48	32	16	40	42	14	62	21	103	14	51.5	7.1
<i>Triamcinolone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	111	19	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	48	30
<i>Triamterene</i>	<i>Diuretic</i>	102.2	7.4	0	N/D	104.7	4.7	107.1	4.7	89	17	0	N/D	0	N/D
<i>Trichlormethiazide</i>	<i>Diuretic</i>	90	28	63	26	84.8	6.8	0	N/D	86.2	7.2	67	20	82.9	4.2
<i>Turinabol</i>	<i>Diuretic</i>	106.9	3.1	100.1	7.4	88.6	9.8	84.7	4.8	96.2	9.0	51	14	81.2	6.0
<i>Vanillic acid diethylamide</i>	<i>Stimulant</i>	95.0	4.6	102.0	6.9	108	14	102	11	125.3	8.0	72.5	7.9	78.1	3.4
<i>Warfarin</i>	<i>Anticoagulant</i>	93.0	4.4	87.4	2.4	123.2	7.9	102	12	114.3	8.0	79	18	77.0	5.5

Table 3. Recovery values of all compounds with the seven studied extraction protocols (spiking level 25 µg L⁻¹)

Compound	Class	SPE PLEXA		SPE HLB		SPE C18		SPE MCX		SPE MAX		LLE TBME		SLE TBME	
		Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)	Mean recovery	RSD (%)
16-β-Hydroxyfurazabol	Steroid	72.1	6.3	77.6	8.4	90.2	8.6	8.5	55	103.4	3.7	89	14	0	N/D
17,17-Dimethyl-18-androsta-1,4,13(14)-trien-3-one	Steroid	81.4	7.8	52	14	46	26	61	12	65.1	12	0	N/D	0	N/D
17-α-Ethinyl estradiol	Strogen agonist	94.7	5.6	94.4	5.4	84.4	3.5	92.0	3.3	88.2	5.5	11	28	15	17
17-α-Methyltestosterone	Steroid	58	19	100.1	4.5	91.8	4.4	43	78	94.5	3.1	78.9	9.4	79.0	3.1
17-α-Hydroxyprogesterone	Steroid	88.7	4.8	106.7	5.2	104.6	4.4	96.1	4.9	68.3	2.3	70.5	8.4	85.2	1.3
17-Epioxandrolone	Oxandrolone Metabolite (Steroid)	95.8	4.2	93.1	6.5	96.4	4.5	104.2	3.3	84.3	3.8	68	14	50	16
19-Norethiocholanone	Steroid	82	13	94.7	3.8	91.5	3.2	42	75	93.8	3.6	75	12	68.6	9.9
2-Aminoheptane	Stimulant	79	13	104	14	82	24	127.2	2.8	15	30	3	12	8.8	4.6
2-Hydroxymethyl-17α-methylandrosta-1,4-diene-11α,17β-diol-3-one	Formebolone Metabolite (Steroid)	125.4	2.6	106.9	7.2	78.9	1.3	0	N/D	0	N/D	67	19	51.9	9.8
2α-Hydroxymethylethisterone	Steroid	84.3	7.3	109.5	7.5	106	20	110.4	3.0	73	22	81	11	80.4	4.0
2α-Methyl-5α-Androstan-3α-ol-17-one	Drostanolone Metabolite (Steroid)	109.4	6.0	106.4	6.3	85.4	9.8	127	18	75.6	8.0	0	N/D	83.5	5.0
4-Androstene-3,17-dione	Steroid	68	14	96.9	4.9	102.1	4.6	101.8	3.9	68.6	2.1	72.9	5.3	86.4	2.2
4-Chloro-4-androsten-3α-ol-17-one	Clostebol Metabolite (Steroid)	94	17	107	15	0	N/D	0	N/D	0	N/D	40	55	0	N/D
4-Hydroxyandrostendione (Formestane)	Steroid	98.4	7.7	93.3	6.3	95.0	3.0	113.4	6.6	86.3	2.4	66	13	82.5	5.8
4-Hydroxytestosterone	Steroid	107.0	6.4	108.9	6.3	88	12	121	15	83.9	4.8	87	21	78.1	2.6
Acebutolol	β-blocker	116.2	4.5	0	N/D	106.7	1.9	107.2	2.4	0	N/D	1	12	5.6	7.0
Acepromazine	Narcotic	103.3	4.3	99.3	3.9	40	20	0	N/D	85.8	4.4	66	16	72.3	13
Acetazolamide	Diuretic	90	16	91.9	8.3	0	N/D	40	76	90.6	8.9	46	24	4	70
Acethylmorphine	Narcotic	74.1	4.5	97	19	72	28	114.0	4.0	91	24	46	12	40.3	3.8
α-Zearalanol	Strogen agonist	113	16	106.0	5.4	96	15	76	24	79.0	5.7	0	N/D	82.7	2.1
Alprenolol	β-blocker	113.8	2.8	116.4	3.9	91	12	0	N/D	83.2	4.0	61.6	5.5	46.6	5.6
Althiazide	Diuretic	93.0	7.5	90	20	95	18	52	41	99	24	44	37	87	16
Altrenogest	Steroid	103.3	1.1	114.4	4.6	90	15	91	22	75.7	3.8	98	11	0	N/D
Amcinonide	Glucocorticosteroid	85.9	5.9	89.3	4.2	92.4	2.9	25	89	94.5	4.8	58	33	88.3	6.9
Aminoglutethimide	Aromatase Inhibitor	109.0	3.6	106.1	6.6	90	11	112	31	76	15	98.2	7.2	58.4	3.6
Amphetamine	Stimulant	102.2	1.7	116.8	4.2	98	12	119	13	9	12	0	N/D	8	14
Anastrozole	Aromatase Inhibitor	97.7	2.9	97.2	5.0	91.4	3.9	100.9	5.9	88.3	3.9	66	16	83.3	6.7
Androsterone	Steroid	92.8	3.5	104.3	3.7	100.7	4.8	103.0	6.6	78.2	1.9	69	12	90.4	2.2

<i>Atenolol</i>	<i>β-blocker</i>	86.8	6.6	94.9	6.5	85.2	9.4	103.4	5.4	5	11	0	N/D	0	N/D
<i>Bambuterol</i>	<i>β2-agonist</i>	99.8	4.9	99.9	5.0	92.2	3.9	32	75	93.7	4.0	4.8	8.0	3	11
<i>Beclomethasone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	98.0	6.2	103.4	2.4	44	38	99.5	5.6	72.8	1.8	0	N/D	83.4	4.7
<i>Bendroflumethiazide</i>	<i>Diuretic</i>	100	14	109.2	6.9	91	12	82.9	23	75.6	5.8	24	71	85.6	1.5
<i>Benthiazide</i>	<i>Diuretic</i>	101	10	92.7	8.3	95.2	8.3	81.4	9.3	32.2	7.0	34	43	46	32
<i>Benzoylcegonine</i>	<i>Cocaine Metabolite (Stimulant)</i>	112.2	8.6	103.7	6.1	97.0	3.1	110.6	6.9	55.6	3.2	0.5	50	0	N/D
<i>β-Estradiol</i>	<i>Strogen agonist</i>	99.8	5.2	90.9	6.0	95.6	4.6	0	N/D	66.6	6.8	0	N/D	89.1	3.1
<i>Betaxolol</i>	<i>β-blocker</i>	96.7	2.5	99.9	4.2	85.7	4.2	109.9	5.0	89.4	7.8	44	16	23	24
<i>Bis(4-cyanophenyl) methanol</i>	<i>Letrozole Metabolite (Aromatase Inhibitor)</i>	73.5	2.9	89.1	8.3	84	11	76	13	73	24	77	15	85.1	7.2
<i>Bisoprolol</i>	<i>β-blocker</i>	100.4	2.6	99.5	4.4	86.9	3.8	95.5	4.3	87.4	4.9	24	17	8	23
<i>Boldenone</i>	<i>Steroid</i>	100.2	3.8	106.4	4.3	104.9	4.2	104.8	5.1	67.5	1.9	74.8	4.8	89.2	2.5
<i>Boldine</i>	<i>Broncodilatador</i>	84.6	7.2	87	21	84.6	3.5	114.0	4.0	79	23	46	12	83.2	7.0
<i>Brucine</i>	<i>Stimulant</i>	92.1	4.2	94.4	4.4	86.5	8.9	32	87	92.4	6.0	0	N/D	0	N/D
<i>Bumetanide</i>	<i>Diuretic</i>	113.4	4.1	113.4	5.6	92	13	100	18	72.2	6.5	104	80	0	N/D
<i>Bupropion</i>	<i>Stimulant</i>	103.8	3.0	105.7	4.6	106.2	3.3	106.2	4.7	69.0	1.6	75.9	2.7	123.0	5.5
<i>Butobarbital</i>	<i>Narcotic</i>	128	23	104.8	3.7	106	10	0	N/D	83.9	6.0	65	30	130	28
<i>Cannabidiol</i>	<i>Cannabinoid</i>	74	12	105	42	59	25	85	26	23	24	0	N/D	50.7	6.2
<i>Canrenone</i>	<i>Aldosterone Antagonist (Masking Agent)</i>	110.0	1.5	111.6	5.4	92	14	90	19	78.1	4.6	94.6	8.2	82.1	4.7
<i>Capsaicin</i>	<i>Analgesic</i>	66	15	95.7	3.8	92.9	5.1	32	82	93.0	3.6	71	25	80.6	2.6
<i>Carphedone</i>	<i>Stimulant</i>	92.1	4.0	77.8	8.2	96.9	4.8	51	79	96.4	8.6	30.6	9.6	14.1	9.8
<i>Carvedilol</i>	<i>β-blocker</i>	89.8	5.8	91.6	3.6	94.5	2.0	9	73	88.5	5.1	0	N/D	73.6	3.3
<i>Celecoxib</i>	<i>Anti-inflammatory</i>	87.1	4.6	111	14	82.9	5.0	68.8	9.3	71	20	83	36	65.1	4.4
<i>Celiprolol</i>	<i>β-blocker</i>	99.7	5.2	97.4	4.6	83.7	3.7	91.1	4.3	86.3	5.8	2	20	2	32
<i>Chlorothiazide</i>	<i>Diuretic</i>	83.6	3.6	100.3	9.0	102	42	113.0	6.6	18	26	37	13	0	N/D
<i>Clenbuterol</i>	<i>Anabolic agent</i>	99.1	3.0	82	40	90.7	2.2	79.2	3.9	88.6	3.9	42	17	43	14
<i>Clopamide</i>	<i>Diuretic</i>	112.7	3.5	111.2	5.0	99	11	109	19	83.5	6.2	87.9	8.7	78.5	2.2
<i>Clostebol acetate</i>	<i>Steroid</i>	85	13	114	35	66.8	9.9	69	12	58	22	0	N/D	72.5	4.0
<i>Cocaethylene</i>	<i>Cocaine Metabolite (Stimulant)</i>	79.3	4.1	103.0	6.2	56	33	103.4	3.6	78	24	57.4	5.7	95.8	8.3
<i>Cocaine</i>	<i>Stimulant</i>	79.0	4.8	100.2	6.4	63	25	112.6	4.1	94	18	37.6	2.8	97	14
<i>Codeine</i>	<i>Narcotic</i>	129	17	96.3	8.5	84	10	100.4	3.1	62.1	2.5	1	35	18.9	5.3
<i>Cotinine</i>	<i>Stimulant</i>	64	26	112.2	9.5	95.8	3.9	109.2	5.1	76.8	3.0	9	37	7	16
<i>Cyclofenil</i>	<i>Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM)</i>	75	10	77	19	52	22	84	26	57.8	9.2	0	N/D	0	N/D
<i>Cyclothiazide</i>	<i>Diuretic</i>	102	13	105.2	5.9	95.1	6.8	0	N/D	91.1	6.3	58	10	82.7	7.3
<i>Danazol</i>	<i>Steroid</i>	100.6	5.9	102	17	84.4	9.8	105	19	62.9	5.8	0	N/D	71.2	3.9
<i>Δ9-THC</i>	<i>Cannabinoid</i>	82	48	82	37	59	25	25	14	42	18	0	N/D	56.4	9.7

<i>Dexamethasone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	98.8	2.0	92	11	93.9	2.6	132.9	5.4	88.9	3.8	68	10	86.2	3.6
<i>Diethylnicotinamide</i>															
<i>(Niketamide)</i>	<i>Stimulant</i>	129	42	102.5	7.5	104.3	7.1	97.3	7.9	68.3	3.0	62	10	59	11
<i>Dimethylphenethylamine</i>	<i>Stimulant</i>	90.9	9.9	93.0	3.0	107	41	88.4	8.1	35.6	8.2	5	20	8	21
<i>Doxapram</i>	<i>Stimulant</i>	116.2	6.2	110	14	108.7	3.0	108.2	4.4	72.3	2.9	70.1	4.1	93.1	3.1
<i>EDDP</i>	<i>Methadone</i>														
	<i>Metabolite (Narcotic)</i>	95.1	3.8	103.5	4.6	96.0	5.3	30	85	96.1	3.2	50.4	8.1	53	25
<i>Ephedrine</i>	<i>Stimulant</i>	79	21	98.2	4.7	83	13	94	10	4	14	1	20	8.0	8.3
<i>Epitestosterone</i>	<i>Steroid</i>	65	14	97.5	5.0	93.9	3.9	33	83	92.5	3.9	78.3	8.3	80.4	3.9
<i>Eplerenone</i>	<i>Diuretic</i>	100.4	3.9	94.0	4.0	90.1	7.1	88.5	6.7	87.0	5.0	76	17	82	11
<i>Esmolol</i>	<i>β-blocker</i>	95.9	6.7	97.1	4.6	87.4	3.5	92.2	5.2	88.1	5.2	16.1	5.6	16	22
<i>Ethacrinic acid</i>	<i>Diuretic</i>	83.8	4.0	107.5	5.7	93.4	5.0	68.0	6.1	2	86	0	N/D	0	N/D
<i>Ethiocholanone</i>	<i>Testosterone</i>														
	<i>Metabolite(Steroid)</i>	108.8	6.9	115.0	2.3	89.9	5.8	105.5	9.8	91.9	4.4	0	N/D	0	N/D
<i>Ethisterone</i>	<i>Steroid</i>	111.8	2.8	115.4	6.0	91	16	118	17	81.3	4.7	91.9	9.2	76.9	3.4
<i>Ethylamphetamine</i>	<i>Stimulant</i>	96.5	4.0	88.9	5.8	93.0	4.8	92.3	3.8	78.8	4.5	6	14	15	34
<i>Ethylmorphine</i>	<i>Narcotic</i>	99.3	3.8	98.4	4.8	77.2	7.4	90.3	4.0	89.0	4.0	2.8	8.7	24	17
<i>Famprofazone</i>	<i>Stimulant</i>	82.0	5.5	94	11	94.4	5.3	98.5	3.8	79	26	80.4	4.7	82.4	2.2
<i>Fenbutrazate</i>	<i>Stimulant</i>	84.1	6.1	99.4	9.5	85.9	4.3	77.6	9.1	75	26	73	12	75.9	2.1
<i>Fenfluramine</i>	<i>Stimulant</i>	97.3	5.8	98.0	4.3	85.4	3.9	98.1	5.2	81.9	7.9	53	13	63	23
<i>Fenpiride</i>	<i>α-Adrenergic blocker</i>														
	<i>(Bronchodilator)</i>	76	13	100	12	79	23	102.5	7.4	83	23	3	13	26.7	7.2
<i>Fentanyl</i>	<i>Narcotic</i>	89.1	5.4	99.4	4.2	89.5	4.6	25	88	91.2	3.3	81	10	76.8	3.0
<i>Finasteride</i>	<i>Steroid</i>	71	11	95.5	5.1	86.6	3.2	37	86	94.3	2.4	77	14	81.9	3.0
<i>Flumethasone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	105.2	4.2	113.0	6.3	89	14	101	19	73	44	9.1	6.6	82.5	2.1
<i>Flunisolide</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	82.9	5.3	95.2	8.9	89.7	3.0	108.6	3.6	74	25	84	13	76.7	3.3
<i>Fluocinolone acetonide</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	98.4	4.7	99.47	4.7	96.3	5.1	40	72	97.6	5.3	76	14	80.0	2.7
<i>Fluorometholone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	94.4	3.7	93	19	93.2	3.6	91.4	3.7	85.9	5.0	61	26	89.3	9.3
<i>Fluoxymesterone</i>	<i>Steroid</i>	88.9	5.4	98.5	4.7	99.0	3.8	33	87	96.1	4.2	94	11	78.5	3.0
<i>Flurandrenolide</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	105.8	4.5	109.4	7.3	87	12	85	21	81.1	5.5	92	15	79.3	2.3
<i>Fluticasone propionate</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	107.2	2.6	103	10	85	11	84	22	71.6	3.4	114	29	77.9	4.2
<i>Formoterol</i>	<i>β2-agonist</i>	98.0	3.9	98.0	4.4	92.8	1.9	46.4	9.4	90.1	3.3	8	22	20	18
<i>Furosemide</i>	<i>Diuretic</i>	96.8	8.8	84	21	77	15	61	15	13	23	39	47	0	N/D
<i>Gestrinone</i>	<i>Steroid</i>	107.4	2.7	119.5	4.5	89	15	113	18	79.1	3.9	96	12	82.6	3.0
<i>Glibenclamide</i>	<i>Antidiabetic</i>	100.6	2.9	79.0	4.5	84.5	2.1	86.0	6.2	79.9	9.3	0	N/D	4	86
<i>Glipizide</i>	<i>Antidiabetic</i>	93.2	4.4	97.1	4.6	94.9	4.7	40	85	96.8	2.8	74	12	0	N/D
<i>Heptaminol</i>	<i>Stimulant</i>	7	22	123	22	95	20	127	14	0	N/D	0	N/D	2	21
<i>Heroin</i>	<i>Narcotic</i>	96	14	94	15	71	15	70.7	7.5	78	27	18.7	5.6	81	20
<i>Hexobarbital</i>	<i>Narcotic</i>	66	16	129.2	3.6	76	24	108.2	5.3	61	40	111	23	66	28
<i>Hydrochlorothiazide</i>	<i>Diuretic</i>	95	10	0	N/D	110.0	8.5	66	22	70	19	32	35	90.0	5.4
<i>Hydrocortison</i>	<i>Cortisol Metabolite</i>														
	<i>(Glucocorticosteroid)</i>	115.9	6.5	99.8	4.6	97.4	3.5	94	18	88.9	5.6	113.6	9.7	67.5	7.0

<i>Hydroflumethiazide</i>	<i>Diuretic</i>	10	17	70	15	92.4	5.8	0	N/D	104.9	7.5	51	18	90.0	4.4
<i>Hydromorphone</i>	<i>Narcotic</i>	111.1	6.0	107.3	3.3	79	13	62	24	60.8	9.4	0	N/D	10.8	9.0
<i>Ibuprofen</i>	<i>Anti-inflammatory</i>	92.7	6.0	98.4	7.6	107.0	6.0	0	N/D	0	N/D	0	N/D	105	32
<i>Indapamide</i>	<i>Diuretic</i>	114.2	4.5	116.2	5.5	89	12	90	20	86.3	4.7	87	12	79.1	4.1
<i>Isoetharine</i>	<i>β2-agonist</i>	53	21	98.4	6.4	102.2	5.4	108.7	7.7	10	12	1	32	2	34
<i>Ketamine</i>	<i>Stimulant</i>	106.9	3.9	116.4	3.5	90	13	107	18	86.1	3.8	73.5	9.7	78.5	0.8
<i>Labetalol</i>	<i>β-blocker</i>	123	18	83	13	102.0	3.9	77	19	66.6	1.0	41.4	8.7	61.4	8.1
<i>Letrozole</i>	<i>Aromatase Inhibitor</i>	107.7	4.8	96	11	87	13	89	23	82.2	7.5	88	12	79.6	3.2
<i>Lidocaine</i>	<i>Anesthetic</i>	122	25	104.5	5.4	99.4	1.0	108.6	7.2	63.8	1.5	57	11	89.3	4.7
<i>LSD</i>	<i>Narcotic</i>	120.9	6.5	107.0	4.0	102.1	1.5	101.3	5.6	69.5	1.9	66.5	4.4	91.3	1.8
<i>MDA</i>	<i>Stimulant</i>	62	16	94.7	9.3	100.6	2.4	102	10	59.6	5.9	0	N/D	10.9	4.3
<i>MDEA</i>	<i>Stimulant</i>	98	11	105.0	7.3	102.2	1.6	102.7	7.4	64.6	1.4	1	36	14.3	9.2
<i>MDMA</i>	<i>Stimulant</i>	127	20	99.9	3.1	123.3	7.0	102.8	7.8	61.3	4.5	3	33	20.0	5.2
<i>Medroxyprogesterone</i>	<i>Steroid</i>	96.2	2.8	93.0	3.4	91.1	3.0	90.9	5.6	83.2	3.6	60	28	81	14
<i>Mefenorex</i>	<i>Stimulant</i>	109.2	4.4	105	10	99.0	2.9	95.4	6.7	70.4	1.8	57.1	8.0	90.2	1.8
<i>Meloxicam</i>	<i>Anti-inflammatory</i>	99.0	3.1	90.2	4.6	91.0	3.2	96.9	2.7	0	N/D	78	70	0	N/D
<i>Meperidine</i>	<i>Narcotic</i>	110.8	5.6	89	42	94.5	7.2	106.2	4.9	69.1	1.2	41.9	4.0	85.6	4.8
<i>Mesterolone</i>	<i>Steroid</i>	72	13	96.5	5.6	96.4	5.0	34	82	97.8	3.4	73	23	76.0	6.4
<i>Metaproterenol</i>															
<i>(Orciprenaline)</i>	<i>β2-agonist</i>	62	22	100.6	8.0	100.4	8.8	69.8	9.0	16	22	6	34	12	29
<i>Methadone</i>	<i>Narcotic</i>	111.6	3.5	120.1	4.3	110	29	106	18	80.9	4.7	83.8	4.0	77.6	3.0
<i>Methamphetamine</i>	<i>Stimulant</i>	102.4	4.9	133.1	6.4	91	17	104	21	25.0	4.4	0	N/D	14.9	7.9
<i>Methandienone</i>	<i>Steroid</i>	101.8	2.5	105.8	5.0	102.7	6.0	0	N/D	63.2	5.2	73.4	7.7	90.0	1.6
<i>Methoxyphenamine</i>	<i>Stimulant</i>	95.0	4.0	97.6	6.6	82.4	5.4	101.8	3.4	66.0	2.6	0	N/D	10	24
<i>Methylephedrine</i>	<i>Stimulant</i>	105	40	85.0	6.1	82	20	89.4	8.7	15	10	2	14	19.8	5.6
<i>Methylphenidate</i>	<i>Stimulant</i>	81.7	5.5	104.0	5.8	105	16	108	15	76	25	25.7	5.2	72	24
<i>Metricrane</i>	<i>Diuretic</i>	113	10	103.8	6.2	99	11	81	23	74.2	4.6	100.1	8.9	80.2	2.0
<i>Metolazone</i>	<i>Diuretic</i>	89.6	6.0	99.7	5.1	97.4	2.4	39	79	90.9	3.3	79	11	77.8	3.0
<i>Metoprolol</i>	<i>β-blocker</i>	119	13	117.3	4.1	89	13	96	20	80.6	3.8	0	N/D	11.8	7.9
<i>Morphine</i>	<i>Narcotic</i>	106	14	108.8	6.0	86	23	57	69	79	15	5	71	9.1	8.5
<i>Nadolol</i>	<i>β-blocker</i>	86.7	8.6	100.5	4.9	91	13	33	77	29	40	0	N/D	2	12
<i>Nandrolone</i>															
<i>(19-Nortestosterone)</i>	<i>Steroid</i>	81.1	5.5	100.5	6.3	93.7	3.8	109.2	2.3	79	24	83.6	6.7	81.7	4.3
<i>Nateglinide</i>	<i>Antidiabetic</i>	96.4	3.2	88.0	2.8	89.7	1.9	98.1	4.0	79.4	6.0	76	41	0	N/D
<i>N-Desmethylselegiline</i>	<i>Metabolito de Selegiline (Stimulant)</i>	97.9	2.8	88.9	5.8	103.2	4.2	83.5	8.9	82	10	51	23	83	11
<i>Nicotine</i>	<i>Stimulant</i>	8	19	7	36	60	29	130.0	6.0	91	74	0	N/D	13.1	6.9
<i>Norcocaine</i>	<i>Cocaine Metabolite (Stimulant)</i>	94	12	97.9	5.4	80.2	2.6	101.4	6.6	84.6	6.6	18.4	9.4	62.2	8.0
<i>Norcodeine</i>	<i>Codeine Metabolite (Narcotic)</i>	80	16	90.6	5.7	77	10	92.6	8.1	47.4	6.6	0	N/D	3	34
<i>Norethandrolone</i>	<i>Steroid</i>	98.2	3.0	93.0	4.1	91.5	3.6	105.9	5.5	83.4	5.0	64	20	80	10

Norethindrone	Steroid	59	20	97.7	5.6	97.0	4.5	48	74	95.6	2.5	81	11	80.0	4.0
Norfenfluramine	Fenfluramine Metabolite	112.7	5.1	89	21	99.0	5.8	99.4	7.3	68.8	1.4	33.2	2.5	34.9	8.6
Norfentanyl	Fentanyl Metabolite(Narcotic)	98	23	95.4	4.8	87.4	2.1	35	84	50.0	9.6	0	N/D	0	N/D
Norgestrel	Steroid	59	19	96.7	4.2	95.8	4.2	42	75	95.4	3.0	78	13	77.8	4.0
Normorphine	Morphine Metabolite (Narcotic)	60	11	82.2	7.9	56	28	0	N/D	4	16	0	N/D	1	23
Noroxycodone	Narcotic	81	11	99	12	68	21	104.9	8.1	56	24	0	N/D	5	12
Octopamine	Stimulant	20	24	79	11	0	N/D	0	N/D	0	N/D	0	N/D	10	33
Oxilofrine	Stimulant	82.5	8.1	42	17	0	N/D	0	N/D	0	N/D	22	30	0	N/D
Oxycodone	Narcotic	69.3	6.1	100.3	9.0	0	N/D	98.3	4.7	65	23	3	11	26.7	5.1
Oxymorphone	Narcotic	111	14	104.9	5.6	88	16	97	32	49	16	0	N/D	18.0	7.9
Penbutolol	β -blocker	96.1	5.5	104.0	3.6	106.6	3.7	93.8	9.9	66.7	2.0	69.8	7.6	85.6	2.3
Pentobarbital	Narcotic	85.2	8.4	99	16	99	11	94	12	0	N/D	0	N/D	91.8	9.3
Pentoxifylline	Anticoagulant	79.5	5.2	105.6	2.9	106.0	6.6	108.5	4.3	69.1	2.8	56	13	58	13
Pentylenetetrazole	Stimulant	106.2	3.5	112.2	6.5	82	12	98	17	85.7	7.2	58.1	9.4	68	12
Phenobarbital	Narcotic	98	17	86	20	85	12	0	N/D	54	13	0	N/D	87.8	6.7
Phenylephrine	Stimulant	14	16	0	N/D	0	N/D	0	N/D	3	18	10	43	0	N/D
Picrotin	Stimulant	104	25	87	19	87	32	0	N/D	98	32	0	N/D	91	25
Picrotoxinin	Stimulant	92	16	0	N/D	98.9	6.0	93.9	6.6	82.1	5.5	0	N/D	74	28
Pindolol	β -blocker	136.2	9.7	116	17	76.9	6.3	34	19	71.2	3.4	5	28	14	15
Piretanide	Diuretic	94.7	5.1	105.7	5.4	107.8	4.8	89.6	4.5	59.0	3.2	175	49	1	184
Prednisolone	Glucocorticosteroid	76.7	9.4	97	6	88	13	72	23	90.5	7.9	89.8	6.9	76.1	3.6
Prednisone	Glucocorticosteroid	82.3	7.2	95.6	2.2	96.0	6.6	36	74	92.7	3.2	98.4	5.6	77.8	3.2
Probenecid	Diuretic	111.7	3.1	112.5	5.2	85	13	37	37	79.0	3.8	73	32	81.5	2.7
Propafenone	Antiarrhythmic Agent	83.7	5.1	102.0	5.5	77	12	71	11	75	27	70.4	9.7	64.4	4.9
Propoxyphene	Analgesic	98.6	4.5	108.7	8.2	108.4	4.4	107.0	4.8	71.1	0.6	77.9	6.4	89.2	2.1
Propranolol	β -blocker	80.9	3.5	97.2	6.6	80	11	88.3	5.7	72	26	48.8	7.8	41.4	4.8
Propylhexedrine	Stimulant	101.5	5.0	108.5	4.5	101.9	4.1	94.4	4.5	59.7	2.0	10.3	2.9	12.8	4.5
Repaglinide	Antidiabetic	82.8	6.9	98.2	4.7	97.8	3.4	27	85	95.3	3.3	69.2	9.5	0	N/D
Ritodrine	β 2-agonist	16	10	103.8	6.7	85	16	28	91	90.9	8.6	14	18	26.8	6.9
Salbutamol	β 2-agonist	37.4	7.0	96.1	4.7	93.7	3.5	100.1	6.8	2	24	1	37	2	34
Salicylamide	Analgesic	100.8	6.9	76.2	6.0	83.3	8.8	71	14	88.6	7.7	93	12	77.0	4.7
Salmeterol	β 2-agonist	77.7	4.8	96.9	11	77	11	58	12	75	26	66	23	0	N/D
Selegiline (Deprenil)	Stimulant	99.8	2.4	93.8	5.4	0	N/D	96.1	4.9	0	N/D	111	18	83	18
Sotalol	β -blocker	114	14	105	12	106.8	8.5	91	11	20	10	0	N/D	5	13
Spirololactone	Diuretic	92.4	5.5	0	N/D	101.0	7.2	98.1	5.9	68.1	3.5	73.3	7.3	87.2	2.8
Stanozol	Steroid	109.6	3.9	112.0	7.9	90	14	83.9	25	70.1	4.5	86	41	79.8	3.9
Strychnine	Stimulant	80.9	7.0	88	16	50	14	111.5	3.5	70	24	0	N/D	19.9	8.4
Tamoxifen	SERM	94	26	96	22	14	91	36.2	18	43	19	50	47	57.0	5.5
Terbutaline	β 2-agonist	55	27	104.4	7.5	94.0	6.0	35.2	80	4	22	2	144	5.6	7.4

<i>Testosterone</i>	<i>Steroid</i>	111.5	2.1	109.5	5.6	90	13	93.0	21	81.9	5.3	92	12	79.2	3.4
<i>Tibolone</i>	<i>Steroid</i>	91.7	4.7	74.9	5.4	97.5	7.6	124.4	2.4	78.8	5.1	79	24	44	14
<i>Timolol</i>	<i>β-blocker</i>	87.1	6.0	88.8	3.5	97.8	4.2	43.4	79	90.8	5.4	7.3	6.2	15.6	6.8
<i>Tolazamide</i>	<i>Antidiabetic</i>	89.6	6.7	99.1	5.3	97.1	3.5	41.5	83	99.5	3.6	81.0	2.7	18	23
<i>Tolbutamide</i>	<i>Antidiabetic</i>	98.2	6.1	96.3	4.8	89.8	3.9	104.9	3.6	81.3	4.5	68	14	69	15
<i>Torasemide</i>	<i>Diuretic</i>	108.1	6.5	104.8	3.6	102.4	3.0	105.8	3.0	64.5	2.6	74.5	4.1	1	168
<i>Toremifene</i>	<i>SERM</i>	78.2	6.8	124	35	47	46	66	19	37	13	37	72	67.0	3.8
<i>Triamcinolone</i>	<i>Glucocorticosteroid</i>	81	17	105	12	0	N/D	0	N/D	89	14	0	N/D	34.7	3.8
<i>Triamterene</i>	<i>Diuretic</i>	121	33	111.7	7.2	99.7	3.5	103.5	5.2	66.7	1.9	6.8	5.6	8	18
<i>Trichlormethiazide</i>	<i>Diuretic</i>	97.6	8.8	81	17	84.8	8.9	0	N/D	75	11	43	25	90.2	3.4
<i>Turinabol</i>	<i>Diuretic</i>	91.9	7.9	87.0	3.3	92.6	4.7	42	80	94.8	6.9	79	11	81.9	3.5
<i>Vanillic acid diethylamide</i>	<i>Stimulant</i>	101.2	3.9	95.8	4.7	96.4	3.5	107.4	2.9	88.8	5.7	73	14	83.5	9.6
<i>Warfarin</i>	<i>Anticoagulant</i>	89.5	4.4	103.4	4.9	103.5	5.7	104.4	3.8	67.4	4.0	77	26	88.9	5.6

Reverse-Phase SPE cartridges

SPE Bond Elut PLEXA cartridges

Bond Elut Plexa is a non-polar divinylbenzene-based neutral polymeric sorbent. This sorbent has a non-polar retention mechanism and is recommended for non-ionic extraction of a wide range of acidic, neutral and basic analytes from different matrices. More than 80% of the studied compounds showed good recoveries (70-120%) and RSD below 15% as shown in **Figure 1**. Recovery and RSD values obtained for all the compounds are shown in **Tables 2** (concentration level $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) and **3** (concentration level $25 \mu\text{g L}^{-1}$), and also plotted as 2D-plot vs retention time in **Figure 1**. The results were highly satisfactory with all the compounds recovered at both concentration levels, proving that polymeric cartridges obtain adequate recoveries regardless of the polarity or nature of the analyte. In spite of the great heterogeneity of the studied analytes, the average recovery rate for all the analytes was higher than 90% and only 5 analytes (heptaminol, metaproterenol, nicotine, hexobarbital and hydroflumethiazide) showed a recovery percentage lower than 50% in any of the concentration level tested. It should be noted that the first three species eluted near the void (ca. retention time 1.5 min). Therefore, the results were excellent and prove the usefulness of this SPE-based procedure for the targeted application.

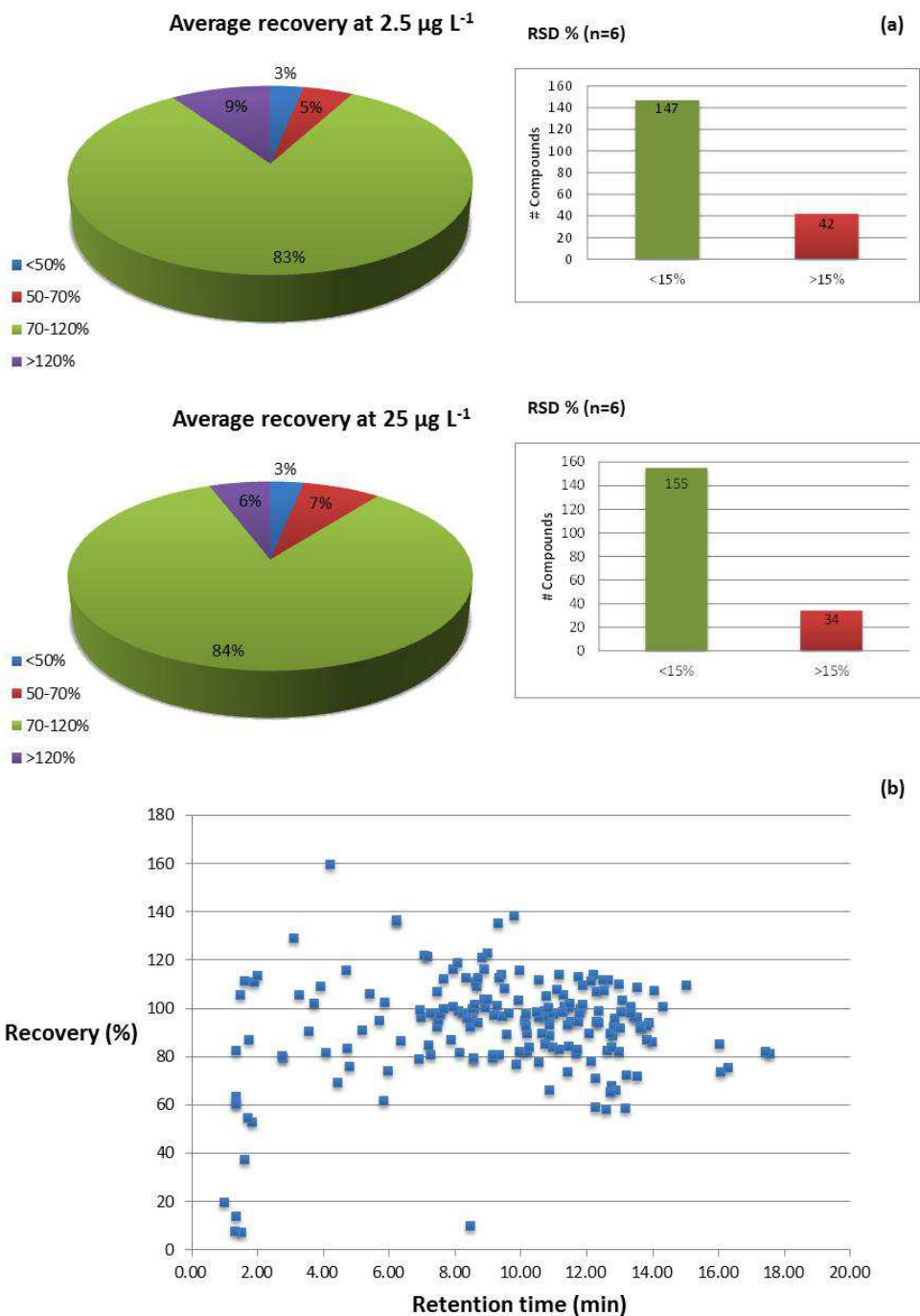


Figure 1. (a) Average recovery values and RSD (n=6) obtained for the 189 compounds using Bond Elut PLEXA polymeric cartridges; (b) 2D plot representing the recovery percentages over the entire LC run, for the selected extraction method (25 $\mu\text{g L}^{-1}$ level)

SPE Oasis HLB cartridges

Oasis HLB cartridges contain as sorbent a copolymer designed to have a hydrophilic-lipophilic Balance (HLB). This reversed-phase sorbent is recommended for the extraction of acidic, basic and neutral compounds in aqueous matrices. Therefore, the mechanism and expected analyte coverage should be similar to the previous method. In fact, good recoveries (70-120%) were found for most of the studied analytes, especially at the highest level of concentration, and RSD values were better than 15% for more than 80% of the compounds as shown in **Figure 2**. Similarly to the other polymeric cartridge tested, and despite the wide heterogeneity of the analytes, the average recovery was higher than 95% and only two compounds showed recovery values below 50%, although 5 compounds were not recovered with this cartridge (at 25 $\mu\text{g L}^{-1}$), presumably due to their high polarity. The precision (RSD values) obtained with this approach was also satisfactory with RSD values within 15 % in most cases. Detailed recovery values and RSD obtained for all the compounds included in the study at both concentration levels are shown in **Tables 2** and **3**, and also plotted as 2D-plot vs retention time in **Figure 2**. The results demonstrate again that polymeric cartridges are a convenient and versatile approach applicable to any analyte independently of its nature or polarity

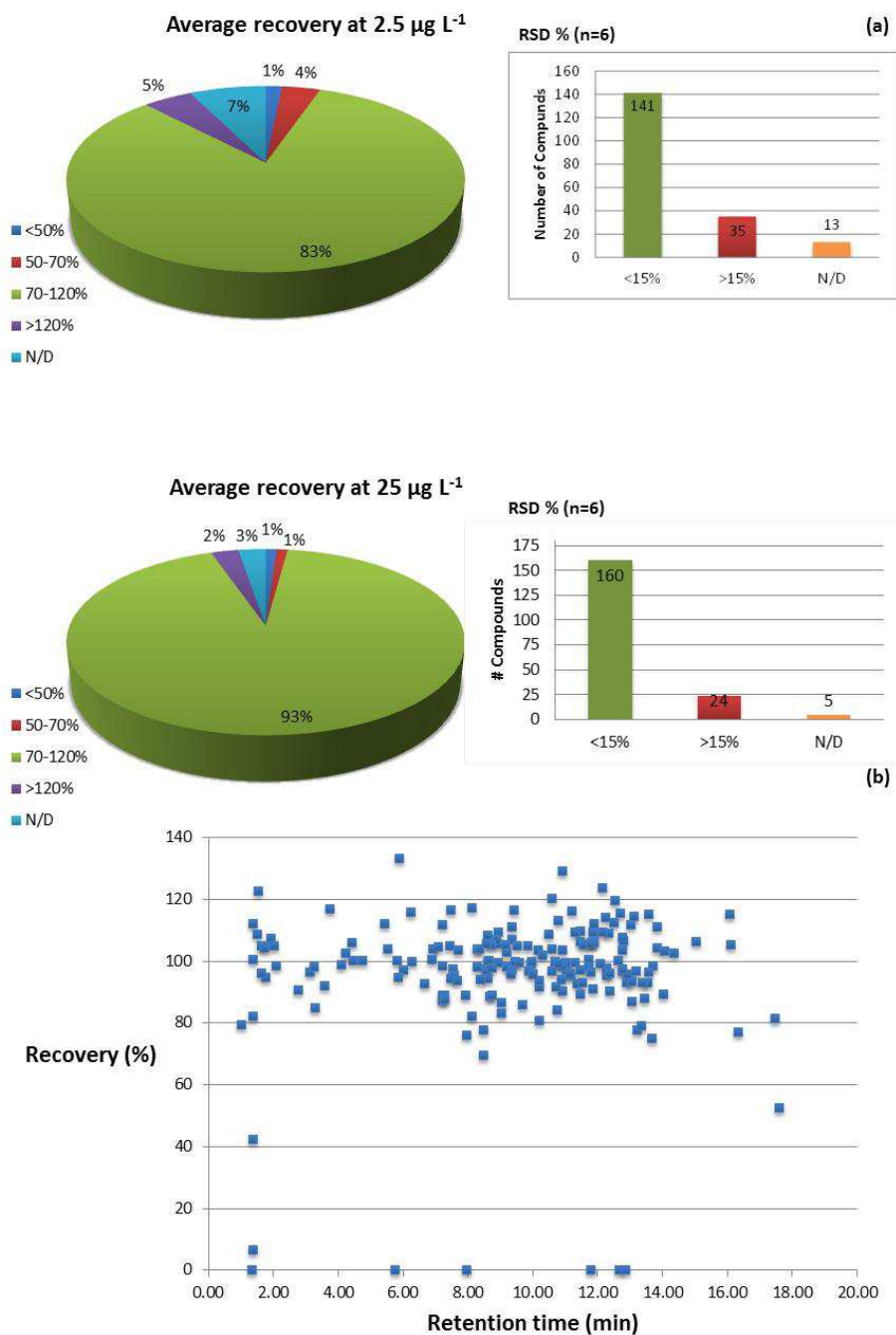


Figure 2. (a) Average recovery values and RSD (n=6) obtained for the 189 compounds using Oasis HLB polymeric cartridges; (b) 2D plot representing the recovery percentages over the entire LC run, for the selected extraction method (25 µg L⁻¹ level)

SPE Discovery DSC-18 cartridges

Discovery DSC-18 cartridges are filled with a polymerically-bonded octadecyl sorbent. This reversed-phase sorbent retains organic analytes from aqueous matrices, but is not recommended for polar molecules. The recovery values obtained for more than 85% of the analytes were in the range 70-120%, with RSD values below 15% for more than 75% of the compounds as is shown in **Figure 3(a)**. Seven compounds were not recovered with this sorbent (at the highest fortification level), due to their high polarity, and the average recovery for all the studied compounds was around 90%, with only five compounds showing recovery values below 50%. Recovery and RSD values for all the analytes are detailed in **Tables 2** and **3**. These results indicate that C₁₈ bonded sorbents are indicated for most of compounds, except for very polar compounds, which are not retained in this sorbent. This also suggest that this approach is not particularly useful for conjugated metabolites (glycosides or sulphate derivatives), so overall it has not as high coverage as the two previous polymeric-type SPE methods.

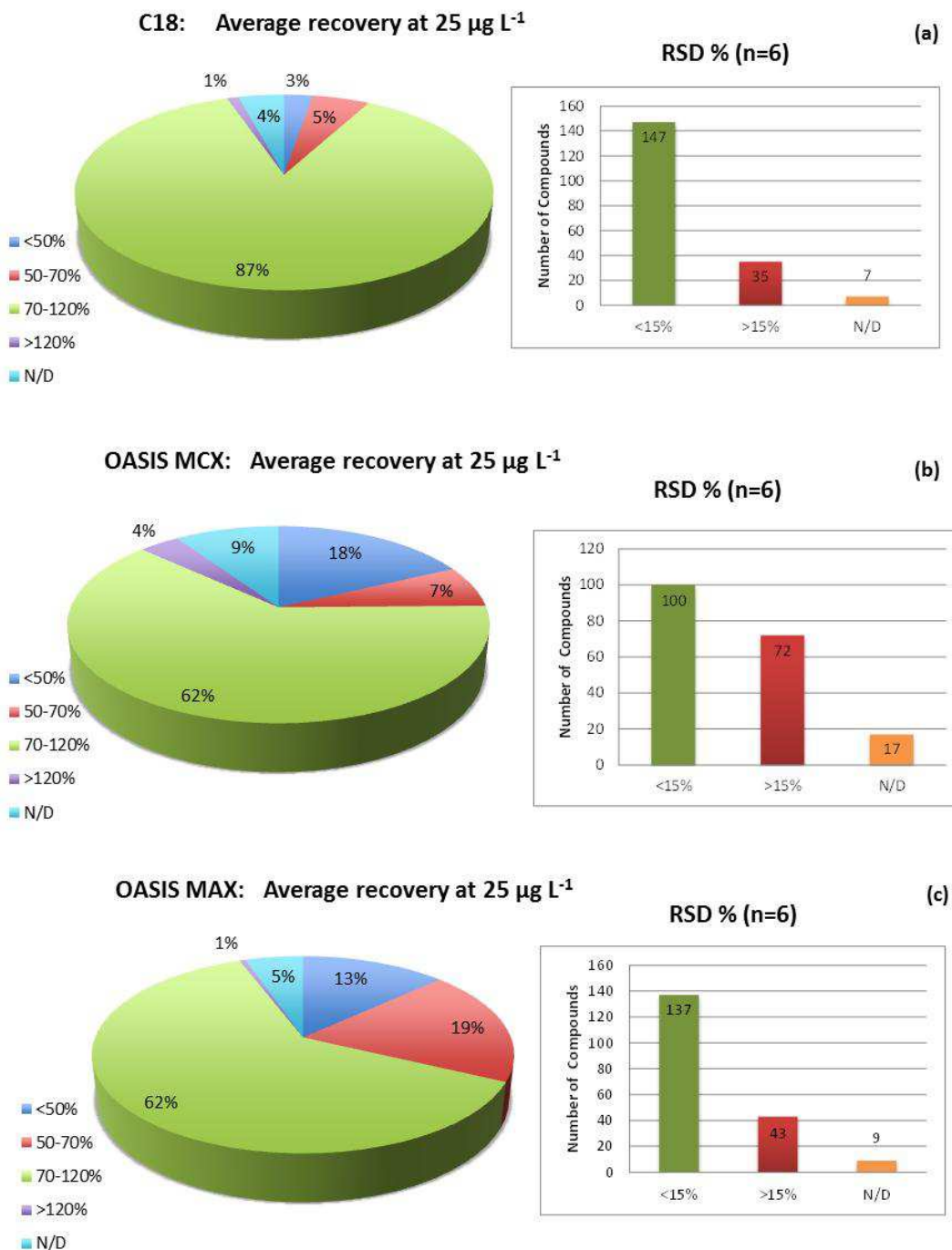


Figure 3. Average recovery values and RSD (n=6) obtained for the 189 compounds (25 µg L⁻¹ level), using (a) Oasis Discovery DSC-18 reverse-phase cartridge; (b) Oasis MCX mixed-mode/cationic exchange cartridges; (c) Oasis MAX mixed-mode/anionic exchange cartridge

Mixed-mode SPE cartridges

SPE Oasis MCX mixed-mode cartridges

Oasis MCX cartridges contain a mixed-mode polymeric ion exchanger polymer with hydrophobic and strong cation exchange capabilities (sulfonate group). It is recommended for the extraction of basic analytes, so in order to improve ion exchange interactions, the analytes should be ionized prior to the extraction, which makes necessary the acidification of the sample prior to the extraction (using 2 mL of 5 % 0.1 M HCl aqueous solution). Good recoveries between 70 and 120% were obtained for more than 60% of the compounds, with RSD values below 15 for more than 50% of the analytes. Due to the cationic exchange nature of these cartridges, a relatively high number of compounds were not retained, or the recovery values were lower than 50%. These results are illustrated in **Figure 3b**. Average recovery for all the recovered analytes is higher than 80%, but about 18% of the compounds showed a recovery value below 50% and up to 17 compounds were not recovered at all at the highest concentration. These results show that mixed mode-cation exchange sorbents are not indicated for large-scale multiclass methods, but better for some class-specific applications with certain analytes in a determined range of pK_a . Detailed recovery values and RSD are included in **Tables 2 and 3**.

SPE Oasis MAX mixed-mode cartridges

Oasis MAX cartridges consist of a mixed-mode polymeric ion exchanger with hydrophobic and strong anion exchange capabilities (dimethyl butylamine group). This mixed mode sorbent is suitable for the extraction of acidic analytes so it is recommended the ionization of the analytes, increasing the pH of the sample prior to the extraction, with 50 mM sodium acetate buffer at pH 7. Details of the recovery and RSD values obtained for all the analytes in the study are shown in **Tables 2** and **3**. Recovery values obtained with these cartridges were in the range 70-120 for about 60% of the compounds, while about 70% of the compounds showed RSD below 15% as shown in **Figure 3(c)**. Similarly to the case of MCX cartridges, the primary ion-exchange nature of this sorbent compromises the recovery of the compounds which were not ionized under the pH conditions of the extraction procedure, so up to 20% of the compounds showed poor recovery values (below 50%) or even were not recovered with this sorbent.

LLE with MTBE

LLE with non-polar solvents is recommended for the extraction of non-polar analytes in aqueous matrices such as urine. In this case, the choice of the performance and class of analytes tentatively extracted from urine strongly depends on the nature of the solvent, which must be non miscible with water, In this study, MTBE was selected due to its slight polarity with favours the extraction

of moderate polar compounds based on previous literature [30, 31]. Alternatively, other authors have proposed both diethyl ether and ethyl acetate [8, 21]. In fact, there are not significant differences on polarity amongst them; MTBE and diethyl ether has practically the same relative polarity while ethyl acetate is a little bit more polar, which may increase slightly the performance for more polar and water soluble compounds, at the expense of decreasing the recoveries for less polar species such as steroids though. The results obtained with this approach were really poor for a relatively large number of species as can be seen in **Figure 4**, where the recoveries obtained with MTBE LLE are plotted versus the retention time. The performance of LLE (regardless the solvent used) for moderately polar sport drugs is really poor compared to the results obtained with any of the polymeric-SPE procedures (**Figures 1 and 2**). Only about 30% of the compounds studied showed recovery values higher than 70%, and more than 20% of the compounds were not recovered at all or their recovery value was lower than 10%. These bad extraction values are especially worse with the lower concentration level, where 35% of the compounds are not recovered at all. RSD values are below 15% for between 50% and 60% of the recovered analytes. Recovery values and RSD obtained for all the compounds are shown in **Tables 2 and 3**, showing an average recovery value rounding 50% for the recovered analytes.

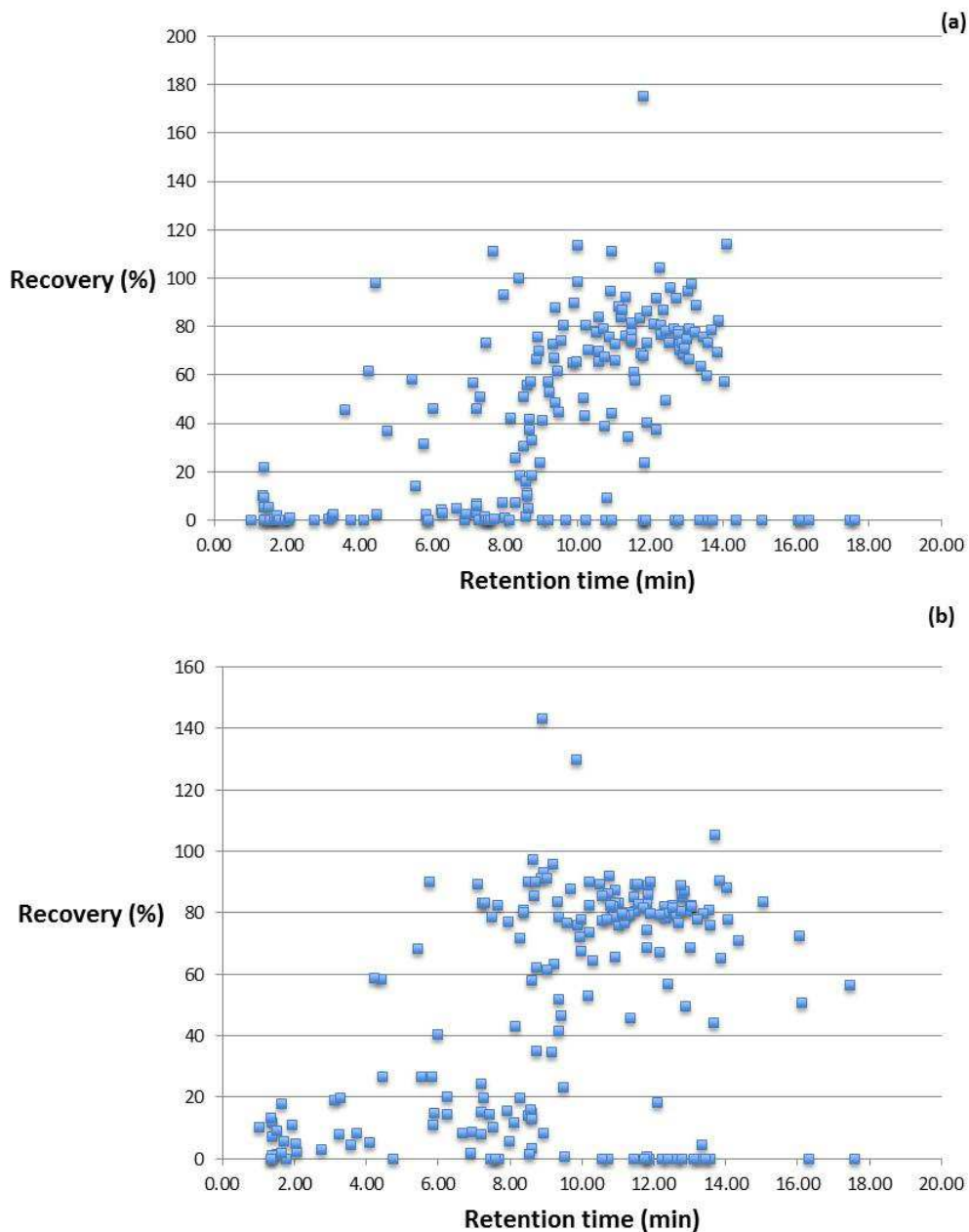


Figure 4. 2D plot representing the recovery percentages ($25 \mu\text{g L}^{-1}$ level) obtained for the 189 compounds over the entire LC run using: (a) using LLE with MTBE; (b) Chem Elut cartridges with MTBE

The retention time may somewhat be used as an indicator of $\log K_{ow}$. Therefore, it is straightforward to interpret that only one extraction mechanism take place in the LLE, and since the solvents used should be non-miscible with water such as MTBE or ethyl acetate, the extraction of polar compounds is poor, while in the case of the selected polymeric SPE cartridges (*eg.* Oasis HLB or PLEXA), different mechanisms (both ionic-exchange type and nonpolar adsorption) may occur. In LLE, only one mechanism of retention is ruling out the extraction, and so, the overall extraction performance can be correlated with retention time as shown in **Figure 4**. The main conclusion is that there is no solvent able to provide adequate performance for the extraction of the 190 tested compounds given the array of physicochemical properties and features. Most of the compounds tested have polar groups in their structure, so they cannot be extracted from the aqueous matrix using organic solvents. The use of other solvent may have yielded some minor changes but would have not change the overall picture at all. In view of the results, can be concluded that LLE is not the best suited extraction procedure for multiclass drug testing.

Supported Liquid Extraction (SLE) cartridges (Chem Elut)

As an alternative approach to both SPE and LLE, SLE was also evaluated with Chem Elut cartridges, which are packed with specially cleaned and sized diatomaceous earth. This sorbent acts as a support on which is absorbed the aqueous sample forming a thin film with a high surface area where occurs the liquid-liquid

extraction with the solvent. SLE is presented as an alternative to liquid-liquid extraction and is indicated for the extraction of non-polar compounds in aqueous matrices. The results obtained with SLE, plotted in **Figure 4(b)** were not as positive as the other approaches tested. About 45% of the studied compounds showed recovery values better than 70%, and more than 20% of the compounds were not recovered at all or their recovery was lower than 10%. RSD values were lower than 15% for more than 65% of the compounds. Average recovery value for the recovered analytes was 56%. The detailed values are provided in **Tables 2** and **3**. These results are somewhat consistent with those results obtained with LLE, although slightly higher recoveries were obtained for most of the compounds with SLE. In spite of this slight improvement in the recovery values for most of the compounds compared with classical LLE, this method is not the more appropriate for multiclass testing of sport drugs in urine, although it can be eventually suitable for the analysis of selected compounds such as steroids or glucocorticosteroids, due to its relatively low polarity which favours the extraction with this method.

Table 4. Summary of the results obtained with the seven approaches for large-scale sport drug testing at 25 µg/L

Method	Conc. Level µg/L	# Compounds with Recoveries > 50 %	# Compounds with Recoveries between 30 and 50 %	# Compounds with Recoveries < 30 %	# Compounds not recovered (0%)
SPE PLEXA	2.5	184	3	2	-
	25	186	-	3	-
SPE Oasis HLB	2.5	174	1	1	13
	25	182	1	1	5
SPE C18	2.5	171	1	2	15
	25	177	4	1	7
SPE MCX	2.5	153	4	2	29
	25	139	26	7	17
SPE MAX	2.5	159	4	9	17
	25	155	6	19	9
LLE	2.5	73	30	20	66
	25	94	20	37	38
SLE (<i>Chem Elut</i>)	2.5	94	16	43	36
	25	105	9	53	22

Concluding remarks

For many reasons, the best possible sample preparation approach in Analytical Chemistry is no doubt the absence of sample treatment. In this context, dilute-and-shoot methods based on direct injection of urine after dilution with buffer is a promising strategy that surely will gain acceptance in the field of large-scale multiclass sport drug testing as the instrument performance and sensitivity permits in the near future, although it yet has some drawbacks such as reduced analyte detectability, matrix effects, retention time shifts and also chromatographic peak shape issues. Therefore, the use of a sample preparation

stage is yet the more reliable approach for the simultaneous multiclass screening of hundreds of sport drugs.

For this purpose, in this work, seven extraction protocols, including SPE with five different sorbents (Bond Elut PLEXA, Oasis HLB, C-18, Oasis MCX and Oasis MAX), liquid-liquid extraction and solid-supported liquid extraction with ChemElut cartridges were evaluated for large-scale multi-class analysis of 189 doping agents in urine. From the results obtained (**Table 4**), the use of SPE with polymeric cartridges (both PLEXA and HLB) are the best choice for routine multiclass sport drugs screening methods, obtaining absolute superior performance in terms of higher recoveries and good RSD values than the other approaches. In addition, matrix effects were assessed for a selected group of representative species with both polymeric SPE methods (PLEXA and OASIS HLB), obtaining moderate signal suppression between 10 and 30 %, for 85 % of the compounds tested, which is remarkably low given the matrix studied. On the other hand, from the data obtained, mixed-mode cartridges are highly suitable for selected class specific applications and liquid-liquid extraction or supported liquid-liquid extraction only obtained remarkable recoveries for less polar compounds, slightly better for SLE. Along with the excellent results of polymeric sorbents in terms of analyte coverage, SPE approaches offers additional known advantages such as low solvent consumption, enhanced automation and precision and the possibility of direct coupling with LC-MS. Sensitivity increase (due to the preconcentration factor),

partial matrix removal, reduced and enhanced ruggedness of the instrument performance over large batch of samples are also advantages of these SPE approaches.

Referencias

- 1 M. Thevis, A. Thomas, V. Pop, W. Schänzer, Ultrahigh pressure liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations, *J. Chromatogr. A*, 1292 (2013) 38-50.
- 2 M. Thevis, G. Opfermann, W. Schaezner, Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for β 2-agonists in human or equine urine, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 1197-1206.
- 3 M. Mazzarino, X. de la Torre, F. Botrè, A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 681-698.
- 4 O.J. Pozo, R. Ventura, N. Monfort, J. Segura, F.T. Delbeke, Evaluation of different scan methods for the urinary detection of corticosteroid metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 929-944.
- 5 M.E. Toubert, M.C. van Engelen, C. Georgakopoulos, J.A. van Rhijn, M.W.F. Nielen, Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 137-146.
- 6 E.D. Virus, T.G. Sobolevsky, G.M. Rodchenkov, Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 949-957.
- 7 O.J. Pozo, K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, Efficient Approach for the Comprehensive Detection of Unknown Anabolic Steroids and Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1709-1720.
- 8 A. Vonaparti, E. Lyris, Y.S. Angelis, I. Panderi, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, R.J.B. Peters, M.W.F. Nielen, C. Georgakopoulos, Preventive doping control screening analysis of prohibited substances in human urine

- using rapid-resolution liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1595-1609.
- 9 O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, H. Elbardissy, S. Grimalt, J.V. Sancho, F. Hernandez, R. Ventura, F.T. Delbeke, Comparison between triple quadrupole, time of flight and hybrid quadrupole time of flight analysers coupled to liquid chromatography for the detection of anabolic steroids in doping control analysis, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 107-120
 - 10 C.G. Georgakopoulos, A. Vonaparti, M. Stamou, P. Kioussi, E. Lyriss, Y.S. Angelis, G. Tsoupras, B. Wuest, M.W.F. Nielen, I. Panderi, M. Koupparis, Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21 (2007) 2439-2446.
 - 11 J. Thörngren, F. Oestervall, M. Garle, A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC–MS/MS, *J. Mass Spectrom.*, 43 (2008) 980-992.
 - 12 A. Vonaparti, E. Lyriss, I. Panderi, M. Koupparis, C. Georgakopoulos, Direct injection liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. II. Determination of theobromine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1020-1028.
 - 13 F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, L. Avois, M. Saugy, S. Rudaz, J.-. Veuthey, Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry: I. Screening analysis, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4423-4433.
 - 14 A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC–TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine, *Anal. Chim. Acta*, 586 (2007) 13-21.
 - 15 K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry:

- Comparison between liquid–liquid extraction and direct injection, *J. Chrom. A*, 1216 (2009) 5819-5827.
- 16 K. Deventer, O.J. Pozo, A.G. Verstraete, P. Van Enoo, Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology, *Trends Anal. Chem.* 55 (2014), 1-13.
 - 17 J.O. Thorngren, F. Osterwall, M. Garle, A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC–MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 980-992.
 - 18 A. Jiménez, K. Deventer, K. Roels, P. Van Enoo, Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC–HRMS for doping control, *Anal. Chim. Acta* 721 (2012) 137-146.
 - 19 S. Guddat, E. Solymos, A. Orlovius, A. Thomas, G. Sigmund, H. Geyer, M. Thevis, W. Schänzer, High-throughput screening for various classes of doping agents using a new ‘dilute-and-shoot’ liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach, *Drug Test Anal.* 3 (2011) 836-850.
 - 20 A. Pelander, I. Ojanpera, S. Lacks, I. Rasanen, E. Vuori, Toxicological Screening with Formula-Based Metabolite Identification by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5710-5718.
 - 21 M. Kolmonen, A. Leinonen, A. Pelander, I. Ojanperae, A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 94-102.
 - 22 M. Kolmonen, A. Leinonen, T. Kuuranne, A. Pelander, I. Ojanperae, Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography—time-of-flight mass spectrometry for high-throughput screening in doping analysis, *Drug Test. Anal.* 1 (2009) 250-266.
 - 23 R.J.B. Peters, J.E. Oosterink, A.A.M. Stolker, C. Georgakopoulos, M.W.F. Nielen, Generic sample preparation combined with high-resolution liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry for unification of urine

- screening in doping-control laboratories, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2583-2598.
- 24 F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, S. Rudaz, J.-. Veuthey, Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4109-4119.
- 25 Y. Moulard, L. Bailly-Chouriberry, S. Boyer, P. Garcia, M.-. Popot, Y. Bonnaire, Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control, *Anal. Chim. Acta* 700 (2011) 126-136.
- 26 L. Hintikka, T. Kuuranne, A. Leinonen, M. Thevis, W. Schänzer, J. Halket, D. Cowan, J. Grosse, P. Hemmersbach, M.W.F. Nielen, R. Kostianen, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of glucuronide-conjugated anabolic steroid metabolites: method validation and interlaboratory comparison, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 965-973.
- 27 G.J. Murray, J.P. Danaceau, Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3857-3864.
- 28 A. Musenga, D.A. Cowan, Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control, *J. Chromatogr. A* 1288 (2013) 82-95.
- 29 I. Marchi, S. Rudaz, J.-. Veuthey, Sample Preparation Development and Matrix Effects Evaluation for Multianalyte Determination in Urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 459-467.
- 30 M. Mazzarino F. Botré, A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3465-3476.
- 31 M. Mazzarino, I. Fiacco, X. de la Torre, F. Botrè, Screening and confirmation analysis of stimulants, narcotics and beta-adrenergic agents in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8156-8167.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Screening and confirmation capabilities of liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of 200 multiclass sport drugs in urine



Juan C. Domínguez-Romero, Juan F. García-Reyes, Felipe J. Lara-Ortega, Antonio Molina-Díaz*

Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Paraje Las Lagunillas, E-23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2014
Received in revised form
15 October 2014
Accepted 24 October 2014
Available online 31 October 2014

Keywords:

Liquid chromatography
High resolution mass spectrometry
Doping
Sport drug testing
Time-of-flight
Metabolites
Urine
Screening
Confirmation

ABSTRACT

In this article, a screening method for the determination of 200 sport drugs in human urine has been developed using liquid-chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC-TOFMS). The chromatographic separation of the targeted doping agents was carried out by fast liquid chromatography using a C₁₈ column (4.6 × 50 mm) with 1.8 μm particle size. Accurate mass measurements of the selected ion (typically [M+H]⁺ and [M-H]⁻) along with retention time matching was used for the screening and detection of the targeted species. The proposed methodology comprised also a simple sample treatment stage based on solid-phase extraction (SPE) with polymeric cartridges. The SPE method displayed satisfactory recoveries rates (between 70 and 120%) for the majority of the compounds at both concentration levels tested (2.5 and 25 μg L⁻¹). The overall performance of the method was satisfactory with all 200 compounds fulfilling WADA minimum required performance levels (MRPLs), with limits of quantitation lower than 1 μg L⁻¹ for 80% of the compounds, and showing an appropriate linearity (r² > 0.99) in most cases. Additionally, the ability of “in-source” collision induced dissociation (CID) for confirmatory purposes was examined using as criterion the presence of two high-resolution ions with relevant abundances for unambiguous confirmation. This stringent criterion was fulfilled for 75% of the species using in-source CID fragmentation. The use of an improved approach based on CID performed on a dedicated collision cell without precursor ion selection (using a Q-TOF) provided at least two ions in all cases with the exception of 2-aminoheptane. Finally, based on the use of diagnostic fragment ions, a workflow for the comprehensive screening and identification of non-targeted compounds (*viz.* compounds with no primary standards or retention time information available, such as metabolites) has been also examined using rat urine samples. The proposed screening method has proved to be effective for the analysis of targeted compounds, and also for the identification of metabolites, expanding easily the search for doping agents not only limited to specific banned parent compounds but also to derivate compounds with similar structure as well as metabolites.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

III.2. Desarrollo de un método de análisis cualitativo y cuantitativo para la determinación de sustancias dopantes en orina mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de tiempo de vuelo

III.2.1. Resumen

La cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) ofrece unas características que encajan a la perfección con la filosofía del control antidoping. Por una parte, ofrece una sensibilidad muy elevada en modo de adquisición *full-scan* para todo tipo de compuestos con límites de detección a nivel de picogramos, lo que significa que se puede detectar cualquier sustancia a niveles de concentración muy bajos, sin tener que seleccionar iones. Además, el número de compuestos diferentes que se pueden determinar es en principio ilimitado. Por otro lado, el analizador de tiempo de vuelo ofrece la posibilidad de medir las masas exactas de los iones con errores de desviación de masa tan bajos, que se puede obtener la composición elemental de las especies detectadas, lo que se puede emplear como criterio de identificación para nuevas sustancias dopantes y de sus metabolitos sin disponer de patrones a priori.

En este capítulo, se ha estudiado la potencialidad del acoplamiento LC-TOFMS para análisis multi-categoría simultáneo de 200 sustancias dopantes en orina. El método cromatográfico empleaba una columna cromatográfica C18 (4.6 x 50 mm) y 1.8 μm de tamaño de partícula. Para la etapa de *screening* y detección se emplearon medidas de masa exacta del ión seleccionado en cada caso (principalmente $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$) junto con el tiempo de retención de cada compuesto. La metodología propuesta para el análisis de orina incluye una etapa de tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida con cartuchos poliméricos de tipo hidrofílico/lipofílico (Agilent PLEXA[®]), optimizado en el capítulo 3.1. El

método de *screening* propuesto permitía la detección de las 200 sustancias dopantes estudiadas cumpliendo los requisitos mínimos requeridos en cuanto a nivel de concentración de detección establecidos por la WADA, obteniéndose límites de cuantificación por debajo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en la mayoría de los casos.

Además, y aunque todavía no está implantado en este tipo de análisis por la WADA, se estudio la capacidad de la técnica LC-TOFMS para proporcionar en un único análisis, suficiente información para la confirmación inequívoca de las sustancias identificadas en la etapa de *screening*. Se empleó como criterio la presencia de dos iones con abundancias relevantes (por ejemplo la molécula protonada y un fragmento) de forma análoga a la que se emplea por ejemplo para la determinación de productos veterinarios en alimentos de origen animal (Directiva 2002/657/EC). Para poder cumplir con estos requisitos, se estudio la fragmentación inducida por colisiones en la región de transporte de iones (*in source* CID), que se lleva a cabo sin aislamiento de ion precursor ni empleando celda de colisión. En el 70 % de los casos empleando dos condiciones de fragmentación distintas (190 y 220 V de voltaje de fragmentación) se obtenían al menos dos iones con abundancias relativas relevantes (> 10 %). Como alternativa a esta aproximación se estudio el empleo del modo de trabajo *all ion mode* empleando un equipo LC-QTOF-MS, que consiste en la fragmentación por colisiones en una cámara de colisión de dedicada pero sin llevar a cabo aislamiento de ión precursor, de forma que las ventajas inherentes de adquirir los datos en modo *full-scan* se preservan. Con esta aproximación se obtuvieron resultados positivos (al menos dos iones para cada compuesto) para los 200 compuestos con la excepción del 2-aminoheptano.

Por último, basándose en la información específica de fragmentación (iones diagnóstico) de cada categoría química de sustancias estudiadas, se examinó el rendimiento de la metodología propuesta para análisis de compuestos no dirigido o *non-targeted* (entendiéndolo como compuestos *a priori* desconocidos y/o no incluidos en la lista de analitos y para los que no se dispone de información de tiempo de retención ni patrones primarios) empleando como estudio de caso el metabolismo del diurético bumetanida en orina de rata, identificándose de forma sencilla e intuitiva varios compuestos relacionados (metabolitos).

Introduction

The World Anti-Doping code defines doping as the occurrence of one or more of the anti-doping rule violations set forth in Article 2.1 through Article 2.8 of *The Code*, including, but not limited to the presence of a Prohibited Substance or its Metabolites or Markers in an Athlete's Sample ^[1]. The World Anti-Doping Agency (WADA) is responsible of publication and revision of the *Prohibited List* ^[2], which is an international standard in which all the substances and methods prohibited are listed. *The List* is divided into three sections: substances and methods prohibited at all times (in- and out-of-competition); substances and methods prohibited in-competition; and substances prohibited in particular sports.

Liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) has nowadays a compelling role in sport drug testing, given the features of most of the targeted analytes ^[3-6]. LC-MS ability of fast and sensitive targeted analysis has dramatically expanded the tools available for comprehensive sport drug testing. In addition, liquid chromatography provides some advantages in ease of sample treatment compared to gas chromatography (GC), although GC methods are still in use particularly for class-specific applications ^[7-9]. Amongst the assays described for sport drug testing, the initial approach followed by official laboratories was the validation of class-specific methods, due to the relatively large number of compounds to trace and their different physicochemical properties. Most of these methods were based on the use of either GC-MS or LC-MS to determine class-specific groups of doping agents such as anabolic steroids and glucocorticosteroids ^[10-17], stimulants and narcotics ^[18-22], diuretics and masking agents ^[23-27], β_2 -agonists and β -blockers ^[28-34], or emerging sport drugs such as selective androgen receptor modulators (SARMs) ^[35-42].

In the last decade, advances in instrumentation (sensitivity, speed and resolution) have led to the development of generic wide-scope multiclass screening methods

^[3-6], covering several dozens of sport drugs from different families within the same run ^[43-61]. For this purpose, there are different LC-MS(MS) technologies, based on: (i) predefined list of analytes under optimized conditions (approach limited to targeted species) or (ii) non-predefined masses or conditions (approach covering targeted and eventually non-targeted analysis). Amongst the first option, the use of triple quadrupole operated in multiple-reaction monitoring mode is the standard approach for either class-specific methods or multiclass methods ^[3-5, 47,58]. As an alternative, the use of high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) as screening tool for sport drug testing purposes has been investigated in recent years ^[3-6]. The main advantage of this approach in comparison with targeted measurements based on the acquisition of fixed parent/fragment ion transitions is the comprehensive acquisition of the entire data, which provides the possibility to retrospectively scrutinize the analytical data for formerly unknown compounds or new species that eventually become relevant from the point of view of sport drug testing. This feature maps well against the requirements of doping control laboratories. Actually *The List* specifies that substances with similar structure or biological effects of any prohibited substances are also prohibited [2]. This fact has prompted that these instruments have become highly used for screening of doping agents ^[3-6].

Amongst LC-HRMS methods using full-scan high-resolution mass spectrometry, liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC-TOFMS) was first applied for the screening of 64 drugs using liquid-liquid extraction with diethyl ether ^[44]. An update of this methodology was reported by the same authors, but extended to 173 compounds validated at WADA MRPLs ^[52]. Kolmonen *et al.* proposed a multiclass screening method based on the combined use of SPE and LC-TOFMS ^[45], validated at WADA MRPL standards for 97 compounds. The same authors proposed an improved screening method validated at MRPLs for up to 197 compounds using LC-TOFMS after a dedicated 2-step SPE procedure using two

mixed mode (cation and anion) exchange cartridges ^[59]. Similarly, Badoud *et al.* described a screening method for 103 compounds using Q-TOF instrumentation, but without the inclusion of steroids ^[48,49]. As an alternative to TOFs, orbital ion trap (Orbitrap) is a high resolution analyzer also used for the screening of sport drugs in urine ^[46,54,60,61]. Musenga *et al.* developed a method for the screening of 182 sport drugs using a mixed-mode cation exchange SPE procedure and Orbitrap ^[60]. Jimenez-Girón *et al.* skipped the sample treatment by simply using 1:10 dilution for the screening of 120 sport drugs ^[61]. Moulard *et al.* developed a method for equine urine covering 235 compounds using SPE with C18 cartridges using an Exactive Orbitrap ^[54]. The method is so far the more comprehensive in terms of number of analytes included, although not detailed extraction recoveries were provided, and given the nature of the cartridge used, the sample preparation can be considered somewhat biased towards less polar species, being the more polar compounds/metabolites not eventually recovered with this approach.

In this article, a screening method for the determination of 200 sport drugs in urine using LC-TOFMS has been developed and fully validated at WADA MRPLs. The proposed methodology comprises a generic single-stage sample preparation with commercial polymeric SPE cartridges followed by LC-TOFMS analysis. A dedicated study and evaluation of the fragmentation displayed using in-source CID fragmentation was performed and contrasted with the fragmentation exhibited using a dedicated collision cell with a Q-TOF instrument. Additionally, based on the use of diagnostic ions (obtained by in-source CID fragmentation or CID without precursor selection) and a database of predefined biotransformations, an automated workflow for the comprehensive screening and identification of non-targeted compounds (*viz.* with no standards or retention time information available, such as metabolites) has been examined using rat urine samples.

Experimental

Chemicals and reagents

HPLC grade acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Drug analytical standards were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX), Dr. Ehrenstorfer (Madrid, Spain), European Pharmacopeia, National Measurement Institute (Australia) and Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Individual stock solutions were prepared in MeOH or MeCN and were stored at -18°C. Formic acid was purchased from Fluka (Madrid, Spain). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA) was used throughout the study to obtain HPLC water used during the analyses and to prepare all the solutions. Bond Elut PLEXA SPE cartridges (200 mg, 6 mL) were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA) and a Supelco (Bellefonte, PA) Visiprep™ SPE vacuum system was used for SPE experiments.

Sample preparation

Human urine sample aliquots (after a enzymatic hydrolysis step) were subjected to an SPE procedure using Bond Elut PLEXA cartridges (200 mg, 6 mL). The cartridges were preconditioned with 4 mL of MeOH/MeCN (1:1) and 4 mL of HPLC grade MilliQ water. After the conditioning step, 2 mL of urine buffered with 2 mL of formic acid/formate (50 mM) at pH 2.6, were passed through the SPE cartridge. 4 mL of 5% MeOH in MilliQ water was then added to rinse the cartridge prior to elution. The cartridges were dried under vacuum in order to remove the excess water and the analytes were finally eluted with 4 mL of MeOH/MeCN (1:1, v/v). The extracts were evaporated until near dryness using a Turbo Vap LV from Zymark (Hopkinton, MA), with a water bath temperature of 37 °C and a N₂ pressure of 15 psi. The samples were then taken up with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) to achieve a preconcentration of 4:1. The reconstituted extracts were

filtered through a 0.45 μ m syringe filter and then transferred to a 2-mL analysis vial.

LC-TOFMS and LC-QTOFMS

The separation of the analytes from the urine extract was carried out using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (consisting of vacuum degasser, auto sampler and a binary pump) (Agilent 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a reversed-phase XDB-C18 analytical column of 4.6 mm x 50 mm and 1.8 μ m particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). 20 μ L of the extract were injected in each run. Mobile phases A and B were water with 0.1% formic acid and MeCN. The chromatographic method held the initial mobile phase composition (10% B) constant for 3 min, followed by a linear gradient to 100% B up to 15 min and kept for 3 min at 100% B. The flow rate used was 0.5 mL min⁻¹. The HPLC system was connected to a time-of-flight mass spectrometer Agilent 6220 accurate mass TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an electrospray interface operating in either positive or negative ion mode, using the following operation parameters: capillary voltage, 4000V; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas flow rate, 9.0 L min⁻¹; gas temperature, 325 °C; skimmer voltage, 65 V; octapole 1 rf, 250 V; fragmentor voltage: 190 V (screening method) and 220 V (for in-source CID fragmentation and confirmatory purposes evaluation). LC-MS accurate mass spectra were recorded across the m/z range of 50-1000 in positive ion mode and 50-1100 in negative ion mode. The instrument performed the internal mass calibration automatically, using a dual-nebulizer electrospray source, which introduced a low flow (approximately 5 μ L min⁻¹) of calibrating internal reference masses solution (TFANH₄ (ammonium trifluoroacetate, C₂O₂F₃NH₄, at m/z 112.9856 in negative ion mode), purine (C₅H₄N₄, at m/z 121.0509, in ESI(+)) and HP-0921 [hexakis-(1*H*,1*H*,3*H*-tetrafluoropropoxy)phosphazine], C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, at m/z 922.0098 in positive ion

mode and 1033.9881 in negative mode). To perform CID experiments with a dedicated collision cell, an Agilent 1260 Infinity HPLC system was connected to a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer Agilent 6530 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), equipped with the same dual spray interface, applying the same chromatographic method and MS parameters described for the TOF instrument except fragmentor voltage, set at 90 V. "All-ion mode" full-scan acquisition was used at different collision energy conditions (0, 10, 20 and 30 V). All data was recorded with Agilent Mass Hunter Data Acquisition software (version B.04.00) and processed with Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.04.00) which included both "Molecular Feature Extractor" and "Find by Formula" applications used.

Method validation

A pool of human urine samples (specific gravity 1.015, pH 7.0) were checked for the presence of any of the 200 sport drugs tested. Seven replicates of spiked urine samples were prepared to measure extraction recovery and method precision. Extraction recovery was determined by analyzing samples spiked before and after SPE extraction at two concentration levels (2.5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$). Spiking after the extraction process (10 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively considering the preconcentration factor) corresponded to 100% recovery. The results were obtained by comparing mean values of peak areas of analytes. Repeatability of the extraction method was expressed as relative standard deviations (RSD (%)) of peak areas. In the case of endogenous substances, the background value was considered and corrected for method performance evaluation.

The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) were calculated as the minimum concentration of analyte whose extracted ion chromatogram (with a narrow mass window extraction of ± 20 ppm without smooth filters) showed a signal-to-noise ratio at (S/N) = 3:1 and 10:1 respectively. LODs were empirically

calculated using the data acquired from recovery experiments (2.5 and $25 \mu\text{g L}^{-1}$), or by subsequent dilutions of these extracts with non-spiked matrix. Matrix effects (ME) were also estimated in order to assess the impact of the matrix on the ionization suppression/enhancement on the analytes (compared to neat standards). For this purpose, the slopes obtained in the calibration with urine extracts were compared with those obtained with solvent-based standards, calculating slope ratios matrix/solvent (ME) for each of the targeted compounds. $\text{ME} > 1$ means signal enhancement while $\text{ME} < 1$ means signal suppression (the more common phenomenon).

Development of the automated targeted screening method

An automated screening approach based on accurate masses of selected ions and retention time matching was used based on “Find by Formula” application of the software used. The selected 200 drugs were divided in 10 mixtures containing *ca.* 20 drugs each at a concentration of *ca.* $200 \mu\text{g L}^{-1}$. These solutions were analyzed by LC-TOFMS to collect the retention time data and relevant mass spectra information. For the automatic screening method, an excel spreadsheet was constructed containing the elemental composition and exact mass data for each drug and their retention times. This file was put into *csv (comma separated values)* file format for use by the Agilent TOF automated data analysis (“Find by Formula”) software. The data included are summarized in **Table 1**, where the retention time, molecular formula and accurate masses of the selected ions are shown for each compound tested.

Table 1. LC-TOFMS Accurate mass database of the studied sport drugs, including retention times, elemental composition of the detected ions, theoretical and experimental accurate mass and their error (fortification level: 25 µg/L)

Compound	R _t	Ioniz. mode	Ion	Ion formula	Theor. m/z	Exp. m/z	Error (ppm)
11-Nor-11-carboxy-Δ ⁹ -THC	15.07	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₉ O ₄	345.2060	345.2062	0.58
16-β-Hydroxyfurazabol	13.23	ESI +	Fragment 1	C ₂₀ H ₂₉ N ₂ O ₂	329.2224	329.2225	0.30
17,17-Dimethyl-18-androsta-1,4,13(14)-trien-3-one	17.59	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₇ O	283.2056	283.2056	0.00
17-α-Ethynil estradiol	12.33	ESI +	Fragment 1	C ₂₀ H ₂₃ O	279.1743	279.1742	-0.36
17-α-Methyltestosterone	12.62	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.2319	303.2318	-0.33
17-α-Hydroxyprogesterone	12.80	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₁ O ₃	331.2268	331.2271	0.91
17-Epiandrosterone	12.89	ESI +	Fragment 1	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	289.2162	289.2166	1.38
19-Norandrosterone	13.43	ESI +	Fragment 1	C ₁₈ H ₂₇ O	259.2056	259.2054	-0.77
19-Norethiocholanone	13.00	ESI +	Fragment 1	C ₁₈ H ₂₇ NO	259.2056	259.2057	0.39
2-Aminoheptane	6.93	ESI +	[M+H] ⁺	C ₇ H ₁₈ N	116.1434	116.1436	1.72
2-Hydroxymethyl-17α-methylandrosta-1,4-diene-11α,17β-diol-3-one	9.35	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₁ O ₄	347.2217	347.2213	-1.15
2α-Hydroxymethylethisterone	11.48	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ O ₃	343.2268	343.2269	0.29
2α-Methyl-5α-Androstan-3α-ol-17-one	15.04	ESI +	Fragment 1	C ₂₀ H ₃₁ O	287.2369	287.2372	1.04
4-Androstene-3,17-dione	12.78	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	287.2006	287.2003	-1.04
4-Hydroxyandrostendione (Formestane)	13.06	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₇ O ₃	303.1958	303.1962	1.32
4-Hydroxytestosterone	12.33	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ O ₃	305.2111	305.2114	0.98
5-α-Dihydroxytestosterone	13.22	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	291.2319	291.2315	-1.37
6α-Methylprednisolone	10.48	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ O ₅	375.2166	375.2165	-0.27
Acebutolol	7.97	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₉ N ₂ O ₄	337.2122	337.2120	-0.59
Acepromazine	9.95	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ OS	327.1526	327.1530	1.22
Acetazolamide	3.58	ESI +	Fragment 1	C ₂ H ₅ N ₄ O ₂ S ₂	180.9848	180.9848	0.00
Acethylmorphine	6.00	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	328.1543	328.1542	-0.30
Adrafinil	9.68	ESI +	Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁	167.0855	167.0856	0.60
α-Zearalanol	11.79	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₇ O ₅	323.1853	323.1856	0.93
Alprenolol	9.43	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ NO ₂	250.1802	250.1800	-0.80
Althiazide	10.91	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₃ O ₄ S ₃	383.9908	383.9906	-0.52
Altrenogest	13.11	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	311.2006	311.2005	-0.32
Amcinonide	14.03	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₃₆ FO ₇	503.2440	503.2446	1.19
Aminoglutethimide	3.95	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₂	233.1285	233.1281	-1.70
Amphetamine	3.75	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₁	119.0858	119.0862	2.20
Anastrozole	11.03	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ N ₅	294.1713	294.1714	0.34
Androsterone	13.84	ESI +	Fragment 1	C ₁₉ H ₂₉ O	273.2213	273.2211	-0.73
Atenolol	1.78	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O ₃	267.1703	267.1701	-0.75
Bambuterol	8.62	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ N ₃ O ₅	368.2180	368.2183	0.81
Beclomethasone	10.93	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₆ ClO ₅	409.1776	409.1774	-0.49
Bendroflumethiazide	11.84	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₅ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	422.0451	422.0453	0.47
Benthiazide	11.36	ESI -	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₃ ClN ₃ O ₄ S ₃	429.9771	429.9775	0.93
Benzoylgonine	7.69	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₀ NO ₄	290.1387	290.1390	1.03
β-Estradiol	11.85	ESI +	Fragment 1	C ₁₈ H ₂₃ O	255.1743	255.1746	1.18
Betaxolol	9.47	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃	308.2220	308.2219	-0.32
Bis(4-cyanophenyl) methanol	11.46	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O	238.0866	238.0864	-0.84
Bisoprolol	8.94	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ NO ₄	326.2326	326.2324	-0.61
Boldenone	11.48	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	287.2006	287.2006	0.00
Boldine	7.22	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	238.1543	238.1542	-0.42

Brucine	7.47	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₇ N ₂ O ₄	295.1966	295.1969	1.02
Bumetanide	12.23	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₅ S	365.1166	365.1168	0.55
Buprenorphine	9.82	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₂ NO ₄	468.3108	468.3107	-0.21
Bupropion	8.90	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₁ ClNO	184.0524	184.0526	1.09
Butabarbital	9.84	ESI +	Fragment 1	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃	157.0608	157.0609	0.64
Cannabidiol	16.11	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	315.2319	315.2314	-1.59
Canrenone	13.02	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₆ O ₃	341.2111	341.2111	0.00
Capsaicin	12.92	ESI +	Fragment 2	C ₈ H ₉ O ₂	137.0597	137.0599	1.46
Carphedone	8.49	ESI +	Fragment 1	C ₁₁ H ₁₂ NO	174.0913	174.0910	-1.72
Carvedilol	10.20	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₄	407.1965	407.1968	0.74
Celecoxib	13.85	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₅ F ₃ N ₃ SO ₂	382.0832	382.0830	-0.52
Celiprolol	8.55	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₄ N ₃ O ₄	380.2544	380.2547	0.79
Chlorothiazide	4.75	ESI -	[M-H] ⁻	C ₇ H ₅ ClN ₃ O ₄ S ₂	293.9421	293.9426	1.70
Clenbuterol	8.14	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O	277.0869	277.0874	1.80
Clopmide	9.37	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ ClN ₃ O ₃ S	346.0987	346.0988	0.29
Clostellol acetate	16.06	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ ClO ₃	365.1878	365.1880	0.55
Cocaethylene	9.19	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	318.1700	318.1706	1.89
Cocaine	8.59	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ NO ₄	304.1543	304.1542	-0.33
Codeine	3.13	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	300.1594	300.1596	0.67
Cotinine	1.37	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	177.1022	177.1023	0.56
Cyclofenil	16.33	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₈ NO ₄	382.2013	382.2013	0.00
Cyclothiazide	11.50	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₁ ClN ₃ O ₄ S ₂	323.9874	323.9877	0.93
Danazol	14.35	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	338.2115	338.2116	0.30
Dehydroandrosterone	12.66	ESI +	Fragment 1	C ₁₉ H ₂₇ O	271.2056	271.2052	-1.47
Δ9-THC	17.47	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₁ O ₂	315.2319	315.2322	0.95
Dexamethasone	10.72	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₀ FO ₅	393.2072	393.2076	1.02
Diazepam	12.40	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₂ O	285.0789	285.0791	0.70
Diethylnicotinamide (Niketamide)	4.23	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O	179.1179	179.1175	-2.23
Dimethylphenethylamine	5.22	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₃	133.1013	133.1016	2.25
Doxapram	8.93	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₂	379.2380	379.2382	0.53
EDDP	10.16	ESI +	[M] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ N	278.1909	278.1906	-1.08
Ephedrine	2.79	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₄ N	148.1121	148.1120	-0.68
Epitestosterone	12.76	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	289.2162	289.2163	0.35
Eplerenone	10.87	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₁ O ₆	415.2115	415.2117	0.48
Esmolol	8.57	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₆ NO ₄	296.1856	296.1854	-0.68
Ethacrinic acid	12.77	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	303.1850	303.1852	0.66
Ethiocholanone	13.56	ESI +	Fragment 1	C ₁₉ H ₂₉ O	273.2213	273.2214	0.37
Ethisterone	12.70	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	313.2162	313.2162	0.00
Ethylamphetamine	6.99	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₇ N	164.1434	164.1430	-2.44
Ethylmorphine	6.95	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	314.1751	314.1753	0.64
Famprofazone	10.21	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₂ N ₃ O	378.2540	378.2538	-0.53
Fenbutrazate	11.01	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₀ NO ₃	368.2220	368.2221	0.27
Fenfluramine	9.21	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	232.1308	232.1305	-1.29
Fenspiride	4.83	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₂	261.1598	261.1594	-1.53
Fentanyl	9.60	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O	337.2274	337.2273	-0.30
Finasteride	12.28	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₇ N ₂ O ₂	373.2850	373.2851	0.27
Flumethasone	10.79	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₉ F ₂ O ₅	411.1978	411.1978	0.00
Flunisolide	11.19	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₂ FO ₆	435.2177	435.2172	-1.15
Fluocinolone acetonide	11.30	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₁ F ₂ O ₆	453.2083	453.2082	-0.22
Fluorometholone	11.54	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₀ FO ₄	377.2123	377.2122	-0.27
Fluoxymesterone	10.90	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ FO ₃	337.2173	337.2174	0.30
Flurandrenolide	11.32	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₄ FO ₆	437.2334	437.2335	0.23
Fluticasone propionate	14.07	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₂ F ₃ O ₅ S	501.1917	501.1919	0.40
Formoterol	8.28	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₄	345.1809	345.1810	0.29
Furosemide	10.74	ESI -	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ S	329.0004	329.0004	0.00
Gestrinone	12.54	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₅ O ₂	309.1849	309.1848	-0.32
Glibenclamide	13.35	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₃ O ₅ S	494.1511	494.1513	0.40

Glipizide	11.46	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₈ N ₅ O ₄ S	446.1857	446.1859	0.45
Heptaminol	1.53	ESI +	Fragment 1	C ₈ H ₁₈ N	128.1434	128.1435	0.78
Heroin	8.39	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₄ NO ₅	370.1649	370.1645	-1.08
Hexobarbital	10.91	ESI +	Fragment 1	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃	157.0608	157.0605	-1.91
Hydrochlorothiazide	5.73	ESI -	[M-H] ⁻	C ₇ H ₇ ClN ₃ O ₄ S ₂	295.9572	295.9570	-0.68
Hydrocortison	9.98	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₁ O ₅	363.2166	363.2160	-1.65
Hydroflumethiazide	8.49	ESI -	[M-H] ⁻	C ₈ H ₇ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	329.9836	329.9840	1.21
Hydromorphone	1.94	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	286.1438	286.1439	0.35
Ibuprofen	13.69	ESI +	Fragment 1	C ₁₂ H ₁₇	161.1325	161.1326	0.62
Indapamide	11.20	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₃ O ₃ S	366.0674	366.0677	0.82
Isoetharine	1.85	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃	240.1594	240.1596	0.83
Ketamine	7.48	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₇ ClNO	238.0993	238.0994	0.42
Labetalol	9.02	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₃	329.186	329.1861	0.30
Letrozole	11.13	ESI +	Fragment 1	C ₁₅ H ₉ N ₂	217.076	217.0758	-0.92
Lidocaine	7.10	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O	235.1805	235.1801	-1.70
LSD	8.86	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₆ N ₃ O	324.2070	324.2073	0.93
MDA	5.85	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163.0754	163.0753	-0.61
MDEA	7.43	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163.0754	163.0755	0.61
MDMA	6.26	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163.0754	163.0754	0.00
Medroxyprogesterone	13.55	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₃ O ₃	345.2424	345.2423	-0.29
Mefenorex	8.70	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₈ ClN	212.1201	91.0543	1.10
Meloxicam	12.39	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₂	352.0420	352.0421	0.28
Meperidine	8.67	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ NO ₂	248.1645	248.1644	-0.40
Mesterolone	13.57	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	305.2475	305.2477	0.66
Metaproterenol (Orciprenaline)	1.37	ESI +	Fragment 1	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	194.1176	194.1177	0.52
Methadone	10.58	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₈ NO	310.2165	310.2163	-0.64
Methamphetamine	5.89	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₁	119.0858	119.0854	-3.36
Methandienone	11.90	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	301.2162	301.2165	1.00
Methoxyphenamine	7.53	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₃ O	149.0961	149.0962	0.67
Methylephedrine	3.28	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ NO	180.1383	180.1382	-0.56
Methylphenidate	8.18	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₀ NO ₂	234.1489	234.1487	-0.85
Metricrane	8.36	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄ S ₂	276.0359	276.0359	0.00
Metolazone	10.68	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₃ O ₃ S ₂	366.0674	366.0671	-0.82
Metoprolol	8.11	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₆ NO ₃	268.1907	268.1904	-1.12
Morphine	1.50	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	286.1438	286.1435	-1.05
Nadolol	6.39	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₈ NO ₄	310.2013	310.2015	0.64
Nandrolone (19- Nortestosterone)	11.71	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	275.2006	275.2001	-1.82
Nateglinide	13.45	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ NO ₃	318.2064	318.2066	0.63
N-Desmethylselegiline	7.29	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₁	119.0858	119.0861	2.52
Nicotine	1.36	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ N ₂	163.1230	163.1232	1.23
Norbolethone	14.39	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₃ O ₂	317.2475	317.2477	0.63
Norcocaine	8.73	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₀ NO ₄	290.1387	290.1386	-0.34
Norcodeine	2.76	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	286.1438	286.1439	0.35
Norethandrolone	13.38	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.2319	303.2320	0.33
Norethindrone	12.28	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₇ O ₂	299.2006	299.2004	-0.67
Norfenfluramine	8.73	ESI +	Fragment 2	C ₁₀ H ₉ N	187.0729	187.0732	1.60
Norfentanyl	7.58	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	233.1648	233.1647	-0.43
Norgestrel	13.20	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	313.2162	313.2162	0.00
Normorphine	1.38	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ NO ₃	272.1281	272.1282	0.37
Noroxycodone	4.10	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	302.1387	302.1386	-0.33
Noroxymorphone	1.52	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₈ NO ₄	288.1230	288.1234	1.39
Norpseudoephedrine	2.24	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₂ N	134.0964	134.0962	-1.49
Octopamine	1.02	ESI +	Fragment 1	C ₈ H ₁₀ NO	136.0757	136.0758	0.73
Oxilofrine	1.37	ESI +	Fragment 1	C ₁₀ H ₁₄ NO	164.1070	164.1072	1.22
Oxycodone	4.46	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	316.1545	316.1543	-0.63
Oxymorphone	1.65	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	302.1387	302.1389	0.66

Penbutolol	10.58	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ NO ₂	292.2271	292.2273	0.68
Pentobarbital	10.77	ESI +	Fragment 1	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃	157.0608	157.0607	-0.64
Pentoxifylline	8.59	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₃	279.1452	279.1450	-0.72
Pentylene-tetrazole	5.44	ESI +	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₁ N ₄	139.0978	139.0978	0.00
Phenobarbital	9.67	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₃	233.0921	233.0922	0.43
Phenylephrine	1.37	ESI +	Fragment 1	C ₉ H ₁₂ NO	150.0913	150.0914	0.67
Picrotin	9.02	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O ₇	311.1125	311.1129	1.29
Picrotoxinin	10.18	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	293.1020	293.1023	1.02
Pindolol	6.25	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₂	249.1598	249.1597	-0.40
Piretanide	11.79	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₅ S	363.1009	363.1007	-0.55
Prednisolone	9.89	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₉ O ₅	361.2010	361.2014	1.11
Prednisone	9.99	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₇ O ₅	359.1853	359.1855	0.56
Probenecid	12.51	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₂₀ NO ₄ S	286.1108	286.1107	-0.35
Propafenone	10.29	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₈ NO ₃	342.2064	342.2066	0.58
Propoxyphene	10.50	ESI +	Fragment 1	C ₁₉ H ₂₄ N	266.1903	266.1903	0.00
Propranolol	9.36	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₂	260.1645	260.1646	0.38
Propylhexedrine	8.61	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₂₂ N	156.1747	156.1747	0.00
Repaglinide	11.74	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₇ N ₂ O ₄	453.2748	453.2746	-0.44
Ritodrine	4.71	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ NO ₃	288.1594	288.1596	0.69
Salbutamol	1.65	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃	240.1594	240.1598	1.67
Salicylamide	7.96	ESI +	[M+H] ⁺	C ₇ H ₉ NO ₂	138.0550	138.0553	2.17
Salmeterol	10.58	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₈ NO ₄	416.2795	416.2796	0.24
Selegiline (Deprenil)	7.67	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₈ N	188.1434	188.1430	-2.12
Sotalol	2.03	ESI +	Fragment 1	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₂ S	255.1162	255.1160	-0.78
Spirolactone	12.86	ESI +	Fragment 1	C ₂₂ H ₂₉ O ₃	341.2111	341.2113	0.59
Stanozol	11.89	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₃ N ₂ O	329.2587	329.2590	0.91
Strychnine	7.28	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂	335.1754	335.1755	0.30
Tamoxifen	12.39	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₀ NO	372.2332	372.2330	-0.54
Terbutaline	1.72	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ NO ₃	226.1438	226.1440	0.88
Testosterone	12.16	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₉ O ₂	289.2162	289.2163	0.35
Tibolone	13.66	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	313.2162	313.2164	0.64
Timolol	7.92	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₂₅ N ₄ O ₃ S	317.1642	317.1644	0.63
Tolazamide	12.09	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	312.1376	312.1375	-0.32
Tolbutamide	11.80	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₃ S	271.1111	271.1110	-0.37
Torasemide	9.52	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	349.1329	349.1330	0.29
Toremifene	12.15	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₉ ClNO	406.1932	406.1930	-0.49
Triamcinolone	9.17	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₈ FO ₆	395.1864	395.1865	0.25
Triamterene	7.20	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₂ N ₇	254.1149	254.1149	0.00
Trichlormethiazide	10.19	ESI -	Fragment 1	C ₈ H ₅ ClN ₃ O ₄ S ₂	305.9415	305.9416	0.33
Turinabol	13.04	ESI +	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₈ ClO ₂	335.1772	335.1771	-0.30
Tyramine	1.40	ESI +	Fragment 1	C ₈ H ₉	105.0699	105.0700	0.95
Vanillic acid diethylamide	9.32	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₈ NO ₃	224.1281	224.1280	-0.45
Warfarin	12.76	ESI +	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₇ O ₄	309.1121	309.1125	1.29

Non-targeted analysis of rat urinary metabolites

Besides the standard screening method for targeted detection of sport drugs, the performance of LC-TOFMS for the comprehensive screening and identification of non-targeted compounds (*viz.* preliminary identification of components with neither primary standards nor retention time information available (eg. such as derivate species and/or metabolites)) has been examined using rat urine samples. The non-targeted approach is based on the use of diagnostic ions (obtained by in-source CID fragmentation or CID without precursor selection) and a list of predefined biotransformations that parent compounds usually undergo.

Sample collection. The study was performed on adult male Wistar rats (250–300 g) (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). The animals (n=5) were weighed and placed in individual metabolic cages 48 hours prior to treatment to acclimatize them to this environment, maintained under standard conditions of light and temperature and allowed *ad libitum* access to food and water to the end of the experiment. All the procedures followed the Spanish guidelines on the use of animals for research (RD 1201/2005) and were approved by the institutional Committee for Ethics. The rats were treated with buprenorphine at 8 mg Kg⁻¹ body weight (intraperitoneal). After drug administration, urine was daily collected in graduate cylinders for 3 days (24, 48 and 72 h). The urine collected 24 h prior to treatment was used as control. The SPE procedure was applied omitting intentionally the enzymatic hydrolysis/deconjugation step in order to keep the metabolites in their conjugated forms.

Compilation of diagnostic ions and data analysis. For untargeted detection, the full-scan high-resolution mass spectrometry data was processed by two main approaches:

- (a) *“Molecular Feature Extractor”* software tool. Raw LC-MS data is scrutinized thoroughly by an algorithm, which treats the entire sample mass spectral data from the experiment as a large, three-dimensional array of retention time, m/z and abundance values). Background and other incoherent signals are disregarded and only chromatographic peaks (*viz.* transient signals with coherent chromatographic peak profile behavior) are finally included in the list of sample features. The results provided for each compound detected are: a mass spectrum containing the ions with the same elution time and explainable relationships, and an extracted compound chromatogram that is effectively an extracted ion chromatogram which computes all of the masses in the compound spectrum (and only those masses). Once the compounds were automatically extracted, its molecular formula was generated and may be confronted against any user-created database. These databases should contain specific information such as diagnostic ions or the use of accurate-mass shifts from parent species due to typical biotransformations.
- (b) *“Find by formula”*. This software tool can be also used for non-targeted detection, similarly to the targeted approach, but without retention time information included in the spreadsheet. A list of elemental compositions/ions to be searched (without retention time restriction), including diagnostic fragment ions and eventually a list of potential metabolites from parent species based on an *ab-initio* list prepared considering formula modifications/mass shifts due to biotransformations.

To obtain the specific information (diagnostic ions) required for this approach, spectral features of each compound were also studied. In-source CID fragmentation was investigated at different fragmentor voltages (160, 190 and 220

V), obtaining diagnostic fragment ions (**Table 2**), which can be used to identify compounds with similar structure, degradation products or metabolites ^[62-64].

Table 2. Main in-source CID fragment ions of the 200 studied compounds at different fragmentor voltage (160, 190 and 220 V).

Compound	Ion	m/z	Elemental composition	Relative abundance		
				160V	190V	220V
11-Nor-11-carboxy- Δ^9 -THC	[M+H] ⁺	345.2060	C ₂₁ H ₂₉ O ₄	100	100	100
	Fragment 1	327.1954	C ₂₁ H ₂₇ O ₃	75.7	87.1	65.85
	Fragment 2	299.2006	C ₂₀ H ₂₇ O ₂	-	30.8	57.3
16- β -Hydroxyfurazabol	[M+Na] ⁺	369.2169	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₃ Na	17.0	33.5	31.9
	[M+H] ⁺	347.2329	C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₃	58.2	84.3	70.2
	Fragment 1	329.2224	C ₂₀ H ₂₉ N ₂ O ₂	100	100	23.7
17,17-Dimethyl-18-androsta-1,4,13(14)-trien-3-one	Fragment 2	311.2118	C ₂₀ H ₂₇ N ₂ O	23.2	71.8	100
	[M+H] ⁺	283.2056	C ₂₀ H ₂₇ O	100	100	100
17- α -Ethynil estradiol	Fragment 1	147.0804	C ₁₀ H ₁₁ O	-	18.5	48.3
	[M+H] ⁺	297.1849	C ₂₀ H ₂₅ O ₂	11.8	11.0	-
17- α -Methyltestosterone	Fragment 1	279.1743	C ₂₀ H ₂₃ O	100	100	100
	[M+H] ⁺	303.2319	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	100	100	100
17- α -Hydroxyprogesterone	Fragment 1	285.2213	C ₂₀ H ₂₉ O	-	-	-
	[M+H] ⁺	331.2268	C ₂₁ H ₃₁ O ₃	100	100	100
17-Epioxandrolone	Fragment 1	313.2168	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	-	-	3.1
	[M+H] ⁺	307.2268	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	21.3	21.4	-
19-Norandrosterone	Fragment 1	289.2162	C ₁₉ H ₂₉ O ₂	100	100	100
	[M+Na] ⁺	299.1982	C ₁₈ H ₂₈ O ₂ Na	6.3	14.7	29.1
	[M+H] ⁺	277.2162	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	45.2	17.5	8.4
	Fragment 1	259.2056	C ₁₈ H ₂₇ O	100	100	76.5
19-Norethiocholanone	Fragment 2	241.1951	C ₁₈ H ₂₆	14.7	43.9	100
	[M+Na] ⁺	299.1982	C ₁₈ H ₂₈ NO ₂ Na	-	17.1	25.5
	[M+H] ⁺	277.2162	C ₁₈ H ₂₉ NO ₂	60.1	13.7	5.6
	Fragment 1	259.2056	C ₁₈ H ₂₇ NO	100	100	45.2
2-Aminoheptane	Fragment 2	241.1951	C ₁₈ H ₂₅	41.2	93.2	100
	[M+H] ⁺	116.1434	C ₇ H ₁₈ N	100	100	100
2-Hydroxymethyl-17 α -methylandrosta-1,4-diene-11 α ,17 β -diol-3-one	[M+Na] ⁺	369.2030	C ₂₁ H ₃₀ O ₄ Na	-	-	23.3
	[M+H] ⁺	347.2217	C ₂₁ H ₃₁ O ₄	100	100	100
	Fragment 1	329.2111	C ₂₁ H ₂₉ O ₃	-	10.3	99.4
2 α -Hydroxymethylethisterone	Fragment 2	311.2006	C ₂₁ H ₂₇ O ₂	-	-	42.4
	[M+H] ⁺	343.2268	C ₂₂ H ₃₁ O ₃	100	100	100
2 α -Methyl-5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	[M+H] ⁺	305.2475	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	39.0	17.9	5.2
	Fragment 1	287.2369	C ₂₀ H ₃₁ O	100	100	100
	Fragment 2	269.2264	C ₂₀ H ₂₉	8.8	20.2	41.1
4-Androstene-3,17-dione	[M+Na] ⁺	309.1825	C ₁₉ H ₂₆ O ₂ Na	-	5.2	8.0
	[M+H] ⁺	287.2006	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	100	100	100
4-Hydroxyandrostendione	[M+H] ⁺	303.1958	C ₁₉ H ₂₇ O ₃	100	100	100
	[M+H] ⁺	305.2111	C ₁₉ H ₂₃ O ₃	100	100	100
4-Hydroxytestosterone	Fragment 1	113.0595	C ₆ H ₉ O ₂	6.0	3.9	5.6
	[M+H] ⁺	291.2319	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	100	100	100
5- α -Dihydroxytestosterone	Fragment 1	273.2213	C ₁₉ H ₂₉ O	8.2	9.1	23.1
	Fragment 2	255.2107	C ₁₉ H ₂₇	-	-	14.6
	[M+H] ⁺	375.2166	C ₂₂ H ₃₁ O ₅	100	100	37.7
6 α -Methylprednisolone	Fragment 1	357.2060	C ₂₂ H ₂₉ O ₄	5.7	38.6	100
	Fragment 2	339.1955	C ₂₂ H ₂₇ O ₃	-	14.8	55.4

	[M+H] ⁺	337.2122	C ₁₈ H ₂₉ N ₂ O ₄	100	100	100
Acebutolol						
	[M+H] ⁺	327.1526	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ OS	100	100	100
Acepromazine	Fragment 1	254.0634	C ₁₅ H ₁₂ NOS	-	-	6.2
	Fragment 2	86.0694	C ₅ H ₁₂ N	-	-	20.4
	[M+H] ⁺	222.9954	C ₄ H ₇ N ₄ O ₃ S ₂	100	43.5	-
Acetazolamide	Fragment 1	180.9848	C ₂ H ₅ N ₂ O ₂ S ₂	33.0	100	-
Acethylmorphine	[M+H] ⁺	328.1543	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	100	100	100
	[M+H] ⁺	290.0845	C ₁₅ H ₁₆ NO ₃ S	0.2	0.2	-
Adrafinil	Fragment 1	167.0855	C ₁₃ H ₁₁	100	100	100
	[M+H] ⁺	323.1853	C ₁₈ H ₂₇ O ₅	100	100	-
α-Zearalanol	Fragment 1	287.1642	C ₁₈ H ₂₃ O ₃	-	11	100
	[M+H] ⁺	250.1802	C ₁₅ H ₂₄ NO ₂	100	100	100
Alprenolol	Fragment 1	147.0804	C ₁₀ H ₁₁ O	-	-	11.0
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	-	-	5.5
	[M+H] ⁺	383.9908	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₃ O ₄ S ₃	100	100	100
Althiazide	Fragment 1	341.9438	C ₈ H ₉ ClN ₃ O ₄ S ₃	-	30.7	86.3
	[M+Na] ⁺	333.1827	C ₁₉ H ₂₆ O ₂ Na	100	100	100
Altrenogest	[M+H] ⁺	311.2006	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	99.9	51.4	40
	[M+H] ⁺	503.2440	C ₂₈ H ₃₆ FO ₇	100	100	100
Amcinonide	Fragment 1	483.2377	C ₂₈ H ₃₅ O ₇	-	10.5	53.7
	[M+H] ⁺	233.1285	C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₂	100	48.5	48.5
Aminoglutethimide	Fragment 1	146.0964	C ₁₀ H ₁₂ N	-	-	11
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	88.4	100	100
	[M+H] ⁺	136.1121	C ₉ H ₁₄ N	47.0	-	-
Amphetamine	Fragment 1	119.0858	C ₉ H ₁₁	91.7	12.2	-
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	100	100	100
	[M+H] ⁺	294.1713	C ₁₇ H ₂₀ N ₅	100	100	100
Anastrozole	Fragment 1	225.1389	C ₁₅ H ₁₇ N ₂	-	4.7	46.5
	[M+H] ⁺	291.2319	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	52.8	20.5	9.4
Androsterone	Fragment 1	273.2213	C ₁₉ H ₂₉ O	100	100	100
	Fragment 2	255.2107	C ₁₉ H ₂₇	13.5	30.5	72.2
	[M+H] ⁺	267.1703	C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O ₃	100	100	100
Atenolol	Fragment 1	225.1234	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₃	-	-	10
	Fragment 2	190.0863	C ₁₁ H ₁₂ NO ₂	-	-	9.0
	[M+H] ⁺	368.2180	C ₁₈ H ₃₀ N ₃ O ₅	100	100	100
Bambuterol	Fragment 1	312.1554	C ₁₄ H ₂₂ N ₃ O ₅	-	6.5	28.3
	Fragment 2	294.1448	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₄	-	10.6	85.3
	[M+H] ⁺	409.1776	C ₂₂ H ₃₀ ClO ₅	100	100	55.9
Beclomethasone	Fragment 1	391.1671	C ₂₂ H ₂₈ ClO ₄	26.2	38.3	100
	[M+Na] ⁺	444.0270	C ₁₅ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	100	100	67.1
Bendroflumethiazide	[M+H] ⁺	422.0451	Na	92.6	56.8	30.9
	Fragment 1	159.0804	C ₁₅ H ₁₅ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	-	86.4	100
	[M-H] ⁻	429.9771	C ₁₅ H ₁₃ ClN ₃ O ₄ S ₃	100	100	100
Benthiazide	Fragment 1	307.9572	C ₈ H ₇ ClN ₃ O ₄ S ₂	-	-	7.7
	[M+Na] ⁺	312.1208	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄ Na	19.2	21.9	26.2
Benzoylcegonine	[M+H] ⁺	290.1387	C ₁₆ H ₂₀ NO ₄	100	100	100
	Fragment 1	168.1019	C ₉ H ₁₄ NO ₂	-	8.8	75.3
	[M+H] ⁺	273.1849	C ₁₈ H ₂₅ O ₂	15.6	13.2	-
β-Estradiol	Fragment 1	255.1743	C ₁₈ H ₂₃ O	100	100	49.1
	Fragment 2	159.0804	C ₁₁ H ₁₁ O	-	30.8	100
	[M+H] ⁺	308.2220	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃	100	100	100
Betaxolol	[M+H] ⁺	238.0866	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O	100	100	100
Bis(4-cyanophenyl) methanol	Fragment 1	217.0760	C ₁₅ H ₉ N ₂	-	-	6.9
	[M+H] ⁺	326.2326	C ₁₈ H ₃₂ NO ₄	100	100	100
Bisoprolol	[M+H] ⁺	309.1825	C ₁₉ H ₂₆ O ₂ Na	100	100	100
Boldenone						

	[M+H] ⁺	287.2006	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	75.6	28.2	7.5
	[M+H] ⁺	238.1543	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	100	100	100
Boldine	Fragment 1	297.1121	C ₁₈ H ₁₇ O ₄	-	7.9	75.0
	Fragment 2	265.0859	C ₁₇ H ₁₃ O ₃	-	2.7	32.2
Brucine	[M+H] ⁺	295.1966	C ₂₃ H ₂₇ N ₂ O ₄	100	100	100
	[M+Na] ⁺	387.0981	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ Na	32	37	52
Bumetanide	[M+H] ⁺	365.1166	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₅ S	100	100	100
	Fragment 1	284.1281	C ₁₇ H ₁₈ NO ₃	-	8.0	43.0
Buprenorphine	[M+H] ⁺	468.3108	C ₂₉ H ₄₂ NO ₄	100	100	100
	[M+H] ⁺	240.1150	C ₁₃ H ₁₈ ClNO	100	47.0	-
Bupropion	Fragment 1	184.0524	C ₉ H ₁₁ ClNO	42.9	100	68.3
	Fragment 2	166.0418	C ₉ H ₉ ClN	6.7	39.0	100
	[M+H] ⁺	213.1234	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₃	100	37.0	7.2
Butabarbital	Fragment 1	157.0608	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃	39.2	100	100
	Fragment 2	97.0284	C ₅ H ₅ O ₂	-	10.0	53.0
Cannabidiol	[M+H] ⁺	315.2319	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	100	100	100
Canrenone	[M+H] ⁺	341.2111	C ₂₂ H ₂₉ O ₃	100	100	100
	[M+H] ⁺	306.2064	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	100	61.5	17.7
Capsaicin	Fragment 1	182.1540	C ₁₁ H ₂₀ NO	-	5.7	2.1
	Fragment 2	137.0597	C ₈ H ₉ O ₂	15.4	100	100
	[M+H] ⁺	219.1128	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₂	94.9	4.4	-
Carphedone	Fragment 1	174.0913	C ₁₁ H ₁₂ NO	100	100	100
	Fragment 2	145.0644	C ₁₀ H ₉ O	-	24.3	80.9
	[M+Na] ⁺	429.1785	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄ Na	31	32	34
Carvedilol	[M+H] ⁺	407.1965	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₄	100	100	100
	[M+H] ⁺	382.0832	C ₁₇ H ₁₅ F ₃ N ₃ SO ₂	100	100	100
Celecoxib	Fragment 1	362.0769	C ₁₇ H ₁₄ F ₂ N ₃ SO ₂	-	-	-
	[M+H] ⁺	380.2544	C ₂₀ H ₃₄ N ₃ O ₄	100	100	100
Celiprolol	Fragment 1	324.1918	C ₁₆ H ₂₆ N ₃ O ₄	-	-	15.2
Chlorothiazide	[M-H]	293.9421	C ₇ H ₅ ClN ₃ O ₄ S ₂	100	100	100
	[M+H] ⁺	277.0869	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₂ N ₂ O	100	100	-
Clenbuterol	Fragment 1	259.0763	C ₁₂ H ₁₇ Cl ₂ N ₂	5.8	36.6	6.7
	Fragment 2	203.0137	C ₈ H ₉ Cl ₂ N ₂	8.2	96.9	100
Clopamide	[M+H] ⁺	346.0987	C ₁₄ H ₂₁ ClN ₃ O ₃ S	100	100	100
	[M+Na] ⁺	387.1664	C ₂₁ H ₂₉ ClO ₃ Na	-	-	23.2
Clostebol acetate	[M+H] ⁺	365.1878	C ₂₁ H ₃₀ ClO ₃	100	100	100
	Fragment 1	323.1772	C ₁₉ H ₂₇ ClO ₂	-	-	7.2
	Fragment 2	305.1667	C ₁₉ H ₂₆ ClO	-	-	23.7
	[M+H] ⁺	318.1700	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	100	100	100
Cocaethylene	Fragment 1	196.1332	C ₁₁ H ₁₈ NO ₂	-	5.2	52.6
	[M+H] ⁺	304.1543	C ₁₇ H ₂₂ NO ₄	100	100	100
Cocaine	Fragment 1	182.1176	C ₁₀ H ₁₆ NO ₂	-	8.0	64.5
	[M+H] ⁺	300.1594	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	100	100	100
Codeine	[M+H] ⁺	300.1594	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	100	100	100
	[M+H] ⁺	177.1022	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	100	100	100
Cotinine	Fragment 1	136.0757	C ₈ H ₁₀ NO	55.5	67.7	74.9
	[M+H] ⁺	382.2013	C ₂₃ H ₂₈ NO ₄	100	100	56.4
Cyclofenil	Fragment 1	229.1223	C ₁₅ H ₁₇ O ₂	-	6.5	44.2
	Fragment 2	187.1117	C ₁₃ H ₁₅ O	-	11.8	100
	[M+H] ⁺	390.0344	C ₁₄ H ₁₇ ClN ₃ O ₄ S ₂	38.4	28.9	22.2
Cyclothiazide	Fragment 1	323.9874	C ₉ H ₁₁ ClN ₃ O ₄ S ₂	100	100	100
	Fragment 2	306.9609	C ₉ H ₈ ClN ₂ O ₄ S ₂	-	24.2	75.4
Danazol	[M+H] ⁺	338.2115	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	100	100	100
	[M+H] ⁺	289.2162	C ₁₉ H ₂₉ O ₂	52.3	29.2	13.6
Dehydroandrosterone	Fragment 1	271.2056	C ₁₉ H ₂₇ O	100	100	100
	Fragment 2	253.1951	C ₁₉ H ₂₅	18.8	32.0	63.5
Δ ⁹ -THC	[M+H] ⁺	315.2319	C ₂₁ H ₃₁ O ₂	100	100	100
Dexamethasone	[M+H] ⁺	393.2072	C ₂₂ H ₃₀ FO ₅	100	100	47.4

	Fragment 1	373.2010	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	6.9	38.4	100
	Fragment 2	355.1904	C ₂₂ H ₂₇ O ₄	-	9.1	56.2
Diazepam	[M+H] ⁺	285.0789	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₂ O	100	100	100
	[M+Na] ⁺	201.0998	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ ONa	17.4	13.2	8.5
Diethylnicotinamide (Niketamide)	[M+H] ⁺	179.1179	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O	100	100	100
	Fragment 1	108.0443	C ₆ H ₆ NO	-	13.6	97.9
	[M+H] ⁺	150.1277	C ₁₀ H ₁₆ N	58.3	-	-
Dimethylphenethylamine	Fragment 1	133.1013	C ₁₀ H ₁₃	100	22.3	-
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	68.3	100	100
	[M+H] ⁺	379.2380	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₂	100	100	100
Doxapram	Fragment 1	292.1696	C ₂₀ H ₂₂ NO	-	-	-
EDDP	[M] ⁺	278.1909	C ₂₀ H ₂₄ N	100	100	100
	[M+H] ⁺	166.1226	C ₁₀ H ₁₆ NO	92.3	-	-
Ephedrine	Fragment 1	148.1121	C ₁₀ H ₁₄ N	100	100	100
	Fragment 2	133.0886	C ₉ H ₁₁ N	-	6.8	45.9
	[M+H] ⁺	289.2162	C ₁₉ H ₂₉ O ₂	100	100	100
Epitestosterone	[M+Na] ⁺	437.1935	C ₂₄ H ₃₀ O ₆ Na	-	6	17.4
	[M+H] ⁺	415.2115	C ₂₄ H ₃₁ O ₆	100	100	100
Eplerenone	Fragment 1	397.2010	C ₂₄ H ₂₉ O ₅	-	-	12.0
	[M+H] ⁺	296.1856	C ₁₆ H ₂₆ NO ₄	100	100	100
Esmolol	[M+H] ⁺	303.185	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	100	100	100
Ethacrinic acid	[M+H] ⁺	291.2319	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	59.1	17.2	5.7
	Fragment 1	273.2213	C ₁₉ H ₂₉ O	100	100	96.1
Ethiocholanone	Fragment 2	255.2107	C ₁₉ H ₂₇	26.7	50.0	100
	[M+Na] ⁺	335.1982	C ₂₁ H ₂₈ O ₂ Na	100	100	100
Ethisterone	[M+H] ⁺	313.2162	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	76	34.2	25.6
	[M+H] ⁺	164.1434	C ₁₁ H ₁₇ N	100	19.3	-
Ethylamphetamine	Fragment 1	119.0858	C ₉ H ₁₁	10.9	21.8	-
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	18.4	100	100
	[M+H] ⁺	314.1751	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	100	100	100
Ethylmorphine	[M+H] ⁺	378.254	C ₂₄ H ₃₂ N ₃ O	100	100	100
Famprofazone	[M+H] ⁺	368.2220	C ₂₃ H ₃₀ NO ₃	100	100	100
Fenbutrazate	[M+H] ⁺	232.1308	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	100	100	15.0
Fenfluramine	Fragment 1	159.0416	C ₈ H ₆ F ₃	-	37.2	100
	[M+H] ⁺	261.1598	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₂	100	100	100
Fenspiride	Fragment 1	105.0699	C ₈ H ₉	-	-	27.0
	[M+H] ⁺	337.2274	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O	100	100	100
Fentanyl	Fragment 1	188.1434	C ₁₃ H ₁₈ N	-	-	17.4
	[M+H] ⁺	373.2850	C ₂₃ H ₃₇ N ₂ O ₂	100	100	100
Finasteride	Fragment 1	317.2222	C ₁₉ H ₂₉ N ₂ O ₂	-	-	10.4
	[M+H] ⁺	411.1978	C ₂₂ H ₂₉ F ₂ O ₅	100	100	100
Flumethasone	Fragment 1	371.1853	C ₂₂ H ₂₇ O ₅	-	-	15.4
	Fragment 2	353.1747	C ₂₂ H ₂₅ O ₄	-	-	16.0
	[M+H] ⁺	435.2177	C ₂₄ H ₃₂ FO ₆	100	100	100
Flunisolide	Fragment 1	417.2067	C ₂₀ H ₃₀ FO ₅	-	6.1	34.7
	[M+H] ⁺	453.2083	C ₂₄ H ₃₁ F ₂ O ₆	100	100	100
Fluocinolone acetonide	[M+H] ⁺	377.2123	C ₂₂ H ₃₀ FO ₄	100	100	100
Fluorometholone	Fragment 1	357.2057	C ₂₂ H ₂₉ O ₄	-	15.0	65.2
	Fragment 2	339.1950	C ₂₂ H ₂₇ O ₃	-	7.0	49.9
	[M+H] ⁺	337.2173	C ₂₀ H ₃₀ FO ₃	100	100	100
Fluoxymesterone	[M+H] ⁺	437.2334	C ₂₄ H ₃₄ FO ₆	100	100	100
Flurandrenolide	[M+H] ⁺	501.1917	C ₂₅ H ₃₂ F ₂ O ₅ S	100	100	100
Fluticasone propionate	Fragment 1	481.1855	C ₂₅ H ₃₁ F ₂ O ₅ S	-	-	13.3
	[M+H] ⁺	345.1809	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₄	100	100	75.4
Formoterol	Fragment 1	327.1703	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₃	-	9.3	49.9
	Fragment 2	149.0961	C ₁₀ H ₁₃ O	-	7.1	100

Furosemide	[M-H] ⁻	329.0004	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ S	100	100	31.9
	Fragment 1	285.0106	C ₁₁ H ₁₀ ClN ₂ O ₃ S	5.4	83.6	100
	Fragment 2	204.9844	C ₆ H ₆ ClN ₂ O ₂ S	-	-	11.3
Gestrinone	[M+Na] ⁺	331.1669	C ₂₁ H ₂₄ O ₂ Na	100	100	100
	[M+H] ⁺	309.1849	C ₂₁ H ₂₅ O ₂	77.1	41.8	31.4
Glibenclamide	[M+H] ⁺	494.1511	C ₂₃ H ₂₉ ClN ₃ O ₅ S	100	100	42.0
	Fragment 1	369.0671	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₂ O ₄	-	28.7	100
	Fragment 2	318.2061	C ₁₉ H ₂₈ NO ₃	-	10.0	2.4
Glipizide	[M+H] ⁺	446.1857	C ₂₁ H ₂₈ N ₅ O ₄ S	100	100	31.9
	Fragment 1	347.0805	C ₂₀ H ₁₅ N ₂ O ₂ S	-	11.6	36.7
	Fragment 2	321.1017	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O ₃ S	-	35.4	100
Heptaminol	[M+H] ⁺	146.1539	C ₈ H ₁₉ NO	61.9	7.1	-
	Fragment 1	128.1434	C ₈ H ₁₈ N	100	100	83.7
	Fragment 2	111.1166	C ₈ H ₁₅	8.0	18.0	13.0
	Fragment 3	69.0702	C ₅ H ₉	-	33.5	100
Heroin	[M+H] ⁺	370.1649	C ₂₁ H ₂₄ NO ₅	100	100	100
Hexobarbital	[M+H] ⁺	237.1234	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₃	100	70.8	38.6
	Fragment 1	157.0608	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃	39.9	100	100
Hydrochlorothiazide	[M-H] ⁻	295.9572	C ₇ H ₇ ClN ₃ O ₄ S ₂	100	100	100
	Fragment 1	268.9463	C ₆ H ₆ ClN ₂ O ₄ S ₂	-	-	12.0
	Fragment 2	204.9844	C ₆ H ₆ ClN ₂ O ₂ S	-	-	13.4
Hydrocortison	[M+H] ⁺	363.2166	C ₂₁ H ₃₁ O ₅	100	100	100
	Fragment 1	345.2060	C ₂₁ H ₂₉ O ₄	-	-	-
	Fragment 2	327.1955	C ₂₁ H ₂₇ O ₃	-	-	-
Hydroflumethiazide	[M-H] ⁻	329.9836	C ₈ H ₇ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	100	100	100
Hydromorphone	[M+H] ⁺	286.1438	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	100	100	100
Ibuprofen	[M+H] ⁺	207.1380	C ₁₃ H ₁₉ O ₂	63.3	5.3	-
	Fragment 1	161.1325	C ₁₂ H ₁₇	100	100	100
	Fragment 2	119.0855	C ₉ H ₁₁	5.3	16.9	57.6
Indapamide	[M+Na] ⁺	388.0493	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ SN	100	100	100
	[M+H] ⁺	366.0674	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₃ O ₃ S	49.6	21.3	-
Isoetharine	[M+H] ⁺	240.1594	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃	100	100	-
	Fragment 1	222.1489	C ₁₃ H ₂₀ NO ₂	-	98.9	100
	Fragment 2	180.1014	C ₁₀ H ₁₄ NO ₂	-	-	75.6
Ketamine	[M+H] ⁺	238.0993	C ₁₃ H ₁₇ ClNO	100	100	8.1
	Fragment 1	207.0571	C ₁₂ H ₁₂ ClO	-	32.5	16.8
	Fragment 2	125.0153	C ₇ H ₆ Cl	-	45.4	100
Labetalol	[M+H] ⁺	329.186	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₃	100	100	43.8
	Fragment 1	311.1754	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₂	-	26.9	100
	Fragment 2	179.0815	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₂	-	-	20.0
Letrozole	[M+H] ⁺	286.1087	C ₁₇ H ₁₁ N ₅	100	12.2	-
	Fragment 1	217.076	C ₁₅ H ₉ N ₂	41.6	100	100
	Fragment 2	132.0808	C ₉ H ₁₀ N	22.6	27.2	15.0
Lidocaine	[M+H] ⁺	235.1805	C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O	100	100	31.1
	Fragment 1	86.0694	C ₅ H ₁₂ N	-	17.5	100
LSD	[M+H] ⁺	324.2070	C ₂₀ H ₂₆ N ₃ O	100	100	100
	Fragment 1	281.1648	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ O	-	-	21.2
	Fragment 2	223.1230	C ₁₅ H ₁₅ N ₂	-	-	11.2
MDA	[M+H] ⁺	180.1019	C ₁₀ H ₁₄ NO ₂	36.6	-	-
	Fragment 1	163.0754	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	100	100	40.1
	Fragment 2	135.0441	C ₈ H ₇ O ₂	5.8	20.6	62.7
	Fragment 3	105.0699	C ₈ H ₉	5.9	23.2	100
MDEA	[M+H] ⁺	208.1332	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	100	29.0	-
	Fragment 1	163.0754	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	26.3	100	96.2
	Fragment 2	135.0441	C ₈ H ₇ O ₂	-	13.3	69.4
	Fragment 3	105.0699	C ₈ H ₉	-	14.2	100

MDMA	[M+H] ⁺	194.1176	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	100	13.9	-
	Fragment 1	163.0754	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	48.3	100	61.6
	Fragment 2	135.0441	C ₈ H ₇ O ₂	-	15.5	65.9
	Fragment 3	105.0699	C ₈ H ₉	-	16.4	100
Medroxyprogesterone	[M+H] ⁺	345.2424	C ₂₂ H ₃₃ O ₃	100	100	100
Mefenorex	[M+H] ⁺	212.1201	C ₁₂ H ₁₈ ClN	100	57.4	-
	Fragment 1	119.0858	C ₉ H ₁₁	7.1	42.3	8.4
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	14.6	100	100
Meloxicam	[M+H] ⁺	352.0420	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O ₄ S ₂	100	100	58.4
	Fragment 1	141.0119	C ₅ H ₅ N ₂ OS	-	3.2	21.3
	Fragment 2	115.0328	C ₄ H ₇ N ₂ S	1.8	19.1	100
Meperidine	[M+H] ⁺	248.1645	C ₁₅ H ₂₂ NO ₂	100	100	100
	Fragment 1	220.1332	C ₁₃ H ₁₈ NO ₂	-	-	10.6
	Fragment 2	174.1277	C ₁₂ H ₁₆ N	-	-	10.4
Mesterolone	[M+H] ⁺	305.2475	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	100	100	100
	Fragment 1	287.2369	C ₂₀ H ₃₁ O	6.6	6.0	9.3
	Fragment 2	183.0804	C ₁₃ H ₁₀ O	23.4	8.4	12.3
Metaproterenol (Orciprenaline)	[M+H] ⁺	212.1281	C ₁₁ H ₁₈ NO ₃	100	80.7	-
	Fragment 1	194.1176	C ₁₁ H ₁₆ NO ₂	12.2	100	37.6
	Fragment 2	164.0706	C ₉ H ₁₀ NO ₂	-	13.2	54.4
	Fragment 3	152.0706	C ₈ H ₁₀ NO ₂	-	47.7	100
Methadone	[M+H] ⁺	310.2165	C ₂₁ H ₂₈ NO	100	100	35.5
	Fragment 1	265.1587	C ₁₉ H ₂₁ O	-	10.4	100
Methamphetamine	[M+H] ⁺	150.1277	C ₁₀ H ₁₆ N	100	7.0	-
	Fragment 1	119.0858	C ₉ H ₁₁	33.3	18.1	-
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	48.2	100	100
Methandienone	[M+H] ⁺	301.2162	C ₂₀ H ₂₉ O ₂	100	100	100
Methoxyphenamine	[M+H] ⁺	180.1383	C ₁₁ H ₁₈ NO	100	20.4	-
	Fragment 1	149.0961	C ₁₀ H ₁₃ O	36.2	100	40.6
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	-	17.2	100
Methylephedrine	[M+H] ⁺	180.1383	C ₁₁ H ₁₈ NO	100	100	9.9
	Fragment 1	162.1277	C ₁₁ H ₁₆ N	7.9	87.0	100
	Fragment 2	147.1043	C ₁₀ H ₁₂ N	-	5.7	31.7
Methylphenidate	[M+H] ⁺	234.1489	C ₁₄ H ₂₀ NO ₂	100	100	23.4
	Fragment 1	84.0808	C ₅ H ₁₀ N	-	39.5	100
Meticrane	[M+H] ⁺	276.0359	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄ S ₂	100	100	82.8
	Fragment 1	259.0093	C ₁₀ H ₁₁ S ₂ O ₄	7.2	18.3	31.3
	Fragment 2	223.0536	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₂ S	-	21.9	100
Metolazone	[M+Na] ⁺	388.0493	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S ₂	100	100	100
	[M+H] ⁺	366.0674	Na	79.3	44.4	18.5
	Fragment 1	258.9939	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₃ O ₃ S ₂ C ₉ H ₈ ClN ₂ O ₃ S	-	21.3	63.4
Metoprolol	[M+H] ⁺	268.1907	C ₁₅ H ₂₆ NO ₃	100	100	100
Morphine	[M+H] ⁺	286.1438	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	100	100	100
Nadolol	[M+H] ⁺	310.2013	C ₁₇ H ₂₈ NO ₄	100	100	100
	Fragment 1	254.1387	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄	-	8.1	67.4
Nandrolone (19-Nortestosterone)	[M+H] ⁺	275.2006	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	100	100	100
	Fragment 1	257.1900	C ₁₈ H ₂₅ O	-	-	5.2
Nateglinide	[M+H] ⁺	318.2064	C ₁₉ H ₂₈ NO ₃	100	100	100
	Fragment 1	125.1326	C ₉ H ₁₇	1.2	11.8	65.2
	Fragment 2	120.0808	C ₈ H ₁₀ N	1.9	14.2	95.3
N-Desmethylselegiline	[M+H] ⁺	174.1277	C ₁₂ H ₁₆ N	100	8.6	-
	Fragment 1	119.0858	C ₉ H ₁₁	36.7	32.8	-
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	40.9	100	100

Nicotine	[M+H] ⁺	163.1230	C ₁₀ H ₁₅ N ₂	100	100	21.4
	Fragment 1	132.0808	C ₉ H ₁₀ N	6.9	6.9	100
	Fragment 2	117.0571	C ₈ H ₆ N	-	8.0	50.9
Norbolethone	[M+Na] ⁺	339.2295	C ₂₁ H ₃₂ O ₂ Na	62.6	100	100
	[M+H] ⁺	317.2475	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	100	66.4	50.2
Norcocaine	[M+H] ⁺	290.1387	C ₁₆ H ₂₀ NO ₄	100	100	44.5
	Fragment 1	168.1019	C ₉ H ₁₄ NO ₂	-	26.0	100
	Fragment 2	136.0757	C ₈ H ₁₀ NO	-	6.7	41.7
Norcodeine	[M+H] ⁺	286.1438	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	100	100	100
Norethandrolone	[M+H] ⁺	325.2135	C ₂₀ H ₃₀ O ₂ Na	-	-	7.0
		303.2319	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	100	100	100
Norethindrone	[M+Na] ⁺	321.1825	C ₂₀ H ₂₆ O ₂ Na	100	100	100
	[M+H] ⁺	299.2006	C ₂₀ H ₂₇ O ₂	60.7	30.3	26.0
Norfenfluramine	[M+H] ⁺	204.0995	C ₁₀ H ₁₂ F ₃ N	100	30.9	-
	Fragment 1	187.0729	C ₁₀ H ₉ N	14.0	40.9	-
	Fragment 2	159.0416	C ₈ H ₅ F ₃	13.4	100	100
Norfentanyl	[M+H] ⁺	233.1648	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	100	100	41.8
	Fragment 1	150.0913	C ₉ H ₁₂ NO	-	-	16.3
	Fragment 2	84.0808	C ₅ H ₁₀ N	-	18.3	100
Norgestrel	[M+Na] ⁺	335.1982	C ₂₁ H ₂₈ O ₂ Na	100	100	100
	[M+H] ⁺	313.2162	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	75.5	35.1	36.8
Normorphine	[M+H] ⁺	272.1281	C ₁₆ H ₁₈ NO ₃	100	100	100
Noroxycodone	[M+H] ⁺	302.1387	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	100	100	87.3
	Fragment 1	284.1281	C ₁₇ H ₁₈ NO ₃	-	18.5	100
	Fragment 2	227.0941	C ₁₄ H ₁₂ NO ₂	-	-	16.9
Noroxymorphone	[M+H] ⁺	288.1230	C ₁₆ H ₂₈ NO ₄	100	100	100
	Fragment 1	270.1125	C ₁₆ H ₂₆ NO ₃	-	15.7	93.3
Norpseudoephedrine(Cathine)	[M+H] ⁺	152.1070	C ₉ H ₁₄ N	8.8	-	-
	Fragment 1	134.0964	C ₉ H ₁₂ N	100	100	97.8
	Fragment 2	117.0699	C ₉ H ₉	-	19.7	100
Octopamine	[M+H] ⁺	154.0863	C ₈ H ₁₂ NO ₂	3.8	-	-
	Fragment 1	136.0757	C ₈ H ₁₀ NO	100	100	52.5
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	4.3	31.6	100
Oxilofrine	[M+H] ⁺	182.1178	C ₁₀ H ₁₆ NO ₂	51.4	-	-
	Fragment 1	164.1070	C ₁₀ H ₁₄ NO	100	100	100
	Fragment 2	149.0835	C ₉ H ₁₁ NO	-	8.0	56.6
Oxycodone	[M+Na] ⁺	338.1363	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ Na	55.5	69.4	100
	[M+H] ⁺	316.1545	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	100	100	75.6
	Fragment 1	298.1438	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃	-	10.8	52.9
Oxymorphone	[M+H] ⁺	302.1387	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	100	100	100
	Fragment 1	284.1281	C ₁₇ H ₁₈ NO ₃	-	6.7	53.7
Penbutolol	[M+H] ⁺	292.2271	C ₁₈ H ₃₀ NO ₂	100	100	65.3
	Fragment 1	236.1645	C ₁₄ H ₂₂ NO ₂	-	14.6	100
Pentobarbital	[M+H] ⁺	227.139015	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₃	100	32.2	7.0
	Fragment 1	157.0608	C ₆ H ₉ N ₂ O ₃	43.8	100	100
Pentoxifylline	[M+H] ⁺	279.1452	C ₁₃ H ₁₉ N ₄ O ₃	100	100	100
	Fragment 1	181.0720	C ₇ H ₉ N ₄ O ₂	-	-	13.4
	Fragment 2	138.0622	C ₆ H ₈ N ₃ O	-	-	22.3
Pentylentetrazole	[M+H] ⁺	139.0978	C ₆ H ₁₁ N ₄	100	100	87.9
	Fragment 1	96.0808	C ₆ H ₁₀ N	8.6	45.2	100
Phenobarbital	[M+H] ⁺	233.0921	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₃	100	100	36.9
	Fragment 1	162.0913	C ₁₀ H ₁₂ NO	-	31.0	100
Phenylephrine	[M+H] ⁺	168.1019	C ₉ H ₁₄ NO ₂	27.3	-	-
	Fragment 1	150.0913	C ₉ H ₁₂ NO	100	100	100
	Fragment 2	135.0679	C ₈ H ₉ NO	-	6.8	51.4

Picrotin	[M+Na] ⁺	333.0943	C ₁₅ H ₁₈ O ₇ Na	-	22.2	100
	[M+H] ⁺	311.1125	C ₁₅ H ₁₉ O ₇	100	100	36.7
	Fragment 1	293.1020	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	-	31.9	32.4
Picrotoxinin	[M+Na] ⁺	315.0838	C ₁₅ H ₁₆ O ₆ Na	-	49.9	100
	[M+H] ⁺	293.1020	C ₁₅ H ₁₇ O ₆	100	100	23.7
	Fragment 1	265.1071	C ₁₄ H ₁₇ O ₅	-	38.3	18.5
Pindolol	[M+H] ⁺	249.1598	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₂	100	100	100
	Fragment 1	172.0757	C ₁₁ H ₁₀ NO	-	-	21.3
	Fragment 2	134.0600	C ₈ H ₈ NO	-	-	18.2
Piretanide	[M+H] ⁺	363.1009	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₅ S	100	100	100
Prednisolone	[M+H] ⁺	361.2010	C ₂₁ H ₂₉ O ₅	100	100	25.2
	Fragment 1	343.1904	C ₂₁ H ₂₇ O ₄	8.1	60.1	100
	Fragment 2	325.1798	C ₂₁ H ₂₅ O ₃	-	14.2	36.8
Prednisone	[M+H] ⁺	359.1853	C ₂₁ H ₂₇ O ₅	100	100	100
	Fragment 1	341.1747	C ₂₁ H ₂₅ O ₄	-	6.5	41.4
Probenecid	[M+H] ⁺	286.1108	C ₁₃ H ₂₀ NO ₄ S	100	100	43.8
	Fragment 1	244.0638	C ₁₀ H ₁₄ NO ₄ S	-	39.6	100
	Fragment 2	202.0169	C ₇ H ₈ NO ₄ S	-	9.3	77.2
Propafenone	[M+H] ⁺	342.2064	C ₂₁ H ₂₈ NO ₃	100	100	100
	Fragment 1	116.1070	C ₆ H ₁₄ NO	-	-	5.5
Propoxyphene	[M+H] ⁺	340.2271	C ₂₂ H ₃₀ NO ₂	100	50.6	5.4
	Fragment 1	266.1903	C ₁₉ H ₂₄ N	14.5	100	100
	Fragment 2	143.0855	C ₁₁ H ₁₁	-	-	25.4
Propranolol	[M+H] ⁺	260.1645	C ₁₆ H ₂₂ NO ₂	100	100	100
	Fragment 1	183.0804	C ₁₃ H ₁₁ O	-	-	7
Propylhexedrine	[M+H] ⁺	156.1747	C ₁₀ H ₂₂ N	100	100	100
Repaglinide	[M+H] ⁺	453.2748	C ₂₇ H ₃₇ N ₂ O ₄	100	100	100
	Fragment 1	230.1903	C ₁₆ H ₂₄ N	-	-	8.2
Ritodrine	[M+H] ⁺	288.1594	C ₁₇ H ₂₂ NO ₃	100	100	20.1
	Fragment 1	270.1489	C ₁₇ H ₂₀ NO ₂	6.4	47.7	100
	Fragment 2	150.0913	C ₉ H ₁₂ NO	-	-	21.7
Salbutamol	[M+H] ⁺	240.1594	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃	100	100	-
	Fragment 1	166.0863	C ₉ H ₁₂ NO ₂	7.6	88.2	50.8
	Fragment 2	148.0757	C ₉ H ₁₀ NO	6.0	64.9	100
Salicylamide	[M+H] ⁺	138.0550	C ₇ H ₈ NO ₂	100	100	100
Salmeterol	[M+H] ⁺	416.2795	C ₂₅ H ₃₈ NO ₄	100	100	100
	Fragment 1	398.2690	C ₂₅ H ₃₆ NO ₃	-	6.0	10.0
Selegiline (Deprenil)	[M+H] ⁺	188.1434	C ₁₃ H ₁₈ N	100	26.7	-
	Fragment 1	119.0858	C ₉ H ₁₁	11.4	33.0	-
	Fragment 2	91.0542	C ₇ H ₇	19.2	100	100
Sotalol	[M+H] ⁺	273.1267	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ S	100	68.0	5.5
	Fragment 1	255.1162	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₂ S	15.5	100	100
	Fragment 2	213.0692	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	-	12.8	59.2
Spironolactone	[M+H] ⁺	417.2094	C ₂₄ H ₃₃ O ₄ S	0.3	0.5	0.5
	Fragment 1	341.2111	C ₂₂ H ₂₉ O ₃	100	100	100
Stanozolol	[M+H] ⁺	329.2587	C ₂₁ H ₃₃ N ₂ O	100	100	100
Strychnine	[M+H] ⁺	335.1754	C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₂	100	100	100
Tamoxifen	[M+H] ⁺	372.2332	C ₂₆ H ₃₀ NO	100	100	100
Terbutaline	[M+H] ⁺	226.1438	C ₁₂ H ₂₀ NO ₃	100	100	-
	Fragment 1	152.0706	C ₈ H ₁₀ NO ₂	13.1	76.2	100
Testosterone	[M+Na] ⁺	311.1982	C ₁₉ H ₂₈ O ₂ Na	86.8	100	100
	[M+H] ⁺	289.2162	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	100	47.2	37.0
Tibolone	[M+H] ⁺	313.2162	C ₂₁ H ₂₉ O ₂	100	100	82.2
	Fragment 1	295.2056	C ₂₁ H ₂₇ O	7.9	22.5	100
	Fragment 2	199.0754	C ₁₃ H ₁₁ O	-	-	53.4

Timolol	[M+H] ⁺	317.1642	C ₁₃ H ₂₅ N ₄ O ₃ S	100-	100	78.1
	Fragment 1	261.1016	C ₉ H ₁₇ N ₄ O ₃ S	-	13.5	100
		188.0488	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₂ S	-	-	12.4
Tolazamide	[M+H] ⁺	312.1376	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	100	100	100
	Fragment 1	141.1024	C ₇ H ₁₃ N ₂ O	-	1.7	17.4
	Fragment 2	115.1234	C ₆ H ₁₅ N ₂	-	3.9	24.8
Tolbutamide	[M+H] ⁺	271.1111	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₃ S	100	100	53.4
	Fragment 1	172.0427	C ₇ H ₁₀ NO ₂ S	4.7	51.0	61.7
	Fragment 2	119.0605	C ₇ H ₇ N ₂	-	17.4	90.1
	Fragment 3	91.0542	C ₇ H ₇	-	9.8	100
Torasemide	[M+H] ⁺	349.1329	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	100	100	11.8
	Fragment 1	264.0801	C ₁₂ H ₁₄ N ₃ O ₂ S	8.3	59.9	100
Toremifene	[M+H] ⁺	406.1932	C ₂₆ H ₂₉ ClNO	100	100	100
Triamcinolone	[M+Na] ⁺	417.1684	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆ Na	58.6	100	100
	[M+H] ⁺	395.1864	C ₂₁ H ₂₈ FO ₆	100	45.9	7.6
Triamterene	[M+H] ⁺	254.1149	C ₁₂ H ₁₂ N ₇	100	100	100
Trichlormethiazide	[M-H]	379.8920	C ₈ H ₇ Cl ₃ N ₃ O ₄ S ₂	100	82.8	29.1
	Fragment 1	305.9415	C ₈ H ₅ ClN ₃ O ₄ S ₂	28.8	100	67.7
	Fragment 2	241.9796	C ₈ H ₅ ClN ₃ O ₂ S	5.2	41.8	100
Turinabol	[M+H] ⁺	335.1772	C ₂₀ H ₂₈ ClO ₂	100	100	31.1
	Fragment 1	317.1667	C ₂₀ H ₂₆ ClO	8.4	55.9	100
Tyramine	[M+H] ⁺	138.0913	C ₈ H ₁₂ NO	100	32.4	-
	Fragment 1	105.0699	C ₈ H ₉	-	100	100
Vanillic acid diethylamide	[M+Na] ⁺	246.1101	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃ Na	85.8	100	100
	[M+H] ⁺	224.1281	C ₁₂ H ₁₈ NO ₃	100	85.1	33.8
	Fragment 1	151.039	C ₈ H ₇ O ₃	5.8	22.4	53.3
Warfarin	[M+Na] ⁺	331.0941	C ₁₉ H ₁₆ O ₄ Na	100	100	100
	[M+H] ⁺	309.1121	C ₁₉ H ₁₇ O ₄	13.7	7.3	4.1

Results and Discussion

Identification of targeted sport drugs by LC-TOFMS accurate mass measurements

For screening purposes, the identification of the selected sport drugs was accomplished by combining retention time matching and accurate mass measurements of the selected ion, criteria in compliance with current WADA guidelines^[65]. **Table 1** summarizes the data of the 200 compounds tested listed in alphabetical order including retention time, elemental composition of the detected ions, theoretical and experimental accurate mass and their relative mass error at 25 µg L⁻¹ concentration level. Most of the compounds were detected in positive ion mode except 6 detected in the negative ion mode (benthiazide, chlorothiazide, furosemide, hydrochlorothiazide, hidroflumethiazide and trichlormethiazide). A single high-resolution ion (either a protonated ([M+H]⁺) or deprotonated molecule

([M-H]⁻) were used for screening (detection) and quantitation purposes, except in some cases including EDDP (already charged ([M]⁺)) and other compounds for those a fragment ion was found more appropriate due to higher signal than the respective molecule, avoiding the use of non-specific ions such as tropyllium cation (m/z 91) and selecting the higher mass value as possible in order to preserve selectivity. On the other hand, only a few compounds exhibited sodium adducts (eg. 4-androstene-3,17-dione, norethandrolone, 16- β -hydroxyfurazabol) although these ions were not selected (**Table 2**).

For the automated targeted screening, “Find by formula” software application was used. This tool is implemented to search the selected targeted list of retention time/accurate mass (elemental composition) pairs in the LC-MS raw datafile. Two main parameters affecting search criteria were optimized: accurate mass tolerance and retention time tolerance. A \pm 10-mDa mass window was selected for screening purposes, although final confirmation within 5 ppm relative mass error tolerance is required for positive identification. Different retention time tolerance windows were also considered, and finally it was fixed at \pm 0.2 min for screening/identification purposes. The RSD deviation of retention time were typically well below this tolerance (eg. < 0.1 %).

To each individual positive finding, the retention time and accurate mass bias is provided along with the isotope pattern matching score. This is an additional tool to further confirm the identity of a positive, based on the comparison of the experimental data with the theoretical values of the assigned elemental composition of the tentative positive. A score coefficient (scale up to 100), which considers the relative abundance of the different isotope signals of the detected species, the space (m/z gap) between these signals and the relative mass error is generated per positive finding.

Finally, with respect to the identification criteria, it is worthwhile mention the high mass accuracy attained with the LC-TOFMS instrument used. As shown in **Table 1**, the relative mass errors were below 2 ppm in most cases, being the average mass error as low as 0.72 ppm in the studied urine matrix-matched standard spiked at 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Another key part of the LC-TOFMS screening method is the chromatography which is of paramount importance for appropriate identification of each individual sport drug. Several isobaric (same nominal mass) or isomeric species (same elemental composition) can be easily distinguished with an optimized LC separation. A 18-min run gradient using a short C_{18} column (50 mm) with small particle size (1.8 μm particle size) was finally selected. The use of shorter methods may yield some isobaric coeluting species and also stronger matrix effects. With the selected method, only 8 compounds eluted near the void volume (*eg.* retention time ≤ 1.5 min). The targeted compounds are distributed mainly (> 80 %) in the retention time range from 5 to 15 min, with the following distribution: 15 % compounds between 0 and 5 min; 35 % compounds between 5 and 10 min; 46 % compounds between 10 and 15 min and 4 % compounds from 15 to 18 min. With the selected method, no coeluting isobaric species were found amongst the selected compounds. A summary of tentative coeluting isobaric species resolved is shown in **Table 3**. All the species could be distinguished between themselves by retention time, mass resolving power and/ or characteristic fragmentation.

Table 3. Summary of selected isobaric species (same nominal mass) occurring in the 200 studied sport drugs included in the LC-TOFMS accurate-mass database method

Group	Compound	Theoretical exact mass (m/z)	Retention Time (min) ($\Delta RT \leq 0.2$ min)*	Comments
1	Butabarbital	157,0608	9,84	Distinguished by RT
	Hexobarbital	157,0608	10,91	Distinguished by additional ion ($[M+H]^+$ m/z 237)
	Pentobarbital	157,0608	10,77	Distinguished by additional ion ($[M+H]^+$ m/z 227)
2	MDA	163,0754	5,85	Distinguished by RT
	MDEA	163,0754	7,43	Distinguished by RT and additional ion (m/z 208 ($[M+H]^+$))
	MDMA	163,0754	6,26	Distinguished by RT
3	Phenobarbital	233,0921	9,67	Distinguished by RT and resolving power
	Norfentanyl	233,1648	7,58	Distinguished by RT and resolving power
4	Bis(4-cyanophenyl)metanol	238,0866	11,46	Distinguished by RT
	Ketamine	238,0993	7,48	Distinguished by RT
	Boldine	238,1543	7,22	Distinguished by RT
5	Isoetharine	240,1594	1,85	Distinguished by RT and additional ion (fragment, m/z 180) at higher fragmentor voltage
	Salbutamol	240,1594	1,65	Distinguished by RT and additional ions (fragments, m/z 166 and 148)
6	Sotalol	255,1162	2,03	Distinguished by RT and resolving power
	β -Estradiol	255,1743	11,85	Distinguished by RT and resolving power
7	19-Norandrosterone	259,2056	13,43	Distinguished by RT
	19-Noresthiocholanone	259,2056	13,00	Distinguished by RT
8	Tolbutamide	271,1111	11,80	Distinguished by RT and resolving power
	Dehydroandrosterone	271,2056	12,66	Distinguished by RT and resolving power
9	Pentoxifylline	279,1452	8,59	Distinguished by RT and resolving power
	17- α -Ethinil estradiol	279,1743	12,33	Distinguished by RT and

				resolving power
10	Hydromorphone	286,1438	1,94	Distinguished by RT
	Morphine	286,1438	1,5	Distinguished by RT
	Norcodeine	286,1438	2,76	Distinguished by RT
11	4-Androstene-3,17-dione	287,2006	12,78	Distinguished by RT
	Boldenone	287,2006	11,48	Distinguished by RT
	2 α -Methyl-5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	287,2369	15,04	Distinguished by RT and resolving power
12	Noroxymorphone	288,123	1,52	Distinguished by RT and resolving power
	Ritodrine	288,2594	4,71	Distinguished by RT and resolving power
13	17-Epioxandrolone	289,2162	12,89	Distinguished by additional ion ([M+H] ⁺ m/z 307)
	Epitestosterone	289,2162	12,76	Distinguished by RT and additional ions (fragments, m/z 109 and 97) at higher fragmentor voltage
	Testosterone	289,2162	12,16	Distinguished by RT
14	Benzoylcegonine	290,1387	7,69	Distinguished by RT
	Norcocaine	290,1387	8,73	Distinguished by RT
15	Noroxycodone	302,1387	4,1	Distinguished by RT
	Oxymorphone	302,1387	1,65	Distinguished by RT
16	Ethacrinic acid	303,1850	12,77	Distinguished by RT and resolving power
	4-Hydroxyandrostendione	303,1958	13,06	Distinguished by RT
	17- α -Methyltestosterone	303,2319	12,62	Distinguished by RT and resolving power
	Norethandrolone	303,2319	13,38	Distinguished by RT
17	4-hydroxytestosterone	305,2111	12,33	Distinguished by RT and resolving power
	Mesterolone	305,2475	13,57	Distinguished by RT and resolving power
18	Warfarin	309,1121	12,76	Distinguished by RT and resolving power
	Gestrinone	309,1849	12,54	Distinguished by RT and resolving power
19	Nadolol	310,2013	6,39	Distinguished by RT and resolving power
	Methadone	310,2165	10,58	Distinguished by RT and resolving power
20	Picrotin	311,1125	9,02	Distinguished by RT and resolving power
	Altrenogest	311,2006	13,11	Distinguished by RT and resolving power
21	Ethisterone	313,2162	12,70	Distinguished by RT
	Norgestrel	313,2162	13,20	Distinguished by RT
	Tibolone	313,2162	13,66	Distinguished by RT
22	Cannabidiol	315,2319	16,11	Distinguished by RT

	Δ^9 -THC	315,2319	17,47	Distinguished by RT
23	Timolol	317,1642	7,92	Distinguished by RT and resolving power
	Norbolethone	317,2475	14,39	Distinguished by RT and resolving power
24	Cocaethylene	318,1700	9,19	Distinguished by RT and resolving power
	Nateglinide	318,2064	13,45	Distinguished by RT and resolving power
25	4-Chloro-4-androsten-3 α -ol-17-one	323,1772	13,93	Distinguished by RT
	α -Zearalanol	323,1853	11,79	Distinguished by RT
26	Labetalol	329,1860	9,02	Distinguished by RT and resolving power
	16- β -Hydroxyfurazabol	329,2224	13,23	Distinguished by RT and resolving power
	Stanozol	329,2587	11,89	Distinguished by RT and resolving power
27	Strychnine	335,1754	7,28	Distinguished by RT
	Turinabol	335,1772	13,04	Distinguished by RT
28	Acebutolol	337,2122	7,97	Distinguished by RT
	Fluoxymesterone	337,2173	10,9	Distinguished by RT
	Fentanyl	337,2274	9,6	Distinguished by RT
29	Canrenone	341,2111	13,02	Distinguished by RT
	Spirolactone	341,2111	12,86	Distinguished by RT
30	Formoterol	345,1809	8,28	Distinguished by RT and resolving power
	11-Nor-11-carboxy- Δ^9 -THC	345,2060	15,07	Distinguished by RT and resolving power
	Medroxyprogesterone	345,2424	13,55	Distinguished by RT and resolving power
31	Piretanide	363,1009	11,79	Distinguished by RT and resolving power
	Hydrocortison	363,2166	9,98	Distinguished by RT and resolving power
32	Bumetanide	365,1166	12,23	Distinguished by RT and resolving power
	Clostebol acetate	365,1878	16,06	Distinguished by RT and resolving power
33	Indapamide	366,0674	11,20	Distinguished by RT
	Metolazone	366,0674	10,68	Distinguished by RT
34	Bambuterol	368,2180	8,62	Distinguished by RT
	Fenbutrazate	368,2220	11,01	Distinguished by RT
35	Celecoxib	382,0832	13,85	Distinguished by RT and resolving power
	Cyclofenil	382,2013	16,33	Distinguished by RT and resolving power
36	Fluocinolone acetonide	453,2083	11,30	Distinguished by RT and resolving power
	Repaglinide	453,2748	11,74	Distinguished by RT and resolving power

Evaluation of LC-TOFMS approach for confirmatory purposes

The only document available so far related to criteria and guidelines for identification of substances by chromatographic/mass spectrometric assays ^[6,65] states that for molecules < 800 Da, prohibited substances with a concentration greater than approximately 100 ng mL⁻¹ should have a full or partial scan acquired or shall have accurate mass determined such that the elemental composition can be determined. Whenever possible, a full-scan is the preferred option ^[6]. The WADA guidelines are thus very non-specific in terms of identification criteria by HRMS ^[6,65].

Table 1 includes the selected ion for screening purposes. Unlike other applications such as food or feed testing ^[66,67], yet there are no detailed guidelines in sport drug testing requiring for instance two high resolution ions for confirmation purposes) or even ion ratios. Most of the literature published so far (preventive screening method with HRMS) only included one single ion ^[6,44,48,52,54,59,60,61], with the exception of Virus *et al.* ^[46] (20 compounds using LTQ-Orbitrap) and Badoud *et al.* ^[49] (103 compounds using Q-TOF), both using dedicated CID MS/MS experiments providing at least two HR ions. Even, it is often easy to find LC-MS/MS methods based on a single screening MRM MS/MS transition ^[55,58]. As an alternative, Jimenez-Girón *et al.* ^[61] used an HRMS Orbitrap without collision cell and considered Na adducts and chlorine isotope signals instead of actual fragment ions. One of the drawbacks reported was the extent of matrix effects which was remarkable for these secondary ions used for confirmatory purposes.

With the aim to evaluate LC-TOFMS capabilities for confirmatory purposes, considering the measurement of 2 HR ions (within 5 ppm error) as criterion for unambiguous confirmation, two approaches were tested:

(a) *In-source CID fragmentation using two different fragmentor voltages (190 and 220V), and;*

(b) *CID MS/MS fragmentation without precursor ion isolation (commercially called “all ion mode” or “MS^E”), an approach analogous to in-source CID carried out in a dedicated collision cell (instead of the ion transportation region), fully compatible with full-scan acquisition of LC-TOFMS instruments,*

In-source CID fragmentation was studied for each individual compound and is summarized in **Table 2**, including the assigned elemental composition for each fragment ion. Data was acquired at two fragmentor voltages (190 and 220 V), using either a single injection for each voltage, or both experiments in the same run, which involved a slight decrease of sensitivity (*ca.* 20 %) due to reduced acquisition time (500 ms in each experiment). Nearly 70 % of the studied compounds exhibited at least one fragment ion with relevant relative abundance (eg. > 10 %) at the tested fragmentor voltages. In contrast, about 60 compounds only displayed the protonated molecule at the optimized fragmentor voltages. In a few cases (benthiazide, chlorothiazide, clopamide, diazepam, ethacrinic acid, indapamide and toremifene) these compounds displayed additional information due to A+2 signals from chlorine atoms, that can also be used for confirmation purposes. The list of compounds difficult to be fragmented with in-source CID is detailed in **Table 4**.

Table 4. All-ion mode CID-MS/MS Fragmentation study of the compounds, which do not yield relevant in-source CID fragmentation for confirmatory purposes

Compound	Ion	m/z Theoretical	Main fragments
17- α -Methyltestosterone	[M+H] ⁺	303.2319	285.2213
17- α -Hydroxyprogesterone	[M+H] ⁺	331.2268	313.2168, 271.2056
2-Aminoheptane	[M+H] ⁺	116.1434	-
2 α -Hydroxymethylethisterone	[M+H] ⁺	343.2268	237.1638, 139.0754, 127.0754
4-Androstene-3,17-dione	[M+H] ⁺	287.2006	269.1900 and [M+Na] ⁺
4-Hydroxyandrostendione	[M+H] ⁺	303.1958	285.1849, 267.1743
4-Hydroxytestosterone	[M+H] ⁺	305.2111	113.0595
Acebutolol	[M+H] ⁺	337.2122	319.2016, 116.1068, 98.0963
Acetylmorphine	[M+H] ⁺	328.1543	268.1332, 211.0754, 58.0651
Adrafinil	[M+H] ⁺	290.0845	167.0855
Benthiazide	[M-H] ⁻	429.9771	307.9572
Betaxolol	[M+H] ⁺	308.2220	246.1125, 151.0390
Bis(4-cyanophenyl) methanol	[M+H] ⁺	235.0866	217.0760
Bisoprolol	[M+H] ⁺	326.2326	308.2220, 222.1489, 116.1070
Boldenone	[M+H] ⁺	287.2006	269.1900, 173.0961, 135.1168
Brucine	[M+H] ⁺	395.1965	367.1652, 350.1387, 282.1125
Buprenorphine	[M+H] ⁺	468.3108	396.2640; 187.1040
Bupropion	[M+H] ⁺	240.1150	184.0524, 166.0418, 139.0309
Cannabidiol	[M+H] ⁺	315.2319	259.1693, 193.1223, 135.1168
Canrenone	[M+H] ⁺	341.2111	205.1223, 187.1117, 107.0855
Celecoxib	[M+H] ⁺	382.0832	362.0769
Chlorothiazide	[M-H] ⁻	293.9421	213.9610
Clopramide	[M+H] ⁺	346.0987	250.0048, 112.1121
Codeine	[M+H] ⁺	300.1594	243.1016, 215.1067, 58.0651
Danazol	[M+H] ⁺	338.2115	310.2165
Δ 9-THC	[M+H] ⁺	315.2319	259.1693, 193.1223, 135.1168
Diazepam	[M+H] ⁺	285.0789	257.0840, 228.0575, 154.0418
Doxapram	[M+H] ⁺	379.2380	292.1696
EDDP	[M] ⁺	278.1903	249.1512, 234.1277, 200.1434
Epitestosterone	[M+H] ⁺	289.2162	271.2076, 109.0648, 97.0648
Esmolol	[M+H] ⁺	296.1856	219.1016, 145.0648, 116.1070
Ethylmorphine	[M+H] ⁺	314.1751	296.1645, 257.1175, 229.1223
Famprofazone	[M+H] ⁺	378.254	260.1757
Fenbutrazate	[M+H] ⁺	368.2220	191.1067
Fluocinolone acetonide	[M+H] ⁺	453.2083	413.1959, 355.1504, 337.1415
Fluoxymesterone	[M+H] ⁺	337.2173	317.2111, 299.2006, 281.1900
Flurandrenolide	[M+H] ⁺	437.2334	225.1274
Heroin	[M+H] ⁺	370.1649	328.1543, 310.1439, 268.1332
Hydrocortison	[M+H] ⁺	363.2166	345.2060, 327.1955
Hydroflumethiazide	[M-H] ⁻	329.9836	302.9727, 266.0217, 239.0108
Hydromorphone	[M+H] ⁺	286.1438	185.0597, 157.0648

Methandienone	[M+H] ⁺	301.2162	149.1325, 121.0648
Metoprolol	[M+H] ⁺	268.1907	191.1067, 159.0804, 116.1070
Morphine	[M+H] ⁺	286.1438	229.0859, 211.0754, 201.0910
Nandrolone (19-Nortestosterone)	[M+H] ⁺	275.2006	257.1900
Norcodeine	[M+H] ⁺	286.1438	268.1332
Norethandrolone	[M+H] ⁺	303.2319	285.2213
Normorphine	[M+H] ⁺	272.1281	254.1176
Piretanide	[M+H] ⁺	363.1009	282.1125, 236.1070, 210.1277
Propafenone	[M+H] ⁺	342.2064	116.1070
Propranolol	[M+H] ⁺	260.1645	183.0804, 157.0648, 116.1070
Propylhexedrine	[M+H] ⁺	156.1747	83.0855, 69.0699
Repaglinide	[M+H] ⁺	453.2748	230.1903, 162.1274
Salicylamide	[M+H] ⁺	138.0550	93.0335, 65.0386
Spirolactone	[M+H] ⁺	417.2094	341.2111
Stanazol	[M+H] ⁺	329.2587	175.1230, 163.1230, 81.0447
Strychnine	[M+H] ⁺	335.1754	184.0757
Tamoxifen	[M+H] ⁺	372.2332	327.1743, 129.0699, 72.0808
Testosterone	[M+H] ⁺	289.2162	109.0648, 97.0648
Toremifene	[M+H] ⁺	406.1932	361.1354, 285.1274, 271.1117
Triamterene	[M+H] ⁺	254.1149	237.0883
Warfarin	[M+H] ⁺	309.1121	163.0390, 121.028 and [M+Na] ⁺

At this point it is important to mention that the use of “all ion mode” preserves full-scan acquisition flexibility and benefits of acquiring all the information all the time without time window boundaries (scheduled precursor ion lists), but also adding the ability to cleave molecules which requires high energy to provide fragmentation due to the use of a dedicated collision cell. Given the number of potentially coeluting analytes, and considering the fact that 80% of the targeted species are concentrated on the middle section of the chromatographic run, the use of all ion mode seems to be better suited than dedicated CID MS/MS with precursor isolation, since several MS/MS features can be collected from coeluting species without loss of sensitivity. A dedicated MS/MS method development would be required instead, and eventually may produce a significant loss of sensitivity and also of information of the sample. Without precursor selection, this is no longer a problem, although at the expense of an inherent loss of specificity

compared to precursor ion isolation MS/MS spectra. The fragmentation of the species which were difficult to cleave with in-source CID were satisfactorily accomplished, providing at least an additional fragment ion in all cases with the exception of 2-aminoheptane, a low-molecular weight compound which could not be fragmented whatsoever.

Therefore, LC-TOFMS using in-source CID provided information for 70 %, a value reasonably high, but not as comprehensive as results obtained with “all ion mode” CID MS/MS fragmentation without precursor isolation. The use of two experiments at for instance 5 and 20 V (collision energy) provided detailed information for confirmation purposes in a single run.

Method performance for quantitation purposes

The performance of the extraction method was studied at two concentration levels (2.5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$) ($n=7$). The results obtained are summarized in **Figure 1**, with all the detailed recovery data included in **Table 5**. The SPE method exhibited high recoveries for the majority of the sport drugs at both concentration levels tested (2.5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$), ranging between 70 and 120% for over 80% of the compounds tested, displaying also appropriate precision with relative standard deviation below 20 % for approximately 90% of the compounds at both concentration levels tested.

Table 5. Recovery percentages and RSD (%) (n = 7) obtained at both concentration levels tested (2.5 and 25 µg L⁻¹).

Compound	Recovery (%) (2.5 ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Recovery (%) (25 ng mL ⁻¹)	RSD (%)
11-Nor-11-carboxy- Δ^9 -THC	99	12	70	11
16- β -Hydroxyfurazabol	88	36	72.1	6.3
17,17-Dimethyl-18-androsta-1,4,13(14)-trien-3-one	78	13	81.4	7.8
17- α -Ethinil estradiol	97.1	4.1	94.7	5.6
17- α -Methyltestosterone	110.8	6.2	58	19
17- α -Hydroxyprogesterone	100.4	6.4	88.7	4.8
17-Epioxandrolone	102.0	2.8	95.8	4.2
19-Norandrosterone	128.5	3.8	86.2	9.6
19-Norethiocholanone	145.4	3.9	82	13
2-Aminoheptane	125	19	79	13
2-Hydroxymethyl-17 α -methylandrosta-1,4-diene-11 α ,17 β -diol-3-one	139.1	1.8	125.4	2.6
2 α -Hydroxymethylethisterone	106.7	9.0	84.3	7.3
2 α -Methyl-5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	100	17	109.4	6.0
4-Androstene-3,17-dione	110.3	4.9	68	14
4-Hydroxyandrostendione (Formestane)	88.3	7.0	98.4	7.7
4-Hydroxytestosterone	100.0	4.1	107.0	6.4
5- α -Dihydroxytestosterone	138.5	3.2	84	12
6 α -Methylprednisolone	90	16	99.9	4.2
Acebutolol	111	11	116.2	4.5
Acepromazine	104.4	4.0	103.3	4.3
Acetazolamide	89	20	90	16
Acethylmorphine	102.8	6.6	74.1	4.5
Adrafinil	102	11	91.0	2.2
α -Zearalanol	38	12	113	16
Alprenolol	103.6	4.1	113.8	2.8
Althiazide	120	20	93.0	7.5
Altrenogest	107.3	5.7	103.3	1.1
Amcinonide	100.5	4.1	85.9	5.9
Aminoglutethimide	89.6	8.2	109.0	3.6
Amphetamine	91.6	6.0	102.2	1.7
Anastrozole	89.7	5.2	97.7	2.9
Androsterone	77	11	92.8	3.5
Atenolol	101.4	7.6	86.8	6.6
Bambuterol	96.2	5.2	99.8	4.9
Beclomethasone	102.8	5.3	98.0	6.2
Bendroflumethiazide	88	13	100	14
Benthiazide	103	17	101	10
Benzoyllecgonine	91.7	3.0	112.2	8.6
β -Estradiol	119	12	99.8	5.2
Betaxolol	104.6	3.6	96.7	2.5
Bis(4-cyanophenyl) methanol	77	21	73.5	2.9
Bisoprolol	93.7	8.1	100.4	2.6
Boldenone	99	11	100.2	3.8
Boldine	103.9	6.2	84.6	7.2
Brucine	111.1	9.7	92.1	4.2
Bumetanide	97	12	114.0	4.1
Buprenorphine	107.9	7.6	106	12
Bupropion	88.6	6.8	103.8	3.0
Butabarbital	136.9	8.9	138	23

Cannabidiol	60	26	74	12
Canrenone	122.2	6.7	109.8	1.5
Capsaicin	100.8	4.0	66	15
Carphedone	112.1	11	92.1	4.0
Carvedilol	101	12	89.8	5.8
Celecoxib	95.9	3.0	87.1	4.6
Celiprolol	81.6	1.5	99.7	5.2
Chlorothiazide	96.3	5.2	83.6	3.6
Clenbuterol	92	14	99.1	3.0
Clopidamide	111.6	5.3	112.7	3.5
Clostebol acetate	79	12	85	13
Cocaethylene	92.7	7.0	79.3	4.1
Cocaine	103	14	79.0	4.8
Codeine	133	19	129	17
Cotinine	68	32	64	26
Cyclofenil	103	10	75	11
Cyclothiazide	105	12	102	13
Danazol	100.2	4.0	100.6	5.9
Dehydroandrosterone	117.2	8.1	82	15
Δ^9 -THC	98	11	112.8	8.5
Dexamethasone	103.0	4.0	98.8	2.0
Diazepam	109.5	4.5	101	16
Diethylnicotinamide (Niketamide)	132.4	5.2	114.7	9.8
Dimethylphenetylamine	83	18	90.9	9.9
Doxapram	128.4	7.6	116.2	6.2
EDDP	137.8	6.3	95.1	3.8
Ephedrine	66	23	79	21
Epitestosterone	98.6	7.4	65	14
Eplerenone	88.3	7.2	100.4	3.9
Esmolol	101.0	3.5	95.9	6.7
Ethacrinic acid	129.1	7.8	83.8	4.0
Ethiocholanone	142.1	8.5	108.8	6.9
Ethisterone	102.3	4.2	111.8	2.8
Ethylamphetamine	104.4	4.8	96.5	4.0
Ethylmorphine	89.7	11	99.3	3.8
Famprofazone	91.0	4.3	82.0	5.5
Fenbutrazate	93.1	4.3	84.1	6.1
Fenfluramine	91.4	3.0	97.3	5.8
Fenspiride	98	11	75.7	13
Fentanyl	106.6	7.5	89.1	5.5
Finasteride	106.2	4.0	71	11
Flumethasone	100.2	9.3	105.2	4.2
Flunisolide	90.8	9.8	82.9	5.3
Fluocinolone acetonide	110.4	6.2	98.4	4.7
Fluorometholone	89.2	3.5	94.4	3.7
Fluoxymesteorone	103.6	6.7	88.9	5.4
Flurandrenolide	97	19	105.8	4.5
Fluticasone propionate	113.7	7.0	107.2	2.6
Formoterol	64	46	98.0	3.9
Furosemide	85	17	96.8	8.8
Gestrinone	105.0	4.5	107.4	2.7
Glibenclamide	97.0	6.6	100.6	2.9
Glipizide	122.1	5.3	93.2	4.4
Heptaminol	12	19	7	22
Heroin	84	29	96	14
Hexobarbital	12.1	6.3	66.21	16
Hydrochlorothiazide	110	12	95	10
Hydrocortison	99.3	5.2	115.9	6.5

Hydroflumethiazide	35	19	20	17
Hydromorphone	101	12	111.1	6.0
Ibuprofen	114	16	92.7	6.0
Indapamide	106.6	5.4	114.2	4.5
Isoetharine	84.4	4.9	53	21
Ketamine	95.5	3.6	106.9	3.9
Labetalol	95.5	8.0	123	18
Letrozole	130	17	107.7	4.8
Lidocaine	106.5	3.0	122	25
LSD	129.6	4.8	121.0	6.5
MDA	97	23	62	16
MDEA	88	31	98	11
MDMA	85.8	9.6	137	20
Medroxyprogesterone	90.1	5.2	96.2	2.8
Mefenorex	76.1	4.0	109.2	4.4
Meloxicam	97.2	6.4	99.0	3.1
Meperidine	134.3	5.6	110.8	5.6
Mesterolone	110.3	6.1	72	13
Metaproterenol (Orciprenaline)	31	41	62	22
Methadone	101.35	4.8	111.6	3.4
Methamphetamine	112.8	7.8	102.4	4.9
Methandienone	105.7	3.1	101.8	2.5
Methoxyphenamine	114	13	95.0	4.0
Methylephedrine	105.6	5.6	105	40
Methylphenidate	94.4	3.4	81.8	5.5
Metricrane	100	21	113	10
Metolazone	109.5	8.9	89.6	6.0
Metoprolol	103.6	3.6	119	13
Morphine	101	16	106	14
Nadolol	101	14	86.7	8.6
Nandrolone (19-Nortestosterone)	91.2	6.8	81.0	5.5
Nateglinide	88.0	3.6	96.4	3.2
N-Desmethylselegiline	95.5	4.4	97.9	2.8
Nicotine	43	26	8	19
Norbolethone	113.0	5.7	97	14
Norcocaine	100	12	94	12
Norcodeine	114.0	7.0	80	16
Norethandrolone	92.5	4.9	98.2	3.0
Norethindrone	95.7	5.3	59	20
Norfenfluramine	107.4	3.8	112.7	5.1
Norfentanyl	118	12	98	23
Norgestrel	114.4	5.8	59	19
Normorphine	105	13	60	14
Noroxycodone	85	12	81	11
Noroxymorphone	101.7	8.8	96	16
Norpseudoephedrine(Cathine)	104	10	80	13
Octopamine	51	24	20	24
Oxilofrine	86	25	82.5	8.1
Oxycodone	96.6	6.3	69.3	6.1
Oxymorphone	118	25	111	14
Penbutolol	106.0	4.9	96.1	5.5
Pentobarbital	76	15	85.2	8.4
Pentoxifylline	94	11	79.5	5.2
Pentylene-tetrazole	94	19	106.2	3.5
Phenobarbital	105.0	9.4	98	17
Phenylephrine	56.2	8.6	14	16
Picrotin	100	17	104	25
Picrotoxinin	91.5	8.7	92	16

Pindolol	133	10	136.2	9.7
Piretanide	105.5	5.8	94.7	5.1
Prednisolone	130	35	76.7	9.4
Prednisone	101	19	82.3	7.2
Probenecid	98.3	6.6	111.7	3.1
Ppropafenone	93.5	4.5	83.7	5.1
Propoxyphene	96	17	98.6	4.5
Propranolol	96.4	5.8	80.9	3.5
Propylhexedrine	107.9	2.7	101.5	5.0
Repaglinide	107.5	4.7	82.8	6.9
Ritodrine	119.3	5.3	116	10
Salbutamol	52	23	37.4	7.0
Salicylamide	66	39	100.8	6.9
Salmeterol	96.4	5.1	77.7	4.8
Selegiline (Deprenil)	92	11	99.8	2.4
Sotalol	71	18	114	14
Spiroinolactone	85.9	4.7	92.4	5.5
Stanozol	107.1	2.5	109.6	3.9
Strychnine	92.4	5.0	80.9	7.0
Tamoxifen	78	16	94	26
Terbutaline	77.8	7.4	55	26
Testosterone	104.9	5.1	111.5	2.1
Tibolone	94.0	5.3	91.7	4.7
Timolol	110.8	4.8	87.1	6.0
Tolazamide	112.8	3.6	89.6	6.7
Tolbutamide	89.5	7.2	98.2	6.1
Torasemide	112.2	4.0	108.1	6.5
Toremifene	68.6	8.2	78.2	6.8
Triamcinolone	111	19	81	17
Triamterene	102.2	7.4	101	12
Trichlormethiazide	90	28	97.6	8.8
Turinabol	106.9	3.1	91.9	7.9
Tyramine	36	16	38	12
Vanillic acid diethylamide	95.0	4.6	101.2	3.9
Warfarin	93.0	4.4	89.5	4.4

The overall results are positive given the variety of compounds included in the method. This can be partly attributed to the SPE cartridge used, which displays different retention mechanisms, both ionic-exchange type and nonpolar adsorption mechanisms. Only lower recoveries were obtained for some compounds eluting near the void (**Figure 1 (b)**), perhaps due to poor retention in the cartridge because of their relatively high hydrophobicity. Anyway, the recoveries were enough to fulfill WADA minimum required performance levels.

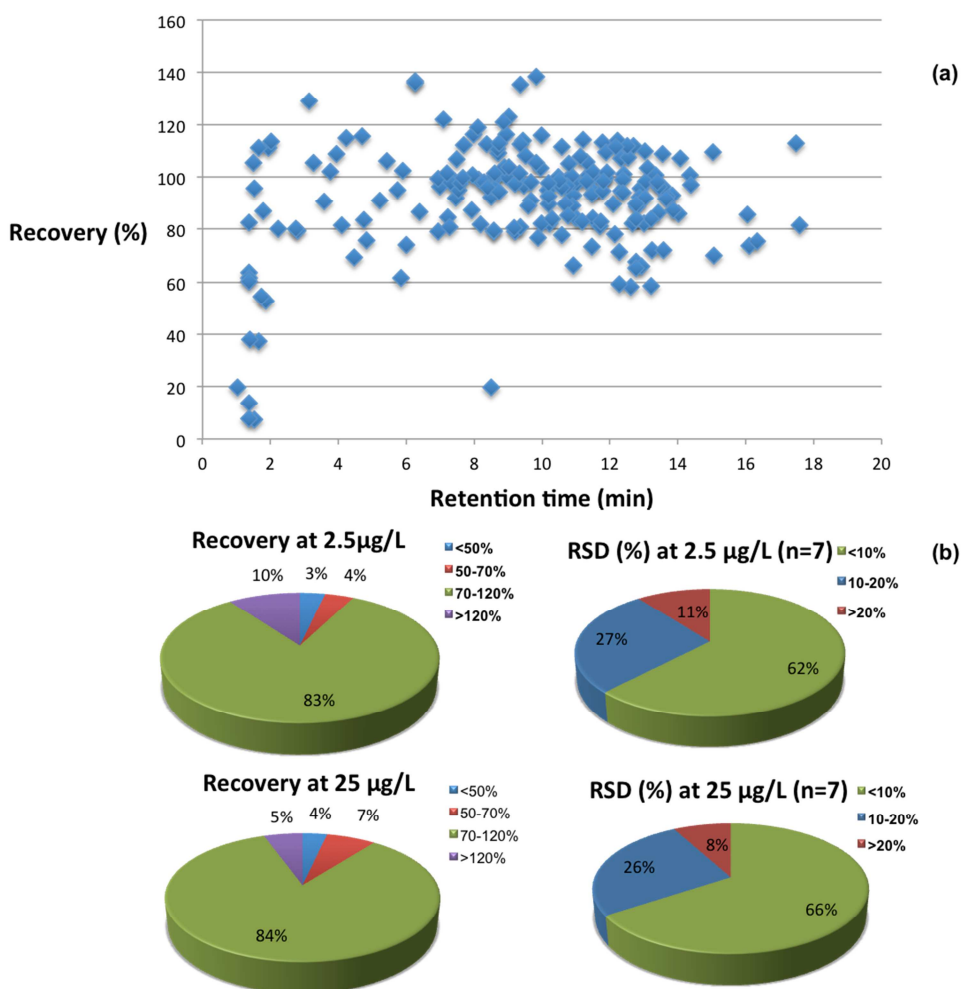


Figure 1. (a) 2D plot representing recovery percentages for all targeted compounds over the entire LC run. (b) Cake diagrams summarizing recovery rates of the SPE at both concentration levels tested and the corresponding RSD values

In order to evaluate the linearity of the proposed method, calibration curves of the 200 targeted drugs were constructed at 9 different concentrations in the range 0.25-125 µg L⁻¹ using blank urine extracts. The obtained results are shown in **Table 6** where the limits of detection and quantitation are summarized together with the matrix effects and the linearity for each compound. LOQs were empirically

calculated using the data acquired from recovery experiments (2.5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$), or by subsequent dilutions of these extracts with non-spiked matrix. The results obtained were satisfactory with all analytes tested in compliance with the minimum performance required by WADA standards (Table 6). The proposed method showed good quantitation limits, lower than 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 72% of the compounds and lower than 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 81% of the included compounds.

Table 6. Analytical parameters of the LC-TOFMS method for screening and quantitation of 200 sport drugs in urine

<i>Compound</i>	<i>R_t</i>	<i>Molecular formula</i>	<i>Class</i>	<i>MRPL^(a) ng mL⁻¹</i>	<i>LOD ng mL⁻¹</i>	<i>LOQ ng mL⁻¹</i>	<i>R²</i>	<i>Matrix effect^(b)</i>
11-Nor-11-carboxy- Δ^9 -THC	15.07	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	Cannabinoid	15	0.12	0.41	0.9907	0.991
16- β -Hydroxyfurazabol	13.23	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₃	Steroid	10	0.38	1.3	0.9935	1.021
17,17-Dimethyl-18-androsta-1,4,13(14)-trien-3-one	17.59	C ₂₀ H ₂₆ O	Steroid	10	0.16	0.53	0.9971	0.914
17- α -Ethinil estradiol	12.33	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	Strogen agonist	50	7.26	24.0	0.9970	0.607
17- α -Methyltestosterone	12.62	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Steroid	10	0.061	0.20	0.9987	0.777
17- α -Hydroxyprogesterone	12.80	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	Steroid	10	0.030	0.10	0.9993	0.964
17-Epiandrosterone	12.89	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	Oxandrolone Met. (Steroid)	10	0.13	0.42	0.9983	1.000
19-Norandrosterone	13.43	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.30	1.0	0.9991	0.823
19-Norethiocholanone	13.00	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.30	1.0	0.9981	0.953
2-Aminoheptane	6.93	C ₇ H ₁₇ N	Stimulant	500	0.091	0.30	0.9888	1.274
2-Hydroxymethyl-17 α -methylandrosta-1,4-diene-11 α ,17 β -diol-3-one	9.35	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	Formebolone Met. (Steroid)	10	0.032	0.11	0.9979	0.808
2 α -Hydroxymethylethisterone	11.48	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	Steroid	10	0.030	0.10	0.9992	0.983
2 α -Methyl-5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	15.04	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Drostanolone Met. (Steroid)	10	0.28	0.93	0.9988	0.981
4-Androstene-3,17-dione	12.78	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	Steroid	10	0.024	0.081	0.9979	0.741
4-Hydroxyandrostendione (Formestane)	13.06	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	Steroid	10	0.18	0.60	0.9995	0.934
4-Hydroxytestosterone	12.33	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	Steroid	10	0.13	0.43	0.9991	0.912
5- α -Dihydroxytestosterone	13.22	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	Steroid	10	0.21	0.69	0.9998	0.833
6 α -Methylprednisolone	10.48	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	Glucocorticosteroid	30	0.032	0.11	0.9993	1.004
Acebutolol	7.97	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄	β -blocker	500	0.0060	0.021	0.9949	1.263
Acepromazine	9.95	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₅	Narcotic	200	0.012	0.041	0.9983	0.948
Acetazolamide	3.58	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂	Diuretic	250	1.2	4.1	0.9942	0.789
Acethylmorphine	6.00	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	Narcotic	200	0.12	0.40	0.9930	0.854
Adrafinil	9.68	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ S	Stimulant	500	0.32	1.1	0.9892	0.972
α -Zearalanol	11.79	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	Strogen agonist	50	0.21	0.71	0.9927	0.937
Alprenolol	9.43	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	β -blocker	500	0.016	0.052	0.9984	0.857
Althiazide	10.91	C ₁₁ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ S ₃	Diuretic	250	0.45	1.5	0.9960	1.736
Altrenogest	13.11	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	Steroid	10	0.026	0.088	0.9920	0.954
Amcinonide	14.03	C ₂₈ H ₃₅ FO ₇	Glucocorticosteroid	30	0.015	0.048	0.9984	0.862
Aminoglutethimide	3.95	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	Aromatase Inhibitor	50	0.9	3.0	0.9990	0.808
Amphetamine	3.75	C ₉ H ₁₃ N	Stimulant	500	7.6	25.0	0.9870	1.176
Anastrozole	11.03	C ₁₇ H ₁₉ N ₅	Aromatase Inhibitor	50	0.013	0.045	0.9996	0.948
Androsterone	13.84	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	Steroid	10	0.23	0.78	0.9996	0.963

Atenolol	1.78	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	β-blocker	500	0.053	0.18	0.9997	0.891
Bambuterol	8.62	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₅	β ₂ -agonist	100	0.012	0.040	0.9992	1.064
Beclomethasone	10.93	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₅	Glucocorticosteroid	30	0.024	0.078	0.9995	1.336
Bendroflumethiazide	11.84	C ₁₅ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	Diuretic	250	0.28	0.94	0.9981	0.858
Benthiazide	11.36	C ₁₅ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ S ₃	Diuretic	250	0.030	0.099	0.9994	0.779
Benzoyllecgonine	7.69	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	Cocaine Met. (Stimulant)	500	0.011	0.035	0.9989	0.575
β-Estradiol	11.85	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	Strogen agonist	50	0.26	0.86	0.9936	0.785
Betaxolol	9.47	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	β-blocker	500	0.006	0.019	0.9955	1.050
Bis(4-cyanophenyl) methanol	11.46	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O	Letrozole Met. (Aromatase Inhibitor)	50	0.71	2.4	0.9969	0.706
Bisoprolol	8.94	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	β-blocker	500	0.005	0.016	0.9994	0.964
Boldenone	11.48	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	Steroid	10	0.084	0.28	0.9990	0.830
Boldine	7.22	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	Broncodilatador	-	0.027	0.092	0.9990	1.140
Brucine	7.47	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	Stimulant	500	0.035	0.12	0.9569	0.711
Bumetanide	12.23	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	Diuretic	250	0.035	0.12	0.9987	0.955
Buprenorphine	9.82	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	Narcotic	10	0.005	0.017	0.9971	0.828
Bupropion	8.90	C ₁₃ H ₁₈ ClNO	Stimulant	500	0.062	0.21	0.9981	0.712
Butabarbital	9.84	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃	Narcotic	200	2.1	7.1	0.9893	0.363
Cannabidiol	16.11	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	Cannabinoid	15	0.45	1.5	0.9938	1.152
Canrenone	13.02	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	Masking Agent	250	0.029	0.096	0.9976	0.939
Capsaicin	12.92	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	Analgesic	-	0.033	0.11	0.9992	1.005
Carphedone	8.49	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	Stimulant	500	0.12	0.42	0.9941	0.696
Carvedilol	10.20	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	β-blocker	500	0.012	0.040	0.9991	1.028
Celecoxib	13.85	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ SO ₂	Anti-inflammatory	-	0.032	0.11	0.9915	0.990
Celiprolol	8.55	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	β-blocker	500	0.005	0.016	0.9959	1.098
Chlorothiazide	4.75	C ₇ H ₆ ClN ₃ O ₄ S ₂	Diuretic	250	0.32	1.1	0.9981	0.679
Clenbuterol	8.14	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	Anabolic agent	2	0.044	0.15	0.9992	0.968
Clopamide	9.37	C ₁₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₃ S	Diuretic	250	0.010	0.035	0.9991	0.940
Clostebol acetate	16.06	C ₂₁ H ₂₉ ClO ₃	Steroid	10	0.14	0.47	0.9951	1.052
Cocaethylene	9.19	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	Cocaine Met. (Stimulant)	500	0.006	0.019	0.9990	0.927
Cocaine	8.59	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	Stimulant	500	0.16	0.53	0.9948	0.822
Codeine	3.13	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	Narcotic	200	0.047	0.16	0.9994	0.716
Cotinine	1.37	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	Stimulant	500	0.048	0.16	0.9977	0.828
Cyclofenil	16.33	C ₂₃ H ₂₄ O ₄	SERM	50	0.34	1.1	0.9983	1.130
Cyclothiazide	11.50	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₄ S ₂	Diuretic	250	3.7	12.0	0.9989	0.781
Danazol	14.35	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂	Steroid	10	0.020	0.066	0.9967	0.961
Dehydroandrosterone	12.66	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	1.4	4.7	0.9949	0.733
Δ9-THC	17.47	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	Cannabinoid	15	4.1	13.0	0.9962	1.124
Dexamethasone	10.72	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	Glucocorticosteroid	30	0.050	0.17	0.9965	0.426
Diazepam	12.40	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	Narcotic	200	0.016	0.054	0.9996	0.936
Diethylnicotinamide (Niketamide)	4.23	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	Stimulant	500	0.15	0.51	0.9985	1.183
Dimethylphenethylamine	5.22	C ₁₀ H ₁₅ N	Stimulant	500	3.0	10.0	0.9975	1.233
Doxapram	8.93	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₂	Stimulant	500	0.021	0.071	0.9988	0.851
EDDP	10.16	C ₂₀ H ₂₄ N	Methadone Met. (Narcotic)	200	0.007	0.024	0.9988	1.115
Ephedrine	2.79	C ₁₀ H ₁₅ NO	Stimulant	500	0.082	0.27	0.9991	0.936
Epitestosterone	12.76	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.071	0.24	0.9983	1.000
Eplerenone	10.87	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	Diuretic	250	0.065	0.22	0.9933	0.774
Esmolol	8.57	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄	β-blocker	500	0.009	0.028	0.9967	1.005
Ethacrinic acid	12.77	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	Diuretic	250	0.78	2.6	0.9941	0.788
Ethiocholanone	13.56	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	Testosterone Met.(Steroid)	10	1.3	4.2	0.9993	1.080
Ethisterone	12.70	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.048	0.16	0.9994	0.987
Ethylamphetamine	6.99	C ₁₁ H ₁₇ N	Stimulant	500	2.4	8.0	0.9935	0.884
Ethylmorphine	6.95	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	Narcotic	200	0.020	0.066	0.9989	0.879

Famprofazone	10.21	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O	Stimulant	500	0.009	0.031	0.9988	0.916
Fenbutrazate	11.01	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	Stimulant	500	0.008	0.025	0.9968	1.154
Fenfluramine	9.21	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	Stimulant	500	0.054	0.18	0.9967	0.780
Fenspiride	4.83	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	α-Adrenergic blocker	50	0.083	0.28	0.9987	0.733
Fentanyl	9.60	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	Narcotic	10	0.013	0.044	0.9997	0.910
Finasteride	12.28	C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₂	Steroid	10	0.006	0.021	0.9988	0.968
Flumethasone	10.79	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	Glucocorticosteroid	30	0.050	0.17	0.9974	0.852
Flunisolide	11.19	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	Glucocorticosteroid	30	0.038	0.13	0.9968	0.980
Fluocinolone acetonide	11.30	C ₂₄ H ₃₀ F ₂ O ₆	Glucocorticosteroid	30	0.033	0.11	0.9958	0.915
Fluorometholone	11.54	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄	Glucocorticosteroid	30	0.025	0.084	0.9996	0.982
Fluoxymesterone	10.90	C ₂₀ H ₂₉ FO ₃	Steroid	10	0.065	0.22	0.9968	0.889
Flurandrenolide	11.32	C ₂₄ H ₃₃ FO ₆	Glucocorticosteroid	30	0.069	0.23	0.9968	0.914
Fluticasone propionate	14.07	C ₂₅ H ₃₁ F ₃ O ₅ S	Glucocorticosteroid	30	0.017	0.058	0.9997	0.937
Formoterol	8.28	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	β ₂ -agonist	100	0.026	0.086	0.9998	1.082
Furosemide	10.74	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	Diuretic	250	0.85	2.8	0.9934	0.133
Gestrinone	12.54	C ₂₁ H ₂₄ O ₂	Steroid	10	0.038	0.13	0.9996	0.998
Glibenclamide	13.35	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	Antidiabetic	-	0.020	0.066	0.9923	0.991
Glipizide	11.46	C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S	Antidiabetic	-	0.016	0.054	0.9967	0.956
Heptaminol	1.53	C ₈ H ₁₉ NO	Stimulant	500	0.063	0.21	0.9987	1.110
Heroin	8.39	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	Narcotic	200	0.039	0.13	0.9907	0.633
Hexobarbital	10.91	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	Narcotic	200	2.0	6.6	0.9997	0.554
Hydrochlorothiazide	5.73	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	Diuretic	250	0.24	0.80	0.9953	0.545
Hydrocortison	9.98	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	Cortisol Met. (Glucocorticosteroid)	30	0.032	0.11	0.9957	0.762
Hydroflumethiazide	8.49	C ₈ H ₈ F ₃ N ₃ O ₄ S ₂	Diuretic	250	0.26	0.86	0.9925	0.151
Hydromorphone	1.94	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	Narcotic	200	0.044	0.15	0.9984	0.809
Ibuprofen	13.69	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Anti-inflammatory	-	0.64	2.1	0.9989	0.774
Indapamide	11.20	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S	Diuretic	250	0.028	0.092	0.9990	0.684
Isoetharine	1.85	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	β ₂ -agonist	100	0.056	0.18	0.9971	3.810
Ketamine	7.48	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	Stimulant	500	0.049	0.16	0.9974	0.838
Labetalol	9.02	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	β-blocker	500	0.038	0.13	0.9985	1.029
Letrozole	11.13	C ₁₇ H ₁₁ N ₅	Aromatase Inhibitor	50	0.14	0.48	0.9953	0.924
Lidocaine	7.10	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	Anesthetic	-	0.045	0.15	0.9954	0.969
LSD	8.86	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	Narcotic	200	0.011	0.038	0.9990	0.831
MDA	5.85	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	Stimulant	500	0.31	1.0	0.9961	0.469
MDEA	7.43	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	Stimulant	500	0.11	0.36	0.9987	0.545
MDMA	6.26	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	Stimulant	500	0.096	0.32	0.9957	1.599
Medroxyprogesterone	13.55	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	Steroid	10	0.026	0.088	0.9988	1.001
Mefenorex	8.70	C ₁₂ H ₁₈ ClN	Stimulant	500	0.08	0.30	0.9991	1.423
Meloxicam	12.39	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	Anti-inflammatory	-	0.003	0.009	0.9989	0.973
Meperidine	8.67	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	Narcotic	200	0.017	0.056	0.9982	0.930
Mesterolone	13.57	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Steroid	10	0.15	0.50	0.9998	1.007
Metaproterenol (Orciprenaline)	1.37	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	β ₂ -agonist	100	0.10	0.34	0.9855	0.949
Methadone	10.58	C ₂₁ H ₂₇ NO	Narcotic	200	0.009	0.030	0.9967	0.939
Methamphetamine	5.89	C ₁₀ H ₁₅ N	Stimulant	500	3.0	10.0	0.9934	0.955
Methandienone	11.90	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Steroid	2	0.027	0.089	0.9989	0.945
Methoxyphenamine	7.53	C ₁₁ H ₁₇ NO	Stimulant	500	0.10	0.34	0.9987	0.712
Methylephedrine	3.28	C ₁₁ H ₁₇ NO	Stimulant	500	0.15	0.49	0.9997	1.096
Methylphenidate	8.18	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	Stimulant	500	0.027	0.091	0.9983	1.161
Metricrane	8.36	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄ S ₂	Diuretic	250	0.55	1.8	0.9921	0.485
Metolazone	10.68	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S	Diuretic	250	0.028	0.092	0.9980	0.936
Metoprolol	8.11	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	β-blocker	500	0.034	0.11	0.9994	1.008
Morphine	1.50	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	Narcotic	200	0.029	0.096	0.9975	0.519
Nadolol	6.39	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	β-blocker	500	0.033	0.11	0.9994	1.192
Nandrolone (19-Nortestosterone)	11.71	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	Steroid	10	0.043	0.14	0.9989	0.968
Nateglinide	13.45	C ₁₉ H ₂₇ NO ₃	Antidiabetic	-	0.020	0.068	0.9977	1.025
N-Desmethylselegiline	7.29	C ₁₂ H ₁₅ N	Selegiline Met. (Stimulant)	500	1.2	4.0	0.9938	0.882

Nicotine	1.36	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	Stimulant	500	0.66	2.2	0.9956	0.192
Norbolethone	14.39	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	Steroid	10	0.006	0.021	0.9977	1.054
Norcocaine	8.73	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	Cocaine Met. (Stimulant)	500	0.43	1.4	0.9977	0.653
Norcodeine	2.76	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	Codeine Met. (Narcotic)	200	0.054	0.18	0.9970	0.727
Norethandrolone	13.38	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Steroid	10	0.063	0.21	0.9992	1.014
Norethindrone	12.28	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	Steroid	10	0.032	0.11	0.9997	1.003
Norfenfluramine	8.73	C ₁₀ H ₁₂ F ₃ N	Fenfluramine Met. (Stimulant)	500	0.067	0.22	0.9989	1.000
Norfentanyl	7.58	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	Fentanyl Met.(Narcotic)	10	0.033	0.11	0.9979	0.747
Norgestrel	13.20	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.052	0.18	0.9992	1.001
Normorphine	1.38	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	Morphine Met. (Narcotic)	200	0.029	0.096	0.9946	0.648
Noroxycodone	4.10	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	Narcotic	200	0.24	0.80	0.9932	0.838
Noroxymorphone	1.52	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	Narcotic	200	0.062	0.21	0.9988	0.578
Norpseudoephedrine(Cathine)	2.24	C ₉ H ₁₃ NO	Stimulant	500	0.058	0.20	0.9966	0.918
Octopamine	1.02	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Stimulant	500	1.7	5.6	0.9909	0.921
Oxilofrine	1.37	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	Stimulant	500	0.065	0.22	0.9966	0.624
Oxycodone	4.46	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	Narcotic	200	0.096	0.32	0.9868	0.737
Oxymorphone	1.65	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	Narcotic	200	0.081	0.27	0.9966	0.927
Penbutolol	10.58	C ₁₈ H ₂₉ NO ₂	β-blocker	500	0.012	0.039	0.9968	0.945
Pentobarbital	10.77	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	Narcotic	200	1.8	6.1	0.9997	0.567
Pentoxifylline	8.59	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₃	Anticoagulant	-	0.16	0.52	0.9995	0.790
Pentylentetrazole	5.44	C ₆ H ₁₀ N ₄	Stimulant	500	0.49	1.6	0.9988	0.584
Phenobarbital	9.67	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	Narcotic	200	2.0	6.5	0.9907	0.596
Phenylephrine	1.37	C ₉ H ₁₃ NO ₂	Stimulant	500	0.051	0.17	0.9968	0.733
Picrotin	9.02	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	Stimulant	500	1.5	4.9	0.9988	0.253
Picrotoxinin	10.18	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	Stimulant	500	15	50	0.9935	0.287
Pindolol	6.25	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₂	β-blocker	500	0.072	0.24	0.9952	0.686
Piretanide	11.79	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	Diuretic	250	0.013	0.044	0.9964	0.994
Prednisolone	9.89	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	Glucocorticosteroid	30	0.043	0.14	0.9950	0.809
Prednisone	9.99	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	Glucocorticosteroid	30	0.061	0.20	0.9939	0.791
Probenecid	12.51	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	Diuretic	250	0.058	0.19	0.9997	0.933
Ppropafenone	10.29	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	Antiarrhythmic Agent	-	0.010	0.035	0.9982	0.921
Propoxyphene	10.50	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	Analgesic	-	0.050	0.17	0.9967	1.017
Propranolol	9.36	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	β-blocker	500	0.015	0.051	0.9992	0.805
Propylhexedrine	8.61	C ₁₀ H ₂₁ N	Stimulant	500	0.043	0.14	0.9958	0.990
Repaglinide	11.74	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₄	Antidiabetic	-	0.002	0.006	0.9991	1.114
Ritodrine	4.71	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	β2-agonist	100	0.046	0.15	0.9983	0.810
Salbutamol	1.65	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	β2-agonist	100	0.020	0.067	0.9971	1.007
Salicylamide	7.96	C ₇ H ₇ NO ₂	Analgesic	-	0.18	0.60	0.9971	0.874
Salmeterol	10.58	C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	β2- agonist	100	0.010	0.032	0.9967	1.096
Selegiline (Deprenil)	7.67	C ₁₃ H ₁₇ N	Stimulant	500	0.3	1.0	0.9931	0.755
Sotalol	2.03	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	β-blocker	500	0.081	0.27	0.9945	6.540
Spirolactone	12.86	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S	Diuretic	250	0.058	0.19	0.9976	0.939
Stanozol	11.89	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	Steroid	2	0.006	0.019	0.9940	0.911
Strychnine	7.28	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	Stimulant	200	0.035	0.12	0.9959	0.896
Tamoxifen	12.39	C ₂₆ H ₂₉ NO	SERM	50	0.016	0.055	0.9963	1.421
Terbutaline	1.72	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	β2-agonist	100	0.11	0.35	0.9979	1.055
Testosterone	12.16	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.061	0.20	0.9993	1.012
Tibolone	13.66	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Steroid	10	0.52	1.8	0.9928	0.962
Timolol	7.92	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	β-blocker	500	0.026	0.087	0.9978	0.867
Tolazamide	12.09	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	Antidiabetic	-	0.014	0.045	0.9972	1.046
Tolbutamide	11.80	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	Antidiabetic	-	0.12	0.39	0.9989	0.957
Torasemide	9.52	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	Diuretic	250	0.011	0.037	0.9956	0.843

Toremifene	12.15	C ₂₆ H ₂₈ ClNO	SERM	50	0.012	0.039	0.9926	1.296
Triamcinolone	9.17	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	Glucocorticosteroid	30	0.20	0.68	0.9989	0.821
Triamterene	7.20	C ₁₂ H ₁₁ N ₇	Diuretic	250	0.017	0.057	0.9990	0.873
Trichlormethiazide	10.19	C ₈ H ₈ Cl ₃ N ₃ O ₄ S ₂	Diuretic	250	0.30	1.0	0.9965	0.216
Turinabol	13.04	C ₂₀ H ₂₇ ClO ₂	Diuretic	250	0.055	0.18	0.9991	1.001
Tyramine	1.40	C ₈ H ₁₁ NO	Stimulant	500	5.2	17	0.9940	0.968
Vanillic acid diethylamide	9.32	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	Stimulant	500	0.22	0.72	0.9987	0.879
Warfarin	12.76	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	Anticoagulant	-	0.036	0.12	0.9987	0.885

(a) MRPLs: WADA minimum required performance levels.

(b) Calculated using the ratio of the calibration curve slopes obtained with urine extracts and with solvent-based standards (slope matrix/ slope solvent (ME)). ME > 1 means signal enhancement while ME < 1 means signal suppression (the more common phenomenon).

No isotopically labelled internal standard (ILIS) were used in the present method, as it is difficult to address and compensate matrix effects (ME) for 200 species using a reduced number of non-analogue ILIS for all the species included. We considered that the use of 3-4 ILIS distributed throughout the LC run would not improve and compensate ME, which vary a significantly during the run as shown in **Figure 2(b)**, even amongst compounds with similar retention time. Given the complexity and variability of the sample, it is difficult to compensate ME even using the specific analogue ILIS of an analyte, due to the variability of urine matrix (eg. specific gravity values strongly altered ME compensation by ILIS) ^[68] or even due to significant isotope effects ^[69]. For this reason, the correction of ME was accomplished via matrix-matched calibration. ME were evaluated by comparing the slopes of the calibration with matrix-matched standards (urine extracts) with standards prepared in pure solvent.

Detailed ME are represented as a 2D-plot in **Figure 2(b)**. Two compounds with significant signal enhancement (isoethanine (3.81 min) and selegiline (6.54 min) not represented) were observed. Their behaviour can be attributed to their early elution near the void. This section is probably the more subjected to ME as noticed in the 2D-plot. Besides this exception, not clear tendencies could be observed when mapping the occurrence of ME throughout the LC run. Only a section from 8 to 10 minutes suffered particularly relevant signal suppression that may be

attributed to coeluting species from the matrix. In overall terms, the results were satisfactory nearly 80 % of the compounds exhibiting soft ME in the range of 25 % signal suppression or lower (**Figure 2 (a)**).

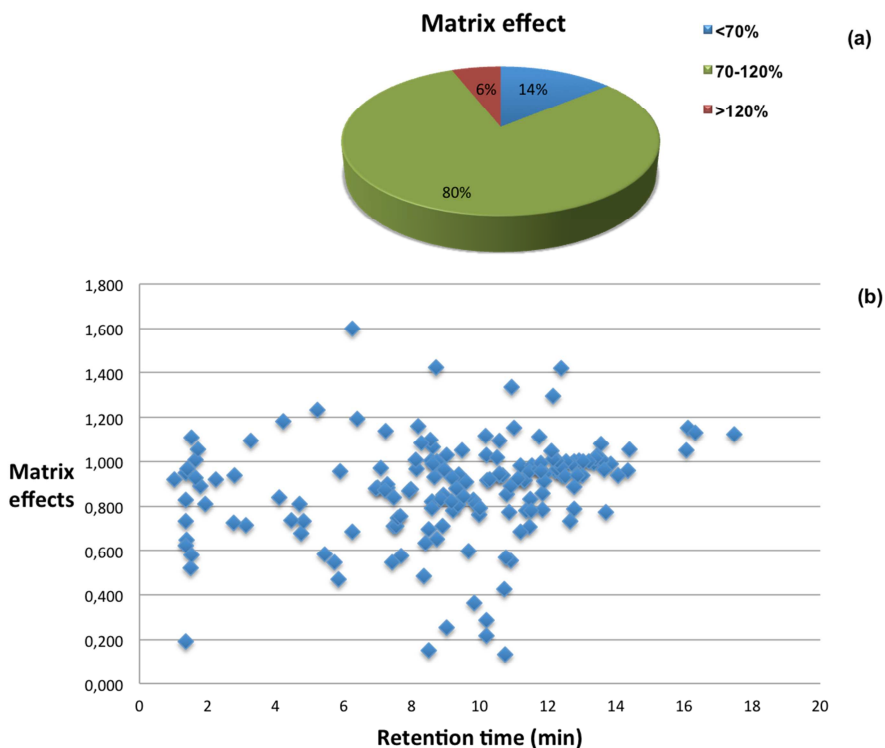


Figure 2. Cake diagrams summarizing matrix effects (b) 2D plot representing matrix effects for all targeted compounds over the entire LC run. Data from isoethanine (3.81) and selegiline (6.54) not represented

The main issue of matrix-matched standards for ME correction is the representativeness of the matrix used, particularly difficult to predict given the different features urine samples may pose (specific gravity, pH, composition, etc). The best approach to minimize matrix effects and the impact of matrix variability on ME correction is dilution. The lower the relative amount of urine in the injected extracts the lower these effects so that the representativeness of the sample is less problematic. For instance a 1:10 or 1:20 dilution may minimize ME in most

cases so that external calibration with solvent standards could be feasible. The implementation of these dilutions depends strongly on instrument sensitivity and performance. Preliminary experiments accomplished with a state-of-the-art instrument (Agilent 6550 Q-TOF) provided both increase in sensitivity and minimized ME when using 1:10 dilution of the SPE extracts. Anyway, it should be noticed that these quantitative issues are more critical only for threshold substances, which require a dedicated assessment of ME and the uncertainty associated. For these particular cases, the use of ILIS may be considered and tested in first place ^[68].

Systematic data analysis for detection of metabolites and other derivative species of sport drugs

After a detailed study of fragmentation detection of the 200 sport drugs, the search of metabolites and other derivative species of sport drugs was addressed through the use of diagnostic fragment ions, which are defined as molecular ion or fragment ions whose presence and abundance are characteristic of the substance and thereby may assist in its identification ^[62-64]. Hence, related compounds or metabolites with similar structure, preserving some of these diagnostic fragments, may be easily tracked using narrow-mass window extraction of diagnostic ions or even by means of an automated search of diagnostic ions. For this "*substructure search*", a database with the masses of the diagnostic ions for each family of class of compounds can be created, grouping them because similar compounds may have the same diagnostic ions. In this case, only accurate mass is used as search criterion. In most cases, the compounds displayed characteristic information for the search of derivative compounds or metabolites which are also targeted compounds of WADA methods since the list of prohibited species includes not only the species listed but also any other substances with similar structure or biological effects of any prohibited substances.

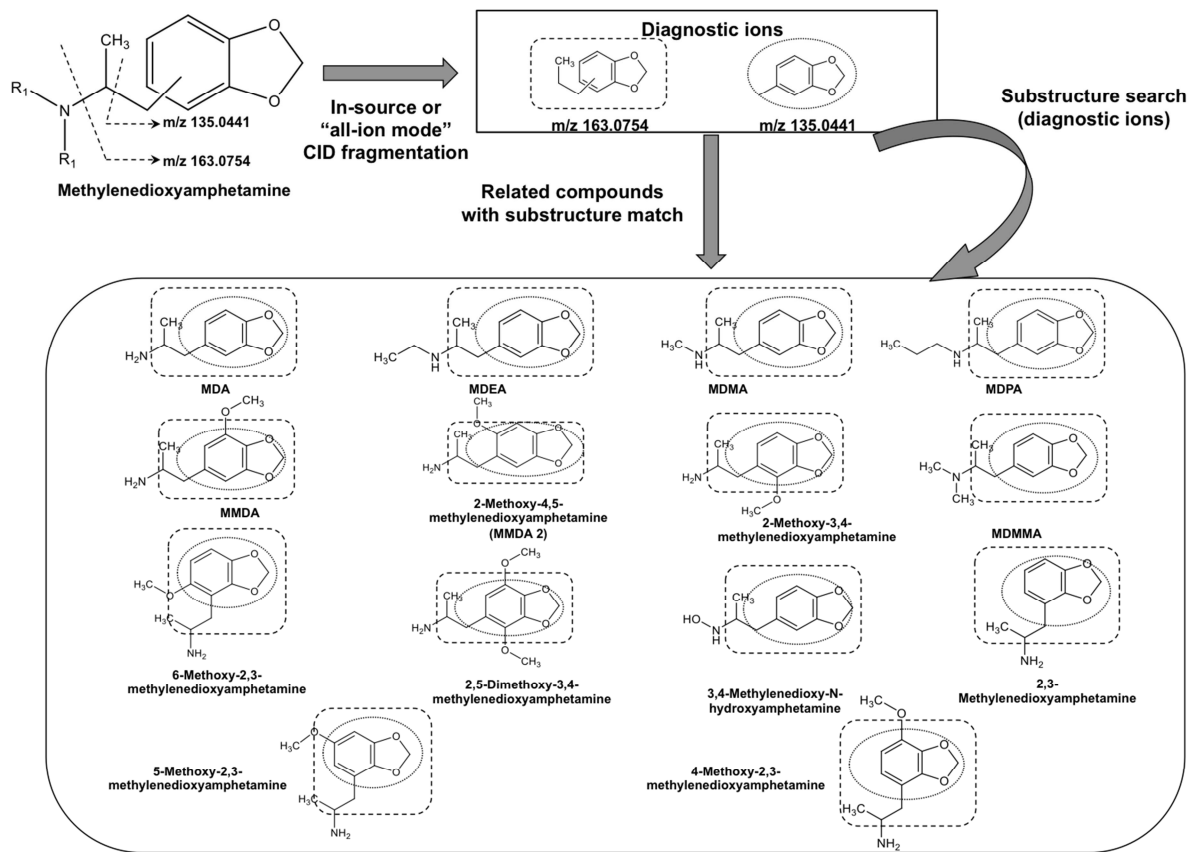


Figure 3. Fragmentation of a generic methylenedioxyamphetamine (MDMA) generating two diagnostic ions and set of related compounds with the same moiety/substructure

An example of this searching strategy is depicted in **Figure 3**, where the structure and tentative fragmentation of a generic methylenedioxyamphetamine (MDMA) is illustrated yielding two diagnostic ions at m/z 163.0754 and 135.0441. These *diagnostic ions* or substructures are common in many compounds derived from methylenedioxyamphetamine as shown in **Figure 3**, where up to 14 compounds described share these diagnostic ions. Data from a urine sample spiked with three derivatives of methylenedioxyamphetamine is shown in **Figure 4**. The extracted ion chromatogram (EIC) of diagnostic ion m/z 163.0754 is represented, with 3 chromatographic peaks, and extracting their mass spectra is possible to find in them the mass of the diagnostic ion and the mass of the parent compound. Extracting their EICs confirms that the compounds present in the sample are MDA, MDEA and MDMA.

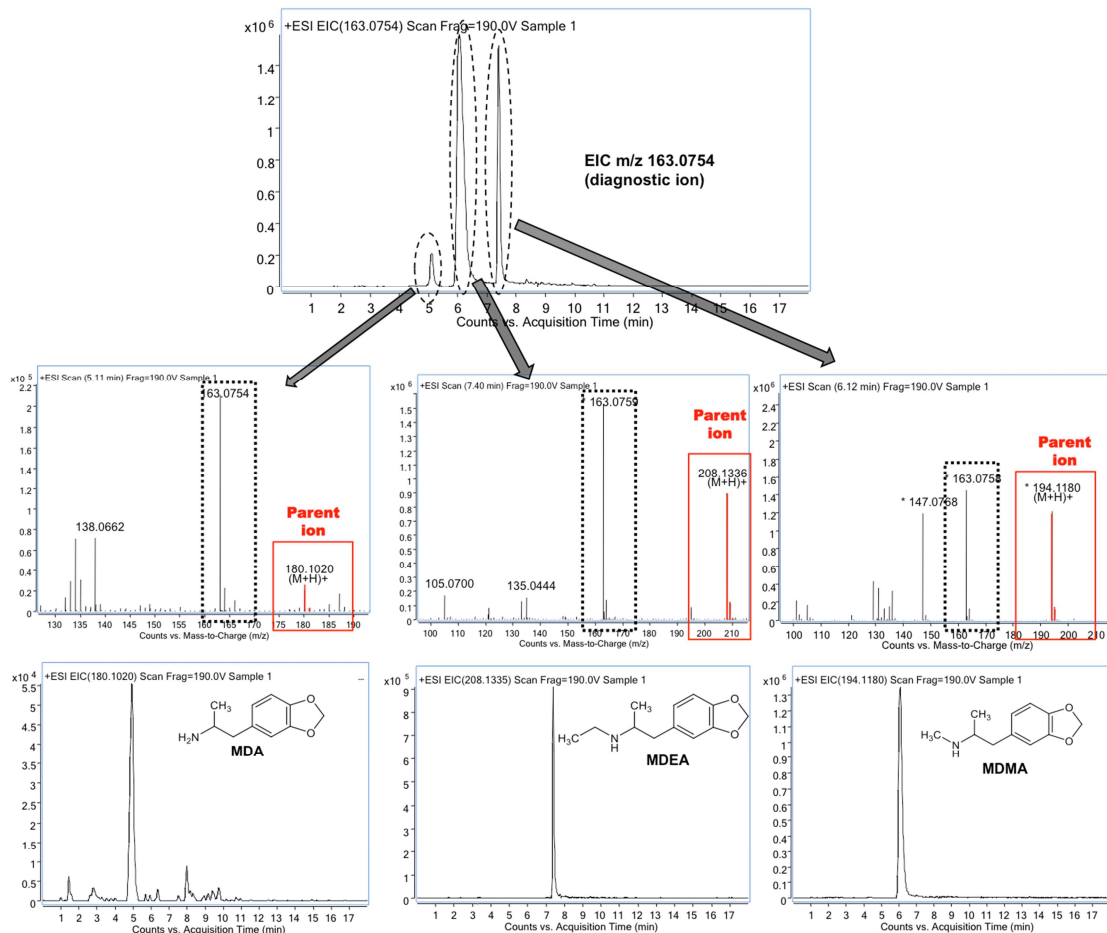


Figure 4. Example of a urine sample spiked with three methylenedioxyamphetamine derivatives. EIC of the diagnostic ion at m/z 163.0754 and the compounds detected with this diagnostic ion

In addition, for a thorough metabolism study of an individual sport drug, the use of accurate mass shifts due to typical biotransformations is also a convenient tool ^[64]. Potential metabolites starting from the original drug were also studied by applying typical biotransformations with calculated mass shifts and the corresponding chemical formula modification ^[64]. Only the transformations plausible for a molecule were taken into account, being a csv format excel file created for each compound with all feasible biotransformations, and their accurate masses. This file is then used with "Find by formula" search tool of the software (MassHunter

Qualitative Analysis). For instance, a set of typical biotransformations is summarized in **Table 7**. The defined criteria search were the same applied to targeted species but without using retention time data, since no pure standards are available in first place.

Table 7. Predefined biotransformations with calculated mass shifts and the corresponding chemical formula modification

Biotransformation	Mass shift	Chemical formula modification
Dehydrogenation	-2.0157	-H ₂
Hydrogenation + desmethylation	-12.0000	-C
Desmethylation	-14.0157	-CH ₂
Oxidative desulfuration	-15.9772	-S +O
Dehydrogenation + demethylation	-16.0313	-CH ₄
Nitro reduction	-29.9742	-O ₂ + H ₂
Deacetylation	-42.0106	-OC ₂ H ₂
Decarboxylation	-43.9898	-O ₂ C
Dealkylation	n (-14.0157)	n (-CH ₂)
Deamination	1.0316	-NH ₃ +O
Hydroxylation + demethylation	1.9793	+O -CH ₂
Hydrogenation	2.0157	+H ₂
Methylation	14.0157	+CH ₂
Hydroxylation, N-oxidation,	15.9949	+O
Hydration	18.0106	+H ₂ O
Methoxylation	30.0106	+CH ₂ O
Dihydroxylation, Hydroxylation + N- Oxidation	31.9898	+O ₂
Acetylation	42.0106	+OC ₂ H ₂
Sulfonation	79.9568	+SO ₃
Deacetylation + glucuronidation	134.0215	+C ₄ H ₆ O ₅
Desmethylation + glucuronidation	162.0164	+C ₅ H ₆ O ₆
Conjugation with glucose	162.0528	+C ₆ H ₁₀ O ₅
Glucuronidation	176.0321	+C ₆ H ₈ O ₆
Hydroxylation + glucuronidation	192.027	+C ₆ H ₈ O ₇
Conjugation with GSH (glutathione)	305.0682	+C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S

An example of this approach is shown in **Figure 5**, with data obtained from a rat urine sample after intraperitoneal dose of diuretic bumetanide. Up to six metabolites were identified based on their possible biotransformations, including three hydroxylated metabolites, a dihydroxylated species, one oxidized to acid and the metabolite formed by the dealkylation of the alkyl chain.

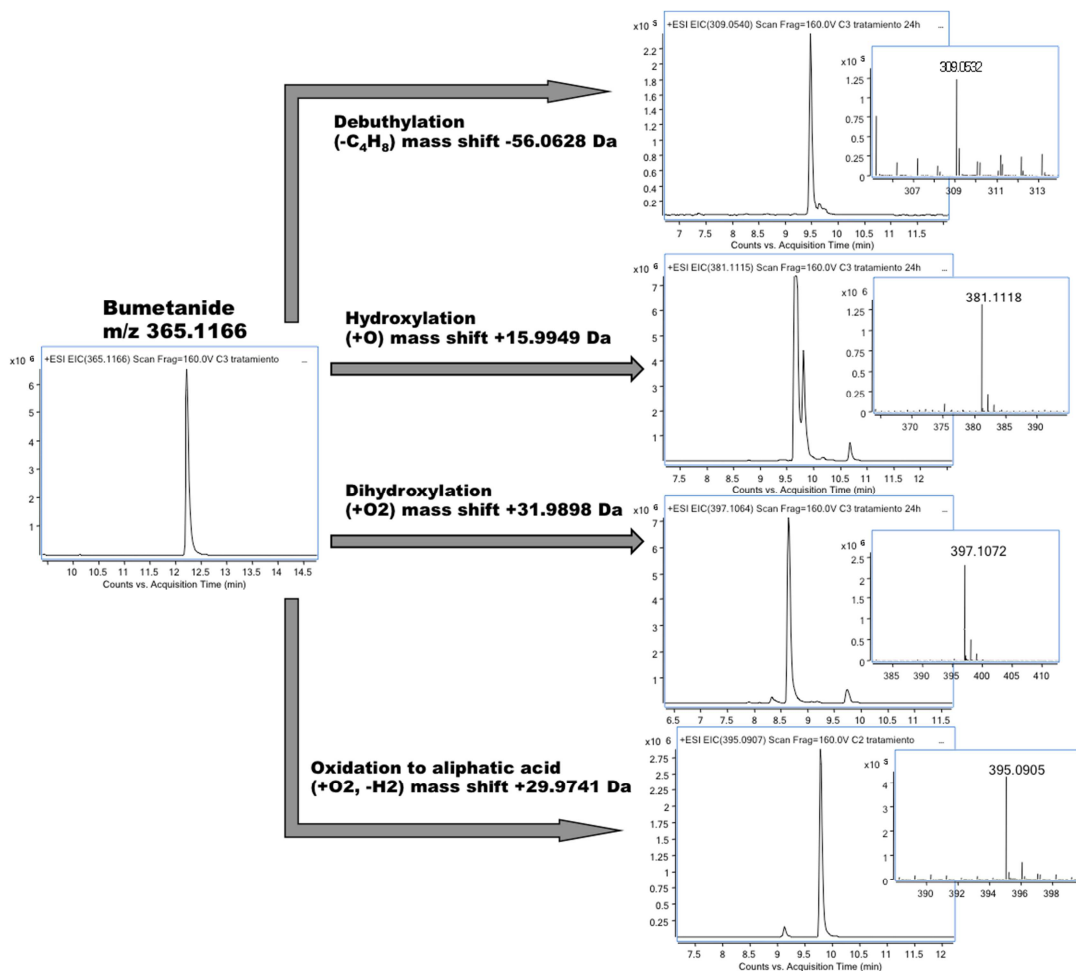


Figure 5. Example of typical biotransformations search in a real urine sample after the treatment with the diuretic bumetanide where 6 metabolites were identified starting from the original molecule and applying different biotransformations

Concluding remarks

In this work, a method for the screening and quantitation of 200 sport drugs using LC-TOFMS has been developed. The proposed SPE method provided adequate recoveries and RSD while providing a clean extract that not causes important matrix effects. The screening method based on accurate-mass/retention time pairs enabled the detection of all the species tested at WADA MRPLs levels using a single high resolution ion.

For confirmatory analysis, the use of in-source CID fragment provided appropriate results for the unambiguous confirmation of *ca.* 70 % of the compounds if the 2-high resolution ion criterion is used. In contrast, the use of CID fragmentation on a dedicated collision cell without precursor ion selection provided comprehensive fragmentation information for all the compounds. This approach is definitely the best suited for this type of application as the full-scan acquisition and their advantages are not altered, while the fragmentation obtained is thorough. Finally, the use of this characteristic fragmentation along with the *ab initio* calculation of typical biotransformations allowed the straightforward identification of relevant non-targeted compounds such as drugs with similar structure to the WADA targeted compounds or metabolites. Furthermore, the validated method can be expanded towards new targeted species with high flexibility and also permits retrospectively inspect former samples for new or unknown doping agents added to the WADA list without the need of re-processing the sample, just the data acquired.

Referencias

- 1 The World Anti-Doping Code. www.wada-ama.org
- 2 The 2013 prohibited list. www.wada-ama.org
- 3 M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer. Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 405.
- 4 M. Thevis, W. Schänzer. Mass Spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 79.
- 5 M. Thevis, A. Thomas, V. Pop, W. Schänzer. Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tándem)-mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 38.
- 6 I. Ojanperä, M. Kolmonen, A. Pelander. Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1203.
- 7 L. Hintikka, M. Haapala, S. Franssila, T. Kuuranne, A. Leinonen, R. Kostiainen. Feasibility of gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in analysis of anabolic steroids. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8290.
- 8 H.K. Henze, G. Opfermann, H. Spahn-Langguth, W. Schänzer. Screening of β_2 -agonists and confirmation of fenoterol, orciprenaline, reproterol and terbutaline with gas chromatography-mass spectrometry as tetrahydroisoquinoline derivatives. *J. Chromatogr. B* 751 (2001) 93.
- 9 S. Strano-Rossi, D. Leone, X. de la Torre, F. Botré. Analysis of stimulants in oral fluid and urine by gas chromatography-mass spectrometry II: Pseudophedrine. *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 210.
- 10 O.J. Pozo, P. Van Enoo, K. Deventer, H. Elbardissy, S. Grimalt, J.V. Sancho, F. Hernández, R. Ventura, F.T. Delbeke. Comparison between triple quadrupole, time of flight and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers coupled to liquid chromatography for the detection of anabolic steroids in doping control analysis. *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 98.

- 11 M. Galesio, R. Rial-Otero, J. Simal-Gandara, X. de la Torre, F. Botré, J.L. Capelo-Martínez. Improved ultrasonic-based sample treatment for the screening of anabolic steroids by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24 (2010) 2375.
- 12 K. Saito, K. Yagi, A. Ishizaki, H. Kataoka. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 727.
- 13 M. Thevis, S. Guddat, W. Schänzer. Doping control analysis of trenbolone and related compounds using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Steroids* 74 (2009) 315.
- 14 Y. Hadeif, J. Kaloustian, H. Portugal, A. Nicolay. Multivariate optimization of a derivatisation procedure for the simultaneous determination of nine anabolic steroids by gas chromatography coupled with mass spectrometry *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 278.
- 15 M.W.F. Nielen, M. C. Van Engelen, R. Zuiderent, R. Ramaker. Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using liquid chromatography accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 122.
- 16 M. Thevis, U. Bommerich, G. Opfermann, W.Schänzer. Characterization of chemically modified steroids for doping control purposes by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 494.
- 17 J. Marcos, J.A. Pascual, X. De la Torre, J. Segura. Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 1059.
- 18 J. Lu, S. Wang, Y. Dong, X. Wang, S. Yang, J. Zhang, J. Deng, Y. Qin, Y. Yu, M. Wu, G. Ouyang. Simultaneous analysis of fourteen tertiary amine stimulants in human urine for doping control purposes by liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 45.
- 19 S.S. Rossi, X. de la Torre, F. Botré. A fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of stimulants and narcotics in urine, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24 (2010) 1475.
 - 20 K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Enoo, F.T. Delbeke. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of ephedrines in urine, *J Chromatogr. B* 877 (2009) 369.
 - 21 A. Thomas, G. Sigmund, S.W. Guddat, W. Schänzer, M. Thevis. Determination of selected stimulants in urine for sports drug analysis by solid phase extraction via cation exchange and means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 14 (2008) 135.
 - 22 K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Enoo, F.T. Delbeke. Development of a qualitative liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the detection of narcotics in urine relevant to doping analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3015.
 - 23 K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Enoo, F.T. Delbeke. Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry *J Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5819.
 - 24 T.F. Tsai, M.R. Lee. Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for detecting diuretics in urine. *Talanta* 75 (2008) 658.
 - 25 L. Politi, L. Morini, A. Poletti. A direct screening procedure for diuretics in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with information dependent acquisition. *Clin Chim Acta* 386 (2007) 46.
 - 26 V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. di Stilo, F. Botré. Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine. *J. Chromatogr. A.* 1135 (2006) 219.

- 27 D. Thieme, J. Grosse, R. Lang, R.K. Mueller, A. Wahl. Screening, confirmation and quantitation of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B* 757 (2001) 49.
- 28 K. Shrivastava, D.K. Patel. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for quantitative determination of β -blocker drugs in one-drop of human serum sample. *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 35.
- 29 D. Di Corcia, V. Morra, M. Pazzi, M. Vincenti. Simultaneous determination of β_2 -agonists in human urine by fast-gas chromatography/mass spectrometry: method validation and clinical application. *Biomed Chromatogr.* 24 (2010) 358.
- 30 M. Lu, L. Zhang, X. Li, Q. Lu, G. Chen, Z. Cai. A new method for the analysis of β_2 -agonists in human urine by pressure-assisted capillary electrochromatography coupled with electrospray ionization-mass spectrometry using a silica-based monolithic column. *Talanta* 81 (2010) 1655.
- 31 M. Kang, Y.H. Hwang, W. Lee, K.H. Dim. Validation and application of a screening method for β_2 -agonists, anti-estrogenic substances and mesocarb in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21 (2007) 252.
- 32 H. Van Hoof, D. Courtheyn, J.P. Antignac, M. Van de Wiele, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 19 (2005) 2801.
- 33 W. Liu, L. Zhang, Z. Wei, S. Chen, G. Chen. Analysis of β_2 -agonists and β -blockers in urine using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5340.
- 34 P.S. Shrivastava, S.M. Buha, M. Sanyal. Detection and quantitation of β -blockers in plasma and urine. *Bioanalysis* 2 (2010) 263.
- 35 L. Luosujarvi, M. Haapala, M. Thevis, V. Saarela, S. Franssila, R.A. Ketola, R. Kostianen, T. Kotiaho. Analysis of Selective Androgen Receptor Modulators by

- Gas Chromatography-Microchip Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (2010) 310.
- 36 E. Gerace, A. Salomone, F. Fasano, R. Costa, D. Boschi, A. Di Stilo, M. Vincenti. Validation of a GC/MS method for the detection of two quinolinone-derived selective androgen receptor modulators in doping control analysis. *Anal Bioanal Chem.* 400 (2011) 137.
- 37 M. Thevis, S. Beuck, A. Thomas, B. Kortner, M. Kohler, G. Rodchenkov, W. Schänzer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 23 (2009) 1139.
- 38 M. Thevis, M. Kohler, A. Thomas, N. Schöler, W. Schänzer. Doping control analysis of emerging drugs in human plasma - identification of GW501516, S-107, JTV-519, and S-40503. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2471.
- 39 T. Kuuranne, A. Leinonen, W. Schänzer, M. Kamber, R. Kostianen, M. Thevis. Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes. *Drug Metab Dispos.* 36 (2008) 571.
- 40 M. Thevis, M. Kohler, A. Thomas, J. Maurer, N. Sclörer, M. Kamber, W. Schänzer. Determination of benzimidazole- and bicyclic hydantoin-derived selective androgen receptor antagonists and agonists in human urine using LC-MS/MS. *Anal Bioanal. Chem.* 391 (2008) 251.
- 41 M. Thevis, M. Kohler, J. Maurer, N. Schlörer, M. Kamber, W. Schänzer. Screening for 2-quinolinone-derived selective androgen receptor agonists in doping control analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3477.
- 42 M. Thevis, M. Kamber, W. Schänzer. Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 870.
- 43 M. Mazzarino, F. Botrè. A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3465.

- 44 C.G. Georgakopoulos, A. Vonaparti, M. Stamou, P. Kiousi, E. Lyris, Y.S. Angelis, G. Tsoupras, B. Wüst, M.W. Nielen, I. Panderi, M. Koupparis. Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2439.
- 45 M. Kolmonen, A. Leinonen, A. Pelander. A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chim Acta* 585 (2007) 94.
- 46 E.D. Virus, T.G. Rodchenkov. Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 949.
- 47 J. Thoerngren, F. Oestervall, M. Garle. A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 980.
- 48 F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, L. Avois, M. Saugy, S. Rudaz, J.L. Veuthey. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. I. Screening analysis, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4423-4433.
- 49 F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, S. Rudaz, J.L. Veuthey. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4109-4119.
- 50 G.J. Murray, J.P. Danaceau. Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3857.
- 51 R.J. Peters, J.E. Oosterink, A.A.M. Stolker, C. Georgakopoulos, M.W. Nielen. Generic sample preparation combined with high-resolution liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for unification of urine screening in doping-control laboratories, *Anal Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2583.

- 52 A. Vonaparti, E. Lyris, Y.S. Angelis, I. Panderi, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, R.J. Peters, M.W. Nielen, C. Georakopoulos. Preventive doping control screening analysis of prohibited substances in human urine using rapid-resolution liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1595.
- 53 M. Galesio, M. Mazzarino, X. De La Torre, F. Botré, J.L. Capelo. Accelerated sample treatment for screening of banned doping substances by GC-MS: Ultrasonication versus microwave energy, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 861.
- 54 Y. Moulard, L. Bailly-Chouriberry, S. Boyer, P. García, M.A. Popot, Y. Bonnaire. Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control, *Anal. Chim. Acta* 700 (2011) 126.
- 55 R. Ventura, M. Roig, N. Monfort, P. Sáez, R. Bergés, J. Segura. High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents. *Eur. J. Mass Spectrom.* 14 (2008) 191.
- 56 O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1209.
- 57 C.A. Mueller, W. Weinmann, S. Dresen, A. Schreiber, M. Gergov. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1332.
- 58 E.N. Ho, D.K.K. Leung, T.S. Wan, N.H. Yu. Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 38.
- 59 M. Kolmonen, A. Leinonen, T. Kuuranne, A. Pelander, I. Ojanperä. Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography-time-of-flight

- mass spectrometry for high-throughput screening in doping analysis, *Drug Test Anal.* 1 (2009) 250.
- 60 A. Musenga, D.A. Cowan. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high-throughput doping control. *J. Chromatogr. A* 1288 (2013) 82.
- 61 A. Jiménez-Girón, K. Deventer, K. Roels, P. Van Enoo. Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC-HRMS for doping control. *Anal. Chim. Acta* 721 (2012) 137.
- 62 J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via “fragmentation-degradation” relationships. *Anal. Chem.* 79 (2007) 307.
- 63 E. Liotta, R. Gotardo, A. Bertaso, A. Poletini. Screening for pharmacotoxicologically relevant compounds in biosamples using high-resolution mass spectrometry: a ‘metabolomic’ approach to the discrimination between isomers, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 261.
- 64 J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, R. Martínez-Romero, P. Berton, E. Martínez-Lara, M. Del Moral-Leal, A. Molina-Díaz. Combined data mining strategy for the systematic identification of sport drug metabolites in urine by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 761 (2013) 1-10.
- 65 Identification criteria for Qualitative Assays incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry (WADA Technical Document 2010 IDCR). Effective date: 01/09/2010. Available at: www.wada-ama.org. Last accessed (July 2014).
- 66 European Commission Health and Consumer Protection Directorate-Generale. Document SANCO 12571/2013 “Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Implemented by 01/01/2014

- 67 Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- 68 A. Vonaparti, E. Lyris, I. Panderi, M. Koupparis, C. Georgakopoulos. Direct injection liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. II. Detection of theobromine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1020-1028
- 69 A. González-Antuña, J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García-Alonso, A. Molina-Díaz. Overcoming matrix effects in electrospray: Quantitation of β -agonists in complex matrices by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry using singly ^{13}C -labeled analogues. *J. Chromatogr. A* 1288 (2013) 40-47.



Combined data mining strategy for the systematic identification of sport drug metabolites in urine by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry



Juan C. Domínguez-Romero^a, Juan F. García-Reyes^a, Rubén Martínez-Romero^b, Paula Berton^c, Esther Martínez-Lara^b, María L. Del Moral-Leal^b, Antonio Molina-Díaz^{a,*}

^a Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

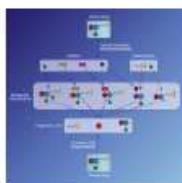
^b Department of Experimental Biology, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

^c Analytical Chemistry Research and Development Group (QUANID), Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Cuyo, Padre Jorge Contreras 1300, Parque Gral. San Martín, C.P. M5502MA Mendoza, Argentina

HIGHLIGHTS

- ▶ A strategy based on the use of two complementary data mining tools is proposed.
- ▶ Accurate m/z extraction of diagnostic ions and mass shifts from biotransformations.
- ▶ Nine sport drugs from different classes were studied after single doses to rats.
- ▶ Several non-previously reported metabolites were identified with the approach.
- ▶ 24 propranolol metabolites detected (15 non previously described in literature).

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2012

Received in revised form

16 November 2012

Accepted 25 November 2012

Available online 5 December 2012

Keywords:

Liquid chromatography

High resolution mass spectrometry

Drug metabolites

Sport drug testing

Propranolol

ABSTRACT

The development of comprehensive methods able to tackle with the systematic identification of drug metabolites in an automated fashion is of great interest. In this article, a strategy based on the combined use of two complementary data mining tools is proposed for the screening and systematic detection and identification of urinary drug metabolites by liquid chromatography full-scan high resolution mass spectrometry. The proposed methodology is based on the use of accurate mass extraction of diagnostic ions (compound-dependent information) from in-source CID fragmentation without precursor ion isolation along with the use of automated mass extraction of accurate-mass shifts corresponding to typical biotransformations (non compound-dependent information) that xenobiotics usually undergo when metabolized. The combined strategy was evaluated using LC–TOFMS with a suite of nine sport drugs representative from different classes (propranolol, bumetanide, clenbuterol, ephedrine, finasteride, methoxyphenamine, methylephedrine, salbutamol and terbutaline), after single doses administered to rats. The metabolite identification coverage rate obtained with the systematic method (compared to existing literature) was satisfactory, and provided the identification of several non-previously reported metabolites. In addition, the combined information obtained helps to minimize the number of false positives. As an example, the systematic identification of urinary metabolites of propranolol enabled the identification of up to 24 metabolites, 15 of them non previously described in literature, which is a valuable indicator of the usefulness of the proposed systematic procedure.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

III.3. Detección sistemática de metabolitos de sustancias dopantes mediante estrategias basadas en el empleo de LC-TOFMS

III.3.1. Resumen

El conocimiento detallado del metabolismo de las sustancias dopantes en orina es de gran interés ya que puede permitir la detección, a veces durante un periodo de tiempo mayor, del uso de sustancias dopantes que presenten una rápida metabolización y que por tanto no se puedan detectar en su forma original. La cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) presenta unas características que la hace muy apropiada para el estudio del metabolismo de sustancias dopantes.

En este capítulo se propone el uso de una estrategia para la búsqueda y detección sistemática de metabolitos de sustancias dopantes mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución en modo de adquisición *full-scan*. La metodología propuesta está basada en el empleo de cromatogramas de ion extraído de iones diagnóstico (fragmentos) obtenidos mediante fragmentación en la región de transporte de iones (*in-source CID*) sin aislamiento del ión precursor (información específica de la molécula de partida), junto con el uso de cromatogramas de ion extraído de especies derivadas teniendo en cuenta los cambios de masa exacta originados por modificaciones (biotransformaciones) del metabolismo de fase I y fase II típico de fármacos. Por una parte, se encuentran modificaciones previsibles de los compuestos de interés y además mediante información específica del compuesto o familia de compuestos (los iones diagnóstico son aquellos comunes a una familia de compuestos) se pueden identificar otras especies que mantengan parcialmente la estructura de la sustancia dopante original.

La estrategia propuesta ha sido examinada usando diez sustancias dopantes representativas de diferentes familias (propranolol, bumetanida, clenbuterol, efedrina, finasteride, metoxifenamina, metilefedrina, salbutamol y terbutalina), a través de ensayos en ratas y posterior estudio de orina. Se estudiaron los metabolitos que se identificaban empleando la estrategia de iones diagnóstico y cambios de masa exacta originados por biotransformaciones, y se contrastaron los resultados con la bibliografía disponible sobre el metabolismo urinario descrito para cada compuesto. Como ejemplo, para el propranolol (que se estudio en ratas y humanos) se encontraron un total de 24 metabolitos, 15 de ellos no descritos anteriormente en ningún estudio, lo que indica la potencialidad de la estrategia propuesta que puede ser fácilmente implementable de forma automatizada. De estos metabolitos, 15 fueron encontrados con las modificaciones de masa debida a biotransformaciones mientras que 11 de ellos se detectaron a través de fragmentos diagnóstico. Para el resto de compuestos estudiados también se encontraron nuevos metabolitos y se obtuvo un porcentaje de cobertura de metabolitos ya descritos superior al 50 % en todos los casos.

Introduction

Drug metabolism is a complex process, involving multiple enzymatic pathways that result in a variety of metabolites with uneven concentrations^[1]. The knowledge of the metabolism and excretion of doping agents is of particular interest in sport drug testing, where the information related on the time course in which a parent drug or its metabolites can be detected, is essential. The discovery of new long-term metabolites can increase the retrospectivity of the analysis and therefore, their inclusion in screening methods represents a valuable contribution for doping control laboratories. For these purposes, comprehensive methods able to tackle with the systematic identification of drug metabolites in an automated fashion are of great interest.

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has an extensive role in metabolism research. Many reviews in the literature highlight principles and usage of different MS instruments for metabolite identification^[2,3]. In modern doping control laboratories, the use of LC-MS has become mandatory to meet the needs of fast, robust, sensitive, and specific detection methods in sport drug testing^[4]. Several LC-MS methods based on ion trap, triple quadrupole, time-of-flight or Orbitrap analyzers have been used for the urinary detection of several prohibited substances such as corticosteroids, diuretics or beta blockers^[5,6]. Concerning sport drugs metabolism, LC-MS has proved particularly useful and versatile for the identification and characterization of metabolic products derived from prohibited substances. In particular, the increasing availability of high resolution/high accuracy mass spectrometry combined with MS/MS or MSⁿ experiments provide valuable information to help the assignment of structures to tentative metabolites.

The use of full-scan high resolution mass spectrometry generates an enormous amount of data, offering the advantage of enabling simultaneous analysis of a virtually unlimited number of analytes with no method performance compromise

when increasing the number of compounds included in the scope of the method. The features of this instrumentation map well against the requirements of sport drug metabolism studies. However, despite the development of high resolution mass spectrometry instrumentation has improved the quality of metabolite identification processes, data processing and interpretation still remains as the main bottleneck in metabolite identification ^[7]. Depending on the matrix, the huge amount of data can also cause problems in compound identification step, which may be hindered by matrix interferences.

For this reason, several data mining strategies have been proposed to perform objective searching/filtering of accurate-mass-based LC-MS data to facilitate metabolite detection ^[8,9]. Amongst them, *in-silico* tools for metabolite prediction/detection ^[10], the use of precursor ion and constant neutral loss scanning modes ^[11,12], isotope-pattern-filtering algorithms ^[13], mass defect filter (MDF) ^[14,15], and retention-time-shift-tolerant background subtraction algorithms ^[15-17] have been proposed. In this sense, the need of preliminary knowledge of the parent compound can be used as a valid criterion to classify these data mining tools. While for instance, constant neutral-loss experiments require no knowledge of the parent compound, because expected neutral losses from the analyte are traced (e.g. loss of 176 Da from a glucuronide conjugate), in the case of precursor ion scanning experiments, the operator needs to know the fragmentation pattern of the parent ion in advance to perform the experiment ^[18].

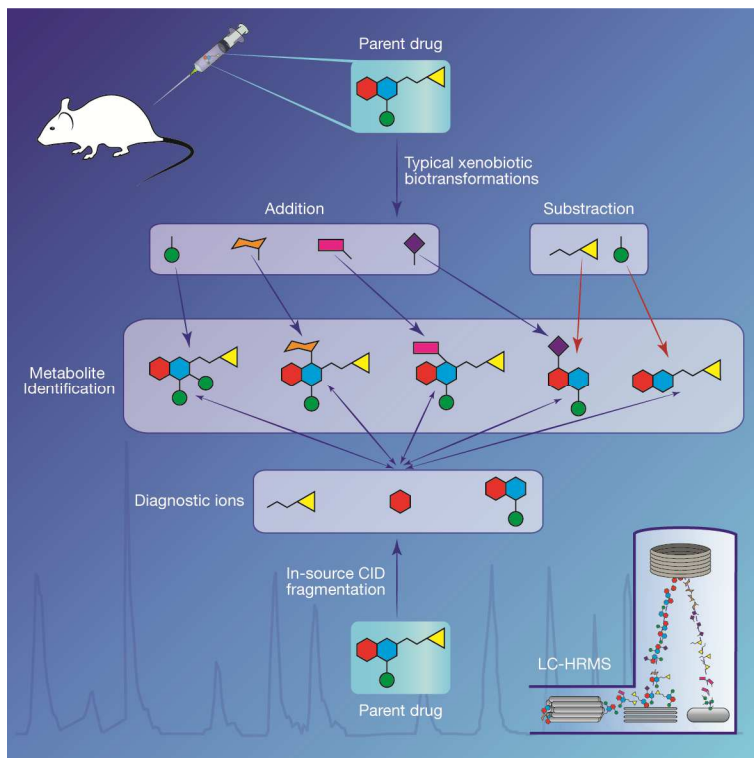


Figure 1. Scheme of the dual "top-down/bottom-up" strategy for metabolites identification

In this article, a strategy based on the combined use of two complementary data mining tools is proposed for the screening and systematic detection of urinary drug metabolites by liquid chromatography full-scan high resolution mass spectrometry. The proposed methodology is based on the use of accurate mass extraction of diagnostic ions (compound-dependent information) from in-source CID fragmentation experiments without precursor ion isolation along with the use of automated mass extraction of accurate mass shifts corresponding to typical biotransformations (non compound-dependent information) that xenobiotics usually undergo when metabolized. The methodology can be considered as a comprehensive "top-down/bottom-up" approach, since identification of metabolites can be obtained from accurate mass shifts starting from the unaltered parent drug (top-down approach), while the use of diagnostic ions (those fragment

ions common in a class of species) can also be used as markers for identifying metabolites (bottom-up approach) starting from the core/nuclei of the metabolite structure which may be common to that of the parent drug. The combined strategy was evaluated using LC-TOFMS with a suite of ten sport drugs representative from different classes, after single doses administered to rats.

Experimental

Chemicals and reagents. Propranolol, finasteride and salbutamol analytical standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer, bumetanide, clenbuterol, ephedrine, methoxyphenamine, methylephedrine and terbutaline standards were acquired from Sigma-Aldrich. HPLC grade acetonitrile and methanol were acquired from Sigma-Aldrich. Formic acid and dimethyl sulfoxide were obtained from Fluka. A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout the study to obtain the HPLC water used during the analyses. Bond Elut PLEXA SPE cartridges (200 mg, 6 mL) were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA) and a Supelco (Bellefonte, PA) Visiprep™ SPE vacuum system was used for SPE experiments.

Samples and sample collection. The metabolism study was performed on adult male Wistar rats (250–300 g) (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). The animals were weighed and placed in individual metabolic cages 48 hours prior to treatment to acclimatize them to this environment, maintained under standard conditions of light and temperature and allowed *ad libitum* access to food and water to the end of the experiment. All the procedures followed the Spanish guidelines on the use of animals for research (RD 1201/2005) and were approved by the institutional Committee for Ethics. The details of doses and sampling of the experiments are included in **Table 1**. In the case of propranolol, rats were treated with (25 mg Kg⁻¹ (body weight, intraperitoneal). The solution of propranolol was made in 15% DMSO in saline. After drug administration, urine was daily collected

in graduate cylinders for 3 days (24, 48h and 72h). The urine collected 24 h prior to treatment was used as control. Human urine was collected from a female volunteer treated with oral propranolol (40 mg twice a day) for more than 5 years.

Table 1. Summary of experiments accomplished with multiclass sport drugs administered to Wistar rats

Drug	Dose (Vehicle)	Collected samples
Ephedrine	10 mg kg ⁻¹ (Saline solution)	Control sample: 24h before treatment; Sample: 24 and 48 hours after treatment
Methylephedrine	10 mg kg ⁻¹ (Saline solution, 10% DMSO)	Control sample: 24h before treatment; Sample: 24 and 48 hours after treatment
Bumetanide	9 mg kg ⁻¹ (50umol kg ⁻¹) (Saline solution, 0.01M NaOH)	Control sample: 24h before treatment; Sample: 24 and 48 hours after treatment
Ephedrine	1mg kg ⁻¹ (Saline solution)	Control sample: 24h before treatment; Sample: 24, 48, 96, 144, 168, 192 and 216h after treatment
Propranolol	25 mg kg ⁻¹ (Saline solution, 15% DMSO)	Control sample: 24 h before treatment; Sample: 24, 48, and 72 h after treatment
Clenbuterol	40 ug kg ⁻¹ (Saline solution)	Control sample: 24 h before treatment; Sample: 24, 48, and 72 h after treatment
Salbutamol	12 mg kg ⁻¹ (50umol kg ⁻¹) (Saline solution)	Control sample: 24 h before treatment; Sample: 24 and 48 h after treatment
Terbutaline	11 mg kg ⁻¹ (50umol kg ⁻¹) (Saline solution)	Control sample: 24 h before treatment; Sample: 24 and 48 h after treatment
Methoxyphenamine	9 mg kg ⁻¹ (50umol kg ⁻¹) (Saline solution)	Control sample: 24 h before treatment; Sample: 24 and 48 h after treatment

Sample treatment. Urine samples were concentrated by a solid-phase extraction (SPE) procedure using Bond Elut PLEXA cartridges. The cartridges were preconditioned with 4 mL of MeOH/MeCN (1:1) and 4 mL of HPLC grade MilliQ water. After the conditioning step, 2 mL of urine buffered with 2 mL of formic acid/formate pH 2.6 buffer were passed through the SPE cartridge. 4 mL of 5% MeOH in MilliQ water was then added to rinse the cartridge prior to elution. The cartridges were dried under vacuum in order to remove the excess water and the analytes were finally eluted with 4 mL of MeOH/MeCN (1:1). The extracts were evaporated until near dryness using a Turbo Vap LV from Zymark (Hopkinton, MA), with a water bath temperature of 37 °C and a N₂ pressure of 15 psi. The samples were then taken up with 0.5 mL of MeOH/water (10:90 v/v) to achieve a preconcentration of 4:1. The reconstituted extracts were passed through a 0.45 µm PTFE syringe filter and then transferred to a vial prior to LC-TOFMS analyses.

Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry The separation of the analytes from the urine extract was carried out using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (consisting of vacuum degasser, auto sampler and a binary pump) (Agilent Infinity 1290, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a reversed-phase XDB-C₁₈ analytical column of 4.6 mm x 50 mm and 1.8 µm particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). 20 µL of the extract were injected in each run. Mobile phases A and B were water with 0.1% formic acid and acetonitrile. The chromatographic method held the initial mobile phase composition (10% B) constant for 3 min, followed by a linear gradient to 100% B up to 15 min and kept for 3 min at 100% B. The flow rate used was 0.5 mL min⁻¹. The HPLC system was connected to a time-of-flight mass spectrometer Agilent 6220 accurate mass TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an electrospray interface operating in both positive and negative ion mode, using the following operation parameters: capillary voltage, 4000 V; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas flow rate, 9.0 L min⁻¹; gas temperature, 325 °C; skimmer voltage,

65 V; octapole 1 rf, 250 V; fragmentor voltage (in-source CID fragmentation): 190V (range tested: from 160 to 350 V). Different fragmentor voltages can be established in the same experiment, so that complete fragmentation information may be obtained within a single LC-MS run. LC-MS accurate mass spectra were recorded across the range of m/z 50-1000 in positive ion mode and m/z 50-1100 in negative ion mode. The instrument performed an internal calibration using a second sprayer with a reference solution containing the reference masses TFANH₄ (ammonium trifluoroacetate, m/z 112.985587 in negative ion mode), purine (m/z 121.050873, in positive ion mode) and HP-0921 (m/z 922.009798 in positive ion mode and m/z 1033.988109 in negative). For this reason, a different mass range was used in negative ionization mode in order to collect the data from the two reference masses. The instrument was operated in the 4-GHz high resolution mode, providing a typical resolution of *ca.* 20000 at m/z 922. The full scan data were recorded with Agilent Mass Hunter Data Acquisition software (version B.04.00) and processed with Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.04.00).

Approach for systematic identification of drug metabolites using LC-TOFMS. Two strategies were combined: a) the use of automated mass extraction of accurate-mass shifts corresponding to typical biotransformations (non compound-dependent information) that xenobiotics usually undergo when metabolized, so that selected moieties or functional groups are added or removed from the parent molecule, and; b) the use of accurate mass extraction of diagnostic ions (compound-dependent information) from in-source CID fragmentation experiments without precursor ion isolation. The maximum accurate-mass error tolerance for considering tentative metabolites was set to 5 ppm.

a) Use of automated mass extraction of accurate-mass shifts corresponding to typical biotransformations. It consists in searching potential metabolites based on the original drug by applying a set of typical biotransformations ^[19] which have an associated change in the molecular formula and its corresponding mass shift. The search for these potential metabolites in a sample is automatically performed with the database searching tool of Agilent MassHunter software. A predefined set of possible biotransformations were considered (**Table 2**). A csv.-format excel file was created for each drug with its possible biotransformation including the molecular formula of the metabolites, its accurate mass and as name the corresponding biotransformation. This file is used by the automated accurate-mass extraction tool of the software. When a positive result was found, its extracted ion chromatogram and mass spectrum are automatically obtained from the raw data.

Table 2. Predefined biotransformations with calculated mass shifts and the corresponding chemical formula modification

Biotransformation	Mass shift	Chemical formula modification
Dehydrogenation	-2.0157	-H ₂
Hydrogenation + demethylation	-12.0000	-C
Demethylation	-14.0157	-CH ₂
Oxidative desulfuration	-15.9772	-S + O
Dehydrogenation + demethylation	-16.0313	-CH ₄
Nitro reduction	-29.9742	-O ₂ + H ₂
Deacetylation	-42.0106	-OC ₂ H ₂
Decarboxylation	-43.9898	-O ₂ C
Dealkylation	n (-14.0157)	n (-CH ₂)
Deamination	1.0316	-NH ₃ + O
Hydroxylation + demethylation	1.9793	+O -CH ₂
Hydrogenation	2.0157	+H ₂
Methylation	14.0157	+CH ₂
Hydroxylation, N-oxydation,	15.9949	+O
Hydration	18.0106	+H ₂ O
Methoxylation	30.0106	+CH ₂ O
Dihydroxylation, Hydroxylation + N-		
Oxydation	31.9898	+O ₂
Acetylation	42.0106	+OC ₂ H ₂
Sulfonation	79.9568	+SO ₃
Deacetylation + glucuronidation	134.0215	+C ₄ H ₆ O ₅
Demethylation + glucuronidation	162.0164	+C ₅ H ₆ O ₆
Conjugation with glucose	162.0528	+C ₆ H ₁₀ O ₅
Glucuronidation	176.0321	+C ₆ H ₈ O ₆
Hydroxylation + glucuronidation	192.027	+C ₆ H ₈ O ₇

An example of this approach is depicted in **Figure 2**, where the results from a sample of rat urine after the treatment with propranolol are shown, including the identification of seven metabolites identified through this strategy.

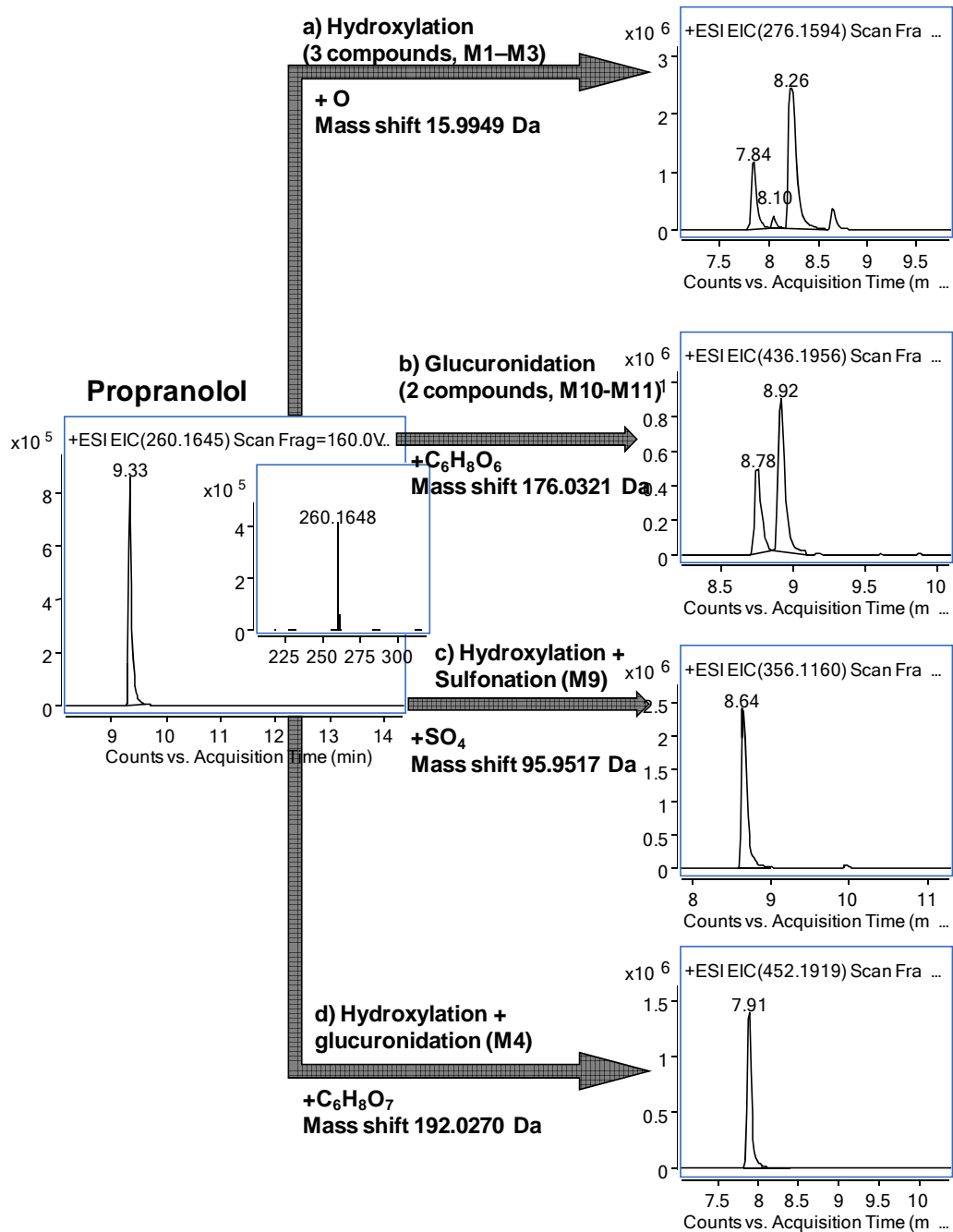


Figure 2. Example of a typical biotransformations search in a rat urine sample after the treatment with propranolol is shown. The metabolites identified correspond to the hydroxylation of propranolol (a), its conjugation with glucuronic acid (b) and the conjugation with sulfate and glucuronic acid of the hydroxylated derivative (c and d)

b) Accurate mass extraction of diagnostic ions from in-source CID fragmentation of parent drug.

Diagnostic ions are fragment ions whose presence and abundance are characteristic of a class of compounds and thereby may assist in the identification of any species belonging to this class. Diagnostic ions of the original molecule can be easily obtained by in-source CID fragmentation capability of LC-MS instrumentation. This strategy is based on the fact that many of the diagnostic ions are preserved in the metabolites. Metabolites exhibiting a structure similar to the parent molecule, usually display the same fragments. To implement this strategy, a database is created with the diagnostic ions of each compound and the automatic database searching tool of the MassHunter software is used. When one of these diagnostic ions is found, its chromatogram and mass spectrum is extracted automatically, the spectrum is analyzed to find the parent ion and a tentative molecular formula is automatically generated by the software, with mass error and an isotope pattern matching coefficient. Therefore, if one of these diagnostic ions is found with a retention time different from the original molecule, this could be used as a marker to tentatively detect and identify a new metabolite. By extracting the accurate mass corresponding to the tentatively identified metabolite ($[M\pm H]^{\pm}$ ion), candidate elemental composition and structure assignment for this detected metabolite can be accomplished. As an example, diagnostic ions from in-source CID fragmentation of propranolol are shown in **Figure 3**.

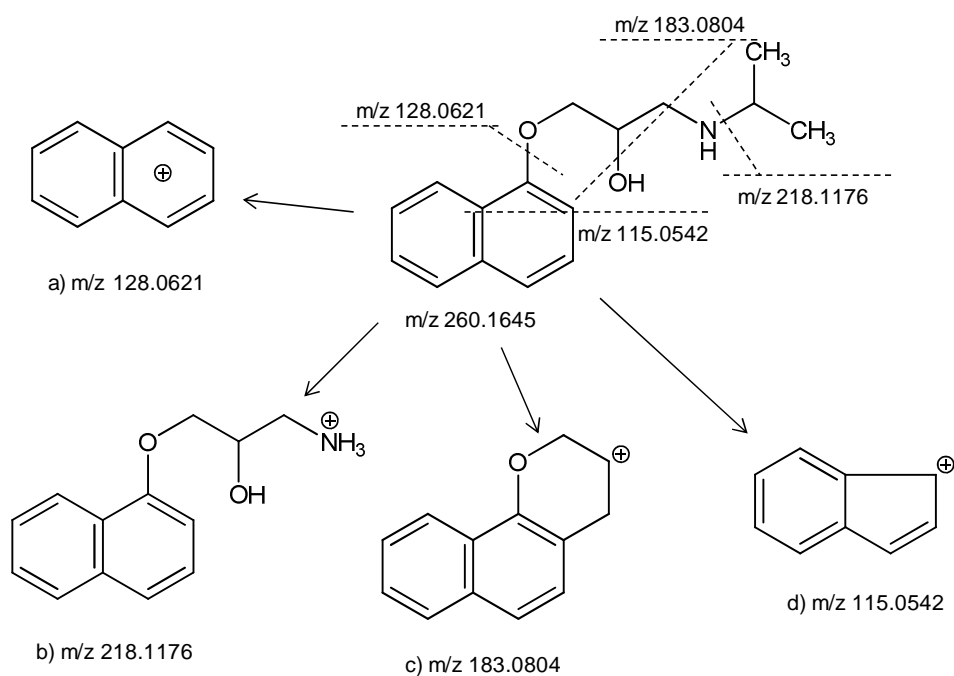


Figure 3. In-source CID fragmentation of propranolol

An example of the proposed strategy is highlighted in **Figure 4**, where the extracted ion chromatogram EIC of diagnostic ion m/z 115.0542 is shown, and reveals the presence of various chromatographic peaks, candidates to be metabolites. The accurate mass spectrum of each peak enables the confirmation of the presence of this diagnostic ion and also assists the tentative identification of the corresponding parent compound (metabolite).

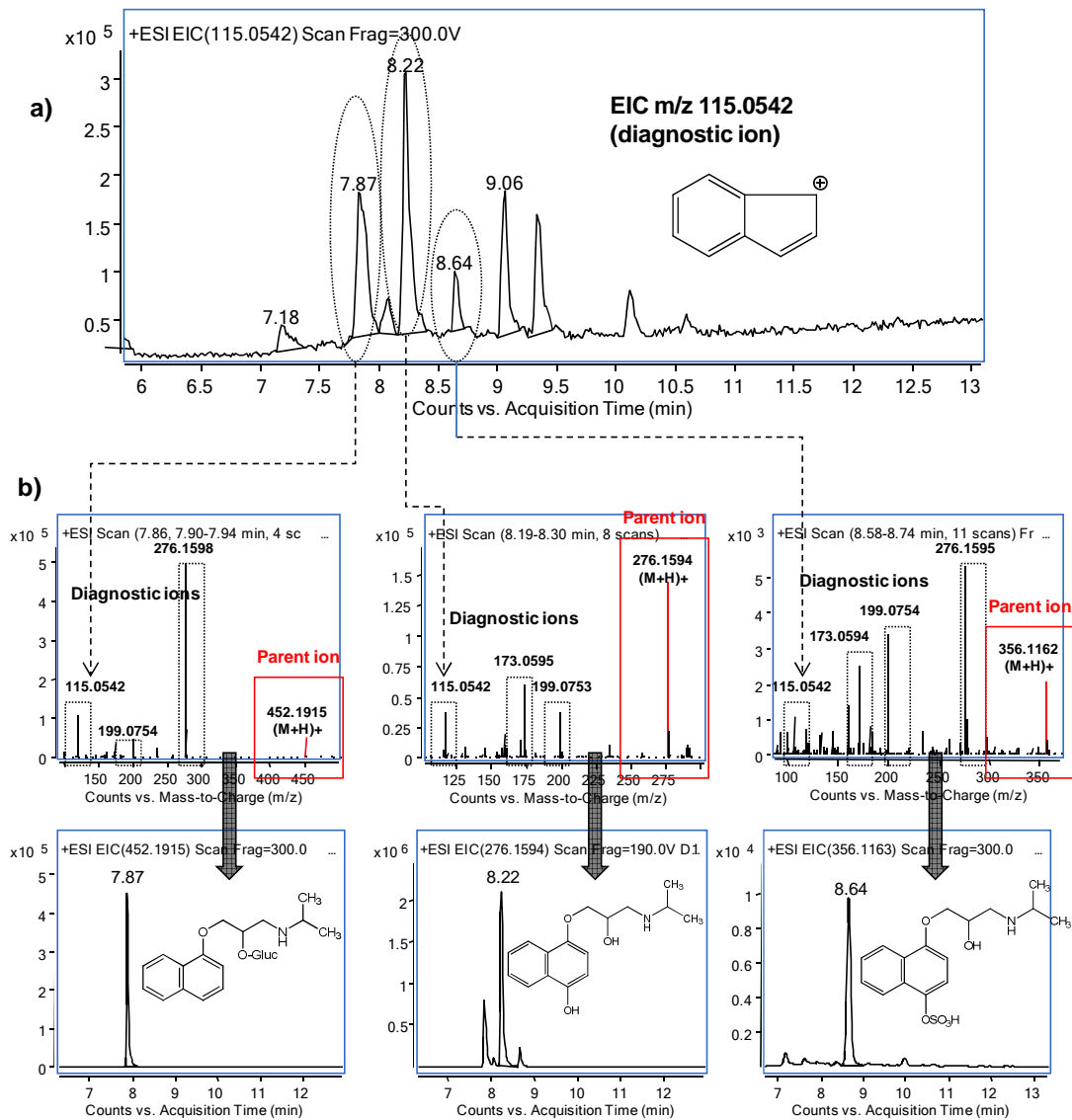


Figure 4. Example of a diagnostic ion based search: **a)** Extracted ion chromatogram of diagnostic ion 115.0542. **b)** metabolites found with the diagnostic ion 115.0542: Hydroxylation + sulfonation (m/z 356.1162), hydroxylation (m/z 276.1594) and glucuronidation (m/z 452.1915)

Results and discussion

The proposed combined approach was tested using 10 sport drugs from different classes (propranolol, bumetanide, clenbuterol, ephedrine, finasteride, methoxyphenamine, methylephedrine, salbutamol and terbutaline). As a case study, the identification of propranolol metabolites is described in detail.

Identification of propranolol and its metabolites in urine. Propranolol is a non-selective β -blocker included in the list of banned substances of the World Anti Doping Agency (WADA). Its use is prohibited in competition in some sports and also out of competition in archery and shooting ^[20,21]. The metabolism study of propranolol was carried out using the proposed procedure and the results were compared to the metabolites reported in the existing literature.

The identification and confirmation of propranolol was performed by LC-TOFMS accurate mass measurements and retention time matching. For confirmation purposes and the subsequent metabolite search based on diagnostic ions, in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation of propranolol was examined (**Figure 3**). The metabolites identified in the rat urine sample (**M1-M4**, **M7-M11**, and **M14-M24**) are summarized in **Table 3**. These include: the hydroxylation of the ring in different positions (**M1-M3**); the glucuronic conjugates of the parent molecule (**M10-M11**); of the ring-hydroxylated metabolite (**M4**) and of the dihydroxylated derivatives (**M20-M24**); the sulfate conjugate of the ring-hydroxylated (**M7-M9**); the dihydroxylation of the rings (**M14-M15**); the N-desisopropylation of the propranolol (**M16**), the oxidation of the side chain to aliphatic acids (**M17-M18**) and α -naphthol sulfate (**M19**). All compounds were identified by accurate mass measurements of the intact molecules and diagnostic fragment ions with a mass error below 2 ppm in most cases as shown in **Table 3**.

Table 3. . Identification and accurate mass measurements of propranolol metabolites found in rat urine.

Metabolite	RT	Exp. <i>m/z</i>	Theor. <i>m/z</i>	Error		Proposed formula	DBE
				mDa	ppm		
M1- Hydroxylation	7.84	276.1598	276.1594	0.37	1.35	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7
M2- Hydroxylation	8.10	276.1594	276.1594	0.02	0.09	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7
M3- Hydroxylation	8.26	276.1597	276.1594	0.28	1.01	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7
M4- Hydroxylation + glucuronidation	7.92	452.1919	452.1915	0.42	0.93	C ₂₂ H ₂₉ NO ₉	9
M7- Hydroxylation + sulfonation	7.23	356.1166	356.1162	0.32	0.9	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	7
M8- Hydroxylation + sulfonation	7.68	356.1160	356.1162	0.19	0.52	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	7
M9- Hydroxylation + sulfonation	8.68	356.1158	356.1162	0.44	1.24	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	7
M10- Glucuronidation	8.78	436.1956	436.1966	0.96	2.21	C ₂₂ H ₂₉ NO ₈	9
M11- Glucuronidation	8.92	436.1964	436.1966	0.19	0.43	C ₂₂ H ₂₉ NO ₈	9
M14- Dihydroxylation	7.97	292.1545	292.1543	0.15	0.5	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	7
M15- Dihydroxylation	8.41	292.1539	292.1543	0.41	1.39	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	7
M16- <i>N</i> -Desisopropylation	8.77	218.1169	218.1176	0.63	2.9	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	7
M17- Naphthoxylactic acid	10.58	231.0666	231.0663	0.34	1.45	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	8
M18- Naphthoxyacetic acid	11.64	201.0557	201.0558	0.03	0.13	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	8
M19- α -naphthol sulfate	9.30	223.0071	223.0071	0.08	0.35	C ₁₀ H ₈ O ₄ S	7
M20- Dihydroxylation + glucuronidation	2.19	468.1868	468.1864	0.41	0.88	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₀	9
M21- Dihydroxylation + glucuronidation	3.88	468.1867	468.1864	0.29	0.63	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₀	9
M22- Dihydroxylation + glucuronidation	6.50	468.1868	468.1864	0.35	0.74	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₀	9
M24- Dihydroxylation + glucuronidation	7.69	468.1865	468.1864	0.08	0.17	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₀	9

Metabolites **M1**, **M2** and **M3** (m/z 276.1594) were found as ring-hydroxy derivatives of propranolol, with a mass shift of 15.9949 Da corresponding to the addition of an oxygen atom. They were confirmed with fragment ions m/z 199.0756, 173.0602 and 115.0542. According to elution order found in literature [22,23], the three isobaric species were assigned as 5' (RT 7.84 min), 4' (RT 8.10 min) and 7' (RT 8.26 min) hydroxyl-derivatives of propranolol. **M4** detected at 7.92 min with m/z 452.1915 (with a mass shift of 192.0270 Da, addition of $C_6H_8O_6$) was identified as the glucuronide of the hydroxylated propranolol. In-source CID fragmentation of this metabolite showed characteristic fragments with m/z 276.1594, 199.0756, 173.0602 and 115.0542. **M7**, **M8** and **M9** metabolites with m/z of 356.1162 (mass shift of 95.9517 Da (addition of SO_4)) were identified as sulfate derivatives of the (ring)-hydroxylated propranolol derivative. Similarly to the hydroxy derivatives (**M1-M3**), the tentative elution order was established as follows: 5'-hydroxy sulfate (RT 7.23 min) (**M7**), 4'-hydroxy sulfate (RT 7.68 min) (**M8**) and 7'-hydroxy sulfate (RT 8.68 min) (**M9**). In-source CID fragmentation of **M7-M9** revealed the presence of fragments with m/z 276.1594, 199.0756, 173.0602 and 115.0542. Glucuronidation of propranolol (involved a mass shift of 176.0321 Da (addition of $C_6H_8O_6$)) yielded **M10** (RT 8.78 min) and **M11** (RT 8.92 min), with m/z 436.1966. Since the glucuronidation is only possible in two positions, the hydroxyl group and the amine group in the side chain, **M10** and **M11** correspond to the O-Glucuronide and N-glucuronide derivatives of propranolol (elution order not set). Characteristic fragments of both metabolites were also found at m/z 260.1645 and 183.0804.

Hydroxylation at two positions of the rings yielded **M14** (RT 7.97 min) and **M15** (RT 8.41 min) metabolites, with m/z 292.1543 corresponding to a mass shift of 31.9898 Da (addition of O_2). In-source CID fragmentation of **M14** showed fragments ions at m/z 199.0756 and 173.0602. N-desisopropylation of propranolol led to **M16** with

m/z 218.1176 (a mass shift of 42.0469 Da (loss of C_3H_7)), identified at a retention time of 8.77 min. and showing a characteristic fragment at m/z 183.0804.

Side-chain oxidation of propranolol generated two metabolites, **M17**, identified as naphthoxylactic acid (m/z 231.0663, RT 10.58 min), and **M18**, identified as naphthoxyacetic acid (m/z 201.0558, RT 11.64 min). These metabolites were detected in negative ionization mode, and both exhibited a common fragment ion with m/z 143.0503, which corresponds to α -naphthol moiety. This fragment was also common to **M19**, detected at 9.30 minutes, which was found to be the sulfated conjugate of α -naphthol. Finally, metabolites **M20** (RT 2.19 min), **M21** (RT 3.88 min), **M22** (RT 6.50 min) and **M24** (RT 7.69 min), with m/z of 468.1864, corresponding to a mass shift of 208.0219 Da (addition of $C_6H_8O_8$), were identified as glucuronide conjugates of dihydroxylated propranolol derivatives. These four metabolites showed a similar CID fragmentation, generating two characteristic fragment ions with m/z 292.1543 and 215.0703. Additional dedicated CID-MS/MS experiments were performed with LC-QTOF-MS, and were not able to provide complementary fragmentation information to elucidate the relative positions of the hydroxyl groups and the glucuronic acid. This observation proves that dedicated MS/MS experiments undertaken in collision cells after precursor ion isolation often do not provide additional fragmentation data compared to in-source CID fragmentation. This usually happens when the studied molecules easily undergo fragmentation even with low energy and only a few information can be extracted.

Identification of propranolol metabolites in human urine. The metabolites identified in human urine (**M1-M15**, **M17-M18** and **M23**) are also summarized in **Table 4**. The detected metabolites include the ring-hydroxylation (**M1-M3**), the glucuronidation or sulfonation of these hydroxy derivatives (**M4-M9**), a glucuronic derivative of a double ring-hydroxylated derivative (**M23**), the glucuronic

derivatives of propranolol (**M10-M11**), dihydroxylation (**M12-M15**), the N-desisopropylation of the parent molecule (**M16**), and the oxidation of the side chain to aliphatic acid (**M17-M18**). All the assignments were done with accurate mass measurements of these selected ions with relative mass errors below 2 ppm in most cases as shown in **Table 1**. As in rat urine, metabolites **M1**, **M2** and **M3** were identified at 7.84 min (5'-hydroxy), 8.10 min (4'-hydroxy) and 8.26 min (7'-hydroxy). Metabolites **M4**, **M5** and **M6** were identified as the glucuronide conjugated species of the ring-hydroxylated derivatives, with m/z 452.1915 (addition of $C_6H_8O_7$, mass shift of 192.0270 Da). Similarly to the hydroxyl-derivatives, the tentative elution order was tentatively set as 5', 4', and 7': 7.92 min (5'-O-Gluc) (**M4**), 8.00 min. (4'-O-Gluc) (**M5**) and 9.30 min. (7'-O-Gluc) (**M6**). CID fragmentation experiments were performed for the metabolites, glucuronic derivatives showed as characteristic fragments m/z 276.1594 and 173.0602 for **M4** and m/z 276.1594, 199.0756, 173.0602 and 115.0542 for **M5** (**M6** was not concentrated enough to provide fragmentation information).

Table 4. Identification and accurate mass measurements of propranolol metabolites found in human urine.

Metabolite	RT	Exp. <i>m/z</i>	Theor. <i>m/z</i>	Error		Proposed formula	DBE
				mDa	ppm		
M1 - Hydroxylation	7.84	276.1591	276.1594	0.31	1.16	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7
M2 - Hydroxylation	8.10	276.1589	276.1594	0.50	1.88	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7
M3 - Hydroxylation	8.26	276.1598	276.1594	0.37	1.34	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7
M4 - Hydroxylation + glucuronidation	7.92	452.1912	452.1915	0.31	0.69	C ₂₂ H ₂₉ NO ₉	9
M5 - Hydroxylation + glucuronidation	8.00	452.1912	452.1915	0.27	0.61	C ₂₂ H ₂₉ NO ₉	9
M6 - Hydroxylation + glucuronidation	9.30	452.1918	452.1915	0.29	0.64	C ₂₂ H ₂₉ NO ₉	9
M7 - Hydroxylation + sulfonation	7.23	356.1168	356.1162	0.52	1.46	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	7
M8 - Hydroxylation + sulfonation	7.68	356.1162	356.1162	0.02	0.05	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	7
M9 - Hydroxylation + sulfonation	8.68	356.1155	356.1162	0.73	2.06	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	7
M10 - Glucuronidation	8.78	436.1973	436.1966	0.68	1.56	C ₂₂ H ₂₉ NO ₈	9
M11 - Glucuronidation	8.92	436.1965	436.1966	0.06	0.15	C ₂₂ H ₂₉ NO ₈	9
M12 - Dihydroxylation	7.52	292.1553	292.1543	0.94	3.24	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	7
M13 - Dihydroxylation	7.65	292.1546	292.1543	0.30	0.91	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	7
M14 - Dihydroxylation	7.97	292.1543	292.1543	0.04	0.14	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	7
M15 - Dihydroxylation	8.41	292.1547	292.1543	0.38	1.25	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	7
M16 - <i>N</i> -Desisopropylation	8.77	218.1169	218.1173	0.33	1.6	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	7
M17 - Naphthoxylactic acid	10.58	231.0669	231.0663	0.59	2.54	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	8
M18 - Naphthoxyacetic acid	11.64	201.0557	201.0558	0.1	0.47	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	8
M23 - Dihydroxylation + glucuronidation	7.12	468.1858	468.1864	0.65	1.39	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₀	9

M7, **M8** and **M9** (sulfate derivative of the ring hydroxylated propranolol) and glucuronides from intact propranolol (**M10** and **M11**) were also identified in human urine. **M12**, **M13**, **M14** and **M15** (RT 7.52, 7.65, 7.97 and 8.41 min) were identified

as the ring-dihydroxylated propranolol derivatives, with m/z 292.1543 (mass shift 31.9898 Da, addition of O₂). Only two of these metabolites were concentrated enough to be subjected to CID fragmentation. **M14** yielded fragment ions with 199.0756 and 173.0602, while **M13** exhibited an additional fragment with m/z 115.0542. Finally, as in rats, the oxidation of the side chain of propranolol generates two metabolites, **M17**, (naphthoxylactic acid, RT 10.58, m/z 231.0663), and **M18**, (naphthoxyacetic acid, RT 11.64, m/z 201.0558). These are the only metabolites detected in negative ionization mode. CID fragmentation of both compounds led to a fragment ion with m/z 143.0503, corresponding to α -naphthol. These two metabolites (**M17**, **M18**) and the sulfate conjugate of α -naphthol only identified in rat urine (**M19**) were identified based on previous literature^[24-33].

Finally, **M23** (m/z 468.1864), detected in human urine at 7.12 min, corresponds to the glucuronic conjugate of the ring-dihydroxylated derivative. This metabolite (involving an addition of C₆H₈O₈, and a mass shift of 208.0219 Da) also exhibited characteristic fragment ions with m/z 292.1543 and 215.0703. **Figure 5** shows the proposed structure for the 24 identified propranolol urinary metabolites. Only 9 of these detected metabolites were previously described in literature^[24-33]. **M1**, **M2** and **M3** were previously described as 5', 4' and 7' hydroxy derivatives of propranolol. Only one glucuronic derivative of the hydroxylated metabolite was previously described, while in this work 3 metabolites (**M4-M6**) have been identified, tentatively corresponding to the glucuronidation of the 3 hydroxylated metabolites (**M1-M3**). Similar results were also found in the case of sulfate derivatives of the hydroxylated metabolites; 3 metabolites have been identified, **M7-M9**, tentatively corresponding to the sulfonation of the three hydroxy derivatives (**M1-M3**) while in literature only one of them was described. **M10** and **M11**, identified as the two glucuronide derivative propranolol isomers, have not been described elsewhere. Neither, the four dihydroxylated metabolites (**M12-**

M15) nor their glucuronic derivatives (**M20-M24**) have been previously reported. **M17** and **M18**, identified as naphthoxylactic and naphthoxyacetic acid, were previously described, although **M19** (α -naphthol sulfate) was not described in literature.

In-source CID fragmentation of the detected metabolites provides structural information and confirmation in the identification. The spectral features of all the 24 identified metabolites are summarized in **Table 5**.

Table 5. . In-source CID fragmentation of propranolol and its metabolites detected in rat and human urine experiments

Compound	RT	Ion	Elemental composition	Theoretical m/z	CID fragmentation Relative abundance (%)					
					160V	190V	220V	250V	300V	350V
Propranolol	9.42	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₂	260.1645	100	100	100	100	10	18
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₆ NO ₂	218.1176	-	-	-	13	-	-
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O	183.0804	-	-	7	53	10	-
		Fragment 3	C ₁₀ H ₈	128.0621	-	-	-	10	100	100
		Fragment 4	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	10	67	57
M1- Hydroxylation	7.84	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	-	19
		Fragment 2	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	-	51
		Fragment 3	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	-	29
M2- Hydroxylation	8.10	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	100	100	100	100	100	10
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	-	1
		Fragment 2	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	29	8
		Fragment 3	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	82	100
M3- Hydroxylation	8.26	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	100	100	100	100	38	5
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	18	13	9
		Fragment 2	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	28	28	3
		Fragment 3	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	100	100
M4- Hydroxylation + glucuronidation	7.92	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₂₀ NO ₉	452.1915	100	100	100	43	95	65
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	8	39	58	100	100	100
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	9	32
		Fragment 3	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	7	46
		Fragment 4	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	6	40

M5- Hydroxylation + glucuronidation	8.00	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₂₀ NO ₉	452.1915	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	-	-	-	19	97	31
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	18	17
		Fragment 3	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	12	29
		Fragment 4	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	13	63
M6- Hydroxylation + glucuronidation	9.30	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₂₀ NO ₉	452.1915	100	100	100	100	100	100
M7- Hydroxylation + Sulfonation	7.23	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₆ S	356.1162	100	100	100	100	100	99
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	9	10	23	77	95	100
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	6	24	12
		Fragment 3	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	25	17
		Fragment 4	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	10	80
M8- Hydroxylation + Sulfonation	7.68	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₆ S	356.1162	100	100	100	100	100	81
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	9	10	23	75	97	100
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	10	5
		Fragment 3	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	13	9
		Fragment 4	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	9	21
M9- Hydroxylation + Sulfonation	8.68	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₆ S	356.1162	48	31	30	26	47	48
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	276.1594	100	100	100	100	100	100
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	20	17
		Fragment 3	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	19	18
M10- Glucuronidation	8.78	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₈	436.1966	100	100	100	100	74	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₂	260.1645	-	-	-	15	100	33
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O	183.0804	-	-	-	-	28	29
M11- Glucuronidation	8.92	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₈	436.1966	100	100	100	100	86	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₂	260.1645	-	-	-	17	100	40
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₁ O	183.0804	-	-	-	-	28	35
M12- Dihydroxylation	7.52	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	100	100	100	100	100	100

M13- Dihydroxylation	7.65	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	100	100	100	100	-	-
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	70	61	23
		Fragment 2	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	81	36
		Fragment 3	C ₉ H ₇	115.0542	-	-	-	-	100	100
M14- Dihydroxylation	7.97	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	199.0756	-	-	-	-	-	21
		Fragment 2	C ₁₁ H ₉ O ₂	173.0602	-	-	-	-	-	55
M15- Dihydroxylation	8.41	[M+H]⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	100	100	100	100	100	100
M16- N-Desisopropylation	8.77	[M+H]⁺	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	218.1176	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₃ H ₁₁ O	183.0804	-	-	-	21	35	52
M17- Naphthoxylactic acid	10.58	[M-H]⁻	C ₁₃ H ₁₁ O ₄	231.0663	67	64	63	62	-	-
		Fragment 1	C ₁₀ H ₇ O	143.0503	100	100	100	100	-	-
M18- Naphthoxyacetic acid	11.64	[M-H]⁻	C ₁₂ H ₉ O ₃	201.0558	94	90	92	-	-	-
		Fragment 1	C ₁₀ H ₇ O	143.0503	100	100	100	-	-	-
M19- α-Naphthol sulfate	9.30	[M-H]⁻	C ₁₀ H ₇ O ₄ S	223.0071	100	100	100	-	-	-
		Fragment 1	C ₁₀ H ₇ O	143.0503	21	21	21	-	-	-
M20- Dihydroxylation + glucuronidation	2.19	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₁₀	468.1864	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	-	-	-	4	14	30
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	215.0703	-	-	-	-	7	26
M21- Dihydroxylation + glucuronidation	3.88	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₁₀	468.1864	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	-	-	-	-	28	36
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	215.0703	-	-	-	-	3	9

M22- Dihydroxylation + glucuronidation	6.50	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₁₀	468.1864	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	-	-	-	-	24	26
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	215.0703	-	-	-	-	3	7
M23- Dihydroxylation + glucuronidation	7.12	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₁₀	468.1864	100	100	100	100	100	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	-	-	-	21	79	43
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	215.0703	-	-	-	-	-	21
M24- Dihydroxylation + glucuronidation	7.69	[M+H]⁺	C ₂₂ H ₃₀ NO ₁₀	468.1864	100	100	100	100	63	100
		Fragment 1	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄	292.1543	-	-	-	13	100	88
		Fragment 2	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	215.0703	-	-	-	-	-	18

Implementation and evaluation of the proposed systematic approach for multiclass sport drugs metabolite identification.

The proposed approach was tested with different sport drugs corresponding to different classes such as diuretics, stimulants or anabolic steroids. Single dose experiments were performed in rats by triplicate. Details on the experiments are provided in **Table 1**. The total number of metabolites detected was compared with the reported metabolites in order to explore the metabolite identification coverage rate of the proposed systematic approach. The results obtained are summarized in **Table 6**. As it can be noted, the coverage rate was higher than 50 % of metabolites in most cases. Besides, up to 28 putative new metabolites were identified in the present study. This reveals the usefulness of the proposed approach as a straightforward method to screen for metabolites on a systematic basis.

Table 6. Evaluation of the proposed systematic approach for multiclass sport drugs metabolite identification in terms of metabolite coverage with regards to previously reported literature

Compound	Number of detected urinary metabolites	Number of previously described urinary metabolites	% Coverage^a	Number of non-described urinary metabolites detected	References
Propranolol	24	13	69 (9/13)	15	[44-49]
Bumetanide	6	6	100	0	[50-51]
Clenbuterol	5	7	57	1	[52-53]
Ephedrine	6	9	33	3	[54-57]
Finasteride	9	10	60	3	[58-61]
Methoxyphenamine	5	5	60	2	[62-69]
Methylephedrine	5	5	80	1	[53, 70]
Salbutamol	3	2	50	2	[71-74]
Terbutaline	2	2	50	1	[75-77]

^aCoverage percentage was calculated excluding the compounds non-previously reported species detected for the first time

For instance, in the case of propranolol, 15 compounds were identified solely with mass shifts while 11 were identified using diagnostic ions produced in in-source CID experiments. But, more interestingly to the total number of metabolites identified, is the synergetic effect when using both tools. The combined use of diagnostic ion fragmentation and accurate-mass mass shifts clearly increases the metabolite identification coverage rate, but more importantly improve identification quality, because the number of false positives is drastically reduced. In the cases where a diagnostic ion is used to detect the metabolite candidate, accurate mass analyses of two ions (diagnostic ion and the intact molecule) along

with isotope pattern information is enough to tentatively confirm the metabolite. Final characterization/standardization of the tentative species may involve synthesis, NMR, and additional dedicated CID MS/MS or even high resolution MSⁿ experiments to distinguish amongst isomers and to elucidate the relative positions of the functional groups from the different metabolites detected with the same *m/z* value.

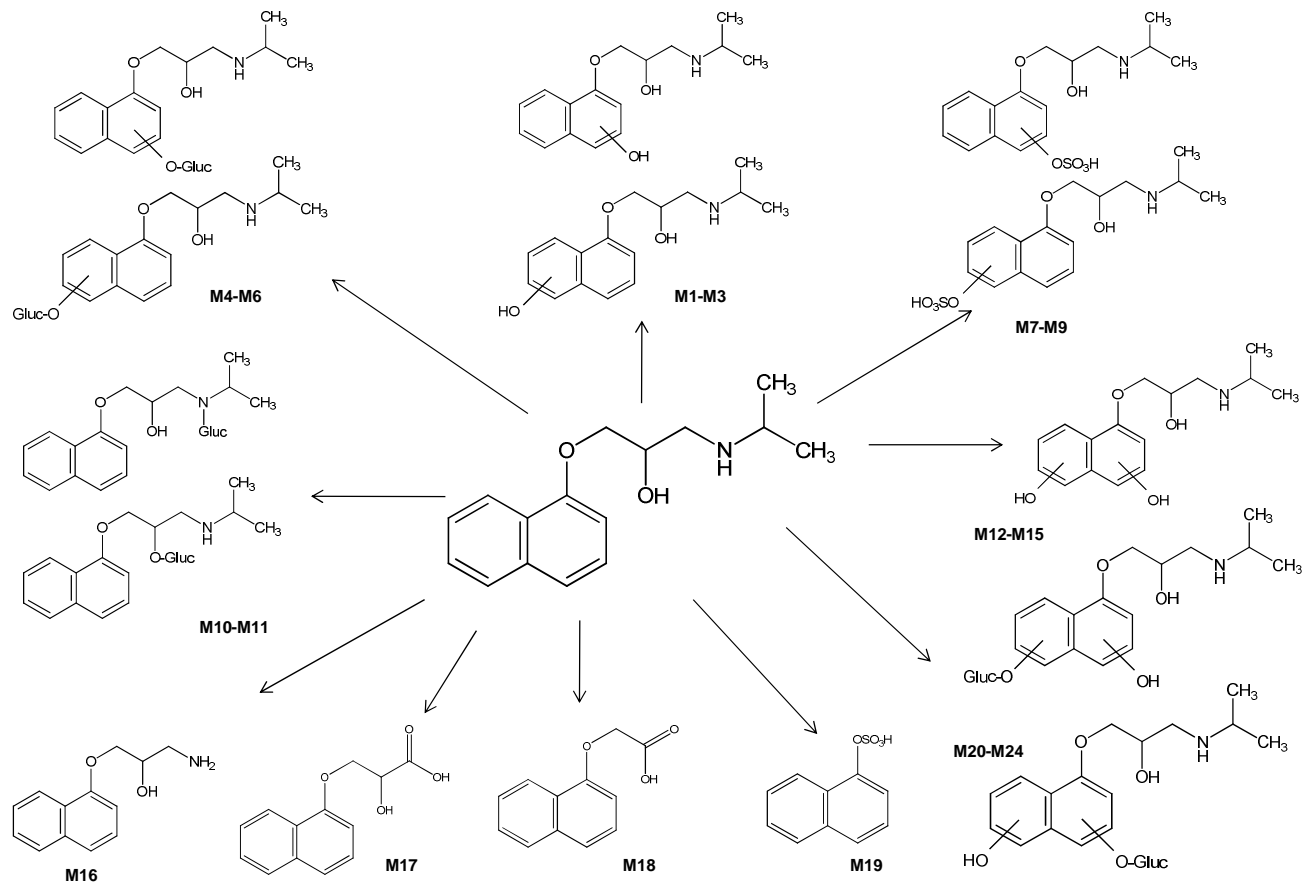


Figure 5. Proposed structures of identified propranolol metabolites

With regards to the implementation of the proposed approach, the key issue is the mass spectrometer acquisition mode selection rather than specific software features. **Table 7** summarizes information related to selected instrumentation suitable to implement the present approach. Not huge differences are found amongst different software packages available, mostly based on the use of scripts calculating mass shifts or alternatively the use of mass defect filtering (MDF) algorithms^[14,15]. Straightforward scripts based on user-created excel spreadsheets can be easily implemented regardless the instrument manufacturer.

The key part is the ability to acquire simultaneously (or in consecutive runs) information from intact molecules and CID fragmentation without precursor isolation. The use of specific MS/MS experiments offer additional specificity, even considering precursor ion isolation is accomplished typically with mass-unit (low) resolution. However, the MS/MS data information that can be acquired in a run is limited by the acquisition time and compatibility with chromatographic peak shape requirement. Therefore, only a selected number of co-eluting ions (up to 10) may be isolated and fragmented within each acquisition cycle. If different collision energy is used to fine tune the fragmentation (two or three different values), the number of tentative species traced is much lower. On the other hand, the use of triggered data-dependent acquisition modes which isolates, for instance, the more abundant ions, is not particularly useful when dealing with complex matrices with abundant co-eluting species which are usually more intense than the targeted species. In this context, the need for different MS and MS/MS experiments is requested.

In contrast, the use of CID fragmentation without precursor isolation, offered by different vendors as shown in **Table 7** provides much more advantages than disadvantages. The main drawback of this acquisition mode is the loss of specificity compared to a dedicated precursor ion isolation MS/MS experiment. In contrast,

the last generation of instruments enables fast switching of fragmentation conditions from soft (producing intact (de)protonated species) to medium-hard fragmentation yielding most relevant diagnostic ions. Therefore, the entire data can be eventually collected within a unique run. Different solutions are proposed from the typical in-source CID fragmentation undertaken in the ion transportation region at low vacuum ^[34] used in this work with LC-TOFMS, which enable the acquisition of up to four different fragmentation conditions in the same run, to the use of a dedicated high-energy dissociation cell (HCD) in stand-alone Orbitrap mass spectrometers ^[35,36] or a typical Q-TOFMS MS/MS experiment, but without isolation in dedicated cell at high vacuum with auxiliary gasses (MS^E mode from Waters ^[37,38]). The versatility of the experiment (amount of information acquired) is achieved however at the expense of sensitivity in TOF instruments and resolving power in Orbitraps, because sensitivity and resolution decreases with increasing acquisition rates in TOF and Orbitraps respectively ^[35,36], although the introduction of newer and faster HRMS instruments partly compensates this issue.

Table 7. Implementation of the proposed approach based on CID fragmentation (without precursor ion isolation) and high resolution mass spectrometry (implementation of mass shifts from biotransformations), using different manufacturers^[35-43].

Instrument/ Manufacturer	Features, acquisition modes and performance: advantages and disadvantages	Specific Available Software
Exactive Orbitrap™ / Thermo	<p>(+) Resolution up to <i>ca.</i> 100.000 (160.000 in Q-Exactive). The mass resolution is related to sampling/acquisition time. A single-stage Exactive™ instrument permits a resolution of 17500 FWHM (12 Hz); 100000 (1 Hz): a compromise between mass resolution and the number of spectra recorded per time unit should be adopted. Only a weak loss is observed in the dependency of sensitivity with acquisition time</p> <p>(+) If the so-called high energy dissociation cell (HCD) is included, in full-scan mode, data acquisition software permits to rapidly alternate between two different HCD voltage settings, thus generating low- and high collision energy mass spectra during the same run^[35,36]</p> <p>(+) No interfering neutral molecules are present in the HCD, yielding more reliable fragmentations than in in-source CID experiment (without a dedicated collision cell)</p> <p>(+) Enhanced mass accuracy when measuring fragment ions. In Q-TOF MS/MS experiments, when the reference mass is lost, there is a decrease in mass accuracy</p> <p>(-) The experiment (pseudo MS/MS without precursor ion isolation in HCD cell) is not as selective as dedicated MS/MS (with precursor ion isolation), so eventually the fragment ion information from two coeluting species could be misinterpreted</p> <p>(-) When dealing with complex matrices, C-trap capacity may eventually be overloaded with matrix background ions, being precision and sensitivity affected^[39]</p>	MassFrontier, Networks (product-ion filter, neutral loss filter ^[40])

TOF (Bruker, Agilent)	<p>(+) Resolution up to <i>ca.</i>50000 (depending of manufacturer and reference <i>m/z</i> used. Resolution is not affected by acquisition time (but by the flight-path and electronic issues), although sensitivity relies on higher number of accumulated individual scans/transients</p> <p>(+)When using full-scan and CID fragmentation without precursor ion isolation, all the ions are fragmented without any loss of information</p> <p>(-) In-source CID experiment accomplished ion transportation section (without a dedicated collision cell) may be less effective for analytes difficult to fragment</p>	Bruker metabolite tools and Meteor Software ^[41]
Q-TOF (Bruker, Agilent, Applied Biosystems, etc.)	<p>(+) Resolution up to <i>ca.</i> 50000 (depending of manufacturer and reference <i>m/z</i> used. Resolution is not affected by acquisition time (but by the flight-path and electronic issues), although sensitivity relies on higher number of accumulated individual scans/transients</p> <p>(+) Dedicated fragmentation in a collision cell with precursor ion isolation is more selective</p> <p>(-) Reduced number of acquired MS/MS spectra of enough quality per acquisition point. When using MS/MS, time matters and only a limited number of MS/MS spectra can be acquired</p> <p>(-) Data dependent acquisition (or information dependent acquisition) mode (the instrument alternates between MS (full-scan and MS/MS mode by selecting precursor ions in the quadrupole mass filter based on defined selection criteria applied to the mass spectral data.) may be useless in complex matrices when targeting species at (ultra)trace levels. This technique has the inherent disadvantage of dedicating analysis time exclusively to a single precursor ion, while all other ions sampled from the ion source into the mass spectrometer escape detection. As the most commonly used criterion for selecting a precursor ion is its prevalence in the mass spectrum, the chance of selecting a drug molecule ion among a complex background is low.</p>	Mass Profiler Professional and Molecular Feature Extraction (data mining tools) (MassHunter) (Agilent)

TOF/QTOF (Waters) <i>featuring MS^E</i>	<p>(+) MS^E is based on the use of full-scan acquisition and CID fragmentation without precursor ion isolation, so that all the ions are fragmented without any loss of information. A dedicated collision cell (without precursor ion selection) enables effective fragmentation at reproducible conditions, so that exact-masses of precursor and fragment ion are obtained from every detectable component in the sample. Under appropriate conditions, the result is one spectrum containing the intact molecular ion, whereas the high-collision energy spectrum displays fragment ion information [37,38].</p> <p>(+) Dedicated fragmentation in a collision cell is more effective and reproducible than in-source CID</p> <p>(+) Enhanced mass accuracy when measuring fragment ions when using MS^E. In dedicated Q-TOF MS/MS experiments, when the reference mass is lost, there is a decrease in mass accuracy</p> <p>(-) The experiment (pseudo MS/MS without precursor ion isolation) in HCD cell) is not as selective as dedicated MS/MS (with precursor ion isolation), so eventually the fragment ion information from two coeluting species could be misinterpreted</p> <p>(-) Data dependent acquisition may be less useful when working with low concentrated species</p>	MetaboLynx [42] and Mass Lynx [43] (prediction of metabolites / mass defect filtering (MDF)) MassFragment (tool for the structural assignment of product ions from known structures)
Triple Quadrupole (most vendors) or QTRAP (Applied Biosystems) (<i>operated in precursor ion scan mode</i>)	<p>(+) Precursor ion scan (PIS) experiment to detect a family of compounds is a smart approach highly useful for selected cases, <i>eg.</i> to detect a family of compounds [6,18], although a previous knowledge on the species of interest prior to acquisition (PIS) method implementation is required.</p> <p>(-) Do not feature high resolution/accurate mass measurements</p> <p>(-) In precursor scanning experiments one needs to know the fragmentation pattern of the parent ion in advance in order to find the appropriate diagnostic ion for this proposed approach.</p> <p>(-) Loss of sensitivity while using scanning modes such as precursor ion scan</p>	

Concluding remarks

The proposed approach based on CID fragmentation without precursor ion isolation combined with accurate mass shifts has been evaluated using LC-TOFMS with a suite of ten sport drugs representative from different classes, after single doses administered to rats. Metabolite identification coverage rate obtained with the systematic method (compared to existing literature) was satisfactory and the approach enabled the identification of several non-previously reported metabolites on a systematic basis. The study with propranolol enabled the identification of up to 24 metabolites, 15 of them not been previously described in literature, which is a valuable indicator of the usefulness of the proposed systematic procedure. The methodology can be considered as a comprehensive “top-down/bottom-up” approach since identification of metabolites can be obtained from accurate mass shifts starting from the unaltered parent drug (top-down), while the use of diagnostic ions (those fragment ions common in a class of species) can also be used as markers for identifying metabolites (bottom-up) starting from the core/nuclei of the metabolite structure which may be common to that of the parent drug. The proposed methodology can be easily implemented with most of high resolution mass spectrometers available in the market. Differences will rely on whether CID fragmentation is performed during ion transportation (at relatively high pressure) or in dedicated collision cells, in both cases without precursor ion isolation.

Referencias

- 1 N. J. Clarke, D. Rindgen, W. A. Korfmacher, K. A. Cox, Systematic LC/MS metabolite identification in drug discovery , *Anal. Chem.* 73 (2001) 431A-439A.
- 2 B. Prasad, A. Garg, H. Takwani, S. Singh, Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 360-387.
- 3 S. Ma ,S. K. Chowdhury, Analytical strategies for assessment of human metabolites in preclinical safety testing, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5028-5036
- 4 M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer, Current role of LC-MS(/MS) in doping control, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 405-420.
- 5 M. Thevis, W. Schänzer, Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays, *Mass Spectrom. Rev* 26 (2007) 79-107.
- 6 O. J. Pozo, D. Van Eenoo K. Deventer, T. Delbeke, , Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC–MS, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 657-671.
- 7 M. Zhu, H. Zhang, W. G. Humphreys, Drug Metabolite Profiling and Identification by High-resolution Mass Spectrometry, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 25419-25425.
- 8 R. J. B. Peters, A. A. M. Stolker, H. G. J. Mol, A. Lommen, E. Lyris, Y. Angelis, A. Vonaparti, M. Stamou, C. Georgakopoulos, M. W. F. Nielen, Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1250-1268.
- 9 A. Lommen, MetAlign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3079-3086.
- 10 R. J. B. Peters, M. C. van Engelen, M. E. Touber, C. Georgakopoulos, M. W. F. Nielen, Searching for in silico predicted metabolites and designer modifications of (cortico)steroids in urine by high-resolution liquid

- chromatography/time-of flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2329-2337.
- 11 O. J. Pozo, W. Van Thuyne, K. Deventer, P. Van Eenoo, F. T. Delbeke, Elucidation of urinary metabolites of fluoxymesterone by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 394-408.
 - 12 R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 357-372.
 - 13 P. Zhu, W. Tong, K. Alton, S. Chowdhury, An accurate-mass-based spectral-averaging isotope-pattern-filtering algorithm for extraction of drug metabolites possessing a distinct isotope pattern from LC-MS data, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5910-5917.
 - 14 H. Zhang, D. Zhang, K. Ray, A software filter to remove interference ions from drug metabolites in accurate mass liquid chromatography/mass spectrometric analyses, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 1110-1112.
 - 15 H. Zhang, L. Ma, K. He, M. M. Zhu, An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application to the detection of troglitazone metabolites in rat plasma, bile, and urine, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1191-1200.
 - 16 H. Zhang, Y. Yang, An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application for detection of glutathione-trapped reactive metabolites, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1181-1190.
 - 17 P. Zhu, W. Ding, W. Tong, A. Ghosal, K. Alton, S. Chowdhury, A retention-time-shift-tolerant background subtraction and noise reduction algorithm (BgS-NoRA) for extraction of drug metabolites in liquid chromatography/mass spectrometry data from biological matrices, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1563-1572.
 - 18 O.J. Pozo, K. Deventer, P. Van Eenoo, F. T. Delbeke, Efficient approach for the comprehensive detection of unknown anabolic steroids and metabolites in

- human urine by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1709-1720.
- 19 E. Liotta, R. Gottardo, A. Bertaso, A. Poletti, Screening for pharmacotoxicologically relevant compounds in biosamples using high-resolution mass spectrometry: a 'metabolomic' approach to the discrimination between isomers, *J. Mass. Spectrom.* 45 (2010) 1-271.
 - 20 WADA technical document - TD2003IDCR, www.wada-ama.org.
 - 21 The 2012 prohibited list. www.wada-ama.org.
 - 22 H. A. Semple, F. Xia, Simplified high-performance liquid chromatographic method for propranolol and five metabolites in liver perfusate, rat serum and dog plasma, *J. Chromatogr. B* 655 (1994) 293-299.
 - 23 C. R. Otey, G. Bandara, J. Lalonde, K. Takahashi, Preparation of human metabolites of propranolol using laboratory-evolved bacterial cytochromes P450, *Biotechnology and Bioengineering* 93 (2006) 494-499.
 - 24 G.L. Tindell, T. Walle, T.E. Gaffney, Rat liver microsomal metabolism of propranolol: Identification of seven metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, *Life Sci.*, 11 (1972) 1029-1036.
 - 25 T. Walle, T.E. Gaffney, Propranolol metabolism in man and dog. Mass spectrometric identification of six new metabolites, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 182 (1972) 83-92.
 - 26 V.T. Vu, F.P. Abramsom, The pathways of propranolol metabolism in dog and rat liver 10,000g supernatant fractions, *Drug. Metab. Dispos.*, 8 (1980) 300-304.
 - 27 J.F. Pritchard, D.W. Schneck, W.J. Racz, A.H. Hayes, The contribution of propranolol metabolites to the fluorometric assay of propranolol in human plasma, *Clin. Biochem.*, 11 (1978) 121-125.
 - 28 V.L. Herring, J.A. Johnson, Direct high-performance liquid chromatographic determination in urine of the enantiomers of propranolol and its major basic metabolite 4-hydroxypropranolol, *J. Chromatogr. B*, 612 (1993) 215-221.

- 29 J.F. Pritchard, D.W. Schneck, A.H. Hayes, Determination of propranolol and six metabolites in human urine by high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 162 (1979) 47-58.
- 30 H.A. Semple, F. Xia, *J. Chromatogr. B*, Simplified high-performance liquid chromatographic method for propranolol and five metabolites in liver perfusate, rat serum and dog plasma, 655 (1994) 293-299.
- 31 D.E. Easterling, T. Walle, E.C. Conradi, T.E. Gaffney, Quantitative analysis of naphthoxylactic acid, a major metabolite of propranolol in plasma in man, *J. Chromatogr.*, 162 (1979) 439-445.
- 32 S. Qureshi, H.S. Buttar, High-performance liquid chromatographic determination of propranolol and its metabolites in rat serum, *J. Chromatogr. B*, 431 (1988) 465-470.
- 33 E.C. Kwong, D.D. Shen, Versatile isocratic high-performance liquid chromatographic assay for propranolol and its basic, neutral and acidic metabolites in biological fluids, *J. Chromatogr. B* (1987) 365-379.
- 34 L. Abranko, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 478-488.
- 35 P. Eichorn, S. Pérez, D. Barceló. Time-of-Flight Mass Spectrometry Versus Orbitrap-Based Mass Spectrometry for the Screening and Identification of Drugs and Metabolites: Is There a Winner?, *Comprehensive Analytical Chemistry* 58 (2012) 217-272.
- 36 A. Kaufmann. *Comprehensive Analytical Chemistry* 58 (2012) 169-215.
- 37 An overview of the principles of MS^E, the engine that drives MS performance, Waters. 2011 (Publication ref. 720004036EN).
- 38 F. Hernández, L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Diaz, M. Ibañez, Rapid wide-scope screening of drugs of abuse, prescription drugs with potential for abuse and their metabolites in influent and effluent urban wastewater by ultrahigh

- pressure liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight–mass spectrometry, *Anal Chim Acta* 684 (2011) 96–106.
- 39 A. Kaufmann, M. Widmer, K. Maden, S. Walker, M. Widmer. Post-interface signal suppression, a phenomenon observed in a single-stage Orbitrap mass spectrometer coupled to an electrospray interfaced liquid chromatograph, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24 (2010) 2162.
- 40 Q. Ruan, S. Peterman, M.A. Szewc, L. Ma, D. Cui, W. G. Humphreys, M. Zhu. An integrated method for metabolite detection and identification using a linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer and multiple data processing techniques: application to indinavir metabolite detection, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 251–261.
- 41 A. Pelander, E. Tyrkko, I. Ojanpera. Rapid Commun. In silico methods for predicting metabolism and mass fragmentation applied to quetiapine in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry urine drug screening, *Mass Spectrom.* 23 (2009) 506–514.
- 42 Rousu T, Herttuainen, A. Tolonen. Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification in vitro – amitriptyline and verapamil as model compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 939–957.
- 43 R.J. Mortishire-Smith, J.M. Castro-Pérez, K. Yu, J.P. Shockcor, JK. Goshawk, M.J. Hartshorn, A. Hill. 'All-in-one' analysis for metabolite identification using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry with collision energy switching, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 939–948.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Detection of main urinary metabolites of β_2 -agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry



Juan C. Domínguez-Romero^a, Juan F. García-Reyes^{a,*}, Rubén Martínez-Romero^b, Esther Martínez-Lara^b, María L. Del Moral-Leal^b, Antonio Molina-Díaz^a

^a Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

^b Department of Experimental Biology, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 December 2012
Accepted 6 February 2013
Available online 14 February 2013

Keywords:
 β_2 -agonists
Clenbuterol
Terbutaline
Salbutamol
Urine
Liquid chromatography
Mass spectrometry
Metabolites

ABSTRACT

Clenbuterol, terbutaline and salbutamol are β_2 -agonists drugs included in the list of banned substances of the World Anti Doping Agency (WADA) prohibited in and out of competition. In this article, the excretion of urinary metabolites of clenbuterol, terbutaline and salbutamol have been studied using liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC-TOFMS), after a single therapeutic dose administration in rats. Urine collected was processed with solid-phase extraction prior to LC-TOFMS analyses using electrospray in the positive ion mode and pseudo MS/MS experiments from in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation (without precursor ion isolation). The strategy applied for the identification of metabolites was based on the search of typical biotransformations with their corresponding accurate mass shift and the use of common diagnostic fragment ions from the parent drugs. The approach was satisfactory applied, achieving the identification of 11 metabolites (5 from clenbuterol, 4 from salbutamol and 3 from terbutaline), 4 of them not previously reported in urine. Novel metabolites identified in rat urine included N-oxide-salbutamol, hydroxy-salbutamol, methoxy-salbutamol glucuronide and terbutaline N-oxide, which are all reported here for the first time.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

III.4. Estudio del metabolismo en orina de β_2 -agonistas clenbuterol, salbutamol y terbutalina mediante LC-TOFMS

III.4.1. Resumen

Los fármacos *beta-agonistas* producen broncodilatación estimulando directamente los receptores β_2 en el músculo liso de toda la vía aérea y por tanto se emplean para el tratamiento de varias enfermedades respiratorias. De esta familia, el clenbuterol es probablemente el compuesto más efectivo. Se empleado también como sustancia dopante por su efecto anabolizante y como promotor del crecimiento. El clenbuterol está incluido dentro de la lista de sustancias prohibidas de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA). El salbutamol, [2-(tert-butylamino)-1-(4-hydroxy-3-hydroxy methylphenyl) ethanol] también conocido como albuterol es un broncodilatador agonista- β_2 -adrenérgico relativamente selectivo que se emplea en forma de aerosol para aliviar los síntomas del asma. El uso de salbutamol solo está permitido por al Agencia Mundial Antidopaje si se hace por inhalación. La administración oral, parenteral o grandes dosis inhaladas están prohibidas debido a los efectos anabolizantes que también presenta. La terbutalina (5-[2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl]benzene-1,3-diol) es un β_2 -agonista adrenérgico efectivo y de acción rápida, que se puede administrar por dosis orales, inyección o inhalación, para el tratamiento del asma y otras enfermedades respiratorias. La terbutalina está prohibida por la WADA tanto en competición como fuera de ella.

En este capítulo, se ha llevado a cabo un estudio cualitativo del metabolismo del clenbuterol, salbutamol y terbutalina, a través del tratamiento y administración de una única dosis en ratas y posterior análisis de la orina durante las siguientes 72 horas. Para el estudio, se ha empleado

cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) con una fuente de ionización electrospray en modo de ionización positivo, y empleando información de fragmentación a través de experimentos *in-source CID* (sin aislamiento de ión precursor) en la región de transporte de iones. Se empleó como estrategia el uso de cromatogramas de ion extraído de especies derivadas teniendo en cuenta los cambios de masa exacta originados por modificaciones del metabolismo de fase I y fase II típico de los fármacos. La metodología propuesta permitió la identificación de 11 metabolitos (5 de clenbuterol, 4 de salbutamol y 3 de terbutalina), 4 de ellos descritos por primera vez en este trabajo. Los metabolitos identificados por primera vez en orina son el salbutamol N-óxido, hidrox-salbutamol, derivado glucurónico del metoxi-salbutamol y terbutalina N-óxido.

Introduction

β -Agonists are widely used for the treatment of respiratory diseases. Amongst them, clenbuterol (CL) is the most effective from the class^[1] and has been used in sports as an anabolic agent because of its stimulation of the central nervous system and as a growth-promoting agent, so it is included in the list of prohibited substances published by the World Anti-Doping Agency (WADA)^[2]. Salbutamol, [2-(tert-butylamino)-1-(4-hydroxy-3-hydroxy methylphenyl) ethanol], also known as albuterol, is a relatively selective β_2 -adrenergic bronchodilator commonly used as an aerosol for relieving the acute symptoms of asthma^[3]. The list of prohibited substances in sports published by the World Antidoping Agency (WADA) specifies that the use of salbutamol is only permitted by inhalation^[4,5]. The administration by the oral or parenteral route or the administration of very large inhaled doses is forbidden due to a strong adrenergic stimulatory effect and an anabolic-like effect^[6,7]. Salbutamol is excreted in urine as a mixture of the unchanged drug and its conjugate metabolites, mainly sulphate, being the percentage of glucuronide of salbutamol in urine negligible^[8-10]. Terbutaline (5-[2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl]benzene-1,3-diol) is a selective fast-acting β_2 -adrenergic agonist. It has marketing authorization for use by injection, inhalation or oral dosage for the treatment of obstructive pulmonary diseases and as a short-term asthma treatment^[11]. Terbutaline can be misused in sports and therefore appears on the prohibited list of the World Anti-doping Agency (WADA) for use in and out of competition^[2]. Following oral administration, one-third to one-half of the dose is excreted in the urine, whereas after intravenous and subcutaneous administration more than 90% is eliminated by this route^[12,13]. Metabolism studies of terbutaline in man revealed a sulphate conjugate as the main metabolite in urine beside the unchanged drug and a glucuronidated conjugate which was detected as minor component^[11].

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) are the two techniques approved by the WADA in doping control ^[5]. Both the chromatographic retention time and the diagnostic mass spectrometric ions are required for the identification of a compound ^[14-16]. However, GC–MS may require additional derivatisation steps to enhance the volatility of analytes, which might produce interferences and consequently make more difficult quantitation. In contrast, LC-MS has become one of the standard techniques in doping control analysis over the last decade. Several analyzers, such as ion trap, triple quadrupole, time-of-flight or Orbitrap have been used for the urinary detection of several prohibited substances such as corticosteroids, diuretics, β_2 -agonists or β -blockers ^[17-19]. Besides its importance for sensitive, specific, fast and comprehensive doping control analyses, LC-MS has proved particularly useful and versatile for the identification and characterization of metabolic products derived from prohibited substances. In particular, the increasing availability of high resolution/high accuracy mass spectrometry combined with MS/MS or MSⁿ experiments provide valuable information to help the assignment of structures to tentative metabolites ^[20,21]. In this sense, the discovery of new long-term metabolites can increase the retrospectivity of the analysis and therefore their inclusion in screening methods represents a valuable contribution for doping control laboratories.

In this chapter, the excretion of urinary metabolites of β_2 -Agonists drugs clenbuterol, terbutaline and salbutamol have been studied in rats after a single dose administration using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC-TOFMS). For identification of the metabolites, urine collected was processed with solid-phase extraction prior to LC-TOFMS analyses using electrospray in the positive ion mode and pseudo MS/MS experiments from in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation (without precursor ion isolation). The strategy applied for the identification of metabolites was based on the search of

typical biotransformations with their corresponding accurate mass shift and the use of common diagnostic fragment ions from the parent drugs.

Experimental

Chemicals and reagents. Clenbuterol and terbutaline analytical standards were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Salbutamol analytical standard was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Madrid, Spain). HPLC grade acetonitrile and methanol were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Formic acid and ammonium formate were obtained from Fluka (Madrid, Spain). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout the study to obtain the HPLC water used.

Sample collection. The study was performed on adult male Wistar rats (250–300 g) (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). The animals were weighed and placed in individual metabolic cages 48 hours prior to treatment to acclimatize them to this environment, maintained under standard conditions of light and temperature and allowed *ad libitum* access to food and water to the end of the experiment. All the procedures followed the Spanish guidelines on the use of animals for research (RD 1201/2005) [22] and were approved by the institutional Committee for Ethics.

Groups of three rats were treated with clenbuterol (1 mg Kg⁻¹ body weight, intraperitoneal), salbutamol (12 mg Kg⁻¹ body weight, intraperitoneal), and terbutaline (11 mg Kg⁻¹ body weight, intraperitoneal). The vehicle solution for the three drugs was saline solution. After drug administration, urine was daily collected in graduate cylinders for 3 days (24, 48 and 72h). The urine collected 24 h prior to treatment was used as control.

Sample treatment. 2 mL of urine were diluted with 2mL of formic acid/formate pH 2.6 buffer and then was passed through a polymeric Bond Elut PLEXA™ SPE

cartridge from Agilent Technologies (Santa Clara, CA) and then washed with H₂O/methanol (95:5; v/v). The cartridges were previously conditioned with 4 mL of methanol/acetonitrile (50:50; v/v) and 4 mL of MilliQ water. The analytes were eluted from the cartridge with 4 mL of methanol/acetonitrile (1:1) and the extract was evaporated to near dryness with a TurboVap LV (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA) and then reconstituted with 0.5 mL of the initial mobile phase to achieve a preconcentration factor of 4:1. The extract was filtered through a 0.22 µm PTFE syringe filter and transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analyses.

Liquid Chromatography Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. The chromatographic separation was performed using a HPLC system (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a reversed-phase Zorbax XDB-C₁₈ analytical column of 4.6 x 50 mm and 1.8 µm particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Mobile phases A and B were water with 0.1 % (v/v) formic acid and acetonitrile. The chromatographic method held the initial mobile phase composition (10 % B) constant for 3 minutes (min), followed by a linear gradient to 100% B up to 15 min and kept for 3 min at 100%. The flow rate used was 0.5 mL min⁻¹ and 20 µL of the urine extract were injected in each run. The outlet of the liquid chromatography system was connected to an Agilent 6220 accurate mass TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an electrospray interface operated in the positive ionization mode, using the following operation parameters: capillary voltage: 4000 V; nebulizer pressure: 40 psig; drying gas flow rate: 9.0 L min⁻¹; gas temperature: 325°C; skimmer voltage: 65 V; octapole 1 rf: 250 V; fragmentor voltage (in-source CID fragmentation): 160-350 V. LC-MS accurate mass spectra were recorded across the range *m/z* 50-1000. The instrument performed continuous accurate-mass calibration using a second sprayer with a reference solution containing purine (*m/z* 121.0509) and hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine (HP-921) (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, at

m/z 922.009798). The instrument was operated in the 4-GHz high resolution mode, providing a typical resolution of *ca.* 10000 at m/z 118 and *ca.* 18000 at m/z 1522. The full-scan data were recorded with Agilent Mass Hunter Data Acquisition software (version B.04.00) and processed with Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.04.00).

Results and discussion

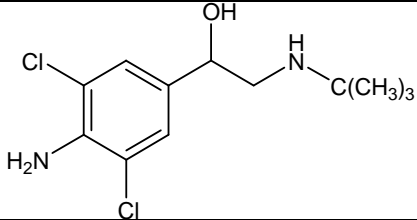
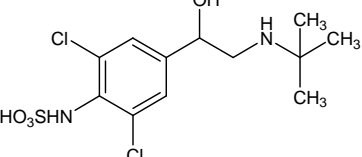
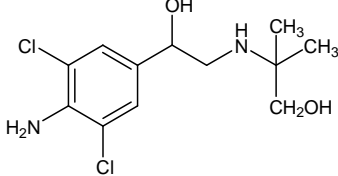
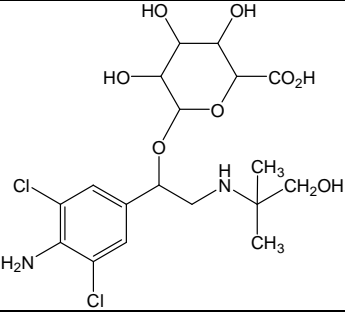
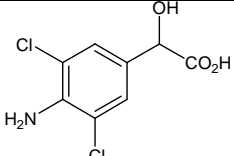
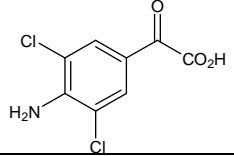
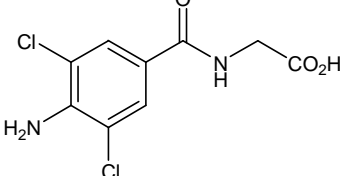
Identification of clenbuterol and its urinary metabolites. The identification and confirmation of clenbuterol was performed by LC-TOFMS accurate mass measurements and retention time matching with a standard (8.1 min). For confirmation purposes and the subsequent metabolite search based on diagnostic ions, in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation of clenbuterol was performed, being the main fragment ions detected with m/z 259.0763 (neutral loss of water), m/z 203.0137, m/z 168.0449, m/z 132.0682 and m/z 104.0499. Five clenbuterol urinary metabolites were identified in the rat urine samples (**CL-M1- CL-M5**) as summarized in **Table 1**.

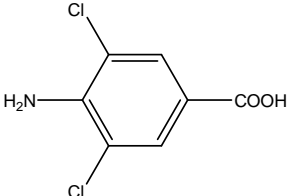
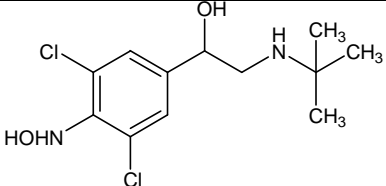
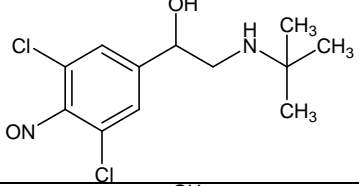
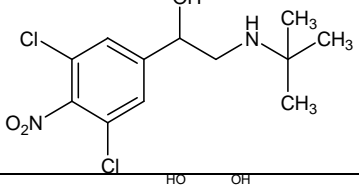
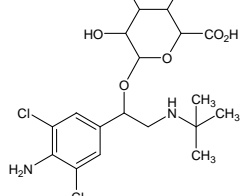
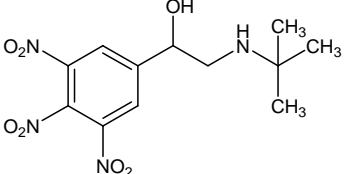
Table 1. Summary of clenbuterol, salbutamol and terbutaline identified metabolites in rat urine with liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry

Metabolite	Retention time (min)	Experimental <i>m/z</i>	Theoretical <i>m/z</i>	Error		Proposed formula (M)
				mDa	ppm	
Clenbuterol	8.14	277.0874	277.0869	0.50	1.80	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O
CL-M1	2.26	357.0436	357.0437	-0.08	-0.22	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₄ S
CL-M2	3.76	293.0817	293.0818	-0.11	-0.38	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₂
CL-M3	7.75	453.1184	453.1190	-0.59	-1.29	C ₁₈ H ₂₆ Cl ₂ N ₂ O ₇
CL-M4	8.84	262.9983	262.9985	-0.21	-0.66	C ₉ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₃
CL-M5	9.64	307.0612	307.0611	0.09	0.08	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₃
Salbutamol	1.65	240.1598	240.1594	0.40	1.67	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃
S-M1	1.34	416.1918	416.1915	0.33	0.70	C ₁₉ H ₂₉ NO ₉
S-M2	1.40	446.2020	446.2021	-0.12	-0.16	C ₂₀ H ₃₁ NO ₁₀
S-M3	1.46	256.1537	256.1543	-0.65	-2.49	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄
S-M4	3.67	254.1388	254.1387	0.14	0.46	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄
Terbutaline	1.72	226.1440	226.1438	0.20	0.88	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃
T-M1	1.34	402.1755	402.1759	-0.39	-0.89	C ₁₈ H ₂₇ NO ₉
T-M2	3.12	242.1390	242.1387	0.32	1.31	C ₁₂ H ₁₉ NO ₄

An extracted ion chromatogram (EIC) and the mass spectrum of each metabolite detected are shown in **Figure 1**. These include the conjugation with sulphate (**CL-M1**) and glucuronic acid (**CL-M3**), the hydroxylation of clenbuterol (**CL-M2**), the oxidative cleavage of the side chain (**CL-M4**), and the oxidation of the amine group in the aromatic ring (**CL-M5**). All these findings are consistent with previous literature available on urinary metabolism of clenbuterol ^[23-28] (**Table 2**).

Table 2. Literature overview of clenbuterol metabolites

CL-Metabolite	Specimen	Structure	Refs
Clenbuterol	-		[23-28]
Clenbuterol-4-aminosulfonic acid (SCL)	Urine [23]		[23],[28]
4-amino-3,5-dichloro-α-(2-hydroxy-1,1-dimethyl)ethyl aminomethyl benzyl alcohol (OH-CL)	-		[23]
4-amino-3,5-dichloro-α-(2-hydroxy-1,1-dimethyl)ethyl aminomethyl benzyl alcohol (OH-CL Glucuronide)	Urine (rat [23])		[23]
4-amino-3,5-dichloro-romandelic acid (ADMA)	Urine (Calf [28])		[23],[28]
2-(4-amino-3,5-dichlorophenyl)-2-oxoacetic acid (ADOA)	Tissue (calf [28])		[23],[28]
4-amino-3,5-dichlorohippuric acid (ADHA)	Urine (Calf [28])		[23],[28]

4-amino-3,5-dichloro benzoic acid (ADBA)	Liver microsomal fractions ^[24] ; rat and cattle urine ^[28]		[24],[28]
N-Hydroxylamine clenbuterol (N-OH-CL)	Urine (calf ^[28])		[23],[24],[27],[28]
4-nitroso clenbuterol (NO-CL)	Urine (rat ^[23])		[23],[24]
4-nitro clenbuterol (NO ₂ -CL)	Urine (rat ^[23])		[23],[24],[26]
Clenbuterol Glucuronide	Dog and bovine liver microsomes ^[25]		[25]
Trinitro Clenbuterol	Saliva ^[26]		[26]

All compounds were identified by accurate mass measurements of the intact molecules and diagnostic fragment ions when available. None of these compounds were detected in blank urine samples obtained from the same animals before the treatment with clenbuterol.

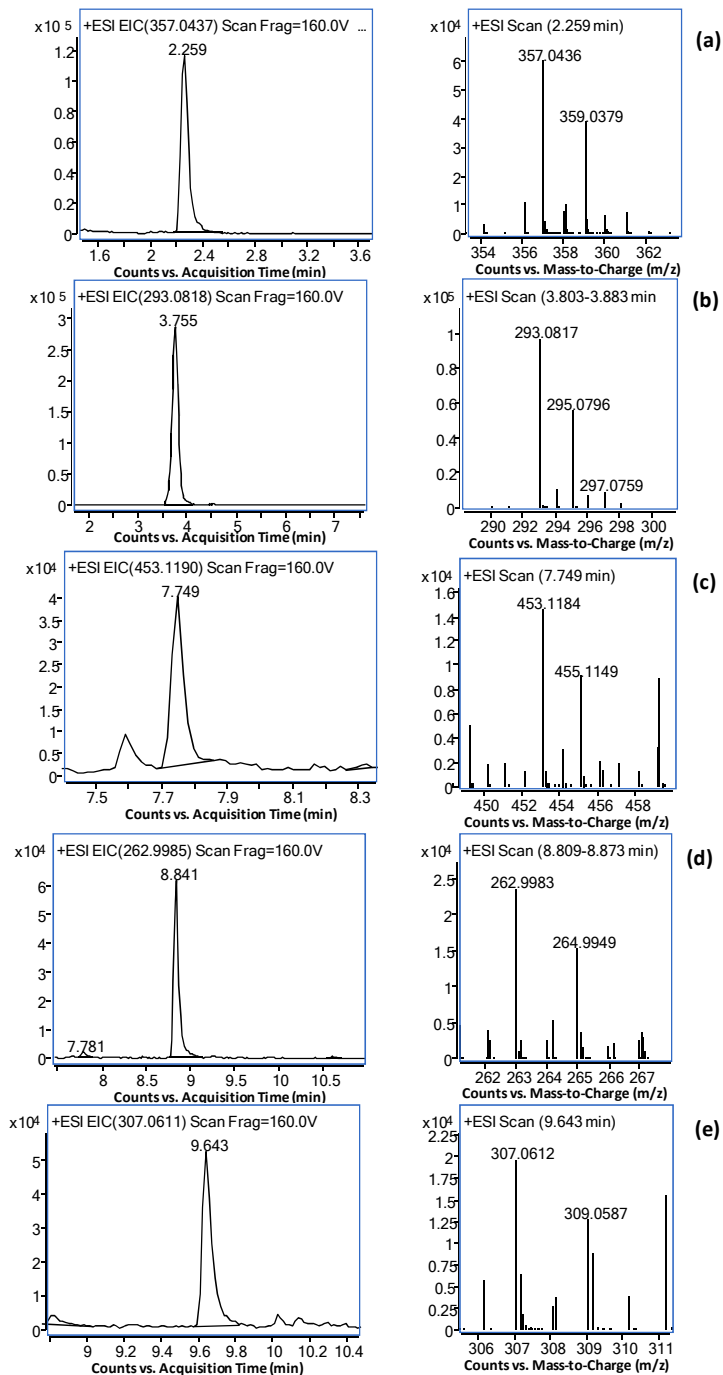


Figure 1. Extracted ion chromatograms (EICs) (left) and accurate mass spectra (right) of clenbuterol identified metabolites: (a) CL-M1; (b) CL-M2; (c) CL-M3; (d) CL-M4; and (e) CL-M5.

Metabolite **CL-M1** was identified as the sulphate conjugate of clenbuterol. This biotransformation has an associated mass shift of +79.9568 Da, corresponding to the addition of SO₃ generating a derivative with m/z 357.0437, detected at 2.26 minutes. According to the literature^[23], the conjugation with the sulphate group is produced in the primary amine group attached to the aromatic ring, as shown in the structure proposed in **Figure 2**. In-source CID fragmentation experiments for this metabolite showed characteristic fragments at m/z 277.0869 (loss of sulphate), 259.0764, 203.0139, 168.0449, 132.0682 and 104.0499, all of them being common to clenbuterol in-source diagnostic fragments.

The addition of a hydroxyl group to clenbuterol yielded **CL-M2** (RT 3.76 min) with m/z 293.0818 corresponding to a mass shift of +15.9949 Da (addition of oxygen). Besides the neutral loss of water (m/z 277), in-source CID fragmentation of CL-M2 showed fragment ions at m/z 219.0086 (C₈H₉N₂OCl₂, from subsequent loss of tert-butyl moiety) and m/z 202.0059 (odd electron fragment ion with C₈H₈N₂Cl₂, corresponding to the radical loss of remaining hydroxyl group), both ions consistent with electrospray data reported by Zalko *et al*^[27]. According to literature^[23,24], this hydroxylation typically occurs in terminal primary amine group attached to the aromatic ring as shown in **Figure 2**. Conjugation with glucuronic acid generated metabolite **CL-M3**, with m/z 453.119 and retention time 7.75 min, with an associated mass shift of +176.0321Da (addition of C₆H₈O₆). Glucuronide conjugated typically are formed in the hydroxyl group^[25], as shown in **Figure 2**. **CL-M4** (m/z 262.9985, RT 8.84 min) [4-amino-3,5-dichlorohippuric acid (ADHA)] is formed via a complex mechanism of oxidative cleavage of the side chain of clenbuterol molecule described in literature^[23,28] (**Figure 2**) which implies three intermediates ((4-amino-3,5- dichlororomandelic acid (ADMA), 4-amino-3,5-dichlororo benzoic acid (ADBA) and 2-(4-amino-3,5-dichlororophenyl)-2-oxoacetic acid (ADOA)) that were not detected, probably not retained on the solid-phase extraction cartridge. Fragmentation experiments were not possible to be

performed due to the relatively low abundance of this metabolite. Finally, the oxidation of **CL-M2** (hydroxylamine clenbuterol) led to **CL-M5**, the nitro-derivative of clenbuterol, with m/z 307.0611, detected at 9.64 min. Structure of this metabolite was previously reported ^[23,24,26].

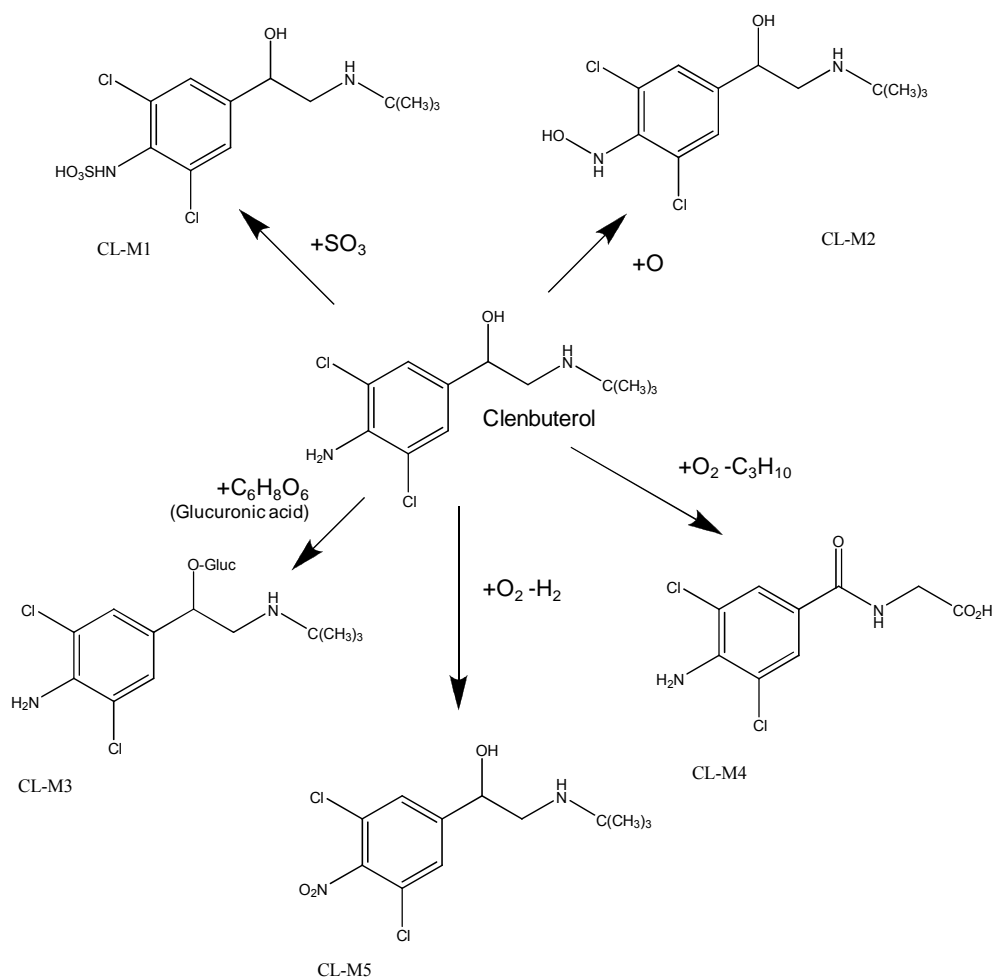


Figure 2. Proposed structures of clenbuterol identified metabolites

According to the relative intensities of the metabolites detected, the more abundant metabolite was CL-M2 (hydroxylamine-clenbuterol) followed by CL-M1 (sulphate conjugate). Therefore, in the case of clenbuterol, the metabolites

detected were not particularly relevant in terms of relative intensity compared to the parent drugs. However, in some cases (CL-M1, CL-M3 and CL-M5) their presence over the course of time after administration is longer than the parent drug as shown in **Figure 3**. These three metabolites were detected in urine after 48 h, this being interesting from the point of view of the retrospectivity of the test.

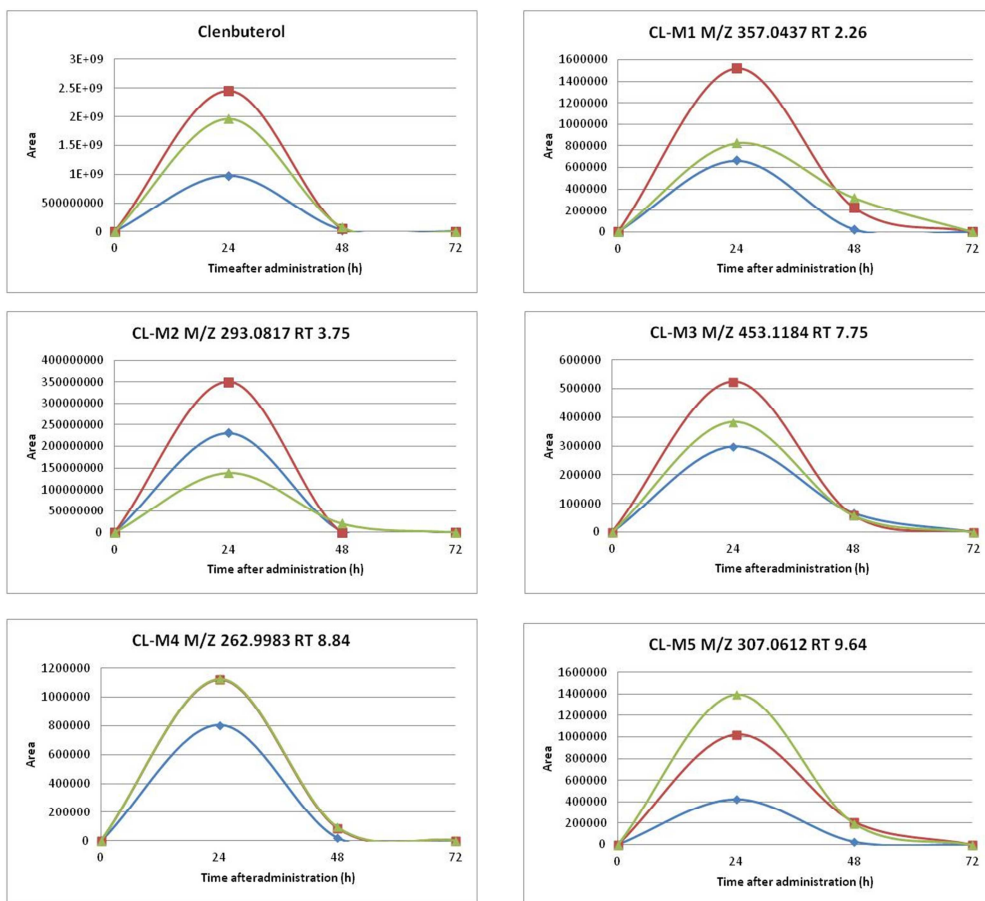


Figure 3. Retrospectivity of clenbuterol and its metabolites (3 different experiments)

Identification of salbutamol and its urinary metabolites. In addition to the parent drug detected at 1.65 min (confirmed with standards), four salbutamol urinary metabolites were identified in the rat urine samples (**S-M1** – **S-M4**). They are summarized in **Table 1** and their EICs with the corresponding mass spectra shown in **Figure 4**. These include the conjugation glucuronic acid (**S-M1**), the combined addition of a methoxyl group and glucuronic acid (**S-M2**), the addition of a hydroxyl group (**S-M3**), and the formation of an unknown metabolite (**S-M4**) whose tentative structure is shown in **Figure 5**. All compounds were identified by accurate mass measurements of the intact molecules and diagnostic fragment ions and none of these compounds were detected in blank urine samples obtained from the same animals before the treatment with salbutamol.

The conjugation of salbutamol with glucuronic acid yielded metabolite **S-M1**, with m/z 416.1915 (mass shift of 176.0321 Da, addition of $C_6H_8O_6$) detected at of 1.34 min. The conjugation with glucuronic acid and sulphate were the only previously reported in literature metabolites ^[29-36], but sulphate conjugate was not detected in these experiments. Perhaps, due to the sample preparation used based on solid-phase extraction we could not recover such a polar species, which were not properly retained on the cartridge with the conditions used. Glucuronide formation was almost negligible, this being consistent with recent data provided in human urine ^[10]. Because of this low abundance, in-source CID fragmentation experiments conducted were not useful to elucidate the position of the glucuronide moiety.

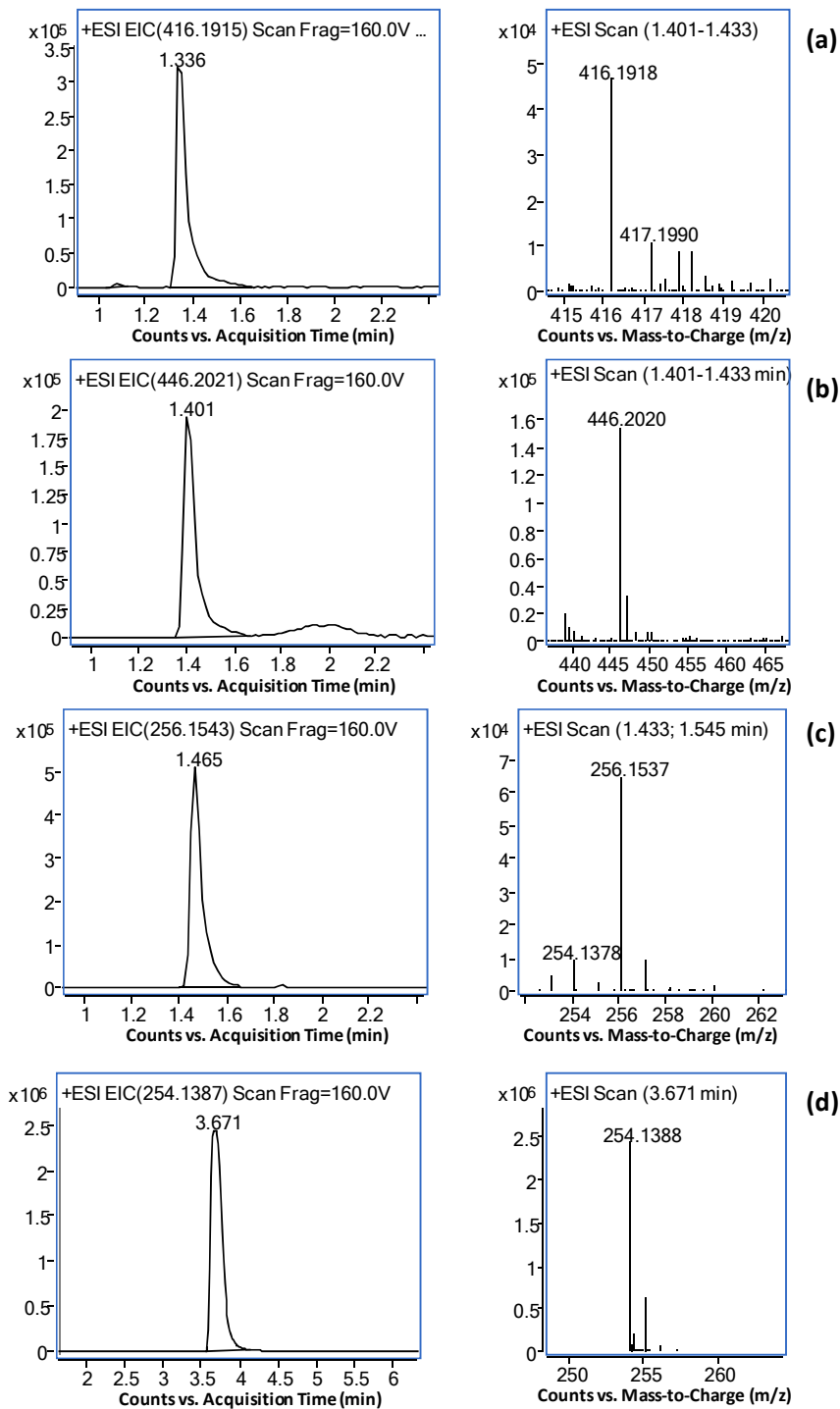


Figure 4. EICs (left) and accurate mass spectra (right) of salbutamol identified metabolites: (a) S-M1; (b) S-M2; (c) S-M3; and (d) S-M4

S-M2 is formed via the addition of a methoxyl group to the salbutamol glucuronide, with m/z 446.2021 and retention time of 1.40 min. This metabolite has an associated mass shift of +206.0427 (addition of $C_7H_{10}O_7$). In source CID fragmentation experiments generated as characteristic fragment ions with m/z 432.1864 (which is consistent with the loss of the methyl group of the methoxyl), 196.0968 and 178.0800.

The hydroxylation of salbutamol led to **S-M3** (m/z 256.1543, RT 1.46 min). This biotransformation has an associated mass shift of +15.9949 corresponding to the addition of an oxygen atom. In-source CID fragmentation of this metabolite showed characteristic fragment ions with m/z 238.1838, 182.0812 and 164.0706.

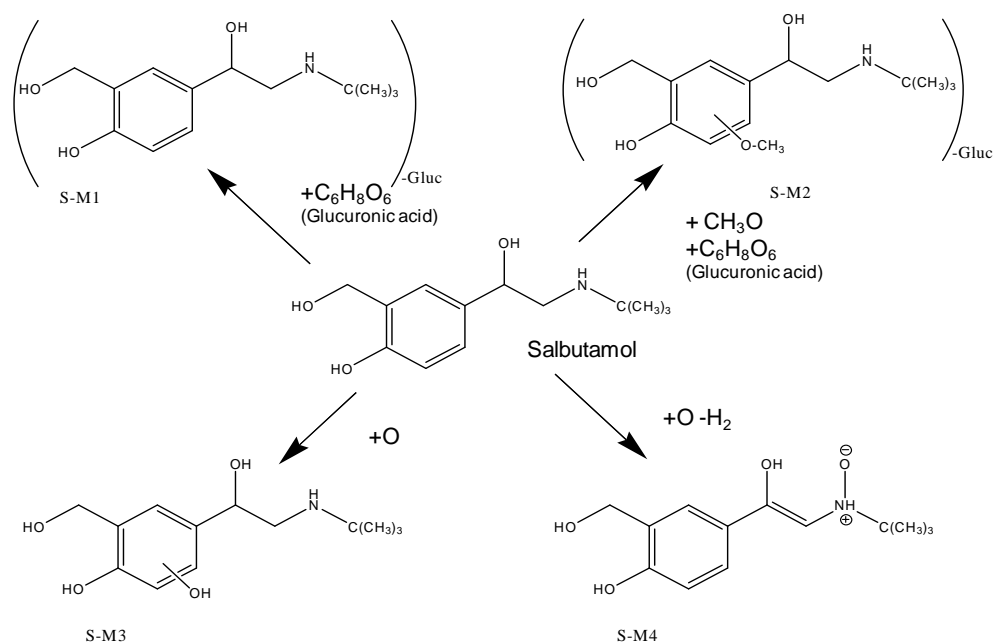


Figure 5. Proposed structures of salbutamol identified metabolites

Finally, a new metabolite **S-M4** was identified with m/z 254.1387 and retention time 3.67 min. This metabolite has a molecular formula of $C_{13}H_{20}NO_4$. This

metabolite is formed via a dehydrogenation and an addition of an oxygen atom. The addition of oxygen could be produced via hydroxylation or the formation of the N-oxide, in this case, the retention time of the derivative is higher than the retention time of salbutamol which is consistent with the formation of the N-oxide. Moreover, in-source CID fragmentation of this compound yielded fragment ions with m/z 180.0655 (which is consistent with the loss of the *tert*-butyl group and the O in the N-oxide), 162.0554 and 105.0452, the proposed structure of this compound together with the rest of metabolites are shown in **Figure 5**. Therefore, up to three non-previously described metabolites were detected (hydroxyl-salbutamol, methoxy-salbutamol glucuronide conjugate and n-oxide salbutamol). From the point of view of the retrospectivity, the identified metabolites were detected only after 24 h like the parent drugs as shown in **Figure 6**.

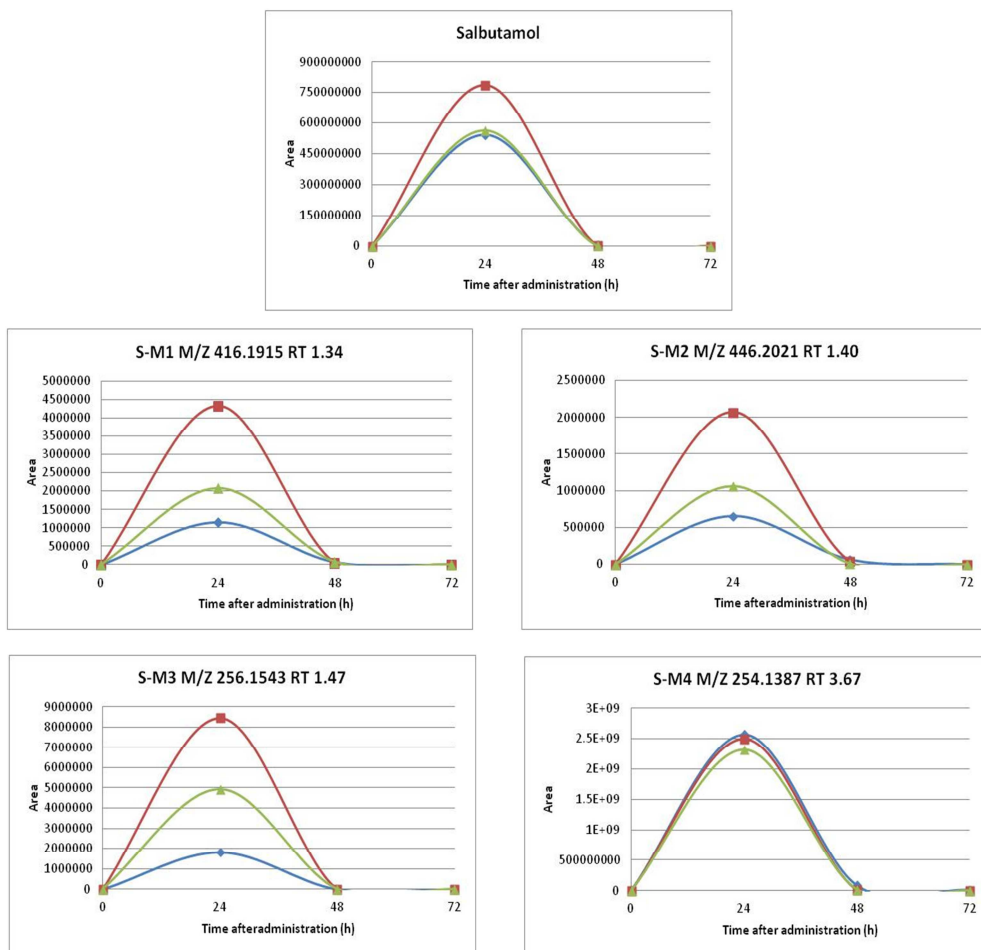


Figure 6. Retrospectivity of salbutamol and its metabolites (3 different experiments)

Identification of terbutaline and its urinary metabolites. In-source CID fragmentation of terbutaline (confirmed with standards and detected at 1.72 min) yielded fragment ions with m/z 152.0706 and 107.0491, consistent with previous literature^[11]. Terbutaline urinary metabolites identified in the rat urine samples (**T-M1** and **T-M2**) are summarized in **Table 1**, and the EICs chromatograms and the mass spectra shown in **Figure 7**

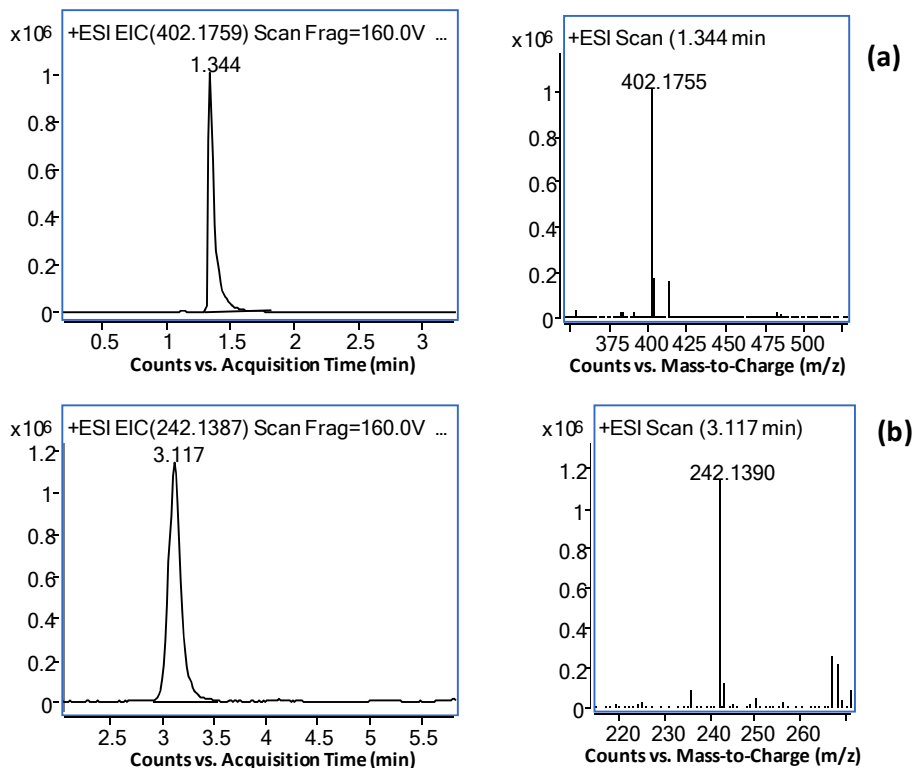


Figure 7. EICs (left) and accurate mass spectra (right) of terbutaline identified metabolites: (a) T-M1; and (b) T-M2

Terbutaline metabolites previously described in literature were only the sulphate and glucuronic conjugates [37-40]. Similarly to the case of salbutamol, because of the additional polarity of salbutamol and terbutaline compared to clenbuterol, terbutaline sulphate conjugate could not be detected probably because it was not recovered from the solid-phase extraction step. This highlights the importance of the choice of sample preparation approach for this type of studies. Not only detection step matters but also the preparation of the interrogated extract is essential.

In contrast, terbutaline glucuronide was identified (**T-M1**), with m/z 402.1759 (corresponding to a mass shift of 176.0321 Da due to the addition of glucuronic

acid) at 1.34 min. In-source CID fragmentation experiments generated a characteristic fragment ion with m/z 328.1027, which was not useful for the elucidation of the glucuronide moiety position. The addition of O yielded metabolite **T-M2** with m/z 242.1387 (corresponding to a mass shift of +15.9949 Da), detected at 3.12 min. The addition of an oxygen atom can be attributed to the formation of a hydroxyl-derivative or the N-oxide. In this case, the formation of terbutaline N-oxide is more likely due to the retention time of the metabolite is higher than the retention time of terbutaline, which is consistent with the formation of the N-oxide instead of the hydroxylation which is usually accompanied with a shift towards shorter retention times. The structures of terbutaline identified metabolites are shown in **Figure 8**.

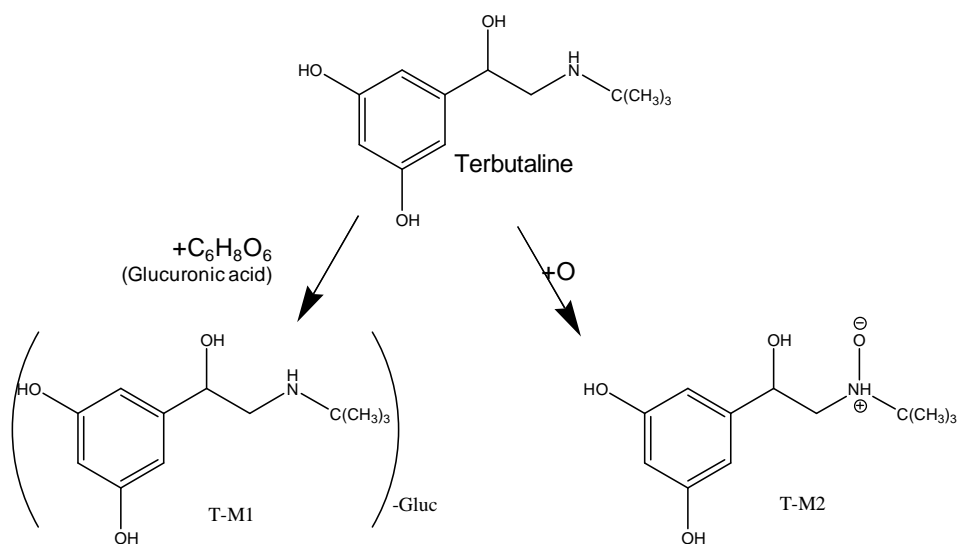


Figure 8. Proposed structures of terbutaline identified metabolites

In this case, as shown in **Figure 9**, neither the relative abundance with respect to the parent drug nor the permanency in urine makes these metabolites of particular interest from the point of view of sport drug testing.

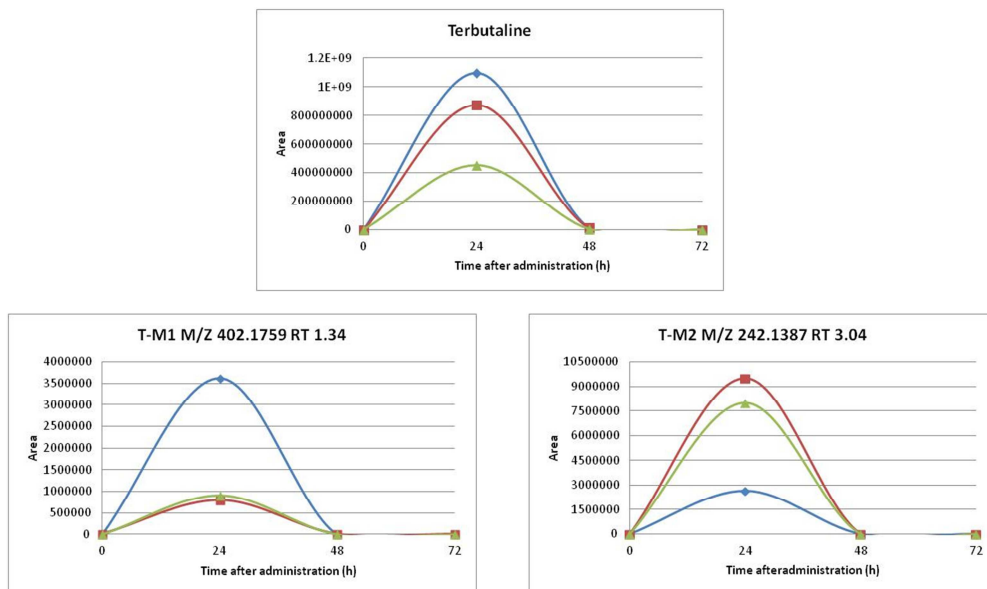


Figure 9. Retrospectivity of terbutaline and its metabolites (3 different experiments)

Concluding Remarks

The excretion of urinary metabolites of clenbuterol, terbutaline and salbutamol has been studied using LC-TOFMS. The strategy applied for the identification of metabolites was based on LC-TOFMS analyses using pseudo MS/MS experiments from in-source CID fragmentation (without precursor ion isolation) to search for common diagnostic fragment ions from the parent drugs, together with the search of typical biotransformations with their corresponding accurate mass shifts. The approach was satisfactory applied, achieving the identification of 11 metabolites (5 from clenbuterol, 4 from salbutamol and 3 from terbutaline), 4 of them not previously reported in urine. Novel metabolites detected in rat urine included N-oxide-salbutamol, hydroxy-salbutamol, methoxy-salbutamol glucuronide and terbutaline N-oxide. In the case of selected clenbuterol metabolites (CL-M1, CL-M3 and CL-M5), they lasted longer than the parent drug, which may be interesting for testing purposes.

Referencias

- 1 J. Cartaña, T. Segues, M. Yebras, N.J. Rothwell, M.J. Stock. Anabolic effects of clenbuterol after long-term treatment and withdrawal in the rat, *Metabolism* 43 (1994) 1086-1092.
- 2 World Anti-Doping Agency (WADA). The 2012 prohibited list.
- 3 D. Zhang, Y. Teng, K. Chen, S. Liu, C. Wei, B. Wang, G. Yuan, R. Zhang, X. Liu, R. Guo. Determination of salbutamol in human plasma and urine using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1176–1182.
- 4 R. Ventura, R. Ramírez, N. Monfort, J. Segura. Ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for direct quantification of salbutamol in urine samples in doping control, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 886-890.
- 5 The **2013 WADA List of Prohibited Substances and Methods**. Available at: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2013/WADA-Prohibited-List-2013-EN.pdf (Last accessed, January 2013)
- 6 J.F. Caruso, J.F. Signorile, A.C. Perry, B. Leblanc, R. Williams, M. Clark, M.M. Bamman. The effects of albuterol and isokinetic exercise on the quadriceps muscle group, *Med. Sci. Sports Exerc.* 27 (1995) 1471-1476.
- 7 W.H. Meeuwisse, D.C. McKenzie, S.R. Hopkins, J.D. Road. The effect of salbutamol on performance in elite nonasthmatic athletes, *Med. Sci. Sports Exerc.* 24 (1992) 1161-1166.
- 8 E.A. Eaton, U.K. Walle, H.M. Wilson, G. Aberg, T. Walle. Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41 (1996) 201-206.
- 9 D.J. Morgan, J.D. Paull, B.H. Richmond, E. Wilson-Evered, S.P. Ziccone. Pharmacokinetics of intravenous and oral salbutamol and its sulphate conjugate, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22 (1986) 587-593.

- 10 U. Mareck, S. Guddat, A. Schwenke, S. Beuck, H. Geyer, U. Flenker, J. Elers, V. Backer, M. Thevis, W. Achanzer. Determination of salbutamol and salbutamol glucuronide in human urine by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Drug Test. Analysis* 3 (2011) 820-827.
- 11 A.K. Orlovius, S. Guddat, M.K. Parr, M. Kohler, M. Gutschow, M. Thevis, W. Schänzer. Terbutaline sulfoconjugate: characterization and urinary excretion monitored by LC/ESI-MS/MS, *Drug Test. Analysis* 1 (2009) 568-575.
- 12 G.M. Pacifici, M. Eligi, L. Giuliani. (+) and (-) terbutaline are sulphated at a higher rate in human intestine than in liver, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45 (1993) 483-487.
- 13 D.S. Davies, C.F. George, E. Blackwell, M.E. Conolly, C.T. Dollery. Metabolism of terbutaline in man and dog, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1 (1974) 129-136
- 14 WADA Technical Document – TD2010IDCR. Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry. Available at:
http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf
- 15 M. Thevis, *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing. Characterization of Prohibited Substances and doping control analytical assays.* Wiley, 2010.
- 16 G. Brambilla, S. di Bez, D. Pietraforte, M. Minetti, L. Campanella, A. Loizzo. Ex vivo formulation of gastric metabolites of clenbuterol preliminary characteristics of their chemical structure, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 426-431.
- 17 M. Thevis, W. Schänzer. Mass spectrometry in sports drug testing: structure characterization and analytical assays, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 79-107.
- 18 O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, F.T. Delbeke. Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 657-671.

- 19 M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer. Current role of LC-MS(/MS) in doping control, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 405-420.
- 20 B. Prasad, A. Garg, H. Takwani, S. Singh. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 360-387.
- 21 F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, J.-P. Antignac, B. LeBizec. F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, J.-P. Antignac, B. LeBizec. *Analyst* 134 (2009) 1637-1646, *Analyst* 134 (2009) 1637-1646.
- 22 Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (RD 1201/2005) (October 2005)
- 23 D. Zalko, L. Debrauwer, G. Bories, J. Tulliez. Metabolism of clenbuterol in rats, *Drug. Metab. Dispos.* 26 (1998) 891-899.
- 24 D. Zalko, E. Perdu-Duran, L. Debrauwer, M.P. Bec-Ferte, J. Tulliez. Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes and slices, *Drug. Metab. Dispos.* 26 (1998) 28-35.
- 25 A. Alonen, M. Gartman, O. Aitio, M. Finel, J. Yli-Kauhala, R. Kostianen. Synthesis, structure characterization and enzyme screening of clenbuterol glucuronides, *Eur. J. Pharm. Sciences* 37 (2009) 581-587.
- 26 G. Brambilla, S. di Bez, D. Pietraforte, M. Minetti, L. Campanella, A. Loizzo. Ex vivo formulation of gastric metabolites of clenbuterol preliminary characteristics of their chemical structure, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 426-431.
- 27 D. Zalko, L. Debrauwer, G. Bories, J. Tulliez. Evidence for a new and major metabolic pathway clenbuterol involving in vivo formation of an N-hydroxyarylamine., *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 197-204.
- 28 D. Zalko, G. Bories, J. Tulliez. Metabolic fate of clenbuterol in calves, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1998) 1935-1943.

- 29 L.E. Martin, J.C. Hobson, J.A. Page, C. Harrison. Metabolic studies of Salbutamol-3H: a new bronchodilator, in rat, rabbit, dog and man, *Euro. J. Pharmacol.* 14 (1971) 183-199.
- 30 R. Bergés, J. Segura, X. De la Torre, R. Ventura. Analytical methodology for enantiomers of salbutamol in human urine for application in doping control, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 173-184.
- 31 C. Lin, Y. Li, J. McGlotten, J.B. Morton, S. Symchowicz. Isolation and identification of the major metabolite of albuterol in human urine, *Drug. Metab. Dispos.* 5 (1977) 234-238.
- 32 D.J. Morgan, J.D. Paull, H.R. Barbara, E. Wilson-Evered. Pharmacokinetics of intravenous and oral salbutamol and its sulphate conjugate, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22 (1986) 587-593.
- 33 G. Maier, C. Rubino, R. Hsu, T. Grasela, R.A. Baumgartner. Population pharmacokinetics of (R)-albuterol and (S)-albuterol in pediatric patients aged 4-11 years with asthma, *Pulm. Pharmacol.* 20 (2007) 534-542.
- 34 T. Srichana, R. Suedee, N. Tanmanee, D. Muanpanarai, C. Marriot. The correlation of urinary levels of albuterol and its metabolites isomers following inhalation from a dry powder inhaler and in vitro particle size characterisation, *Pulm. Pharmacol.* 20 (2007) 36-45.
- 35 K.B. Joyce, A.E. Jones, R.J. Scott, R.A. Biddlecombe, S. Pleasance. Determination of the enantiomers of salbutamol and its 4-O-sulphate metabolites in biological matrices by chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 1899-1910.
- 36 E.A. Eaton, U.K. Walle, H.M. Wilson, G. Aberg. Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 41 (1996) 201-206.
- 37 D.S. Davies, C.F. George, E. Blackwell, M.E. Conolly, C.T. Dollery, Metabolism of terbutaline in man and dog, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1 (1974) 129-136.
- 38 H.T. Nilsson, K. Persson, K. Tegnér. The metabolism of terbutaline in man, *Xenobiotica* 2 (1972) 363-373.

- 39 H.T. Nilsson, C.G.A. Persson, K. Persson, K. Tegnér, A. Ryrfeldt. The metabolism of terbutaline in dog and rat, *Xenobiotica* 3 (1973) 615-623.
- 40 T. Walle, K. Walle, Stereoselective sulphate conjugation of racemic terbutaline by human liver cytos, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30 (1990) 127-133.

Research article

Biomedical
Chromatography

Received: 13 August 2014,

Revised: 9 October 2014,

Accepted: 18 November 2014

Published online in Wiley Online Library ⁴

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.3411

Development and thermodynamic evaluation of novel lipid raft stationary phase chromatography for screening potential antitumor agents

Shanshan Tong^{at}, Chaonan Sun^{at}, Xia Cao^{at}, Qianfeng Zheng^a,
Huiyun Zhang^a, Caleb Kesse Firempong^a, Yingshu Feng^a, Yan Yang^a,
Jiangnan Yu^{a,b} and Ximing Xu^{a*}

ABSTRACT: Novel lipid raft stationary phase chromatography (LRSC), with lipid rafts that contain abundant tropomyosin-related tyrosine kinase A receptors immobilized on the stationary phase, was developed for a high-throughput screening of potentially active antitumor agents. Lestaurtinib was used as a model compound to determine the operational parameters of the LRSC. Of all the factors considered, the particle size of column packing, the column temperature and the flow rate were of immense importance in determining the performance of the established LRSC system. In order to profoundly comprehend the binding interaction between the model drug and the receptors on the column, thermodynamic studies were employed. The results revealed that the interaction was spontaneous and exothermic, a typical enthalpy-driven process. Additionally, the primary forces were hydrogen bonding and van der Waals forces. In evaluating the applicability of the method, active extracts from *Albizia* Cortex were screened out using the LRSC system under the optimized conditions. The bioactive components were successfully confirmed by the MTT assay. In conclusion, it could be said that the LRSC is a good model for screening potential antitumor agents because of its viability, rapid response and scalable features. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Keywords: *Albizia* Cortex; antitumor activity; lipid raft stationary phase chromatography; optimum chromatographic condition; thermodynamic studies

III.5. Identificación de metabolitos de tamoxifén en orina mediante UHPLC-TOFMS

III.5.1. Resumen

El tamoxifén (TMX) es un fármaco antagonista estrogénico o "anti-estrógeno", indicado para el tratamiento de cáncer mamario. El TMX trabaja en contra de los efectos del estrógeno, los cuales se ha demostrado, promueven el crecimiento de las células de cáncer del seno. Además, está incluido dentro de la lista de sustancias prohibidas de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA). En este capítulo, se ha llevado a cabo un estudio cualitativo del metabolismo del TMX, a través del tratamiento y administración de una única dosis de TMX en ratas y posterior análisis de la orina durante las siguientes 72 horas. Para el estudio del metabolismo se empleó cromatografía de líquidos de alta resolución empleando columnas de 1.8 micras de tamaño de partícula y elevada presión de trabajo (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (UHPLC-TOFMS) con fuente de ionización de *electrospray* en modo de ionización positivo. Se empleó como estrategia el uso de cromatogramas de ion extraído de especies derivadas teniendo en cuenta los cambios de masa exacta originados por modificaciones (biotransformaciones) del metabolismo de fase I y fase II típico de los fármacos. Aparte del método UHPLC-TOFMS, se llevaron a cabo estudios de fragmentación empleando un Q-TOF y aislamiento de ion precursor con la finalidad de aportar información estructural complementaria. Previamente al análisis, se llevo a cabo una etapa de tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida con cartuchos poliméricos PLEXA.

El estudio permitió la identificación cualitativa de 38 metabolitos del TMX en orina. Comparando los resultados con la bibliografía, se han identificado

nuevos isómeros de modificaciones metabólicas ya descritas, así como metabolitos completamente nuevos que se incluyen por primera vez en este estudio. Entre los metabolitos identificados se incluyeron: (a) hidroxilación (m/z 388.2271); (b) dihidroxilación o hidroxilación y N-oxidación (m/z 404.2220); (c) formación de epóxidos (m/z 386.2114); (d) hidroxilación y N-desmetilación (m/z 374.2115); (e) adición de metoxilo e hidroxilación (m/z 418.2377); (f) reducción (hidrogenación del TMX (m/z 370.2165) y (g) derivado N-desmetilado de la especie reducida de TMX (m/z 356.2009), siendo los dos últimos tipos de metabolitos descritos por primera vez en orina en el presente estudio, lo que confirma la utilidad del método UHPLC-TOFMS para este tipo de aplicación.

Por el contrario, los experimentos CID MS/MS con Q-TOF no permitieron obtener una información pormenorizada de los diferentes isómeros de los metabolitos detectados, debido a escasa fragmentación proporcionada por este tipo de compuestos. Los espectros MS/MS sólo permitieron la alteración del residuo de amina secundaria de la molécula original a través del ión diagnóstico m/z 72.

Introduction

Tamoxifen (TMX) is a non-steroidal estrogen antagonist drug therapeutically used for the treatment of breast cancer. TMX is considered a pro-drug since its metabolites have more activity than itself. Amongst them, 4-hydroxy-tamoxifen shows from 30 to 100 times more activity than TMX ^[1-4] and its secondary metabolite 4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen (endoxifen) also exhibits a similar activity ^[5-7]. From the point of view of sport drug testing, TMX is a drug included in the list of banned substances of the World Anti Doping Agency (WADA) (group S4, hormone antagonist and modulators) ^[8,9]. Its use is prohibited at all the times (in and out of competition).

Different authors have reported on the metabolism of TMX as recently reviewed by Beijnen and co-workers ^[10]. While TMX metabolism studies have been reported extensively in serum ^[11-14], plasma ^[5,15-19], and other specimens such as tumoral tissues ^[20,21], in vitro preparations using liver microsomes ^[22-24] or synthetic gastric acids ^[25], the urinary excretion of TMX metabolites has not been studied in such detail ^[26-30].

In the past, the identification of TMX metabolites was performed by liquid chromatography with fluorescence detection after photochemical reaction ^[5,16,17,26]. Nowadays, although gas chromatography ^[15,20] and capillary electrophoresis ^[23] coupled with mass spectrometric detection has been used for TMX metabolite identification, the more convenient technique employed for TMX metabolite identification is by far liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) with different mass analyzers such as triple quadrupole (HPLC-MS/MS) ^[13,14,19,22,24,28,29], time-of-flight mass spectrometers (HPLC-TOFMS) ^[25,27,29,30], or orbital ion trap high-resolution mass spectrometry instruments ^[31]. The main mass spectrometric strategies used so far for the identification of TMX metabolites in urine include accurate

mass measurements using HRMS ^[27,30,31] or the collection of data from different (up to five) scanning modes using HPLC-MS/MS: precursor ion scan of m/z 166, 152 and 129 and neutral loss of m/z 72 and 58) ^[28].

High resolving power mass spectrometers, such as time-of-flight analyzers or orbitraps offer full-scan high sensitivity and high mass accuracy, enabling the screening for a theoretically unlimited number of compounds and the analysis of unknown or non-target compounds, what makes these instruments a powerful tool for the identification of drug metabolites, particularly when combined with ultra-high pressure liquid chromatography separations ^[32]. In this work, a study of TMX urinary metabolites in rats after a single dose administration by using solid-phase extraction followed by ultra-high-pressure liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOFMS) has been reported. Up to 38 TMX metabolites were detected, some of the modifications detected not previously reported in urine in the literature.

Experimental

Chemicals and reagents. Tamoxifen (TMX) was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). HPLC grade acetonitrile and methanol were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Formic acid was obtained from Fluka (Madrid, Spain). A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used throughout the study to obtain HPLC water during the analyses.

Sample collection. The study was performed on adult male Wistar rats (250–300 g) (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). The animals (n=5) were weighed and placed in individual metabolic cages 48 hours prior to treatment to acclimatize them to this environment, maintained under

standard conditions of light and temperature and allowed *ad libitum* access to food and water to the end of the experiment. All the procedures followed the Spanish guidelines on the use of animals for research (RD 1201/2005) and were approved by the institutional Committee for Ethics. The rats were treated with TMX (10 mg Kg⁻¹ body weight, intraperitoneal). After drug administration, urine was daily collected in graduate cylinders for 3 days (24, 48 and 72 h). The urine collected 24 h prior to treatment was used as control.

Sample treatment. 2 mL of urine were diluted with 2 mL of formic acid/formate pH 2.6 buffer and then was passed through a polymeric Bond Elut PLEXA™ SPE cartridge from Agilent Technologies (Santa Clara, CA) and then washed with 2 mL of H₂O/Methanol (95:5). The cartridges were previously conditioned with 4 mL of methanol/acetonitrile (1:1) and 4 mL of MilliQ water. The analytes were eluted from the cartridge with 4 mL of methanol/acetonitrile (1:1) and the extract was evaporated to near dryness with a TurboVap LV (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA) and then taken up with 0.5 mL of the initial mobile phase to achieve a preconcentration factor of 4:1. Finally, the extract was filtered through a 0.22 µm PTFE syringe filter and transferred to a 2-mL glass vial prior to LC-MS analyses. Different recovery studies were conducted with TMX at different concentration levels to secure that the compounds was quantitatively recovered. The recovery rates obtained approached 100 % regardless the type of polymeric cartridge (Oasis HLB or PLEXA) used. Considering the similar structure and chromatographic properties of potential TMX phase-I metabolites, it is likely to expect a similar behavior.

UHPLC-TOFMS method. The chromatographic separation was performed using a UHPLC system (Agilent Infinity 1290, Agilent Technologies, Santa

Clara, CA) equipped with a reversed-phase Zorbax High definition (RRHD) Eclipse Plus-C₁₈ analytical column of 2.1 x 50 mm and 1.8 μm particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Mobile phases A and B were water with 0.1% formic acid and acetonitrile. The chromatographic method held the initial mobile phase composition (10% B) constant for 5 min, followed by a linear gradient to 40% B up to 28 min, to 100 % then up to 33 min and finally kept for 2 min at 100%. The flow rate used was 0.5 mL min⁻¹ and 20 μL of the urine extract were injected in each run.

This UHPLC system was connected to a time-of-flight mass spectrometer (Agilent 6220 accurate mass TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)) equipped with an electrospray interface operating in positive ion mode, using the following operation parameters: capillary voltage, 3500V; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas flow rate, 9.0 L min⁻¹; gas temperature, 325°C; skimmer voltage, 65V; octapole 1 rf, 250V; fragmentor voltage 175V and 230 V (in-source CID fragmentation); acquisition time: 1.5 spectra/second. LC-MS accurate mass spectra were recorded across the range of *m/z* 50-1000. The instrument performed an internal calibration using the reference mixture provided by the manufacturer over the acquired mass range, using a second sprayer with a reference solution containing the masses purine (*m/z* 121.0509) and hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine (HP-921) (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, *m/z* 922.0098). The instrument was operated in the 4GHz-high resolution mode. The resolution displayed by the instrument with these conditions was *ca.*14000 at *m/z* 400. The full scan data were recorded with Agilent Mass Hunter Data Acquisition software (version B.04.00) and processed with Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.04.00). The analytical performance of the method for TMX determination in urine was satisfactory with a limit of quantitation below 0.15 ng mL⁻¹.

Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) mass spectrometry

Additional MS/MS product ion scan experiments were performed using a hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Agilent 6530 Series Accurate Mass QTOF MS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Ions were generated using an ESI Jet Stream ion source. Operation conditions were as follows: superheated nitrogen sheath gas temperature 400°C at a flow rate of 12 L min⁻¹; capillary voltage: 4 kV; nebulizer pressure: 60 psig; drying gas: 5 L min⁻¹; gas temperature: 250°C; skimmer voltage: 65 V; octapole RF peak: 750 V; fragmentor voltage: 90 V. The *m/z* axis was calibrated using the reference mixture provided by the manufacturer over the range *m/z* 40–950. A second sprayer with a reference solution was used as continuous calibration in positive mode using the masses of purine (*m/z* 121.0509) and HP-921 (*m/z* 922.0098). The instrument was operated in the 4GHz high-resolution mode (resolution: *ca.* 21700±500 at *m/z* 922.0098). MS/MS spectra were acquired over the range *m/z* 40–950 at a scan rate of 0.2 s per spectrum. MS/MS spectra were obtained using variable collision energy (20-30 eV) for each compound. Data was acquired and processed with Agilent MassHunter Acquisition and Qualitative Analysis Software (version B.04.00).

Systematic data mining method for the identification of TMX metabolites

The examination for potential TMX metabolites was based on the search of a set of typical biotransformations, which have an associated change in the molecular formula and its corresponding mass shift with respect to the parent drug (TMX). The search for these potential metabolites in a sample is automatically performed with database searching tool application of Agilent MassHunter software (*Find by Formula* software application). A predefined

set of possible biotransformations was considered ^[33]. A csv. format excel file was created with its possible biotransformation including the molecular formula of the metabolites, its accurate mass and as name the corresponding biotransformation. This file is implemented in the automated accurate-mass extraction tool of the software. When a positive result was found, its extracted ion chromatogram and mass spectrum are automatically obtained from the raw data [33]. Additionally, other metabolites previously reported in literature were included in this database in order to confirm their presence or absence. The results of the automated search were a list of possible compounds whose extracted ion chromatograms (EICs) and mass spectrum were collected. For confirmation purposes, fragmentation studies of the metabolites were performed. The fragmentation of metabolites was studied using in-source CID fragmentation capability of UHPLC-TOFMS method, and additional dedicated MS/MS fragmentation in a collision cell with a MS/MS instrument (HPLC-QTOF-MS/MS).

Results and discussion

Identification of TMX urinary metabolites

TMX urinary metabolites identified in the rat urine samples (using $n = 5$) (**M1-M38**) are summarized in **Table 1**. These include: a) the addition of one oxygen atom (mainly due to hydroxylation or N-oxidation (**M1-M6**)); b) the addition of two oxygen atoms, including the mono and di-hydroxylated derivatives or alternatives such as hydroxylation and N-oxidation (**M7-M18**); c) hydroxylation and N-desmethylation (amine moiety) (**M19-M20**); d) combined methoxylation and hydroxylation (**M21-M24**); e) dehydrogenation of the parent molecule (**M25-M28**) and (f) of their N-desmethylated derivative (**M29-M32**), and epoxide formation or combined hydroxylation and dehydrogenation (**M33-M38**). As shown in **Table 1**, all compounds were identified in most of the specimens studied by accurate mass measurements of the intact molecules (below 3 ppm relative mass error). Additional diagnostic fragment ions (when available) were used either with in-source CID or with CID-MS/MS (Q-TOF) for confirmatory purposes. None of these compounds were detected in blank urine samples obtained from the same animals before the treatment with TMX. **Figure 1** included TMX structure along with tentative structures proposed for the metabolites detected in the study.

Table 1. Tamoxifen (TMX) metabolites identified in rat urine (n = 5) after a single dose administration

#	Formula Change	RT	Elemental Composition	m/z Theoretical M+H] ⁺	RT rat 1	m/z rat 1	RT rat 2	m/z rat 2	RT rat 3	m/z rat 3	RT rat 4	m/z rat 4	RT rat 5	m/z rat 5	Average Error (ppm)	RT RSD (%)
M1	+O	19.0	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.2271	18.97	388.2259	18.96	388.2284	18.96	388.2246	18.97	388.2273	18.99	388.2247	3.9	0.064
M2	+O	19.1	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.2271	19.13	388.2270	19.09	388.2268	19.08	388.2260	19.11	388.2262	19.15	388.2259	1.86	0.150
M3	+O	20.7	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.2271	20.73	388.2265	20.71	388.2280	20.67	388.2278	20.75	388.2278	20.75	388.2296	2.77	0.161
M4	+O	23.4	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.2271	23.39	388.2252	23.38	388.2252	23.32	388.2268	23.39	388.2262	23.39	388.2257	3.30	0.130
M5	+O	23.6	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.2271	23.67	388.2279	23.66	388.2269	23.60	388.2272	23.67	388.2265	23.68	388.2266	1.12	0.135
M6	+O	25.0	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388.2271	24.98	388.2261	24.97	388.2259	24.94	388.2283	24.95	388.2276	24.95	388.2276	2.26	0.066
M7	+O ₂	12.9	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	12.91	404.2203	12.94	404.2223	12.91	404.2211	12.94	404.2226	12.97	404.2202	2.62	0.194
M8	+O ₂	16.2	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	16.24	404.2225	16.24	404.2230	16.25	404.2207	16.25	404.2238	16.24	404.2251	3.77	0.033
M9	+O ₂	17.0	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	17.04	404.2206	17.02	404.2206	17.02	404.2198	17.01	404.2195	ND	ND	4.68	0.074
M10	+O ₂	17.2	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	17.20	404.2221	17.17	404.2216	17.17	404.2216	17.20	404.2189	ND	ND	2.43	0.100
M11	+O ₂	17.8	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	17.77	404.2224	17.74	404.2210	17.71	404.2208	17.78	404.2207	ND	ND	2.43	0.178
M12	+O ₂	18.4	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	18.41	404.2226	18.41	404.2216	18.35	404.2211	18.38	404.2213	18.41	404.2210	1.80	0.145
M13	+O ₂	19.7	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	19.72	404.2220	19.70	404.2228	19.67	404.2216	19.66	404.2227	19.68	404.2238	1.82	0.122
M14	+O ₂	20.0	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	20.01	404.2220	20.00	404.2231	19.94	404.2220	20.00	404.2221	20.00	404.2217	0.75	0.141
M15	+O ₂	20.1	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	20.10	404.2223	20.10	404.2213	20.06	404.2222	20.10	404.2236	20.09	404.2251	2.88	0.086
M16	+O ₂	20.3	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	20.26	404.2215	20.25	404.2215	20.20	404.2206	20.22	404.2212	20.26	404.2218	1.73	0.132
M17	+O ₂	21.2	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	21.19	404.2223	21.18	404.2218	21.12	404.2219	21.15	404.2231	21.18	404.2206	1.54	0.136
M18	+O ₂	21.7	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404.2220	21.74	404.2211	21.73	404.2220	21.66	404.2207	21.70	404.2207	21.72	404.2204	2.56	0.146
M19	+O - CH ₂	18.8	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	374.2114	18.73	374.2110	18.71	374.2114	18.65	374.2114	18.72	374.2116	18.75	374.2109	0.67	0.201

M20	+O - CH ₂	20.5	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	374.2114	20.39	374.2112	20.40	374.2112	20.35	374.2117	20.40	374.2104	20.41	374.2110	1.20	0.115
M21	+ CH ₂ O ₂	18.1	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	418.2377	18.18	418.2379	18.13	418.2368	18.10	418.2360	18.16	418.2369	18.15	418.2388	2.23	0.168
M22	+ CH ₂ O ₂	21.5	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	418.2377	21.53	418.2383	21.52	418.2369	21.48	418.2362	21.48	418.2398	ND	ND	2.98	0.122
M23	+ CH ₂ O ₂	24.8	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	418.2377	24.81	418.2370	24.78	418.2370	24.77	418.2369	24.79	418.2362	24.78	418.2369	2.07	0.0611
M24	+ CH ₂ O ₂	25.1	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	418.2377	25.10	418.2372	25.09	418.2371	25.06	418.2366	25.10	418.2376	25.10	418.2366	1.52	0.0690
M25	-H ₂	26.2	C ₂₆ H ₂₇ NO	370.2165	26.17	370.2173	26.16	370.2161	26.15	370.2157	26.15	370.2158	26.16	370.2167	1.58	0.032
M26	-H ₂	26.7	C ₂₆ H ₂₇ NO	370.2165	26.66	370.2161	ND	ND	26.63	370.2157	26.65	370.2163	26.68	370.2168	1.20	0.078
M27	-H ₂	26.8	C ₂₆ H ₂₇ NO	370.2165	26.81	370.2159	26.81	370.2163	26.80	370.2165	26.80	370.2155	26.81	370.2161	1.28	0.020
M28	-H ₂	27.5	C ₂₆ H ₂₇ NO	370.2165	27.54	370.2160	27.54	370.2159	27.51	370.2156	27.52	370.2149	27.52	370.2164	2.11	0.049
M29	-CH ₄	23.4	C ₂₅ H ₂₅ NO	356.2009	23.40	356.2016	23.38	356.2018	23.30	356.2005	23.38	356.2006	23.38	356.1990	2.34	0.167
M30	-CH ₄	25.7	C ₂₅ H ₂₅ NO	356.2009	25.72	356.2009	25.72	356.2004	25.70	356.2004	25.70	356.2007	25.71	356.2008	0.71	0.043
M31	-CH ₄	26.4	C ₂₅ H ₂₅ NO	356.2009	26.37	356.2007	26.36	356.2007	26.33	356.2002	26.36	356.2003	26.35	356.2004	1.20	0.0575
M32	-CH ₄	27.1	C ₂₅ H ₂₅ NO	356.2009	27.08	356.2012	27.08	356.2009	ND	ND	ND	ND	27.10	356.2014	0.75	0.043
M33	+ O -H ₂	20.6	C ₂₆ H ₂₇ NO ₂	386.2114	20.57	386.2106	20.55	386.2095	20.50	386.2101	20.55	386.2116	20.59	386.2105	2.71	0.163
M34	+ O -H ₂	20.9	C ₂₆ H ₂₇ NO ₂	386.2114	20.92	386.2111	20.92	386.2096	20.85	386.2119	20.90	386.2112	20.94	386.2116	1.58	0.164
M35	+ O -H ₂	21.7	C ₂₆ H ₂₇ NO ₂	386.2114	21.67	386.2109	21.66	386.2098	21.64	386.2118	21.62	386.2112	21.66	386.2112	1.58	0.092
M36	+ O -H ₂	23.7	C ₂₆ H ₂₇ NO ₂	386.2114	23.66	386.2100	23.67	386.2112	23.63	386.2111	23.66	386.2105	23.70	386.2101	2.26	0.106
M37	+ O -H ₂	27.2	C ₂₆ H ₂₇ NO ₂	386.2114	27.17	386.2105	27.16	386.2108	27.15	386.2110	27.18	386.2107	27.16	386.2116	1.53	0.042
M38	+ O -H ₂	27.8	C ₂₆ H ₂₇ NO ₂	386.2114	27.77	386.2107	27.75	386.2106	27.75	386.2119	27.73	386.2119	27.77	386.2119	1.52	0.06

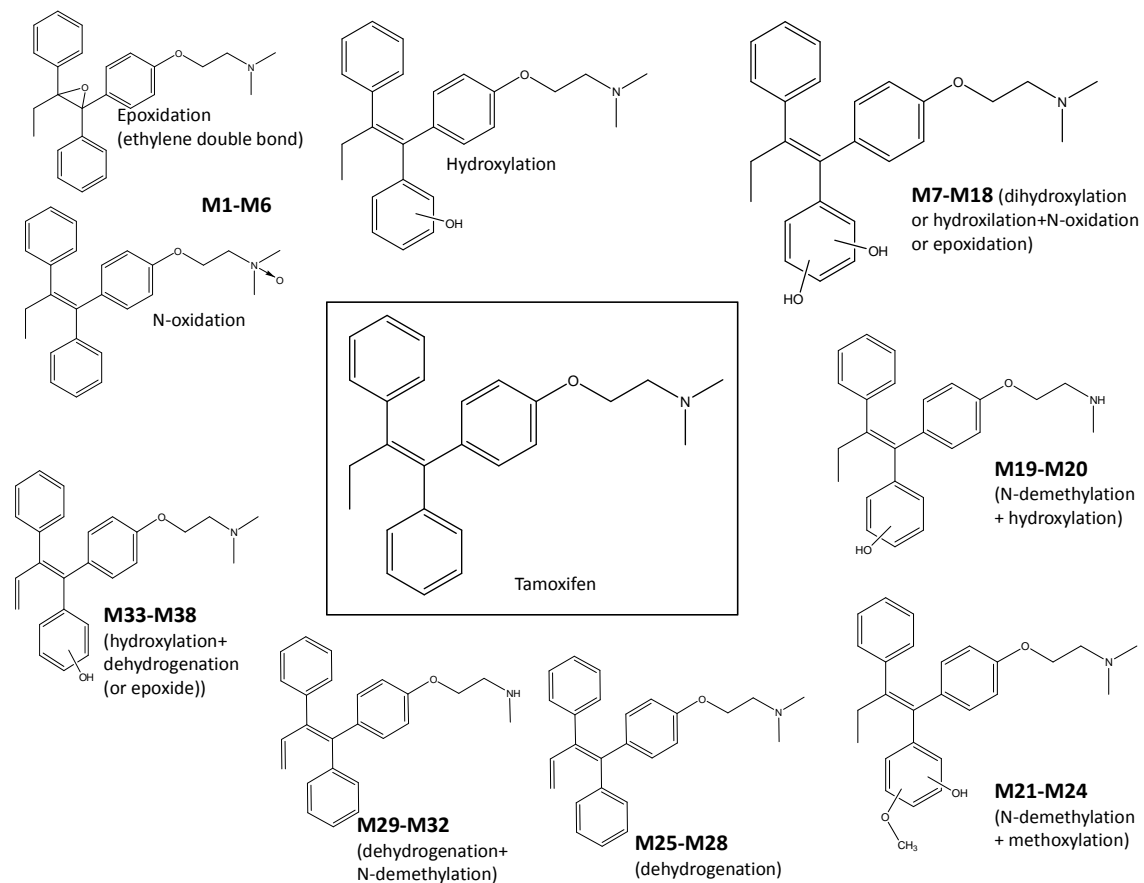


Figure 1. Structure of TMX and tentative structures proposed for the different TMX metabolites detected in the study. For details, see text

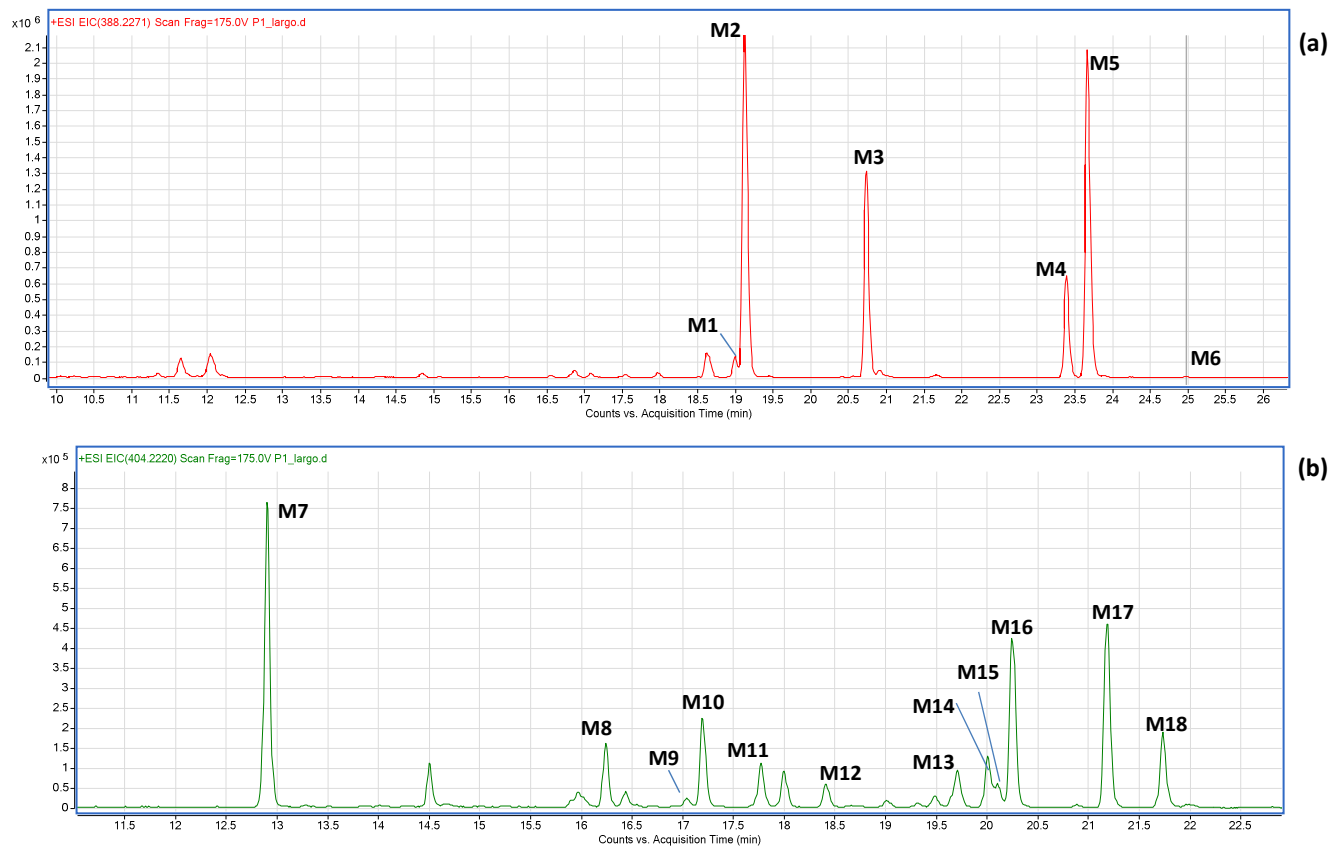


Figure 2. UHPLC-TOFMS analysis of TMX urinary metabolites: (a) extracted ion chromatogram of m/z 388.2271 (metabolites M1-M6); (b) extracted ion chromatogram of m/z 404.2220 (metabolites M7-M18)

TMX metabolites with M_w 387

Metabolites **M1-M6** corresponds to the addition of an oxygen atom, with a mass shift of +15.9949 Da (theoretical m/z 388.2271) and retention times 19.0, 19.1, 20.7, 23.4, 23.6 and 25.0 minutes (min) respectively. The extracted ion chromatogram is represented in **Figure 2(a)**. According to the literature ^[19,22,24], the addition of an oxygen atom can lead to different compounds from hydroxylation at different sites, epoxidation (ethylene double bond) or N-oxidation. Due to the inherent stability of TMX ^[30] and its derivatives, thanks to the conjugated π -electron system including three benzyl groups and a double bond, poor fragmentation was obtained, with only one diagnostic ion with m/z 72.0808 from the amine moiety ($C_4H_{10}N$). Neither the use of UHPLC-TOFMS nor HPLC-Q-TOF-MS/MS enabled the elucidation of the hydroxylation position based on fragmentation of the different metabolites. According to the literature available ^[19,22,24], the reported metabolites in urine are either hydroxylated metabolites or tamoxifen N-oxide. Considering the literature and previous studies [29-32] and the relative abundance of these compounds in urine, the identification and elution order of these compounds is tentatively as follows: β -hydroxytamoxifen (M2), α -hydroxytamoxifen (M3), 4-hydroxytamoxifen (M4), 4'-hydroxytamoxifen (M5). Primary standards would be required for further confirmation. Fragmentation experiments of these metabolites using HPLC-Q-TOF-MS/MS revealed that TMX characteristic fragment ion (m/z 72) corresponding to the amine moiety is preserved in metabolites **M1-M5**, indicating that hydroxylation occurs either on the aromatic rings or the ethylene moiety. In the case of **M6**, neither fragment ion with m/z 72 nor fragment ion with m/z 88 ($C_4H_{10}NO$) from the N-oxidation of the amine group ^[31], could be detected partly due to its relative low intensity (**Figure 2**).

TMX metabolites with M_w 403

The addition of two oxygen atoms yielded up to 12 metabolites **M7-M18**, with m/z 404.2220 corresponding to a mass shift of +31.9898 Da. The retention times of the detected metabolites were 12.9, 16.2, 17.0, 17.2, 17.8, 18.4, 19.7, 20.0, 20.1, 20.3, 21.2 and 21.7 min respectively. The extracted ion chromatogram is shown in **Figure 2(b)**. The addition of two oxygen atoms may occur by different ways, combining mono or di-hydroxylation and/or N-oxidation. Fragmentation experiments accomplished with more abundant metabolites showed the characteristic TMX fragment with m/z 72.0808, which indicated that the addition of both oxygen atoms was placed in the aromatic skeleton, instead of the side chain. Considering conformational isomers, hydroxylation positions (in both the alkene moiety or the three benzyl groups at different sites) and even N-oxidation, there are many different possibilities that are consistent with the formation of such large amount of isomers. Different studies have reported on the presence of these isomers in both plasma and urine ^[10, 25-31]. Similarly to mono-hydroxylated metabolites, it was not possible to find characteristic fragmentation to figure out the different isomers and their detailed structure.

TMX metabolites with M_w 373

Metabolites **M19** and **M20** (m/z 374.2114) are hydroxylated derivatives of N-desmethyl TMX. The retention times of these metabolites were 18.8 and 20.5 min respectively. According to the literature these metabolites previously described in literature are N-desmethyl-4-hydroxy-tamoxifen and N-desmethyl-3-hydroxy-tamoxifen ^[22,25,34,35]. Their extracted ion chromatogram is displayed in **Figure 2(a)**. Neither of these two compounds exhibited the characteristic fragment with m/z 72.0808, which is consistent with the N-desmethylation.

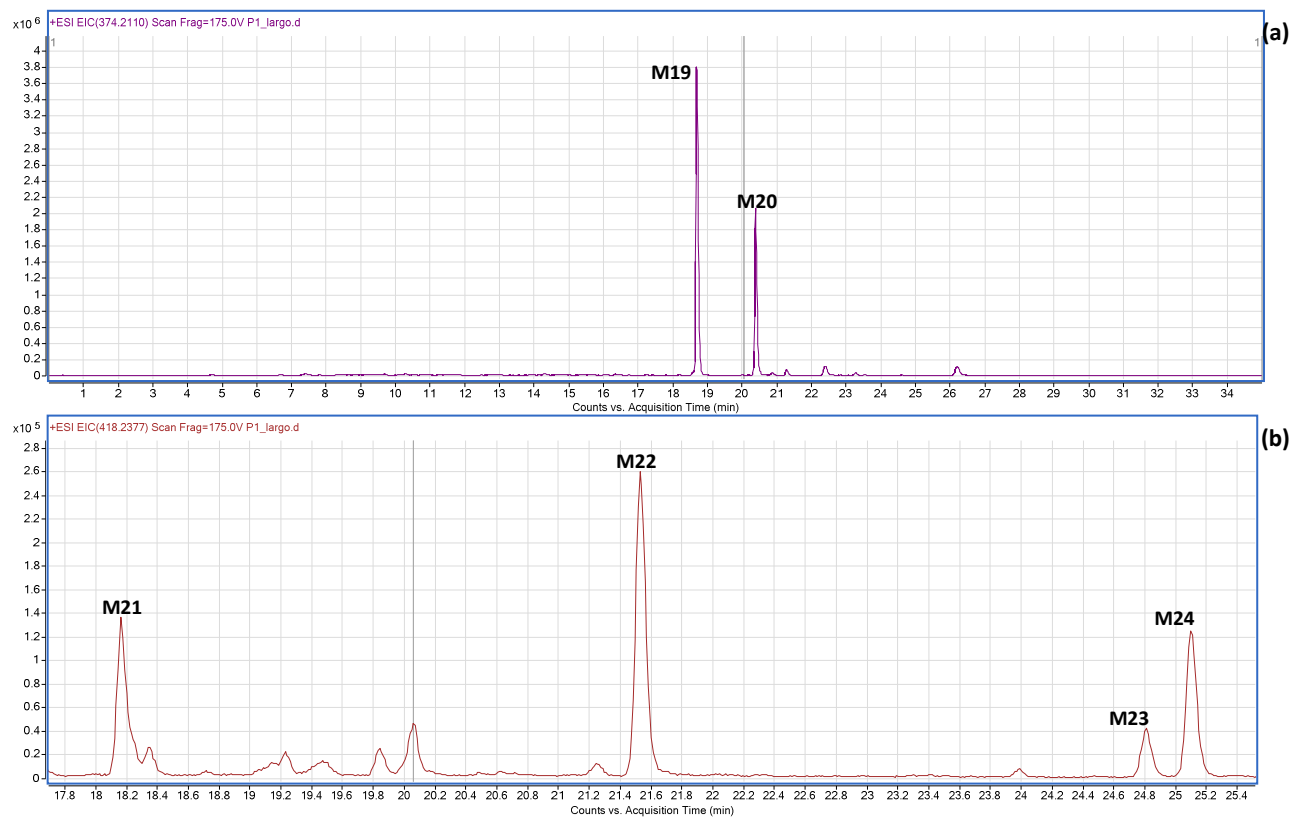


Figure 3. UHPLC-TOFMS analysis of TMX urinary metabolites: (a) extracted ion chromatogram of m/z 374.2110 (metabolites M19-M20); (b) extracted ion chromatogram of m/z 418.2377 (metabolites M21-M24)

TMX metabolites with M_w 417

The combined hydroxylation and methoxylation led to metabolites **M21-M24** (m/z 418.2377), corresponding to the addition of CH_2O_2 , with a mass shift of +45.9596Da. The retention time of these metabolites was 18.1, 21.5, 24.8 and 25.1 min respectively. Their extracted ion chromatogram is represented in **Figure 3(b)**. Only two of these metabolites have been previously reported in the literature: 3-hydroxy-4-methoxy-TMX (reported in urine) and 4-hydroxy-3-methoxy-TMX [10,25,36]. Q-TOF-MS/MS CID fragmentation experiments performed showed again the presence of TMX diagnostic fragment with m/z 72.0808 and the absence of neutral loss of water, thus confirming that both methoxylation and hydroxylation must be placed in the aromatic skeleton. In this study, the existence of additional position isomers has been revealed.

Novel saturated TMX metabolites with M_w 369 and 355

Metabolites **M25-M28** were identified as dehydrogenated derivatives of TMX. The loss of H_2 led to 4 isomers with m/z 370.2165 (a mass shift of -2.0157Da) detected at 26.2, 26.7, 26.8 and 27.5 min respectively (**Figure 4(a)**). These metabolites have never been previously reported in the literature. Their N-desmethylated derivatives yielded metabolites **M29-M32**, with m/z 356.2009, corresponding to a loss of CH_4 (mass shift of 16.0313Da), detected at 23.4, 25.7, 26.4 and 27.1 min respectively. Their extracted ion chromatograms are shown in **Figure 4 (b)**.

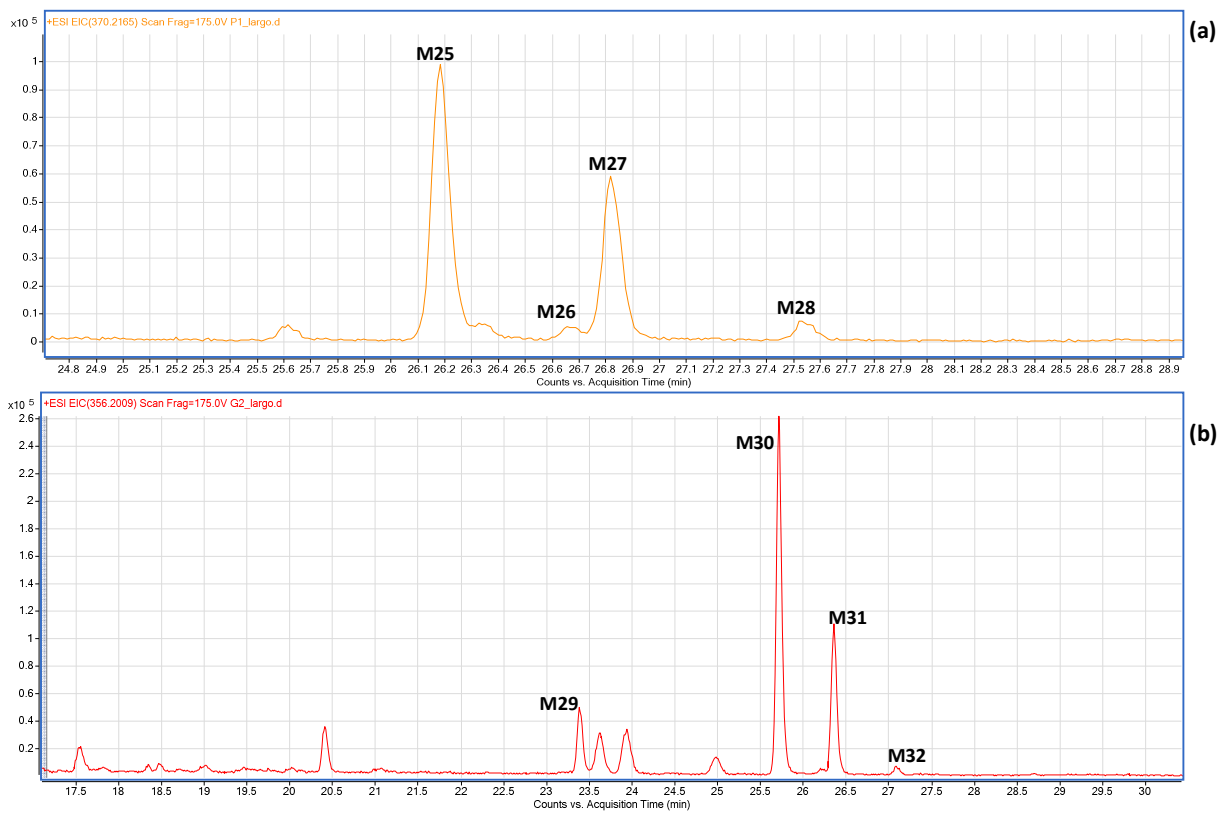


Figure 4. UHPLC-TOFMS analysis of TMX urinary metabolites: (a) extracted ion chromatogram of m/z 370.2165 (metabolites M25-M28); (b) extracted ion chromatogram of m/z 356.2009 (metabolites M29-M32)

Tentative structures of these metabolites (**M25-M28** and **M29-M32**) are shown in **Figure 5**. Q-TOF-MS/MS fragmentation provided diagnostic ions with m/z 72 and 58 respectively from the intact TMX amine moiety and its N-desmethyl derivative. These modifications (TMX saturated derivative and its N-desmethylated derivative) are consistent with a recent report where these compounds (**M29-M32**) were identified in human plasma using LC-HRMS^[31].

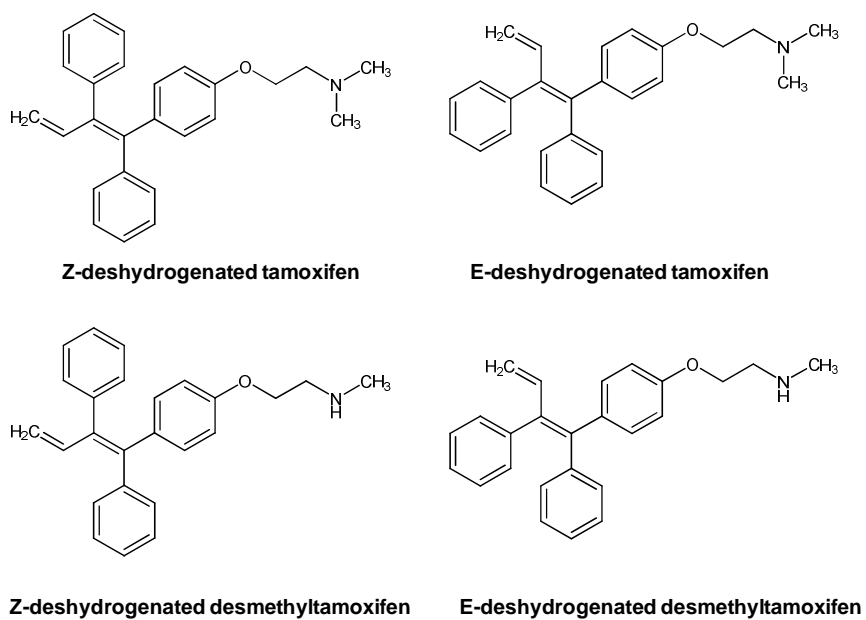


Figure 5. Tentative structures for TMX metabolites **M25-M28** and **M29-M32**

3.1.6. *TMX metabolites with M_w 385*

Finally, TMX metabolites **M33-M38** were identified with m/z 386.2114 (**Figure 6**). According to previous literature ^[10,14,30,31], these metabolites results from epoxidation, involving the addition of an oxygen atom in any of the double bonds of TMX parent drug (+O-H₂) except the ethylene double bond. Alternatively, the same modification could be attributed to hydroxylation and dehydrogenation (desaturated hydroxy-tamoxifen) ^[31]. This set of metabolites has been described in the literature, although not yet in urine ^[10,31]. In summary, despite the use of CID MS/MS experiments with precursor ion isolation at different collision energy conditions, poor fragmentation was observed for TMX and its metabolites, which caused serious difficulties to elucidate the structure of the metabolites detected. These results are consistent with previous data from a TMX derivative (toremifene), which only exhibited m/z 72 and m/z 58 as products ions, being the rest of fragment ions detected during MS/MS experiments with poor abundances ^[37].

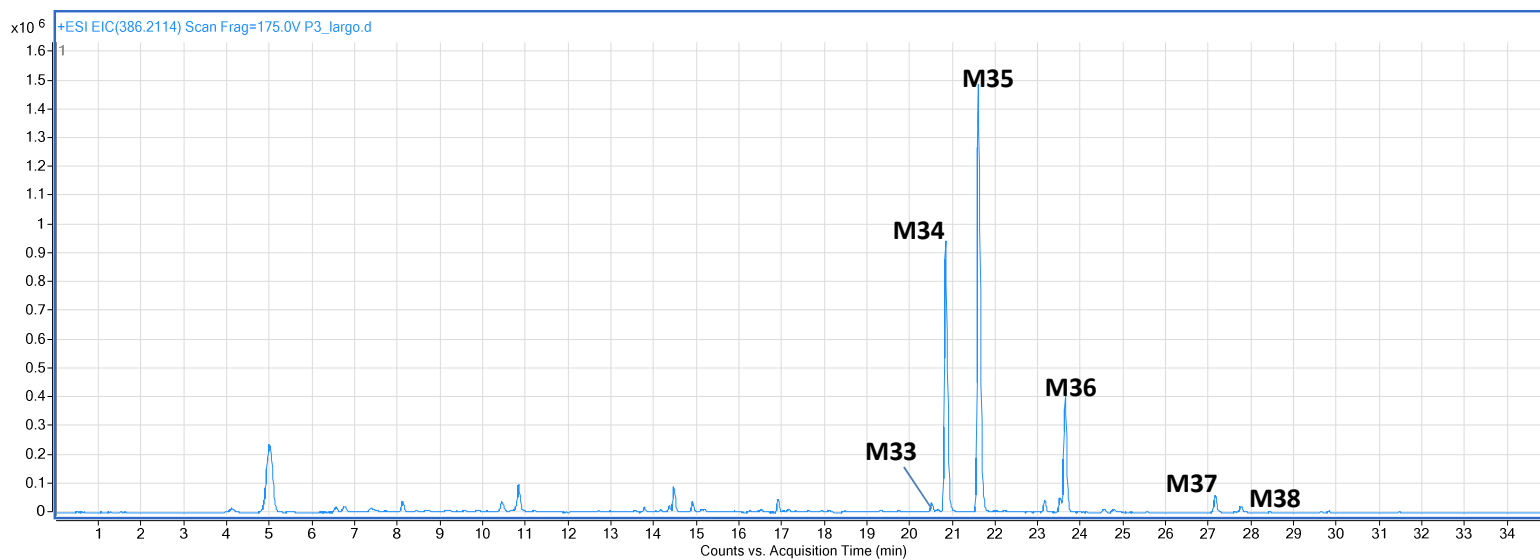


Figure 6. UHPLC-TOFMS analysis of TMX urinary metabolites: (a) extracted ion chromatogram of m/z 386.2114 (metabolites M33-M38)

Use of TMX metabolites as indirect marker of its consumption

The use of TMX metabolites as indirect marker for its consumption is important due to in rats experiments, after a single dose administration, TMX intact molecule has not been detected in urine after 24, 48 or 72 hours. However, metabolites can be detected in urine; most of them reach the highest concentration in the first 24 hours, but with a long persistence, allowing their identification up to 72 hours after the administration in most cases. The evolution of the relative abundance of selected TMX metabolites in urine after the administration of a dose of TMX is shown in **Figures 7 to 9**. It should be noted that the novel metabolites reported in urine in the present study (M25, M27, M30 and M31) are still detected after the 72 h-sample, which remarks the potential interest for their use as a marker of TMX consumption.

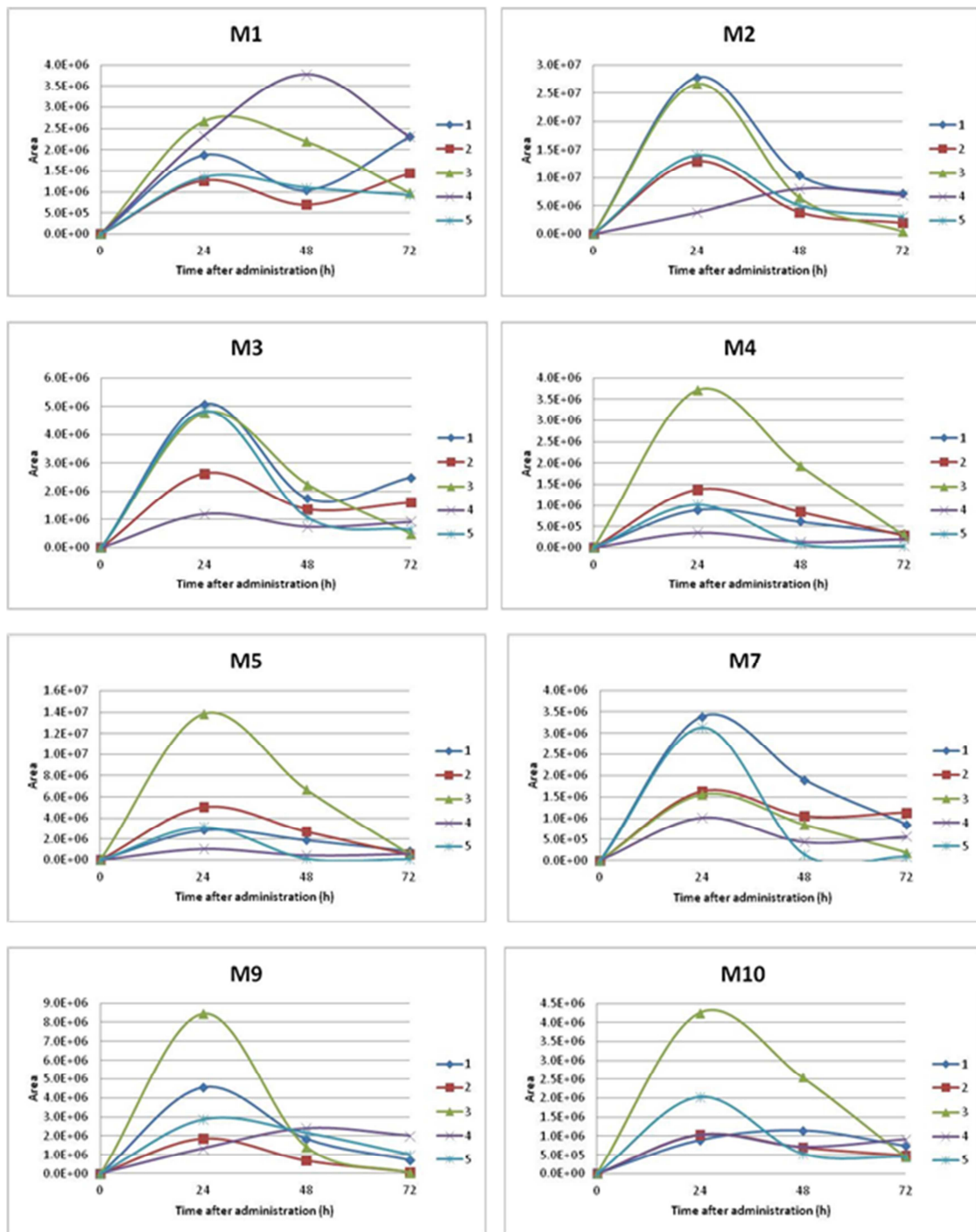


Figure 7. Profile and evolution of main TMX metabolites after administration (0, 24, 48 and 72 h) (I)

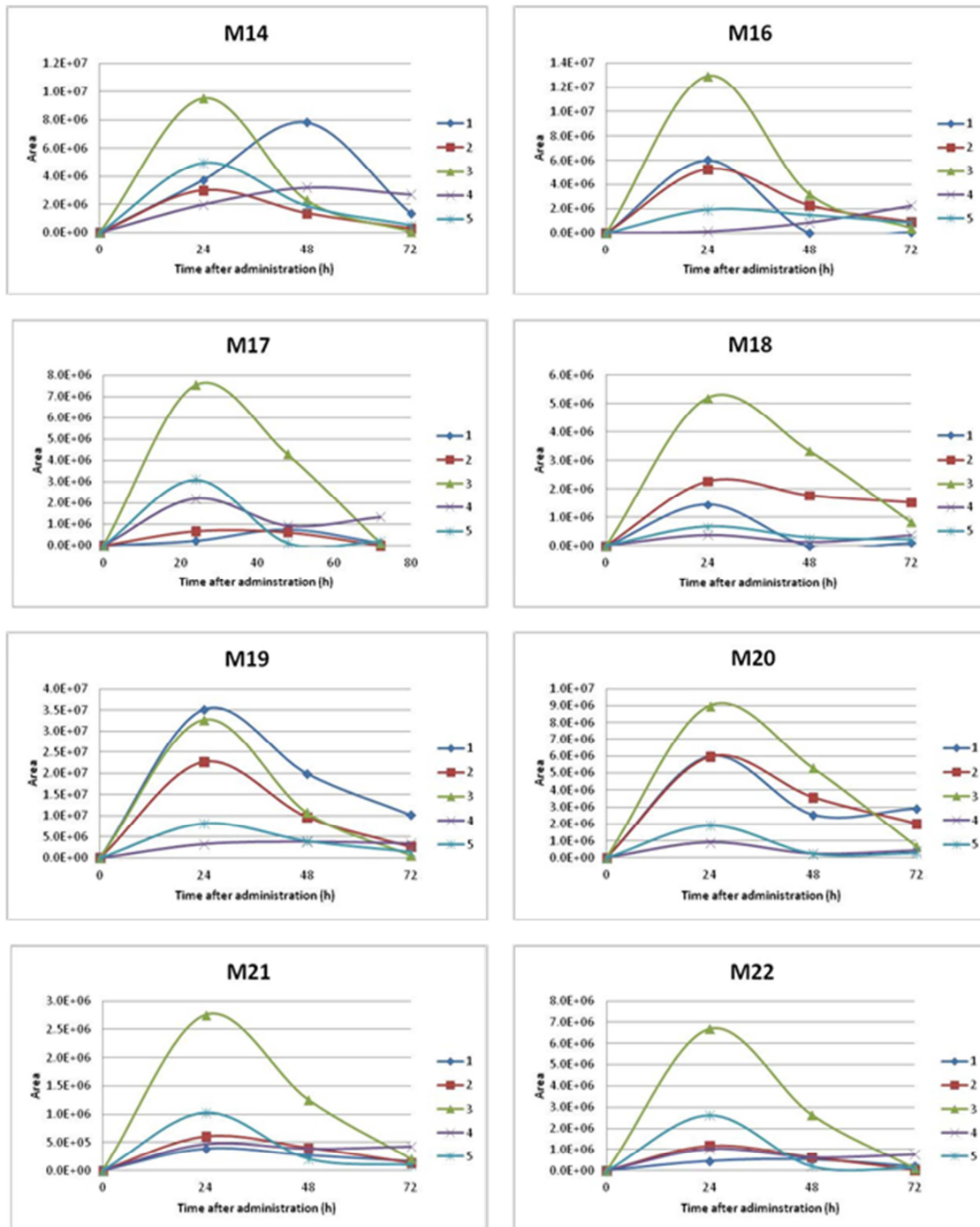


Figure 8. Profile and evolution of main TMX metabolites after administration (0, 24, 48 and 72 h) (II)

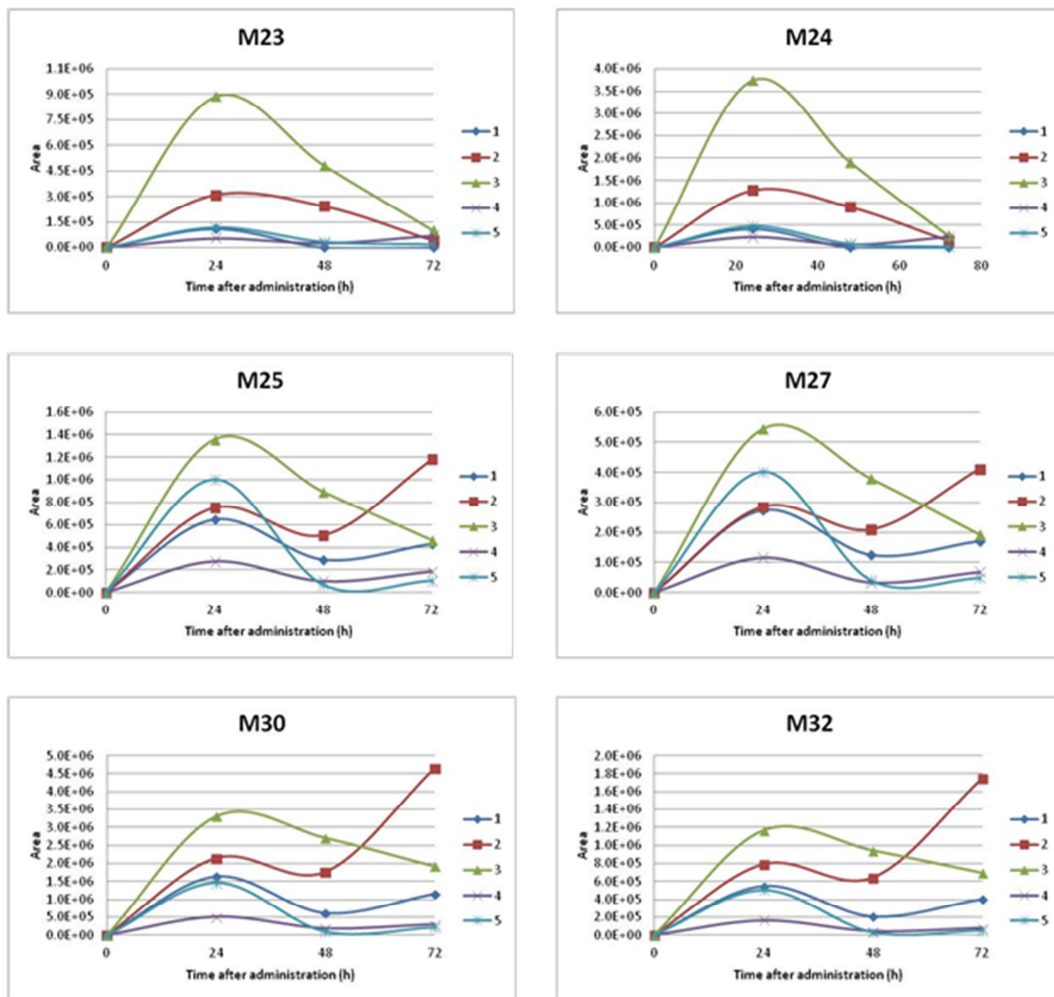


Figure 9. Profile and evolution of main TMX metabolites after administration (0, 24, 48 and 72 h) (III)

Concluding remarks

The excretion of urinary metabolites of TMX has been investigated in rats after a single dose administration using UHPLC-TOFMS. The proposed metabolites systematic identification procedure is based on applying a predefined set of typical biotransformations to the parent molecule (TMX), with their corresponding molecular formula modifications and accurate mass shifts. Additional CID MS/MS fragmentation of the metabolites was performed using Q-TOFMS/MS. The strategy was satisfactorily applied to the identification of up to 38 urinary metabolites, some of which were not previously reported in urine. New isomers of previously reported metabolites (modifications) have been identified and also a set of novel metabolites formed from reduction (hydrogenation) of TMX and its N-desmethyl derivative have been reported for the first time in this article.

Referencias

- 1 J. Borgna, H. Rochefort. Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1981; 256: 859-868.
- 2 Robertson DW, Katzenellenbogen JA and Long DJ. Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *Journal of Steroid Biochemistry* 1982; 16:1-13.
- 3 Jordan VC. Metabolites of tamoxifen in animals and man: Identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Research and Treatment* 1982; 2:123-138.
- 4 Coezy E, Borgna JL and Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: Correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Research* 1982; 42: 317-323.
- 5 Stearns V, Johnson MD, Rae J, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z and Flockhart DA. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95:1758-1764.
- 6 Johnson MD, Zuo H, Lee K, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, and Skaar TC. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; 85:151-159.
- 7 Young CL, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA and Skaar TC. Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006; 318:503-512.

8 2014 WADA List of Prohibited Substances and Methods. Available at:

[http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2013/WADA-Prohibited-List-2014-EN.pdf)

[Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2013/WADA-Prohibited-List-2014-EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2013/WADA-Prohibited-List-2014-EN.pdf)

9 The World Anti-Doping Code. www.wada-ama.org.

10 Teunissen SF, Rosing H, Schinkel AH, Schellens JHM and Beijnen JH. Bioanalytical methods for determination of tamoxifen and its phase I metabolites: A Review. *Analytica Chimica Acta* 2010; 683:21-37.

11 Gjerde J, Kisanga ER, Hauglid M, Holm PI, Mellgren G and Lien EA. Identification and quantitation of tamoxifen and four metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2005; 1082:6-14.

12 Teunissen SF, Rosing H, Koornstra RHT, Linn SC, Schellens JHM, Schinkel AH and Beijnen JH. Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and the flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2009; 877:2519-2529.

13 Teunissen SF, Jager NGL, Rosing H, Schinkel AH, Schellens JHM and Beijnen JH. Development and validation of a quantitative assay for the determination of tamoxifen and its five main metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2011; 879:1677-1685.

14 Teunissen SF, Rosing H, Dominguez Seoane M, Brunsveld L, Schellens JHM, Schinkel AH and Beijnen JH. Investigational study of tamoxifen phase I metabolites using chromatographic and spectroscopic analytical techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; 55:518-526.

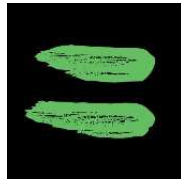
- 15 Murphy C, Fotsis T, Pantzar P, Adlercreutz H and Martin F. Analysis of tamoxifen and its metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using selected ion monitoring (SIM). *Journal of Steroid Biochemistry* 1987; 26:547-555.
- 16 Stevenson D, Briggs RJ, Chapman DJV and De Vos D. Determination of tamoxifen and five metabolites in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1988; 6:1065-1068.
- 17 Kikuta C and Schmid R. Specific high-performance liquid chromatographic analysis of tamoxifen and its major metabolites by "on-line" extraction and post-column photochemical reaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1989; 7:329-337.
- 18 Dahmane E, Mercier T, Zanolari B, Cruchon S, Guignard N, Buclin T, Leyvraç S, Zaman K, Csajka C and Decosterd LA. An ultra performance liquid chromatography-tandem MS assay for tamoxifen metabolites profiling in plasma: First evidence of 4'-hydroxylated metabolites in breast cancer patients. *Journal of Chromatography B* 2010; 878:3402-3414.
- 19 Jaremko M, Kasai Y, Barginear MF, Raptis G, Desnick R and Yu C. Tamoxifen metabolite isomer separation and quantitation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2010; 82:10186-10193.
- 20 Murphy C, Fotsis T, Pantzar P, Adlercreutz H and Martin F. Analysis of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen levels in cytosol and KCl-nuclear extracts of breast tumours from tamoxifen treated patients by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using selected ion monitoring (SIM). *Journal of Steroid Biochemistry* 1987; 28:609-618.
- 21 MacCallum J, Cummings J, Dixon JM and Miller WR. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in breast tumour tissues. *Journal of Chromatography B* 1997; 698:269-275.

- 22 Jones RM, Yuan ZX, Lamb JH and Lim CK. On-line high-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric method for the study of tamoxifen metabolism. *Journal of Chromatography A* 1996; 722:249-255.
- 23 Lu W, Poon GK, Carmichael PL and Cole RB. Analysis of tamoxifen and its metabolites by on-line capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry employing nonaqueous media containing surfactants. *Analytical Chemistry* 1996; 68:668-674.
- 24 Lim CK, Yuan ZX, Jones RM, White INH and Smith LL. Identification and mechanism of formation of potentially genotoxic metabolites of tamoxifen: Study by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997; 15:1335-1342.
- 25 Li XF, Carter S, Dovichi NJ, Zhao JY, Kovarik P and Sakuma T. Analysis of tamoxifen and its metabolites in synthetic gastric fluid digests and urine samples using high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2001; 914:5-12.
- 26 De Vos D, Slee PHTJ, Briggs RJ and Stevenson D. Serum and urine levels of tamoxifen in patients with advanced breast cancer after a loading dose at steady-state levels. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1998; 42:512-514.
- 27 Mazzarino M, Fiacco I, De la Torre X and Botrè F. A mass spectrometric approach for the study of the metabolism of clomiphene, tamoxifen and toremifene by liquid chromatography time-of-flight spectroscopy. *European Journal of Mass Spectrometry* 2008; 14:171-180.
- 28 Mazzarino, De la Torre X, Di Santo R, Fiacco I, Rosi F and Botrè F. Mass spectrometric characterization of tamoxifene metabolites in human urine utilizing different scan parameters on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010; 24:749-760.

- 29 Mazzarino M, Biava M, De la Torre X, Fiacco I and Botré F. Characterization of the biotransformation pathways of clomiphene, tamoxifen and toremifene as assessed by LC-MS/(MS) following in vitro and excretion studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 2013; 405:5467-5487.
- 30 Lu J, He C, He G, Wang X, Xu, Y, Wu Y, Dong Y and Ouyang G. Structural elucidation of new urinary tamoxifen metabolites by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2014; 49: 570-578.
- 31 Dahmane E, Boccard J, Csajka C, Rudaz S, Decosterd L, Genin E, Duret B, Bromirski M, Zaman K, Testa B and Rochat B. Quantitative monitoring of tamoxifen in human plasma extended to 40 metabolites using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry: new investigation capabilities for clinical pharmacology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014; 406:2627-2640.
- 32 Thevis M, Thomas A, Pop V and Schänzer W. Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations. *Journal of Chromatography A* 2013; 1292:38-50.
- 33 Domínguez-Romero JC, García-Reyes JF, Martínez-Romero R, Berton P, Martínez-Lara E, Del Moral-Leal ML and Molina-Díaz A. Combined data mining strategy for the systematic identification of sport drug metabolites in urine by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2013; 761:1-10.
- 34 Lien EA, Ueland PM, Solheim E and Kvinnsland S. Determination of tamoxifen and four metabolites in serum by low-dispersion liquid chromatography. *Clinical Chemistry* 1987; 33:1608-1614.
- 35 U. Hellmann-Blumberg, M.G. Cartner, G.T. Wurz, M.W. DeGregorio. Intrinsic reactivity of tamoxifen and toremifene metabolites with DNA. *Breast Cancer Res. Treat.* **1998**, 50, 135-141.

- 3 Kemp JV, Adam HK, Wakeling AE and Slater R. Identification and biological activity of tamoxifen metabolites in human serum. *Biomedical Pharmacology* 1983; 32:2045-2052.

- 37 Gómez C, Pozo OJ, Díaz R, Sancho JV, Vilaroca E, Salvador JP, Marco MP, Hernández F, Segura J and Ventura R. Mass spectrometric characterization of urinary toremifene metabolites for doping control analyses. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:4727-4737.



CONCLUSIONES

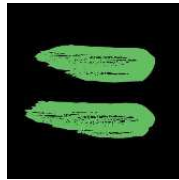
IV. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha estudiado la potencialidad de la técnica LC-TOFMS para el control antidoping, tanto para el análisis de sustancias dopantes. De los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones

1. El tratamiento de muestra seleccionado empleando SPE con cartuchos poliméricos genéricos de tipo hidrofóbico/lipofílico (Oasis HLB[®] o PLEXA[®]) proporciona resultados casi óptimos para el análisis multiclase de sustancias dopantes en orina, tanto por eficacia de extracción como por limpieza de extracto y efectos matriz.
2. El método de *screening* propuesto basado en el uso de LC-TOFMS permitía la detección de las 200 sustancias dopantes estudiadas cumpliendo los requisitos mínimos requeridos en cuanto a nivel de concentración de detección establecidos por la WADA, obteniéndose límites de cuantificación por debajo de 1 µg L⁻¹ en la mayoría de los casos.
3. Sin embargo, la capacidad de la técnica LC-TOFMS para proporcionar en un único análisis, suficiente información para la confirmación inequívoca de las sustancias identificadas en la etapa de *screening*, es limitada, ya que sólo en un 70 % de los casos se obtenía información suficiente para la confirmación inequívoca de cada analito, empleando como criterio la presencia de dos iones con abundancias relevantes (Directiva 2002/657/EC). Como alternativa, el modo de trabajo *all ion mode* empleando LC-QTOF-MS proporcionó resultados positivos (al menos dos iones para cada

compuesto) prácticamente para todos los compuestos estudiados, pero manteniendo las ventajas inherentes de adquirir los datos en modo *full-scan* se preservan, ya que la fragmentación se lleva a cabo en una cámara de colisión de dedicada pero sin aislamiento de ión precursor.

4. A partir de la información específica de fragmentación (iones diagnóstico) de cada categoría química de sustancias estudiadas, se demostró la potencialidad de la metodología propuesta empleando LC-TOFMS para análisis de compuestos no dirigido o *non-targeted* identificándose de forma sencilla e intuitiva varios compuestos relacionados (principalmente metabolitos) para una docena de casos de sustancias dopantes representativas. Para la mayoría de compuestos estudiados, se encontraron nuevos metabolitos y se obtuvo un porcentaje de cobertura de metabolitos ya descritos superior al 50 % .



ANEXOS

V. ANEXOS

ANEXO 1: LISTA DE PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

1. J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, A. MOLINA-DÍAZ.

TÍTULO: Comparative evaluation of seven different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by liquid chromatography-mass spectrometry.

REVISTA: *Journal of Chromatography A*, 1361 (2014) 34-42

ÍNDICE DE IMPACTO: 4.339 (5 year)

2. J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, F.J. LARA-ORTEGA, A. MOLINA-DÍAZ.

TÍTULO: Screening of 200 multiclass sport drugs in urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry.

REVISTA: *Talanta*, 134 (2015) 74-88

ÍNDICE DE IMPACTO: 3.756 (5 year)

3. J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, R. MARTÍNEZ-ROMERO, P. BERTON, E. MARTÍNEZ-LARA, M.L. DEL MORAL-LEAL, A. MOLINA-DÍAZ.

TÍTULO: Combined data mining strategy for the systematic identification of sport drug metabolites in urine by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry

REVISTA: *Analytica Chimica Acta*, 761 (2013) 1-10 (*Featured on Cover*)

ÍNDICE DE IMPACTO: 4.711 (5 year)

4. J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, R. MARTÍNEZ-ROMERO, E. MARTÍNEZ-LARA, M.L. DEL MORAL-LEAL, A. MOLINA-DÍAZ.

TÍTULO: Detection of main urinary metabolites of β_2 -agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry

REVISTA: *Journal of Chromatography B*, 923-924 (2013) 128-135.

ÍNDICE DE IMPACTO: 2.862 (5 year)

5. J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, MIRIAM BENEITO-CAMBRAA, R. MARTÍNEZ-ROMERO, E. MARTÍNEZ-LARA, M.L. DEL MORAL-LEAL, A. MOLINA-DÍAZ.

TÍTULO: Study of tamoxifen urinary metabolites in rat by ultra-high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry

Revista: *Biomedical Chromatography* (2015)

ÍNDICE DE IMPACTO: 1.662

ANEXO 2: LISTA DE COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS NACIONALES

1. "Comparative evaluation of different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by LC-MS"

Autores: J.C. Domínguez-Romero*, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral.

Congreso: XIII International Conference of Instrumental Analysis

Lugar de celebración: Barcelona, España, 14-16 Noviembre 2011

PÓSTERS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. "Development of an automated LC-TOFMS screening method for the identification and confirmation of doping agents in urine"

Autores: J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación tipo poster.

Congreso: 48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) Joint Meeting with the Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh)

Lugar de celebración: Bonn, Alemania, Septiembre 2010

PÓSTERS A CONGRESOS NACIONALES

1. "Detección y confirmación automatizada de agentes dopantes en orina mediante bases de datos de masas exactas de iones y HPLC-TOFMS"

Autores: J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación tipo poster.

Congreso: XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA)

Lugar de celebración: Córdoba, España, Junio 2010.

2. "Combined strategy for the automated identification of sport drug metabolites in urine using liquid chromatography high resolution mass spectrometry"

Autores: J.C. Domínguez Romero, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación tipo poster.

Congreso: V Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas

Lugar de celebración: Málaga, España, 11-14 de Abril de 2011.

3. "Identification of propranolol urinary metabolites in rat and human by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry"

Autores: J.C. Domínguez Romero, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, E. Martínez-Lara, M.L. Del Moral-Leal

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación tipo POSTER.

Congreso: V Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas

Lugar de celebración: Málaga, España, 11-14 de Abril de 2011.

4. "Identification of tamoxifen urinary metabolites by ultra high pressure liquid chromatography electrospray high resolution mass spectrometry"

Autores: J.C. Domínguez Romero, J.F. García Reyes, M. Beneito Cambra, E. Martínez Lara, M.L. Del Moral Leal, A. Molina Díaz

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación PÓSTER.

Congreso: XIV Reunión del Grupo GRASEQA de la Sociedad Española de Química Analítica

Lugar de celebración: Baeza, España, 26-27 de Junio de 2014.

ANEXO 3: LISTA DE OTROS ARTÍCULOS RELACIONADOS CON EL CONTENIDO DE LA TESIS.

1. J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, A. MOLINA-DÍAZ.

TÍTULO: Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry

REVISTA: *Journal of Chromatography B*, 897 (2011) 2034-2042.

ÍNDICE DE IMPACTO: 2.862 (5 year)

2. A. GONZÁLEZ-ANTUÑA, J.C. DOMÍNGUEZ-ROMERO, J.F. GARCÍA-REYES, P. RODRÍGUEZ-GONZALEZ, G. CENTINEO, J.I. GARCÍA ALONSO, A. MOLINA-DÍAZ

TÍTULO: Overcoming matrix effects in electrospray: Quantitation of β -Agonists in complex matrices by isotope dilution LC-MS using single ^{13}C -labelled analogues

REVISTA: *Journal of Chromatography A*, 1288 (2013) 40-47.

ÍNDICE DE IMPACTO: 4.339 (5 year)