Giampaolo Cartoni, Francesca Buiarelli, Franco Coccioli, Mirco Merolle, Università di Roma "La Sapienza"; Bruno Neri, Istituto Zooprofilattico e Sperimentale Regioni Lazio e Toscana - Roma.
giampaolocartoni@uniroma1.it

METABOLITI DELLO STANOZOLOLO IN LC-MS-MS

Questo lavoro descrive l'ottimizzazione della rivelazione dei maggiori metaboliti dello stanozololo in urine bovine, mediante Hplc-MS-MS.

L'urina è dapprima sottoposta ad idrolisi enzimatica e poi estratta in fase solida con sistema a doppia cartuccia. La rivelazione è stata eseguita in Hplc-MS-MS in Multiple Reaction Monitoring (MRM). Il recupero del metodo è intorno all'80% per i 3 metaboliti e i loro limiti di rivelazione sono inferiori al limite decisionale richiesto dal Piano Nazionale Residui.

Alcuni ormoni anabolizzanti trovano impiego fraudolento negli allevamenti degli animali da reddito come promotori di crescita, in quanto, come dimostrato da numerosi studi sperimentali, la somministrazione degli stessi al bestiame, produce un aumento della deposizione di proteine e di peso corporeo, con una contemporanea diminuzione della deposizione di grasso. Basandoci sulle metodologie ad oggi sviluppate e, tenendo conto delle esigenze analitiche attualmente richieste per la ricerca di residui negli animali vivi e nei loro prodotti (1), in questo lavoro è stato sviluppato un metodo di conferma altamente sensibile e specifico per l'identificazione dei metaboliti dello stanozololo (steroide anabolizzante di sintesi (2)), in urine bovine avvalendoci dell'accoppiamento tra cromatografia liquida e spettrometria di massa tandem.

Materiali e strumenti

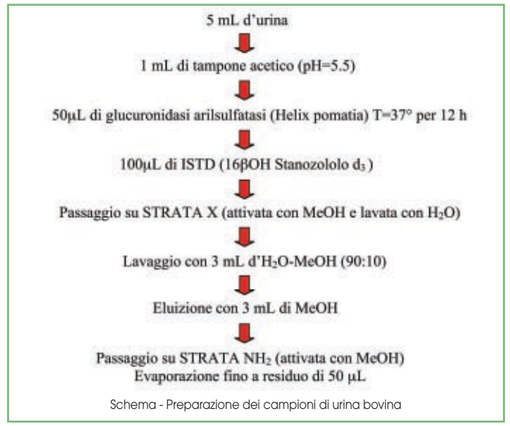
Le condizioni cromatografiche sono state ottimizzate utilizzando una colonna Nucleosil (D.I=2,1 mm, L=250 mm,dp=5 μm), sfruttando un'eluizione isocratica con una miscela di H_2O-MeOH 25-75% (v/v) con aggiunta di NH_4COOH 2 mM. Il cromatografo liquido usato è costituito da 2 pompe per Hplc Shimadzu LC10 AD (Shimadzu Kyto Japan), collegate ad un miscelatore da 0,5 mL, iniettore Rheodyne 8125 con loop da 5 μL). Per l'analisi in spettrometria di massa è stato impiegato uno spettrometro di massa PE Sciex a triplo quadrupolo mod. 365 Perkin-Elmer Sciex Instruments Foster City (Ca, Usa), interfacciato con una sorgente Turboion Spray (IS). La preparazione del campione si è basata sullo Schema riportato di seguito. I recuperi medi per i 3 tre metaboliti sono stati valutati su 5 diversi livelli di validazione nell'intervallo fra 1 e 10 ng/mL, ottenendo valori superiori all'80%.

Ioni precursori e ioni prodotto più significativi dei tre metaboliti scelti per l'analisi in Hplc-MS-MS in MRM

Analita	Ione precursore $(M+H)^+$ m/z (%)	Frammenti (m/z) (%)
3'OH stanozololo	345,04 (11)	97,02 (100) ;81,12 (36)
4βOH stanozololo	345,04 (13)	309,05 (100); 327,04 (65)
16βOH stanozololo	345,04 (4)	81,02 (100); 95,01 (36)
ISTD	348,04 (5)	81,01 (100); 95,01 (41)

Studi in Hplc-MS e Hplc-MS-MS

Sono stati fatti studi su standard in MS, sfruttando la tecnica dell'*infusione*, per valutare e modificare i parametri critici che influenzano la formazione degli ioni quasi molecolari e le relative frammentazioni,



Schema - Preparazione dei campioni di urina bovina

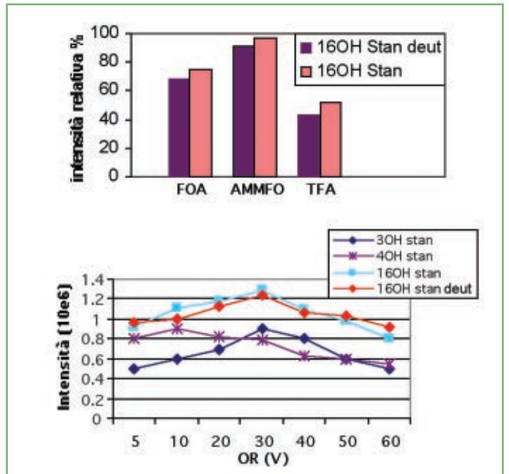


Figura 1 - a) Intensità relativa dello ione $(M+H)^+$ del 16βOH-stanozololo e dell'ISTD utilizzando acido formico (FOA), formiato di ammonio (AMMFO) ed acido trifluoroacetico (TFA) in fase mobile; b) ottimizzazione del potenziale dell'orifizio (OR) sul primo quadrupolo

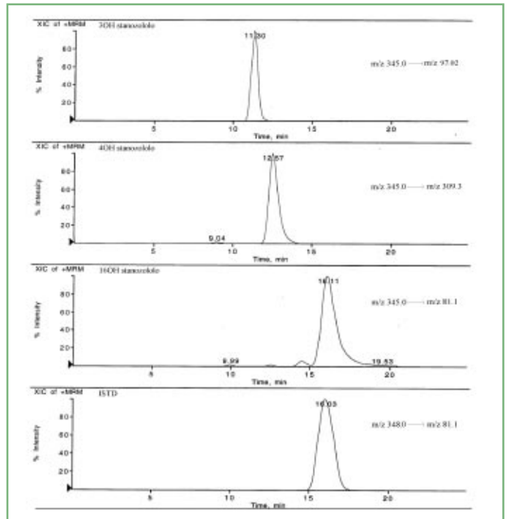


Figura 2 - Analisi in Hplc-MS-MS in MRM di una miscela standard di 3'OH stanozololo, 4βOH stanozololo e 16βOH stanozololo (1 ng/μL)

attraverso lo studio delle intensità delle diverse specie ioniche (ioni molecolari, clusters, addotti), che si ottengono in funzione appunto dei parametri sperimentali, come mostrato in Figura 1a e 1b. L'acquisizione primaria è stata fatta in positivo in un range *m/z* di 50-350 Da, impostando il primo quadrupolo in modalità *full scan* ed ottimizzando i parametri di lavoro (OR=potenziale dell'orifizio; RNG= focusing ring; IS= ion spray), per ottenere massime intensità dello ione quasi molecolare m/z=345,04 $(M+H)^+$ caratteristico del 3'OH Stan, 4βOH Stan, 16βOH stanozololo. Gli ioni quasi molecolari *m/z*=345,04 (comuni per il 3;4;16βOH stanozololo)e *m/z*=348,04 (per lo ISTD), successivamente sono stati selezionati come precursori sul primo quadrupolo, inviati al secondo quadrupolo (camera di collisione) e frammentati utilizzando N_2 come gas di collisione. Ai fini dell'analisi di conferma sono stati scelti per le prove in MRM gli ioni riportati nella Tabella, in quanto rappresentano i frammenti ionici con intensità relativa più significativa. In Figura 2, si riporta l'analisi in Hplc in MRM usando le transizioni mostrate in tabella, di una miscela standard dei tre metaboliti al livello di concentrazione di 1 ng/μL.

Sono state analizzate inoltre urine bovine spiked a diversi livelli di concentrazione (1, 2, 3, 5 e 10 ng/mL) e urine reali di un vitello trattato oralmente con stanozololo. Il metodo da noi sviluppato è stato validato valutando la precisione in termini di ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio, ripetibilità intra-day e riproducibilità inter-day, ottenendo dei valori di CV compresi tra il 6 e il 10%, soddisfacenti considerando la complessità della matrice. Sono stati determinati anche LOD e LOQ sfruttando il metodo dei residui (3) ottenendo dei valori medi per i tre metaboliti, rispettivamente di: 0,4 e 1,2 ng/mL. Tali valori risultano quindi inferiori al limite decisionale di 2 ng/mL richiesto dal Piano Nazionale Residui. Questo metodo rappresenta uno strumento particolarmente valido per l'analisi di conferma della presenza dei metaboliti dello stanozololo in fluidi biologici. Infatti tale metodo si presenta semplice, specifico e sensibile, consentendo la rivelazione diretta degli analiti senza dover ricorrere a derivatizzazioni come accade in GC-MS. Inoltre c'è la possibilità di estendere questo metodo anche in campo umano in quanto lo stanozololo assunto o per scopi terapeutici o per uso dopante, viene metabolizzato come 3, 4 e 16 idrossilato.

Bibliografia

(1) Direttiva UE 96/22, UE 96/23.
(2) R.O. Clinton *et al., J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81,** 1513.
(3) E. Desimoni, Chimica analitica, Ed. Clueb, 1996.

ABSTRACT

Stanozolol Metabolites by LC-MS-MS

This paper describes the optimisation of the detection of stanozolol and its major metabolite in bovine urine by Hplc-MS-MS. Urine is first submitted to enzymatic hydrolysis and then extracted by solid phase with two cartridges. Detection is carried out by Hplc-MS-MS in Multiple Reaction Monitoring (MRM). Recovery of the method is around 80% for the three main stanozolol metabolites. Limit of detection of the compounds is below the criteria proposed by National Residue Plan.