

Détermination des concentrations physiologiques de la norandrostérone et de la norétiocholanolone, métabolites urinaires de la nandrolone par CPG/SM. Résultats d'une étude multicentrique

Determination of physiological concentrations of norandrosterone and noretiocholanolone, urinary metabolites of nandrolone by GC/MS. Results of a multicentric study

**Luc HUMBERT^{*(1)}, Michel LHERMITTE⁽¹⁾, François VAYSSETTE⁽²⁾,
Gilbert PEPIN⁽²⁾, Florence DESCAMPS⁽³⁾, Marie-Hélène GHYSEL⁽³⁾,
Eric LACASSIE⁽⁴⁾, Jean-Marie GAULIER⁽⁴⁾, Laurence SCHANG⁽⁵⁾,
Yvan RICORDEL⁽⁵⁾, Vincent CIRIMELE⁽⁶⁾, Pascal KINTZ⁽⁶⁾**

(1) Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, CHR et U de LILLE

(2) Laboratoire d'Expertise TOXLAB, PARIS

(3) Laboratoire de Police Scientifique de LILLE

(4) Service de Pharmacologie-Toxicologie, CHR et U de LIMOGES

(5) Laboratoire de Toxicologie, Préfecture de PARIS

(6) Institut de Médecine Légale, STRASBOURG

*Auteur à qui adresser la correspondance : Luc HUMBERT - Tél : 03 20 44 49 66 - Fax : 03 20 44 47 29
e-mail : mlhermitte@chru-lille.fr

(Reçu le 6 décembre 1999 ; accepté le 14 janvier 2000)

RÉSUMÉ

La nandrolone (19-Nortestostérone, 17 β -hydroxyestr-4-en-3-one) stéroïde anabolisant est une substance dopante qui augmente la masse musculaire, accroît la résistance à l'effort et diminue le temps de récupération entre les efforts, elle est utilisée à la fois chez l'homme et l'animal.

Les deux principaux métabolites urinaires de la nandrolone sont les dérivés glucuroconjugés de la 19-norandrostérone et de la 19-norétiocolanolone. La limite de positivité à la nandrolone, basée sur la quantification urinaire de la 19-norandrostérone, proposée par le Comité International Olympique est de 2 ng/mL. Des résultats supérieurs à 2 ng/mL amènent quelquefois les athlètes à contester les résultats, niant la prise de cette substance.

La question d'une production endogène des métabolites de la nandrolone s'est posée, puisque plusieurs études ont montré que, dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques, on pouvait retrouver ces métabolites dans l'urine des sujets. Une étude multicentrique a été réalisée par la SFTA sur les concentrations physiologiques des métabolites de la nandrolone dans les urines humaines. Les échantillons (160) ont été obtenus auprès d'hommes sportifs ou non, issus de la population normale. Après extraction, hydrolyse par la β -glucuronidase, purification, les analytes ont été silylés. L'identification et la quantification de la 19-norandrostérone et de la 19-norétiocolanolone ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

A partir de ces 160 échantillons, il a pu être démontré chez certains individus, une sécrétion physiologique des métabolites de la nandrolone. En général, les concentrations obtenues sont inférieures à 0,5 ng/mL, sous le seuil de positivité proposée par le C.I.O.

Aucun des sujets étudiés ne présentait des concentrations urinaires des métabolites de la nandrolone supérieures à 1 ng/mL. La sécrétion physiologique de la nandrolone est donc faible, mais pas inexistante. La limite de positivité proposée par le C.I.O. semble donc donner des garanties suffisantes pour une population normale. Cependant on ne peut exclure la présence de nandrolone qui se trouverait dans la viande consommée par les sportifs, ni la prise d'autres substances comme des précurseurs stéroïdiens, tels que les 19 norstéroïdes qui pourraient entraîner l'apparition des mêmes métabolites dans les urines.

MOTS-CLÉS

Nandrolone, norandrostérone, norétiocolanolone, taux physiologique, CPG/SM.

Introduction

La 19-nortestostérone (17 β -hydroxyestr-4-en-3-one, NT), dénommée **nandrolone** (Figure 1) et ses esters (en position 17), le phénylpropionate ou le décanoate de nandrolone sont des stéroïdes anabolisants synthétiques, largement utilisés en thérapeutique, dans les problèmes d'amaigrissement, d'escarres, de brûlures étendues ou encore d'ostéoporose, aussi bien en médecine animale et humaine. Ces substances augmentant la force musculaire et les performances ont très vite trou-

SUMMARY

Nandrolone (19-nortestosterone, 17 β -hydroxyestr-4-en-3-one) anabolic steroid is a doping agent used to improve muscular strength and performance, in sport and horse racing. Two main metabolites, 19-norandrosterone and 19-noretiocholanolone are excreted as glucuronides in urines. Official doping analysis of illicit nandrolone administration is based on the detection of 19-norandrosterone above a provisional decision limit of 2 ng/mL. Values higher than 2 ng/mL were contested by several athletes, who denied anabolic steroids doping.

Endogeneous formation of is discussed, as several studies showed that in some physiological or pathological conditions, the two metabolites could be found in urines. A study about the physiological concentrations of nandrolone in human urine has been performed by The French Society of Analytical Toxicology. 160 samples of urine collected from men were analyzed. After extraction, enzymatic hydrolysis by β -glucuronidase, purification and silylation, the derivatized steroids were analysed by gas chromatography/mass spectrometry.

From 160 tested urinary samples, a physiological excretion of nandrolone metabolites is showed. Often concentrations are below 0.5 ng/mL, clearly under the proposed CIO positive cut-off (2ng/mL).

Endogeneous formation was established. However, metabolites of nandrolone could be also found after consumption of meat generated from nandrolone treated animals, or after ingestion of steroid precursors, as 19-norsteroids.

KEY-WORDS

Nandrolone, norandrosterone, noretiocholanolone, physiological concentrations, GC/MS.

vé leur place comme substances dopantes dans les milieux sportif et hippique (1,2). La nandrolone est l'anabolisant le plus utilisé, ses effets androgènes sont plus faibles que ceux de la testostérone (3). En 1974, les stéroïdes anabolisants étaient ajoutés à la liste des produits dopants interdits par le C.I.O.

Le métabolisme de la nandrolone et de ses esters a été étudié chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, après administration de nandrolone à une patiente, atteinte d'un cancer du sein, la

19-norandrostérone (3 α -hydroxy-5 α -estran-17-one, NA) et la 19-norétiocolanolone (3 α -hydroxy-5 β -estran-17-one, NE) ont été mises en évidence dans les urines (Figure 1) (4), excrétés sous forme de glucuronides (5,6). D'autres métabolites sont également produits, tels que la 19-norépiandrostérone. Le contrôle d'une prise illicite de nandrolone est basé sur la présence de norandrostérone ou (la présence à la fois de 19-norandrostérone et de 19-norétiocolanolone) (7) à des concentrations supérieures à 2 ng/mL. Schänzer a montré que les métabolites de la nandrolone NA/NE sont produits dans un rapport 72 : 28 alors que ceux de la testostérone le sont dans un rapport 53 : 47(7).

Courtot et coll. (8) et Houghton et coll. (9) ont montré la production physiologique de nandrolone chez l'éta- lon, puisque cette substance se retrouve dans les urines. La nandrolone a aussi été mise en évidence dans le liquide folliculaire équin (10).

De même, il a été montré chez la femme enceinte, la production naturelle de nandrolone et de 19-norandros- ténedione dans le liquide folliculaire et la présence de nandrolone dans le plasma (11).

La nandrolone est également produite de façon physio- logique par le sanglier, des concentrations allant jus- qu'à 1 ng/mL, ont été mesurées dans les urines (12,13).

La 17 α nortestostérone a été retrouvée dans les urines de vaches gestantes et dans celle du veau nouveau-né (14,15). La même constatation a été faite chez la brebis par Clouet et coll. (16).

In vitro, il est démontré la conversion enzymatique d'androgènes (testostérone et androsténedione) en estrogènes (17 β estradiol et estrone) par des prépara- tions différentes d'aromatase (principalement d'origine placentaire humaine). Ces conversions sont accompa- gnées de 19-déméthylations avec production de faibles quantités de 19-norstéroïdes (19-nortestostérone/estra- diol < 10 %). La formation de 19-nortestostérone et de

19 norandrosténedione par des tissus riches en aroma- tase a été démontrée dans les follicules ovariens (11) et au cours de la grossesse dans le placenta (17). D'autres tissus contenant moins d'aromatase, comme le tissu adipeux, les testicules, les surrénales, le foie ou le muscle pourraient aussi contribuer à la production de faibles quantités de 19 norstéroïdes, excrétés dans l'uri- ne sous forme de NA et de NE à faible concentration. Toutefois, l'excrétion urinaire des 19-norstéroïdes doit être inférieure à l'excrétion des estrogènes totaux cor- respondant (18).

L'utilisation de contraceptifs oraux contenant de la norethisterone, conduit aussi à l'excrétion urinaire de norandrostérone (19).

Des substances contenant de la nortestotérone sont uti- lisées illégalement pour nourrir du bétail (20). et de petites quantités de métabolites de la nandrolone sont détectables dans les urines après ingestion de viande produite par les animaux traités à la nandrolone (19). L'abus de préparations de nandrolone par des athlètes pour augmenter leurs performances physiques est bien connu. Des variétés de préparations de nandrolone sont vendues sur le marché légal ou le marché noir. De plus, la nandrolone est souvent utilisée de manière dissimu- lée (21).

Les produits contenant de la nandrolone sont des pré- parations injectables et le métabolite, la norandrostéro- ne est détectable dans l'urine sur une longue période de temps (19).

Pépin et coll (22) ont aussi montré que NA et NE pou- vaient se retrouver dans les urines après administration de 19-norstéroïdes (norandrosténediol et norandrostè- nedione) et après prise de gélules commerciales de 4 et 5 androsténe diol, par suite de la présence d'impuretés à base d'un 19-norandrosténe.

Depuis peu, un certain nombre d'échantillons urinaires ont été trouvés positifs à la nandrolone par des labora- toires de contrôle antidopage pour des sportifs dans des disciplines telles que le judo, le football, le patina- ge artistique, disciplines pour lesquelles la présence de stéroïdes anabolisants n'avait jamais été constatée. Plusieurs sportifs ont contesté les interprétations des contrôles antidopage. On pouvait donc se poser la question de la production endogène ou non des princi- paux métabolites de la 19-NT : la NA et la NE. Dehennin et coll. (étude chez 30 sujets) (18) et Le Bizec et coll. (étude chez 8 sujets) (24) avaient déjà montré la production de NA, à des taux faibles, alors qu'ils ne détectaient pas de NE. Par contre Jeanneau et coll. (23) montraient la production de NA et NE dans un groupe de 41 sujets masculins.

Afin de répondre à cette question, une étude multicen- trique sur la détection et la quantification de NA et de NE a été réalisée sur 160 sujets sportifs ou non, en uti- lisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la

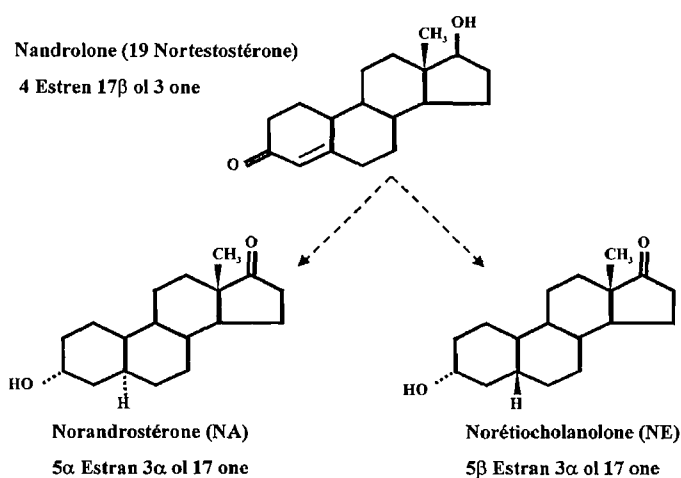


Figure 1 : Structures de la 19-nortestostérone, 19-NA et 19-NE.

spectrométrie de masse (23) et afin de déterminer si la sécrétion naturelle de nandrolone pouvait remettre en question la limite de positivité (2 ng/mL) proposée par le C.I.O.

Matériel et Méthode

Produits chimiques

Le méthanol, le carbonate et le bicarbonate de sodium sont de qualité ultra pure (Merck, Darmstadt, Allemagne). La nandrolone a été achetée chez Fluka (St Quentin Fallavier, France). Les solutions de norandrosterone (NA) et de noretiocholanolone (NE) et le standard deutéré (NE-d3) sont fournies par Promochem (Molsheim, France).

La β -glucuronidase d'*Escherichia Coli* provient de Boehringer Mannheim (Allemagne).

L'iodure d'ammonium (NH_4I) a été acheté chez Aldrich (Steinheim, Allemagne), le pentane, le 2-mercaptoéthanol et le N-Methyl-NTrimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) chez Fluka (St Quentin Fallavier, France).

Échantillonnage

Le Tableau I présente les caractéristiques des sujets qui ont participé à l'étude (sexe et tranche d'âge) Les échantillons ont été obtenus principalement auprès de jeunes hommes (20 à 35 ans), issus de la population normale. Les échantillons ont été conservés à + 4° C avant analyse.

Tableau I : Caractéristiques de la population étudiée.

	IML Strasb.	TOXLAB Paris	LIPS Lille	Préf. Pol. Paris	CHR Limoges	CHR Lille
Nbre sujets	40	21	23	23	31	22
Homme	40	21	23	13	31	22
Femme	0	0	0	10	0	0
Tr. d'âge	10-68	20-55	18 - 38	16 - 34	18 - 35	18 - 48

Tableau II : Appareillage et sensibilités.

	IML Strasb.	TOXLAB Paris	LIPS Lille	Préf. Pol. Paris	CHR Limoges	CHR Lille
Appareillage	HP 5973	TSQ 7000	HP 5973	HP 5971	QP 5000	Automass
Détection	MS	MS/MS	MS	MS	MS	MS
Préparation	Protocole	Protocole	Protocole	Protocole	Protocole	Protocole
LOQ NA (ng/ml)	0.06	0.1	0.1	0.25	0.1	0.1
LOQ NE (ng/ml)	0.11	0.1	0.1	0.25	0.25	0.1

Extraction

Les urines ont été traitées selon le protocole décrit par Jeanneau et coll. (23). Elles sont centrifugées à 3000 trs/min pendant 10 min. A 2,5 ml d'urines sont ajoutés 5 ng de noretiocholanolone-d3, utilisée comme standard interne. Les urines sont extraites en phase solide sur colonne C18 Isolute selon la procédure suivante : dépôt des échantillons, lavage avec 1 ml d'eau bidistillée (2 fois), séchage des colonnes sous vide poussé, élution fractionnée des analytes (2 x 0,75 ml MEOH) et évaporation à 60° C sous azote de l'éluat. L'hydrolyse des urines consiste à reprendre l'extrait sec avec 1 ml de tampon phosphate et 100 μ l de β glucuronidase. Après incubation 1h à 50° C, l'homogénat est purifié par 2ml de pentane : agitation (15 min à 1 00 cycles/min) puis centrifugation (10 min à 3000 trs/min). La phase organique est prélevée et évaporée. L'extrait sec est finalement dérivé avec 50 μ l du mélange MSTFA/ NH_4I /2-mercaptoéthanol (1000/2/5). Après 20 min d'incubation à 60° C, injection en mode pulsé ou en mode splitless dans la colonne. Les analytes sont séparés par chromatographie en phase gazeuse puis détectés par spectrométrie de masse.

Instrumentation

Le système de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, utilisé dans chaque centre est présenté dans le tableau II. Le protocole de programmation est sensiblement identique à celui

décrit par Jeanneau et coll. (23). L'acquisition des données a été réalisée sur le mode Selected Ion monitoring sur les ions spécifiques des métabolites de la nandrolone et du standard deutéré. Les dosages pour la norandrostérone ont été réalisées après avoir déterminé le facteur de réponse de NA vis-à-vis de NE-d₃.

Résultats

La méthode a été validée dans chaque centre selon le protocole décrit par Jeanneau et coll. (23). Les limites de quantification pour NA et NE, obtenues sont rapportées dans le Tableau II.

La norandrostérone et la noretiocholanolone ont été recherchées et quantifiées dans chacune des urines. Le pourcentage des sujets excréant de la norandrostérone et de la norétiocholanolone est rapporté dans les figures 2 et 3, pour chaque centre. On constate que seuls 57 sujets sur 160 présentent dans leurs urines une concentration de NA, supérieure à la limite de quantification (35,6 %) et seuls 49 sujets sur 160 ont une présence de NE, supérieure à la limite de quantification (30,6 %). La figure 4 reprend les sujets, présentant une sécrétion de NA et de NE et rapporte les valeurs, minimale, maximale et la moyenne.

Des tests statistiques ont été réalisés, après avoir réalisé un test de normalité de distribution, une analyse de variance a montré que les tests X², Hartley, et Neyman-Pearson n'étaient pas applicables. L'utilisation d'un test non paramétrique : Kruskal et Wallis ont montré que le moyennage des valeurs obtenues dans chaque centre était possible car non significativement différent. De nos résultats, une valeur de 1,265 ng/mL correspondant à la moyenne géométrique plus 4 écart-types est obtenue pour la norandrostérone, valeur bien inférieure aux 2 ng/mL, retenue comme seuil de positivité par le CIO. Pour la norétiocholanolone, la moyenne géométrique plus 4 écart-types est de 0,625 ng/mL.

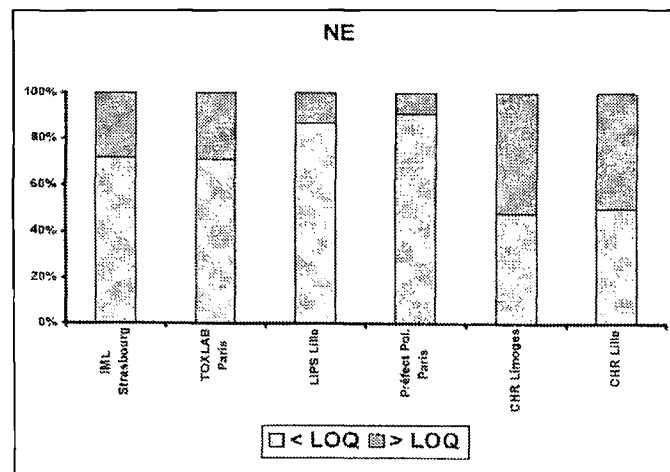


Figure 3 : Proportion de sujets présentant une détection de NE.

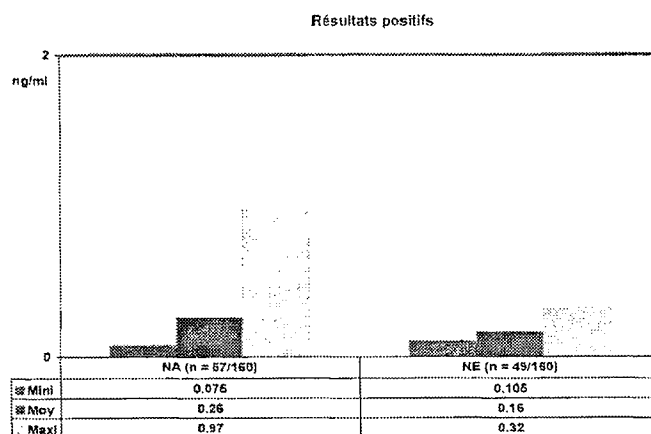


Figure 4 : Nombre total de sujets présentant une détection de NA et de NE avec les valeurs moyenne, minimale et maximale.

Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude multicentrique confortent ceux rapportés par Dehennin et coll. (18) et Le Bizec et coll. (24). En effet, Le Bizec et coll. (24) montraient chez huit sujets volontaires la présence de norandrostérone à des taux compris entre 0,02 et 0,6 ng/mL, les concentrations étant souvent comprises entre 0,1 et 0,3 ng/mL, et la non-détection de norétiocholanolone. De même, Dehennin et coll. (18) rapportent dans leur étude effectuée sur 30 sujets masculins des taux de norandrostérone compris entre 0,01 et 0,32 ng/mL, avec une moyenne géométrique de 0,078 ng/mL, valeur sensiblement identique à celle rapportée dans cette étude multicentrique. Par contre Dehennin et coll. ne détectaient pas de norétiocholanolone (18).

Plusieurs hypothèses ont été formulées concernant l'origine de la nandrolone.

Debruyckere et coll. (20) ont montré qu'après consommation de viande provenant d'animaux traités par de la

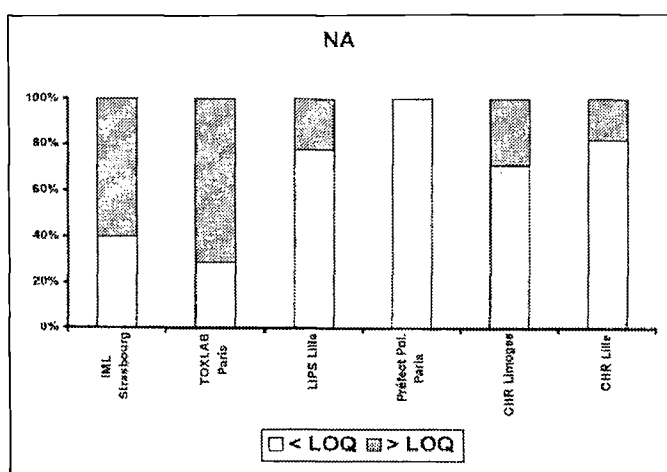


Figure 2 : Proportion de sujets présentant une détection de NA.

nandrolone, de petites quantités de métabolites de la nandrolone pouvaient être détectés dans les urines des sujets consommateurs. Concernant cette possible ingestion de viande contaminée, selon les statistiques des laboratoires de référence de l'Union Européenne, les taux de résidus de nandrolone dans la viande des animaux traités n'excèdent pas 100 ng/Kg. On peut donc en déduire que la quantité de viande qui devrait être consommé pour atteindre les valeurs de l'ordre de 2 ng/mL serait de l'ordre du Kg (18, 24).

Le Bizec et coll. incriminent également la consommation de foie de sanglier non castré, il a en effet été démontré que le jeune sanglier produisait naturellement de la nandrolone (12, 13). Van Ginkel et coll. (26) trouvaient chez cet animal des taux de 23 et 200 mg/g de foie. Même, si cela semble improbable, on ne peut éliminer cette hypothèse, de la viande de porcs non castrés pouvant être introduite dans des plats cuisinés. Mareck-Engelke et coll. (19) ont montré après prise de nandrolone par voie orale (20µg), que la concentration de norandrostérone diminuait rapidement. Pour une femme, après 8 heures, on se retrouve sous la limite de détection admise (5ng/mL) et pour un homme, après 15 h (2ng/mL).

L'origine physiologique ne doit pas non plus être négligée puisque la production naturelle de nandrolone et de ses métabolites a été démontrée chez le cheval, le sanglier, les femelles gestantes (vache, brebis, chèvre). Il en est de même chez la femme enceinte (23).

De plus des préparations enzymatiques *in vitro*, de tissus riches en aromatasas permettent la production de 19 nortestostérone et de 19 norandrostenedione (follicule ovarien et placenta) (Figure 5). On peut suspecter la production de 19 norstéroïdes par d'autres tissus.

Il a été aussi démontré que dans certaines conditions, tels qu'un effort physique violent, la concentration de 19 NA pouvait être augmentée d'un facteur 3 (24). On peut donc imaginer qu'après des efforts intenses ou des périodes de déshydratation on peut obtenir des valeurs plus élevées en NA.

Les métabolites de la nandrolone (Figure 5), se retrouvent aussi après consommation de précurseurs stéroïdiens utilisés illégalement en France dans le cadre du dopage (22). Si la prise de DHEA, de 4-androsténedione, et de 5-androstenedione ne conduit pas à l'excrétion de NA et de NE, le 19-norandrosténediol et la 19-norandrosténedione produisent l'excrétion massive de NA et de NE dans des rapports variables au cours du temps. Il faut également signaler que des gélules de 4 et 5-androsténediol commercialisés au USA induisent une faible excrétion de NA et de NE dans des rapports souvent inversés et à des concentrations proches de celles observées chez des sportifs contrôlés positive-

ment (22). Dehennin et coll avaient aussi montré que la 19 norandrosténedione produisaient les mêmes métabolites que la nandrolone (18). Ceci n'est pas surprenant puisque l'on sait qu'il existe un équilibre entre testostérone et androstenedione, cet équilibre doit se retrouver sur les formes 19 déméthylées (figure 5).

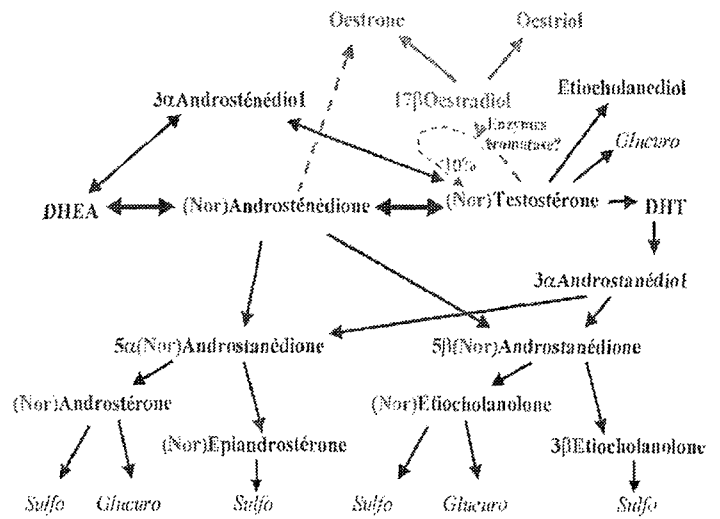


Figure 5 : Schéma métabolique simplifié des stéroïdes androgènes.

Conclusion

On peut dire que le sujet non traité par des stéroïdes anabolisants excrète dans ses urines de faibles quantités des métabolites de la 19-nortestostérone, d'origine endogène. Ce résultat devrait être confirmé sur un nombre plus important de sujets incluant des athlètes à l'entraînement et lors de compétition. De plus, on ne peut sous-estimer les effets d'une possible induction physiologique de la synthèse des 19 norstéroïdes ou l'existence de polymorphismes génétiques des enzymes impliqués dans les voies métaboliques de ces 19 norstéroïdes, qui expliqueraient l'existence possible de plus hautes concentrations de NA et de NE chez certains individus.

Il faudrait également faire la distinction entre la prise de substances venant de la viande contaminée par la nandrolone et la prise de préparations dopantes, afin d'éviter les faux positifs et la protection des athlètes. Différentes solutions ont déjà vu le jour Donike a proposé d'utiliser le rapport dans l'urine de la concentration de 19-nortestostérone sur la somme des concentrations d'androstérone et d'étiocholanolone (24). Le Bizec et Coll. (24) proposent d'utiliser le rapport 19-NA/19-NE qui a été trouvé entre 3 et 5 chez des sportifs dopés alors que dans l'urine le rapport est de 2,57 (7). Enfin l'utilisation de la spectrométrie à haute résolution devrait en utilisant les rapports isotopiques ¹³C/¹²C permettre de différencier une prise de nandro-

lone ou d'autres stéroïdes anabolisants. En effet, ce rapport pour les stéroïdes synthétiques est généralement plus bas que celui des stéroïdes endogènes correspondants (27). Ce rapport en cas de prise exogène diminuerait dans l'urine. Enfin, des études endocriniennes similaires à celles effectuées dans le cas de suspicion de prise de testostérone devraient être effectuées sur plusieurs échantillons d'urines collectés sur plusieurs jours. Si les concentrations de métabolites diminuent rapidement, on pourrait conclure à la prise de nandrolone, dont l'origine serait alimentaire. Dans le cas d'une injection de nandrolone, on ne constaterait qu'une faible variation de ces concentrations en fonction du temps (19).

Références

1. Copera H. The history of anabolic steroids and review of clinical experience with anabolic steroids. *Acta Endocrinol.* 1985 ; 271 Suppl : 11-9.
2. Frankle M.A., Cicero G.J., Payne J. Use of androgenic anabolic steroids by athletes. *J. Am. Med. Assoc.* 1984 ; 252 : 482.
3. Di Pasquale M.G. Drug use and detection in amateur sports. *MGD Press* 1984 ; 5-8.
4. Engel L.L., Alexander J., Wheeler M. *J. Biol. Chem.* 1958 ; 231 : 159-165.
5. Massé R., Laliberté C., Tremblay L., Dugal R. *Biomed. Mass. Spectrom.* 1985 ; 12 : 115.
6. Donike M ; Steroid profiling in Cologne. Proceedings of the 10th Cologne Workshop on doping analysis. 1993. 7-12 March, pp 47-68.
7. Schänzer W. Recent advances in doping analysis in Schänzer K.W., Geyer H., Gotzmannand A., Mareck-Engelke U (Eds). Proceedings of the Manfred Donike Workshop 14th Cologne Workshop on dope analysis. 1996 Sport and Buch Strauss, 1996, pp 185-201.
8. Courtot D, Guyot JL, Benoit E. Demonstration of urinary excretion of 19-nortestosterone of endogenous origin in the male horse. *C. R. Acad. Sci.* 1984 ; 299 : 139-41.
9. Houghton E., Copsey J., Dumasia M.C., Haywood P.E., Moss M.S., Teale P. The identification of C-18 neutral steroids in normal stallion urine. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984 ; 11 : 96-9.
10. Silberzahn P., Dehennin L., Zwain I., Reiffsteck A. Gas chromatography-mass spectrometry of androgens in equine ovarian follicles at ultrastructurally defined stages of development. Identification of 19-nortestosterone in follicular fluid. *Endocrinology* 1985 ; 117 : 2176-81.
11. Reznik Y., Herrou M., Dehennin L., Lemaire M., Leymarie P. Rising plasma levels of 19-nortestosterone throughout pregnancy : determination by radioimmunoassay and validation by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987 ; 64 : 1086-8.
12. Vandebroek M., Van Vyncht G., Gaspar P., Dasnois C., Delahaut P., Pelzer G., De Graeve J., Maghuin-Rogister. Identification and characterization of 19-nortestosterone in urine of meat-producing animals. *J. Chromatogr.* 1991 ; 564 : 405-12.
13. Debruyckere G., Van Peteghem C., De Brabander H.F., Debackere M. Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of 19-nortestosterone in the urine of untreated boars--effect of the administration of Laurabolin. *Vet. Q.* 1990 ; 12 : 246-50.
14. de Brabander H.F., van Hende J., Batjoens P., Hendriks L., Raus J., Smets F., Pottie G., van Ginkel L., Stephany R.W. Endogenous nortestosterone in cattle? *Analyst* 1994 ; 119 : 2581-5.
15. Meyer H.H., Falckenberg D., Janowski T., Rapp M., Rosel E.F., van Look L., Karg H. Evidence for the presence of endogenous 19-nortestosterone in the cow peripartum and in the neonatal calf. *Acta Endocrinol.* 1992 ; 126 : 369-73.
16. Clouet A.S., Le Bizec B., Montrade M.P., Monteau F., Andre F. Identification of endogenous 19-nortestosterone in pregnant ewes by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 1997 ; 122 : 471-4.
17. Dehennin L., Jondet M., Scholler R. Androgen and 19-norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: an isotope dilution-mass spectrometric study. *J. Steroid. Biochem.* 1987 ; 26 : 399-405.
18. Dehennin L., Bonnaire Y., Plou P. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1999 ; 721 : 301-7.
19. Mareck-Engelke U., Geyer H., Schänzer W. 19-norandrosterone-Criteria for the decision making process. Recent advances in doping analysis in Schänzer K.W., Geyer H., Gotzmannand A., Mareck-Engelke U (Eds). Proceedings of the Manfred Donike Workshop 14th Cologne Workshop on dope analysis. 1998 Sport and Buch Strauss, 1998, pp 119-25.
20. Debruyckere G., Van Peteghem C.H., de Sagher. Influence of the consumption of meat contaminated with anabolic steroids on doping tests. *Anal. Chim. Acta.* 1993 ; 275 : 49-56.
21. European Anabolic Update 1,2,3.XL Productions, Camberley, 1996.
22. Pépin G., Kintz P., Vayssette F., Cirimele V., Gaillard Y. Mise en évidence de norandrostérone et de norétiocinolone dans les urines de volontaires sains, après consommations de précurseurs stéroïdiens utilisés illégalement en France dans le cadre du dopage. Résumés du VII congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique. Marseille 2-3 juin 1999.
23. Jeanneau T., Kintz P., Cirimele V., Ludes. Détermination des concentrations physiologiques de la norandrosterone et de la noretiocholanolone, métabolites urinaires de la nandrolone par CPG/MS. *Toxicorama.* 1999 ; 11 : 25-29.
24. Le Bizec B., Monteau F., Gaudin I., André F. Evidence for the presence of endogenous 19-norandrosterone in human urine. *J. Chromatogr.* 1999 ; 723 : 157-72.
25. van Ginkel L.A., Stephany R.W., Zoontjes P.W., van Rossum H.J., van Blitterswijk H., Zuijndorp J. The presence of nortestosterone in edible parts from non-castrated male. *Tijdschr Diergeneeskd* 1989 ; 114 : 311-4.
26. Aguilera R., Becchi M., Mateus L., Popot M.A., Bonnaire Y., Casabianca H., Hatton C.K. Detection of exogenous hydrocortisone in horse urine by gas chromatography-combustion-carbon isotope ratio mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1997 ; 702 : 85-91.