

Validación de una metodología analítica para la determinación de cocaína y sus metabolitos en muestras de saliva por cromatografía gaseosa

Mónica Martínez
Carolina Troncoso
Isabel Riveros*
Jaime H. Rojas**

Resumen

Se presentan en este artículo los resultados obtenidos durante el desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de cocaína y sus metabolitos, benzoilecgonina y cocaetileno, en saliva por cromatografía en fase gaseosa. El método consiste en una purificación previa por extracción en fase sólida y determinación por cromatografía en fase gaseosa con detector selectivo para nitrógeno y fósforo (NPD), empleando lidocaína como estándar interno. El método es preciso, exacto y reproducible. El método validado se utilizó para la determinación de cocaína en muestras de saliva y para establecer su relación de concentraciones en sangre y saliva.

Palabras clave: Cocaína – Cromatografía en fase gaseosa – Validación – NPD.

Summary

Validation of an analytic methodology for the assay of cocaine and their metabolites in human saliva by gas chromatography

A gas liquid chromatography methodology was developed and validated for the quantitative assay of cocaine in human saliva previous a purification step by solid phase extraction. A capillary column combined with a selective nitrogen phosphorous detector were used. The method showed a good accuracy, reliability and reproducibility. The validated method was applied for the assay of cocaine in saliva with the aim to establish the relationship between the blood and saliva drug concentrations.

Key words: Cocaine – Gas liquid chromatography – Validation – NPD.

Recibido para evaluación: 16 de Agosto de 2002
Aceptado para publicación: 31 de Mayo de 2003

* Instituto de Medicina Legal.
* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.
E-mail: jhrojasb@unal.edu.co

Introducción

La cocaína clorhidrato es usada tópicamente para producir anestesia local en membranas mucosas (1,2), así como en oftalmología, aunque es generalmente reemplazada por otras sustancias con menores efectos tóxicos. El alcaloide tiene propiedades simpaticomiméticas y es un fuerte estimulante del sistema nervioso central, por lo cual se utiliza de manera ilegal en la búsqueda de efectos fisiológicos y psicotrópicos como sensación de alerta, bienestar y euforia (3). Uno de los principales metabolitos es la benzoilecgonina y cuando se ingiere junto con alcohol se encuentra además cocaetileno como metabolito. Estas sustancias se determinan de manera rutinaria en el Instituto de Medicina Legal por cromatografía gaseosa, por lo cual se hace necesario validar el método empleado.

La cocaína, al igual que sus metabolitos, ha podido ser determinada en variadas matrices como orina, sangre, hígado, cerebro y cabello, empleando diferentes técnicas instrumentales (4-8). El empleo de saliva como matriz ha cobrado bastante importancia para la determinación de fármacos y de sustancias cuyo uso está prohibido y penalizado. Esta matriz permite además establecer la relación de concentraciones matriz y sangre (S/P), con la cual una vez conocida la concentración en saliva puede conocerse la concentración en sangre con una buena aproximación (4, 6, 7, 9).

Parte experimental

Equipos

Cromatógrafo NPD/FID 6890 Hewlett Packard con automuestreador, evaporador Rapidvap Labconco, cartuchos LichroLut TSC® y Narc-2®, Columna capilar HP-1 30m x 0.25 mm ID (100% metildisiloxano)

Reactivos

Estándares secundarios de cocaína clorhidrato (COC), benzoilecgonina (BE), cocaetileno (COCET), lidocaina clorhidrato. Como reactivos RA se emplearon anhídrido heptafluorobutírico, hexafluoroisopropanol, acetato de etilo, ácido acético, ácido cítrico, diclorometano, dimetilformamida, amoníaco, isopropanol, metanol, sulfato de sodio anhidro.

Extracción en fase sólida

Antes de proceder a la estandarización y validación del sistema de separación cromatográfico, con el propósito de purificar la muestra, fue necesario estandarizar el proceso previo de extracción en fase sólida para lo cual se realizaron algunas variaciones a los procesos indicados en la literatura (10,11). La muestra o el blanco de saliva, adicionada del estándar interno, se ajustó a pH 4 con ácido acético y luego de proceso de mezcla y centrifugación, se dejó en contacto 5 minutos con el cartucho de extracción previamente activado. El cartucho se lavó con 2 mL de ácido acético 0.01N y 100 mL de metanol, luego de lo cual se procedió a la elución de las sustancias con 6 mL de una mezcla de diclorometano-isopropanol 85:15, adicionada de hidróxido de amonio al 2%.

Derivatización

El eluato se evaporó a 60°C y la derivatización de la benzoilecgonina se realizó con 50 µL de hexafluoroisopropanol y 50 µL de anhídrido heptafluorobutírico, modificando ligeramente uno de los procedimientos indicados en la literatura (10). El residuo se reconstituyó en 100 µL de acetato de etilo para proceder luego a la determinación por cromatografía gaseosa empleando un detector NPD y las temperaturas

indicadas en la Tabla 1. Como gas de arrastre se utilizó helio con un flujo de 1 mL/min.

Tabla 1. Programa de temperatura del sistema.

Nivel 1	30 °C/min	230 °C	1 min
Nivel 2	2 °C/min	235 °C	2.5 min
Nivel 3	30 °C/min	290 °C	6 min

Estudios de estabilidad

El objetivo del estudio fue el de observar el comportamiento de las soluciones de trabajo y de la matriz durante cierto periodo de tiempo de acuerdo a su almacenamiento. Las soluciones estándar almacenadas a -20°C , de acuerdo a los cromatogramas obtenidos, no indican mayor inestabilidad de las sustancias. A nivel de la tercera semana el descenso en la concentración fue de 3.7% para benzoilecgonina, 8.11 % para cocaína y 6.43% para cocaetileno. La concentración del estándar interno establecida por HPLC (12) se mantuvo en el 100% durante el mismo periodo y bajo las mismas condiciones. Por el método estandarizado de cromatografía gaseosa no se observaron señales adicionales para la lidocaina. Respecto de la matriz blanco de saliva, ésta se conserva estable durante un mínimo de 6 meses almacenada a -20°C .

La matriz fortalecida con los analitos de interés almacenada a -20°C durante tres meses no presentó signos de descomposición, al contrario de las muestras almacenadas a la misma temperatura y sometidas cada quince días a ciclos de congelamiento y descongelamiento, tiempo de custodia de las muestras forenses. En este caso la descomposición alcanzó 12.39% para la benzoilecgonina, 10.94% para la cocaína y 10.68% para el cocaetileno.

En cuanto a la estabilidad de los analitos en el automuestreador, un descenso significativo se alcanzó con la benzoilecgonina al cabo de seis horas y cuarenta minutos (79.60% remanente)

y descomposiciones de 54.90, 5.62 y 6.54% al cabo de quince horas para la benzoilecgonina, cocaína y cocaetileno respectivamente.

Estos estudios se realizaron teniendo en cuenta las recomendaciones de la FDA para la validación de métodos bioanalíticos.

Resultados y discusión

En la Figura 1 se presenta el cromatograma obtenido bajo las condiciones y programa de temperatura estandarizados. En el cromatograma se puede observar la resolución adecuada del sistema cromatográfico e ilustra la selectividad del mismo, selectividad previamente demostrada frente al acetato de etilo, a la matriz de la muestra y a sustancias como caféina, nicotina, acetaminofen, ibuprofeno y ácido acetilsalicílico, sustancias que en un momento dado han podido ser ingeridas y que se pueden encontrar en la saliva (13). El valor de resolución más bajo obtenido fue de 3.67 para la pareja cocaína y una interferencia de la matriz, valor que indica una resolución superior a 100%.

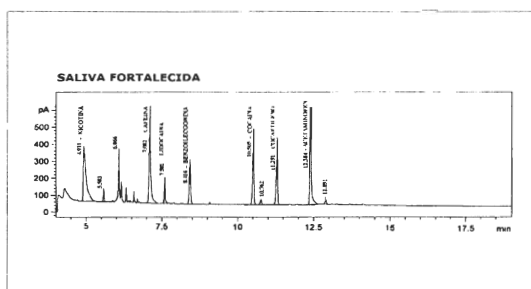


Figura 1. Cromatograma obtenido con una muestra de saliva adicionada de los analitos y del estándar interno.

Los tiempos de retención obtenidos fueron 7.80, 8.42, 10.50 y 11.29 minutos para el estándar interno, benzoilecgonina, cocaína y cocaetileno respectivamente.

Linealidad. La linealidad tanto del sistema como del método se evaluó a 6 niveles de concentración comprendidos entre 0.50 y 15.00 $\mu\text{g/mL}$

para cada uno de los tres analitos. Cada concentración se preparó por triplicado y se inyectó por duplicado. El estándar interno se utilizó a una concentración equivalente a 1.0 µg/mL. En la Tabla 2 se presentan las ecuaciones obtenidas para las diferentes rectas luego del ajuste por mínimos cuadrados y en la Figura 2, la representación gráfica para los tres analitos en la matriz de saliva.

Tabla 2. Ecuaciones para las rectas de regresión del sistema y del método.

Sustancia	Sistema	Método
BE	$Y = 0.193x + 0.0388, R^2 : 0.997$	$y = 0.173x + 0.0189, R^2 : 0.996$
COC	$Y = 0.405x + 0.0386, R^2 : 0.996$	$y = 0.345x + 0.0530, R^2 : 0.998$
CO CET	$Y = 0.481x + 0.0108, R^2 : 0.999$	$y = 0.173x + 0.0183, R^2 : 0.999$

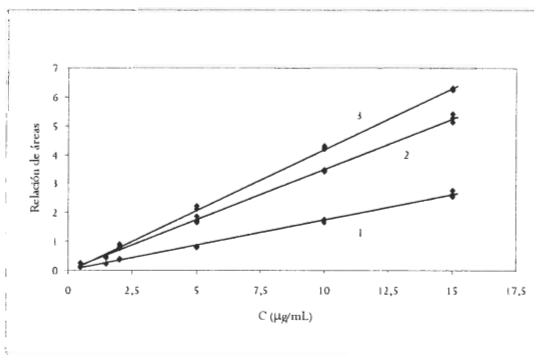


Figura 2. Curvas de calibración para el método: 1. Belzoileconina, 2. Cocaína, 3. Cocaetileno.

En todos los casos, los valores de *t* de Student para los interceptos indicaron valores no significativamente diferentes de cero y para las pendientes valores significativamente diferentes

de cero. El análisis de varianza de la regresión indica una regresión significativa y un desvío no significativo de la linealidad para las tres sustancias en el sistema y en el método.

Precisión y exactitud. La precisión del sistema y del método se evaluó al nivel de repetibilidad y de precisión intermedia para cada uno de los tres analitos, utilizando concentraciones equivalentes a 2, 5 y 10 µg/mL. Para la precisión intermedia se estudió el efecto del día y del analista. Los coeficientes de variación encontrados no fueron en ningún caso superiores a 9.96%, valor no mayor al aceptado generalmente para metodologías bioanalíticas (14).

Los resultados de la exactitud se indican en la Tabla 3, al igual que los valores de los porcentajes de recuperación, criterio que generalmente se toma como estimador de exactitud.

Los valores encontrados para las sustancias se encuentran dentro de las especificaciones establecidas para la exactitud de metodologías bioanalíticas (14).

Límites de Detección y de Cuantificación. La concentración mínima cuantificable para los analitos se estableció como el primer punto de la curva de calibración, nivel de concentración que cumple con los criterios de exactitud y precisión y al cual no se encontró interferencia por parte de los componentes

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud y de recuperación de los analitos en estudio.

Analito	2 µg/mL		5 µg/mL		10 µg/mL	
	% Exactitud	% Recuper.	% Exactitud	% Recuper.	% Exactitud	% Recuper.
BE	90.68	89.08	85.52	80.16	88.00	87.80
COC	98.64	89.96	89.33	82.03	94.57	84.14
CO CET	96.60	87.67	94.31	85.76	90.71	88.00

endógenos de la saliva, según las recomendaciones de las normas borrador de la FDA (12).

Los límites de detección determinados mediante observación visual de los cromatogramas se establecieron como 0.2, 0.3 y 0.35 $\mu\text{g/mL}$ para la benzoilecgonina, cocaína y cocaetileno respectivamente.

Solidez. Las variables consideradas para el estudio de solidez del método se indican en la Tabla 4. El análisis de los resultados se realizó según el método de Youden y señalado por Quattrochi (15). Se realizaron 8 experimentos que combinaron los factores de la tabla. Para todas las variables estudiadas se calculó el producto de la desviación estándar del estudio de

repetibilidad a 10 $\mu\text{g/mL}$ por la raíz cuadrada de 2, valor que se comparó con la diferencia observada entre los dos niveles de la variable estudiada.

Como factores encontrados no críticos se señalan:

Benzoilecgonina: 1, 3, 4, 6 y 7.

Cocaína: 6.

Cocaetileno: 6 y 7.

Los demás factores son señalados como críticos y deben controlarse muy bien durante la determinación.

Aplicaciones. Con el fin de comprobar experimentalmente la utilidad y confiabilidad de la metodología validada, se recolectaron

Tabla 4. Parámetros estudiados en la solidez del método.

Variable	Factor estandarizado	Factor alternativo
1. pH del solvente de extracción	4.00	3.70
2. Cartucho de extracción	Lichrolut TSC® Merck	Narc-2® JT Baker
3. Tiempo transcurrido hasta la derivatización	Inmediata	24 horas
4. Tiempo transcurrido en la derivatización	30 minutos	10 minutos
5. Características de la derivatización	Con agitación	Sin agitación
6. Tiempo transcurrido hasta la reconstitución	Inmediata	24 horas
7. Tiempo transcurrido hasta la inyección	Inmediata	6 horas

Tabla 5. Resultados de la relación S/P para cocaína y benzoilecgonina.

Analito	Caso	Sangre $\mu\text{g/mL}$	Saliva $\mu\text{g/mL}$	Relación S/P exp
BE	1	0.40	1.08	2.69
	2	0.56	1.08	1.91
	3	0.21	0.61	2.89
	4	0.60	1.62	2.71
	5	3.33	9.31	2.80
COC	1	1.75	1.90	1.09
	2	1.14	1.35	1.18
	3	1.41	1.71	1.21
	4	1.86	2.25	1.21
	5	4.79	6.34	1.32

Tabla 6. Resultados de la determinación de COC y BE en sangre a partir de la relación S/P.

Caso	Concentraciones en $\mu\text{g/mL}$					
	COC en saliva	COC teórica en sangre	COC experimental en sangre	BE en saliva	BE teórica en sangre	BE experimental en sangre
6	0.704	0.587	0.607	0.706	0.272	0.210
7	1.000	0.833	0.695	0.636	0.245	0.202

muestras de sangre y saliva a cinco voluntarios hombres declarados consumidores habituales de cocaína (bazuco). En la Tabla 5 se presentan los resultados de concentración obtenidos con una determinación para benzoilecgonina y cocaína en sangre y saliva, al igual que los valores respectivos de la relación saliva/sangre, S/P.

En todos los casos la toma de la muestra se realizó 4 horas después del último consumo, a excepción del caso 3, donde la toma se hizo 4.5 horas después. Para la determinación en sangre se siguió la metodología indicada en la bibliografía (11). El caso 5 fue el único en el cual se encontró cocaetileno.

El valor medio de la relación S/P obtenido experimentalmente con los cinco casos, se empleó para calcular la concentración aproximada en sangre en dos casos adicionales. Estas concentraciones teóricas se compararon con los resultados obtenidos en el análisis de sangre (Tabla 6).

Conclusiones

Se desarrolló y validó un método de análisis preciso, exacto, y reproducible para la determinación cuantitativa de cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno en muestras de saliva por cromatografía gaseosa. El método permite la determinación selectiva de los analitos, sin ninguna interferencia entre sí ni con los componentes endógenos de la matriz. La determinación de cocaína en saliva por el método validado permite junto con el valor de la relación S/P, el cálculo

aproximado de su concentración en sangre, con lo cual la saliva puede constituirse en una matriz alternativa no invasiva para tal propósito.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Medicina Legal por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

Bibliografía

1. W. Catterall y K. Mackie, en "Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Ed. J.G. Hardman, Mc Graw Hill Interamericana, Attampa, 1996, vol. 1, pp. 353-371
2. The United Nations Division of Narcotics Drugs, Recommended Methods for testing cocaine, United Nations, 1986, vol. 85, 4-5.
3. P.I. Jatlow, Drug of abuse profile: Cocaine, *Clin. Chem.*, **33**, 66B (1987).
4. K. Clauvert W. Lambert y A. DeLeenheer, High performance liquid chromatographic determination of cocaine and its main metabolites in biological samples: a review, *J. Liquid Chromatogr.*, **18**, 2097 (1995).
5. E.J. Cone y W.W. Weddington, Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use, *J. Anal. Toxicol.*, **13**, 65 (1989).

6. A. Verstraete, Laboratorium voor Klinische Biologie-toxicologie, Universitair Ziekenhuis, Belgium, mediante comunicación personal por e-mail, 1999.
7. United Nations International Drug Control Programme, "Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Saliva", United Nations, **98**, 15 (1998).
8. A. Jeffcoat, M. Pérez-Reyes, J.M. Hill, M. Sadler y C.E. Cook, Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting) or smoking, *Drug Metab. Disposit.*, **17**, 153 (1988).
9. E.J. Cone, Saliva testing for drugs of abuse, *Ann. NY. Acad. Sci.*, **694**, 91 (1993).
10. A.J. Jenkins, J.M. Oyler y E.J. Cone, Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma, *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 359 (1995).
11. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Procedimiento estandarizado de trabajo: Análisis cualitativo y cuantitativo de cocaína y sus metabolitos (benzoilecgonina, cocaetileno, ecgonina-metiléster y ecgonina) a partir de microextracciones de sangre y orina en columnas de fases mezcladas LichroLut TSc y posterior estudio por cromatografía de gases / detector nitrógeno-fósforo, 1999.
12. The United States Pharmacopeia, The U.S. Pharmacopeial Convention Inc., USP 24, National Publishing, Rockville MD, 2000, p. 970.
13. M. Martínez y C. Troncoso, "Validación de una Metodología Analítica para la Determinación de Cocaína y sus Metabolitos a partir de Muestras de Saliva por Cromatografía de Gases", Tesis de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2000.
14. Guidance for Industry, "Bioanalytical Methods Validation for Human Studies", U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1998.
15. O.A. Quattrochi, R.F. Laba y S.I. Belaira, "Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Aplicación y Práctica", Ed. Artes Gráficas Ferrosa, Buenos Aires, 1992.