

Análisis Forense Ultra-Sensible de Cocaína y sus Metabolitos en Muestras de Cabello

Utilizando el instrumento QTRAP® 6500+ LC-MS/MS

Janna Anichina¹, Oscar G. Cabrices², Sean Orłowicz³, Laura Snow³, Pierre Negri²
SCIEX, Concord, Canada; ²SCIEX, Redwood City, USA; ³Phenomenex, Torrance, USA

La cocaína es una de las drogas recreativas de la que se abusa más comúnmente, con un estimado de consumidores de 16.5 millones de personas, el equivalente al 0.35% de la población mundial.¹ La detección de su consumo se puede realizar en diversas matrices biológicas, como son: sangre, orina, fluidos orales y cabello. Si bien la orina y los fluidos orales son muy útiles para la determinación de la cocaína a corto plazo, las muestras de cabello se han vuelto extremadamente valiosas para determinar el uso a largo plazo. Beneficios adicionales de las pruebas de cabello incluyen pero no se limitan a: (1) Extracción de la muestra fácil y no invasiva, (2) Ausencia de requerimientos de almacenamiento, y (3) estabilidad a largo plazo con un mínimo de riesgo de degradación con el paso del tiempo.

La presencia de cocaína y sus metabolitos en el cabello indica el uso activo de la droga. Sin embargo, existen dos desafíos analíticos principales asociados con la detección de la cocaína y sus metabolitos en la muestra de cabello: (1) baja concentración de estos compuestos y (2) gran cantidad de interferencias de la matriz asociadas con las muestras de cabello.

Presentamos un flujo de trabajo analítico sensible y confiable que combina el uso del instrumento QTRAP 6500+ LC-MS/MS con una extracción en fase sólida (SPE) para una detección del orden de picogramos de cocaína y metabolitos por mg de cabello. Se demuestra que este método para cuantificar la cocaína y sus metabolitos proporciona ventajas únicas en la capacidad de maximizar la selectividad al confirmar y cuantificar metabolitos a una baja concentración en cabello.

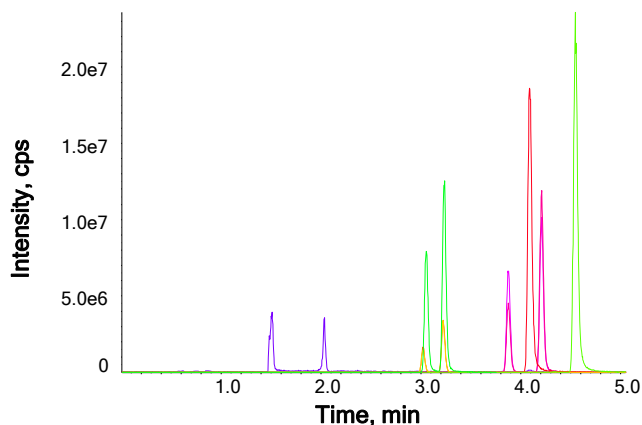


Figura 1: Detección Sensible de Cocaína y sus 10 Metabolitos en Cabello utilizando el sistema QTRAP® 6500+ LC-MS/MS. Detección de cocaína y sus 10 metabolitos en cabello a 0.05 ng/mg de cabello.



Principales ventajas del instrumento QTRAP® 6500+ LC-MS/MS con SPE

- La tecnología IonDrive™ del QTRAP® 6500+ proporciona mejoras en la eficiencia de ionización, y de muestreo de iones, así como un amplio rango dinámico de detección para una alta sensibilidad.
- Identificación y confirmación simultánea de drogas ilícitas y sus metabolitos a través de la adquisición de datos completos de MS/MS de escaneo (Enhanced Product Ion (EPI)) y búsqueda automatizada de la biblioteca de MS/MS).
- La preparación de muestras optimizada con SPE proporciona un método robusto y fácil de implementar para el análisis selectivo de los niveles traza de cocaína y sus metabolitos en cabello.
- La cromatografía optimizada permite la separación de la cocaína y sus metabolitos en menos de 5 minutos con un alto nivel de selectividad.
- Generación automatizada de curvas lineales óptimas utilizando el software SCIEX OS 1.4 que permite una menor intervención manual y una rápida identificación de valores atípicos.

Método

Preparación y digestión de muestras de cabello: Las muestras de cabello son lavados de acuerdo con el procedimiento de laboratorio aceptado, se secaron y se cortaron en segmentos de ~ 2 mm de longitud. Aproximadamente 20 mg de cada muestra de cabello se transfirieron a un recipiente adecuado y sellado con tapa. A cada recipiente se adicionó 1 mL de 0.1 N HCl. Los recipientes fueron incubados toda la noche a 45 ° C para tener una digestión completa de las muestras de cabello. Al día siguiente, se retiran los recipientes de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 10 µL de estándar interno (IS) a 800 µL de la solución extraída de cabello, y se procedió a mezclar completamente. Las soluciones resultantes se sometieron a una extracción en fase sólida usando cartuchos de Phenomenex Strata®-X-C, 30 mg/3mL (Part No. 8B-S029-TBJ) de acuerdo con el procedimientos mostrados en la Figura 2.

Condiciones cromatográficas: La separación en HPLC se realizó con una columna Phenomenex KinetexBi phenyl (100 x 3 mm, 2.6 µm, 00A-4723-AN) en un instrumento SCIEX ExionLC™ AC. La Fase móvil A (MPA) y Fase móvil B (MPB) fueron 0.1% de ácido fórmico en agua y metanol respectivamente. El flujo del HPLC fue de 600 µL/min, la temperatura de la columna fue de 30 ° C, y el tiempo de corrida total fue menor a 5 minutos.

Condiciones MS/MS: Se utilizó un instrumento SCIEX QTRAP® 6500+ con una fuente de ionización IonDrive™ Turbo V y la sonda de Electrospray Ionization (ESI). La cocaína y sus 10 metabolitos fueron detectados utilizando dos transiciones MRM por compuesto para realizar la cuantificación e identificación con base en la relación de las transiciones MRM cuantificadoras y calificadoras (Tabla 3).

Condition 1	•1 mL EtOAc/MeOH/28-30% NH ₄ OH (70:20:10)
Condition 2	•1 mL Methanol
Equilibrate	•1 mL Water
Load	•Pre-treated sample
Wash 1	•1 mL 0.1N HCl
Wash 2	•1 mL Methanol
Dry	•10 min at high vacuum (~10" of Hg)
Elute	•2 x 500 µL EtOAc/MeOH/28-30% NH ₄ OH (70:20:10)
Add	•50 µL of 0.1N HCl to elute
Dry Down	•Evaporate to dryness under nitrogen at 40-45°C
Reconstitute	•200 µL of initial mobile phase

Figura 2: Flujo de trabajo de la Extracción en Fase Sólida (SPE) de Intercambio Aniónico (SAX) Utilizando cartuchos de 30 mg/3mL Strata®-X-C de Phenomenex. Se desarrolló y optimizó un protocolo de 11 pasos para extraer selectivamente cocaína y sus metabolitos de muestras de cabello para realizar su análisis con el sistema QTRAP® 6500+ LC-MS/MS.

Los parámetros de la fuente de ionización se proporciona en la Tabla 1. Los voltajes dependientes del compuesto: Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Energy (CE) y Collision Cell Exit Potential (CXP) fueron optimizados para cada transición y se encuentran representados en la Tabla 3.

Tabla 1. Condiciones de la Fuente de Ionización.

Parámetro	Valor
Curtain gas (CUR)	30
Collision gas (CAD)	8
IonSpray Voltage (IS)	4500 V
Temperature (TEM)	600 °C
Ion Source Gas 1 (GS1)	60
Ion Source Gas 2 (GS2)	20

Separación de Isómeros

Tras la ingestión, la cocaína se absorbe rápidamente y se descompone en el cuerpo en varios metabolitos. La detección e identificación de estos metabolitos es primordial para garantizar la cuantificación correcta de la cocaína. La existencia de análogos isoméricos dentro del panel de metabolitos de cocaína agrega un nivel adicional de complejidad al ensayo ya que estos análogos no tienen fragmentos únicos que puedan usarse para la detección. Por lo tanto la separación cromatográfica de estos análogos es crítica para la identificación y cuantificación confiables, y por lo tanto fue uno de los objetivos de este estudio.

La separación cromatográfica óptima se logro mediante el uso de una columna de Kinetex® Biphenyl (100 x 3 mm, 2.6 µm, 00A-4723-AN) de Phenomenex, que permitió una mejor retención y selectividad de los analitos más polares en todo el gradiente. La columna se mantuvo a una temperatura de 30 ° C durante el transcurso del experimento. La columna junto con una fase móvil optimizada produjo la separación necesaria para distinguir correctamente todos los isómeros de la cocaína. Esta separación cromatográfica se optimizó para un ensayo MRM, pero también se puede usar en el instrumento X500R QTOF, para técnicas de detección o confirmación adicionales. La Figura 3 muestra la separación de isómeros de Benzoilecgonina y Norcocaína, los isómeros de p-OH-OOC, m-OH-OOC and o-OH-OOC y la separación de p-OH-BZE and m-OH-BZE, todos metabolitos de cocaína.

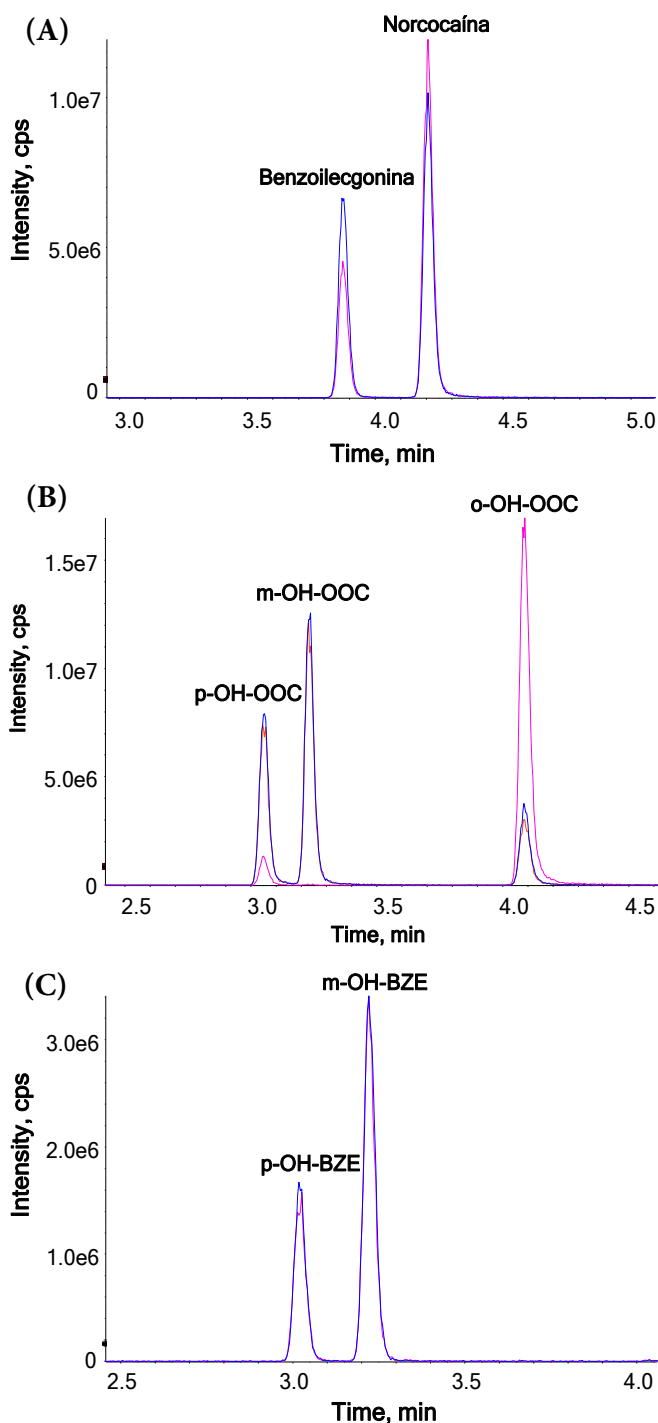


Figura 3: Ejemplos de Separación de isómeros específicos de metabolitos de cocaína. (A) Separación de los isómeros Benzoilecgonina y Norcoocaína. (B) Separación de los isómeros p-OH-OOC, m-OH-OOC and o-OH-OOC. (C) Separación de los isómeros p-OH-BZE and m-OH-BZE. Estos cromatogramas individuales muestran la separación isomérica y fueron extraídos del cromatograma completo que se muestra en la Figura 1 que incluye el panel completo de analitos analizados en este estudio.

Recobro y Efectos de la Matriz

El cabello es una matriz compleja que puede representar un problema al detectar analitos a bajas concentraciones. Los procedimientos de extracción sólidos y confiables son críticos para lograr la reproducibilidad deseada, una buena respuesta lineal y límites de cuantificación. Para evaluar las recuperaciones de los analitos utilizados en este experimento, el recobro (RE) y el efecto de la matriz (ME) se calcularon usando 0.005 ng/mg de cada estándar interno. Siendo (A) las áreas de pico obtenidas de los estándares en solución. (B) el área de los picos correspondientes a los estándares internos fortificados después de la extracción en las muestras de cabello, y (C) las áreas de los picos de los estándares internos antes de la extracción, los valores de RE y ME se calculan de la siguiente forma:

$$RE (\%) = C/B \times 100 \quad (1)$$

$$ME (\%) = B/A \times 100 \quad (2)$$

Los procedimientos de extracción demostraron excelentes recobros de los analitos de interés como se muestra en la Figure 4.

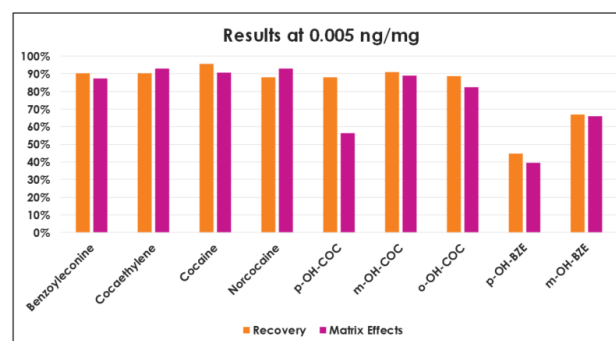


Figura 4: Recobro (RE) y Efecto de la Matriz (ME) Calculado para la Cocaína y sus Metabolitos utilizando 0.005 ng/mg de cada Estándar Interno. En color naranja se muestra el recobro obtenido para cada uno de los metabolitos (benzoilecgonina, norcoocaína, p-CH-OOC, m-CH-OOC, o-CH-OOC, p-OH-BZE, y m-OH-BZE) y en rosa el efecto matriz observado en cada uno de ellos.

Rendimiento analítico del Sistema SCIEX QTRAP 6500+ LC-MS/MS

Siguiendo el procedimiento de SPE, se inyectaron 10 μ L de la solución reconstituida para cada compuesto. Se generaron curvas de calibración para cada uno de los compuestos para determinar los límites de cuantificación (LOQ). Los resultados demostraron una excelente linealidad de las curvas de regresión generadas, que cubren un rango dinámico lineal de 3 a 4 órdenes de magnitud; coeficientes de variación (Cs) dentro del 10% y una buena exactitud. La relación señal/ruido encontrada en el LLOQ varía del 10 a 50. La Tabla 2 resume los límites de cuantificación (LLOQ) de cocaína y su panel de metabolitos. La Figura 5 muestra la imagen de algunas curvas de calibración representativas y las estadísticas de cuantificación generadas usando este método integral.

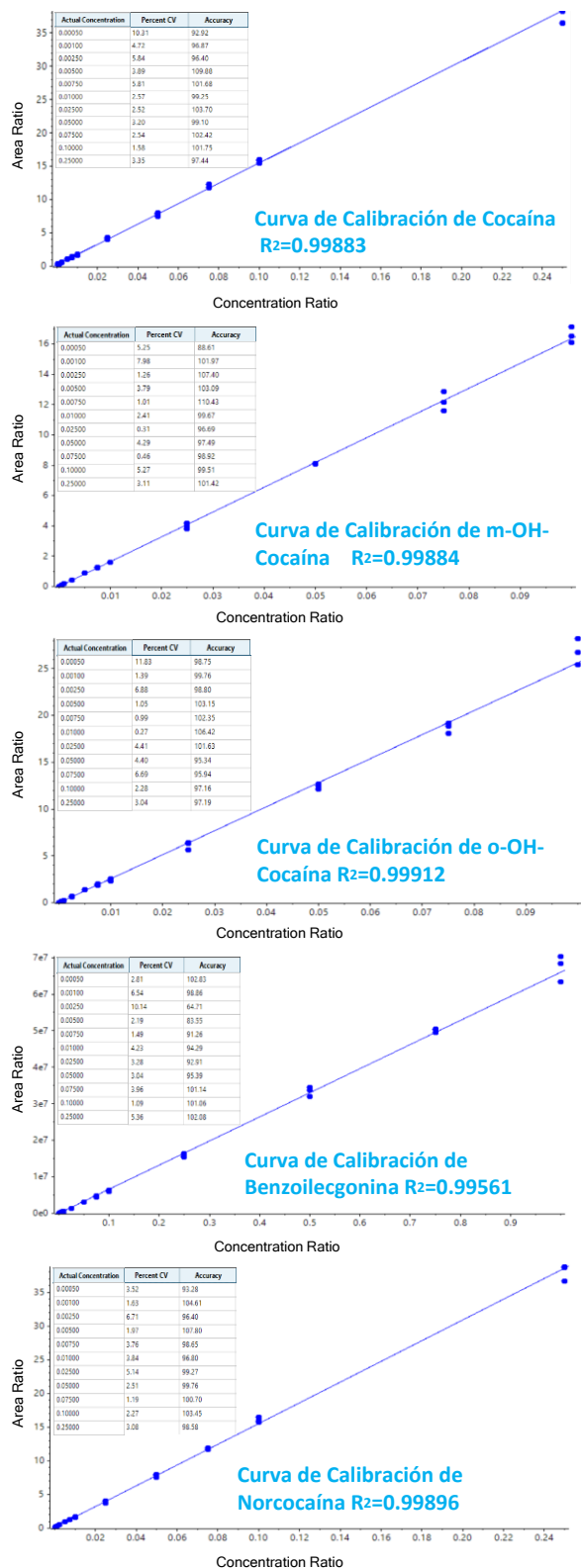


Figura 5: Se obtuvo una excelente linealidad para Cocaina y sus Metabolitos. Las curvas de calibración e información estadística se muestran para Cocaina, m-OH-Cocaina, o-OH-Cocaina, Benzoilecgonina y Norcoocaína. Los valores de R² fueron iguales o superiores a 0.9990 para todos los analitos utilizados en el método integral.

Tabla 2. Límites Inferiores de Cuantificación (LLOQ) para Cocaina y sus Metabolitos Principales

Analito	LLOQ (ng/mg)
Ecgonina	0.05
Éster metílico de ecgonina	0.0025
Benzoilecgonina	0.001
Norcoocaína	0.0005
Cocaina	0.0005
p-OH-Benzoilecgonina	0.01
m-OH-Benzoilecgonina	0.01
Cocaílileno	0.0001
m-OH-Cocaina	0.00005
o-OH-Cocaina	0.00005
p-OH-Cocaina	0.001

Confirmación mediante un escaneo MS/MS

El espectro de masas de SCIEX QTRAP 6500+ es un híbrido entre un triple cuadrupolo lineal y una trampa de iones lo que permite cambiar fácilmente entre escaneos cuantitativos de MRM y escaneos cualitativos en la trampa. Para este experimento, el método utiliza un Survey Scan MRM (Tabla 3) seguidos de dos escaneos EPI (full scan MS/MS) que se activa cuando se detecta la señal para una transición MRM específica. Los espectros MS/MS de exploración completa adquiridos contienen la huella molecular completa de la cocaína y sus metabolitos, que pueden ser buscados en las librerías espectrales para confirmar la detección. Este enfoque proporciona una cuantificación de alta sensibilidad con confirmación del compuesto a través de las librerías, lo que reduce significativamente el riesgo de un falso positivo en las muestras desconocidas.

Usando este método integral, se identificaron la cocaína y sus metabolitos, y se logró la cuantificación mediante la búsqueda en librerías MS/MS. La Figura 6 muestra los resultados típicos de la búsqueda en las librerías MS/MS.

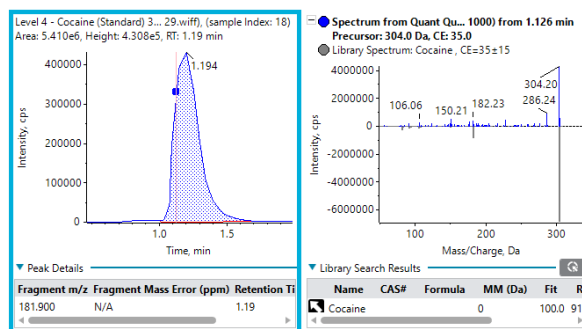


Figura 6: Resultados típicos de una búsqueda en librerías MS/MS Utilizando SCIEX OS Software 1.4. Ejemplo de la búsqueda en las librerías MS/MS para el estándar en solución de Cocaina preparada al fortificar un extracto de cabello.

Conclusiones

La combinación de un procedimiento de extracción en Fase Sólida (SPE) y una cromatografía optimizada en el instrumento QTRAP 6500+ altamente sensible permitió la detección eficaz y sensible de los niveles traza de cocaína y sus metabolitos (0.05 pg/mg) en muestras de cabello, facilitando el flujo de trabajo adaptable a un laboratorio de toxicología forense.

- Un protocolo de extracción de 11 pasos que usa SAX SPE puede implementarse y optimizarse rápidamente para el análisis selectivo de la cocaína y sus metabolitos.
- Se logró optimizar una separación cromatográfica de la cocaína y sus metabolitos con un alto nivel de selectividad utilizando una columna Kinetex Biphenyl de Phenomenex para una corrida menor a 5 minutos.
- Se demostró que los recobros en la extracción de los analitos son superiores al 80 %, lo que permite que el flujo de trabajo analítico presente límites de cuantificación inferiores a pg/ mg (LLOQ) de matriz de cabello para los dos isómeros de hidroxicoína.
- La cuantificación exitosa de la cocaína y sus metabolitos se realizó utilizando el software SCIEX OS 1.4 que permite el procesamiento de datos de forma exacta a una concentración a nivel de trazas (0.05 pg/mg) en muestras de cabello.
- El flujo de trabajo mostró una exactitud (>95%) y una precisión (<15%), con una excelente linealidad que resultó en valores de R^2 de 0.9990 para todos los analitos.
- Además de la cuantificación el instrumento QTRAP 6500+ permitió la identificación y confirmación simultánea de cocaína y sus metabolitos mediante la adquisición de datos MS/MS y el uso de búsquedas automáticas en la librería MS/MS.

Referencias

1. Peacock A, Leung J, Larney S, Colledge S, Hickman M, Rehm J, et al. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*. 2018. DOI: 10.1111/add.14234.

Table 3. Transiciones MRM de Cocaína y sus Metabolitos, Parámetros de Optimización que Dependen del Compuesto

Analito	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
BZE_1	290.2	168.1	65	10	25	10
BZE_2	290.2	105	65	10	36	10
Norcocaína_1	290.2	168	50	10	21	10
Norcocaína_2	290.2	136.1	50	10	30	10
Cocaína_1	304.2	182.2	70	10	26	10
Cocaína_2	304.2	82.1	70	10	35	10
Cocaína_3	304.2	105	70	10	37	10
Ecgonina_1	186.2	168.1	60	10	23	10
Ecgonina_2	186.2	100.3	60	10	31	10
EME_1	200.201	182.1	45	10	23	10
EME_2	200.201	82.1	45	10	32	10
p-OH-BZE_1	306.1	168.1	70	10	26	10
p-OH-BZE_2	306.1	186.1	70	10	27	10
m-OH-BZE_1	306.102	168.1	80	10	27	10
m-OH-BZE_2	306.102	121.1	80	10	35	10
Cocaetileno_1	318.2	196.1	50	10	26	10
Cocaetileno_2	318.2	82.1	50	10	37	10
m-OH-COC_1	320.1	182.1	70	10	27	10
m-OH-COC_2	320.1	82.1	70	10	42	10
o-OH-COC_1	320.101	200.1	50	10	27	10
o-OH-COC_2	320.101	182.1	50	10	37	10
p-OH-COC_1	320.102	182.2	80	10	26	10
p-OH-COC_1	320.102	82.1	80	10	44	10

Solo para Investigación. No Utilizar en Procedimientos de Diagnóstico. Las marcas registradas y/o marcas registradas mencionadas en este documento son propiedad de AB Sciex Pte. Ltd. o sus respectivos propietarios en los Estados Unidos y/o en otros países

AB SCIEX™ es utilizado bajo licencia. © 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. Número de Documento: Related to RUO-MKT-02-8538-A



Headquarters
 500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
 Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales
 For our office locations please call the division
 headquarters or refer to our website at
sciex.com/offices