

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ETILGLUCURÓNIDO
EN MUESTRAS DE ORINA
VALIDATION OF A METHOD TO DETERMINE ETHYLGLUCURONIDE IN
SIGNS OF URINE**

Deamelys Hernández-Domínguez¹, Margarita Teresa Correa-Vidal¹, Rodny Montes de Oca-Porto¹, Mario Granda-Fraga¹

¹Laboratorio Antidoping, Instituto de Medicina del Deporte

RESUMEN

El ácido etil- β -D-6-glucurónico (EtG) es un metabolito estable fase II del etanol que puede ser detectado en muestras de orina varios días después de la eliminación del etanol. Este artículo describe un método para detectar EtG en muestras de orina humana. El método se basa en una extracción en fase sólida de la matriz y un posterior análisis de derivados trimetilsilil por CG-EM. El método fue selectivo y preciso, los análisis intra e inter-ensayos arrojaron un coeficiente de variación de 2.4% y 4.5% respectivamente. La prueba de arrastre fue negativa y el límite de detección de técnica fue 0.2 μ g/mL.

Palabras Claves: ácido etil- β -D-6-glucurónico, derivados trimetilsilil, La prueba de arrastre.

ABSTRACT

Beta-D-ethylglucuronide (EtG) is a stable phase II metabolite of ethanol which can be detected in urine samples several days after elimination of ethanol. This paper describes a method developed to detect EtG in human urine samples. It was based on a solid phase extraction and analysis by GC-MS after the formation of trimethylsilyl derivatives. The implemented method was selective and precise intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.4 % and 4.5 %, respectively. Carryover test was negative and detection limit was set at 0.2 μ g/mL.

Key Words : Beta-D-ethylglucuronide, trimethylsilyl derivatives, Carryover test

INTRODUCCIÓN

El ácido etil- β -D-6-glucurónico⁽¹⁾ o Etilglucurónido (EtG Figura1) es un metabolito directo del etanol, no volátil y muy soluble en agua el cual puede ser detectado en fluidos biológicos, tejidos y cabellos.

El proceso de detoxificación de eliminación de alcohol vía conjugación con el ácido glucurónico fue descrito por primera vez por Neubauer en 1901, esta vía representa alrededor del 0.5% del total de eliminación etanol ⁽²⁾

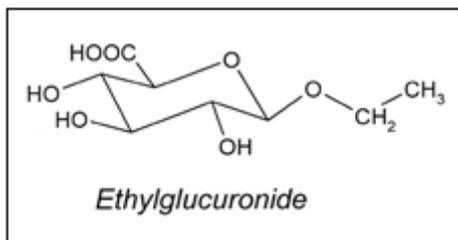


Figura1: Estructura del Etilglucurónido (ETG).

El EtG es un metabolito minoritario del etanol, sólo un 0,02-0,06% se puede encontrar en la orina ⁽³⁾. Se forma principalmente en el retículo endoplásmico de las células hepáticas y, en menor proporción, en las células de la mucosa intestinal y del pulmón, mediante una reacción de glucuronidación entre el etanol y ácido glucurónico, que fue descrita en primer lugar por Neubauer en 1901⁽²⁾ y está catalizada por las enzimas UDP-glucuronosil transferasas (UGT), siendo las isoformas UGT 1A1 y UGT 7B2 las más activas en los microsomas hepáticos ⁽³⁾.

EtG es un metabolito que se puede detectar en fluidos biológicos durante largos periodos de tiempo después de la total eliminación del etanol del organismo. El tiempo de vida media en sangre es de 2 a 3 horas y se puede detectar en suero durante un periodo de tiempo superior a 8 horas después de la total eliminación del etanol, mientras que en orina puede llegar hasta 80 horas en pacientes que entran en programas de desintoxicación ⁽⁴⁻⁵⁾, está entre otras, es la característica que hace que este indicador pueda ser utilizado en toxicología forense, criminalística y en la salud para el seguimiento a enfermos de alcoholismo.

La utilización de la Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas sin previo tratamiento de la muestra y mediante los derivados acetilados y silanizados han sido frecuentemente utilizado, sin embargo, las características tan complejas de la matriz orina puede producir una muestra con un alto grado de impureza. Una de las posibilidades de mejorar los resultados por CG es la extracción del EtG utilizando columnas de extracción en fase sólida (EFS) ⁽⁶⁻⁸⁾ que mejora considerablemente los recobrados y disminuye las interferencias provenientes de la matriz.

Actualmente la mayoría de las técnicas utilizadas para la detección del EtG es el análisis sin un tratamiento previo de la orina por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS) o tándem de masas (LC-MS/MS) por las grandes ventajas de especificidad, preparación mínima de la muestra y alta sensibilidad ⁽⁸⁻¹¹⁾. No obstante son instrumentos altamente costosos que no disponen todos los laboratorios.

Algunos trabajo de determinación de EtG en fluidos biológicos han sido realizados por inmuensayo pero los resultados en cuanto a sensibilidad y selectiva no han sido muy exitosos ⁽¹²⁾.

El objetivo de esta investigación es validar una metodología para la detección inequívoca de EtG en muestras de orina, mediante una extracción en fase sólida y posterior análisis de derivados trimetilsilados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Con el fin de que la técnica pueda ser utilizada en el análisis antidoping, en toxicología forense, criminalística y en la salud para el seguimiento a enfermos de alcoholismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos.

Todos los reactivos y solventes utilizados tuvieron calidad analítica y fueron obtenidos de Aldrich (Milwaukee, USA), el N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) fue obtenido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), las columnas Bond Elut Certify™ fueron obtenidas de Analytichem International (Harbor City, PA, USA) y los patrones de EtG y EtG-d₅ fueron obtenidos de Medichem, Germany (15 µg/mL).

Método de extracción de EtG.

A 2 mL de orina le fue añadido 100 µL de patrón interno, 100 µL of amoniacal buffer (pH 9.2) y fue agitada durante 5 segundos. La muestra fue fijada en una columna Bond Elut Certify™ previamente condicionada (2 mL de metanol y 2 mL de agua desionizada) introducida en un manifold de vacío. Después que la muestra estuvo fijada en la columna fue tratada con 2mL de agua desionizada y eluida con 2mL de metanol. El eluato fue secado a 40 °C bajo corriente de N_{2(g)}. El residuo seco fue derivatizado con 50 µL de MSTFA a 100 °C por 30 min.

Condiciones cromatográficas.

Los analitos fueron separados en una columna capilar de silica fundida (HP-Ultra 2, fenilmetilsiloxano (5%), 12 m x 0.2 mm d.i., espesor 0.33 µm; (Agilent Technologies, CA, USA). El programa de temperature comenzó a 184 °C aumentando a 290 °C a 10 °C/min y se mantuvo en está temperatura por 3 min. La relación de split fue (10:1). El gas portador fue Helio a un flujo de 1 mL/min. Las temperaturas de inyector, el espectrómetro y la interfase fueron: 280, 230 and 280 °C respectivamente. El espectrómetro de masas fue operado en modo

impacto electrónico a 70 eV. Los iones monitoreados fueron m/z 160; 261; 405 para EtG y m/z 165; 266; 410 para EtG- d_5 . El volumen inyectado fue 3 μ L.

Validación

El método fue validado siguiendo las normas exigidas por la Agencia Mundial Antidopaje para ensayos cualitativos ⁽¹³⁾.

Fueron analizados 10 blancos de orina para analizar posibles interferencias de origen endógeno en el análisis del analito. Se determinó la repetibilidad intra e inter ensayo (n=4), el criterio de aceptación fue coeficiente de variación (CV%) < 15. Con el objetivo de analizar el arrastre durante el análisis instrumental una muestra negativa fue analizada después de inyectar en el equipo una muestra positiva cargada a 3 μ g/mL de EtG. El límite de detección fue determinado basados en el criterio de una relación señal/ruido de 3:1(n=4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el método validado se logró separar el analito de la matriz y caracterizarlo por CG-EM (figuras 2 y 3). En el ensayo de selectividad no se observó interferencias en el tiempo de retención de EtG (7.143 min figura 4), lo que significa es selectivo a EtG. El CV% de la relación de áreas entre los iones m/z 261 (EtG) y 266 (EtG- d_5) para el ensayo de repetibilidad (1.5 μ g/mL) intra y interensayo fue de 2.4 y 4.5 respectivamente lo cual cumple el criterio de aceptación antes mencionado. El método no mostró arrastre de una muestra a la siguiente por lo que esta libre de contaminación entre muestra. El límite de detección fue de 0.2 μ g/mL.

Validación de un Método para Determinar Etilglucurónido en Muestras de Orina
Hernández-Domínguez, Correa-Vidal, Montes de Oca-Porto, Granda-Fraga

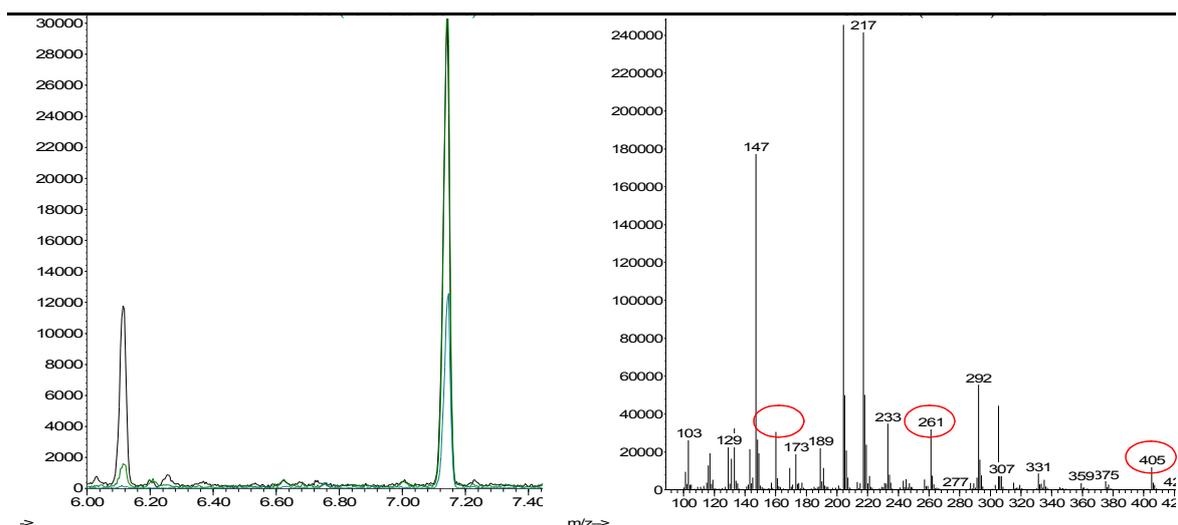


Figura2. Muestra positiva de EtG y su espectro de masas.

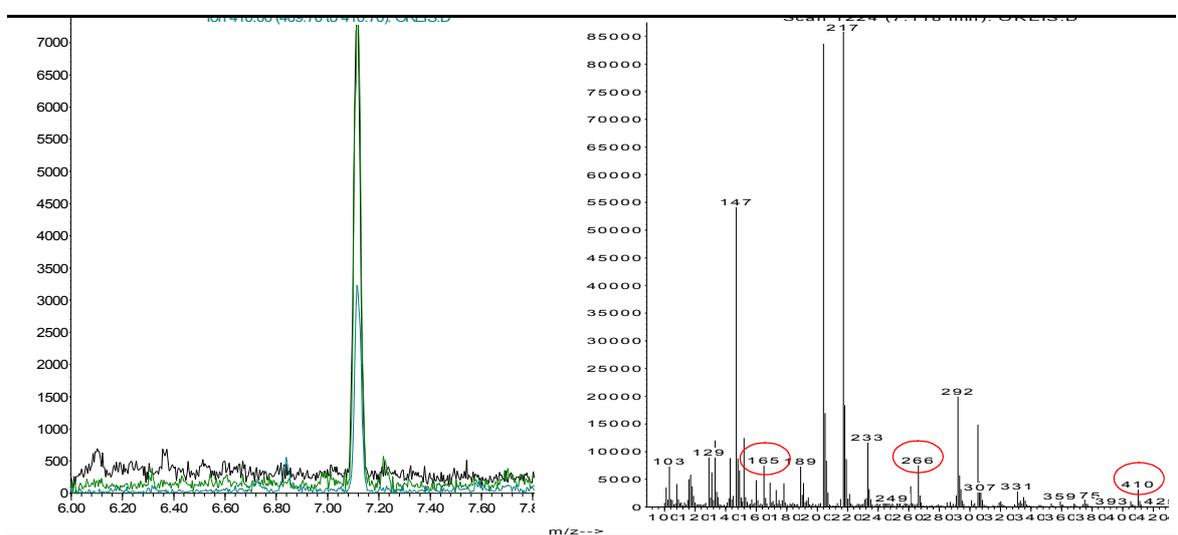


Figura3. cromatograma de iones y espectro de masas del EtG-d₅ (PI).

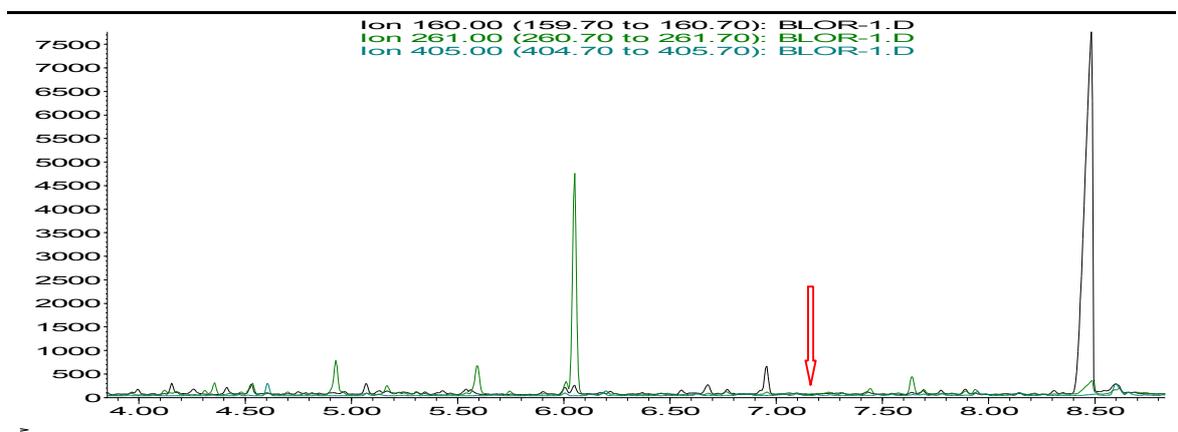


Figura4. Orina blanco de EtG.

REFERENCIAS

1. Goll M, Schmitt G, Ganssmann B, Aderjan RE. Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution, *Journal. Analytical Toxicology*. 2002; 26: 262–266.
2. Neubauer O, Ueber Glucuronsäurepaarung bei Stoffen der Fettreihe, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1901; 46: 135–154.
3. Foti RS and Fisher MB. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs, *Forensic Science. Institute*. 2005; 153: 109–116.
4. Schmitt G, Droenner P, Skopp G, Aderjan R. Ethyl glucuronido concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *Journal Forensic Science* 1997; 42:1099-1102.
5. Janda I , Andreas A, Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid-phase extraction Department of Forensic Medicine, University of Ulm, Prittowitzstr.6, D-89075 Ulm, Germany Received 12 December 2000; received in revised form 15 March 2001; accepted 19 March 2001).
6. Musshoff F, Madea B New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Science International* 2007, 165: 204-215.
7. Colin T. Bedford, Review: Glucuronic acid conjugates, *Journal of Chromatography B*, 1998, 717: 313–326.
8. Janda I., Alt A. Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid-phase extraction. *Journal Chromatography. B Biomedical Science. Appl.* 2001; 758: 229-34.
9. Weinmann W., Schaefer and P Thierauf A Confirmatory Analysis of Ethylglucuronide in Urine by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry According to Forensic Guidelines. Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology, University Hospital, Freiburg, Germany.
10. Nishikawa M. Tsuchihashi H. Miki A. Katagi M. Schmitt G. Zimmer H. Keller Th. Aderjan R. Determination of ethyl glucuronide, a minor metabolite of ethanol, in human serum by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1999; 726: 105-110.
11. Schloegl H. Rost T. Wolfgang S. Friedrich M. Wurst B. Weinmann W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death (LC–MS/MS). *Forensic Science International* 2006; 156: 213-218.
12. Thierauf A. Serr A. Halter C. Al-Ahmad A. Rana S. Weinmann W. Influence of preservatives on the stability of ethyl glucuronide and ethylsulphate in urine. *Forensic Science International* 2008, 182: 41-45.
13. The World Antidoping Code. International Standards for Laboratories, 2009.