

Un enfoque simplificado a Extracción de Fase Sólida usando Strata™-X Drug B para SAMHSA

Michael Rummel, Matthew Trass, Seyed Sadjadi, y Erica Pike
 Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

Utilizando un solo sorbente de Extracción de Fase Sólida (SPE) y sólo 3 métodos de extracción, se extrajeron y analizaron efectivamente por LC/MS y GC/MS once drogas de seis diferentes clases de productos reguladas por la Administración de Abuso de Sustancias y Salud Mental (SAMHSA, por sus siglas en inglés). El sorbente utilizado (Strata-X-Drug B) fue específicamente diseñado y evaluado para toxicología forense, resultando capaz de proporcionar altas recuperaciones de cada una de las drogas analizadas de acuerdo con los nuevos niveles de aceptación que SAMHSA ha implementado recientemente.

Introducción:

El test de drogas en el trabajo se ha convertido en una rutina durante el proceso de solicitud de empleo. Más aún, las corporaciones están adoptando políticas de control de drogas que requieren que los empleados pasen por test de drogas manera aleatoria. Los test de drogas recreacionales no sólo se están incrementando en los lugares de trabajo sino también juegan un rol importante en los centros de rehabilitación y agencias de control del uso de estupefacientes¹. Con el auge de los test de drogas, se ha vuelto difícil establecer métodos analíticos para cada tipo de sustancia que es regulada por SAMHSA porque cada clase de droga es muy diferente de otra y los niveles de aprobación son cada vez más bajos (ver **Tabla 1**). El objetivo de este trabajo fue desarrollar métodos de extracción utilizando un único sorbente para TODAS las drogas controladas por SAMHSA. No sólo fue importante usar un solo sorbente, sino también desarrollar la menor cantidad posible de métodos de extracción necesarios, con la finalidad de reducir los errores humanos así como los tiempos de entrenamiento del personal técnico, generando resultados óptimos y consistentes en el tiempo.

Estos requerimientos llevaron a la creación del sorbente de Extracción de Fase Sólida Strata-X-Drug B, diseñado para extraer todas las drogas reguladas por SAMHSA en solamente 3 métodos cortos. Para asegurar una recuperación consistente y resultados confiables, Strata-X-Drug B es testeado con sistemas de control

Tabla 1
 Niveles Máximos Aceptados por SAMHSA²

Clase	Analito	Límite
Metabolitos de marihuana	Ácido Delta-9-tetrahidrocanabinol-9-carboxílico (THCA)	15 ng/mL
Metabolitos de Cocaína	Benzoilecgonina	100 ng/mL
Metabolitos de Opiato	Codeína	2000 ng/mL
	Morfina	2000 ng/mL
6-MAM	6-Acetil morfina	10 ng/mL
PCP	Fenciclidina	25 ng/mL
Anfetaminas	Anfetamina	250 ng/mL
	Metanfetamina	250 ng/mL
MDMA	Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	250 ng/mL
	Methylenedioxyamphetamine (MDA)	250 ng/mL
	Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	250 ng/mL

de calidad específicos de toxicología forense, evaluando la recuperación de drogas de abuso en muestras de orina, así como también evaluando el sorbente para garantizar que no promueva la conversión de Norcodeína y Normorfina en otros compuestos -lo cual puede ocurrir a veces con otros sorbentes SPE de fuerte intercambio catiónico.

Condiciones experimentales:

Se analizaron varias clases de drogas por LC/MS y GC/MS bajo las regulaciones de SAMHSA. Las clases de drogas incluyen opiatos, 6-MAM, PCP, anfetaminas, metabolitos de marihuana y de cocaína. Los estándares fueron obtenidos de Corporación Cerilliant[®] (Round Rock, TX). Las muestras de orina fueron preparadas para cada clase de drogas y fueron preparadas en proporciones de 40, 100 y 125 % del nivel máximo de aceptación de SAMHSA. Las muestras de orina preparadas fueron sometidas a diversos pasos de pretratamiento, dependiendo de la droga que se añadió a cada una (ver **Tabla 2**). Luego, las muestras pretratadas fueron sometidas a SPE usando tubos de Strata-X-Drug B de 60 mg/6 mL (Phenomenex), tal como se especifica en la **Tabla 3**. Después de la extracción, cada una de las seis clases de drogas fue analizada por GC/MS o LC/MS bajo las condiciones especificadas en la **Figura 1-6**; el análisis GC/MS fue llevado a cabo con una columna Zebron™ ZB-Drug-1 de Phenomenex Inc. MS operando en modo SIM mientras que el análisis de LC/MS fue llevado a cabo usando una columna Kinetex[®] C18 o PFP de Phenomenex (MS operando en modo ESI+).

Tabla 2.
 Pre-tratamiento de muestra

Opiatos	A cada muestra de orina de 2 mL, adicionar 500 µL de HCl concentrado. Calentar a 90 °C por 2 horas. Adicionar 2 mL de buffer Acetato de Sodio 200 mM (pH 4.0). Adicionar 1 mL de solución 6 N de KOH, luego agitar. Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm. Verificar que el pH se encuentre entre 4.0 – 6.0.
6-MAM	A cada muestra de orina de 2 mL, adicionar 1000 µL de solución de β-Glucuronidase (contiene 5000 unidades F/MI Patella Vulgata en solución buffer Acetato 100 mM, pH 5.0) y agitar. Hidrolizar por 3 horas a 60 °C. Dejar enfriar y adicionar 1000 µL de buffer Fosfato 100 mM (pH 6.0). Verificar que el pH se encuentre entre 5.5 y 6.5. Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm y descartar el sedimento.
PCP	A cada muestra de orina de 2 mL, adicionar 2 mL de solución buffer Acetato de Sodio 100 mM (pH 5.0) luego agitar. Verificar que el pH se encuentre entre 4.0 y 6.0.
Anfetaminas	A cada muestra de orina de 2 mL, adicionar 1000 µL de solución buffer Fosfato 100 mM (pH 6.0) y 1000 µL de Periodato de Sodio 0.35 M. Agitar e incubar a temperatura ambiente por 25 minutos. Verificar que el pH se encuentre entre 5.5 y 6.5.
Metabolitos de marihuana	A cada muestra de orina de 2 mL, adicionar 100 µL de Hidróxido de Potasio 11.8 N. Agitar y luego incubar a 60 °C por 20 minutos. Enfriar y adicionar ~450 µL de Ácido Acético glacial y agitar. Verificar que el pH se encuentre entre 4.0 y 6.0.
Metabolitos de cocaína	A cada muestra de orina de 2 mL, adicionar 2 mL de solución buffer Acetato de Sodio 100 mM (pH 5.0) y agitar. Verificar que el pH se encuentre entre 4.0 y 6.0.

TN-0041

APLICACIONES

Tabla 3.
Protocolos Strata™-X-Drug B 60 mg/mL (Código: 8B-S128-UCH)

	Opiatos, 6-MAM, PCP y Anfetaminas	Metabolitos de Marihuana	Metabolitos de Cocaína
Acondicionamiento	No requiere		
Carga	Muestra de orina pretratada	Muestra de orina pretratada	Muestra de orina pretratada
Lavado 1	2 mL de buffer Acetato de Sodio 100 mM (pH 5.0)	2 mL de buffer Acetato de Sodio 100 mM (pH 5.0)	2 mL de Ácido Clorhídrico 0.1 N
Lavado 2	2 mL de Metanol	2 mL de Acetonitrilo/ buffer Acetato de Sodio 100 mM (pH 5.0) (30:70)	2 mL de Metanol
Secado	10 minutos bajo vacío total	15 minutos bajo vacío total	10 minutos bajo vacío total
Elución	2 mL de Acetato de Etilo/ Isopropanol/Hidróxido de Amonio (70:20:10)	2 mL de Acetato de Etilo/ Isopropanol (85:15)	2 mL de Acetato de Etilo/ Isopropanol/ Hidróxido de Amonio (70:20:10)

Figura 1.
Análisis de Opiatos por GC

Las muestras extraídas fueron evaporadas a sequedad a 50°C y luego reconstituidas en 50 µL de Anhídrido Propiónico (PIA) y 50 µL de acetonitrilo. Las muestras fueron calentadas por 30 minutos a 60 °C y fueron nuevamente evaporadas a sequedad a 50 °C. Fueron reconstituidas nuevamente en 100 µL de Acetato de Etilo.

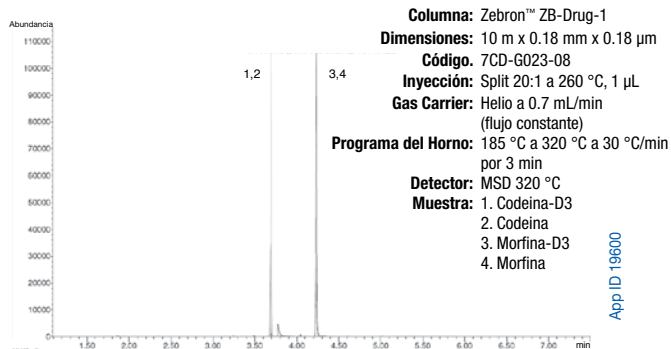


Figura 2.
Análisis de 6-MAM por HPLC

Las muestras extraídas fueron evaporadas a sequedad a 50 °C y reconstituidas en 1 mL de 10 % Metanol / 90 % Acido Fórmico (0.1 %)

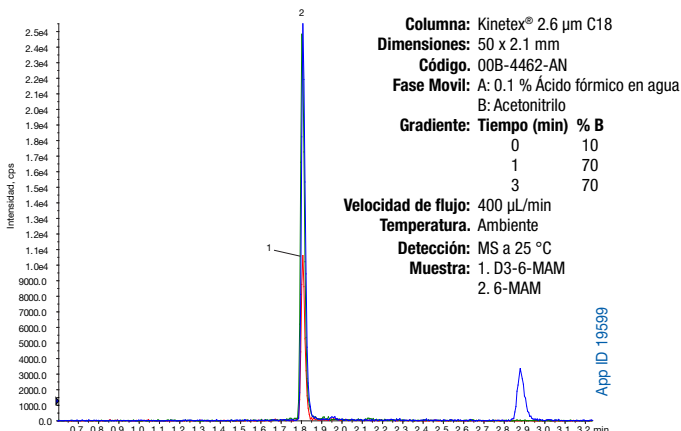


Figura 3.
Análisis de PCP por HPLC

Las muestras extraídas fueron evaporadas a sequedad a 50°C y reconstituidas en 1 mL de 25 % Metanol / 75 % Acido Fórmico (0.1 %)

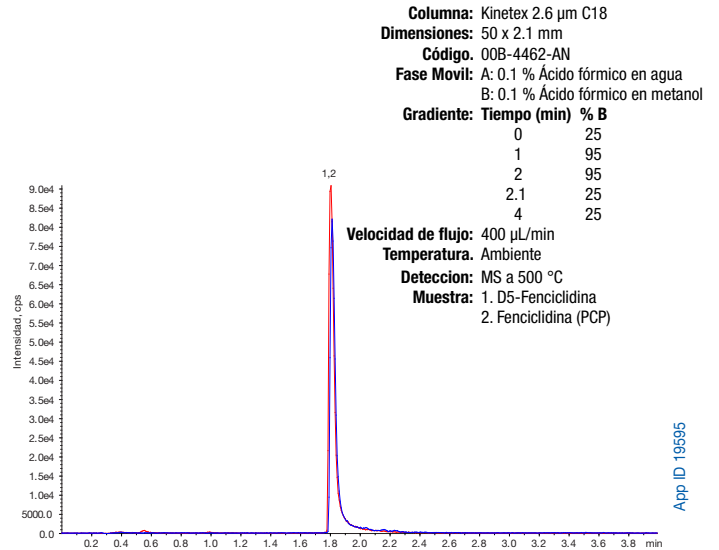
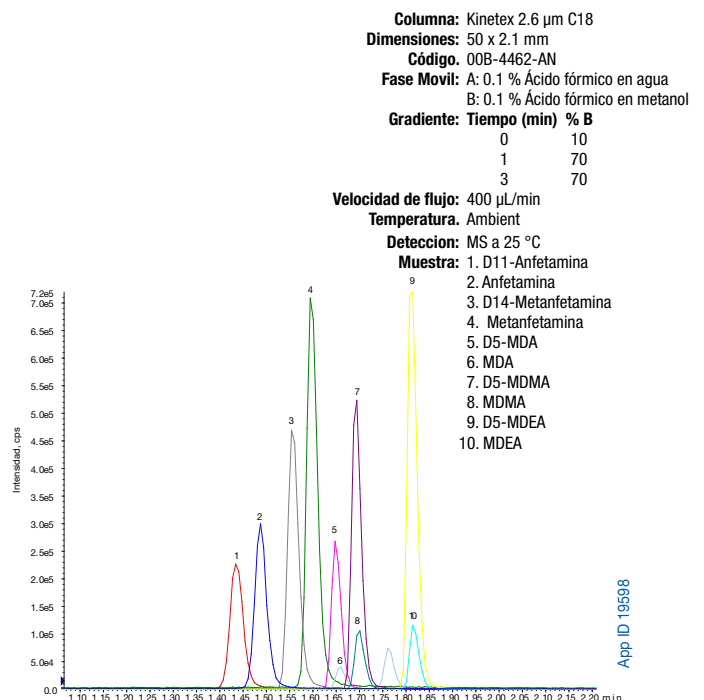


Figura 4.
Análisis de Anfetaminas por HPLC

Se adicionó a la muestra, 300 µL de Metanol HCl 0.5 N (0.5 N HCl en Metanol). Las muestras fueron evaporadas a sequedad a T < 35 °C y luego reconstituidas con 1 mL de 10 % Metanol / 90 % Acido Fórmico (0.1 %). Antes de inyectar al LC/MS, las muestras fueron diluidas por un factor de 20 para que la concentración se encuentre en el rango de análisis.



TN-0041

APLICACIONES

Figura 5.

Análisis de metabolitos de marihuana por GC

Las muestras extraídas fueron evaporadas a sequedad a 50 °C y reconstituidas en 25 µL de Acetato de Etilo y 50 µL de BSTFA. Posteriormente, fueron calentadas por 20 minutos a 70 °C.

Columna: Zebtron™ ZB-Drug-1
Dimensiones: 10 m x 0.18 mm x 0.18 µm
Código: 7CD-G023-08
Inyección: Split 10:1 a 280 °C, 1 µL
Gas Carrier: Helium a 0.7 mL/min (flujo constante)
Programa del Horno: 220 °C to 340 °C a 30 °C/min
Detector: MS a 340 °C
Muestra: 1. D9-carboxi-THC 380
 2. Carboxi-THC 371

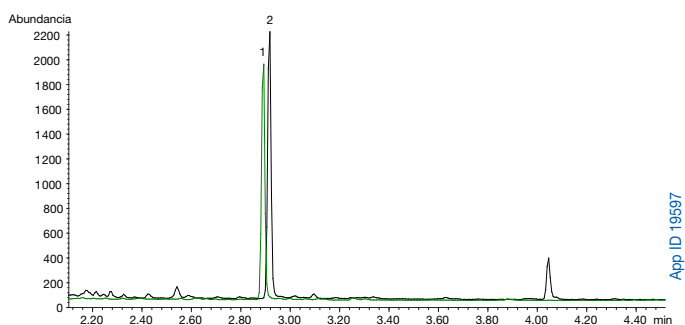


Figura 6.

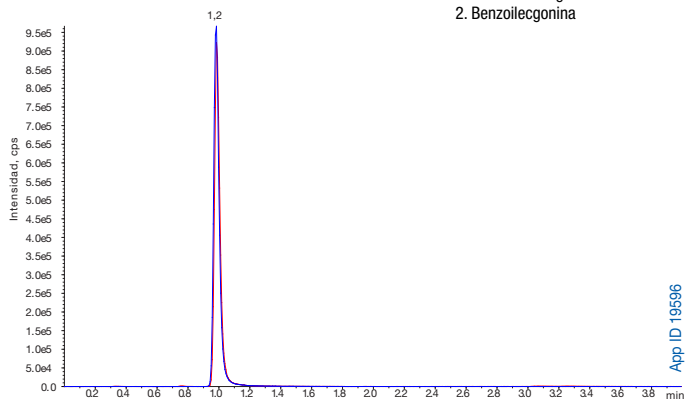
Análisis de metabolitos de cocaína por HPLC

Las muestras extraídas fueron evaporadas a sequedad a 50 °C y reconstituidas en 1 mL de 95 % Metanol / 5 % Acido Fórmico (0.1 %)

Columna: Kinetex® 2.6 µm PFP
Dimensiones: 50 x 2.1 mm
Código: 00B-4477-AN
Fase Movil: A: 0.1 % Acido fórmico en agua
 B: 0.1 % Acido fórmico en metanol
Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	95
1	50
2	50
2.1	95
4	95

Velocidad de flujo: 400 µL/min
Temperatura: Ambiente
Detección: MS a 500 °C
Muestra: 1. D3-benzoilecgonina
 2. Benzoilecgonina



Resultados y Discusión:

Mientras se desarrollaban los métodos de extracción, se verificó que no era necesario acondicionar ni equilibrar el sorbente Strata™-X-Drug B. La eliminación de estos pasos redujo el tiempo y consumo de solvente sin afectar los resultados. El sorbente no acondicionado probó ser efectivo en la extracción de las 11 drogas reguladas por SAMHSA proveyendo alta recuperación y resultados consistentes (ver **Tabla 4**). Acoplado a un eficiente análisis GC/MS y LC/MS usando tanto Zebtron ZB-Drug 1 en GC como Kinetex en HPLC, se determinó que las técnicas de extracción y análisis fueron capaces de producir muestras limpias y excelentes separación y cuantificación, así como tiempos de análisis cortos los cuales se ajustan a las regulaciones de SAMHSA.

Tabla 4.

Recuperación relativa, RSD y Linealidad

Analito	Recuperación relativa (%)	RSD % (N=3)	Linealidad
Codeína	99.86	0.43	0.999
Morfina	99.80	0.59	0.999
6-MAM	100.5	0.63	0.999
Fenciclidina	99.33	0.63	0.999
Anfetamina	101.8	1.59	0.997
Metanfetamina	97.76	1.99	0.998
MDA	96.65	3.03	0.995
MDMA	100.1	1.20	0.998
MDEA	102.2	1.93	0.999
Carboxi-THC	99.45	0.95	0.999
Benzoilecgonina	99.45	0.95	0.999

Conclusión

Strata-X-Drug B disminuye efectivamente el tiempo de extracción, eliminando los pasos de acondicionamiento y equilibrio, y reduciendo los pasos de método de extracción a carga, 2 lavados, y una elución. Además, Strata-X-Drug B permitió un enfoque simplificado de extracción minimizando el número de protocolos de extracción requeridos para el análisis ampliado de SAMHSA a sólo 3 métodos, con pocas variaciones de solventes entre métodos. Este enfoque reduce drásticamente el tiempo de proceso y error del usuario, posibilitando un mayor rendimiento y mayor calidad de los datos. El análisis subsecuente por GC/MS y LC/MS demostró que ambas técnicas de análisis fueron aceptables bajo la misma metodología de extracción SPE. Sin embargo, LC/MS demostró ser ideal ya que resultó tiempos de análisis más cortos, lo cual permite un incremento significativo en la cantidad de muestras analizadas.

Referencias:

1. www.wikipedia.org/wiki/Drug-Testing
2. www.samhsa.gov

TN-0041

APLICACIONES

Alemania

t: 06021-58830-0
f: 06021-58830-11
anfrage@phenomenex.com

Australia

t: 02-9428-6444
f: 02-9428-6445
auinfo@phenomenex.com

Austria

t: 01-319-1301
f: 01-319-1300
anfrage@phenomenex.com

Bélgica

t: +31 (0)30-2418700
f: +31 (0)30-2383749
beinfo@phenomenex.com

Canada

t: (800) 543-3681
f: (310) 328-7768
info@phenomenex.com

Dinamarca

t: 4824 8048
f: 4810 6265
nordicinfo@phenomenex.com

Finlandia

t: +358 (0)9 4789 0063
f: +45 4810 6265
nordicinfo@phenomenex.com

Francia

t: 01 30 09 21 10
f: 01 30 09 21 11
franceinfo@phenomenex.com

India

t: 040-3012 2400
f: 040-3012 2411
indiainfo@phenomenex.com

Irlanda

t: 01 247 5405
f: +44 1625-501796
eireinfo@phenomenex.com

Italia

t: 051 6327511
f: 051 6327555
italiainfo@phenomenex.com

Luxemburgo

t: +31 (0)30-2418700
f: +31 (0)30-2383749
nlinfo@phenomenex.com

Méjico

t: 001-800-844-5226
f: 001-310-328-7768
tecnicomx@phenomenex.com

Noruega

t: +47 810 02 005
f: +45 4810 6265
nordicinfo@phenomenex.com

Nueva Zelanda

t: 09-4780951
f: 09-4780952
nzinfo@phenomenex.com

Países Bajos

t: 030-2418700
f: 030-2383749
nlinfo@phenomenex.com

Puerto Rico

t: (800) 541-HPLC
f: (310) 328-7768
info@phenomenex.com

Reino Unido

t: 01625-501367
f: 01625-501796
ukinfo@phenomenex.com

Todos los demás países:
Oficinas Corporativas en USA 

t: (310) 212-0555
f: (310) 328-7768
info@phenomenex.com

www.phenomenex.com

Los productos de Phenomenex están disponibles en todo el mundo. Para saber cuál es el distribuidor en su país, contáctese con el Departamento Internacional de Phenomenex EE. UU. en international@phenomenex.com.

Información para pedidos:

Strata™-X-Drug B SPE

La Masa del Sorbente	N.º de parte	Unidad
Tubos		
10 mg	8B-S128-AAK	1 mL (100/caja)
10 mg	8L-S128-AAK	1 mL (100/caja)
30 mg	8B-S128-TAK	1 mL (100/caja)
30 mg	8L-S128-TAK	1 mL (100/caja)
30 mg	8B-S128-TBJ	3 mL (50/caja)
60 mg	8B-S128-UBJ	3 mL (50/caja)
60 mg	8B-S128-UCH	6 mL (30/caja)
60 mg	8B-S128-UCL	6 mL (200/caja)

Tubos Giga™		
100 mg	8B-S128-EDG	12 mL (20/caja)

Placa de 96 pocillos		
10 mg	8E-S128-AGB	2 Plates/caja
30 mg	8E-S128-TGB	2 Plates/caja
60 mg	8E-S128-UGB	2 Plates/caja

* Tubos sin sujeción

Kinetex® Core-Shell HPLC/ UHPLC Columnas:

Columnas minibore (mm) de 1.7 µm

	50 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1
C18	00B-4475-AN	00D-4475-AN	00F-4475-AN
PPF	00B-4476-AN	00D-4476-AN	00F-4476-AN

Columnas minibore (mm) de 2.6 µm

	50 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1
C18	00B-4462-AN	00D-4462-AN	00F-4462-AN
PPF	00B-4477-AN	00D-4477-AN	00F-4477-AN

Columnas MidBore™ (mm) de 2.6 µm

	50 x 3.0	100 x 3.0	150 x 3.0
C18	00B-4462-YO	00D-4462-YO	00F-4462-YO
PPF	00B-4477-YO	00D-4477-YO	00F-4477-YO

Columnas analíticas (mm) de 2.6 µm

	50 x 4.6	100 x 4.6	150 x 4.6
C18	00B-4462-E0	00D-4462-E0	00F-4462-E0
PPF	00B-4477-E0	00D-4477-E0	00F-4477-E0

Más dimensiones y fases disponibles, contactarnos.

Zebron™ ZB-Drug-1 GC Columnas

ID(mm)	df(µm)	Límites de Temp. °C	Numero de Parte
10-metros			
0.18	0.18	40 to 320/340 °C	7CD-G023-08
15-metros			
0.25	0.25	40 to 320/340 °C	7EG-G023-11
30-metros			
0.25	0.25	40 to 320/340 °C	7HG-G023-11

garantía

Si los productos Phenomenex de este folleto técnico no ofrecen al menos una separación equivalente a la de otros productos de la misma dimensión y fase, devuelva el producto con datos comparativos dentro de los 45 días para obtener un REEMBOLSO TOTAL.

Términos y Condiciones

Sujeto a los Términos y Condiciones estándares de Phenomenex disponibles en <http://www.phenomenex.com/TermsAndConditions>.

Marcas registradas

Strata-X, Giga, MidBore, y Zebron, son marcas comerciales de Phenomenex, Inc. Kinetex es una marca comercial registrada de Phenomenex en los Estados Unidos de America, la Union Europea y otras Jurisdicciones. Cerilliant es una marca comercial de Cerilliant Corporation.

Límite de Responsabilidad

Phenomenex no está afiliada de ninguna manera a Cerilliant Corporation. Es posible que las separaciones comparativas no sean representativas de todas las aplicaciones.

Strata-X está patentado por Phenomenex. Patente de los EE. UU. n° 7,119,145

© 2011 Phenomenex, Inc. Todos los derechos reservados.