

## **Aislamiento de cocaína y benzoilecgonina en muestras de orina por extracciones líquido-líquido y en fase sólida y confirmación por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

S.Arcay Torres<sup>1</sup>, D.Fleita Peraza<sup>1</sup>, A.Fallarero Linares<sup>2</sup>, A.Vidal Novoa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Criminalística, (LCC), Habana Vieja, La Habana, CUBA

<sup>2</sup> Grupo de Farmacología y Toxicología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

### **Resumen**

El consumo ilícito de cocaína se ha incrementado extraordinariamente en los últimos años, por lo que resulta indispensable el desarrollo de metodologías seguras, rápidas y eficientes para su detección. En este trabajo se desarrolló una técnica de HPLC de fase reversa con detector de UV para identificar y cuantificar a la cocaína y la benzoilecgonina, con resultados satisfactorios en los parámetros del control de calidad.

Se realizó un estudio de recobrado para el aislamiento de la cocaína y la benzoilecgonina en orina con extracciones líquido-líquido y en fase sólida con tres tipos de columnas comerciales (Bond Elut Certify, Extrelut 3 y Supelclean LC-18). Las fracciones obtenidas con la extracción líquido-líquido resultaron muy contaminadas, con porcentajes de recobrados bajos (45% y 28% para la cocaína y la benzoilecgonina, respectivamente). En las extracciones en fase sólida para la cocaína resultaron muy eficientes las columnas Supelclean LC-18 (87-102 %) y Extrelut 3 (70-102 %), mientras que para el aislamiento de la benzoilecgonina resultaron más eficiente las columnas Extrelut 3 (86-101 %) y Supelclean LC-18 (73-89%). Las columnas Bond Elut Certify resultaron poco eficientes para el aislamiento de la cocaína (53-79%) y con un recobrado aún mas bajo para su metabolito (2-21% %).

### **Palabras Clave**

Cocaína, benzoilecgonina, aislamiento, HPLC, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida.

Correspondencia a:

Dr. Alexis Vidal Novoa

Grupo de Farmacología y Toxicología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 # 455 e/ J e I, Vedado, CP 14000, La Habana, CUBA

Teléfono: 537-8309821 - FAX: 537-8321321

E-mail: alexis.vidal@infomed.sld.cu; alvidno@yahoo.com



## Summary

The illegal consumption of cocaine has extraordinarily increased during the past decades. Consequently, there is still a great deal of interest for the development of safe, fast and efficient methods for the detection of cocaine. In current investigation, a reverse phase HPLC technique with uv detection system for the identification and quantification of cocaine and benzoilecgonine was established. The method was shown to be successful, as assessed by the measurement of control and quality parameters.

The isolation of cocaine and benzoilecgonine from urine samples by using liquid-liquid extraction and 3 solid phase commercial columns (Bond Elut Certify, Extrelut 3 and Supelclean LC-18) was performed and so the recovery percentages values were compared. In case of liquid-liquid extraction, the obtained eluates were highly contaminated with low recovery percentages (45% and 28% for cocaine and benzoilecgonine respectively). Experiments carried out in solid-phase extractions shown high cocaine recovery percentages for Supelclean LC-18 (87-102%) and Extrelut 3 (70-102%) columns. Same columns were found effective in the isolation of benzoilecgonine, being the recovery percentages of (86-101)% for Extrelut 3 and (73-89)% for Supelclean LC-18. Bond Elut Certify exhibited low efficiency for the cocaine isolation (53-79%) and even lower for cocaine metabolite (2-21%).

## Key Words

Cocaine, benzoilecgonine, isolation, HPLC, liquid-liquid extraction, solid-phase extraction.

## Résumé

La consommation illégale de cocaïne a augmenté de façon extraordinaire durant les dernières décades. Ceci a favorisé un intérêt grandissant pour le développement de méthodes de détection de la cocaïne à la fois non toxiques, rapides et efficaces. La présente étude décrit la mise au point d'une méthode de CLHP en phase inverse, avec système de détection UV pour l'identification et quantification de la cocaïne et la benzoilecgonine. L'efficacité de la méthode est démontrée par la mesure de paramètres de contrôle et qualité.

La cocaïne et la benzoilecgonine ont été isolées à partir d'échantillons d'urine par extraction liquide-liquide et l'utilisation de 3 colonnes commerciales en phase solide (Bond Elut Certify, Extrelut 3 et Supelclean LC-18) et comparaison de leurs pourcentages de recouvrements. Dans le cas de l'extraction liquide-liquide, les éluants obtenus étaient fortement contaminés et avaient des pourcentages de recouvrement faibles (45% et 28% pour, respectivement, la cocaïne et la benzoilecgonine). Les études menées par extraction en phase solide ont révélé de forts pourcentages de recouvrements avec les colonnes Supelclean LC-18 (87-102 %) et Extrelut 3 (70-102 %). Ces mêmes colonnes furent aussi



efficaces pour l'isolation de benzoylecgonine avec des pourcentages de recouvrements de (86-101 %) pour Extrelut 3 et (73-89 %) pour Supelclean LC-18. Bond Elut Certify s'est montré peu efficace pour l'isolation de la cocaïne (53-79 %) et encore moins efficace pour le métabolite de la cocaïne (2-21 %).

### *Most Clé*

Cocaine, benzoylecgonine, isolation, CLHP, extraction liquide-liquide, extraction en phase solide.

## INTRODUCCION

El hábito de consumir hojas de coca (*Erythroxylum coca*) en los países andinos data de al menos unos 1200 años. En 1860 se aisló su principio activo, la cocaína y en 1870 se descubrieron sus propiedades anestésicas locales. En pocos años se introdujo en la práctica médica y en breve tiempo se observaron sus efectos de Farmacodependencia. En la actualidad la cocaína es una de las sustancias con más alta incidencia en el fenómeno de la Drogadicción (Hollister, 1986).

La cocaína es rápidamente metabolizada por esterasas hepáticas y plasmáticas y por hidrólisis no enzimática. La ruptura del enlace éster del grupo benzoilo da lugar a la ecgonina-metil-éster; la hidrólisis del grupo metoxilo produce benzoilecgonina (con un tiempo de vida media plasmático 6 veces mayor que la cocaína) y la hidrólisis de estos dos metabolitos rinde ecgonina. También se puede metabolizar por otras vías metabólicas para producir los metabolitos minoritarios nor-cocaína, N-hidroxi-norcocaína y nitroxido de norcocaína. La administración conjunta de cocaína y alcohol etílico produce el cocaetileno, considerado como un metabolito farmacológicamente activo. La

éster-metil-ecgonina y la benzoilecgonina son los metabolitos mayoritarios, excretados por vía renal y sin actividad farmacológica sobre el SNC (Inaba, 1989). Entonces, de acuerdo a su farmacocinética, uno de los fluidos biológicos más empleados en los análisis toxicológicos es la orina (Verstraete, 2004)

El aislamiento de xenobióticos por extracciones líquido-líquido quizás sea el procedimiento más empleado en la Toxicología Analítica. El carácter hidrofílico de la benzoilecgonina determina que las extracciones líquido-líquido requieran de solventes con cierta polaridad, como por ejemplo los alcoholes, sin embargo la cocaína es un compuesto apolar, por lo que se hace difícil la elección de un adecuado sistema de solventes con una alta eficiencia de extracción para los dos compuestos a la vez (Clauwaert et al., 1996). Estos sistemas de solventes también extraen sustancias polares endógenas presentes en la orina, de manera que se obtienen fracciones contaminadas, lo que dificulta el proceso de identificación y cuantificación de la droga y/o sus metabolitos ya que no se definen con exactitud los picos de interés, se contaminan las columnas cromatográficas y se obtienen valores bajos de recobrados.



A partir de la década del 70 se incrementó extraordinariamente el empleo de las extracciones líquido-sólido utilizando columnas pre-empacadas con diferentes rellenos. Estos procedimientos ofrecen muchas ventajas: se obtienen fracciones muy limpias, los porcentajes de recuperación son aceptables, los costos son menores, los procedimientos son más rápidos y con un bajo consumo de solventes (Breiter et al., 1976; Scheurer y Moore, 1992).

En la actualidad algunas compañías especializadas en productos cromatográficos comercializan columnas rellenas con adsorbentes de diferentes naturalezas. Entre los rellenos más utilizados para el aislamiento de la cocaína y sus metabolitos se pueden señalar adsorbentes no polares como las "tierras de diatomeas" modificadas como la etil-sílica y octadesil-sílica, que son cadenas apolares que producen interacciones hidrofóbicas (Matsubara et al., 1984; Tebbet y McCartney, 1988; Logan y Stafford, 1989; Aderjan et al., 1993; Tatsuno et al., 1996; Virag et al., 1996; Bogusz et al., 1998; Brunetto et al., 2003, 2004). Otro grupo lo constituyen las columnas rellenas con intercambiadores iónicos, donde el analito adquiere determinada carga eléctrica de acuerdo al pH del medio, se fija y posteriormente es eluido (Logan et al., 1990; Hornbeck et al., 1995) y un tercer grupo son las columnas conocidas como híbridas debido a que tienen un adsorbente que combina tanto las interacciones hidrofóbicas como el intercambio iónico (Abusada et al., 1993; Nishikawa et al., 1994; Clauwaert et al., 1996; Fernández et al., 1996; Chasin y Midio, 2000; Fernández et al., 2004). También se han utilizado con resultados satisfactorios en el aislamiento de cocaína y sus metabolitos, columnas rellenas con resinas XAD-2 y con copolímeros fijados

a soportes inertes (Breiter et al., 1976; Moore et al., 1992; Cone et al., 1994)

Para cada variante de columna se recomienda emplear metodologías específicas que incluyen pre-activaciones, lavados y elusiones con diferentes solventes, entre otros factores experimentales. Un elemento importante a tener en cuenta en la elección de una columna son los valores de recobrados y su reproducibilidad así como las diferencias en los recuperaciones para metabolitos aún de una misma familia química, como pudiera ser una droga y sus metabolitos.

A partir de estas consideraciones, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia, a través del recobrado, de algunas columnas comerciales y una variante de extracción líquido-líquido para el aislamiento de la cocaína y su metabolito mayoritario, la benzoilecgonina, para su uso en el diagnóstico del consumo de cocaína.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Preparación de las muestras:** Se colectaron muestras de orina de sujetos sanos, no consumidores de drogas, y se les ajustó el pH a 7 con tampón Fosfato 0.1 M pH 6 y 0.5 M pH 8 dependiendo del caso. Estas muestras se fortificaron con clorhidrato de cocaína y benzoilecgonina (base) donadas por UN Narcotics Laboratory, CND (Vienna International Center), de manera que las concentraciones resultantes fueran 0.3, 1 y 5 µg/mL para cada una de las sustancias en estudio. La orina fortificada se subdividió en alícuotas y se conservaron a -20°C hasta su uso.

**Extracción en columnas Supelclean LC-18:** En las extracciones con las columnas Supelclean LC-18 (Supelco Co, USA) se empleó



el siguiente procedimiento: columnas con capacidad para 1 mL de muestra se activaron con 2 mL de metanol y seguidamente 1 mL de tampón Fosfato 0.1 M pH 6, entonces se aplicó 1 mL de orina y posteriormente 1 mL de una mezcla de diclorometano: solución amoniacal concentrada (10:0.2). La elución fue realizada con 1 mL de una mezcla de diclorometano: isopropanol: solución amoniacal concentrada (8:2:0.2). La fracción recogida fue llevado a sequedad en un baño termostato y atmósfera de nitrógeno a la temperatura de 50°C y posteriormente reconstituido en 50  $\mu$ L de metanol para el análisis por HPLC.

**Extracción con columnas Bond Elut Certify:** Las extracciones con las columnas Bond Elut Certify (Varian Inc., USA) se desarrollaron de acuerdo a los criterios recomendados por los fabricantes: las columnas con capacidad para 130 mg (10 mL de volumen) de muestra se activaron con 2 mL de metanol y seguidamente 2 mL de tampón Fosfato 0.1 M pH 6, entonces se aplicaron 5 mL de orina; una vez aplicada la muestra (1 mL), se adicionaron 6 mL de agua, y luego 3 mL de ácido clorhídrico 0.1 M, secando la columna a alta presión y por último 9 mL de metanol. Posteriormente la muestra se eluyó usando 2 mL de una mezcla de diclorometano: isopropanol: solución amoniacal concentrada (8:2:0.2); la fracción obtenida fue llevado a sequedad en un baño termostato en atmósfera de nitrógeno a 50°C y reconstituido con 50  $\mu$ L de metanol para su análisis por HPLC.

**Extracción con columnas Extrelut 3:** Las extracciones con las columnas Extrelut 3 (E Merck, Alemania) se realizaron de acuerdo al siguiente esquema: a muestras de orina se les ajustó el pH a 9 empleando tampón Bicarbonato 50 mM pH 10. En una columna de hasta 3 mL de capacidad, se aplicaron 3 mL de orina

y luego de 15 minutos se eluyó empleando 15 mL de una solución de cloroformo:isopropanol (9:1); la fracción recogida fue llevada a sequedad en un baño termostato en atmósfera de nitrógeno a 50°C y posteriormente reconstituido en 50  $\mu$ L de metanol, para su posterior análisis por HPLC.

**Extracción líquido-líquido:** A 10 mL de orina se le ajustó el pH a 8 empleando tampón bicarbonato 50 mM pH 11, se colocaron en un embudo de separación con 10 mL de una mezcla de cloroformo: isopropanol (9:1), se agitaron durante unos minutos, entonces se recogió la fracción orgánica, repitiéndose la operación en 2 ocasiones más. A la fase orgánica obtenida se le eliminó las emulsiones formadas con sulfato de sodio anhidro. Los extractos reunidos fueron llevados a sequedad en un baño termostato en atmósfera de nitrógeno a 50°C y posteriormente fueron reconstituidos en 100  $\mu$ L de metanol, para su posterior análisis por HPLC.

**Identificación y cuantificación de la cocaína y benzoilecgonina por HPLC:** Para la detección de la cocaína y su metabolito, la benzoilecgonina, se desarrolló una variante de una técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (UN Drugs Control Programme, 1995). Se empleó un equipo HPLC Pye Unicam 4020 (Pye Unicam, Gran Bretaña) con una columna de fase reversa LC-318 (5  $\mu$ m) de 25 cm de largo y 0.6 cm de diámetro interno (Supelco Co, USA) y una pre-columna RP-8 (5  $\mu$ m) (E Merck, Alemania). La fase móvil utilizada fue una mezcla de agua desionizada: acetoneitrilo: ácido fosfórico: hexilamina (825:175:4.9:0.28), ajustada a pH 3 con una solución de hidróxido de sodio al 20% y una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. La detección se realizó con detector UV empleando una longitud de onda de 230 nm.



Se aplicaron volúmenes de muestra de 25  $\mu\text{L}$ . Todos los reactivos empleados fueron grado analítico de las firmas E Merck y Riedel-de-Haen (Alemania) y los solventes de la fase móvil fueron LichrosolV (E Merck, Alemania), filtrados con filtros Millipore de 0.2  $\mu\text{m}$  (Supelco Co, USA).

Se realizó un estudio de Control de calidad con las curvas patrones de la cocaína y la benzoilecgonina en intervalos de concentraciones de 5-200  $\mu\text{g/mL}$  y de 5-172  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Se determinó la repetibilidad, reproducibilidad y exactitud y se definió el límite de detección.

## RESULTADOS

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La identificación y cuantificación de la cocaína y su metabolito la benzoilecgonina, en muestras de orina se realizó por una técnica de HPLC. El cromatograma correspondiente a una mezcla de las dos sustancias se presenta en la Figura 1. Como se puede apreciar aparecen dos picos muy simétricos y resueltos; en las condiciones experimentales empleadas, la benzoilecgonina, compuesto más polar, eluye primero con un tiempo de retención de 6 minutos, mientras que la cocaína, más apolar tiene un tiempo de retención de 12 minutos.

Debido a que la cocaína frecuentemente es adulterada con diferentes sustancias, generalmente anestésicos locales y además que la nicotina puede estar presente en la orina de fumadores de tabaco, se decidió probar las posibles interferencias de estas sustancias en esta técnica. En la Tabla 1 se muestran los tiempos de retención de algunos posibles contaminantes, como se puede apreciar, pre-

sentan tiempos de retención muy diferentes de las dos sustancias en estudio.

Las curvas patrones de la cocaína y la benzoilecgonina se realizaron con intervalos de concentraciones de 5-200  $\mu\text{g/mL}$  y de 5-172  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, lo que permite el análisis de las muestras de orina de los consumidores de la droga; en estas curvas se obtuvieron valores satisfactorios del coeficiente de correlación (0.99). En el estudio de repetibilidad se obtuvieron coeficientes de variación de 1.23% y 1.19% para la droga y su metabolito, respectivamente. También en el estudio de exactitud se encontró una curva de regresión con coeficientes de 0.98 y 0.99 para la cocaína y su metabolito. El límite de detección fue de 125 ng para las dos sustancias.

## EXTRACCIONES LÍQUIDO-LÍQUIDO

En los cromatogramas del análisis por HPLC se observaron la presencia de picos de supuestos contaminantes (cromatogramas no presentados). Los extractos obtenidos por este procedimiento se llevaron a sequedad y se redisolviéron en 100  $\mu\text{L}$  de metanol (en lugar de 50  $\mu\text{L}$  como en las demás metodologías) con el objetivo de diluir los contaminantes presentes en la orina y así mejorar la calidad de los cromatogramas. Pero, por otro lado, no fue posible estudiar las muestras menos concentradas debido a que también se redujeron las cantidades de cocaína y benzoilecgonina presentes en estas fracciones diluidas.

Los resultados del estudio de recuperación con este procedimiento se presentan en las Tablas 2 y 3. La recuperación resultó poco eficiente con valores de recobrado de



**TABLA 1.** Tiempo de retención para la cocaína, la benzoilecgonina y algunos compuestos químicos utilizados como adulterantes de la droga, que pueden ser encontrados en muestras de orina.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Cocaína	12
Benzoilecgonina	6
Nicotina	3.5
Cafeína	4
Procaína	3.5
Tetracaína	4
Benzocaína	3.5
Lidocaína	5.5

**TABLA 2.** Estudio de recuperación de cocaína en las muestras de orina por los diferentes procedimientos estudiados.

Procedimiento	Cantidad adicionada (µg) de clorhidrato de cocaína en orina por extracción	Cantidad teórica de cocaína base (µg/ extracción)	Cantidad determinada de cocaína base (µg/extracción)	% de recuperación
Supelclean LC-18	0.3	0.27	0.273 (0.27-0.28)	102.4 (100-104)
	1	0.90	0.82 (0.76-0.86)	90.7 (84.4-96.0)
	5	4.48	3.9 (3.5-4.3)	87.5 (78.1-96.9)
Extrelut 3	0.9	0.81	0.82 (0.81-0.84)	101.6 (100-104)
	3	2.69	2.19 (1.97-2.61)	81.7 (73.3-97.0)
	15	13.45	9.35 (8.44-10.30)	69.5 (62.8-76.6)
Bond Elut Certify	1.5	1.34	1.05 (0.94-1.18)	78.6 (70.0-88.0)
	25	22.42	11.9 (9.8-14.0)	52.9 (43.8-62.5)
Líquido-líquido	50	44.84	19.51 (19.18-19.68)	43.5 (42.8-43.9)

**TABLA 3.** Estudio de recuperación de benzoilecgonina en las muestras de orina por los diferentes procedimientos estudiados.

Procedimiento	Cantidad teórica de benzoilecgonina ( $\mu\text{g}/\text{extracción}$ )	Cantidad determinada de benzoilecgonina base ( $\mu\text{g}/\text{extracción}$ )	% de recuperación
Supelclean LC-18	0.3	0.22 (0.21-0.24)	73.3 (70-80)
	1	0.84 (0.81-0.85)	83.7 (81-85)
	5	4.4 (3.9-4.3)	88.8 (78.6-102)
Extrelut 3	0.9	0.91 (0.84-0.96)	101 (93.3-108)
	3	2.74 (2.64-2.85)	91.3 (88-95)
	15	12.9 (12.7-13.4)	86.1 (84.6-89.2)
Bond Elut Certify	1.5	0.03 (0-0.09)	2 (0-6)
	25	5.2 (5-5.4)	20.9 (20-22.1)
Líquido-líquido	50	14 (13-15)	28 (26-30)

Los resultados se expresan como valores promedios (valores superiores e inferiores). En cada variante de extracción se emplearon 5 muestras de una concentración dada y en cada procedimiento se utilizaron diferente volúmenes de orina de acuerdo a la metodología propuesta: columnas Supelclean LC-18: 1 mL, columnas Extrelut 3: 3 mL, columnas Bond Elut Certify: 1 mL y en la extracción líquido-líquido 10 mL. Las muestras de orina se prepararon con concentraciones de 0.3, 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de benzoilecgonina.

42-44% para la cocaína y de 26-30% para la benzoilecgonina.

#### Extracciones en fase sólida

Los cromatogramas del análisis por HPLC correspondientes a las extracciones en fase sólida, sin excepción, no presentaban picos de posibles contaminantes, por lo que se puede señalar que estos procedimientos de aislamiento resultan muy útiles para la identificación y cuantificación de cocaína y su metabolito por HPLC.

El estudio de recuperación para la cocaína con los diferentes procedimientos de extracción en fase sólida se presenta en la Figura 2. En las muestras fortificadas con la concentración más baja de cocaína se obtuvieron valores de recuperación muy altos empleando las columnas Supelclean LC-18 y Extrelut 3 pero considerando las otras concentraciones, las columnas Supelclean LC-18 demostraron los mejores resultados de recuperación, mientras que las columnas Bond Elut Certify presentan porcentajes de recuperación de cocaína muy bajos.



En la Figura 3 se presentan los resultados del estudio de recuperación de la benzoilecgonina. Como se puede apreciar, la extracción más eficiente resultó ser con las columnas Extrelut 3 aunque también con las columnas Supelclean LC-18 se obtuvieron valores altos de recobrado. Al igual que con la cocaína, las columnas Bond Elut Certify presentan valores de recobrados muy bajos.

## DISCUSIÓN

El consumo de cocaína es diagnosticado mediante la detección de la droga y sus metabolitos en la orina; esto se pudiera explicar porque la cocaína es rápidamente metabolizada por hidrólisis de un y/o ambos enlaces ésteres, para producir la ecgonina-metil-éster y la benzoilecgonina, metabolitos mayoritarios excretados por vía renal (Inaba, 1989; Verstraete, 2004).

La identificación y cuantificación de la cocaína y sus metabolitos se puede realizar por diferentes procedimientos, sin embargo la Cromatografía gaseosa, la Cromatografía líquida de alta resolución y estas técnicas acopladas a la Espectrometría de masa son las más empleadas (Moeller et al., 1998; Maurer, 1998). En este trabajo se desarrolló una modificación a una técnica de HPLC en fase reversa basada en un procedimiento propuesto por el Programa de Control de Drogas de la ONU (UN Drugs Control Programme, 1995) y similar a otras metodologías referidas en la literatura (Jatlow et al., 1978; Logan et al., 1990). Entre sus ventajas se pueden señalar; que se obtienen parámetros del control de calidad satisfactorios, posee un bajo límite de detección, permite la separación de la cocaína, la benzoilecgonina y algunos contaminantes usuales de la droga y utilizan una fase móvil

más económica y sencilla. Se puede señalar además que esta técnica está validada en el intervalo de concentraciones en que la cocaína y la benzoilecgonina usualmente se encuentran en la orina de consumidores (Hamilton et al., 1977; Ambre et al., 1984).

Probablemente la técnica de aislamiento más utilizada en los análisis toxicológicos es la extracción líquido-líquido. Este procedimiento tiene como inconveniente la obtención de extractos muy contaminados, lo que dificulta la definición del pico cromatográfico de la droga y/o los metabolitos (y por tanto la determinación de su tiempo de retención). En los cromatogramas correspondiente a este tipo de extracción se observaron diferentes picos de posibles contaminantes, entonces los extractos fueron reconstituidos en un mayor volumen con el objetivo de diluir estos contaminantes lo que a su vez conllevó a una disminución en las cantidades de la cocaína y la benzoilecgonina en las muestras de orina.

El aislamiento de la cocaína por extracciones líquido-líquido generalmente presenta valores de recobrados medianos o bajos, dificultad adicional si consideramos las cantidades pequeñas de la droga y sus metabolitos en muestras de orina. Garside et al. (1997) trabajando con muestras de orina y empleando solventes apolares obtuvieron valores de 49% de recuperación, similar a lo encontrado en esta investigación (44%), sin embargo Farina et al. (2002) con una mezcla de eter etílico: isopropanol (9:1) reportan valores mucho más altos (75%), similar a los obtenidos por Roberts et al. (1992) aislando cocaína de tejido hepático. En el caso del aislamiento de su metabolito, la benzoilecgonina, los valores de recobrado encontrados en este trabajo resultaron muy bajos (28%), lo que concuerdan con lo reportado por Garside et



al.(1997) y Farina et al. (2002). Otros autores (Needleman et al.,1991; Gerlits,1993) refirieron valores altos de recobrado para este metabolito. Si consideramos que se obtuvieron fracciones muy contaminadas con bajos porcentajes de recuperación para ambos compuestos, entonces se debe considerar a este procedimiento de aislamiento como un proceso poco eficiente.

Las extracciones con columnas en fase sólida utilizadas en el aislamiento de las cocaína y sus metabolitos, presentan algunas ventajas entre las que se pueden mencionar; menores tiempos para el procesamiento de las muestras, volúmenes pequeños de muestras y de solventes, mayores porcentajes de recobrados y fracciones poco contaminadas (Breiter et al.,1976; Scheurer y Moore, 1992). De manera general, en este trabajo se confirmaron estas ventajas.

En el aislamiento de la cocaína resultaron más eficientes las columnas Supelclean LC-18 y Extrelut 3 y al incrementarse las cantidades de cocaína resulto más eficiente la primera; mientras que con las columnas Bond Elut Certify se obtuvieron recuperaciones más bajas (52.9 a 78.6%). Otros autores (Tebbett y McCartney, 1988; Tatsuno et al., 1996; Bogusz et al.,1998; Brunetto et al.,2003,2005) aislando cocaína y benzoilecgonina con columnas de relleno apolares hidrofóbicas en muestras de orina también obtuvieron porcentajes de recobrados por encima de 90 % excepto Aderjan et al., (1993) y Virag et al., (1996) quienes refirieron porcentajes de recobrados, para este tipo de columna, menores a este valor:

Las columnas Bond Elut Certify evidenciaron una baja eficiencia en el aislamiento de la cocaína, con valores de recobrados aún más bajos para la benzoilecgonina. Otros autores

(Fernández et al.,1996, 2004) reportaron recobrados aceptables (75%) mientras Nishikawa et al.,(1994) encontraron un intervalo de valores de recobrado para la cocaína y sus metabolitos muy amplio (40-95%), lo que confirma los resultados de este trabajo para este tipo de columnas.

Debido a la diferencia de polaridad entre la cocaína y sus metabolitos generalmente existen diferencias significativas en los porcentajes de recobrados para un mismo solvente; en el aislamiento de la cocaína por extracción líquido-líquido se obtuvieron valores de recobrado más altos (45%) que en el caso de la benzoilecgonina (28%). Algo similar ocurrió con los procedimientos de aislamiento en extracciones en fase sólida. Con la columna Supelclean LC-18 resultó mas ineficiente la extracción del metabolito mientras que con las columna Extrelut 3 fue mas eficiente la extracción de la benzoilecgonina, resultado diferente al obtenido por Matsubara et al.,(1984) quienes investigando muestras de orina con estas columnas encontraron valores de recobrados superiores para la cocaína. En este trabajo, las extracciones con las columnas Bond Elut Certify resultaron muy ineficientes para el metabolito. También Nishikawa et al.,(1994) no observaron diferencias en los porcentajes de recobrado entre la droga y su metabolito empleando columnas Bond Elut Certify en muestras de orina.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo puede concluirse que no es recomendable el empleo de las extracciones líquido-líquido para la identificación y cuantificación de la droga y/o sus metabolitos por HPLC. Las extracciones en fase sólida con columnas Extrelut 3 y Supelclean LC-18 resultaron muy eficientes, sin embargo las extracciones con columnas Bond Elut Certify mostraron porcentajes de recobrados muy bajos.



## REFERENCIAS

- Abusada, G.M.; Abukhalaf, I.K.; Alford, D.D.; Vinzon-Bautista, I.; Pramanik, A.K.; Ansari, N.A.; Manno, J.E.; Manno, B.R. (1993) Solid phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 17(6):353-8.
- Aderjan, R.E.; Schmitt, G.; Wu, M.; Meyer, C. (1993) Determination of cocaine and benzoylecgonine by derivatization with iodomethane-D3 or PFPA/HFIP in human blood and urine using GC/MS (EI or PCI mode). *Journal of Analytical Toxicology*, 17(1):51-5.
- Ambre, J.; Fischman, M.; Ruo, T.T. (1984) Urinary excretion of ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine in human. *Journal of Analytical Toxicology*, 8(1):23-25
- Bogusz, M.J.; Maier, R.D.; Kruger, K.D.; Kohls U. (1998) Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 22(7):549-58.
- Breiter, J.; Helger, R.; Lang, H. (1976) Evaluation of column extraction: a new procedure for the analysis of drugs in body fluids. *Journal of Forensic Science*, 7(2):131-40.
- Brunetto, M.R.; Delgado, Y.; Gutierrez, L.; Gallignani, M. (2005) Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7:37(1):115-20.
- Brunetto, M.R.; Gutierrez, L.; Delgado, Y.; Gallignani, M.; Burguera J.L.; Burguera M. (2003) High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica (ADS) precolumn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(4):534-8.
- Clauwaert, K.M.; Van Bocxlaer, J.F.; Lambert, W.E.; De Leenheer, A.P. (1996) Analysis of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in urine by HPLC with diode array detection. *Analytical Chemistry*, 68: 3021-28.
- Cone, E.J.; Hillsgrove, M.; Darwin, W.D. (1994) Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and "crack" pyrolysis products by gas chromatography mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 40(7 Pt 1): 1299-305.
- Chasin, A.A.; Midio, A.F. (2000) Validation of an ion-trap gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cocaine and metabolites and cocaethylene in post mortem whole blood. *Forensic Science International*, 109(1):1-13.
- Farina, M.; Yonamine, M.; Silva, O.A. (2002) One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Science International*, 127(3): 204-7.
- Fernandez, P.; Bujan, L.; Bermejo, A.M.; Tabernero M.J. (2004) Gas chromatographic determination of cocaine and its metabolite in blood and urine from cocaine users in northwestern Spain. *Journal of Applied Toxicology*, 24(4): 283-7.
- Fernandez, P.; Lafuente, N.; Bermejo, A.M.; Lopez-Rivadulla, M.; Cruz, A. (1996) HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers. *Journal of Analytical Toxicology*, 20(4): 224-8.
- Garside, D.; Goldberger, B.A.; Preston, K.L.; Cone, E.J. (1997) Rapid liquid-liquid extraction



- of cocaine from urine for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications*, 692(1):61-5.
- Gerlits, J. (1993) GC/MS quantification of benzoilecgonine following liquid-liquid extraction of urine. *Journal of Forensic Science*, 38(5):1210-4.
- Hamilton, H.; Wallace, E.; Shimek, E.L.; Land, P.; Harris, S.C.; Christenson, J.G. (1977) Cocaine and benzoilecgonine excretion in humans. *Journal of Forensic Science*, 22(4):697-707.
- Hollister, L. (1986) Medicamentos de abuso, en *Farmacología Básica y Clínica*, Ciudad México, El Manual Moderno.
- Hornbeck, C.L.; Barton, K.M.; Czarny, R.J. (1995) Urine concentrations of ecgonine from specimens with low benzoilecgonine levels using a new ecgonine assay. *Journal of Analytical Toxicology*, 19(3): 133-8.
- Inaba, T. (1989) Cocaine: Pharmacokinetics and biotransformation in man. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(9): 1154-57.
- Jatlow, P.I.; Van Dyke, C.; Barash, P.; Byck, R. (1978) Measurement of benzoilecgonine and cocaine in urine, separation of various cocaine metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 152(1):115-21.
- Logan, B.K.; Stafford, D.T. (1989) Liquid/solid extraction on diatomaceous earth for drug analysis in postmortem blood. *Journal of Forensic Science*, 34(3): 553-64.
- Logan, B.K.; Stafford, D.T.; Tebbett, I.R.; Moore, C.M. (1990) Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Analytical Toxicology*, 14(3):154-9.
- Matsubara, K.; Maseda, C.; Fukui, Y. (1984) Quantitation of cocaine, benzoilecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction. *Forensic Science International*, 26(3):181-92.
- Maurer, H.H. (1998) Liquid chromatography mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications* 713(1):3-26.
- Moeller, M.R.; Steinmeyer, S.; Kraemer, T. (1998) Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications*, 713(1):91-109.
- Moore, C.; Browne, S.; Tebbett, I.; Negrusz, A.; Meyer, W.; Jain, L. (1992) Determination of cocaine and benzoilecgonine in human amniotic fluid using high flow solid-phase extraction columns and HPLC. *Forensic Science International*, 56(2):177-81.
- Needleman, S.B.; Goodin, K.; Severino, W. (1991) Liquid-liquid extraction systems for THC-COOH and benzoilecgonine. *Journal of Analytical Toxicology*, 15(4): 179-81
- Nishikawa, M.; Nakajima, K.; Tatsuno, M.; Kasuya, F.; Igarashi, K.; Fukui, M.; Tsuchihashi, H. (1994) The analysis of cocaine and its metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC/APCI-MS). *Forensic Science International*, 66(3):149-158.
- Roberts, S.M.; Munson, J.W.; James, R.C.; Harbison, R.D. (1992) An assay for cocaethylene and other cocaine metabolites in liver using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 202(2):256-61.
- Scheurer, J.; Moore, C.M. (1992). Solid phase extraction of drugs from biological



tissues- a review. *Journal of Analytical Toxicology*, 16(4):264-9

Tatsuno, M.; Nishikawa, M.; Katagi M.; Tsuchihashi, H. (1996) Simultaneous determination of illicit drugs in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 20(5):281-6.

Tebbett, I.R.; McCartney, Q.W. (1988) A rapid method for the extraction of cocaine and benzoylecgonine from body fluids. *Forensic Science International*, 39(3):287-91.

UN Drugs Control Programme (1995) Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens (ST/NAR/27), New York, United Nations.

Verstraete, A.G. (2004) Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26(2): 200-5

Virag, L.; Mets, B.; Jamdar, S. (1996) Determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in rat plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications*, 681(2): 263-9

**Figura 1.** Cromatograma de HPLC de los patrones de cocaína y benzoilecgonina. Las condiciones cromatográficas fueron: equipo HPLC Pye Unicam 4020 con una columna de fase reversa LC-318 (5  $\mu$ m, 25 cm x 6 mm) y una pre-columna RP-8 (7  $\mu$ m), la fase móvil fue agua desionizada: acetonitrilo:ácido fosfórico:hexilamina (825:175:4.9:0.28), pH 3 con una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. La detección se realizó con detector UV a 230 nm.

