

Screening y confirmación de drogas de abuso

Luis Angel Vidal del Río*
 Javier Doadrio Marsal**

RESUMEN

Se hace una revisión sobre las diferentes posibilidades que ofrecen las técnicas de inmunoensayo y las cromatográficas en conjunción con los detectores específicos y el de masas, en el proceso de screening y posterior confirmación de positivos a drogas de abuso en muestras de orina.

SUMMARY

A review is made of the possibilities offered by immunoassay and chromatographic techniques in addition to the specific detectors and mass detector in the process of screening and confirmation positive abuse drugs in urine samples.

INTRODUCCION

El progresivo incremento en el número de pruebas analíticas sobre consumo de drogas de abuso viene justificado por su utilidad para detectar precozmente conductas bien sean aditivas u ocasionales y el valor preventivo que reporta esa información, para iniciar rápidamente la deshabitación, así como el valor disuasorio que ofrece la constatación fácil del consumo.

En el seno de las FAS estas evidencias analíticas tienen una especial trascendencia por las acciones disciplinarias que pueden derivar y por la importancia que para la seguridad y buen funcionamiento de las mismas supone el conocer de antemano aquellos miembros en quienes no se puede encomendar puestos de responsabilidad debido a su conexión con el problema de la drogadicción.

Por ello es necesario disponer de técnicas lo suficientemente precisas y fiables que permitan detectar en los medios biológicos aquellas sustancias consideradas como ilícitas. Afrontar con éxito esta tarea es un reto al analista toxicólogo, que dispone como herramientas las técnicas que a conti-

nuación expondremos, mostrando así las diferentes opciones ó alternativas que para estos fines se dispone y que se vienen utilizando en diferentes laboratorios así como en los del Grupo de Farmacia de Madrid y de Sevilla.

1. TECNICAS DE INMUNOENSAYO

Con esta denominación genérica se incluye un amplio grupo de métodos que aunque distintos en sus modos de etiquetaje incluyen como característica común la capacidad de una determinada droga de inhibir de modo competitivo la reacción entre anticuerpos específicos de esa misma droga y una molécula apropiada que es esa misma droga marcada o etiquetada convenientemente, y que participa en la reacción inmunoquímica con el anticuerpo como si fuera la droga de origen. La forma de marcar puede ser por medio de un radioisótopo en cuyo caso hablamos de Radioinmunoanálisis (RIA), con un enzima unido a su estructura covalentemente, Enzimoimmunoanálisis (EMIT), por medio de células sanguíneas Inhibición de la Hemaglutinación (H.I.), por medio de un enzima que actúa sobre un sustrato fluorescente (SLFIA), por medio de un radical nitróxilo unido covalentemente Free Radial Analysis Technique (FRACT).

En una reacción de inmunoensayo una vez adicionados a la muestra los

anticuerpos específicos, la droga etiquetada y el sustrato específico del enzima, se produce una reacción y del equilibrio que resulta, cantidades variables del enzima ligado, con capacidad de actuar sobre el sustrato y originar otros compuestos cuya concentración susceptible de medir espectrofotométricamente se correlaciona con el contenido de la droga investigada en la muestra.

En otros casos la reacción inmunoenzimática es de carácter heterogéneo, efectuándose un paso previo de separación, absorción, formación de un compuesto inmunológico con otro segundo anticuerpo, o cualquier otro medio. A este grupo pertenecen las técnicas de Radioinmunoensayo en las que se correlaciona en la etapa final la actividad radioactiva medida en el detector, con la concentración de droga en la muestra. En general las técnicas de inmunoensayo son sensibles, rápidas y de fácil ejecución, adaptándose a la perfección a un proceso de automatización, lo que permite procesar un ingente volumen de muestras, precisando sólo unos pocos microlítricos de orina para cada serie de determinaciones.

Los pasos previos de preparación de la muestra ineludibles en otras técnicas, aquí no son necesarios, y el coste de las determinaciones tiene un precio razonable. Estas ventajas hacen que las técnicas de enzimoimmunoanálisis y muy especialmente el Enzimoimmu-

* Cte. de San (Farmacia). Grupo de Farmacia de Sevilla.

** Cap. de San (Farmacia). Grupo de Farmacia de Madrid.

noanálisis homogéneo (EMIT) sea el elegido en la mayoría de los laboratorios para el Screening previo, que suele realizarse en orina, donde se encuentran concentraciones abundantes de las substancias y metabolitos, no requiriendo más precauciones la muestra que su conservación a baja temperatura y comprobar previamente PH, densidad aspecto, etc., asegurándose de que no existen manipulaciones previas intencionadas. Por otra parte dado que la cantidad utilizada es ínfima, quedará siempre suficiente muestra disponible para la realización de posteriores pruebas de confirmación que se precisasen.

Estas técnicas poseen algunas limitaciones que se deben tener presentes en su aplicación. La primera y más importante deriva del hecho de no existir anticuerpos con absoluta especificidad con ello cualquier compuesto estructuralmente relacionado mostrará en mayor o menor grado una reactividad cruzada lo que puede inducir a asignar como positivos la presencia de substancias emparentadas química ó estructuralmente con la ensayada. Esta interferencia es bien patente en el grupo de los Opiáceos y en el de las Feniletilaminas aunque en el último recientemente se dispone desde de anticuerpos monoclonales mucho más específicos, y que minimizan el problema.

Existen otros casos como en la investigación de cocaína, en que todos los metabolitos y especialmente la benzoil ecgonina contribuyen a la reacción, lo que aquí no supone inconveniente al no producir reacción cruzada importante el resto de los alcaloides del tropano.

En el caso de los ácidos cannabinóicos que se eliminan del metabolismo del delta 9 tetrahidrocanabinol ocurre que los anticuerpos exhiben una importante reactividad cruzada lo que traduce en un refuerzo de la respuesta y por tanto un aumento de la sensibilidad al grupo.

Otra limitación a tener presente con estas técnicas EMIT es que son semicuantitativas facilitando en todo caso una información aproximada de las concentraciones en función de las tasas siendo el valor Cut —off previamente prefijado y en función de la sensibilidad de la técnica lo que se utiliza para asignar positivos ó negativos.

Por lo que a sensibilidad se refiere, las técnicas EMIT brindan unos límites de detección tan bajos, ver tabla n.º 1 que en la práctica son suficientes para evidenciar la presencia en orina de metabolitos 24 a 48 horas del consumo

DROGA/ METABOLITO	CONCENTRACION MINIMA EN ORINA microgramos/ml	TIEMPO DE DETECCION
Anfetamina	1	1-2 días
Benzodiazepinas	1	3
Benzoilecgonina	0,3	2
Morfina	0,3	2
Metadona	0,3	3
Secobarbital	0,3	1
11-NOR-delta 9 -THC-COOH	0,05	Uso crónico 14 días Uso aislado 2-3 días

Cuadro 1. Límites de detección (EMIT)

de la mayoría de las drogas habituales siendo especialmente larga la detección de los metabolitos del delta-9 tetrahidrocanabinol, que debido a su lenta eliminación pueden detectarse en fumadores crónicos hasta 14 días después de su uso. (Cuadro 1)

1.2. Métodos RIA

Algunos laboratorios utilizan todavía estas técnicas de inmunoanálisis heterogéneo. Su sensibilidad es equiparable a los métodos EMIT, pero cuentan con el lastre de tener que utilizar material radioactivo, con las precauciones, protección y obligaciones legales que comporta el uso de radioisótopos, sin olvidar que los reactivos utilizados son de muy rápida caducidad, y muy costosas los detectores de lectura de datos.

No obstante subsisten algunas técnicas interesantes fruto del desarrollo de antisueros con diferentes especificidades hacia distintos metabolitos, como por ejemplo las desarrolladas para la determinación de morfina—3 glucurónido y morfina—6 glucurónido, y otras para diferenciar el metabolismo de desmetilación de la codeína y su despistaje de positivos a heroína.

1.3. Métodos de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Introducidos por Adler y Liu en 1971 son simples y de bajo coste pero menos sensibles que los EMIT y RIA y exigen la observación visual del ensayo con los correspondientes errores subjetivos. Pueden ser útiles cuando no se disponga de la droga marcada enzimática o radiactivamente, aspecto hoy prácticamente superado.

1.4. Métodos FRACT

Conocida como Free radial analysis technique, fue introducida por Leute a principios de los 70, y se basa en unir un ión nitrógeno estable, que presenta un electrón simple de resonancia de

spin de tres líneas (ESR) en su espectro, covalentemente a una droga que va a ser objeto de análisis. La droga así etiquetada presenta un espectro (ESR) característico. Cuando esta molécula marcada se une al anticuerpo específico, se induce una limitación en la movilidad del electrón de spin que se detecta en un ensanchamiento de la banda y en intensidad de los picos. Al igual que otras técnicas inmunoenzimáticas se produce un equilibrio competitivo entre los anticuerpos y la droga libre y la etiquetada, lo que nos permite una medida de la concentración de la substancia investigada en función de la intensidad de los picos del ESR. Con este procedimiento se ha podido llegar a sensibilidades del nanogramo/ml., si bien está poco introducida especialmente por la costosa instalación que requiere.

1.5. Técnicas FPIA

Las técnicas de inmunoensayo por fluorescencia de polarización, constituyen otra variante útil del ensayo inmunoensayo, que incorpora como novedad la presencia como marcador de la droga un substrato del enzima beta galactosidasa, denominado FDR (reactivo fluorogénico), que no es fluorescente hasta que ha sido hidrolizado por la beta galactosidasa. En la reacción se mezclan el reactivo (FDR), la muestra biológica conteniendo la droga a investigar, el anticuerpo específico, y el enzima beta galactosidasa. Cuanta mayor sea la tasa de droga libre en la muestra mayor será la cantidad de FDR que quedará disponible en el equilibrio, y sobre él actuará el enzima que deja libre el compuesto fluorescente, cuya concentración se correlaciona con la de la droga investigada.

Las ventajas de los métodos FPIA son constituir un ensayo homogéneo sensible y específico, rápido de fácil ejecución que se puede aplicar a infinidad

de compuestos tanto en drogas de abuso como en el medio hospitalario. Su costo ha sido algo más elevado que el método EMIT.

2. METODOS CROMATOGRAFICOS

Este amplio grupo de métodos constituye uno de los procedimientos más universalmente empleados y son las mejores herramientas disponibles para la confirmación de los casos de positividad previamente detectados por cualquiera de las técnicas anteriores.

Aunque los principios fisico-químicos en que se fundamentan son los mismos para todo el grupo, existen tres técnicas fundamentales dentro de este apartado; la CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC), la CROMATOGRAFIA DE GASES (G.C.), y la CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICACIA (HPLC). Las técnicas TLC, especialmente aquellas que utilizan placas del tipo HPTLC (High performace thin layer chromatography) poseen un tamaño de poro muy pequeño, y una gran superficie específica, rindiendo óptimas separaciones. Otra interesante aplicación lo constituyen las placas de recubrimiento en fase reservada tipo octadecilo muy adecuadas a la separación de cannabinoles.

La CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA precisa de poco aparataje y es versátil y de fácil ejecución permitiendo separar infinidad de sustancias bien revelándolas ó visualizándolas sin destruir por medio de luz UV. Comparte con la HPLC el no originar ningún tipo de degradación, razón por la que se sigue utilizando profusamente especialmente en el campo de la bioquímica.

CROMATOGRAFIA DE GASES. Constituye una de las mejores bazas disponibles, muy especialmente desde la aparición de columnas capilares de silica fundida, recubiertas de fases estacionarias crosslinked de metil silicona, y metil fenil silicona (OV-1 y OV-17), para la separación de compuestos poco polares y polietilen glicol (carbowax-20) para los de mayor polaridad.

A estos sistemas cromatográficos pueden ir asociados diversos tipos de detectores, siendo el más idóneo y específico el de Nitrógeno-Fósforo, que responde a cantidades de substancia del orden del picograma, para aquellos compuestos que llevan nitrógeno en su molécula, que es el caso de los alcaloides, barbitúricos, anfetaminas, benzodiazepinas, y un gran número de fármacos. Sólo algunas drogas como los derivados del Cannabis, escapan a este detector

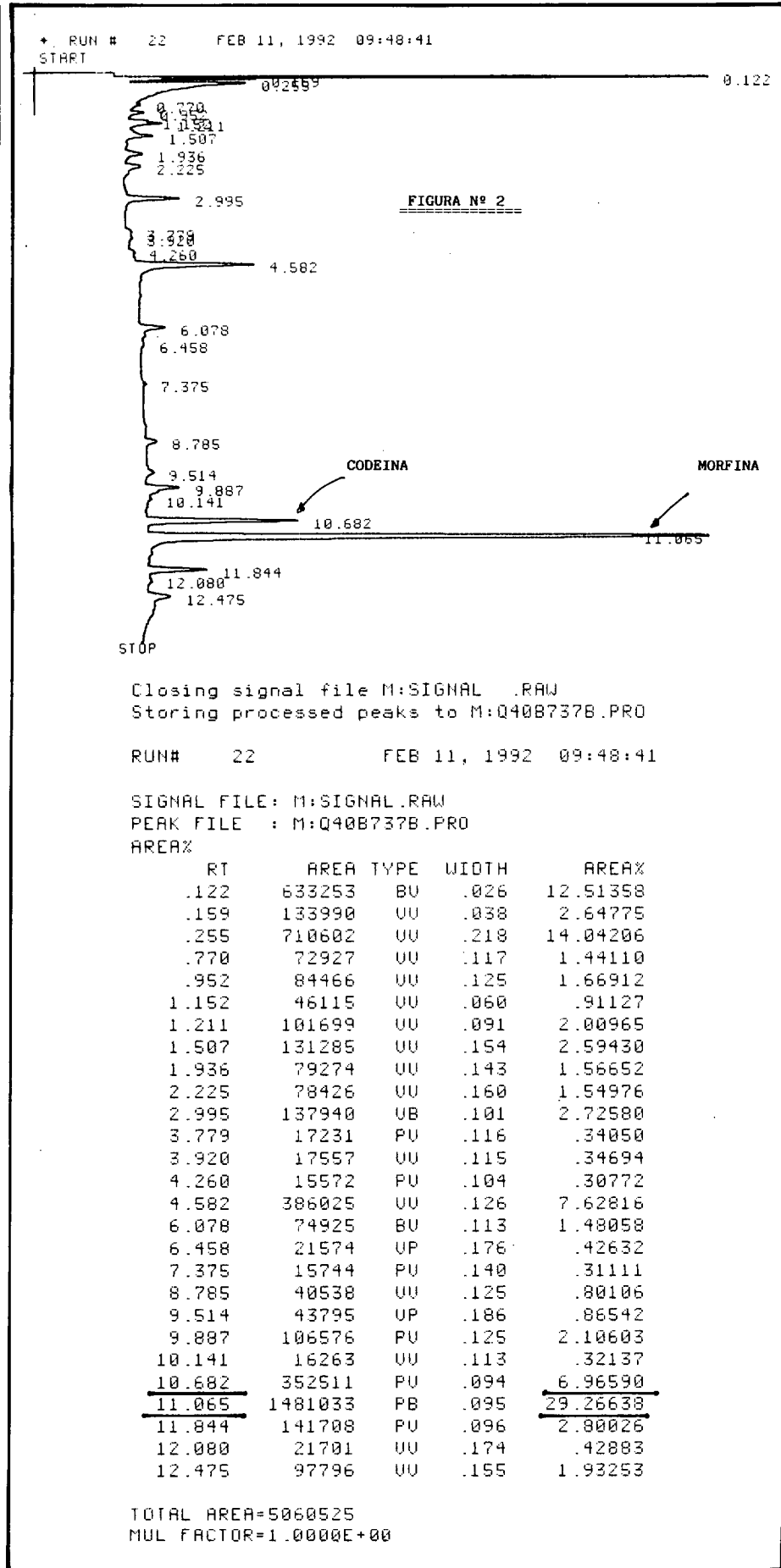


Figura 2

bardeo de la muestra con partículas pesadas (FAB y SIMS), con fotones, con partículas de fisión nuclear, o bien por aplicación de energía térmica o eléctrica en caudales líquidos (termopulverización (TSP) o electropulverización (ESI).

La gran ventaja que aportan estas nuevas técnicas de ionización, aparte de facilitar el acoplamiento HPLC-MS es la apertura del campo de aplicación a moléculas altamente polares, incluso iónicas, no volátiles, de elevado peso molecular (> 1.000) y termolábiles.

Dentro de las posibilidades futuras de la técnica cabe citar los recientes trabajos de acoplamiento de la electroforesis capilar con la MS, con resultados

espectaculares en cuanto a especificidad y límites de detección.

Otra de las alternativas ya disponibles son la utilización de detectores IR acoplados a un cromatógrafo de gases de columna capilar. Esto a sido posible de la introducción de detectores FTIR (Fourier Transform Infrared Detector), que permiten efectuar un scan casi instantáneo dentro de todo el rango de longitudes de onda que se exploran, con acoplamiento directo on-line con el CG. Este nuevo sistema tiene la enorme ventaja de poder distinguir entre compuestos que son estructuralmente muy similares, y con la del mismo peso atómico. Información aún más definitiva se obtiene con la unión GC-FTIR-MS, obteniéndose en este caso secuencialmente, tiempos de retención, datos IR y MS de cada tipo a tiempo real según eluyen por columna. Como ejemplo de su capacidad de resolución tenemos el caso de la anfetamina-metanfetamina, cuyo espectro de masas es virtualmente idéntico mientras que se pueden apreciar importantes diferencias en su espectro IR.

CONCLUSIONES

Hemos visto que el proceso analítico de drogas de abuso puede apoyarse en varias técnicas diferentes, cuya elección depende en gran medida de los condicionamientos económicos y de la disponibilidad lo suficientemente capacitado para su ejecución, pues si bien es cierto que existe una gran automatización en algunas etapas del análisis, las técnicas de confirmación, requieren métodos más laboriosos, que se deben acometer con la garantía absoluta de ausencia de errores, en todas las etapas del proceso, en orden a la validez de los resultados.

Existe unanimidad en que los métodos de inmunoensayo especialmente EMIT y EPIA son los más idóneos en la etapa básica de screening, y que siempre deberán contrastarse y confirmarse estos resultados por métodos cromatográficos HPLC, GC con detector NP ó de masas como mejor opción, tendencia ya implantada desde hace bastantes años en los más importantes laboratorios.



Figura 3

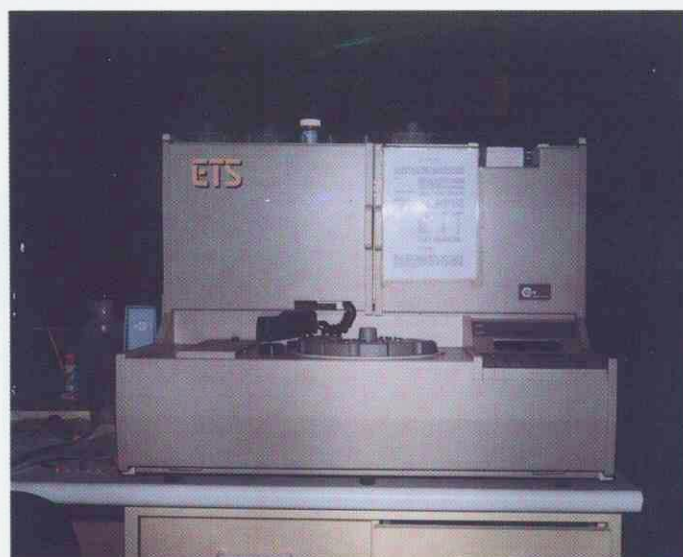


Figura 4

BIBLIOGRAFIA

- 1.—DABRIO M. "Cromatografía de gases". Alhambra. Madrid 1979.
- 2.—GROB R. "Modern practice of gas chromatography". Wiley Interscience. New York 1985.
- 3.—KANAPP D. "Analytical derivatization reactions". Jhon Wiley and sons. New York 1979.
- 4.—HYVER K.J. "High resolution gas chromatography". Hewlett Packard 1989.
- 5.—CLARK'S "Isolation and identification of drugs". Pharmaceutical press. London 1986.

- 6.—A. WALLACE HAYES "Principles and methods of toxicology". Raven press New York 1989.
- 7.—MAJORS R. "Bonded stationary phases in chromatography". An arbor science. Mich 1974.
- 8.—J. SEIBL "Espectrometría de masas". Aliambra. Madrid 1973.
- 9.—W.H. McFADDEN, "Techniques of combined GC/MS: Applications in organic analysis". Wiley, Londres 1973.
- 10.—G. TOJO "Espectros de Masas". Universidad de Santiago de Compostela 1991.

- 11.—C. RODRIGUEZ BUENO "Aplicaciones actuales y futuras de MS en el control de dopaje". Consejo Superior de Deportes, Madrid 1991.
- 12.—E. GELPLI "Presente y futuro de la MS". CSIC. Barcelona. 1991.
- 13.—J. CHAMBERLAIN. "Analysis of drugs in biological fluids". CRC Press. 1987.
- 14.—WILLARD, MERRITT, DEAN. "Métodos instrumentales de análisis". CECSA. 1991.
- 15.—HEWLETT Packard Applications Tip: GC/MS Note 80-19B.