

Estrategias para identificar derivados de anfetamina y metanfetamina en orina por cromatografía de gases-espectrometría de masas

Strategies for Identifying Amphetamine and Methamphetamine Derivatives in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Ariadna McPherson Medina¹ <https://orcid.org/0000-0002-7739-1105>

Dayamín Martínez Brito^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7066-4916>

Mirta Torres Castellanos¹ <https://orcid.org/0000-0002-1222-5712>

Taimí Fiallo Fernández¹ <https://orcid.org/0000-0002-8210-502X>

Teresa Correa Vidal¹ <https://orcid.org/0000-0002-6571-2055>

Rodny Montes de Oca Porto¹ <https://orcid.org/0000-0002-4534-0370>

¹Laboratorio Antidoping de la Habana. Cuba.

*Autor para la correspondencia: xtfdbm@zoho.com; dayamin.cu1@gmail.com

RESUMEN

Introducción: Uno de los desafíos en el análisis de control de dopaje es demostrar la precisión y exactitud de los resultados analíticos. Por ello, es necesario mostrar evidencias durante el análisis de las muestras sobre qué exactamente consumió el atleta. La selegilina es una sustancia estimulante sintetizada a partir de la levo-metanfetamina. Sus metabolitos fundamentales son la L-anfetamina y la L-metanfetamina las cuales son, además, metabolitos de otras sustancias.

Objetivo: Evaluar la formación de derivados en el análisis de anfetamina y metanfetamina, a través de tres parámetros cromatográficos, para establecer una estrategia para su identificación.

Métodos: Se evaluaron muestras de orina colectadas antes y después de una administración oral de 10 mg de selegilina para verificar la funcionalidad de los métodos. Luego de una extracción líquido-líquido con terc-butil metiléter a pH alcalino se obtuvieron derivados R-

α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacetilo (R-MTPCI) y N-trifluoroacetamida (TFA) para el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se compararon los resultados sin y con formación de derivados N-TFA y R-MTPCI.

Resultados: Los derivados N-TFA demostraron no ser una buena opción en ensayos de cuantificación debido a la formación de derivados múltiples. Sin embargo, su aplicación en procesos de identificación (al igual que el derivado R-MTPCI) permitió la obtención de fragmentos de alto valor diagnóstico en el espectro de masas. Luego de la eliminación de los metabolitos específicos de la selegilina, solo se observaron la anfetamina y metanfetamina. El uso del derivado R-MTPCI resolvió cromatográficamente los enantiómeros levo y dextro de ambos compuestos.

Conclusiones: La evaluación de muestras que contienen anfetamina y metanfetamina-N-TFA permitió obtener espectros de masas con alto valor diagnóstico, pero no se recomienda en ensayos de cuantificación. El uso del reactivo de R-MTPCI incrementó la precisión en la identificación del fármaco original selegilina.

Palabras clave: selegilina; formación de derivados; metabolismo; espectrometría de masas.

ABSTRACT

Introduction: One of the challenges in doping control analysis is to demonstrate the preciseness and accuracy of the analytical results. Therefore, it is necessary to show evidence during the analysis of the samples about what exactly the athlete consumed. Selegiline is a stimulant substance synthesized from levo-methamphetamine. Its fundamental metabolites are L-amphetamine and L-methamphetamine which are also metabolites of other substances.

Objective: To evaluate the formation of derivatives in the analysis of amphetamine and methamphetamine through three chromatographic parameters to establish a strategy for the identification of both compounds.

Methods: Urine samples collected before and after oral administration of 10 mg of selegiline were evaluated to verify the functionality of the methods. After a liquid-liquid extraction with tert-butyl methylether at alkaline pH, R- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetyl (R-MTPCI) and N-trifluoroacetamide (TFA) derivatives were obtained for analysis by gas chromatography-mass spectrometry. The outcomes without and with formation of N-TFA and R-MTPCI derivatives were compared.

Results: N-TFA derivatives proved not to be a good option in quantification trials due to the formation of multiple derivatives. However, its application in identification processes (like the derivative R-MTPCI) allowed the obtention of fragments of high diagnostic value in the mass spectrum. After elimination of specific metabolites of selegiline, only amphetamine and methamphetamine were observed. The use of the derivative R-MTPCI chromatographically resolved the levo and dextro enantiomers of both compounds.

Conclusions: The evaluation of samples containing amphetamine and methamphetamine-N-TFA allowed to obtain mass spectra with high diagnostic value, but it is not recommended in quantification tests. The use of the R-MTPCI reagent increased the accuracy in the identification of the original selegiline drug.

Keywords: selegiline; derivatives formation; metabolism; mass spectrometry.

Recibido: 11/02/2022

Aceptado: 10/06/2022

Introducción

La sección S6 de la “Lista de Sustancias Prohibidas” para los deportistas, de la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) describe a los estimulantes que aumentan la actividad orgánica a través de sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC). Esto influye en un aumento de la actividad motriz, cardiorespiratoria y de los procesos metabólicos termogénicos del organismo, dando lugar a una mayor oxidación de lípidos en el tejido adiposo.

Entre este tipo de sustancias se encuentra la cafeína, efedrina, cocaína, anfetamina, metanfetamina y selegilina, entre otros.^(1,2) Este grupo incluye compuestos de estructuras químicas y metabolismo similares. El ejemplo clásico es la anfetamina, pues además de existir como forma farmacéutica por sí misma, es también un metabolito común para diferentes fármacos como son anfetaminil, mesocarb, clobenzorex, selegilina, dimetilanfetamina etilanfetamina, entre otros. Una situación similar ocurre con la metanfetamina.^(3,4)

Uno de los retos de la analítica del control de dopaje es demostrar la exactitud en los resultados analíticos, pues de ello dependen las consecuencias para el deportista. Es necesario mostrar evidencias de lo que ha ingerido el atleta a partir del análisis de sus muestras biológicas (orina y sangre) colectadas oportunamente. Cuando en una muestra de orina se demuestra la presencia de anfetamina o metanfetamina, el principal reto es demostrar cuál es la droga madre (medicamento ingerido) mediante una identificación adecuada.

Aunque la introducción de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) ha constituido una solución a este problema,⁽⁵⁾ y más recientemente la cromatografía de fluido supercrítico,⁽⁶⁾ la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) continúa siendo un método de elección para el análisis estas sustancias. Este problema es usualmente resuelto mediante la formación de derivados. Una reacción de formación de derivados es un paso en el método de ensayo que mejora la detectabilidad de un compuesto mediante la introducción de grupos con alta afinidad electrónica que pueden producir un aumento en la eficiencia de ionización.

La inserción de una reacción de formación de derivados en un método de ensayo para análisis por CG tiene como objetivo aumentar la volatilidad y selectividad, reducir la degradación de las sustancias aumentando su estabilidad térmica (fundamentalmente en el inyector), aumentar la respuesta del detector haciendo factible el análisis de trazas, mejorar la separación entre picos cercanos y reducir las colas cromatográficas facilitando así el análisis de muestras complejas. Además, el espectro de masas obtenido brinda mayor información sobre la estructura química y los grupos funcionales, con fragmentos de mayor intensidad.^(7,8,9,10)

Las reacciones de formación de derivados tienen efectos secundarios como la formación de derivados múltiples con sustancias polifuncionales y la producción no controlada de derivados menores si las condiciones de reacción no están bien establecidas. Ambos inconvenientes dificultan la interpretación de los resultados y pueden disminuir la sensibilidad del método debido a la formación de varios derivados para un solo analito. El procedimiento de formación de derivados ideal debe lograr rendimientos entre 95-100 %, ser reproducible y formar productos que se distingan fácilmente de la matriz. La reacción debe proceder de forma rápida con una metodología sencilla y simple, con reactivos y reacciones que no presenten peligros inusuales.⁽¹¹⁾

La formación de derivados quirales seguida de separación cromatográfica es el método más común para el análisis estereo específico de anfetamina y sus derivados. Los reactivos más comunes son el cloruro de trifluoroacetil-S-prolilo (TPC) y el cloruro de R-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil) fenilacetilo (R-MTPCI) también conocido como reactivo de Mosher. El TPC es un reactivo económico y está fácilmente disponible pero no es recomendado para estudios cuantitativos debido a su baja pureza enantiomérica. Varios autores han utilizado R-MTPCI para la detección de anfetamina en sangre total y orina con una excelente resolución y separación cromatográfica.^(12,13,14)

La identificación de sustancias por métodos de espectrometría de masas se basa en la abundancia relativa (AR) de iones diagnóstico en la muestra problema comparado con un material de referencia (en este caso, las muestras de control). Entre los criterios para realizar una adecuada identificación de una sustancia en una muestra problema, están: la adquisición de al menos tres iones diagnóstico, la determinación de la abundancia de iones de diagnóstico a partir del área o la altura del pico en los cromatogramas de iones seleccionados y el ion diagnóstico más abundante en el espectro de masas es tomado como referencia para el cálculo de las abundancias relativas.

La AR de los iones de diagnóstico no debe diferir de la ventana de tolerancia máxima para abundancias relativas, según establece la Comisión Europea para la Implementación de Métodos Analíticos. Además, en el documento técnico de la AMA se establece que, en caso de que la cantidad mínima de tres iones diagnóstico no esté disponible, se debe evaluar la muestra introduciendo reacciones de formación de derivados diferentes o una segunda técnica de ionización.^(15,16)

La selegilina (fenil-isopropil-metilpropargilamina) pertenece al grupo de las feniletilaminas y fue sintetizada a partir de la levo-metanfetamina y un grupo propargilo. El enantiómero levógiro es quien posee la actividad farmacológica y se comenzó a comercializar como “deprenil”. Este medicamento se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y sufre un proceso de biotransformación en el hígado a través de la N-desmetilación, N-dealquilación, N-despropilación e hidroxilación aromática (β -hidroxilación y *p*-hidroxilación).

Se han descrito 10 metabolitos fundamentales entre ellos la metanfetamina y la anfetamina. Debido a la alta enantioselectividad de las enzimas que participan en el metabolismo de la selegilina, solo se forman los metabolitos L, R, (-)-enantiómeros de la anfetamina y la metanfetamina. Además, ambos analitos reciben el mayor interés en el ámbito del control

del dopaje pues son los que han mostrado un mayor tiempo de excreción, superior a la propia droga madre (selegilina).^(17,18)

El presente trabajo tuvo el objetivo de evaluar la formación de derivados en el análisis de anfetamina y metanfetamina, a través de tres parámetros cromatográficos, para establecer una estrategia para su identificación.

Métodos

Material de referencia: la L-(+)-metanfetamina, R(-)-selegilina y la mezcla racémica de anfetamina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Alemania) en forma de ampollitas selladas conteniendo 1 mL de una disolución metanólica de 1 mg/mL. La difenilamina se utilizó como estándar interno y se obtuvo igualmente de Sigma-Aldrich (Alemania) de la cual se preparó una disolución en metanol a una concentración de 1 mg/mL.

Reactivos: terc-butil metiléter pureza > 99 %; metanol pureza 99,93 %; *n*-hexano pureza 99 %; sulfato de sodio anhidro, pureza > 99,7 %, para análisis y la trietilamina pureza ≥ 99,5 % para síntesis fueron proveídos por Merck (Alemania). Hidróxido de potasio e hidróxido de amonio; N-metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA) pureza 97 %, cloruro de (R)-(-)- α -metoxy- α -trifluorometilacetil (MTPCl, reactivo de Mosher) pureza 99 % para formación de derivados quirales se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Alemania).

Muestras de control: las muestras de control se prepararon en matriz orina (*pool* de orinas de tres voluntarias de sexo femenino) en las que previamente se verificó la ausencia de interferencias al tiempo de retención de los analitos de interés. Se adicionó suficiente volumen de las disoluciones de anfetamina, metanfetamina y selegilina para obtener una concentración final de 500 ng/mL de cada sustancia en orina.

Muestras de orina: las muestras analizadas se colectaron de un voluntario supuestamente sano (sexo femenino, 22 años, de 57 kg de peso corporal y actividad física moderada) al que se administró una dosis única de 10 mg de selegilina por vía oral (deprenil clorhidrato). Las muestras de orina se colectaron antes y hasta las 42 horas después de la administración del fármaco. Las muestras de orina fueron colectadas según la necesidad fisiológica de la voluntaria.

Consideraciones éticas: en el experimento se siguió lo establecido en la Declaración de Helsinki y las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la investigación

con humanos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Deportiva.⁽¹⁹⁾

Preparación de las muestras y controles para su análisis instrumental:

- Método 1: se aplicó a las muestras colectadas antes y después de la administración de selegilina. A 2 mL de orina se adicionaron 25 μ L de estándar interno y se realizó una extracción líquido-líquido con 5 mL de terc-butil metiléter a pH alcalino (500 μ L, KOH 5 M) y con la adición de 1 g de sulfato de sodio anhidro para alcanzar el “*salting out*”. La mezcla se agitó lentamente (40 rpm) durante 30 min y luego de centrifugar (5 min, 3500 rpm), la fase orgánica se separó y evaporó bajo corriente suave de nitrógeno. Los extractos secos se reconstituyeron en 100 μ L de metanol y se trasvasaron a microviales para su análisis instrumental. El grupo incluyó muestras de control.
- Método 2: se aplicó a las muestras colectadas antes y después de la administración de selegilina. Luego de aplicar el método 1 a las muestras, y antes de evaporar el disolvente, se adicionaron 75 μ L de MBTFA con el objetivo de formar derivados N-trifluoracetamida (N-TFA) de la anfetamina y metanfetamina. Se incubaron a 60 °C durante 15 min, y posteriormente se trasvasaron a microviales para su análisis instrumental.
- Método 3: se aplicó a las muestras colectadas antes y después de la administración de selegilina, así como a la muestra de excreción de metanfetamina. Se siguió el mismo proceder del método 1 con excepción de la reconstitución del extracto seco en metanol. Luego de evaporar el disolvente, los extractos secos se sometieron a una reacción de formación de derivados para compuestos quirales. Se adicionaron 2 mL de una disolución de trietilamina y 20 μ L de MTPCI (reactivo de Mosher) y se incubó la mezcla a 80 °C durante 20 min. Luego de alcanzar la temperatura ambiente, se adicionaron 10 μ L de hidróxido de amonio y se incubó por otros 20 min a 80 °C. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 3500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a tubos diferentes donde la fase orgánica se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Los extractos se reconstituyeron con 50 μ L de hexano y se trasvasaron a microviales para su análisis instrumental.

Equipamiento: cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 6890 *plus*, con inyector automático Agilent 7683 acoplado a Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5973. Columna capilar HP-Ultra 2, fase estacionaria fenil-metil-silicona 5 %, 12 m de longitud, 0.20 mm de diámetro interno y 0.33 μm de espesor de película. El volumen de inyección fue de 3 μL en modo *split* (relación 1: 10) y el gas portador fue helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 280 °C y el modo de adquisición de datos fue en modo SCAN en un rango de masas de 50 a 600 Da.

Evaluación de los datos: los cromatogramas y espectros de masas se obtuvieron con el software *MassHunter Workstation Manager Qualitative Analysis* versión B.07.00 Agilent Technologies Inc. 2014. La identificación de la anfetamina, la metanfetamina y la selegilina en las muestras de orina se realizó a partir de las muestras control por comparación del tiempo de retención y los espectros de masas según recomienda el documento técnico TD2021IDRC de la AMA.⁽¹⁶⁾

Para comparar las concentraciones, el área bajo la curva del pico base en el espectro de masas de cada metabolito (en cada muestra) se normalizó a la gravedad específica (g.e.) de la orina de 1,020. Para ello se calculó el factor de corrección según recomienda el documento técnico TD2022DL de la AMA, según la siguiente ecuación:⁽²⁰⁾

$$F_c = (1,020 - 1) / (\text{g.e. muestra} - 1)$$

Donde: F_c : es el factor de corrección; g.e. es la gravedad específica de la orina, 1: densidad del agua.

Las concentraciones de anfetamina, metanfetamina y selegilina fueron estimadas a partir de las muestras control. Se compararon tres parámetros cromatográficos: ancho del pico en la base, altura de la señal cromatográfica y ancho de la señal a la mitad de su altura.

Se evaluó la influencia de la formación de derivados N-trifluoracetamida (N-TFA) en el análisis de anfetamina y metanfetamina a través de tres parámetros cromatográficos: ancho del pico en la base, altura de la señal cromatográfica y ancho de la señal a la mitad de su altura (*full-width-at-half-maximum*, FWHM por sus siglas en inglés). Además, se estudió el uso del reactivo de Mosher (R-MTPCl) para la formación de derivados quirales. En los tres casos se establecieron los criterios de identificación según los criterios de la AMA. La

verificación de la funcionalidad de los métodos se realizó con el análisis de muestras de orina colectadas antes y después de una administración oral de selegilina.

Resultados

En las muestras de orina extraídas por los métodos 1 y 2, se observaron metabolitos de fase I de la selegilina excretados en forma no-conjugada (ej. N-desmetil-selegilina y *p*-hidroxidesmetil-selegine). Las curvas de excreción urinaria para la N-desmetil-selegilina (metabolito específico de la selegilina), la metanfetamina y la anfetamina se obtuvieron con las muestras procesadas por los métodos 1 y 2. La eliminación de la N-desmetil-selegilina coincidió con lo descrito en la literatura y después de las 28 h no fue detectado mediante la técnica usada. La concentración máxima se observó a las 2,5 h estimada en 319 ng/mL, el intervalo de las 15-24 h se observaron concentraciones menores a 15 ng/mL y a las 28 h se estimó la concentración en 2,4 ng/mL. Sin embargo, a las 48 h post-administración cuando no se detectó selegilina, se estimaron las concentraciones de anfetamina y de metanfetamina en 232 y 270 ng/mL, respectivamente. El método 2 arrojó resultados similares, aunque alrededor del 40 % de lo observado en el método 1, debido a la formación de derivados múltiples para un mismo analito.

Las figuras 1 y 2 muestran el cromatograma obtenido para la anfetamina y metanfetamina, respectivamente, analizadas por los métodos 1 y 2, sus espectros de masas, estructuras y propuesta de fragmentación.

El ancho del pico en la base para anfetamina analizada en el método 1 fue de 0,160 min mientras que en las muestras del método 2 fue la mitad (0,081 min). En la señal cromatográfica de la anfetamina analizada por el método 1, el FWHM fue de 0,045, mientras que en la muestra analizada por el método 2 fue de 0,014. Finalmente, la media de la altura de los picos cromatográficos por el método 1 fue de 42 300 unidades, mientras que en el método 2 fue de 75 900, es decir 1,8 veces más alto.

La metanfetamina eluyó en un tiempo de retención mayor que la anfetamina, a los 2,6 min (método 1) y 3,7 min (método 2) y en ambos casos fue el metabolito de mayor intensidad en el cromatograma. La mayor cantidad excretada fue en el intervalo de las 5-24 h posteriores la administración de selegilina con concentraciones estimadas entre 2020 y 2 700 ng/mL. En

la etapa tardía de la eliminación (25 a 42 horas post-administración) la metanfetamina se estimó entre los 200 y 300 ng/mL. En el caso de la metanfetamina, el ancho del pico en la base y el FWHM en la muestra en el método 1 fue de 0,177 y 0,054 min; mientras que en el método 2 fue de 0,062 y 0,015 min, respectivamente. La altura de la señal cromatográfica fue 1,6 veces superior para el caso de las muestras en el método 1.

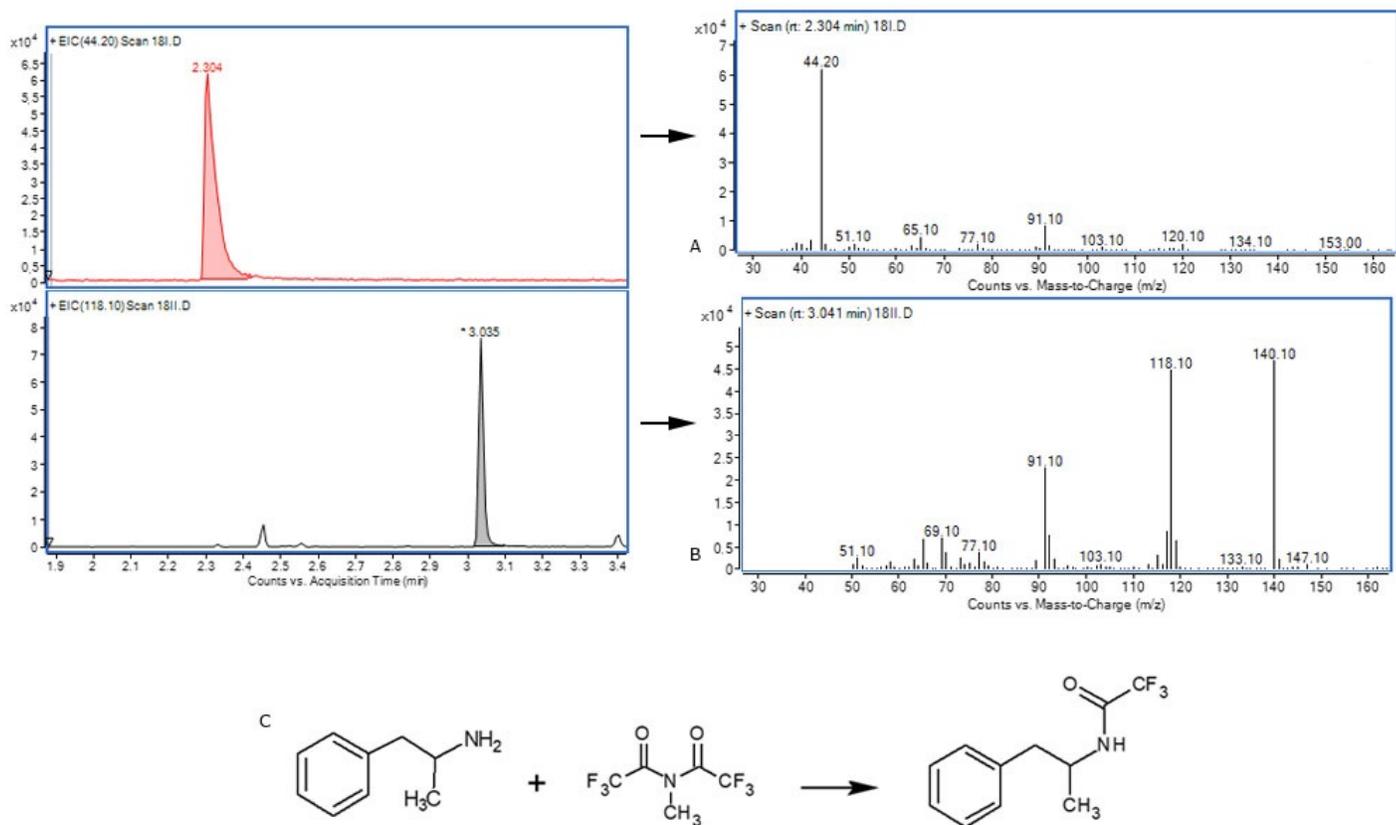


Fig. 1 - Representación del cromatograma iónico, fragmentación y espectro de masas de la anfetamina (A) cromatograma iónico, fragmentación y espectro de masas de la anfetamina en forma de derivado N-TFA, (B) y reacción de formación del derivado N- TFA de la anfetamina con el reactivo MBTFA (C) en la muestra colectada cinco horas posteriores a la administración de selegilina.

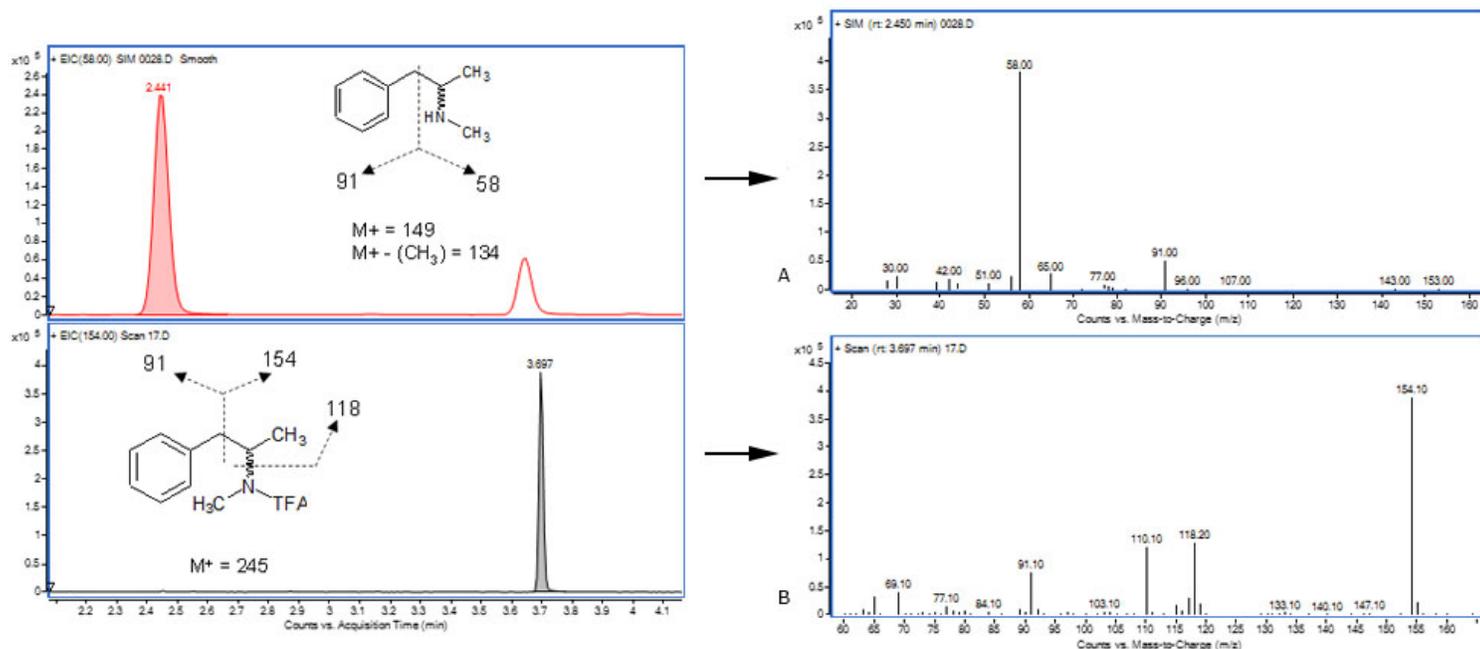


Fig. 2 - Representación del cromatograma iónico, fragmentación y espectro de masas de la metanfetamina A) y cromatograma iónico, fragmentación y espectro de masas de la metanfetamina en forma de derivado N-TFA; B) en la muestra colectada cinco horas después de la administración de selegilina.

La figura 3 muestra la separación cromatográfica de las formas R(-) y S(+) de la anfetamina luego de la reacción quiral con el reactivo de Mosher, así como la reacción química y los espectros de masas. No se observaron interferencias propias de la matriz o de reactivos al tiempo de retención de la anfetamina. Según lo descrito para el metabolismo de la selegilina, solo se observó el isómero R(-). La figura 4 muestra similares resultados para la metanfetamina. En este caso, la muestra control se contaminó con el isómero D(+) debido a la disponibilidad en el laboratorio. No obstante, es evidente la diferencia en los tiempos de retención entre este isómero y el detectado en la muestra post-administración de selegilina (R(-)).

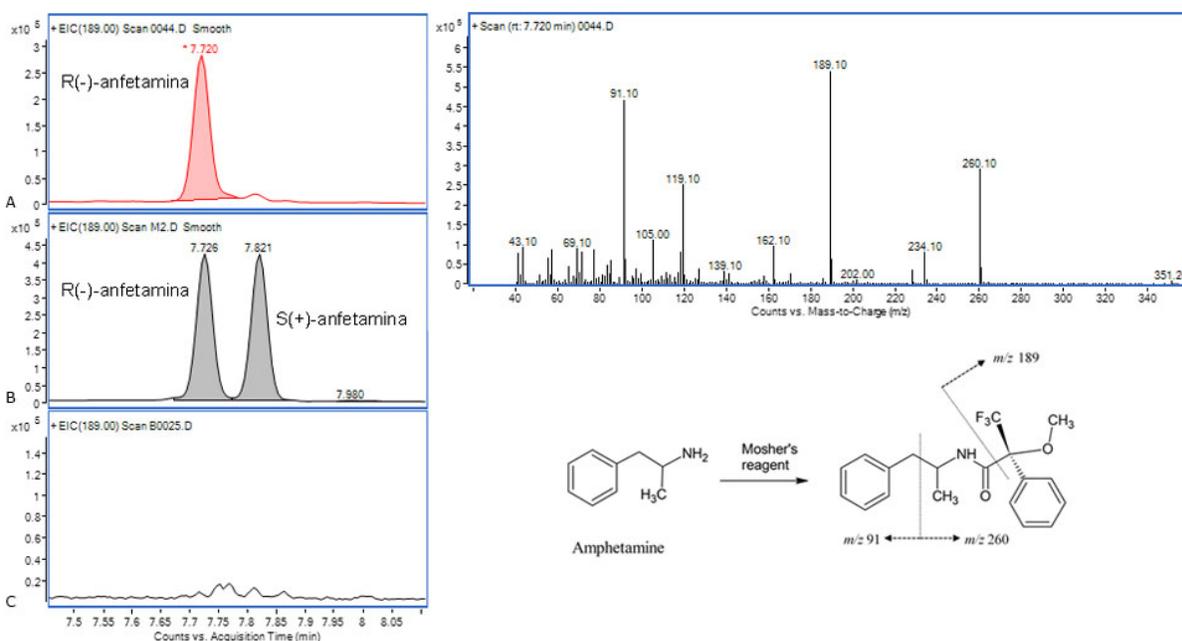


Fig. 3 - Resultados obtenidos con el reactivo de Mosher para derivados quirales. A) Muestra colectada después de 32 horas de una administración oral de dosis única de selegilina; B) Muestra control con mezcla racémica R(-)anfetamina y S(+)-anfetamina; C) Muestra colectada antes de la administración de selegilina.

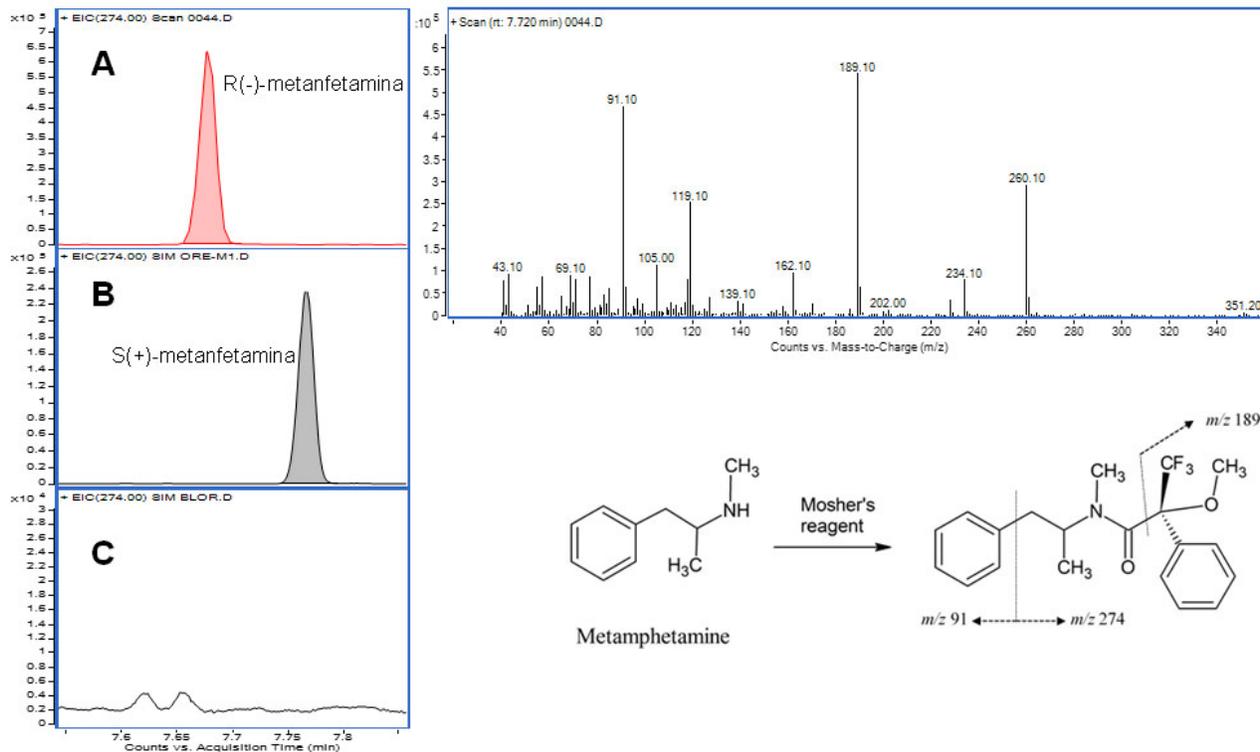


Fig. 4 - Resultados obtenidos con el reactivo de Mosher para derivados quirales. A) Muestra colectada después de 32 horas de una administración oral de dosis única de selegilina; B) Muestra control con S(+)-metanfetamina; C) Muestra colectada antes de la administración de selegilina.

Discusión

El análisis de la anfetamina y la metanfetamina por CG-EM tiene la característica de devolver espectros de masas con una baja abundancia del ion molecular y de los fragmentos que se generan producto del impacto electrónico en la fuente de ionización. En general, se observa un pico base intenso sin otros fragmentos que brinden información útil en la evaluación de la señal cromatográfica. Con el objetivo de obtener una mayor información a través del espectro de masas se han implementado y descrito estrategias de formación de derivados, además, para aumentar el nivel de detección. Entre los más usados en el ámbito de la analítica del dopaje para la detección de sustancias estimulantes están la N-metil-N-trimetil-sililtrifluoracetamida (MSTFA) y la N-metil-bistrifluoracetamida (MBTFA).⁽²¹⁾

Aunque específicos, los metabolitos de la selegilina N-desmetil-selegilina y p-hidroxi-desmetil-selegilina se han descrito como metabolitos de menor importancia debido a las bajas concentraciones en orina y su rápida excreción. Diversos estudios relacionados con el metabolismo de la selegilina en ratas, perros y humanos han demostrado que los metabolitos mayoritarios formados a partir de la biotransformación de este fármaco son la R-(-) metanfetamina y R-(-) anfetamina.^(17,18)

La comparación de los tres parámetros cromatográficos: ancho del pico en la base, altura de la señal cromatográfica y el FWHM demostró la superioridad del método 2 para obtener un adecuado perfil cromatográfico y espectros de masas con fragmentos de valor diagnóstico. Este resultado también influye en la relación señal: ruido y la posibilidad de separar la señal de interés de probables interferentes de la propia matriz. Es importante señalar que el FWHM es un parámetro cromatográfico notablemente considerado en el documento técnico de la AMA TD2021IDCR para la identificación de sustancias en muestras para el control antidopaje.⁽¹⁶⁾

A pesar de las desventajas de una reacción de formación de derivados en procesos de cuantificación, se obtuvieron cromatogramas de mayor calidad para la anfetamina y la metanfetamina con el método 2. La adición del MBTFA previo al proceso de evaporación brindó estabilidad a la molécula obteniéndose un patrón de fragmentación adecuado para una identificación inequívoca.

Enantioselectividad de la formación de derivados

Como se comentó previamente, la anfetamina y la metanfetamina son metabolitos comunes a una serie de sustancias como el clobenzorex, selegilina, dimetilanfetamina, etilanfetamina y famprofazona (entre otros). En estos casos, en la orina se detectan la mezcla racémica de la anfetamina y la metanfetamina, pero la característica principal del metabolismo de la selegilina (comercializado solo el enantiómero levógiro) es la formación de los enantiómeros R-(-) metanfetamina y R-(-) anfetamina.

En el ámbito del dopaje las muestras de orina son colectadas puntualmente a los atletas y la detección correcta de la sustancia que fue administrada no siempre es evidente. En el caso de muestras con presencia de anfetamina y metanfetamina, en la que ya la droga administrada ha sido completamente metabolizada y eliminada, es necesario aplicar estrategias que permitan arribar a un resultado más exacto, en cuanto a la droga madre se refiere. Debido a la estructura de la selegilina y a la enantioselectividad metabólica, un método adecuado es la formación de un derivado quiral capaz de diferenciar las formas dextrógira y levógira.

Los resultados demostraron que, bajo las condiciones del laboratorio, es posible obtener una separación satisfactoria de ambos enantiómeros tanto para la anfetamina como para la metanfetamina. Las estructuras químicas de la anfetamina y la metanfetamina poseen una alta volatilidad y una masa de 135,2 g/mol y 149,2 g/mol, respectivamente. El patrón de fragmentación de ambos analitos por CG-EM solo muestra el pico base sin fragmentos adicionales (método 1) que permitan identificar satisfactoriamente en muestras de orina, según las buenas prácticas de identificación por métodos de espectrometría de masas.⁽¹⁶⁾

Los espectros de masas obtenidos luego de la formación de derivados por los métodos 2 y 3 (fig. 2, 3 y 4) muestran iones que facilitan la identificación inequívoca de los ambos compuestos aún si su concentración es baja. Se observaron al menos cuatro iones de valor diagnóstico con una intensidad mayor al 40 % lo cual hace factible su identificación inequívoca. La tabla muestra las AR en las muestras control a partir de las cuales se fijaron las ventanas de tolerancia máxima que permiten una identificación adecuada de los analitos en muestras problema. La identificación de los metabolitos levógiros en la orina permitió saber cuál fue la droga madre. En este caso, la selegilina.

Consideraciones finales

Los tres parámetros cromatográficos mostraron mejores resultados cuando se analizan los derivados N-TFA de la anfetamina y la metanfetamina (método 2), con una mejor resolución entre picos cercanos. Esto disminuye la posibilidad de coeluciones que dificulten la interpretación del espectro de masas y al mismo tiempo permite aumentar la sensibilidad del método, aunque, no es recomendable en ensayos cuantitativos si no se puede garantizar la formación de un solo derivado.

El uso del reactivo de Mosher para la identificación de los enantiómeros presentes en una muestra problema funcionó bajo las condiciones de trabajo, aumentando la precisión en la identificación de la droga madre cuando no fue posible detectarla en la orina.

Las abundancias relativas de los iones diagnósticos en los espectros de masas de la anfetamina y la metanfetamina, aplicando los métodos 2 y 3, permitieron cumplir con las buenas prácticas para la identificación de analitos en mezclas complejas mediante técnicas de espectrometría de masas (tabla). La aplicación de estas técnicas es posible en otros campos como la toxicología forense o en la evaluación de la pureza enantiomérica de materias primas en la industria farmacéutica.

Tabla - Iones diagnósticos, abundancia relativa en los espectros de masas y ventanas de tolerancia para la evaluación de una muestra problema a partir de las muestras control de anfetamina y metanfetamina

Iones diagnósticos	Abundancia relativa en el espectro de masas en la muestra control	Ventanas de tolerancia máxima para abundancias relativas	Abundancia relativa en el espectro de masas en una muestra problema
Anfetamina, método 1			
<i>m/z</i> 44	100	-	100
<i>m/z</i> 91	7	2-12	8,2
<i>m/z</i> 120	2***	---	1,8
Anfetamina, método 2			
<i>m/z</i> 140	100	---	100
<i>m/z</i> 118	98	88-118	97,5
<i>m/z</i> 91	45	36-54	45,6
Anfetamina, método 3			
<i>m/z</i> 189	100	---	100
<i>m/z</i> 91	75	65-85	74,5
<i>m/z</i> 260	43	34-52	42,6
Metanfetamina, método 1			
<i>m/z</i> 58	100	---	100
<i>m/z</i> 91	5	***	3,9

Metanfetamina, método 2			
<i>m/z</i> 154	100	---	100
<i>m/z</i> 118	32	26-38	31,4
<i>m/z</i> 110	30	24-36	31,9
<i>m/z</i> 91	17	12-22	16,8
Metanfetamina, método 3			
<i>m/z</i> 189	100		100
<i>m/z</i> 274	66	56-76	56,4
<i>m/z</i> 91	29	23-35	34,9
<i>m/z</i> 119	16	11-21	18,7
<i>m/z</i> 200	7	2-12	6,6

Se muestran datos para los métodos 1, 2 y 3.

***: es una exigencia que el ion, aunque presente, debe mostrar una relación señal- ruido superior a tres para ser seleccionado como ion diagnóstico para identificar una sustancia de manera confiable.

Se concluye que la evaluación de muestras que contienen anfetamina y metanfetamina-N-TFA permitió obtener espectros de masas con alto valor diagnóstico, pero no se recomienda en ensayos de cuantificación. El uso del reactivo de R-MTPCl incrementó la precisión en la identificación del fármaco original selegilina.

Referencias bibliográficas

1. World-Anti Doping Agency (WADA). Prohibited List 2022. Montreal, Canadá: WADA; 2022 [acceso 27/01/2022]. Disponible en: <https://www.wada-ama.org/en/resources>
2. Thevis M, Sigmund G, Geyer H, Schänzer W. Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(1):89-105. DOI: [10.1016/j.ecl.2009.10.011](https://doi.org/10.1016/j.ecl.2009.10.011)
3. Musshoff F. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. *Drug Metab Rev.* 2000;32(1):15-44. DOI: [10.1081/DMR-100100562](https://doi.org/10.1081/DMR-100100562)
4. Wang SM, Wang TC, Giang YS. Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic-isotope dilution mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2005;816(1-2):131-43. DOI: [10.1016/j.jchromb.2004.11.027](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.11.027)
5. Rosano TG, Ohouo PY, Wood M. Screening with quantification for 64 drugs and metabolites in human urine using UPLC-MS-MS analysis and a threshold accurate calibration. *J Anal Toxicol.* 2017;41(6):536-46. DOI: [10.1093/jat/bkx035](https://doi.org/10.1093/jat/bkx035)

6. Segawa HT, Iwata Y, Yamamuro T, Kuwayama K, Tsujikawa K, Kanamori T, *et al.* Differentiation of ring-substituted regioisomers of amphetamine and methamphetamine by supercritical fluid chromatography. *Drug Test Anal.* 2017;9(3):389-98. DOI: [10.1002/dta.2040](https://doi.org/10.1002/dta.2040)
7. Moldoveanu SC, David V. *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application.* Chapter 3 Derivatization Methods in GC and GC/MS. Intechopen; 2018. p. 33 [acceso 27/01/2022]. DOI: [10.5772/intechopen.81954](https://doi.org/10.5772/intechopen.81954)
8. Kranenburg RF, Verduin J, Stuyver LI, de Ridder R, van Beek A, Colmsee E, *et al.* Benefits of derivatization in GC–MS-based identification of new psychoactive substances. *Forensic Chem.* 2020;20(August):100273. DOI: [10.1016/j.forc.2020.100273](https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100273)
9. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, Boughton BA, *et al.* Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics.* 2018;14(152):1-31. DOI: [10.1007/s11306-018-1449-2](https://doi.org/10.1007/s11306-018-1449-2)
10. Macherone A. A Brief Review of Derivatization Chemistries for the Analysis of Cannabinoids Using GC–MS. *Cannabis Sci Technol.* 2020;3(7):42-8 [acceso 27/01/2022]. Disponible en: <https://cdn.sanity.io/files/0vv8moc6/cnst/26d280d85604be9922f622e3f5e9fb3d9ed91ea0.pdf>
11. Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B.* 1998(713:1):61-90. DOI: [10.1016/S0378-4347\(98\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00089-9)
12. Wan-Aasim RW, Gan SH, Tan SC. Development of a simultaneous liquid–liquid extraction and chiral derivatization method for stereospecific GC-MS analysis of amphetamine-type stimulants in human urine using fractional factorial design. *Biomed Chromatogr.* 2008;22:1035-42. DOI: [10.1002/bmc.1073](https://doi.org/10.1002/bmc.1073)
13. Wehrle RJ, Powell DR, Masterson DS. Direct determination of absolute stereochemistry of α -methylselenocysteine using the Mosher method. *Results Chem.* 2021;3(January):100114. DOI: [10.1016/j.rechem.2021.100114](https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100114)
14. Saito F, Schreiner PR. Determination of the Absolute Configurations of Chiral Alkanes. An Analysis of the Available Tools. *European J Org Chem.* 2020;(40):6328-39. DOI: [10.1002/ejoc.202000711](https://doi.org/10.1002/ejoc.202000711)

15. Boyd RK, Basic C, Bethem RA. Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry. England: Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry; New Jersey: John Wiley & Sons Ltd.; 2008.
16. World Anti-Doping Agency (WADA). Technical Document TD2021IDCR - Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes. Montreal, Canadá: WADA; 2021. [acceso 27/01/2022]. <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2021idcr>
17. Magyar K, Szende B, Jenei V, Tábi T, Pálfi M, Szöke É. R-deprenyl: Pharmacological spectrum of its activity. Neurochem Res. 2010;35(12):1922-32. DOI: [10.1007/s11064-010-0238-8](https://doi.org/10.1007/s11064-010-0238-8)
18. Hasegawa M, Matsubara K, Fukushima S, Maseda C, Uezono T, Kimura K. Stereoselective analyses of selegiline metabolites: Possible urinary markers for selegiline therapy. Forensic Sci Int. 1999;101(2):95-106. DOI: [10.1016/S0379-0738\(99\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00015-8)
19. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. General Principles. J Am Coll Dent. 2014;81(3):14-8. DOI: [10.1093/acprof:oso/9780199241323.003.0025](https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199241323.003.0025)
20. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2022DL Decision limits for the confirmatory quantification of exogenous threshold substances by chromatography-based. Montreal, Canadá: WADA; 2022. [acceso 27/01/2022]. Disponible en: <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2022dl>
21. Thevis M. Mass Spectrometry in Sports Drug Testing. Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Dayamín Martínez Brito, Teresa Correa Vidal.

Curación de datos: Ariadna McPherson Medina, Dayamín Martínez Brito, Teresa Correa Vidal.

Análisis formal: Ariadna McPherson Medina, Dayamín Martínez Brito, Mirta Torres Castellanos, Taimí Fiallo Fernández, Teresa Correa Vidal.

Investigación: Ariadna McPherson Medina, Dayamín Martínez Brito, Mirta Torres Castellanos, Taimí Fiallo Fernández, Teresa Correa Vidal.

Metodología: Dayamín Martínez Brito, Teresa Correa Vidal.

Administración del proyecto: Teresa Correa Vidal.

Recursos: Dayamín Martínez Brito, Teresa Correa Vidal, Rodny Montes de Oca Porto.

Supervisión: Dayamín Martínez Brito, Teresa Correa Vidal.

Validación – Verificación: Ariadna McPherson Medina, Dayamín Martínez Brito.

Visualización: Ariadna McPherson Medina, Dayamín Martínez Brito.

Redacción - borrador original: Ariadna McPherson Medina, Dayamín Martínez Brito.

Redacción - revisión y edición: Dayamín Martínez Brito, Teresa Correa Vidal, Rodny Montes de Oca Porto.

Financiación

El trabajo fue financiado por el Laboratorio Antidoping de la Habana, Cuba.