

Importancia de la preparación de la muestra en el estudio del metabolismo del clobenzorex

Importance of samples preparation in the study of clobenzorex's metabolism

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/0000-0001-9702-7450>

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

¹Laboratorio Antidoping de La Habana. Instituto de Medicina Deportiva.

*Autor para la correspondencia: xtfdmb@zoho.com

RESUMEN

Introducción: La selección del ensayo para estudiar el metabolismo de una sustancia depende de sus reacciones metabólicas, lo que puede influir positivamente en la selectividad del método y en la recuperación de los analitos, entre otros.

Objetivo: Definir la influencia de la preparación de la muestra en el estudio del metabolismo del clobenzorex en las condiciones de trabajo del Laboratorio Antidoping de La Habana.

Métodos: Se colectaron muestras de orina antes y después de la administración de una dosis de clobenzorex a un voluntario supuestamente sano. Se aplicaron tres ensayos A, B y C diseñados para la detección de metabolitos de fase I y de fase II.

El método de extracción fue líquido-líquido y la diferencia entre los métodos fue la formación de derivados y la hidrólisis enzimática. La técnica instrumental empleada fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y el modo de adquisición de datos fue SCAN desde 50 a 600 Da.

Resultados: La detección de los metabolitos del clobenzorex más volátiles se vio afectada por la manipulación de la muestra, mientras que los hidroxilados (de fase I) necesitaron de una hidrólisis para ser detectados. Con la aplicación del método A se identificaron 3 compuestos, 5 con la aplicación del método B y con la aplicación del método C se identificaron los 8 metabolitos. A las 24 horas después de administrado el fármaco se pudieron detectar 6 de estos compuestos por el método C.

Conclusiones: La aplicación de los métodos adecuados de preparación de muestras, no solo para detectar el dopaje en atletas, sino también en el estudio del metabolismo de fármacos eliminados en la orina, define la cantidad y la calidad de la información obtenida. Bajo las condiciones del Laboratorio Antidoping de La Habana, una mejor detección del clobenzorex y sus metabolitos requiere de un paso de hidrólisis enzimática y uno de formación de derivados, en aras de obtener analitos con buenas condiciones cromatográficas al ser analizadas por la técnica de CG-EM.

Palabras clave: clobenzorex; metabolismo; hidrólisis; formación de derivados; cromatografía de gases; espectrometría de masas.

ABSTRACT

Introduction: The selection of the trial to study the metabolism of a substance depends on its metabolic reactions, which can positively influence the selectivity of the method and the collection of analytes, among others.

Objective: Define the influence of sample preparation in the study of clobenzorex metabolism in the conditions of the Anti-Doping Laboratory in Havana.

Methods: Urine samples were collected before and after the administration of a dose of clobenzorex to a supposedly healthy volunteer. Three trials (A, B and C)

designed for the detection of Phase I and Phase II metabolites were applied. The extraction method was liquid-liquid and the difference between the methods was the derivatives formation and enzymatic hydrolysis. The instrumental technique used was gas chromatography coupled to mass spectrometry, and the data collection mode was SCAN from 50 to 600 Da.

Results: The detection of the most volatile clobenzorex's metabolites was affected by the manipulation of the sample, while the hydroxylated ones (phase I) required hydrolysis to be detected. With the application of method A, 3 compounds were identified, 5 with the application of method B and with the application of method C, 8 metabolites were identified. At 24 hours after administration of the drug, 6 of these compounds could be detected by method C.

Conclusions: The application of appropriate sample preparation methods, not only to detect doping in athletes, but also in the study of the metabolism of drugs eliminated in urine, defines the quantity and quality of the information obtained. Under the conditions of the Anti-Doping Laboratory of Havana, better detection of clobenzorex and its metabolites requires a step of enzymatic hydrolysis and one of derivative formation, in order to obtain analytes with good chromatographic conditions when analyzed by the CG-EM technique.

Keywords: Clobenzorex; metabolism; hydrolysis; derivatives formation; gas chromatography; mass spectrometry.

Recibido: 26/04/2020

Aceptado: 04/03/2021

Introducción

Uno de los retos de la analítica del dopaje es el conocimiento del metabolismo de las sustancias incluidas en la Lista de sustancias prohibidas para los atletas y que emite y actualiza la Agencia Mundial Antidopaje (AMA), con frecuencia anual.⁽¹⁾

El conocimiento de las estructuras químicas, de las probables rutas metabólicas y los metabolitos formados permite determinar inequívocamente cuál fue la

sustancia administrada, siempre que se seleccione adecuadamente la matriz y la técnica instrumental para su detección e identificación.

Aún no existe una técnica instrumental universal capaz de separar, detectar, cuantificar o identificar inequívocamente todos los analitos presentes en una matriz tan compleja como la orina. Las técnicas empleadas hasta el momento oscilan desde una simple dilución de la matriz (técnica *dilute and shoot* empleada en cromatografía líquida (CL) acoplada a espectrometría de masas (EM)^(2,3) hasta las técnicas más complicadas que incluyen extracción en fase sólida o formación de derivados, entre otras.^(4,5,6)

El conjunto de técnicas empleadas para extraer de la matriz analitos de interés y adecuarlos para su análisis instrumental se conoce ampliamente en el ámbito del dopaje como “preparación de la muestra”. Lo que constituye uno de los pasos más importantes en la cadena analítica y puede ocupar del 60 % al 85 % del tiempo total de análisis. Del éxito de esta etapa dependerán parámetros analíticos tan importantes como la eficiencia de recuperación de analitos, la selectividad del método, el tiempo requerido para el análisis y su costo, entre otros.

La preparación de la muestra debe ser capaz de garantizar un extracto que sea compatible con el instrumento. Frecuentemente este hecho se menosprecia y crea problemas analíticos, generando los llamados *falsos negativos* donde no se detectan adecuadamente los analitos presentes en la matriz, o los *falsos positivos* donde se confunden los analitos de interés con señales interferentes producto de una extracción inadecuada de la matriz.

Dentro de las sustancias prohibidas por la AMA se encuentran los estimulantes del sistema nervioso central (SNC), varios de ellos con propiedades anorexígenas. La mayoría de estos compuestos muestran similitudes en sus propiedades químicas y físicas donde la presencia de un grupo amino le concede a la molécula propiedades básicas con un pKa entre 7-10. Son compuestos altamente volátiles y su masa molecular es menor de 350 Da, lo que hace factible su detección por la técnica de cromatografía de gases (CG). Si bien en la última década, la CL acoplada a la EM ha ganado espacio por las ventajas que ofrece, la CG acoplada a EM (CG-EM) aún ocupa un lugar predominante en los estudios metabólicos.^(7,8,9,10,11)

Los estimulantes se pueden excretar en la orina en su forma intacta (droga madre administrada), pueden sufrir reacciones de desaminación, hidroxilación y redox entre otras reacciones de fase I. Además, pueden ser excretados como metabolitos de fase II conjugados con grupos sulfatos o glucurónido, fundamentalmente. El

estudio del metabolismo de los estimulantes a partir de su excreción en orina se focaliza en la búsqueda de metabolitos en ambas fases.^(12,13,14,15)

El diseño de un estudio enfocado en la detección de metabolitos de fase II mediante el uso de la técnica CG-EM debe incluir un paso de hidrólisis que separe el analito de su conjugado. De otra forma se intenta detectar un analito, generalmente de pobres propiedades cromatográficas, cuya masa es superior a la capacidad analítica del instrumento. La hidrólisis puede ser química o enzimática, la última es la preferida por ser altamente selectiva y evitar la formación de productos de degradación o la degradación del propio analito de interés. Además, debe tenerse en consideración la incompatibilidad de la columna cromatográfica capilar con matrices acuosas.^(16,17,18)

La hidrólisis enzimática con extractos de *Helix pomatia* (con acción glucuronidasa y arilsulfatasa) se considera una opción adecuada para escindir complejos formados por enlaces con glucurónido y sulfatos. Sin embargo, su eficacia está influenciada por factores como el tiempo, temperatura y pH de incubación, así como la presencia de sales inorgánicas. Una vez que se completa la hidrólisis, el siguiente paso es lograr la separación de estos metabolitos (libres de su conjugado) de la matriz acuosa. En este caso es común realizar una extracción líquido-líquido donde el disolvente orgánico y el pH de extracción es un punto importante.^(12,19,20,21)

Una vez que esté en fase orgánica, ya es factible hacer el análisis en el instrumento CG-EM, pero en aras de favorecer la detección, usualmente, se reduce la cantidad de disolvente por evaporación o se forman derivados de los analitos de interés. En este punto de la preparación de la muestra, debe tenerse en cuenta que los estimulantes son moléculas de bajo peso molecular, altamente volátiles e inestables. Generalmente poseen funciones químicas con hidrógenos activos tales como hidroxilos (-OH), aminas (-NH) y carboxilos (-COOH) que tienden a formar enlaces intermoleculares que afectan la volatilidad y tienden a interactuar con la fase estacionaria de las columnas cromatográficas, lo que conlleva a una disminución de la sensibilidad del método.^(16,19,22)

Con el objetivo de minimizar estos efectos es usual favorecer las reacciones de formación de derivados. Es una reacción que modifica la funcionabilidad del analito brindando una mayor volatilidad, mayor estabilidad a altas temperaturas (como las que se encuentran en el inyector) y mejor respuesta en el detector. Se obtienen señales cromatográficas más simétricas, una mayor resolución entre picos cercanos y espectros de masas con mayor información sobre la molécula. La

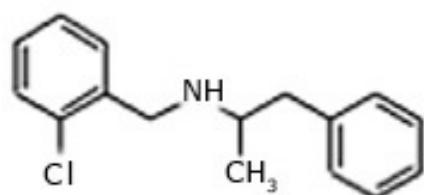
sililación es el método más frecuente de formación de derivados y consiste en la sustitución de un hidrógeno activo en la molécula (-OH o -NH) por un grupo trimetilsilil (TMS).^(16,19,22)

El clobenzorex [(+)-N-(2-clorobencil)-1-fenilpropan-2-amina] es un fármaco anorexígeno, resultado de la modificación estructural de la anfetamina con la presencia de un sustituyente voluminoso en el grupo amino como es el clorobencilo. Pertenece al grupo de las feniletilaminas, es ópticamente activo y posee una masa molecular de 259 Da. Es una amina simpaticomimética que actúa sobre el núcleo ventrolateral del tálamo. Incrementa la secreción de norepinefrina y dopamina y disminuye su recaptura en las terminaciones nerviosas presinápticas.^(14,15,23)

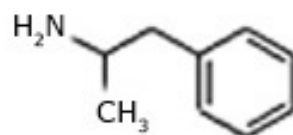
La unión a proteínas plasmáticas es escasa (15 %-30 %) pero muestra una rápida distribución tisular. El tiempo de vida media del clobenzorex es variable y puede oscilar en el intervalo de 1-17 horas. Se ha descrito que la dextroanfetamina es su metabolito mayoritario y que puede ser detectado en orina hasta 116 horas después de la administración de 30 mg del fármaco, con una concentración plasmática de 2,47 µg/mL.^(14,15,24)

La biotransformación del clobenzorex transcurre por 2 vías metabólicas de fase I: (1) N-dealquilación mediante la actividad de la familia de los citocromos P450 que promueve la formación de anfetamina a partir de la molécula de clobenzorex y (2) reacciones de hidroxilación que origina al 4-hidroxiclobenzorex, dihidroxiclobenzorex y *p*-hidroxi-anfetamina. Cerca de un 40 % se excreta en forma de conjugados glucurónidos, el 1 % en forma de hipuratos, el 5 % en forma de anfetaminas y el 3 % como *p*-hidroxianfetamina. Se han descrito otros metabolitos de fase I. En el contexto de la analítica del dopaje se considera como metabolito marcador el 4-hidroxiclobenzorex y solo es detectable hasta 34 horas a partir de la administración del fármaco.^(14,15,25) La figura 1 muestra las estructuras químicas de las sustancias relacionadas con el metabolismo del clobenzorex que fueron incluidas en el estudio.

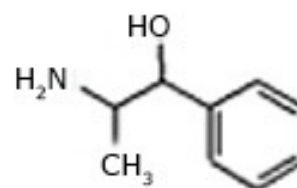
El objetivo principal de la presente investigación es definir la influencia de la preparación de la muestra en el estudio del metabolismo del clobenzorex en las condiciones de trabajo del Laboratorio Antidoping de La Habana.



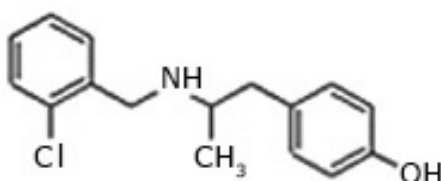
Compuesto I
Clobenzorex
Fórmula molecular: $C_{16}H_{18}ClN$
Peso molecular: 259,77 Da



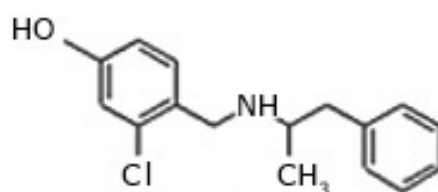
Compuesto II
Anfetamina
Fórmula molecular: $C_9H_{13}N$
Peso molecular: 135,20



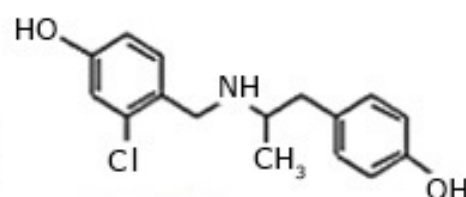
Compuesto III
Norefedrina
Fórmula molecular: $C_9H_{13}NO$
Peso molecular: 151,120



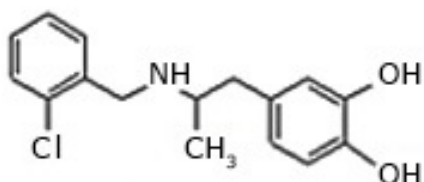
Compuesto IV
4-hidroxi-clobenzorex
Fórmula molecular:
 $C_{16}H_{18}ClNO$
Peso molecular: 275,77 Da



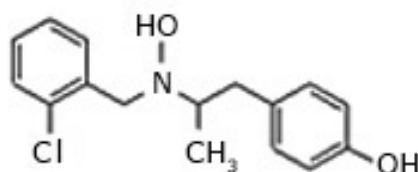
Compuesto V
hidroxi-clobenzorex
Fórmula molecular:
 $C_{16}H_{18}ClNO$
Peso molecular: 275,77 Da



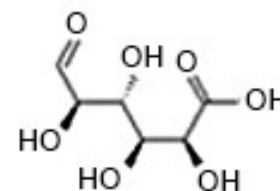
Compuesto VI
di-hidroxi-clobenzorex
Fórmula molecular:
 $C_{16}H_{18}ClNO_2$
Peso molecular: 291,77 Da



Compuesto VII
di-hidroxi-clobenzorex
Fórmula molecular:
 $C_{16}H_{18}ClNO_2$
Peso molecular: 291,77 Da



Compuesto VIII
di-hidroxi-clobenzorex
Fórmula molecular:
 $C_{16}H_{18}ClNO_2$
Peso molecular: 291,77 Da



Ácido glucurónico
Fórmula molecular: $C_6H_{10}O_7$
Peso molecular: 194,14 Da

Fuente: Hemmersbach P. History of mass spectrometry at the Olympic Games. J Mass Spectrom. 2008;43:839-53.

Fig. 1 - Estructuras químicas del clobenzorex y de los metabolitos considerados en el estudio (compuestos I al VIII) y del ácido glucurónico.

Métodos

Reactivos: *Tert*-butil metileter pureza > 99 %, para análisis (Merck, Alemania); metanol pureza 99,93 %, grado espectroscópico (Merck, Alemania); acetato de etilo pureza 99,8 % para cromatografía líquida LiChrosolv®, (Merck (Alemania); hexano pureza 99 % (Merck, Alemania); sulfato de sodio anhidro, pureza > 99,7%, para análisis (Merck, Alemania); hidróxido de amonio (Sigma-Aldrich, Alemania); enzima β -glucuronidasa/arilsulfatasa; de *Helix Pomatia* (Roche, EE. UU.); N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA, derivados TMS), para síntesis (Merck, Alemania); N-metil-bistrifluoracetamida (MBTFA, derivados TFA), pureza > 97 % (Sigma-Aldrich, Alemania).

Material de referencia usado: anfetamina (ampolleta conteniendo una disolución de 1 mg/mL en metanol) y norefedrina clorhidrato, ambos obtenidos de Sigma-Aldrich. El clobenzorex fue gentilmente donado por el Laboratorio Acreditado de Roma, Italia.

Muestras empleadas en el estudio: Las muestras de orina empleadas en el estudio provienen de un individuo supuestamente sano al que se administró una dosis única de clobenzorex por vía oral. Al voluntario (sexo femenino, 22 años, de 54 kg de peso corporal y actividad física moderada) se le administró una dosis única de una tableta de 30 mg de clobenzorex con 240 mL de agua. Las muestras de orina se colectaron antes de la administración del fármaco y posterior a la administración se colectaron cada tres horas hasta las 24 horas (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 h).

Consideraciones éticas: El estudio fue aprobado por el Comité de ética del Instituto de Medicina Deportiva. En el experimento se siguió lo establecido en la Declaración de Helsinki y las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la investigación en humanos.⁽²⁶⁾

Métodos de preparación de las muestras de orina para su análisis instrumental: Se establecieron tres métodos de trabajo para obtener información acerca de los metabolitos urinarios del clobenzorex y observar su influencia en su detectabilidad. La figura 2 describe la preparación de la muestra en cada método de trabajo. El método A debe detectar los metabolitos de fase I que se excretan en forma libre de conjugados. El método B debe detectar los mismos metabolitos del método A, pero con una mayor sensibilidad instrumental, debido a la formación de derivados. El método C debe mostrar la presencia de los metabolitos observados en el método B y adicionalmente los metabolitos de fase II.

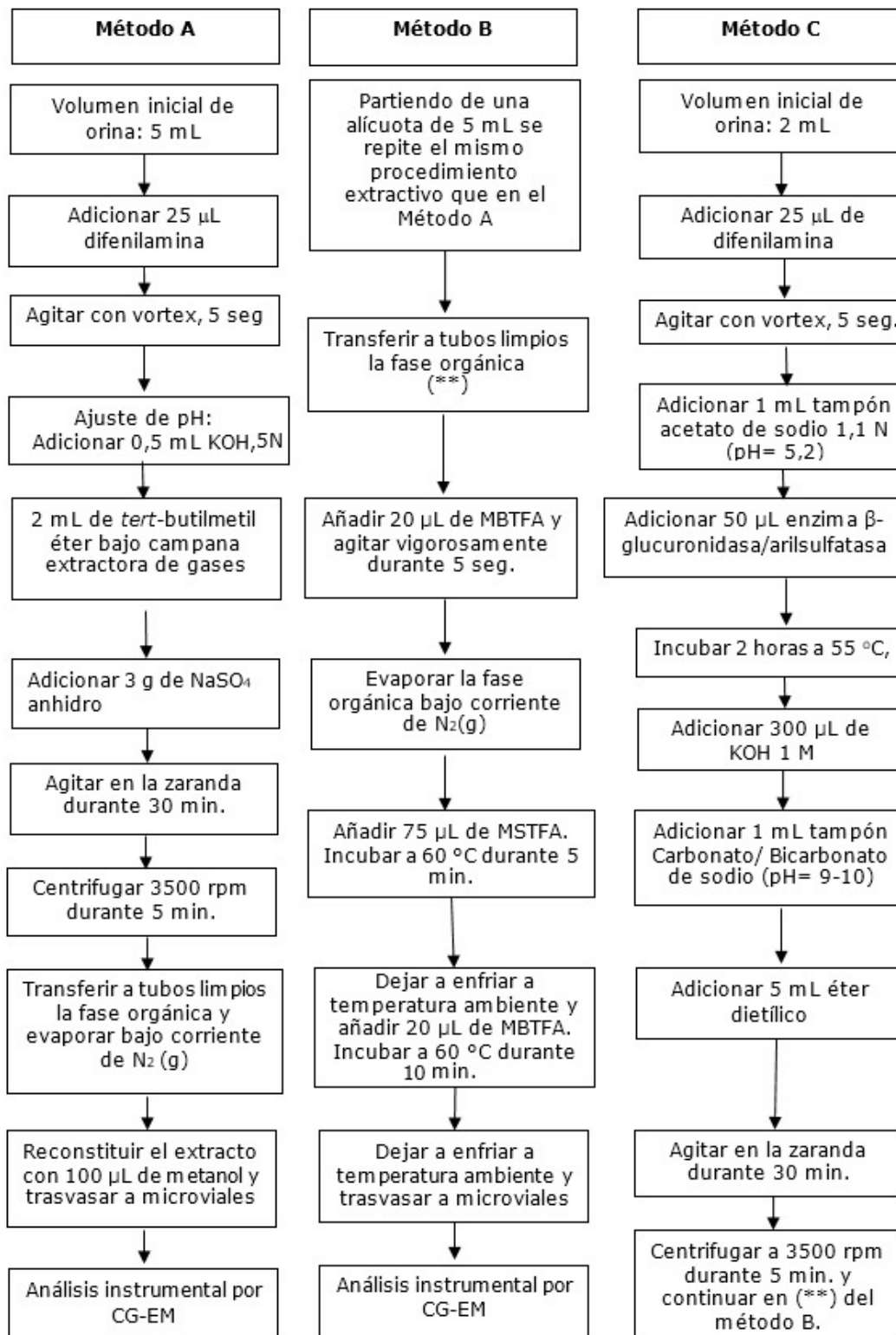


Fig. 2 - Flujo de trabajo y descripción de los tres métodos aplicados a las muestras de orina.

En cada lote de análisis se incluyeron controles positivos que consistieron en orinas contaminadas con clobenzorex, anfetamina y norefedrina en concentración de 200 ng/mL. A los que se les aplicaron los métodos de trabajo correspondientes. El patrón interno (P.I.) fue difenilamina (1 mg/mL).

Equipamiento: cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 plus, con inyector automático Agilent 7683 acoplado a espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 (CG-EM). 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 fue de 250 °C para el método A y 280 °C para los métodos B y C. La temperatura del detector fue de 280 °C y el modo de adquisición de datos fue en modo SCAN en un rango de masas de 50 Da a 600 Da.

Evaluación de los datos: Los cromatogramas y espectros de masas se obtuvieron con el software Enhanced Chemstation MSD E.02.01.1177 Copyright© 1989-2010 Agilent Technologies Inc. A partir del espectro de masas de cada metabolito, se obtuvo el área bajo la curva del ion base. La estimación de las concentraciones de cada analito en cada muestra se realizó a partir de la relación de áreas con el patrón interno. El área bajo la curva de cada metabolito se corrigió por la gravedad específica de la orina (g.e) para normalizarlas al valor de 1,020. Para ello se multiplicaron por un factor de corrección calculado según: $F_c = (g.e. muestra - 1)/(1,020 - 1)$.⁽²⁷⁾

Resultados

Los resultados obtenidos luego de aplicar el método A muestran la presencia de clobenzorex, anfetamina y norefedrina identificados en la tabla como los compuestos I, II, y III, respectivamente.

Tabla - Resumen de los resultados obtenidos en el estudio del metabolismo del clobenzorex mediante la aplicación de tres métodos diferentes de preparación de la muestra de orina

ID	Descripción	Parámetro	Método A	Método B	Método C
I	Clobenzorex Fármaco administrado	TR (min)	7,3	7,5	7,5
		C_{max} (ng/mL)	7,2	1,5	62
		t_{max} (h)	3	3	3
		Conc 24h (ng/mL)	0	0	0
II	Anfetamina (metabolito)	TR (min)	2,3	3,0	3,0
		C_{max} (ng/mL)	305	2265	1144
		t_{max} (h)	6	6	6
		Conc 24h (ng/mL)	191	455	207
III	Norefedrina (metabolito)	TR (min)	3,6	4,1	4,1
		C_{max} (ng/mL)	112	2025	1350
		t_{max} (h)	6	6	6
		Conc 24h (ng/mL)	31	485	323
IV	Metabolito hidroxilado en la posición <i>p</i> - del clorobencilo	TR (min)	8,1	8,6	8,6
		C_{max} (ng/mL)	---	11	2630
		t_{max} (h)	---	3	3
		Conc 24h (ng/mL)	---	0	30
V	Metabolito hidroxilado en la posición <i>p</i> - del grupo bencilo	TR (min)	---	8,8	8,8
		C_{max} (ng/mL)	---	4	9352
		t_{max} (h)	---	3	3
		Conc 24h (ng/mL)	---	0	345
VI	Metabolito hidroxilado en la posición <i>p</i> - del grupo bencilo y clorobencilo	TR (min)	---	---	9,9
		C_{max} (ng/mL)	---	---	476
		t_{max} (h)	---	---	3
		Conc 24h (ng/mL)	---	---	27
VII	Metabolito dihidroxilado en las posiciones <i>o</i> - y <i>p</i> - del grupo bencilo	TR (min)	---	---	9,6
		C_{max} (ng/mL)	---	---	4237
		t_{max} (h)	---	---	3
		Conc 24h (ng/mL)	---	---	41
VIII	Metabolito dihidroxilado en la posición <i>p</i> - del grupo bencilo y en el grupo amino	TR (min)	---	---	9,3
		C_{max} (ng/mL)	---	---	67
		t_{max} (h)	---	---	3
		Conc 24h (ng/mL)	---	---	0

TR: tiempo de retención; min.: minutos; C_{max} : concentración máxima observada en orina; ng/mL: nanogramos por mililitro de orina; t_{max} : tiempo al que se encuentra la concentración máxima; h: horas; Conc 24 h: concentración observada en orina a las 24 horas después de la administración de clobenzorex.

Con la aplicación del método A, la concentración máxima de anfetamina en las muestras colectadas, fue de 305 ng/mL en el intervalo de 3-5 horas después de la administración del fármaco. Sin embargo, con la aplicación de los métodos B y C, la concentración máxima observada fue de 2265 ng/mL y 1144 ng/mL, respectivamente.

Los compuestos IV y V (Tabla) son de fase II, por lo que no fue posible su detección por la aplicación del método A. La presencia del grupo glucurónido otorga a la molécula una alta solubilidad en medio acuoso y por tanto no es posible extraerlo en el disolvente orgánico. Mediante la aplicación de este método, los metabolitos IV y V permanecen en la orina (fase desechada).

Al evaluar los metabolitos por el método B se detectaron concentraciones cercanas a los 10 ng/mL a las 6 h, lo cual es coherente con los autores,^(15,28) alrededor del 1 % de los metabolitos hidroxilados de fase II no llegan a conjugarse y por tanto se pueden eliminar en la orina en su forma libre. En teoría, el 1 % detectado por el método B debería observarse igualmente por el método A, sin embargo, no ocurrió así. Este resultado pone de manifiesto la ventaja que ofrece la formación de derivados en la sensibilidad del ensayo.

El análisis de las muestras con el método B mostró concentraciones del compuesto IV cercano a los 11 ng/mL. Con la inclusión del paso de hidrólisis (método C) la concentración máxima de este compuesto se estimó en 2630 ng/mL.

El compuesto V, conocido en la literatura especializada como el 4-hidroxiclobenzorex, se pudo observar a las 3 h en una concentración máxima aproximada de 9350 ng/mL, con la aplicación del método C. En el intervalo de las 21 h -24 h la concentración estimada osciló entre 250 ng/mL -350 ng/mL confirmando, según lo descrito por otros autores, que es el metabolito de mayor importancia en el metabolismo del clobenzorex.⁽¹⁴⁾ Al aplicar los métodos A y B no se observó señal correspondiente a los analitos identificados como VI y VII (Tabla) y solamente al aplicar el método C pudieron ser detectados.

El compuesto VI alcanzó su concentración máxima aproximada de 480 ng/mL en las primeras 5 h después de la administración de clobenzorex y, aún, al final del estudio, entre las 21 h-24 h, pudo ser detectado con concentraciones en el rango de 21 ng/mL-27 ng/mL. En el caso del compuesto VII, el comportamiento fue similar, sin embargo, los valores de concentración máxima alcanzaron los 4200 ng/mL en el mismo tiempo y en el intervalo de las 21 h-24 h la concentración se observó entre los 33 ng/mL-41 ng/mL.

Luego de aplicar el método C, se observó una señal cromatográfica a los 9,3 minutos con un espectro de masas característico de estructuras con presencia de un átomo de cloro y con una curva de eliminación en concordancia con la administración oral (Fig. 3). Este compuesto fue identificado en la tabla como compuesto VIII y se detectó solamente durante las primeras 15 horas. La concentración máxima estimada fue de 67 ng/mL a las 3 h y durante el intervalo de las 6 h-15 h los valores no superaron los 10 ng/mL.

Fig. 3 - Espectro de masas, propuesta de fragmentación y curva de eliminación urinaria del compuesto identificado como VIII y que pudiera ser atribuible a la hidroxilación del grupo amino y el anillo bencilo.

Discusión

Los principales metabolitos del clobenzorex de fase I y fase II están descritos en la literatura especializada, fundamentalmente en el ámbito de la analítica del dopaje. La importancia de este trabajo se basa en la selección de un método que permita enfocar el estudio de estos metabolitos del clobenzorex en las condiciones de trabajo del Laboratorio Antidoping de La Habana. El resultado final no solo es aplicable con propósitos de control antidopaje sino también con el objetivo de estudiar la farmacología del compuesto.

La reacción de formación de derivados justo antes de la evaporación del solvente orgánico (método B), otorgó a la molécula de anfetamina cierta estabilidad disminuyendo su volatilidad durante el paso de evaporación bajo la corriente de nitrógeno y mejoró considerablemente sus propiedades cromatográficas. El método C mostró niveles más bajos, probablemente debido a la manipulación de la muestra, por ejemplo, la hidrólisis que ocurre a 55 °C durante 2 h y los ajustes de pH necesarios.

Metabolitos monohidroxilados

El compuesto identificado como IV (Tabla) con el grupo OH en la posición “*p*-” del clorobencilo, fue descrito anteriormente por Maurer y otros.⁽²⁹⁾ Al igual que el compuesto V (hidroxilado en el grupo bencilo), son metabolitos de fase II y se excretan en forma de conjugado con el ácido glucurónico.

La masa de ambos compuestos hidroxilados es de 275 Da y la masa del grupo glucurónido es de 194 Da, es decir, la masa de la molécula glucuronada sería de 451 Da, lo cual es detectable por el instrumento, pues el rango de masas de adquisición es de 50 Da a 600 Da. Pero la presencia de 4 grupos hidroxilo con hidrógenos activos le otorga a la molécula propiedades cromatográficas pobres, con picos deformados y colas que van en detrimento de una adecuada detección y resolución de analitos cercanos. La formación de derivados de estas moléculas podría ser la solución al problema cromatográfico y así, la masa total del compuesto glucuronado con los grupos trimetilsilil correspondientes sería de 811 Da. Esta masa se encuentra fuera del rango de medición del instrumento, por tanto, el metabolito no es detectable. Al introducir el paso de la hidrólisis se separa el grupo glucurónido de los analitos de interés, logrando así una mejora considerable de sus propiedades cromatográficas y una adecuada detección mediante el uso de la técnica CG-EM.

La eliminación del metabolito identificado como IV fue rápida, pero incluso a las 24 horas (última muestra de orina colectada) pudo ser detectado en concentraciones cercanas a los 20 ng/mL. La presencia de un átomo de cloro en su molécula le otorga al espectro de masas características especiales, la relación señal: ruido es alta y la selectividad y sensibilidad del método se ven favorecidos.

Los resultados obtenidos para el metabolito V (el 4-hidroxiclobenzorex) corroboran lo descrito anteriormente respecto a la preparación de la muestra de orina basado en la hidrólisis enzimática seguido de la formación de derivados como pasos indispensables para la correcta detección de ambos metabolitos.^(14,15)

Metabolitos polihidroxiados

Entre los metabolitos polihidroxiados del clobenzorex se encuentran descritos en la literatura el *p*-OH-bencilo- *p*-OH-clorobencilo (compuesto VI, Tabla) y el *o*, *p*-diOH-bencilo (compuesto VII, Tabla),⁽²⁸⁾ ambos identificados adecuadamente.

La estructura química del clobenzorex y sus posibilidades de biotransformación permiten la N-hidroxiación del grupo amino catalizada por una enzima de la familia citocromo P450 y, además, una hidroxiación del anillo bencilo. En este caso el metabolito debería conjugarse (fase II) antes de ser excretado en la orina. La figura 3 muestra el espectro de masas para el compuesto VIII y la propuesta del patrón de fragmentación. Se apreció el par de iones *m/z* 125/127 característico del clorobencilo y la existencia del fragmento *m/z* 256/258 que indica la probable presencia del grupo hidroxilo como sustituyente en el grupo amino. Además, el ión *m/z* 179 justifica la presencia de un grupo hidroxilo (trimetilsililado) en el anillo A, probablemente en posición “*para*”. La descripción de la estructura a partir de un espectro de masas es solamente una propuesta. Para la elucidación de la estructura química de nuevas sustancias se requiere de técnicas complementarias como la espectroscopia infrarroja (IR) o la resonancia magnética nuclear (RMN), entre otras.

Es importante tener en cuenta, a pesar de las ventajas conocidas, que la formación de derivados posee desventajas que, de no tenerse en consideración, podrían influir en la interpretación de los resultados. Con los reactivos empleados en la formación de derivados se espera obtener derivados TFA-TMS, sin embargo, no puede excluirse la formación, aunque en menor proporción, de derivados TMS-TMS. La formación de derivados mixtos afecta la cuantificación de sustancias y es

por eso que en el presente trabajo se describen solamente concentraciones estimadas y no exactas.

Comparación de los tres métodos de trabajo

La tabla muestra la comparación de los tres métodos de trabajo A, B y C. Los resultados obtenidos demuestran que con la aplicación de los métodos A y B el Laboratorio Antidoping de La Habana solo es capaz de detectar la anfetamina, la norefedrina y el propio clobenzorex (droga madre). En el caso de este último solamente se observaron valores alrededor de 10 ng/mL hasta las 10 h posadministración, mientras que para la anfetamina y la norefedrina se observaron mayores concentraciones, aún a las 24 h, siempre en el orden de los ng/mL de orina. Es importante decir, que siendo la anfetamina y la norefedrina metabolitos comunes de otras sustancias prohibidas (por ejemplo, etilamfetamina, famprofazona, fencamina, fenetilina), la aplicación de estos dos métodos por sí solos reducen la capacidad analítica del laboratorio para detectar el consumo de clobenzorex con propósitos de dopaje.

Mientras que el método B resultó ser el método óptimo para la detección de la anfetamina y la norefedrina por mejorar significativamente sus condiciones cromatográficas, el método C demostró lo contrario, probablemente por la mayor manipulación de la muestra. Sin embargo, los metabolitos hidroxilados (monohidroxilados y polihidroxilados) excretados como metabolitos de fase II brindan mayor información diagnóstica y su detección es indudable, solamente si se aplica el método C.

Teniendo en cuenta la estructura química del clobenzorex no se debe descartar una probable excreción de metabolitos conjugados con grupos sulfatos. Esta es una vía importante de la biotransformación de grupos fenólicos y de grupos hidroxi-alifáticos, así como de ciertos neurotransmisores, ácidos biliares e hidroxilaminas orgánicas. Las enzimas responsables de la conjugación con sulfato son las sulfotransferasas. Estas enzimas catalizan la sulfatación de los xenobióticos con carácter fenólico, así como catecolaminas, estrógenos y esteroides.^(1,2,30) Con el uso de la enzima β -glucuronidasa-arilsulfatasa contenida en extractos de *H. pomatia* y empleada en el método C, no es posible diferenciar entre un metabolito de fase II conjugado con sulfatos o con glucurónido.

En síntesis, se puede plantear que el mejor método para la detección de anfetamina y norefedrina es el método B. Los metabolitos hidroxilados de fase I

que son eliminados en forma de conjugados (fase II) resultan ser los de mayor valor diagnóstico y requieren de un paso de hidrólisis, por ello el método C resulta ser el adecuado para su detección.

Por lo que se concluye que la aplicación de los métodos adecuados de preparación de muestras, no solo para detectar el dopaje en atletas, sino también en el estudio del metabolismo de fármacos eliminados en la orina, define la cantidad y la calidad de la información obtenida. Bajo las condiciones del Laboratorio Antidoping de La Habana, se pudo determinar que una mejor detección del clobenzorex y sus metabolitos requiere de un paso de hidrólisis enzimática y uno de formación de derivados, en aras de obtener analitos con buenas condiciones cromatográficas al ser analizadas por la técnica de CG-EM.

Referencias bibliográficas

1. World Anti-Doping Agency (WADA). Prohibited List 2021. World Anti-Doping Code; January 2021. p. 1-24. [acceso 24/03/2021]. Disponible en: <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2021-01/wada-2021-list-of-prohibited-substances-and-methods-now-in-force>
2. Cao Z, Kaleta E, Wang P. Simultaneous quantitation of 78 drugs and metabolites in urine with a dilute-and-shoot LC-MS-MS assay. *Journal of Analytical Toxicology*. 2015;39(5):335-346. DOI: [10.1093/jat/bkv024](https://doi.org/10.1093/jat/bkv024)
3. Dong Y, Yan K, Ma Y, Wang Sh, He G, Deng J, *et al.* A sensitive dilute-and-shoot approach for the simultaneous screening of 71 stimulants and 7 metabolites in human urine by LC-MS-MS with dynamic MRM. *Journal of Chromatographic Science*. 2015;53(9):1528-35. DOI: [10.1093/chromsci/bmv048](https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv048)
4. Kim Y, Jeon M, Min H, Son J, Lee J, Kwon O, *et al.* Development of a multi-functional concurrent assay using weak cation-exchange solid-phase extraction (WCX-SPE) and reconstitution with a diluted sample aliquot for anti-doping analysis. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2018;32(11):897-905. DOI: [10.1002/rcm.8119](https://doi.org/10.1002/rcm.8119)
5. Dario C, Cynthia L, Maria F-A, Gloria M, Daniel C. Determination of Doping Peptides via Solid-Phase Microelution and Accurate-Mass Quadrupole Time-Of-Flight LC-MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2017;(1065-1066):134-144. DOI: [10.1016/j.jchromb.2017.08.044](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.044)

6. Athanasiadou I, Kiouisi P, Kioukia-Fougia N, Lyris E, Angelis YS. Current status and recent advantages in derivatization procedures in human doping control. *Bioanalysis*. 2015;7(19):2537-56. DOI: [10.4155/bio.15.172](https://doi.org/10.4155/bio.15.172)
7. World Anti-Doping Agency. International Standard World Anti-Doping Code. Canadá: WADA; 2021. p 1-184. [acceso 24/03/2021]. Disponible en: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf
8. 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. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017;41(6):536-46. DOI: [10.1093/jat/bkx035](https://doi.org/10.1093/jat/bkx035)
9. Segawa H, Iwata YT, Yamamuro T, Kuwayama K, Tsujikawa K, Kanamori T, *et al*. Differentiation of ring-substituted regioisomers of amphetamine and methamphetamine by supercritical fluid chromatography. *Drug Testing and Analysis*. 2017;9(3):389-98. DOI: [10.1002/dta.2040](https://doi.org/10.1002/dta.2040)
10. Woźniak WK, Wiergowski M, Aszyka J, Kubica P, Namieśnik J, Biziuk M. Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;148:58-64. DOI: [10.1016/j.jpba.2017.09.020](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.020)
11. Woźniak MK, Banaszkiwicz L, Wiergowski M, Tomczak E, Kata M, Szpiech B, *et al*. Development and validation of a GC-MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. *Forensic Toxicology*. 2020;38(1):42-58. DOI: [10.1007/s11419-019-00485-y](https://doi.org/10.1007/s11419-019-00485-y)
12. Thevis M, Sigmund G, Geyer H, Schänzer W. Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*; 2010;39(1):89-105. DOI: [10.1016/j.ecl.2009.10.011](https://doi.org/10.1016/j.ecl.2009.10.011)
13. Jesús F, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 5.ª ed. (Elsevier M, ed.). Madrid: MASSON; 2008. <https://booksmedicos.org/farmacologia-humana-5a-edicion-jesus-flores/#more-50295>
14. Valtier S, Cody JT. Differentiation of clobenzorex use from amphetamine abuse using the metabolite 4-hydroxyclobenzorex. *Journal of Analytical Toxicology*. 2000;24(7):606-13. DOI: [10.1093/jat/24.7.606](https://doi.org/10.1093/jat/24.7.606)

15. Cody JT, Valtier S. Amphetamine, clobenzorex, and 4-hydroxyclobenzorex levels following multidose administration of clobenzorex. *Journal of Analytical Toxicology*. 2001;25(3):158-65. DOI: [10.1093/jat/25.3.158](https://doi.org/10.1093/jat/25.3.158)
16. Lai Z, Oliver F. Mass spectral fragmentation of trimethylsilylated small molecules. *Mass Spectrometry Review*. 2016; 9999:1-13. DOI: [10.1002/mas.21518](https://doi.org/10.1002/mas.21518)
17. Ventura R, Matabosch X, Segura J. Bioanalytical techniques in discrimination between therapeutic and abusive use of drugs in sport. *Bioanalysis*. 2016;8(9):965-. DOI: [10.4155/bio.15.253](https://doi.org/10.4155/bio.15.253)
18. Gomez C, Fabregat A, Pozo ÓJ, Marcos J, Segura J, Ventura R. Analytical strategies based on mass spectrometric techniques for the study of steroid metabolism. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 53:106-16. DOI: [10.1016/j.trac.2013.08.010](https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.08.010)
19. Hemmersbach P, De La Torre R. Stimulants, narcotics and β -blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. *Journal of Chromatography B Biomedical Applications*. 1996;687(1):221-238. DOI: [10.1016/S0378-4347\(96\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00276-9)
20. Nicoli R, Guillarme D, Leuenberger N, Baume N, Robinson N, Saugy M, *et al.* Analytical Strategies for Doping Control Purposes: Needs, Challenges, and Perspectives. *Anal. Chem*. 2016;88(1):508-523. DOI: [10.1021/acs.analchem.5b03994](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03994)
21. Thevis M, Schänzer W. Examples of doping control analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Ephedrines, β -receptor blocking agents, diuretics, sympathomimetics, and cross-linked hemoglobins. *Journal of Chromatography Science*. 2005;43(1):22-31. DOI: [10.1093/chromsci/43.1.22](https://doi.org/10.1093/chromsci/43.1.22)
22. Thevis M. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing*. First Edit. (Desiderio DM, Nibbering NMM, eds.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. DOI: [10.1002/9780470626634](https://doi.org/10.1002/9780470626634)
23. Lozano-Cuenca J, González-Hernández A, López-Canales OA, Villagrana-Zesatiet JR, Rodríguez-Choreão JD, Morín-Zaragoza R, *et al.* Possible mechanisms involved in the vasorelaxant effect produced by clobenzorex in aortic segments of rats. *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2017;50(9):1-9. DOI: [10.1590/1414-431x20175765](https://doi.org/10.1590/1414-431x20175765)

24. Kraemer T, Maurer HH. Toxicokinetics of amphetamines: Metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2002;24(2):277-89. DOI: [10.1097/00007691-200204000-00009](https://doi.org/10.1097/00007691-200204000-00009)
25. Cody JT, Valtier S. A Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantitation of Clobenzorex. *Journal of Analytical Toxicology*. 1999;23(7):603-08. DOI: [10.1093/jat/23.7.603](https://doi.org/10.1093/jat/23.7.603)
26. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. General Principles. *Journal of the American College of Dentists*. 2014;81(3):14-18. DOI: [10.1093/acprof:oso/9780199241323.003.0025](https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199241323.003.0025)
27. World Anti-Doping Agency. Decision limits for the confirmatory quantification of threshold substances. WADA Technical Document - TD2019DL. 2019; version 2.; May 2019. p. 1-14. [acceso 24/03/2021]. Disponible en: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019dl_v2_finalb.pdf
28. Tsoutsoulova-Draganova A, Halatcheva N, Karova D. Metabolism of Benzphetamine and Clobenzorex in Human Urine. In: W. Schänzer, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, eds. Manfred Donike Workshop - Proceedings of the 15th Cologne Workshop on Dope Analysis 1997. Cologne: Sport und Buch Strauß - Köln; 1997. p. 231-248. [acceso 24/03/2021]. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/proceedings-of-the-manfred-donike-workshop-15th-cologne-workshop-on-dope-analysis-23rd-to-28th-february-1997/oclc/174316464>
29. Maurer HH, Kraemer T, Ledvinka O, Schmitt CJ, Weber AA. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis. Studies on the detection of clobenzorex and its metabolites within a systematic toxicological analysis procedure by GC-MS and by immunoassay and studies on the detection of α - and β -amanitin in urine by atmospheric pressure ionization electrospray LC-MS. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; 1997;689(1):81-9. DOI: [10.1016/s0378-4347\(96\)00348-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(96)00348-9)
30. Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA. The regulation of steroid action by sulfation and desulfation. *Endocrinology Review*; 2015;36(5):526-63. DOI: [10.1210/er.2015-1036](https://doi.org/10.1210/er.2015-1036)

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Ariadna McPherson Medina: investigación; análisis formal; curación de datos; visualización; redacción - borrador original.

Dayamín Martínez Brito: conceptualización; metodología; supervisión; investigación; validación; curación de datos; visualización; redacción - revisión y edición.

Mirta Torres Castellanos: investigación; análisis formal; curación de datos.

Taimí Fiallo Fernández: investigación; análisis formal; curación de datos.

Teresa Correa Vidal: conceptualización; metodología; supervisión; análisis formal; curación de datos; visualización; redacción - revisión y edición.

Rodny Montes de Oca Porto: conceptualización; recursos; supervisión; análisis formal; curación de datos; redacción - revisión y edición.