



# ARTÍCULOS ORIGINALES

## DETERMINACIÓN DE ETILGLUCORONIDO POR LC-MS/MS, POSIBLE INDICADOR EN ANÁLISIS FORENSE

## DETERMINATION BY LC-MS/MS ETILGLUCORONIDO, POSSIBLE INDICATOR IN FORENSIC ANALYSIS

M.Sc. Ph.D Guillermo Rocabado Calizaya\*, Lic. Francisco de la Fuente Vásquez\*<sup>1</sup>, Lic. Juan Patricio Nieto Martínez\*\*<sup>1</sup>

Recibido: 23/10/2011

Aceptado: 09/01/2012

### RESUMEN

D-etilglucuronido (EtG) metabolito estable del etanol, puede ser identificado en orina hasta 3,5 días después de la ingesta y podría ser útil para el diagnóstico de ingesta en estudios forenses, para su determinación se emplearon los sistemas LC-MS/MS. Los ensayos realizados en orina blanco y aquella tratada con EtG así como muestras y siguiendo la metodología analítica descrita para el estudio, se pudo observar la presencia de iones, siendo los más abundantes aquellos derivados de EtG y D5-EtG (m/z 75, 85, y 113) son resultado del ácido glucurónico no incluyendo el aglicon etanol. Por lo que se puede señalar que estos iones con baja abundancia son resultado de la lactonización o pérdida de agua (m/z 203), decarboxilación adicional (m/z 159), pérdida de etanol (m/z 113), y agua o CO. Por todo lo demostrado, el poder identificar a EtG, y utilizarlo como un indicador de la presencia de etanol en el organismo, para poder extrapolar datos de consumo de etanol, en estudios forenses proponemos que esta metodología podría ser empleada para esclarecer los conflictos relacionados con esta sustancia.

**Palabras claves:** EtG Etilglucurónido, LC Cromatografía líquida, MS espectrometría de masas.

### ABSTRACT

*D-etilglucuronido (EtG) stable metabolite of ethanol, can be identified in urine up to 3.5 days after ingestion and may be useful for the diagnosis of intake in forensic studies, were used for determination LC-MS/MS systems. The target urine tests and those treated with EtG and samples and following the analytical methodology described in the study, we observed the presence of ions, the most abundant being those derived from D5-EtG and EtG (m / z 75, 85, and 113) are the result of glucuronic acid aglycone not including ethanol. As can be noted that these ions with low abundance are the result of lactonization or water loss (m / z 203), additional decarboxylation (m / z 159), loss of ethanol (m / z 113), and water or CO. For all the proven, EtG able to identify and use it as an indicator of the presence of ethanol in the body, to extrapolate data from consumption of ethanol in forensic studies suggest that this methodology could be used to clarify the conflicts this substance.*

\* Académico del Departamento de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Antofagasta-Chile.

\*\* Jefe de Laboratorio del Servicio Médico Legal de Antofagasta-Chile; Académico del Departamento de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Antofagasta-Chile.

**Responsible:** M.Sc. Ph.D Guillermo Rocabado Calizaya. E-mail : gocabado@ucn.cl

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de marcadores biológicos para el control el consumo de alcohol siguen siendo una herramienta en desarrollo, optimizando la sensibilidad y especificidad. Por otra parte, estos biomarcadores pueden ser influenciados por la edad, el género, y una variedad de sustancias y no estar asociados con el consumo de alcohol. El hecho de conocer la conjugación que sufre el etanol con la molécula activa ácido glucurónico en la membrana mitocondrial con UDP glucuronil transferasa representa un vía de desintoxicación de menor importancia para el etanol: 0,02-0,06% (media) de la dosis de etanol administrada, es una respuesta en forma de  $\beta$ -D-etilglucuronido (ETG) en la orina en los seres humanos que puede ser detectado en varios fluidos corporales, tejidos y cabello. ETG (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>) tiene un peso molecular de 222 g / mol, y el punto de fusión (temperatura de descomposición) es de aproximadamente 150 ° C. tiene la particularidad de ser formado poco después del consumo inicial de pequeñas cantidades de etanol, se puede detectar en orina hasta 80 h después de la eliminación completa de alcohol.

por lo tanto D-etilglucuronido (EtG) es un metabolito estable del etanol, que puede ser identificado en orina después de la ingesta y podría ser útil para el diagnóstico de su consumo alcohólico, puesto que la detección de alcohol en orina es de 6,5 h, esta ventaja de tiempo de identificación podría ser empleado en el análisis forense.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estándares EtG y D<sub>5</sub>-EtG Medichem, acetonitrilo grado HPLC, ácido fórmico grado analítico y agua deionizada.

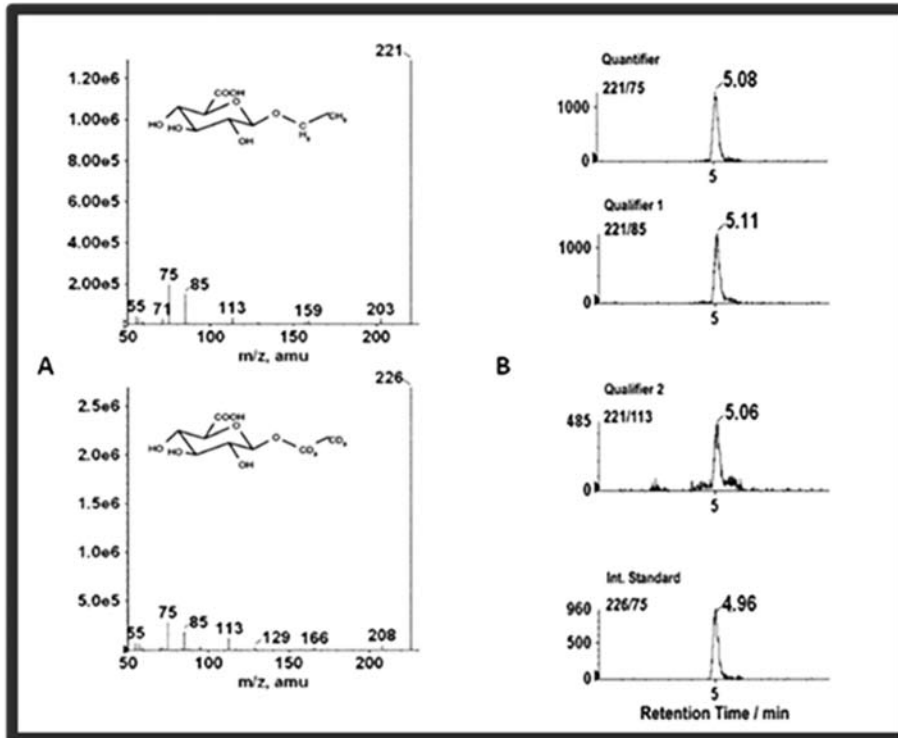
A 0.1 mL de orina en blanco o una orina EtG tratada con 50 ng D<sub>5</sub>-EtG (10  $\mu$ L de una solución acuosa 5  $\mu$ g/mL), adicionada con 0.25 mL de metanol; se centrifugo a (14,000 rpm) por 10 min a 4°C; posteriormente a 0.25 mL del sobrenadante fue evaporado y disuelto

en 0.14 mL de ácido fórmico 0.1 % e inyectado en el sistema LC-MS/MS;

El sistema que consistió en un LC-MS/MS API 365 espectrómetro de masas equipados con un turbo interfaz ionspray (Applied Biosystems / Sciex, Darmstadt, Alemania) y un sistema de HPLC (Shimadzu, Alemania). Los análisis se realizaron con ionización por electrospray utilizando una fuente de ionspray turbo en modo negativo. ETG fue separado a 40 ° C en una columna de fase inversa (Synergy Polar-RP 250x 2 mm, 4 $\mu$  M) con una columna de seguridad (4 mm x 2 mm, del mismo material de embalaje) (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). La fase móvil consistió de una solución acuosa al 0,1% ácido fórmico (vol / vol) a un flujo de 0,2 mL / min. Se admite en la interfaz de MS sólo entre 4 y 6 minutos del tiempo de retención cromatográfica. la fuente ionspray turbo se operó a 400 °C con una ionización de voltaje 4 kV, y nitrógeno como gas de la cortina y gas nebulizador. La optimización de la fuente de iones y MS / MS y parámetros de adquisición de datos fue realizada por infusión de un 1 $\mu$  g / ml de solución de ETG (20 $\mu$ L/min). El análisis fue realizado por multireacción de monitoreo, con el ión precursor de m / z 221 y los fragmentos de iones de m / z 75, 85, 113, y 159 para la ETG, y precursor de iones de m / z 226 y fragmentos de iones de m / z 75 para el patrón interno D<sub>5</sub>-ETG 200 ms para cada transición, la desfragmentación potencial fue a : 16 V, centrándose posteriormente a un potencial de: 140 V, y potencial de entrada 3 V, con energía de colisión: 16 eV, la presión de choque de gas de nitrógeno: 2,4 a 0,7x 10<sup>-5</sup> torr.

## RESULTADOS

Los iones más abundantes de EtG y D<sub>5</sub>-EtG (m/z 75, 85, y 113) son resultado del ácido glucurónico no incluyendo el aglicon etanol. Los iones con baja abundancia son resultado de la lactonización o pérdida de agua (m/z 203), decarboxilación adicional (m/z 159), pérdida de etanol (m/z 113), y agua o CO.



**Figura. 1 A.** Producto de iones del espectros de ETG y D5-ETG (iones precursor  $m/z$  221 y 226). **B.** Muestra los cromatogramas de iones típicos del cuantificador y dos calificadores adicionales para la ETG en una muestra de orina (495 ng / mL ETG) obtenidos a partir de una voluntaria, 8 horas después de ingerir 0,1 L de vino (9 g de etanol), estudio controlado.

### CONCLUSIONES

El método LC-MS/MS se desarrolló de manera experimental, con el objeto de poder identificar a EtG, como indicador de la presencia de etanol en el organismo.

Con la limitante de que cantidades de etanol de 1 a 2 g, presentes en algún alimento o fármaco u otro preparado, podrían dar lugar a concentraciones bajas de EtG en la orina.

## REFERENCIAS

1. Aderjan, R.; Babel, B.; Briellmann, T.; Daldrup, T.; Demme, U.; Hallbach, J.; Hartung, M.; Harzer, K.; Herbold, M.; von Meyer, L.; Moeller, M.; Musshoff, F.; Schmitt, G.; Weinmann, W. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitäts-sicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang A: Anforderung an einzelne Analysenmethoden. *Toxichem\_Krimtech2000*, 67, 13–16.
2. Alt, A.; Janda, I.; Seidl, S.; Wurst, F. M. Determination of Ethylglucuronide in Human Hair. *Alcohol Alcohol*. 2000, 35, 313–314.
3. Dahl, H.; Stephanson, N.; Beck, O.; Helander, A. Comparison of Urinary Excretion Characteristics of Ethanol and Ethyl Glucuronide. *J. Anal. Toxicol.* 2002, 26, 201–204.
4. Janda, I.; Alt, A. Improvement of Ethylglucuronide Determination in Human Urine and Serum by Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001, 758, 229–234
5. Janda, I.; Weinmann, W.; Kuehnle, T.; Lahode, M.; Alt, A. Determination of Ethylglucuronide in Human Hair by SPE and LC-MS/MS. *Forens. Sci. Int.* 2002, 128, 59–65.
6. Kamil, I. A.; Smith, J. N.; Williams, R. T. A New Aspect of Ethanol Metabolism: Isolation of Ethylglucuronide. *Biochem. J.* 1952, 51, 32–33.
7. Nishikawa, M.; Tsuchihashi, H.; Miki, A.; Katagi, M.; Schmitt, G.; Zimmer, H.; Keller, T.; Aderjan, R. Determination of Ethylglucuronide, a Minor Metabolite of Ethanol, in Human Serum by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999, 726, 5–110.
8. Peters, F. T.; Maurer, H. H. Bioanalytical Method Validation and Its Implications for Forensic and Clinical Toxicology—A Review. *Accred. Qual. Assur.* 2002, 7, 441–449.
9. Rivier, L. Criteria for the Identification of Compounds by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Multiple Mass Spectrometry in Forensic Toxicology and Doping Analysis. *Anal. Chimica Acta* 2002, 492, 69–82.
10. Seidl, S.; Wurst, F. M.; Alt, A. U'berpru'fung einer Abstinenzbehauptung in der Fahreignungs-oberbegutachtung mit Hilfe des Ethanolmetaboliten Ethylglucuronid (EtG). *Blutalkohol* 1998, 35, 174–182.
11. Schmitt, G.; Droenner, P.; Skopp, G.; Aderjan, R. Ethylglucuronide: An Unusual Ethanol Metabolite in Humans. *Synthesis, Analytical Data, and Determination in Serum and Urine.* *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19, 91–94.
12. Shoemaker, M. J.; Earley, R. J.; Gorsky, J. E.; Jenny, R. W.; Leiendecker-Foster, C.; Markus, W. R.; Moore, N.; Welch, M. J. *Urine Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, 1999.* 192 WEINMANN ET AL. *J Am Soc Mass Spectrom* 2004, 15, 188\_193
13. Skopp, G.; Schmitt, G.; Po'tsch, L.; Dro'nnner, P.; Aderjan, R.; Mattern, R. Ethylglucuronide in Human Hair. *Alcohol Alcohol*. 2000, 35, 283–285.
14. Stephanson, N.; Dahl, H.; Helander, A.; Beck, O. Direct Quantification of Ethylglucuronide in Clinical Urine Samples by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Therap. Drug Monitor.* 2002, 24, 645–651.
15. Stolker, A. A. M.; Stephany, R. W.; van Ginkel, L. A. Identification of Residues by LC-MS. *The Application of New EU Guidelines.* *Analisis* 2000, 28, 947–951.
16. Weinmann, W.; Svoboda, M. Fast Screening for Drugs of Abuse by Solid-Phase Extraction Combined with Flow-Injection Ionspray Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1998, 22, 319–328.
17. Weinmann, W.; Vogt, S.; Goerke, R.; Mueller, C.; Bromberger, A. Simultaneous Determination of THC-COOH and THCCOOH-Glucuronide in Urine Samples by LC-MS/MS. *Forens. Sci. Int.* 2000, 113, 381–387.
18. Wurst, F. M.; Kempter, C.; Seidl, S.; Alt, A. Ethylglucuronide—A Marker of Alcohol Consumption and a RelapseMarker with Clinical and Forensic Implications. *Alcohol Alcohol*. 1999, 34, 71–77.
19. Wurst, F. M.; Metzger, J.; Jauchau, K.; Seidl, S.; Pridzun, L.; Janda, I.; Alt, A. The Direct Ethanol Metabolite Ethylglucuronide: A Specific Marker of Recent Alcohol Consumption. In *New and Upcoming Markers of Alcohol Consumption*; Wurst, F. M., Ed.; Steinkopff-Springer Verlag: Darmstadt, 2001; pp 62–74.
20. Zimmer, H.; Schmitt, G.; Aderjan, R. Preliminary Immunochemical Test for the Determination of Ethylglucuronide in Serum and Urine: Comparison of Screening Method Results with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 2002, 26, 11–16.