

Químicas

364

T.D

Departamento de Química Analítica
Facultad de Química
Universidad de Valencia

DETERMINACION DE ANFETAMINA, METANFETAMINA Y EFEDRINA CON EL REACTIVO ESPECTROFOTOMETRICO 1,2-NAFTOQUINONA 4-SULFONATO EN MUESTRAS DE ORINA Y FARMACOS. TRATAMIENTO PREVIO Y ESTUDIO ANALITICO-QUIMIOMETRICO DE LOS PROCEDIMIENTOS EXTRACTIVO, CON O SIN SEPARACION CROMATOGRAFICA, Y CINETICO EN DISOLUCION ACUOSA.

Memoria presentada por
CARMEN MOLINS LEGUA
para alcanzar el grado
de Doctor.

UMI Number: U607182

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607182

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

30cm.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

→ Químicas.

Nº Registre 6650

DATA 22-7-94

SIGNATURA

364. T.D

Nº LIBIS: Li.18656237



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
c/. Dr. Moliner, 50
E46100-Burjassot (València)

GUILLERMO RAMIS RAMOS, Catedrático de Universidad, y Director del departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia

CERTIFICA: que la Tesis Doctoral "Determinación de anfetamina, metanfetamina y efedrina con el reactivo espectrofotométrico 1,2-Naftoquinona 4-sulfonato en muestras de orina y fármacos. Tratamiento previo y estudio analítico-quimiométrico de los procedimientos extractivo, con ó sin separación cromatográfica, y cinético en disolución acuosa", cuya memoria se adjunta, ha sido realizada por Doña Carmen Molins Legua en este Departamento, bajo la dirección de las Profesoras Titulares Pilar Campíns Falcó y Adela Sevillano Cabeza.

Lo que certifica para los efectos oportunos en Burjassot, a 27 de mayo de 1994.



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
c/. Dr. Moliner, 50
E46100-Burjassot (València)

PILAR CAMPINS FALCO Y ADELA SEVILLANO CABEZA, Profesoras Titulares del departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral "Determinación de anfetamina, metanfetamina y efedrina con el reactivo espectrofotométrico 1,2-Naftoquinona 4-sulfonato en muestras de orina y fármacos. Tratamiento previo y estudio analítico-quimiométrico de los procedimientos extractivo, con ó sin separación cromatográfica, y cinético en disolución acuosa", ha sido desarrollada bajo su dirección por Doña Carmen Molins Legua en este Departamento.

Lo que certifican para los efectos oportunos en Burjassot, a 27 de mayo de 1994.

INDICE

1.-ANTECEDENTES	1
1.1.- AMINAS ESTIMULANTES	1
1.2.- METODOS DE DERIVATIZACION DE ANFETAMINAS Y COMPUESTOS AFINES	8
1.3.- REACCION DE AMINAS CON 1,2-naftoquinona 4-sulfonato	20
1.4.- METODOS DE TRATAMIENTO PRELIMINAR DE MUESTRAS BIOLOGICAS	26
2.-DISCUSION SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS	30
3.-EXPERIMENTAL	36
3.1.- REACTIVOS Y APARATOS	38
3.2.- INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	44
3.3.- ESTUDIO DE VARIABLES DE LA REACCION ENTRE FENILAMINAS Y 1,2- naftoquinona 4-sulfonato	56
3.3.1.- Influencia del pH	58
3.3.2.- Influencia de la temperatura y tiempo de reacción	70
3.3.3.- Influencia del disolvente utilizado en la extracción de los productos de reacción	78
3.3.4.- Influencia de la concentración de reactivo	81
3.3.5.- Conclusiones	83
3.4.- PROCEDIMIENTO EXTRACTIVO-ESPECTROFOTOMETRICO	86
3.4.1.- Curvas de calibrado de disoluciones patrón de anfetaminas y efedrina	88
3.4.1.1.- Procedimiento experimental	88
3.4.1.2.- Caracterización del comportamiento del blanco absorbente en la etapa de calibración por el método de adición estándar del punto H	88
3.4.1.2.1.- Fundamentos teóricos	89
3.4.1.2.2.- Resultados y discusión	92
3.4.1.3.- Ecuaciones de las rectas de calibrado y parámetros analíticos	103
3.4.2.- Tratamiento preliminar de muestras de orina	106
3.4.2.1.- Procedimientos experimentales	106
3.4.2.2.- Resultados y discusión	108
3.4.2.2.1.- Sin tratamiento preliminar	108
3.4.2.2.2.- Precipitación de componentes endógenos de la orina	108
3.4.2.2.3.- Extracción sólido-líquido	109

3.4.2.2.4.- Extracción líquido-líquido	110
3.4.2.3.- Conclusiones	112
3.4.3.- Etapa de calibración para muestras reales. Caracterización de errores sistemáticos	113
3.4.3.1.- Blanco de orina	113
3.4.3.1.1.- Influencia del disolvente	113
3.4.3.1.2.- Comportamiento del blanco de orina en la etapa de calibración por el método de adición estándar del punto H	115
3.4.3.1.3.- Método de Youden. Estudio y evaluación del error sistemático constante	117
3.4.3.1.4.- Estudio de la posibilidad del uso de un placebo para la corrección del error sistemático constante	119
3.4.3.2.- Efecto matriz. Estudio y evaluación del error sistemático proporcional	120
3.4.3.3.- Exactitud y precisión de las determinaciones de anfetamina y metanfetamina	122
3.4.3.4.- Límites de detección y cuantificación	132
3.4.3.5.- Conclusiones	133
3.4.4.- Determinación conjunta de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina mediante la aplicación del método de adición estándar del punto H	134
3.4.4.1.- Fundamentos teóricos en presencia de blanco total de Youden (TYB)	135
3.4.4.2.- Procedimiento experimental	138
3.4.4.3.- Resultados y discusión	139
3.4.4.4.- Conclusiones	146
3.4.5.- Determinación de efedrina en preparados farmacéuticos	148
3.4.5.1.- Procedimiento experimental	148
3.4.5.2.- Resultados y discusión	150
3.4.5.2.1.- Colirios	150
3.4.5.2.2.- Soluciones nasales	151
3.4.5.2.3.- Comprimidos	152
3.4.5.2.4.- Jarabes	156
3.4.5.3.- Conclusiones	157

3.5.- DETERMINACION EXTRACTO-ESPECTROFOTOMETRICA DE FENILAMINAS CON 1,2-Naftoquinona 4-sulfonato EN DISOLUCION ACUOSA	158
3.5.1.- Estudio de las condiciones óptimas de reacción	161
3.5.2.- Orden de reacción	167
3.5.3.- Ecuaciones de las rectas de calibrado con patrones y parámetros analíticos	168
3.5.4.- Determinación de anfetamina y efedrina en preparados farmaceuticos	169
3.5.5.- Conclusiones	175
3.6.-DETERMINACION DE ANFETAMINA Y METANFETAMINA EN MUESTRAS DE ORINA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA EN FASE NORMAL	176
3.6.1.- Selección de las condiciones de derivatización.	178
3.6.2.- Selección de las condiciones cromatográficas	182
3.6.3.- Curvas de calibrado con patrones y parámetros analíticos	185
3.6.4.- Tratamiento previo de muestras de orina	186
3.6.4.1.- Extracción líquido-líquido	187
3.6.4.2.- Extracción sólido-líquido	191
3.6.4.2.1.- Estudio de diferentes rellenos	191
3.6.4.2.2.- Influencia del pH y del disolvente de elución	194
3.6.4.2.3.- Factores de recuperación	196
3.6.5.- Precisión y exactitud	197
3.6.6.- Límites de detección y cuantificación	197
3.6.7.- Conclusiones	201
4.-CONCLUSIONES GENERALES	204
5.-REFERENCIAS	210

1.- ANTECEDENTES

1.1 AMINAS ESTIMULANTES

No es fácil clasificar los estimulantes en función de su acción farmacológica. La bibliografía presenta en este sentido diversos agrupamientos, según se de prioridad a unas acciones frente a otras, o mejor aun, según que mecanismo de las mismas se realce. Desde el punto de vista del dopaje, los estimulantes constituyen el grupo farmacológico de sustancias que, según el Comité Olímpico Internacional, "aumentan la atención, reducen la fatiga y pueden incrementar la competitividad y la agresividad".

Una de las posibilidades de clasificación, es seguir las pautas establecidas en las primeras listas de sustancias dopantes. En ellas, se distribuían en tres grupos diferentes, interconexiónados y sólo parcialmente delimitados entre si, que recibieron la denominación de: estimulantes psicomotores, aminas simpaticomiméticas y diversos estimulantes del sistema nervioso central. Actualmente integran una clase única denominada estimulantes.

Desde el punto de vista químico, se podrían agrupar por sus funciones representativas (aminas, amidas, imidas, cetonas, ésteres, etc.) pero resultaría una clasificación compleja e insuficientemente aclaratoria. De todas formas cabe reseñar que todos poseen en su estructura nitrógeno, además de carbono e hidrógeno, aunque también pueden contener azufre (amifenazol), oxígeno (anfepirazona, cafeína, clorprenalina, cocaína, cropropamidaefedrina, estricnina, etafedrina, etamiván, fendimetrazina, fenitilina, fenilpropanolamina, fenmetrazina, furfenorex, metilefedrina, metilfenidato, metoxifenamina, morazona, niketamida, pemolina, pipradrol, pirovalerona) o cloro (clobenzorex, clorfentermina, clorprenalina, meclufenoxato, mefonorex).

El conocimiento del papel de la adrenalina en la transmisión sináptica y el avance en los métodos de síntesis han constituido las bases del desarrollo de estos fármacos, a través de la potenciación de sus efectos estimulantes centrales. Se demostró que sus análogos podían ver modificadas cualitativa y cuantitativamente sus propiedades farmacológicas. Se observó que la variación estructural permitía la obtención de compuestos que conservando su acción central, presentaban atenuadas o anuladas otras acciones no necesarias (hipertensora, cardioléptica, broncodilatadora). Con ello se conseguía que la primera fuera prácticamente selectiva. Un análisis crítico de los compuestos ensayados en principio puso de manifiesto que el esqueleto estructural más sencillo del cual es posible obtener derivados activos es el

de la feniletilamina. Aunque en los estimulantes también aparecen otros grupos funcionales químicos, la mayor parte de los estimulantes psicomotores responden a estructuras químicas derivadas de las fenilaminas, es decir, aminas con un radical fenilo unido al nitrógeno, bien directamente o bien a través de una cadena alquílica. El esqueleto estructural más sencillo a partir del cual es posible obtener derivados activos se da en la Figura 1:

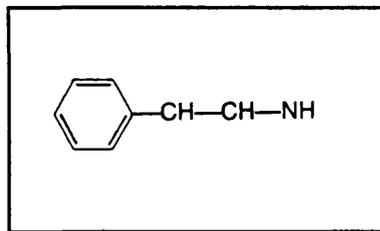


FIGURA 1. Estructura general de las feniletilaminas.

Las fenilisopropilaminas, con tres átomos de carbono en su cadena amínica(Figura 2), constituyen un grupo de gran importancia.

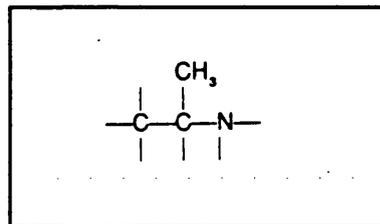
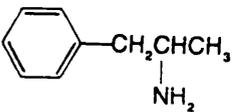
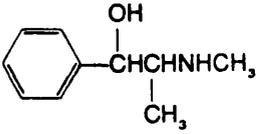
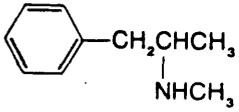


FIGURA 2. Estructura isopropilaminica.

La anfetamina (Tabla 1) es la fenilisopropilamina, su molécula posee un átomo de carbono asimétrico que da lugar a isómeros d, l y dl (racémico); el estereoisómero d posee una potencia vasopresora (simpaticomimética periférica) algo menor que el l, pero es 10 veces más activo como estimulante del sistema nervioso central. La dextroanfetamina, dexanfetamina o d-anfetamina, usada como sulfato, resulta alrededor de dos veces más potente en este sentido que la dl-anfetamina (forma utilizada en la práctica clínica y domiciliaria) y constituye el estimulante central más poderoso del grupo, aunque posee acciones cardiovasculares de igual potencia. La metanfetamina (Tabla 1) fue el primer compuesto introducido en terapia, pero no presenta ventajas apreciables respecto a la anfetamina, aparte de su acción más prolongada, que persiste durante 8-12 h.

TABLA 1. Estructura de algunos estimulantes

Nombre		Fórmula molecular	Estructura
Químico genérico	Químico abstracto principal		
Anfetamina	α -Metilbencenoetanamina	$C_9H_{13}N$	
Efedrina	α -(1-(metilamino)etil)bencenometanol	$C_{10}H_{15}NO$	
Metanfetamina	N, α -dimetilbencenoetanamina	$C_{10}H_{15}N$	

Se han diseñado muchos compuestos farmacéuticos con el fin de reducir el carácter estimulante de la anfetamina y metanfetamina. Sus derivados, son relativamente numerosos (anfepramona, benzfetamina, clobenzorex, clorfentermina, dimetanfetamina, etilanfetamina, fenetilina, fenproporex, furfenorex, mefenorex), y se forman al sustituir los hidrógenos unidos a los átomo de nitrógeno o de carbono (de la cadena lateral o del anillo bencénico), por diversos grupos, como por ejemplo, radicales alquílicos, funciones cetona, funciones nitrilo, halógenos, etc.; incluso el grupo amino puede quedar englobado en un anillo heterocíclico. No obstante, la mayor parte de estos compuestos se metabolizan en anfetamina (Tabla 2).

La efedrina (Tabla 1) es una feniletilamina que tiene dos carbonos asimétricos, lo que origina isómeros ópticos, enantiómeros (formas dextro y levo), pero también diastereoisómeros, con compuestos en forma eritro (l-efedrina, d-efedrina, dl-efedrina), y en forma treo (l-pseudoefedrina, d-pseudoefedrina, dl-pseudoefedrina).

TABLA 2. Ejemplos de sustancias estimulantes de las que anfetamina es uno de los metabolitos

Anfetamina	(C ₉ H ₁₃ N (M=135.20)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NH ₂
Anfetaminil	(C ₁₇ H ₁₈ N ₂ (M=250.33)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NHCH(N)C ₆ H ₅
Benzfetamina	(C ₁₇ H ₂₁ N (M=239.35)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ C ₆ H ₅
Clobenzorex	(C ₁₆ H ₁₈ ClN (M=259.78)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NHCH ₂ C ₆ H ₄ Cl
Dimetanfetamina	(C ₁₁ H ₁₇ N (M=163.27)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)N(CH ₃) ₂
Etilanfetamina	(C ₁₁ H ₁₇ N (M=163.25)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)C ₂ H ₅
Fenetilina	(C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₂ (M=341.40)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NHCH ₂ CH ₂ C ₇ H ₇ N ₄ O ₂
Fenpropores	(C ₁₂ H ₁₆ N ₂ (M=188.27)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NCH ₂ CH ₂ CN
Mefenorex	(C ₁₂ H ₁₈ ClN (M=211.74)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NH(CH ₂) ₃ Cl
Metanfetamina	(C ₁₀ H ₁₅ N (M=149.24)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(CH ₃)NHCH ₃

Las aminas simpaticomiméticas son sustancias que tienen la propiedad de reproducir los efectos fisiológicos obtenidos mediante la estimulación de las fibras nerviosas del sistema adrenérgico. La mayor parte de las aminas que se consideran estimulantes poseen un mecanismo de acción mixta, actuando sobre los receptores y sobre las terminaciones nervioso adrenérgicas. Su común estructura química es la responsable de la fuerte acción estimulante que ejercen sobre el sistema nervioso central, más importante en las anfetaminas que en las efedrinas. Facilitan el esfuerzo y potencian la actividad motora, a la vez que disminuyen la sensación de hambre, sueño, fatiga y malestar. Por su utilización como sustancias dopantes, se debe destacar que esta estimulación aminora o suprime la sensación de fatiga, la enmascara, pero no evita la necesidad de reposo del organismo, lo que ocasiona agotamiento y una depresión posterior.

Esta estructura también es la responsable de las acciones periféricas, tanto de las que se ejercen sobre el sistema cardiovascular, que provocan una estimulación cardíaca y una vasoconstricción periférica con elevación de la presión sanguínea, como de las que actúan sobre el aparato respiratorio, con estímulos sobre los centros bulbares de la respiración y consecuentemente aumento de su amplitud y frecuencia. La importancia de estas acciones es mayor en las efedrinas que en las anfetaminas. La actividad farmacológica de estas aminas se modifica en función de pequeñas variaciones estructurales en la molécula de la feniletilamina. Por ejemplo: una N-metilación en la anfetamina (metanfetamina) aumenta ligeramente la acción estimulante del sistema nervioso central, mientras que la sustitución de

un hidrógeno del carbono beta por un hidróxilo (efedrina) disminuye sus efectos centrales, a la vez que aumenta la acción adrenérgica directa sobre los receptores alfa y beta.

Estas aminas se absorben bien en el tracto digestivo, por lo que son activas por vía bucal y rectal. También se absorben fácilmente por las vías subcutánea e intramuscular. Sin embargo actualmente sólo se administran por vía oral. Se distribuyen con gran rapidez en los tejidos bien irrigados y el fármaco atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica.

Los estimulantes experimentan reacciones metabólicas diversas, con problemas específicos en cada caso o cada grupo de sustancias similares. La anfetamina se hidroliza parcialmente en el hígado por enzimas microsomales hepáticas y el 30-50% se elimina en orina en forma activa durante las 48 horas siguientes a la administración, siendo la totalidad de la dosis (90%) excretada en 3 o 4 días. La orina también contiene p-hidroxianfetamina conjugada, benzilmetilcetona conjugada, ácido benzoico y trazas de 1-fenil propan-2-ol. En el proceso de biotransformación y excreción la anfetamina se transforma en fenilpropanona y p-hidroxianfetamina, esta última se conjuga con el ácido glucurónico. Así, la mitad de la dosis administrada de la anfetamina se excreta en orina y el resto en forma de metabolitos (1). El esquema de biotransformación de la anfetamina podría ser, sin considerar pautas metabólicas muy minoritarias el que se muestra en la Figura 3. En cuanto a la metanfetamina sufre una N-desmetilación (Figura 3), generando anfetamina (que sigue su propio proceso metabólico. El 70% de la metanfetamina se excreta en 24 horas, tal que en condiciones normales el 43% se excreta sin modificar, un 15% como 4-hidroximetanfetamina y entre un 6-10% como anfetamina.

Aunque existen diversos órganos excretores, la excreción renal es el proceso más importante de eliminación de dichas sustancias. En general, los anfetamínicos se eliminan en parte inalterados por el riñón y en parte en forma de metabolitos. Sin embargo, la cuantía de ambos procesos está en estrecha relación con el pH urinario, de manera que, cuando la orina es ácida, la ionización de estos compuestos en el filtrado glomerular es prácticamente total, no se produce reabsorción en los túbulos distales en proporción significativa y, en consecuencia, se excreta una elevada fracción de fármaco en la orina en forma inalterada. Por el contrario, cuando la orina es alcalina aumenta la fracción de fármaco no ionizada en el filtrado y se produce su reabsorción en los túbulos, tanto más importante cuanto más elevado es el pH urinario; esta fracción retorna al plasma y se biotransforma, para eliminarse

en forma de metabolitos más polares, menos liposolubles, por lo que disminuye su reabsorción en los túbulos renales y consecuentemente se facilita su excreción. Sin embargo no hay que olvidar que la velocidad de este proceso depende de la concentración en el plasma sanguíneo y del mecanismo de su excreción renal, por tanto al reabsorberse el agua en mayor proporción que las otras sustancias, estas se concentran en la orina, obteniéndose un nivel superior al existente en sangre; este último motivo es uno de los factores por los que la analítica de control se realiza en muestras fisiológicas de orina y no de sangre.

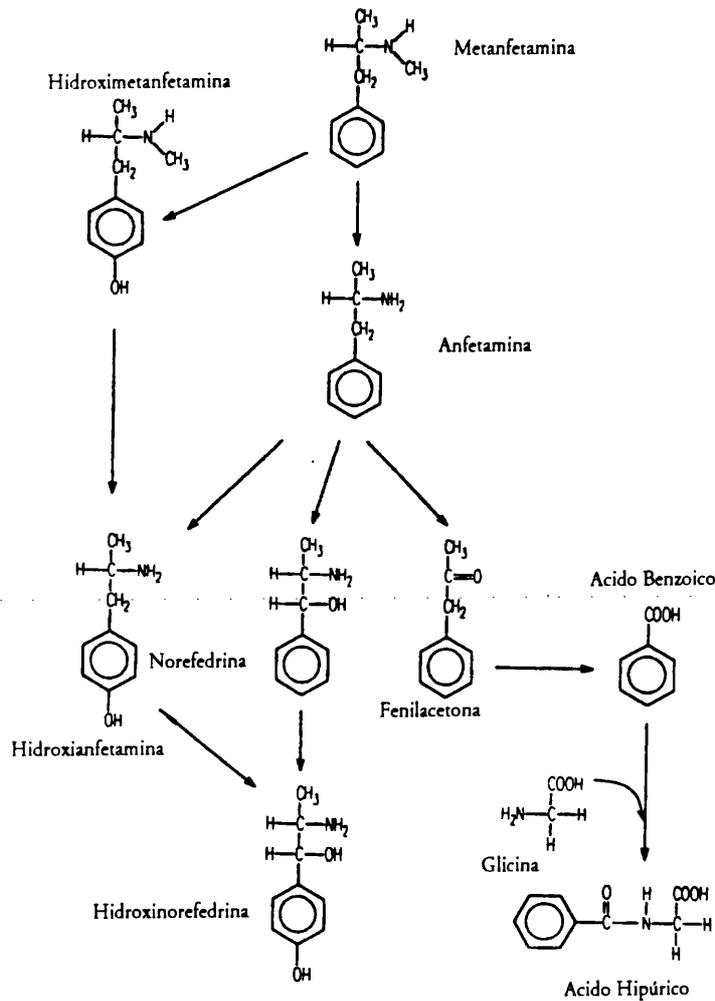


FIGURA 3. Principales vías metabólicas de anfetamina y metanfetamina.

Beckett y col.(2) observaron que tras la administración de dosis de 10 mg, la orina en condiciones ácidas ($\text{pH } 5.0 \pm 0.2$) por la administración de cloruro amónico contenía un 60 % de anfetamina sin modificar tras un período de 48 h. Por el contrario, si la orina había sido alcalinizada con la administración de bicarbonato sódico, sólo el 5% había sido

eliminado como tal en el mismo período de tiempo. Por lo tanto, la ingestión de diuréticos (especialmente los inhibidores de la anhidrasa carbónica como la acetazolamida y algunas tiazidas) y bicarbonato producen orinas alcalinas, lo cual lleva a una reabsorción tubular de anfetamina y produce una acción prolongada más potente de esta droga.

Estas aminas simpaticomiméticas se introdujeron a nivel terapéutico como analépticos, estimulantes, anorexígenos, asociados a los antipiréticos en preparados antigripales, así como en los vasoconstrictores nasales etc.. Puede decirse que hoy los anfetamínicos sólo poseen cuatro indicaciones fundamentales, algunas de ellas muy circunscritas:

- a) En el tratamiento de los estados de narcolepsia.
- b) En algunas neurosis depresivas que cursan sin ansiedad, especialmente en los estados de apatía senil.
- c) En el tratamiento de los estados caracterizados por un déficit de atención en los niños (síndrome hiperkinético infantil).
- d) Como anorexigénicos en el tratamiento de la obesidad exógena o alimentaria.

Estas drogas, son capaces de provocar reacciones adversas que pueden llegar hasta una intoxicación aguda, e incluso provocar la muerte cuando se administran en dosis excesivas. Debe señalarse que aunque la dosis tóxica de anfetamina es variable, en general puede establecerse que para un adulto 30 mg de droga es peligroso y 20 mg por Kg de peso es seguramente mortal. Además dichas drogas son capaces de provocar farmacodependencia, sobre todo psíquica, no causando generalmente dependencia física, ni tampoco síndrome de abstinencia, lo que permite la supresión brusca del tóxico en las curas de deshabitación. No obstante en los adictos a su uso inyectado vía intravenosa también puede provocar dependencia física.

En el caso de anfetamina los efectos descritos comienzan alrededor de una hora después de la ingestión oral, llegan al máximo de 2 a 4 horas y duran de 6 a 8 horas. La vida media de la anfetamina es de 20 horas. En relación a la metanfetamina presenta una vida de 9 horas. Un 20 % de la efedrina se excreta como tal en la orina y el resto en forma de metabolitos (norefedrina y p-hidroxinorefedrina). Su vida media es de aproximadamente 3.5 horas.

1.2- METODOS DE DERIVATIZACION DE ANFETAMINAS Y COMPUESTOS AFINES

Son varias las metodologías usadas para el análisis de estos fármacos, así Rasmussen y col.(3) en un artículo de revisión sobre técnicas analíticas para la detección e identificación de anfetaminas y sustancias afines en muestras no biológicas, muestran una amplia gama de métodos disponibles, desde procedimientos tipo test hasta la utilización de técnicas analíticas altamente sofisticadas, concluyendo que los más empleados son la espectrofotometría UV e IR y cromatografía plana y gaseosa (CG) como métodos de separación, señalando que la cromatografía líquida (CLAR) también tiene mucho que ofrecer por su alto poder de separación, selectividad y reproducibilidad. Robert D.Budd (4) realizó un estudio comparativo entre CG y los métodos enzimáticos EMIT (Técnicas de inmunoensayo enzimático) y RIA (Radioinmunoensayo), en él atiende a mostrar las ventajas y desventajas de estos tres métodos, con el objeto de que se seleccione el más apropiado según las necesidades. A la vista de los resultados que obtuvo concluye que el método más ventajoso corresponde a CG con el inconveniente de que el número de muestras que se analizan es menor. Por otra parte Deyl y col.(5) realizaron una revisión desde 1978-1984, para un amplio grupo de drogas, entre las que se encuentra la anfetamina y metanfetamina, llegando a conclusiones similares.

En la Figura 4 podemos ver el número de publicaciones sobre determinación de anfetamina durante los últimos catorce años, observándose que las técnicas más utilizadas corresponden a CG, CG-MS, EMIT, RIA y CLAR.

Una tendencia similar manifiesta la metanfetamina, dado que la mayor parte de las publicaciones contemplan varias drogas básicas como anfetamina, metanfetamina, efedrina, pemolina...etc. Para su análisis en fluidos biológicos, las técnicas analíticas más empleadas continúan siendo las mismas aunque el porcentaje de publicaciones es bastante menor, correspondiendo a CG el máximo número de ellas.

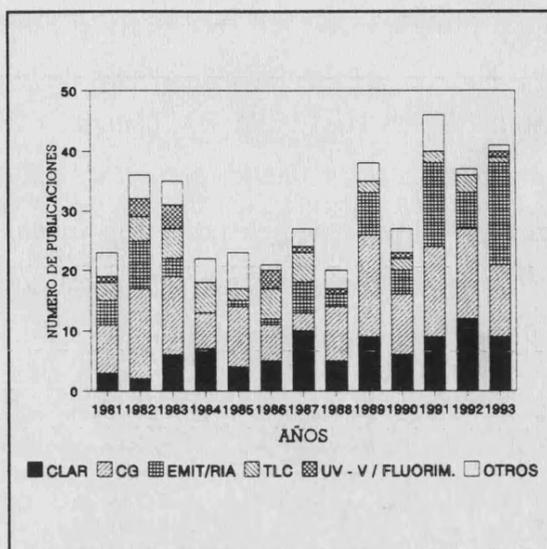


FIGURA 4. Evolución bibliográfica en base a las publicaciones correspondientes a la determinación de anfetamina y metanfetamina durante la última década en función de la técnica empleada.

Durante los últimos años se han desarrollado nuevos procedimientos CLAR para la determinación de anfetamínicos, observándose un aumento en el número de publicaciones. Se está intentando alcanzar una sensibilidad similar a la proporcionada por CG-MS, puesto que esta técnica presenta el inconveniente de estar limitada por la necesidad de que los compuestos de la muestra sean suficientemente volátiles y en el caso de los compuestos polares se requiere un proceso de derivatización tedioso y complicado previo al análisis cromatográfico.

A pesar de la gran cantidad de publicaciones en que se aplica CLAR al análisis de anfetamina y compuestos afines, sólo el 25% de las mismas han sido realizadas en fluidos biológicos (orina, suero, plasma, etc.), de las que un 92% corresponden a determinaciones en orina.

Las anfetaminas en las concentraciones a las que a menudo se encuentran en los fluidos biológicos presentan una absorción ultravioleta y fluorescencia muy baja, no siendo posible su determinación directa por estas técnicas. Por lo que la mayor parte de los trabajos existentes en la bibliografía utilizan la derivatización con el propósito de disminuir los límites de detección de estas drogas.

Son muy pocos los trabajos dedicados a la determinación espectrofotométrica de estas sustancias en fluidos biológicos. La matriz más estudiada ha sido orina. Wallace y col. (6) también determinan anfetamina en muestras biológicas (sangre, suero, orina o en muestras de tejido homogeneizado) oxidándola con sulfato de cerio (IV) y midiendo la absorbancia de los productos formados. Los reactivos más utilizados son fundamentalmente colorantes, dando lugar a la formación de pares iónicos con las aminas que absorben en la región visible. Entre los reactivos más utilizados destacan Tropaeolin (7,8,17), Negro de eriocromo T, Cianuro de eriocromo R, púrpura de bromocresol, verde erio B, Zincon (8), Crom azulol S (8,11), Tetrabromofenolaftalein etil ester (10,13,15), Rosa bengala (14), rojo de metilo, Azul de bromotimol (17) propuestos la mayoría para análisis de screening. Efedrina y metanfetamina también han sido determinadas en orina utilizando la formación de complejos con el ditiocarbamato de cobre (16). En la Tabla 3 se resumen los distintos procedimientos utilizados, así como algunas de sus características analíticas.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el número de trabajos que han utilizado CLAR para la determinación de anfetaminas ha aumentado considerablemente durante los últimos años. Al igual que sucede con la espectrofotometría UV-V en la mayoría de los casos se ha recurrido a la derivatización química de los analitos pre o post columna. Además, de la baja sensibilidad que presentan las anfetaminas, muchas aminas primarias y secundarias presentan baja resolución cromatográfica, lo que hace que el análisis de trazas sea bastante difícil (18-19). La derivatización ha sido aceptada como una técnica de modificación en CLAR, mejorando la especificidad, resolución cromatográfica y la sensibilidad para trazas de analito (20-24).

Kinberger (25) utilizó o-ftaldehído como agente de derivatización de anfetamina en muestras de orina y detección fluorimétrica. De forma análoga, Leroy y col.(26) emplearon este reactivo en presencia de diferentes tioles (2-mecaptoetanol, etanetiol y ter-butilmercapta-no), siendo en este caso detectados los productos de reacción electroquímicamente debido a las propiedades de los productos isoindólicos sustituidos formados.

La detección quimioluminiscente en CLAR ofrece una alta sensibilidad y selectividad para compuestos fluorescentes (27), permitiendo incrementar la primera variable analítica de 10 a 100 veces respecto a la obtenida con detección fluorimétrica.

Para la determinación de trazas de anfetamina y compuestos análogos, Hayakawa y col.(28) realizaron un estudio de comparación entre distintos reactivos fluorescentes. Utilizaron Bis(2,4,6,-triclorofenil)oxalato y peróxido de hidrógeno en medio acetonitrilo como agente de derivatización post-columna quimioluminiscente. Como reactivos precolumna compararon cloruro de dansilo (Dns-Cl), 4-fluoro-7-nitrobenzoxadiazol (NBD-F) y naftaleno-2,3-dicarbaldhido (NDA) que reacciona sólo con aminas primarias en presencia de cianuro.

El reactivo NBD-F reacciona rápidamente con aminas primarias y secundarias, constituyendo una ventaja sobre el reactivo NBD-Cl (29-30). Los derivados NBD proporcionan una sensibilidad con detección quimioluminiscente menor a la presentada por detección fluorescente. Los derivados NDA pueden ser detectados con una sensibilidad del orden de 10 veces mayor que la presentada por los derivados dansilados y del orden de 50 veces a la obtenida para los derivados NBD-F. El cloruro de dansilo fue el mejor reactivo para la determinación simultánea de aminas primarias y secundarias, requiriéndose únicamente la extracción en dietil eter de los analitos previamente a la derivatización. Los límites de detección obtenidos con detección quimioluminiscente utilizando Dns-Cl fueron 3×10^{-15} - 4×10^{-15} moles para todos los analitos ensayados (28). La CG-MS se considera la técnica más sensible para la determinación de anfetaminas, el límite de detección para los derivados heptafluorobutiril de anfetamina y metanfetamina por CG-MS es de 1.5×10^{-14} y 1.4×10^{-14} moles, respectivamente. Sin embargo el método propuesto por estos autores (29-30) ofrece una mejora en la sensibilidad respecto a la CG-MS, del orden de 70 veces superior para los derivados CBI y de 3.5 para los dansilados. En este caso la metanfetamina fue determinada en muestras de orina en concentraciones de 1.0×10^{-7} M. En otro trabajo (31), estos mismos autores identificaron los derivados dansilados utilizando la espectrometría de masa y determinaron las concentraciones de anfetamina, metanfetamina y piperidina en muestras de orina de 6 individuos, detectando concentraciones en el intervalo 3.5×10^{-5} - 3.3×10^{-6} M, 1.3×10^{-3} - 3.6×10^{-8} M y 7.3×10^{-5} - 2.4×10^{-6} M, respectivamente. El límite de detección obtenido para la metanfetamina fue de 2×10^{-10} M (Tabla 4). Posteriormente (32), utilizando este mismo reactivo y también con detección quimioluminiscente, han detectado metanfetamina en muestras de orina en niveles de 0.2 nM, indicando que la sensibilidad obtenida en este caso es mejor que la obtenida en CG con detección FID.

Nakashima y col.(33) determinaron metanfetamina en muestras de suero utilizando N-(4-aminobutil)-N-etilisoluminol (ABEI) como reactivo precolumna quimioluminiscente, las condiciones óptimas de reacción son temperatura de 80 °C y calefacción durante 30-60 minutos. Este método permite detectar cantidades de metanfetamina en suero del orden de 20 fmol cuando se emplean 100 μ L de muestra. Utilizando este procedimiento, se determinó la concentración de metanfetamina en una muestra (de concentración 3.6 μ g/mL previamente determinada por CG.), obteniéndose un valor de 5.05 ± 0.07 μ g/mL. La sensibilidad obtenida fue comparable con la obtenida por CG-MS (34) y por CLAR (28) con detección fluorimétrica, pero fue ligeramente inferior a la obtenida por CLAR con detección quimioluminiscente con peroxioxalato. Recientemente, estos mismos autores (35) han determinado anfetamina y metanfetamina en muestras de orina. Los límites de detección se muestran en la Tabla 4, siendo mayor el obtenido para la anfetamina.

Reactivos tales como naftaleno-2,3-dialdehído (NDA) y antraceno-2,3-dialdehído (ADA) han sido utilizados como derivatizantes precolumna para la determinación de aminas primarias usando detección quimioluminiscente con peroxioxalato en cromatografía líquida en fase normal y reversa (36). El proceso de derivatización se realizó a temperatura ambiente durante 20 minutos, siendo los derivados NDA estables y los ADA inestables probablemente debido, apuntan los autores, a la oxidación de uno de los anillos aromáticos. Una desventaja de este procedimiento fue la formación de productos, que presentaban interferencia en la separación cromatográfica en fase reversa. Por lo que la determinación por CLAR en fase reversa de estas drogas a nivel de trazas no puede realizarse con estos reactivos.

Koning y col.(37), han propuesto un sistema automático de derivatización de aminoácidos, pequeños péptidos, drogas con grupos amina primarios (anfetamina en muestras de orina o plasma) utilizando naftalenodialdehído (NDA) como reactivo fluorigénico y cromatografía en fase reversa. La combinación NDA-cianuro no produce interferencia utilizando detector fluorescente, de modo que el método no requiere una etapa de eliminación del exceso de reactivo tras la derivatización. Otro tipo de reactivo fluorescente empleado ha sido el 4-(N,N-dimetilamino-sulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) utilizando peróxido de hidrógeno y bis(4-nitro-2-(3,6,9-trioxadeciloxi-carbonil) fenil) oxalato en medio acetonitrilo como reactivo postcolumna para la detección quimioluminiscente. Los límites de

detección obtenidos fueron de 27 y 100 fmoles para metanfetamina y anfetamina, respectivamente (38).

Los reactivos con base de poliestireno-divinilbenceno, o-nitrobenzofenona conteniendo marcas de o-acetilsalicil o fluorenil han sido propuestos para la determinación de aminas primarias y secundarias, mediante sistemas operando o no en línea en CLAR y detección fluorescente (39). Estos reactivos poliméricos presentan buena estabilidad térmica y acuosa, alto porcentaje de derivatización, bajos límites de detección para aminas (estando en el orden de concentraciones de ppb), y pocas interferencias por parte de los reactivos. El método ha sido aplicado a muestras de orina, realizando únicamente la filtración de la muestra previamente a la inyección en el sistema cromatográfico de derivatización en línea.

Maeder y col.(40) han propuesto también un sistema de derivatización precolumna en línea utilizando 9-fluorenilmetil coloroformato (FMOC-Cl) como reactivo para la derivatización de aminas, pudiéndose determinar concentraciones de anfetamina del orden de 2×10^{-8} mol/L (Tabla 4) usando este sistema en línea y con preconcentración. La sensibilidad de la técnica es alrededor de 50 veces mayor que la obtenida funcionando el sistema fuera de línea. Este método ha sido aplicado a disoluciones patrón.

La inmovilización del reactivo 9-fluoreneacetil (FA) sobre un soporte, ha sido utilizado por Zhou y col.(41), para la determinación directa de anfetamina en muestras de plasma. Los derivados de 9-fluoreneacetil-anfetamina fueron separados por CLAR en fase reversa usando gradiente y detección fluorescente. El empleo de este reactivo en fase sólida en presencia de un tensioactivo en la fase móvil es un procedimiento simple y sensible para la derivatización en línea inyectando directamente el fluido biológico en el sistema. En este mismo sentido, Szulc y Krull (42) han utilizado sistemas en línea con reactivos de o-nitrobenzofenona unidos a soportes poliméricos, aplicados a la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina. Fisher y col.(43), también han determinado anfetamina en muestras de orina, basandose en el trabajo de Bourque y Krull (44), que implica la inyección directa de las muestras de orina, con derivatización en línea, utilizando 4-(1-(3,5-dinitrobenzoiloxi)benzotriazol-6-il)) como reactivo. Los resultados obtenidos han sido comparables a los obtenidos en CG-MS.

En los últimos años se ha observado un avance en la resolución de enantiómeros utilizando técnicas de cromatografía, especialmente la cromatografía gaseosa (45).

Es importante la separación enantiomérica dado que por ejemplo en el caso de la metanfetamina, mientras que la forma D-metanfetamina es una droga de común abuso, la forma l-metanfetamina es usada en preparados farmacéuticos como sprays nasales. Sin embargo, los métodos tradicionales para la determinación de enantiómeros, tales como la resolución química o la polarimetría, no son adecuados dado que los analitos en estudio se encuentran en los fluidos biológicos en cantidades muy pequeñas.

Los métodos para la resolución cromatográfica de enantiómeros pueden agruparse en tres categorías. La primera de ellas implica la conversión de los enantiómeros a diastereoisómeros mediante la utilización de un agente de derivatización quiral. El segundo grupo engloba la separación de los enantiómeros en función de su interacción con una fase estacionaria quiral. Y por último el tercer grupo, el menos empleado, usa una fase estacionaria quiral y una fase móvil que contiene un eluyente quiral.

En este sentido, se han desarrollado sistemas de derivatización en línea utilizando el reactivo polimérico quiral 9-fluorenilmetil cloroformato-L-proline (FMOC-L-proline) en CLAR con detección fluorimétrica. El límite de detección para DI-anfetamina ha sido de 50 ng/mL (46). Recientemente (47), utilizando este mismo sistema han realizado la determinación de anfetaminas en muestras de plasma, obteniendo un rango de linealidad entre 0.15 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

Miller y col.(48) separaron enantiómeros de anfetamina utilizando cuatro reactivos quirales diferentes:(R)-(+)-l-pheniletil isocianato (PEIC), (-) α -metoxi- α -trifluorometil) fenilacetil cloruro (MTPA.Cl), 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-gluopiranosil isotiocinato (GITC) y 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-arabinopiranosil isotiocinato (AITC). Un tiempo de 60 minutos fue suficiente para completar la reacción con todos los sustratos, variando la temperatura entre 25 y 70 °C. Los derivados fueron separados por CLAR operando en fase reversa utilizando como fase móvil metanol y agua. En general la separación de los diastereoisómeros correspondientes a los productos de reacción de GITC o AITC y MTPA.Cl con aminas fue más completa que los productos de reacción de PEIC.

Noggle y col.(49) han propuesto fenilisotiocianato como agente derivatizante precolumna para la determinación de anfetamina y metanfetamina. Los productos de tiourea formados presentan buenas propiedades para la separación cromatográfica utilizando CLAR en fase reversa y alta absortividad molar. Mediante este procedimiento, se pueden separar enantiómeros para aminas que contienen un centro quiral. La separación de los productos diastereoisoméricos obtenidos de la derivatización quiral pueden ser separados utilizando una columna aquiral C18 como fase estacionaria.

Los enantiómeros de efedrina, pseudoefedrina, anfetamina y metanfetamina han sido separados utilizando isotiocianato 2,3,4,6-tetra-*o*-acetil- β -glucopiranosil isotiocianato como agente de derivatización quiral. La separación de los enantiómeros de anfetamina no es total con este reactivo (49-50), ocurriendo lo mismo si se usa 4-nitrofenylsulfonil-*l*-propil-cloride (NPSP) (51).

Los enantiómeros de aminas primarias, secundarias y terciarias se han resuelto como carbamatos derivados formados al reaccionar con β -naftil cloroformato sobre una fase estacionaria quiral de (R)-N-(3,5-dinitrobenzoil) fenilglicina que esta unida covalentemente a una fase de sílica y empleando una fase móvil de isopropanol en hexano (52).

Los diastereoisómeros de los productos de reacción de d-anfetamina, l-anfetamina, utilizando N-(trifluoroacetil)-*l*-propil-(N-TFA-*l*-propil-) han sido separados por CLAR empleando una columna quiral de N-3,5-(dinitrobenzolil)fenilglicina (53). El uso de una columna quiral y un reactivo de derivatización quiral ha permitido obtener una mejor resolución de las formas d- y l-anfetamina en comparación con los datos existentes en la literatura.

Otros reactivos de derivatización quiral tales como S- α -metoxibencilisocianato (54), N-Naftaleno-2-sulfonil) propil isocianato y N-Naftaleno-2-sulfonil) propil azida (55) también han sido propuestos para la separación de enantiomeros de anfetamina, utilizando en ambos casos fases estacionarias de gel de sílica y petroleo refinado: 2-propanol como fase móvil.

Nagai y Kamiyama (56), también han ensayado la separación de isómeros ópticos de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina de ratas, utilizando columnas quirales con base de celulosa. Los isómeros de metanfetamina existentes en las muestras de orina fueron analizados mediante la combinación de las columnas Chiralcel OB y OJ, ofreciendo alta

resolución de picos, buena relación quiral d/l y tiempos de retención relativamente cortos. Las mezclas de anfetamina y metanfetamina pueden resolverse simultáneamente, obteniéndose un tiempo de análisis menor de 25 minutos, y el límite de detección fue de 25 ng por cada 20 μ l de orina (1.7 μ g/mL).

El desplazamiento del grupo sulfonato en un anillo aromático puede también utilizarse para la determinación de bajas concentraciones de aminas, tal es el caso del reactivo β -naftoquinona sulfonato sódico (NQS). Los grupos amino reaccionan con el reactivo NQS en medio alcalino formando compuestos coloreados. Este reactivo fue empleado por primera vez por Endo y col.(57) en el año 1980 para la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina utilizando CLAR en fase normal. Farrell y col.(58), compararon este reactivo con otros tales como o-ftaldehído (OPA), 4-cloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole (NBD-Cl) y dos reactivos formadores de pares iónicos naftaleno-2-sulfonato (NS) y dodecilsulfato sódico (SDDS). Se determinó la concentración de anfetamina en una muestra real de un individuo que había ingerido una dosis de 55 mg. La orina fue obtenida 8 horas después de la ingestión, siendo la concentración de 8.5 μ g/mL (pH de la orina normal). Si se ingieren de 10-15 mg de sulfato de anfetamina, la concentración en orina es de 40-50 ng/mL después de 1-2 horas, disminuyendo la concentración a alrededor de 2 ng/mL tras 8-10 horas. Según señalan los autores, la sensibilidad requerida para estas determinaciones en muestras de orina o plasma solamente se pudo alcanzar mediante la utilización del reactivo NQS. El método no es válido para la determinación de los metabolitos hidroxilados, no obstante este tipo de sustancias son minoritarias en el porcentaje correspondiente a las formas excretadas y no discrimina las formas isoméricas.

En el siguiente apartado se realiza una revisión más exhaustiva de esta reacción que constituye el centro de la presente memoria.

TABLA 3. Propiedades analíticas de los diferentes métodos propuestos para el análisis de anfetamina y metanfetamina por espectrofotometría UV-V.

(*) Extracción posteriormente a la derivatización.

Druga	Muestra	Limpieza de muestra	Derivatización	Detector	Límite de detección	Nota	Ref
Anfetamina	Orina, sangre, suero o tejido	n-hexano	Oxidación con sulfato de Ce (IV)	UV, 287 nm		0.5 µg/mL tomando 10 mL de orina	6
Metanfetamina	Orina	CHCl ₃ *	Tropaeolin	UV-V	3 µg/mL	Screening. Formación de un producto de color rojo o violeta rojizo cuando se añade MeOH en medio ácido sulfúrico.	7
Metanfetamina	Orina	CHCl ₃ *	Negro de eriocromo T, Eriocromo de cianuro R, Púrpura de Bromocresol Verde de Erio B, Zincon, Tropaeolin O.O	UV-V		Screening	8
Metanfetamina Anfetamina	Orina	CHCl ₃ *	Azul de Chrom S	UV-V		Screening. La presencia de color rojo-violeta en la fase orgánica indican la existencia de más de 1 µg de metanfetamina	9
Anfetamina Metanfetamina	Orina		Tetrabromofenolnaftaleno etil ester	UV-V		Screening	10
Metanfetamina	Orina	CH ₂ Cl ₂ * 1,2-diclorometano CHCl ₃	Verde de bromocresol, Cromo AzuroI S. Negro de eriocromo T, Naranja de metilo Zincon	UV-V		Screening	11
Metanfetamina	Sangre	Celite 545 con posterior extracción del analito en n-hexano	-----	UV-V 230 nm		La determinación se ha realizado espectrofotométricamente y por CG-MS	12
Metanfetamina Efedrina Metilefedrina	Orina	1,2-dicloroetano	Tetrabromofenolnaftaleno etil ester	UV-V 570 nm(Met) 555nm(Efe) 550nm(Mefe)		Screening.	13
Metanfetamina	Orina	Diclorometano*	Solución de Rosa Bengala en tampón Britton-Robinson (pH=7.3), en presencia de 0.05% de azul de bromofenol	UV-V		La coloración roja o naranja amarillento indica la existencia de metanfetamina en concentraciones 5 o 0.6 µg/mL.	14
Metanfetamina	Orina	1,2-dicloroetano	Tetrabromofenolnaftaleno etil ester	UV-V	0.16 µg/mL	(TBPE-H) reacciona en medio CH ₂ Cl ₂ para la formación de pares iónicos	15
Metanfetamina Efedrina	Orina	-----	Complejación con Cu-ditiocarbamato	UV-V	20 µg (Colorimétricamente) 4 µg (CLG)		16
Anfetamina	Orina	CHCl ₃ *	Complejos coloreados con: Tropaeolin, Azul de bromotimol, Rojo de metilo, Negro de eriocromo T	UV-V 530, 590, 530, 530 nm		Intervalo de linealidad entre 2 µg - 100 µg de anfetamina en la muestra.	17

TABLA 4. Propiedades analíticas de los diferentes métodos propuestos para el análisis de anfetamina y metanfetamina por CLAR.

Druga	Muestra	Limpieza muestra	Derivatización	Fase estacionaria	Fase móvil	Detector	Límite de detección	Nota	Ref.
Anfetamina (Anf)	Orina	Líquido-líquido (L/L) 1) Et ₂ O 2) HCl	o-ftaldialdehído (OPA)	RP-18 (10µm)	MeOH:H ₂ O (75:25)	Fluorescencia 450/350nm	Límite de detección 0.2µg/mL	Intervalo de linealidad 0.25-3µg/mL. Muestras de orina añadida	25
Anfetamina, Metanfetamina (Met)	Orina	L/L Et ₂ O, alk. pH	diferentes reactivos: cloruro de dansilo (Dns-Cl), 4-fluoro-7-nitrobenzoxadiazole, naftaleno-2,3-dicarbaldéhido.	Inertsil ODS-2	1.0x10 ⁻³ M imidazol en acetonitrilo-agua.	Fluorescencia Quimioluminiscencia tras reacción con oxalato Bis(2,4,6-triclorofenil) y peróxido de hidrógeno en acetonitrilo.	Para los Dns- derivados 3x10 ⁻¹⁵ - 4x10 ⁻¹⁵ mol	Dns-Cl fue el más adecuado. Recuperación con derivatización Dns 99.3±0.7% para (Metanfetamina). Muestras de orina añadida	28
Anfetamina, Metanfetamina y piperidina	Orina	L/L Et ₂ O, alk pH	Cloruro de dansilo	Inertsil ODS-2	Acetonitrilo-agua(7:3), 1mM imidazol pH 7	Quimioluminiscencia tras reacción con oxalato bis(2,4,6-trichlorophenyl) y peróxido de hidrógeno	2x10 ⁻¹⁰ M (MA) en Orina	Sensibilidad mayor que con el test del reactivo de Simon's y CG. Orina de individuos sospechosos Met: 1.3x10 ⁻³ to 3.6x10 ⁻⁶ M; Anf: 3.5x10 ⁻⁵ to 3.3x10 ⁻⁶ M.	31
Anfetamina, Metanfetamina	Orina	L/L Et ₂ O	ABEI N-(4-amino-butil)-N-ethyl- isoluminol más N,N'- disuccinimidil carbonato en presencia de metanol y trimetilamina	RP-C ₁₈	MeOH:agua (54:64) conteniendo 30mM Na-octanosulfonato	Quimioluminiscencia tras reacción con K-ferricianuro, NaOH, H ₂ O ₂ y β- ciclodextrina	Límite de detección 20 fmol(Met) y 100 fmol(Anf). 10 ⁻⁹ M en muestras de orina para (Anf)	Intervalo lineal hasta 5 pmol (Met) y 10 pmol(Anf). Muestras de orina añadida.	35
Metanfetamina	Suero	Precipitación con acetona	ABEI N-(4-aminobutil)-N- etilsoluminol más N,N'- disuccinimidil carbonato en presencia de metanol y trimetilamina. Calentando 80° 30'	Shimpack CLC-C ₁₈	MeOH:agua (54:64) conteniendo 30mM Na-octanosulfonato	Quimioluminiscencia tras reacción con K-ferricianuro, NaOH, H ₂ O ₂ y β- ciclodextrina	Límite de detección 20 fmol (tomando 100 µL de suero)	Intervalo de linealidad 0.05-5 pmol. Sensibilidad comparable con CG-MS y con Fluorescencia-HPLC. Recuperación para Met 99%. Suero de individuo adicto, Met: 3.8 µg/mL.	76
Anfetamina	Orina y plasma	Fase sólida: XAD-2	OPA, NBD-Cl, NQS, NS, SDDS.	Partisil 5, LiChrospher Si 100, Partisil ODS- 2.	Varias	UV/ Fluorescencia	Orina 4 ng/mL. Plasma 20 ng/mL	Muestra de orina de adicto, Anf: 8.5 µg/mL derivatización con SDDS. Los mejores resultados fueron obtenidos con NQS.	77
Fenilalquilaminas (Anfetamina, Metanfetamina etc...)	Matrices biológicas (Orina y extractos de plantas)	Fase sólida: Adsorbex SCX(100 mg) intercambio catiónico	-----	3µm Spherisorb ODS-1	Acetonitrilo:agua (72:928 v/v), 5mL ácido ortofosfórico (85%), 0.28 mL hexil amina por 1000 mL	Fila de diodos UV 198 y 205 nm	-----	Separación isocrática.	81
Metanfetamina	Orina	-----	-----	Asahipak GS- 320M	0.02M NaHCO ₃ 0.02M Na ₂ CO ₃ (8:2) 40°C 1.0 mL/min	UV 207 nm	-----	Intervalo de linealidad 1-10 µg/mL.	82

Droga	Muestra	Limpieza muestra	Derivatización	Fase estacionaria	Fase móvil	Detector	Límite de detección	Nota	Ref.
Anfetamina	Orina	Filtración a pH=10	Reactivos poliméricos conteniendo un ester activado unido al grupo 9-fluororenil (FMOC-Cl).	LichroSpher C ₁₈ , 5µm	50/50, 80/20, acetonitrilo/agua	UV 254 nm Fluorescencia (265/320nm)	0.1 µg/mL	% de derivatización son 90%-70% para aminas 1 ^ª y 2 ^ª . Muestras de orina añadida.	39
DI-Anfetamina	Orina	Filtración a pH=10	FMOC-L-prolina	C ₁₈	(40-48%) acetonitrilo-agua	UV, Fluorescencia	50 ng/mL	Muestras de orina añadida.	46
Anfetamina	Plasma	Dilución	9-fluorenoacetil-tagged (FA)	Supelcosil LC-ABZ, 5 µm	Gradiente desde 1 mM SDS en ACN-agua (10:90 v/v) a 1 mM SDS en ACN-agua (55:45 v/v) para la separación analítica	Fluorescencia (254/313 nm)	0.2 µg/mL en plasma	Derivatización en línea en ACN:agua (10:90 v/v). Intervalo de linealidad 2-40 µg/mL con 1 mM SDS a 75°C durante 8 min. Muestras de plasma añadida.	41
Anfetamina	Orina humana y de caballos	Concentración en precolumnas. Válvulas de conmutación	-----	Spherisorb ODS-2, 5µm	0.001M acido perclórico-0.1M perclorato sódico en agua/MeOH	UV 210 nm	20 ng/mL	Microboro HPLC gradiente. Límite de determinación 0.1 µg/mL. Muestras de orina añadida.	83
Anfetamina, Metanfetamina	Orina	Con válvulas de conmutación y dos precolumnas	-----	C ₈ y sílice	Tampón pH=6.5 y acetonitrilo	UV 210 y 235 nm	0.2 µg/mL	Intervalo de linealidad 0.3-10 mg/L. Muestras de orina de individuos adictos Met: 8.2 mg/L; Anf: 1.8 mg/L.	84
Anfetamina	Patrones	-----	Naftaleno-2,3-dialdehido, Antraceno-2,3-dialdehido.	Lichrosorb RP-18 5µm	Acetonitrilo-agua(70:30) conteniendo 2.5mM imidazol	Fluorescencia, Quimioluminiscencia con peroxioxalato	> 10 *M	Los derivados fueron extraídos con tolueno:hexano (1:1) y diluidos con diclorometano	36
Anfetamina	Plasma	Diluida como mucho 200- veces	Naftalenodialdehido	ODS-2-Chromospher C ₁₈ , 5µm	Gradiente A- THF-tampón fosfato de potasio(pH=6.8 0.05M) (5:95) B-acetonitrilo-MeOH-tampón fosfato de potasio (pH=6.8 0.05M) (55:10:35)	Fluorescencia	50 fmol de Anf.(50 µL inyectados)	Derivatización precolumna automatizada. La reacción es llevada a cabo en medio acuoso a pH 9.3 en 15 min. Intervalo de linealidad 10 fmol-100 pmol inyectados.	37
Anfetamina, Metanfetamina	Patrones	-----	9-fluorenil metil cloroformato (FMOC-Cl)	Nucleosil C ₁₈ (NM) 5µm	acetonitrilo-agua (58:42, v/v)	UV, 265 nm	-----	Preconcentración y derivatización en línea. Intervalo de linealidad 2x10 ⁸ - 1x10 ¹ M	40

1.3. - REACCION DE AMINAS CON 1,2-NAFTOQUINONA 4-SULFONATO

En 1922 Folin (59) describió un método para la determinación de aminoácidos mediante la combinación de los grupos amino con 1,2-naftoquinona 4-sulfonato (NQS) en medio alcalino, formando compuestos coloreados que podían determinarse colorimétricamente. En el libro de Fiegl (60), también se habla de la identificación de compuestos que contienen átomos de hidrógeno removibles ligados a un átomo de carbono o de nitrógeno mediante la reacción con NQS en medio neutro o ligeramente alcalino, formando productos de condensación para-quinoides de coloración intensa. La prueba descrita según señala el autor sólo puede ser aplicada con fines orientativos, ya que la reactividad de los grupos $-CH_2$ y $-NH_2$ está influenciada por el resto de grupos de la molécula. Otros autores, tales como Howell y col.(61), y Pratt (62) también han utilizado el reactivo NQS para la determinación de aminoácidos y ácido hidrazida isonicotínico, respectivamente.

El trabajo de Rosenblatt y col.(63) es una de las primeras publicaciones en cuanto a la determinación de aminas primarias usando NQS como reactivo de derivatización. Mientras que algunos autores proponen la utilización de agentes reductores tales como tiosulfato sódico (64-65) o acetona (66) para eliminar la coloración del exceso de reactivo, estos autores proponen el empleo de un disolvente orgánico, preferiblemente cloroformo, para extraer el producto de reacción formado, aumentando además la sensibilidad del método.

Gürkan (67) utilizó este reactivo en la investigación de aminas simpatomiméticas (anfetamina, ciclopentamina, triaminoheptano y metilhexaneamina). Condensó los productos de reacción NQS-amina encontrando que aquellas que contenían grupos $-OH$ en posición α (efedrina, mefetermina, fenilpropanolamina, foledrina y oxidrina) no daban reacción cuantitativa con NQS. Este trabajo propone un procedimiento espectrofotométrico basado en la medida de la absorbancia de los productos de condensación para-quinoides extraídos en cloroformo y un procedimiento fluorimétrico basado en la medida de la señal analítica proporcionada por productos de condensación reducidos con borohidruro sódico. Ambos procedimientos han sido aplicados a muestras sintéticas (67), así como a la determinación de anfetamina en preparados farmacéuticos (68).

En 1978 Hashimoto y col.(69) describieron la reacción entre derivados de β -feniletilamina y el reactivo 1,2-naftoquinona 4-sulfonato. Estos autores elucidaron el

mecanismo de reacción examinando las estructuras de los productos de reacción recristalizados. Los resultados obtenidos mediante el análisis elemental sugirieron que los productos de reacción formados tenían una estructura general como la que se muestra en la Figura 5.

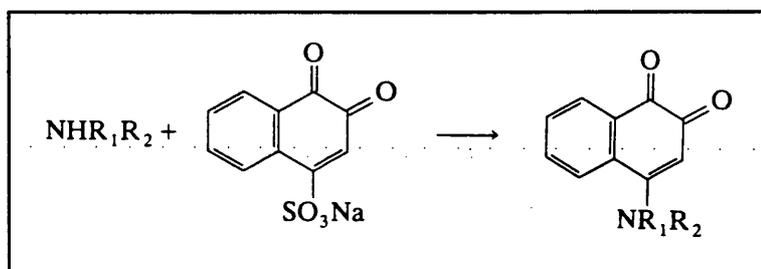


FIGURA 5. Estructura del reactivo NQS y del producto de reacción amina-NQS.

El análisis instrumental (IR, NRM y MS) corroboró la fórmula propuesta. Estos autores establecieron como condiciones óptimas de reacción calefacción a 70 °C durante 30 minutos para la mezcla de volúmenes iguales de amina, medio bicarbonato (8%) y reactivo (0.5%), y extracción del producto de reacción con cloroformo. La cantidad de reactivo en exceso necesaria para completar la reacción fue de alrededor de 6 veces para las aminas primarias y de 8 veces para las secundarias. Señalando que, la reacción de los derivados fenetilamínicos con un grupo -OH no llegaba a completarse bajo las condiciones estudiadas. Los resultados obtenidos por cromatografía plana para los productos de reacción, sugirieron que el método es válido para la detección de estas drogas principalmente para análisis de screening.

Posteriormente, Endo y col.(57) aplicaron esta reacción coloreada a la microdeterminación de drogas estimulantes en muestras de orina (anfetamina y metanfetamina) mediante cromatografía líquida de alta resolución CLAR en fase normal. Las señales analíticas fueron medidas a 450 y 464 nm, respectivamente.

En 1983, Farrell y col.(58) realizaron un estudio de la determinación de anfetaminas en muestras de plasma y orina por CLAR utilizando distintos reactivos de derivatización precolumna, entre ellos NQS. De todos los reactivos ensayados el método de derivatización con NQS fue el más selectivo y el único suficientemente sensible para la determinación de estas drogas en muestras de orina y plasma en cantidades del orden de ng/mL, tal como se

ha mencionado en el apartado anterior. Obtuvieron calibrados lineales para NQS-metanfetamina y NQS-anfetamina en agua, orina y plasma entre 0.5-5 $\mu\text{g/mL}$ y límites de detección de alrededor de 2 ng que confirmaban los resultados obtenidos por Endo y col.(50), siendo este el método de CLAR recomendado por The Pharmaceutical Society of Great Britain (70). Recientemente, Nakahara y col.(71) han descrito la aplicación de este reactivo como agente de derivatización de aminas empleando CLAR en fase reversa y detección electroquímica. En este caso, el disolvente de extracción propuesto fue n-hexano:acetato de etilo (1:1 v/v) en lugar de cloroformo. Este procedimiento ha sido aplicado a la determinación de aminas en muestras de orina (72) y de saliva (73).

Lindsay y col.(74) están de acuerdo con los fundamentos metodológicos de la reacción (Figura 5). Sin embargo, han encontrado algunos ejemplos en los que el procedimiento de derivatización no funciona correctamente. Según estos autores, los efectos estéricos pueden ser una causa importante en el retraso de la derivatización, sin embargo apuntan que el mayor problema reside en la extracción de los derivados hidrofílicos.

Como ha podido observarse en la bibliografía, el NQS ha sido usado como agente de derivatización precolumna de anfetaminas y compuestos afines en muestras biológicas para la determinación cromatográfica utilizando detección UV-V, electroquímica y fluorimétrica, no estando descrita su aplicabilidad a procedimientos estáticos. Del estudio de la bibliografía se deriva que aunque todos los autores indican que la reacción transcurre en medio básico, manteniendo la muestra durante un período de tiempo determinado a temperatura ambiente o superior, no existe unanimidad al respecto, tal es el desacuerdo en cuanto a las condiciones de reacción que incluso los mismos autores, en trabajos diferentes, proponen distintas condiciones (Tabla 5A, 5B). En la Tabla 5A se muestran los diferentes métodos espectrofotométricos descritos en la bibliografía. Como se puede observar, de todos los procedimientos propuestos no hay ninguno aplicado a muestras biológicas, y sólo uno a preparados farmacéuticos (68). Aunque no todos los autores indican la existencia de interferencia introducida por el blanco reactivo, en la mayoría de los trabajos si se ha contemplado dicha posibilidad. Los primeros trabajos se realizaron en disolución acuosa, en uno de ellos para la eliminación de interferencias se adiciona tiosulfato sódico en medio ácido acético (62). Los artículos más recientes utilizan la extracción de los productos de reacción con un disolvente orgánico, siendo el más empleado el cloroformo, la mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:1)

también ha sido ensayada (72-73). La aplicación de esta reacción para la determinación de anfetamina en muestras biológicas emplea CLAR como técnica de separación de los productos de reacción y posterior detección UV-V o electroquímica. En estos trabajos aunque todos emplean medio bicarbonato, las temperaturas y tiempos de reacción son diferentes como se observa en la Tabla 5B.

TABLA 5. Propiedades analíticas de los diferentes procedimientos que han empleado el reactivo NQS como agente de derivatización de aminas, A) utilizando espectrofotometría UV-V, B) haciendo uso de la cromatografía líquida de alta resolución CLAR.

TABLA 5A

Determinaciones espectrofotométricas en las que se utiliza el reactivo NQS					
Analitos y tipo de muestra	Condiciones de reacción				
	Temperatura (°C)	pH y tampón	Tiempo de reacción	Eliminación del exceso de reactivo	Ref
aminoácidos	-----	-----	-----	-----	59
prueba de indentificación de compuestos que contienen grupos CH ₂ o NH ₂	ambiente	neutro o ligeramente alcalino utilizando NaOH	-----	-----	60
aminoácidos	ambiente	pH básico, medio bicarbonato	2.5 horas	ácido acetato sódico y tiosulfato sódico	61
Hidrazida ácido isonicótico	ambiente	básico utilizando NaOH	15 min.	-----	62
Etilenimina, butilamina	ambiente	10.3 utilizando medio fosfato		extracción en cloroformo	63
Isoxizol aminas	ambiente	10.3 utilizando medio fosfato	20 min.	adición de ácido clorhídrico y extracción con tetracloruro de carbono	64
Aminas simpatomiméticas	50	entre 4 y 7 con carbonato sódico	10 min.	extracción en cloroformo	67
Anfetamina en preparados farmacéuticos	60	entre 8-8.5 con carbonato sódico	30 min.	extracción en cloroformo	68

TABLA 5B

REF	Muestra	Volumen de muestra tomado (mL)	Limpieza de muestra	Derivatización				Volumen Inyección (μl)	Separación			Detección	Límite de detección
				Medio	T(°C)	t(min)	fase organica		fase estacionaria	fase móvil	velocidad de flujo (ml/min)		
57	Orina	50	L/L con n-hexano	bicarbonato 2.7%	70	20	cloroformo (2 mL)	100	Lichrosorb Si 100 10μm (25 cmx2 mmID)	cloroformo-acetato de etilo-ctanol-n-hexano (25:10:1:50)	1.2	UV-vis 464 nm 280 nm	5 ng 2 ng
58	Orina y plasma	20 10	S/L con resinas XAD-2	bicarbonato 4%	70	20	cloroformo (2 mL)	20	Partisil (15 cmx 5mm ID)	cloroformo-acetato de etilo-ctanol-n-hexano (25:35:1:50)	2.5	UV-vis 248 nm	2 ng
71	fluidos biológicos	0.05	-----	bicarbonato 0.7%	60	40	n-hexano-etil ether (2:1,v/v) (1 mL)	5	μBondasphere C ₁₈ 5μm 150x3.9 mm ID (40°C)	acetonitrilo/metanol/ 0.01 M H ₂ SO ₄ (20:20:60)	0.8	Electroquímica*	100 ng/mL (orina) 50 ng/mL suero, plasma saliva 10-20 ng/mL suero, plasma saliva)
72		0.5	L/L con hexano-eter (2:1,v/v)	1%	60	30	n-hexano-acetato de etilo (1:1)	5					

1.4.- METODOS DE TRATAMIENTO PRELIMINAR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Generalmente las matrices biológicas no permiten el análisis directo del analito en la muestra, siendo necesario el empleo de procedimientos de limpieza con el fin de eliminar interferencias.

En relación a los procedimientos de análisis de anfetaminas mediante espectrofotometría UV-V, en la mayor parte de los trabajos existentes en la bibliografía, que en realidad son muy pocos y van dirigidos fundamentalmente al análisis cualitativo, se han utilizado disolventes orgánicos, generalmente cloroformo, con el objeto de extraer los pares iónicos que forman con los colorantes propuestos y evitar el exceso de colorante (Tabla 3). También existen algunos trabajos en los que se incluye una etapa previa de extracción del analito en un disolvente orgánico, tal es el caso descrito por Sakai y col.(15), quienes separan los analitos (metanfetamina, efedrina y metilefedrina) de la matriz de orina fuertemente alcalinizada utilizando 1,2-dicloroetano. Los analitos extraídos reaccionan en este medio con tetrabromofenolnaftaleno etil ester formando pares iónicos coloreados. Dado que los compuestos formados presentan características y estequiometría que dependen de la temperatura, propusieron la determinación simultánea de efedrina y metanfetamina en muestras de orina.

Los procedimientos descritos en la bibliografía que utilizan la técnica CLAR ofrecen más posibilidades de tratamiento preliminar de muestra.

El análisis de fármacos en muestras de orina, suero o plasma mediante CLAR, requiere de esta etapa para separar proteínas, pigmentos, etc. de la matriz antes de ser inyectadas en la columna. La imposibilidad de una inyección directa radica en el consiguiente deterioro de la columna debido a una adsorción irreversible de las proteínas en la fase estacionaria con lo que mermaría progresivamente la capacidad regeneradora de ésta, a la vez que se incrementaría progresivamente la presión del sistema. El tratamiento previo de muestra más generalizado es la extracción líquido-líquido, que permite recuperar y concentrar los analitos y separarlos de los compuestos interferentes de la matriz.

En la Tabla 4, se revisan los distintos trabajos en los que se ha utilizado la extracción líquido-líquido. Se han usado disolventes tales como dietileter (EtO₂) (25,28,31,35) y pH

fuertemente alcalino. La extracción se ha realizado generalmente en medio básico dado los valores de las constantes de acidez ($\log K$ alrededor de 9.9) que presentan este tipo de analitos. Kinberger (25) utilizó la extracción líquido-líquido con dietileter para la extracción de anfetamina desde muestras de orina previamente alcalinizadas con NaOH. A los extractos orgánicos se añadió ácido clorhídrico, quedando los analitos en la fase acuosa. Separadas ambas fases, a la acuosa se añadió NaOH y el reactivo OPA para realizar la derivatización. Transcurrido el tiempo de reacción (5 minutos) se procedió a la inyección directa de la muestra en el cromatógrafo. Hayakawa y col.(28), también utilizan este mismo disolvente de extracción pues permite una extracción cuantitativa de metanfetamina desde muestras de orina fuertemente alcalinizadas siendo los porcentajes de recuperación obtenidos de $99.3 \pm 0.7\%$. Estos mismos autores (31) usando dietileter como disolvente de extracción determinaron anfetamina, metanfetamina y piperidina en muestras de orina empleando en este caso cloruro de dansilo como agente derivatizante. El n-hexano también ha sido utilizado como disolvente de extracción por Endo y col.(57) para la determinación de anfetamina y metanfetamina con 1,2-naftoquinona-4-sulfonato.

La extracción de pares iónicos fue propuesta por Hoogewijs y col. (75) para analizar drogas básicas inyectando directamente los extractos en la columna cromatográfica. Las eficacias de extracción de los reactivos n-octilsulfato sódico y fosfato bis(2-etilhexil) formadores de pares iónicos fueron comparadas por estos autores.

Otro procedimiento descrito en la bibliografía (76), consiste en la limpieza de la muestra mediante precipitación con acetona de las proteínas, filtración y posterior extracción de la droga con un disolvente orgánico (Tabla 4).

Durante los últimos años se ha observado una tendencia a la utilización de procedimientos de extracción en fase sólida. Sekine y col.(77), han extraído cuantitativamente anfetamina, metanfetamina, metilefedrina, y p-hidroxianfetamina en muestras de orina, utilizando cartuchos Sep-pack C18. Estas drogas pueden ser extraídas casi cuantitativamente a valores de $\text{pH}=8$ y con velocidades de flujo entre 2.5 y 5.0 mL/min. Estos mismos autores (78) han propuesto un sistema de extracción automático utilizando una minicolumna ODS (25 mm x 9 mm d.i) para el análisis de drogas de abuso en fluidos biológicos. Patel y col. (79), han aislado anfetamina y metanfetamina de muestras de orina utilizando cartuchos de

extracción C18, inyectando directamente los eluatos en la columna para la realización del análisis. En este caso el principio de extracción implica la interacción hidrofóbica usando pares iónicos con ácido hexanosulfónico. La extracción fue lineal en el intervalo de concentraciones 5.0 y 25 $\mu\text{g/mL}$.

Mishra y col.(80) han propuesto un procedimiento de extracción en columna, empleando un soporte de sílice, para el screening y confirmación de drogas en muestras de orina de caballos, mediante la utilización de cromatografía plana TLC y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS), respectivamente. Estos autores indican que la extracción líquido-líquido usando como disolvente una mezcla diclorometano (DCM)-isopropanol (1:3 v/v) proporcionó porcentajes de recuperación para anfetamina y metanfetamina menores al 25 %, mientras que con el procedimiento en columna de sílica DAU se obtuvieron porcentajes del 85 %.

Farrell y Jefferies (58) también han utilizado columnas de extracción en fase sólida (XAD-2) y como eluyente una mezcla de cloroformo:isopropanol (3:1), para la determinación de aminas en muestras de orina.

Recientemente, Helmlin y Brenneisen (81), han extraído derivados de feniletilamina, tales como metilenedioximetilamfetamina(MDMA) y metilenedioxianfetamina(MDA) de muestras de orina, usando una columna de extracción en fase sólida de intercambio catiónico Adsorbex SCX(100 mg), siendo los porcentajes de recuperación mayores del 98% (Tabla 4).

En algunos procedimientos descritos en la bibliografía, la muestra se somete a una única extracción líquido-líquido, con el fin de aislar los productos de reacción y a la vez eliminar el exceso de reactivo y compuestos endógenos de la muestra que puedan interferir (72-73).

Durante los últimos años se ha observado una tendencia a la utilización de sistemas en línea que permitan la inyección directa de muestra. En este sentido, Hoiso (82), ha propuesto la determinación de metanfetamina en muestras de orina sin derivatización ni tratamiento previo de la muestra.

Se han descrito otros procedimientos (39,41,43) en los que se realiza la determinación de anfetamina en fluidos biológicos utilizando derivatización en línea y separación por CLAR y fase reversa. En estos casos, la muestra simplemente se filtra (39,43) o diluye (41) previamente a la inyección en el sistema. Koning y col.(37), en este sentido han propuesto naftalenodialdehído como agente de derivatización en línea y detección fluorimétrica.

Slais y col.(83) proponen un análisis de screenig de anfetaminas en muestras de orina humana y de caballos. Combinan dos columnas en serie que permiten la limpieza de la muestra y la concentración de la misma. Los resultados obtenidos muestran buena reproducibilidad, permitiendo la determinación de anfetamina en concentraciones inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$, (el límite de detección en muestras de orina fue de 20 ng/mL) (Tabla 4).

Binder y col.(84) han propuesto otro esquema de válvulas de conmutación que utiliza dos precolumnas poliméricas para aislar las drogas, y una columna de fase normal acoplada a una de sílice para la separación cromatográfica. Se analizaron muestras de orina que habían dado positivo mediante el análisis por cromatografía plana, las concentraciones obtenidas por comparación con disoluciones patrón de concentración conocida fueron de 1.8 $\mu\text{g/mL}$ y 8.2 $\mu\text{g/mL}$ para anfetamina y metanfetamina, respectivamente.

Recientemente, se ha introducido la electroforesis de zona para el tratamiento preliminar de muestras, incorporándose en línea con CLAR (85-86).

**2.- DISCUSION SOBRE EL ESTADO
ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS**

2. DISCUSION SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

Debido a que en la actualidad y también a lo largo de la historia reciente las anfetaminas son un grupo de estimulantes de consumo fundamentalmente prohibido y suficientemente extendido en diferentes ámbitos de la sociedad, el poder disponer de métodos validados para su determinación que utilicen técnicas de gran difusión como es la espectrofotometría, reviste un interés inmediato.

Del estudio de la bibliografía se deriva que son en realidad pocos los métodos espectrofotométricos propuestos para la determinación de anfetaminas y compuestos afines. La mayor parte son procedimientos cualitativos basados en la formación de pares iónicos con colorantes (Tabla 3). La necesidad de utilizar una reacción química parece evidente, dadas las concentraciones de estas drogas en orina (fluido biológico en el que generalmente se practica el análisis) y la baja absorptividad nativa que presentan. El número de reactivos propuestos tampoco es elevado y en principio del examen de la literatura parece desprenderse que el 1,2-naftoquinona sulfonato sódico es uno de los pocos reactivos espectrofotométricos, sino el único, que pueda proporcionar una sensibilidad suficiente considerando el contenido presente en las muestras biológicas.

En cuanto al estado de conocimiento que se tiene de la reacción señalar que tampoco es mucho, únicamente se han aislado los productos de reacción y las condiciones óptimas propuestas varían en un intervalo bastante amplio (Tabla 5), estando descrita únicamente su aplicación CLAR como agente de derivatización pre-columna. Consecuentemente y a la vista del gran número de variables que pueden influir en la determinación y que por supuesto marcarán la exactitud y precisión del resultado analítico, se planteó su estudio que incluirá varios apartados, eligiendo para ello aminas primarias tales como β -feniletilamina y anfetamina y secundarias como metanfetamina y efedrina. La efedrina se introduce dada la controversia existente entre los diversos autores sobre su reactividad.

Una primera parte se dedicará al estudio de variables propiamente experimentales tales como pH, temperatura, tiempo de calefacción e influencia de la concentración de reactivo que van a incidir fundamentalmente en el grado de desplazamiento de la reacción. En este grupo también se puede incluir la influencia del disolvente orgánico de extracción que marcará el porcentaje de recuperación de los productos formados. Un segundo tipo de

variables van a influir directamente en la exactitud de la determinación y se las puede calificar mejor de variables analíticas, tales como el blanco que plantea el problema de su propia reacción y de los errores sistemáticos a los que puede conducir y el efecto matriz que puede inducir a plantearse la necesidad de un tratamiento preliminar de la muestra o en su caso de una etapa de calibración que puede considerar la presencia de errores sistemáticos corregibles ya sean constantes y/o proporcionales o ambos tipos de error. Para evidenciar y corregir, estos tipos de error se pueden aplicar los métodos de adición estándar (87-88), Youden (89) y el método de adición estándar del punto H propuesto por este grupo de investigación (90-95).

Una vez cumplidos estos objetivos, el conocimiento de la reacción en la dirección planteada permitirá establecer las aplicaciones analíticas que se pueden derivar y que responderían a la determinación de amfetamina y/o metanfetamina y efedrina mediante procedimientos extractivo-colorimétricos, o directamente en disolución acuosa aprovechando la cinética de la reacción o bien utilizando la técnica CLAR acoplada a la detección UV-V, procedimiento para el que esta descrita su aplicación.

La literatura muestra que las técnicas de detección en CLAR de uso más frecuente en este tipo de determinaciones son la fluorescencia, la quimioluminiscencia y la espectrofotometría. Los trabajos dedicados a este último tipo de detección coinciden en señalar que sólo el NQS permite alcanzar los límites de detección necesarios para el análisis de estas drogas en fluidos biológicos. Por otra parte, todos coinciden en la necesidad de utilizar un tratamiento preliminar de la muestra que generalmente consiste en una extracción líquido-líquido. Sin embargo en la literatura se observa una evolución hacia el uso de la extracción sólido-líquido, si bien propuesta para otro tipo de reactivos, etapa previa para el diseño de sistemas de extracción de muestras en línea mediante válvulas de conmutación y que por sí misma ya supone un ahorro de tiempo considerable en la etapa de tratamiento preliminar de la muestra. Teniendo presente estas consideraciones se planteó el estudio de la determinación CLAR en fase normal derivatizando con NQS y utilizando un tratamiento preliminar de la muestra consistente en la extracción sólido-líquido. Método que en principio presentara menores límites de detección que la espectrofotometría convencional entre otras razones porque el incluir una etapa de separación la absorbancia podrá medirse en la región UV.

Una vez justificado el interés científico del tema que podría resumirse en una profundización en el estudio de los errores sistemáticos de esta determinación en particular y de la forma de corregirlos, pero que podría extenderse a otro tipo de procedimientos, indiciendo por tanto en la validación analítica de estos y que también se reflejaría en un conocimiento de la reacción para anfetaminas, pero aplicable a otras aminas, y por tanto de sus prestaciones analíticas y justificado también su interés social dado su consumo, los objetivos de la presente memoria se podrían resumir esquemáticamente en los siguientes puntos:

1. Estudio de las variables experimentales que afectan a la reacción entre aminas y el reactivo NQS, partiendo de las condiciones establecidas en la literatura. El objeto de este apartado es establecer los valores óptimos de estas variables para la determinación de las distintas aminas ensayadas.
2. Estudio quimiométrico de la determinación extracto-espectrofotométrica. Influencia del blanco y efecto matriz. Caracterización de errores sistemáticos. Estudio de diferentes tratamientos preliminares de limpieza de muestras de orina, previos a la derivatización con NQS. Aplicación de los métodos de Youden y de adición estándar. Estudio de la capacidad del método de adición estándar del punto H para evidenciar y corregir los errores introducidos por un blanco absorbente.
3. Determinación extracto-colorimétrica de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina independientemente o conjuntamente mediante el método de adición estándar del punto H, cuya aplicación en presencia de TYB (blanco total de Youden) se demostrará. Determinación de efedrina en preparados farmacéuticos.
4. Dadas las características cinéticas de la reacción, se propone un procedimiento cinético espectrofotométrico para la determinación de aminas en disolución acuosa. Como aplicación práctica del método se ha desarrollado la determinación de anfetamina y efedrina en preparados farmacéuticos.
5. Finalmente se ha adaptado la extracción sólido-líquido como tratamiento previo de muestras al procedimiento CLAR en fase normal propuesto para el análisis de anfetaminas en muestras de orina. Comparación de los resultados obtenidos con los proporcionados por la extracción líquido-líquido.

La presente Memoria se ha desarrollado en base a un proyecto que fue el objeto de la concesión de una beca a Doña Carmen Molins Legua, del Plan de Formación de Personal Investigador en España (AP91-25393355).

Este trabajo se ha reflejado en principio en los siguientes artículos publicados o enviados a revistas de carácter internacional:

TITULO: Extractive-spectrophotometric determination of amphetamine in urine samples with sodium 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate.

REVISTA: Anal. Chim. Acta, **283**, 635-644 (1993), Holanda.

TITULO: Amphetamine and methamphetamine determinations in biological samples by high performance liquid chromatography. A review.

REVISTA: J. Liq. Chromatog., **17**, 731-747 (1994), USA.

TITULO: Extractive-spectrophotometric determination of ephedrine with sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonate in pharmaceutical formulations.

REVISTA: Analytical Letters , **27**, 531-547 (1994), USA.

TITULO: Determination of amphetamine and methamphetamine determination in urine with sodium 1,2-Naphthoquinone sulphonate using the H-point standard additions method.

REVISTA: Anal. Chim. Acta, **287**, 41-48 (1994), Holanda.

TITULO: Study of the behaviour of the absorbent blanks in analytical procedures by using the H-Point Standard Additions Methods (HPSAM).

REVISTA: Talanta **41**(1), 39-52, 1994.

TITULO: Kinetic-spectrophotometric determination of primary and secondary amines by reaction with 1,2-Naphthoquinone 4 shulfonate.

REVISTA: Analytical Letters **27**(6), 1994, USA.

TITULO: Determination of methamphetamine in urine samples with sodium 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate.

REVISTA: Fresenius J. Anal. Chem. (en prensa). Alemania.

TITULO: Improved Amphetamine and Methamphetamine Determination in Urine by Normal Phase High Performance Liquid Chromatography with Sodium 1,2-Naphthoquinone 4-Sulphonate as Derivatizing Agent and Solid-phase Extraccion for Sample Clean-up.

REVISTA: Enviado a Journal of Chromatography. Holanda

3.- EXPERIMENTAL

3.1.- REACTIVOS Y APARATOS

REACTIVOS

D-sulfato de anfetamina (Sigma)
Dl-sulfato de anfetamina (Sigma)
D-clorhidrato de metanfetamina (Sigma)
Dl-clorhidrato de metanfetamina (Sigma)
Clorhidrato de efedrina (cedido por Laboratorios Lasa)
 β -feniletilamina (Sigma)
Acetato de etilo (Para CLAR, Sharlau)
Alcohol isoamílico (R.A., Panreac)
Cloroformo (Para CLAR, Sharlau)
Etanol (Para CLAR, Sharlau)
Metanol (Para CLAR, Sharlau)
n-hexano (Para CLAR, Sharlau)
Isopropanol (Para CLAR, Sharlau)
Acido acético (R.A. 96%, Probus)
Acido clorhídrico (R.A. 37%, Probus)
Hidróxido sódico (R.A., Panreac)
Hidroxido amónico (R.A. 25%, Probus)
Sulfato sódico anhidro (R.A., Probus)
Bicarbonato sódico (R.A., Probus)
Carbonato sódico decahidratado (R.A., Panreac)
Monohidrógeno fosfato sódico dodecahidratado (R.A., Probus)
Dihidrógeno fosfato sódico dihidratado (R.A., Probus)
1,2-Naftoquinona 4-sulfonato sódico (Sigma)
Teofilina (Fluka)
Fenobarbital
Mirazul (Laboratorio de Aplicaciones Farmacodinámicas)
Cilinasofal (Medical S.A. Córdoba)
Winasma (Steling Winthrop S.A)
Difilina Asmorax (Laboratories LIADE, S.A. Alcalá de Henares (Madrid) España)
Desabronquisan (Borehringer Mannheim S.A. Tarrassa (Barcelona) (España).

Tedral (Parke-Davis, S.A)

Tedral Acción Sostenida (Parke-Davis, S.A)

Centramina (Laboratorio Miguel S.A., Barcelona)

Las disoluciones patrón de cada analito, se han preparado disolviendo 1 g del analito puro en 1 L de agua destilada. Las disoluciones de menor concentración se obtuvieron por dilución. Todas las disoluciones fueron guardadas en la oscuridad a 4°C.

El reactivo NQS se preparó diariamente disolviendo el reactivo sólido en agua destilada. La disolución resultante se mantuvo en la oscuridad para evitar su degradación.

Las disoluciones reguladoras se prepararon como se indica a continuación:

- 1) pH=5.00, 1.9 g de acetato sódico, 3.0 mL de ácido acético 2 M y llevando a un volumen final de 100 mL.
- 2) pH 7.5, disolviendo 3.00 g de monohidrógeno fosfato sódico dodecahidratado y 0.25 g de dihidrogeno fosfato sódico dihidratado en 100 mL de agua destilada.
- 3) pH=8.4, 8 g de bicarbonato sódico en 100 mL. En el caso de las disoluciones de pH 10.5 se prepararon disolviendo 8 g de bicarbonato sódico y añadiendo NaOH (5 M) hasta alcanzar el pH requerido, siendo el volumen final de 100 mL.

En el apartado correspondiente a la aplicación cromatográfica, los disolventes empleados en la preparación de la composición de la fase móvil se filtraron con filtros de nylon, 0.45 μm (Teknokroma) y desgasificaron con una corriente de helio inmediatamente antes de ser usadas.

Todas las muestras han sido filtradas antes de su inyección en la columna analítica con filtros de nylon (0.45 μm , Teknocroma).

APARATOS

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron usando un espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard HP8452 termostatado con un baño Lauda RM 20 y conectado a un sistema de tratamiento de datos HP 89530 A MS-DOS UV-V.

Las cuvetas fueron de cuarzo con 1 cm de camino óptico.

En cuanto al tratamiento de las muestras, éstas se agitaron mecánicamente en un agitador automático Vibromatic-384 y centrifugaron en una centrifuga Heraeus Sepatech Medifuge. La evaporación de los disolvente se efectuó en un rotavapor Büchi R110.

Para la separación cromatográfica de las muestras se utilizó un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1040A, equipado con un detector de fila de diodos, y conectado a un sistema de tratamiento de datos (Hewlett-Packard HPLC Chem Station) para la adquisición y almacenamiento de los resultados. El camino óptico de la celda empleada fue de 6 mm, con un volumen de 8 μL . La anchura de la rendija fue de 4 nm. Este equipo además dispone de una bomba cuaternaria (Hewlett-Packard, 1050 Series) con un inyector de muestra de 25 μL .

Se empleó una columna LiChosfer Si 60, 100 (150 mm x 4 mm) Hewlett-Packard, y filtros para columnas de 4 mm (Hewlett-Packard).

En la preparación de la fase móvil se utilizó un equipo de filtración Sharlau S.A.

En la preparación de las muestras se ensayaron columnas de extracción en fase sólida Bond-Elut (Sharlau, S.A.), C18, C8, C2, CH, PH y CN, con una capacidad de carga de 100 mg/1 mL y Extra-Sep C18, 200 mg/3mL.

La inyección de la muestra se llevó a cabo con una microjeringa Hamilton de 25 μL .

3.2.- INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura general de las feniletilaminas.

FIGURA 2. Estructura isopropilamínica.

FIGURA 3. Principales vías metabólicas de anfetamina y metanfetamina.

FIGURA 4. Evolución bibliográfica en base a las publicaciones correspondientes a la determinación de anfetamina y metanfetamina durante la última década en función de la técnica empleada.

FIGURA 5. Estructura del reactivo NQS y del producto de reacción amina-NQS.

FIGURA 6. Espectro del reactivo en disolución acuosa a diferentes valores de pH. a)pH= 3.0, b)pH=5.0, c)pH=7.5, d)pH=8.4, e)pH=10.5. NQS: 2.5×10^{-4} M, temperatura ambiente.

FIGURA 7. Espectros en disolución acuosa a)del reactivo (NQS), b)del reactivo en presencia de amina en medio bicarbonato pH=8.4. NQS: 2.5×10^{-4} M, β -feniletilamina: 20.0 mg/L.

FIGURA 8. Espectros del reactivo correspondientes a A) los extractos clorofórmicos y B) acuosos obtenidos tras un proceso de calefacción a 70°C durante 30 minutos en diferentes medios de pH. a)pH=3, b)pH=5, c)pH=7.5, d)pH=8.4, e)pH=10.5. NQS: 6.4×10^{-3} M, temperatura ambiente.

FIGURA 9. Espectros de A)los extractos clorofórmicos B) los extractos acuosos en medio ácido, correspondientes a)reactivo, b)reactivo en presencia de amina. NQS: 6.4×10^{-3} M, β -feniletilamina 20 mg/L.

FIGURA 10. Espectros de A) los extractos clorofórmicos B)los extractos acuosos en presencia de β -feniletilamina bajo diferentes condiciones de pH. a)pH=7.5, b)pH=8.4, c)pH=10.5. NQS: 6.4×10^{-3} M, β -feniletilamina 20 mg/L.

FIGURA 11. Variación de la absorbancia vs la longitud de onda de una disolución acuosa de reactivo(NQS) a diferentes valores de pH. a)pH=7.5, b)pH=10.5, c)pH=14.0. NQS 6.4×10^{-4} M. Calefacción a la temperatura 70°C durante 30 minutos.

FIGURA 12. Variación de la absorbancia vs la longitud de onda de una disolución acuosa de reactivo(NQS en presencia de β -feniletilamina en exceso) a diferentes valores de pH. a)pH=7.5, b)pH=10.5, c)pH=14.0. NQS 6.4×10^{-4} M. Calefacción a la temperatura 70°C durante 30 minutos.

FIGURA 13. Variación de la absorbancia en función del tiempo, de una disolución acuosa de reactivo en presencia de exceso de amina (β -feniletilamina) trabajando en diferentes condiciones de pH. a)pH=14.0, b)pH=7.5 NQS= 6.4×10^{-4} M, β -feniletilamina 1g/L.

FIGURA 14. Espectros de los extractos A)acuosos del reactivo B) orgánicos del reactivo C) acuosos de reactivo en presencia de amina y D)clorofórmicos del reactivo en presencia de exceso de amina en diferentes condiciones de pH. a)pH=7.5, b) pH=10.5, c)pH=14. NQS 6.4×10^{-4} M β -feniletilamina 1 g/L.

FIGURA 15. Variación de la señal analítica a 450 nm correspondiente al producto de reacción en la fase orgánica en función del pH. a) NQS, b) efedrina, c) anfetamina, d) metanfetamina, e) β -feniletilamina. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración de analito en la muestra 20 mg/L.

FIGURA 16. Variación de la señal analítica del reactivo en la fase orgánica en función del tiempo y de la temperatura de calefacción. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, pH=7.5. Temperatura 60, 70, 80 y 100 °C.

FIGURA 17. Variación de la señal analítica del reactivo en la fase orgánica en función del tiempo y en diferentes medios de reacción. a) pH=10.0, b) pH=7.5 y c) pH=8.4. NQS= $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, 70 °C 30 minutos. Extracción del producto de reacción con CHCl_3 .

FIGURA 18. Extractos acuosos del reactivo cuando la disolución ha sido sometida a diferentes tiempos de calefacción. pH=7.5. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y calefacción a 70 °C durante 0, 30, 90 minutos.

FIGURA 19. Extractos acuosos del reactivo cuando la disolución ha sido sometida a diferentes tiempos de calefacción pH=8.4. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y calefacción a 70 °C durante 30, 90 minutos.

FIGURA 20. Extractos acuosos del reactivo cuando la disolución ha sido sometida a diferentes tiempos de calefacción pH 10.0. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y calefacción a 70 °C durante 30, 90 minutos.

FIGURA 21. Variación de señal analítica del producto de reacción en la fase orgánica de los diferentes analitos en función del tiempo de calefacción de la muestra a diferentes temperaturas. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración de los analitos en la muestra 20 mg/L, en medio tampón fosfato pH=7.5.

FIGURA 22. Variación de señal analítica del producto de reacción en la fase orgánica de los diferentes analitos en función del tiempo de calefacción de la muestra a diferentes temperaturas. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración de los analitos en la muestra 20.0 $\mu\text{g/mL}$, en medio tampón bicarbonato pH=10.0. A y B) Reactivo, (C y D) anfetamina y metanfetamina, respectivamente.

FIGURA 23. Variación de la señal analítica en función del tiempo de agitación utilizado en la realización de la extracción del producto de reacción, correspondiente a) al reactivo, b) al reactivo en presencia de analito, c) correspondiente al reactivo en presencia de analito medido frente blanco reactivo. Temperatura 70°C durante 30 minutos, extraído en CHCl_3 , NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración de β -feniletilamina 20 mg/L.

FIGURA 24. Espectros de absorción de los productos del reactivo en distintos disolventes orgánicos. a) n-hexano:acetato de etilo (1:1), b) cloroformo, c) acetato de etilo, d) alcohol isoamílico. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$. A) condiciones de pH=7.5, B) condiciones de pH=10.0.

FIGURA 25. Espectros de absorción correspondientes a los productos de reacción en los distintos disolventes orgánicos. a) n-hexano:acetato de etilo (1:1), b) cloroformo, c) acetato de etilo, d) alcohol isoamílico. A) Anfetamina 16.8 $\mu\text{g/mL}$ (pH 7.5), B) Metanfetamina 35.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), anfetamina 20.0 $\mu\text{g/mL}$ (pH 10.0), C) Efedrina 10.0 $\mu\text{g/mL}$ (pH 7.5). NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$.

FIGURA 26. Variación de la absorbancia correspondiente a los extractos orgánicos en función de la concentración de reactivo, utilizando como disolvente de extracción A) cloroformo, B) alcohol isomílico.

FIGURA 27. Variación de la señal analítica correspondiente a los productos de reacción amina-NQS en función de la relación entre la concentración de reactivo y analito presente en la muestra. Concentración de reactivo entre 2.56×10^{-4} - $2.56 \times 10^{-2} \text{M}$, 4A) Anfetamina 20 $\mu\text{g/mL}$ y 6.8 $\mu\text{g/mL}$, 4B) metanfetamina 20.0 $\mu\text{g/mL}$ y 6.8 $\mu\text{g/mL}$, 4C) efedrina 16.6 $\mu\text{g/mL}$.

FIGURA 28. Diferentes situaciones en las que la aplicación del método del HPSAM nos lleva a: (A) Las ordenadas en el origen correspondientes a las curvas de calibrado a λ_1 y λ_2 (blanco interno) y el valor correspondiente al blanco externo son coincidentes. (B) Los valores de las O.O a λ_1 y λ_2 son coincidentes entre si pero son diferentes al valor del blanco externo. (C) Las O.O obtenidas a λ_1 y λ_2 son diferentes entre si y diferentes al blanco externo.

FIGURA 29. (A) Espectro correspondiente al blanco reactivo(1), y reactivo en presencia de 9.6 $\mu\text{g/mL}$ de dl-metanfetamina (2). (B) Espectro del blanco reactivo (1) y del reactivo en presencia de 8.66 $\mu\text{g/mL}$ de d-metanfetamina (2). (C) Espectro del blanco reactivo (1) y del blanco reactivo en presencia de 8.66 $\mu\text{g/mL}$ de dl-anfetamina.

FIGURA 30. (A) Representación de los blancos interno y externo correspondientes a la curva de calibrado de dl-metanfetamina utilizando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción en cloroformo. (B) Cociente entre el blanco interno y el blanco externo.

FIGURA 31. (A) Curvas de calibrado de dl-metanfetamina siendo la señal analítica el valor de absorbancia(1) a 382 nm medido frente a blanco disolvente.(2) a 434 nm registrada frente a blanco disolvente.(3) a 464 nm registrada frente a blanco reactivo.(4) ΔA (434-382 nm). Las ecuaciones correspondientes se muestran en la Tabla 6. (B) Representación de los residuales (valores absolutos) vs concentración de d-metanfetamina, \circ ΔA (426-396 nm), \square absorbancia a 464 nm medida frente blanco reactivo.

FIGURA 32.(A) Representación de los blancos interno y externo correspondientes a una curva de calibrado de d-metanfetamina utilizando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción en cloroformo. (B) Cociente entre el blanco interno y externo.

FIGURA 33.(A) Curvas de calibrado de d-metanfetamina, siendo la señal analítica el valor de absorbancia (1) a 396 nm medido frente a blanco disolvente. (2) a 426 nm registrada frente a blanco disolvente. (3) a 464 nm registrada frente a blanco reactivo. (4) ΔA (426-396 nm). Las ecuaciones correspondientes se muestran en la Tabla 7. (B) Representación de los residuales (valores absolutos) vs concentración de d-metanfetamina, \circ ΔA (426-396nm), \square absorbancia a 464 nm medida frente blanco reactivo.

FIGURA 34. (A) Representación de los blancos interno y externo correspondientes a la curva de calibrado de dl-anfetamina utilizando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción en cloroformo. (B) Cociente entre el blanco interno y el externo.

FIGURA 35.(A) Curvas de calibrado dl-anfetamina. (1) a 394 nm medido frente a blanco disolvente. (2) a 432 nm registrada frente a blanco disolvente. (3) a 450 nm registrada frente a blanco disolvente reactivo. (4) ΔA (432-394 nm). Las ecuaciones correspondientes se muestran en la Tabla 8. (B) Representación de los residuales (valores absolutos) vs concentración de dl-anfetamina, \circ usando ΔA (432-394nm) como señal analítica, \square usando como señal el valor de absorbancia a 450 nm medida frente blanco reactivo.

FIGURA 36. (A y B) Equivalencia entre las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para el producto de reacción dl-anfetamina-(NQS)₂ en defecto (1) y exceso (2) de reactivo NQS. C) Espectros correspondientes a diferentes replicas de blanco reactivo.

FIGURA 37. Blancos de orina, medidos frente a blanco reactivo, para los distintos tipos de tratamientos de muestra ensayados. a) Utilización directa $V = 1.0 \text{ mL}$, b) Con precipitación de los componentes endógenos $V = 1.0 \text{ mL}$, c) Con extracción sólido-líquido $V = 2.0 \text{ mL}$, d) Con extracción líquido-líquido (3 extracciones) $V = 5.0 \text{ mL}$. Cond: NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{ M}$, temp. 70°C 30 min $\text{pH} = 7.5$.

FIGURA 38. Representación de la absorbancia a 450 nm vs concentración de anfetamina, cuando la muestra ha sido procesada con distintos tipos de tratamiento. A) Sin restar el blanco de orina B) restando el blanco de orina. Con precipitación de los componentes endógenos a) NQS 0.5%, b) NQS 1.0% , c) con extracción líquido-líquido 3 veces consecutivas. Condiciones NQS 6.4×10^{-3} M, temp. 70 °C 30 min.

FIGURA 39. Espectros de absorción del blanco orina (medido frente blanco disolvente) utilizando distintos disolventes de extracción del producto de reacción a) n-hexano:acetato de etilo (1:1), b) cloroformo, c) acetato de etilo, d) alcohol isoamílico. Las muestras de orina han sido previamente extraídas con n-hexano (3 extracciones). Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, pH 7.5, Temp.70°C, 30 min., A) NQS, B) NQS-anfetamina 15.8 mg/L. pH 10.0, Temp. 45°C, 5 min., C) NQS, D) NQS-anfetamina 12.9 mg/L y NQS-metanfetamina (1) 12.9 mg/L.

FIGURA 40. (A) y (B) representación de los blancos internos y externos para dos calibrados de anfetamina en muestras de orina.(C) Cociente entre el blanco interno y externo para dos réplicas ensayadas.

FIGURA 41. Representación de la variación de la absorbancia (450 nm) en función del volumen de muestra, para muestra en presencia y ausencia de amina A)anfetamina, B)metanfetamina. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, A) Temp.70°C, 30 min. tampón pH 7.5, B) Temp.45°C, 5 min., tampón pH 10.0. Extracción de la orina con n-hexano y el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1).

FIGURA 42. Representación de la variación de la absorbancia (450 nm) en función de cantidad de analito añadido en la muestra/ cantidad de muestra. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, Temp.70°C, 30 min. tampón pH 7.5, Extracción de la orina con n-hexano y el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1).

FIGURA 43. Representación del método de adición estándar del punto H.

FIGURA 44. Representaciones A vs λ para X e Y en presencia de TYB.

FIGURA 45. Espectro de absorción UV-V del producto de reacción a) anfetamina-NQS y b) metanfetamina-NQS.

FIGURA 46. Representación del HPSAM para mezclas anfetamina/metanfetamina, estando anfetamina como analito.

FIGURA 47. Representación del HPSAM para mezclas anfetamina/metanfetamina, estando metanfetamina como analito.

FIGURA 48. Espectro de absorción del NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$ b) efedrina 20 $\mu\text{g/mL}$. NQS 6.4×10^{-3} M, pH=10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min.(espectros medidos frente blanco reactivo).

FIGURA 49. Variación de la velocidad de reacción en función del pH del medio. A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. NQS 6.4×10^{-3} M, pH=10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a λ 490 nm. (medidos frente blanco reactivo).

FIGURA 50. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de tampón carbonato/bicarbonato. A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$.NQS 6.4×10^{-3} M, pH=10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a λ 490 nm. (medidos frente blanco reactivo).

FIGURA 51. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de Triton X-100. A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{pH} = 10.5$, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490\text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

FIGURA 52. Variación de la velocidad de reacción en función de la temperatura. A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{pH} = 10.5$, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490\text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

FIGURA 53. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de NQS. A) Reactivo NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. $\text{pH} = 10.5$, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490\text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

FIGURA 54. Variación de la señal analítica ΔA vs volumen de muestra. a) frente a blanco medio de reacción, b) frente a blanco reactivo. Condiciones: NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, NaHCO_3 0.1M, $\text{pH} 10.5$, triton X-100 0.1%, Temperatura 45°C e intervalo de tiempo 45-180s a 490 nm .

FIGURA 55. Cromatograma correspondiente a los productos de reacción amina-NQS. Utilizando un columna LiChrospher Si-60 $5\mu\text{m}$ $250 \times 4\text{ mm D.I.}$ Fase móvil: Cloroformo:acetato de etilo:n-hexano:etanol A)(15:12:58:15) B)(22:32:45:1) (1: anfetamina, 2: metanfetamina, 3: β -feniletilamina).

FIGURA 56. Espectros de absorción UV-V de los productos de reacción separados mediante CLAR.

FIGURA 57. Cromatograma correspondiente a los productos de reacción amina-NQS utilizando una columna C18. (1: anfetamina, 2: metanfetamina, 3: β -feniletilamina, 4: efedrina.).

FIGURA 58. Cromatograma correspondiente a los productos de reacción amina-NQS utilizando CLAR en fase normal (LiChrosfer Si 60 $5\mu\text{m}$, $125 \times 4\text{ mm D.I.}$), en las condiciones descritas en la Tabla 32.

FIGURA 59. Cromatogramas obtenidos para blancos de orina y para muestras de orina con analitos con extracción líquido-líquido.

FIGURA 60. Cromatogramas obtenidos para A) blancos de orina, B) muestras de orina con analitos con las diferentes columnas de extracción en fase sólida.

FIGURA 61. Cromatogramas obtenidos a distintos valores de pH de la orina, extracción en columnas C18 y utilizando MeOH como disolvente de elución. A) blancos de orina, B) muestras de orina con analitos.

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Estructura de algunos estimulantes.

TABLA 2. Ejemplos de sustancias estimulantes de las que anfetamina es uno de los metabolitos.

TABLA 3. Propiedades analíticas de los diferentes métodos propuestos para el análisis de anfetamina y metanfetamina por espectrofotometría UV-V.

TABLA 4. Propiedades analíticas de los diferentes métodos propuestos para el análisis de anfetamina y metanfetamina por CLAR.

TABLA 5. Propiedades analíticas de los diferentes procedimientos que han empleado el reactivo NQS como agente de derivatización de aminas, A) utilizando espectrofotometría UV-V, B) haciendo uso de la cromatografía líquida de alta resolución CLAR.

TABLA 6. Parámetros analíticos correspondientes a dl-metanfetamina en presencia de NQS. $a \pm s_a$ representa el valor de la ordenada y su desviación típica(100), $b \pm s_b$ corresponde a la pendiente y su desviación típica en ppm, r es el coeficiente de correlación, $t_{calc} = b/S_b$ es el valor del estadístico usado para un test lineal y n representa el número de puntos utilizados en el trazado de la recta.

TABLA 7. Parámetros analíticos correspondientes a d-metanfetamina en presencia de NQS. $a \pm s_a$ representa el valor de la ordenada y su desviación típica, $b \pm s_b$ corresponde a la pendiente y su desviación típica en ppm, r es el coeficiente de correlación, $t_{calc} = b/S_b$ es el valor del estadístico usado para un test lineal y n representa el número de puntos utilizados en el trazado de la recta.

TABLA 8. Parámetros analíticos correspondientes a dl-anfetamina en presencia de NQS. $a \pm s_a$ representa el valor de la ordenada y su desviación típica, $b \pm s_b$ corresponde a la pendiente y su desviación típica en ppm, r es el coeficiente de correlación, $t_{calc} = b/S_b$ es el valor del estadístico usado para un test lineal y n representa el número de puntos utilizados en el trazado de la recta.

TABLA 9. Parámetros analíticos del producto de reacción anfetamina-NQS usando diferentes disolventes orgánicos para la extracción. A) anfetamina, B) metanfetamina C) efedrina.

TABLA 10. Porcentajes de recuperación de anfetamina y metanfetamina utilizando distintos tipos de columnas de extracción en fase sólida.

TABLA 11. Porcentajes de recuperación obtenidos para anfetamina y metanfetamina utilizando varios tratamientos preliminares de muestra.

TABLA 12. Concentración de A) anfetamina (pH 7.5 y pH 10) o B) metanfetamina encontrada en diferentes muestras de orina tomando volúmenes diferentes y mediante la aplicación del método de adición estándar. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M. Las muestras de orina fueron extraídas dos veces consecutivas con n-hexano, (*) extracción con n-hexano tres veces consecutivas, (**) Muestras de orina con anfetamina ensayadas en condiciones de pH 10.0, 45°C y 5 minutos.

TABLA 13. Concentración de A) anfetamina (pH 7.5 y pH 10) B) metanfetamina encontrada en diferentes muestras de orina tomando volúmenes diferentes y mediante la aplicación de la curva de calibrado con patrones. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). Las muestras de orina han sido extraídas dos veces consecutivas con n-hexano, (*) extracción con n-hexano tres veces consecutivas. (**) Muestras de orina con anfetamina ensayadas en condiciones de pH 10, 45°C y 5 minutos.

TABLA 14. Concentración de A) anfetamina (pH 7.5 y pH 10) y B) metanfetamina encontrada en diferentes muestras de orina tomando volúmenes diferentes y mediante la aplicación de la ecuación 4. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). Las muestras de orina han sido extraídas dos veces consecutivas con n-hexano, (*) extracción con n-hexano tres veces consecutivas, (**) Muestras de orina con anfetamina ensayadas en condiciones de pH 10, 45°C y 5 minutos.

TABLA 15. Concentración de metanfetamina en presencia de anfetamina, mediante la aplicación del método de adición estándar, para distintas relaciones anfetamina/metanfetamina en muestras sintéticas y en muestras reales (MA=metanfetamina, AN=anfetamina).

TABLA 16. Concentración de anfetamina, metanfetamina y metanfetamina en presencia de anfetamina, en muestras de orina. Condiciones: pH 10, (*) pH 7.5.

TABLA 17. Esquema del procedimiento de determinación de anfetamina o metanfetamina en muestras de orina mediante reacción con NQS.

TABLA 18. Resultados obtenidos por el HPSAM en la determinación de muestras sintéticas de metanfetamina y anfetamina a diferentes pares de longitudes de onda. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 10.0, calentando la muestra durante 5 min. a la temperatura de 45 °C y extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). ^{a,b} valores de concentración del interferente a las dos longitudes de onda empleadas en el HPSAM mediante la sustitución en la curva de calibrado con patrones.

TABLA 19. Valores medios de absorbancia obtenidos para diferentes muestras de orina (n=16) a diferentes longitudes de onda.

TABLA 20. Resultados obtenidos en la determinación de metanfetamina y anfetamina en muestras de orina mediante la aplicación del HPSAM a diferentes pares de longitudes de onda. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 10.0, calentando la muestra durante 5 min. a la temperatura de 45 °C y extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). ^{a,b} valores de concentración del interferente a las dos longitudes de onda empleadas en el HPSAM mediante la sustitución en la curva de calibrado con patrones.

TABLA 21. Resultados obtenidos en la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina mediante la aplicación de la ecuación 14. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 10.0, calentando la muestra durante 5 min. a la temperatura de 45 °C y extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). ^{a,b} valores de concentración del interferente a las dos longitudes de onda empleadas en el HPSAM mediante la sustitución en la curva de calibrado con patrones. (* MA=metanfetamina, AN=anfetamina).

TABLA 22. Concentración de clorhidrato de efedrina determinada en disoluciones oculares, mediante la sustitución directa en la curva de calibrado convencional y la derivada correspondiente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción. (*) Tomados a partir de una disolución diluida (1:10). (**) Según la referencia del fabricante.

TABLA 23. Concentración de clorhidrato de efedrina en soluciones nasales (cilinafosol) (mg/L), mediante la aplicación del método de adición estándar a 468nm y mediante el método de la primera derivada a 526 nm. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. (*) corresponde al volumen de muestra tomado después de la dilución del preparado farmacéutico.

TABLA 24. Concentración de Efedrina determinada en preparados farmacéuticos en forma de comprimidos mediante la aplicación del método de adición estándar y la primera derivada correspondiente, a las λ 468 nm y 526 nm, respectivamente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. a = Difilina Asmorax, b = Dexabronquisan, c = Tedral y Tedral Acción Sostenida (*).(**) Volumen de muestra tomado después de haber diluido el preparado farmacéutico.

TABLA 25. Concentración de Efedrina (EP) determinada en preparados farmacéuticos en forma de comprimidos mediante el calibrado convencional, el calibrado convencional de la primera derivada, la aplicación del método de adición estándar y la primera derivada correspondiente, a las λ 468 nm y 526 nm, respectivamente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón fosfato pH = 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. a = Difilina Asmorax, b = Dexabronquisan, c = Tedral y Tedral Acción Sostenida (*).(**) Volumen de muestra tomado después de haber diluido el preparado farmacéutico.

TABLA 26. Comparación entre las concentraciones obtenidas para distintos preparados farmacéuticos y las indicadas por el fabricante. (mg/ por comprimido).

TABLA 27. Determinación de la concentración de clorhidrato de Efedrina en jarabe (Pazbronquial) mediante el calibrado convencional y la primera derivada correspondiente, a las λ 468 nm y 526 nm, respectivamente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. (*) Volumen de muestra tomado después de haber diluido el preparado farmacéutico (**) 1 mL diluido a 10 mL. (**) 5 mL diluidos a 50 mL.

TABLA 28. Velocidad de reacción e incrementos de absorbancia a diferentes intervalos de tiempo (s), para el NQS β -feniletamina 20 μ g/mL y efedrina 20 μ g/mL. NQS 6.4×10^{-3} M, pH = 10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. (* medidos frente blanco reactivo).

TABLA 29. Orden de reacción para los distintos analitos y el NQS. NQS 6.4×10^{-3} M, pH = 10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a λ 490 nm. (medidos frente blanco reactivo).

TABLA 30. Características analíticas de la reacción entre el NQS y β -feniletamina (BFN), Efedrina (EFE), dl-metanfetamina (dl-MET), d-metamfetamina (d-MET), d-anfetamina (d-AMP) y dl-anfetamina (dl-AMP). Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, NaHCO₃ 0.1M, pH 10.5, triton X-100 0.1%, Temperatura 45°C e intervalo de tiempo 45-180s a 490 nm. (I.D = Intervalo dinámico, C.R. = coeficiente de regresión, C_{LD} = límite de detección.)

TABLA 31. Resultados de concentración obtenidos en preparados farmacéuticos (Centramina y mirazul). Aplicando el MOSA y la curva de calibrado con patrones. (ANF = anfetamina, EFE = efedrina). (*) Correspondiente a las muestras de colirio para la determinación de clorhidrato de efedrina.

TABLA 32. Condiciones cromatográficas.

TABLA 33. Parámetros analíticos correspondientes a los productos de reacción amina-NQS. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, medio bicarbonato 0.26%, calefacción 20 min. 70°C. Extraídos en cloroformo.

TABLA 34. Eficiencias de la extracción líquido-líquido.

TABLA 35. Eficiencias de la extracción en fase sólida.

TABLA 36. Porcentajes de recuperación obtenidos distintos eluyentes A) MeOH, B) cloroformo:isopropanol (3:1). (BFN: β -feniletilamina, MET:metanfetamina, ANF:anfetamina).

TABLA 37. Concentraciones de anfetamina, metanfetamina y β -feniletilamina obtenidos en muestras de orina. Elución A) con MeOH, B) cloroformo:isopropanol (3:1). (BFN: β -feniletilamina, MET:metanfetamina, ANF:anfetamina).

TABLA 38. Concentración de anfetamina y metanfetamina encontrada en muestras de orina mediante la utilización o no de S.I.

TABLA 39. Resumen de las aplicaciones de determinación de aminas con NQS.

3.3.- ESTUDIO DE VARIABLES DE REACCION ENTRE FENILAMINAS Y 1,2-Naftoquinona 4-Sulfonato

De la bibliografía sobre el tema que viene reflejada en el apartado de antecedentes de la presente memoria se deriva que la reacción viene influenciada principalmente por tres variables pH, temperatura y tiempo de calefacción. Sin embargo, no es clara la coincidencia al respecto de los autores que han investigado el tema. Por otra parte también queda implícito el uso de diferentes procedimientos para la eliminación o atenuación de la posible absorbancia introducida por el reactivo en la absorbancia total registrada, si bien el más generalizado es la extracción de los productos de reacción con un disolvente orgánico. Teniendo en cuenta estas consideraciones se planteó el estudio de las diferentes variables que parecen en principio influir sobre el desarrollo de la reacción planteada o sobre el propio reactivo.

3.3.1.- Influencia del pH

Procedimiento experimental

Se tomó un volumen constante (0.3 mL) de una disolución patrón de analito (200 $\mu\text{g/mL}$) (o agua destilada en el caso del blanco reactivo) al que se añadió 1 mL de tampón, agua destilada y 1 mL de reactivo NQS (0.02 % o 0.05 %) siendo el volumen final 3.0 mL. Los tampones utilizados han sido acético/acetato (pH=5.0), dihidrogenofosfato /monohidrogenofosfato (pH=7.5), y bicarbonato/carbonato (pH=10.5). También se ha empleado bicarbonato 8% (pH=8.4) y HCl de 0.001 M (pH=3). La mezcla resultante se calentó, en su caso, a 70°C durante 30 minutos, siendo después enfriada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción en cloroformo (utilizando el mismo volumen que el de mezcla 3 mL), agitándose mecánicamente durante 2 minutos y centrifugando 5 minutos. Finalmente, se separaron ambas fases, registrándose la señal analítica (Absorbancia) entre 190-820 nm del extracto orgánico. Las absorbancias fueron medidas frente a blanco reactivo (para las muestras con analito) o frente blanco tampón (para las disoluciones de reactivo) a la temperatura de 25 °C. En todos los casos se realizaron tres replicas de cada disolución. En relación al extracto acuoso, se tomaron 0.1 mL de la disolución a los que se añadieron 1 mL de tampón y agua destilada hasta completar un volumen de 2.5 mL, obteniéndose los espectros frente a blanco reactivo o tampón. Para la realización de los estudios cinéticos en disolución acuosa, se partió de un volumen constante (0.2 mL) de analito (12 g/L) (o agua destilada en el caso del blanco reactivo) al que se

adicionó 1.0 mL de tampón, reactivo NQS (0.04%) y agua destilada hasta completar un volumen de 2.5 mL. La mezcla resultante se calentó durante 30 min. a la temperatura de 70 °C, registrándose la variación de la absorbancia en función del tiempo cada 45 s en el intervalo de longitudes de onda 190-820 nm. Finalmente 2 mL de la disolución resultante fueron extraídos con 2 mL de CHCl_3 realizándose las medidas de los extractos orgánico/acuoso.

Resultados y discusión

Se ensayó el comportamiento del reactivo en diferentes medios de acidez, en disolución acuosa y a temperatura ambiente, observándose que los espectros correspondientes son iguales entre si independientemente del medio, con máximos de absorción a 220, 252, y 366 nm (Figura 6). No obstante, la estabilidad del reactivo es función del medio de reacción, siendo más estable a pH cercanos a la neutralidad y aumentando la inestabilidad tanto hacia pH ácidos como básicos.

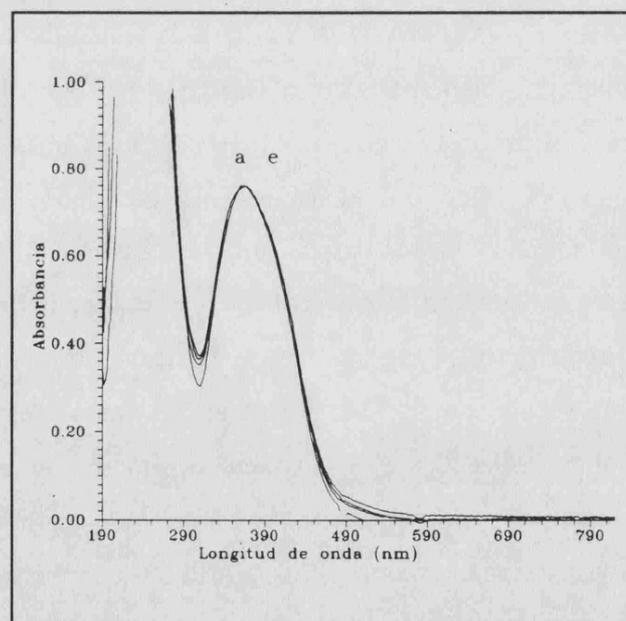


FIGURA 6. Espectro del reactivo en disolución acuosa a diferentes valores de pH. a)pH= 3.0, b)pH=5.0, c)pH=7.5, d)pH=8.4, e)pH=10.5. NQS: 2.5×10^{-4} M, temperatura ambiente.

Las 1,2-naftoquinonas muestran un máximo de absorción cerca de 250 nm y bandas de intensidad intermedia cerca de 340 y 400 nm. Bandas a longitudes de onda mayores de 500 nm sólo son observables en disolventes apolares. La sustitución en el anillo quinoideo tiene relativamente poco efecto en el espectro mientras que la sustitución en el anillo benzoico produce cambios acusados en el mismo, que dependen de la posición de sustitución.

Según la bibliografía (96), 1,2-naftoquinona en medio cloroformo tiene un espectro de absorción UV-V con máximos a 255, 343 y 406 nm. La sal del mismo (1,2-naftoquinona 4-sulfonato sódico) es insoluble en cloroformo, siendo soluble en disolución acuosa. Independientemente del medio y a temperatura ambiente (25°C), la presencia de amina en la disolución acuosa no modifica el espectro del reactivo (Figura 7).

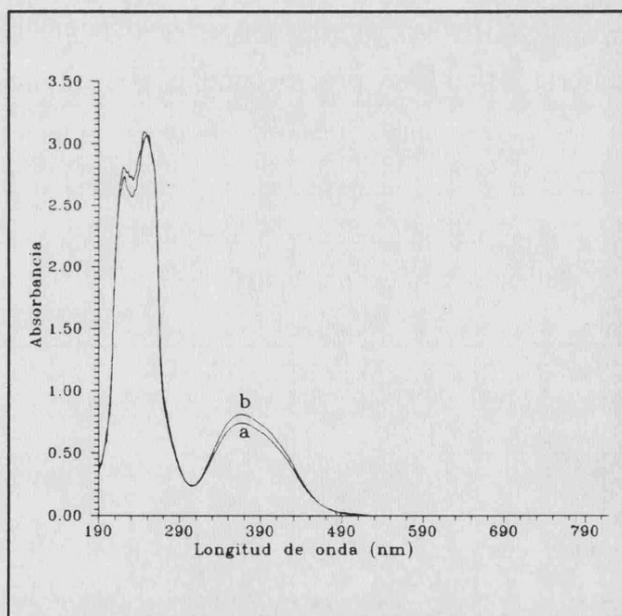
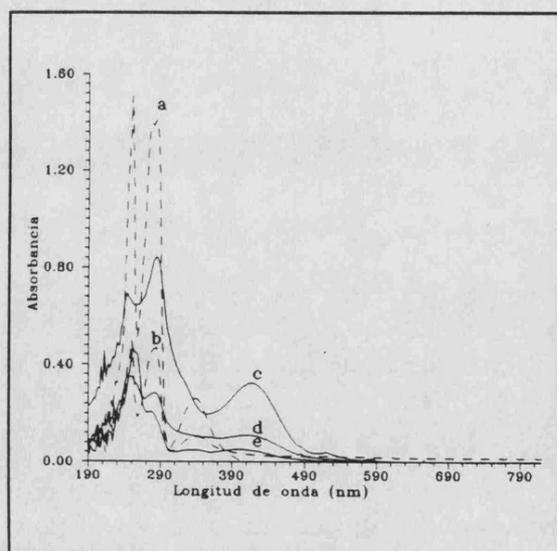


FIGURA 7. Espectros en disolución acuosa a) del reactivo (NQS), b) del reactivo en presencia de amina en medio bicarbonato pH=8.4. NQS: 2.5×10^{-4} M, β -feniletilamina: 20.0 mg/L.

De acuerdo con la bibliografía para la determinación de aminas mediante su reacción con NQS se requiere que la muestra sea sometida a calefacción con posterior extracción del producto de reacción con un disolvente orgánico. Cuando la disolución de NQS, previamente calentada a 70°C durante 30 minutos (condiciones más extendidas en la bibliografía), fue

sometida a extracción con cloroformo, los espectros correspondientes a los extractos orgánico y acuoso, fueron diferentes dependiendo del pH inicial de la disolución. Como puede observarse en la Figura 8, los espectros de los extractos orgánicos cuando el medio de reacción es ácido son similares entre si, y distintos a los obtenidos en medio básico que a su vez también presentan idéntica posición de sus máximos de absorción. Del mismo modo, la cantidad de sustancia/s extraída/s es dependiente del pH, tal que cuanto más ácido es el medio mayor cantidad de producto se extrae, sin embargo en medio básico el valor máximo corresponde a pH 8.4. Los extractos acuosos presentan diferentes máximos de absorción para todos los pH ensayados (Figura 8). A pH 7.5 el espectro corresponde al registrado en disolución acuosa a temperatura ambiente (Figura 6) modificándose a medida que aumenta el pH. Estos resultados parecen mostrar que el reactivo presenta un comportamiento diferente en función del pH y que dependiendo del mismo la cantidad de producto extraído en la fase orgánica es distinta, lo que puede indicar en principio una evolución del reactivo que no está justificada por un equilibrio ácido-base propio, puesto que en disolución acuosa y a temperatura ambiente el reactivo presenta el mismo espectro en el intervalo de pH ensayado (Figura 6).

A)



B)

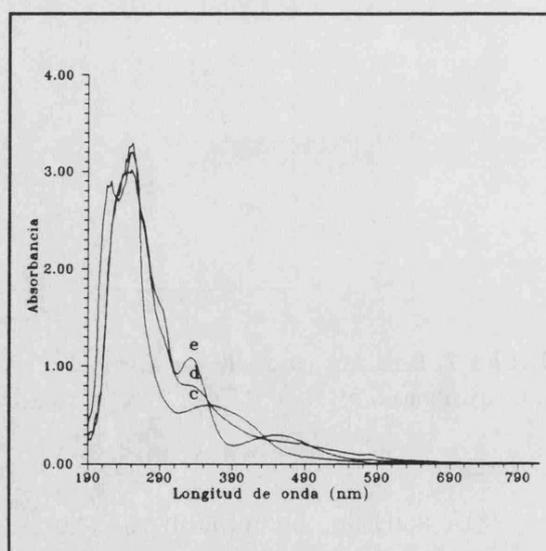


FIGURA 8. Espectros del reactivo correspondientes a A) los extractos clorofórmicos y B) acuosos obtenidos tras un proceso de calefacción a 70°C durante 30 minutos en diferentes medios de pH. a) pH=3, b) pH=5, c) pH=7.5, d) pH=8.4, e) pH=10.5. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, temperatura ambiente.

Con el fin de estudiar si la reacción entre aminas y NQS era dependiente del pH del medio se adicionó β -feniletilamina. En condiciones de pH ácido (HCl, tampón acético/aceta-to) se observa que su presencia no modifica los espectros del reactivo obtenidos en los extractos clorofórmico y acuoso (Figura 9).

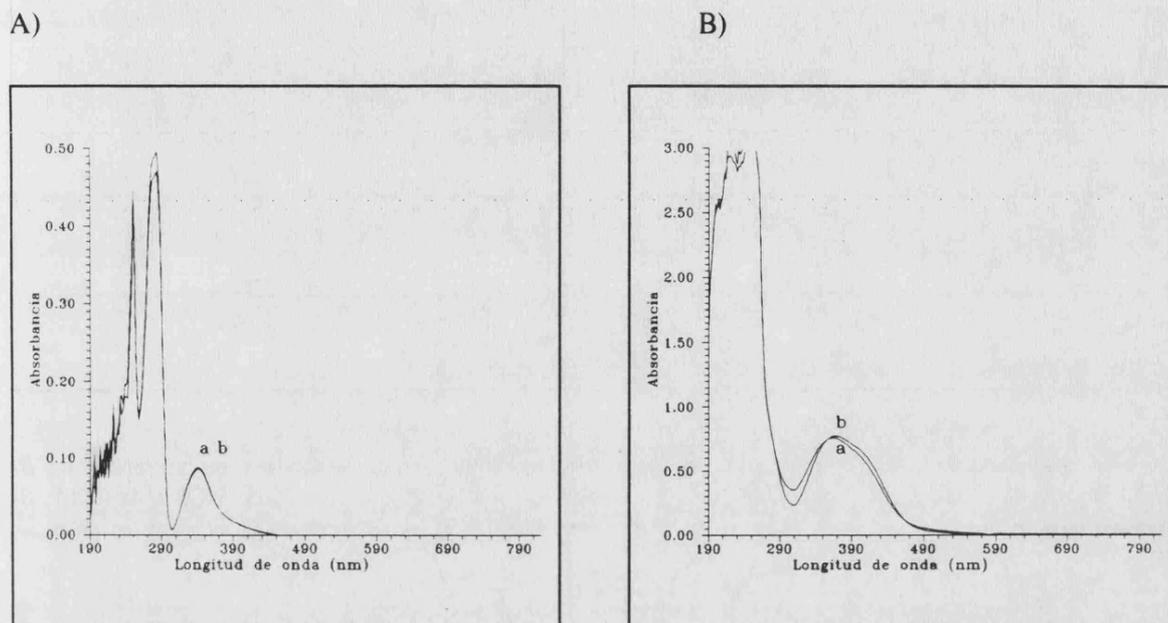


FIGURA 9. Espectros de A) los extractos clorofórmicos B) los extractos acuosos en medio ácido, correspondientes a) reactivo, b) reactivo en presencia de amina. NQS: 6.4×10^{-3} M, β -feniletilamina 20 mg/L.

Sin embargo, en medio básico pH 7.5, 8.4 y 10.5, los espectros correspondientes a los extractos clorofórmicos (Figura 10A) muestran un desplazamiento batocrómico sobre el máximo del reactivo localizado a 416 nm (Figura 8) situándose a 450 nm (máximo presentado por los productos de reacción caracterizados por Hashimoto y col. (69) y de estructura la mostrada en la página 21. Por lo tanto, para que se desarrolle la reacción el medio debe ser básico. Por el contrario los espectros de los extractos acuosos del reactivo (Figura 8) y amina-reactivo (Figura 10) se superponen lo que parece indicar que tanto la cantidad como la naturaleza del compuesto/s polar responsable de la absorbancia son semejantes o incluso iguales en presencia o ausencia de amina.

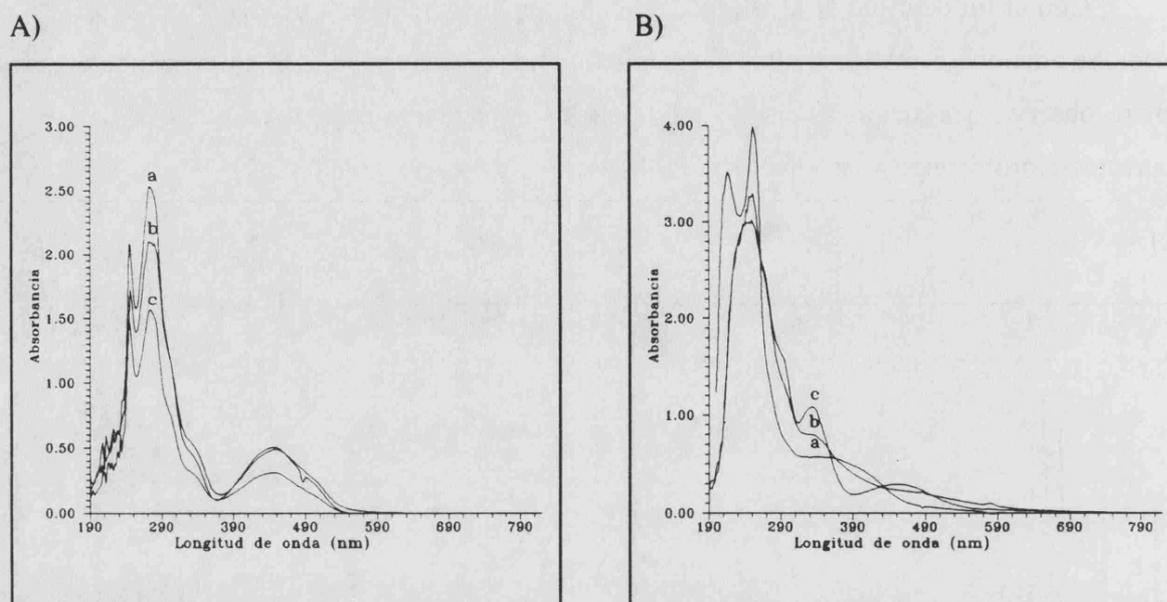


FIGURA 10. Espectros de A) los extractos clorofórmicos B) los extractos acuosos en presencia de β -feniletilamina bajo diferentes condiciones de pH. a) pH=7.5, b) pH=8.4, c) pH=10.5. NQS: 6.4×10^{-3} M, β -feniletilamina 20 mg/L.

Con el objeto de separar la reacción del propio reactivo y la de éste con amina se realizó una experiencia en la que el NQS se encontraba en defecto con respecto a la amina, desplazando por tanto esta última la reacción. Se siguió ésta en disolución acuosa y también se separaron los compuestos polares de los apolares vía extracción con cloroformo, registrándose los espectros de los extractos acuoso y orgánico. En la Figura 11 se muestra la variación de absorbancia vs la longitud de onda correspondiente al reactivo en tres medios y a tres pHs (a) 7.5, (b) 10.5, y (c) 14 con calefacción a 70°C durante 30 minutos. Como puede observarse, su evolución es mucho mayor en función del pH. Así a pH=7.5 el espectro del reactivo apenas se modifica con el tiempo (Figura 6). A pH=10.5, el NQS presenta a tiempos cortos el espectro correspondiente al reactivo evolucionando en función del tiempo y dando lugar a un espectro con máximos de absorción UV-V localizados a 332 y 450 nm. A pH=14, el reactivo muestra un espectro de absorción con máximo localizado a 332 nm.

Si la reacción de la amina con NQS se desplaza a consta de ésta (Figura 12) se observa que a los 3 pHs se parte inicialmente del espectro del reactivo en los diferentes medios. A pH 7.5 se observa la aparición de una especie con máximo de adsorción a 462 nm

que empieza a descomponerse a partir de los 800 seg (Figura 13 A). A pH 14 se mantiene este máximo apareciendo otro a 388 nm, lo que podría indicar en principio la presencia de otro producto de reacción que también se degrada con el tiempo (Figura 13 B). A pH 10.5 se observan ambos máximos de absorción.

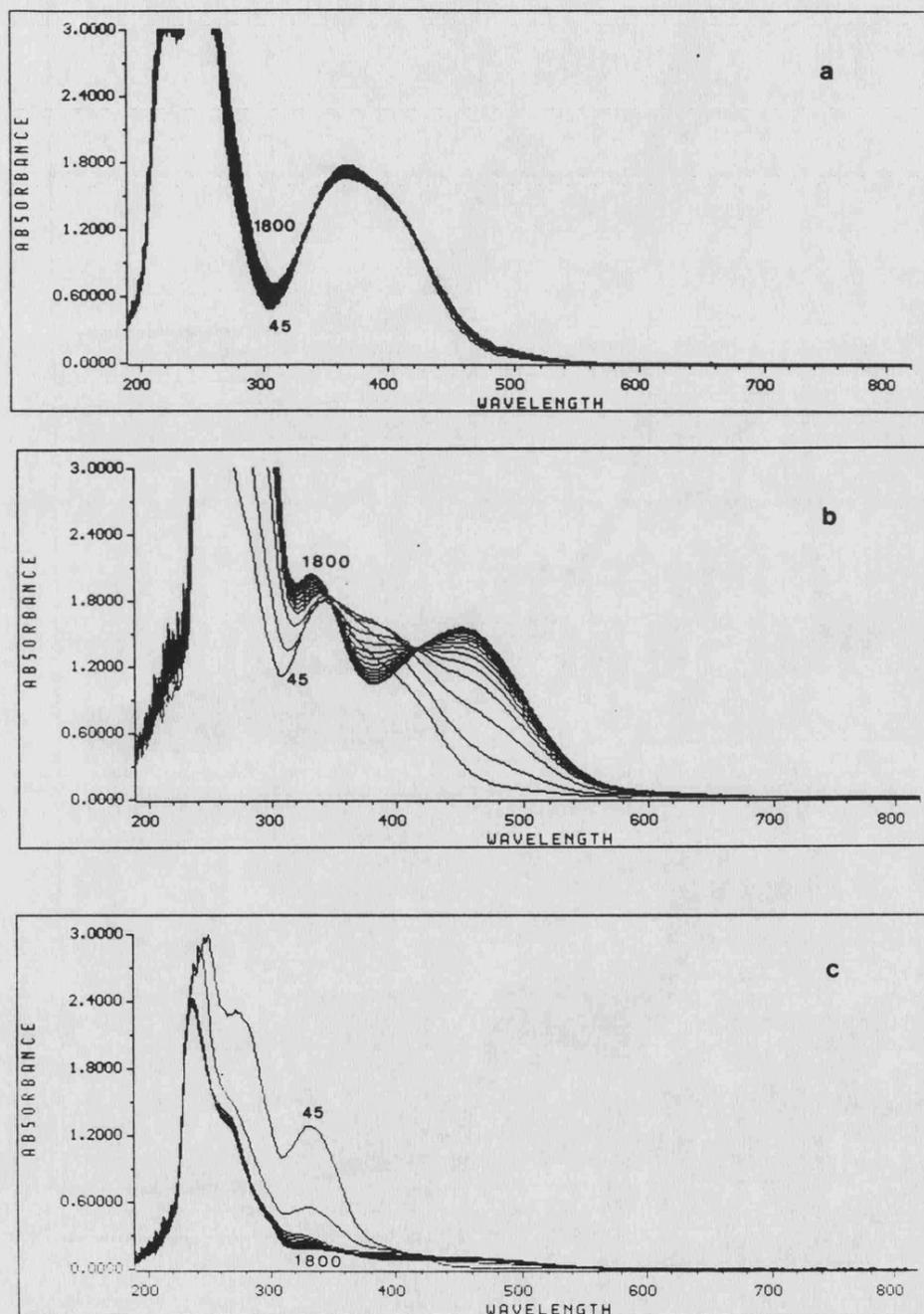


FIGURA 11. Variación de la absorbancia vs la longitud de onda de una disolución acuosa de reactivo(NQS) a diferentes valores de pH. a)pH=7.5, b)pH=10.5, c)pH=14.0. NQS 6.4×10^{-4} M. Calefacción a la temperatura 70°C durante 30 minutos.

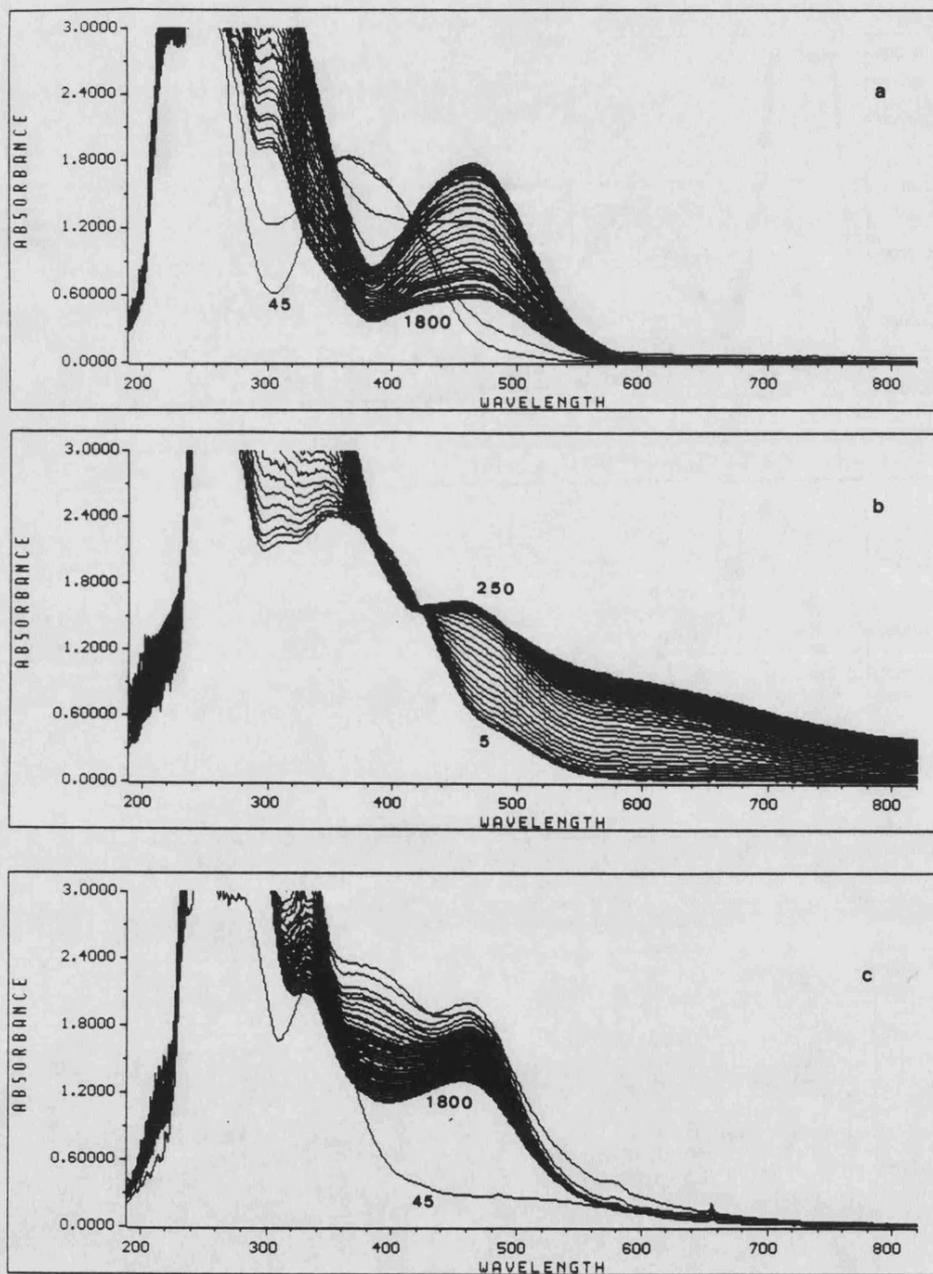


FIGURA 12. Variación de la absorbancia vs la longitud de onda de una disolución acuosa de reactivo(NQS) en presencia de β -feniletilamina en exceso) a diferentes valores de pH. a) pH = 7.5, b) pH = 10.5, c) pH = 14.0. NQS 6.4×10^{-4} M. Calefacción a la temperatura 70°C durante 30 minutos.

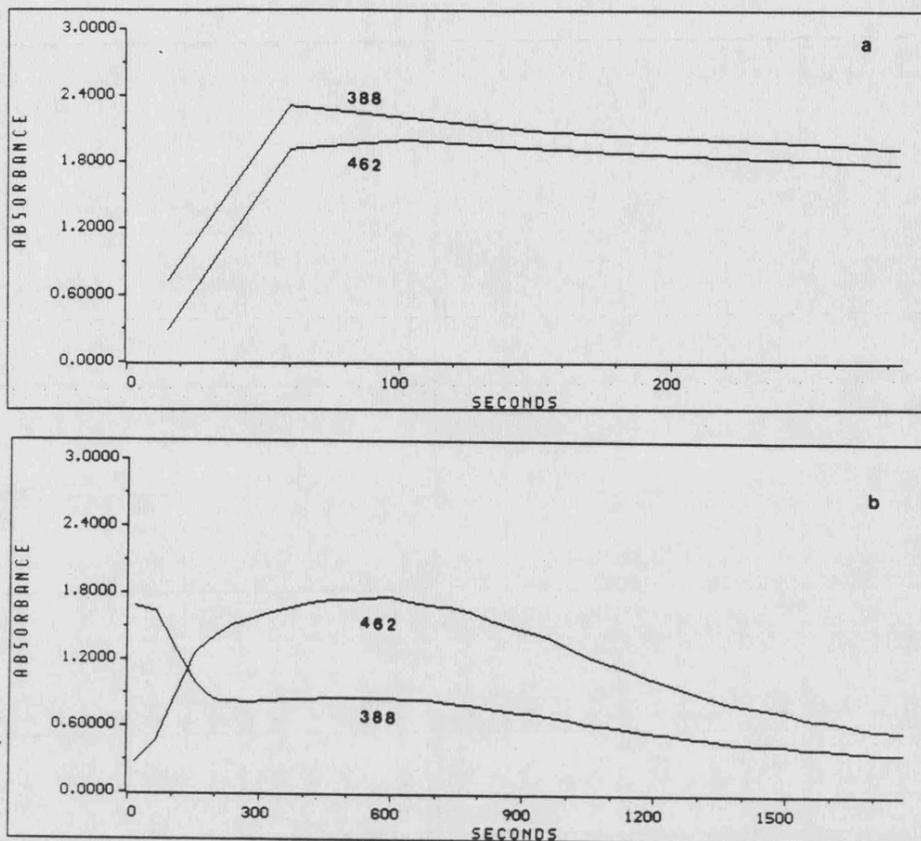
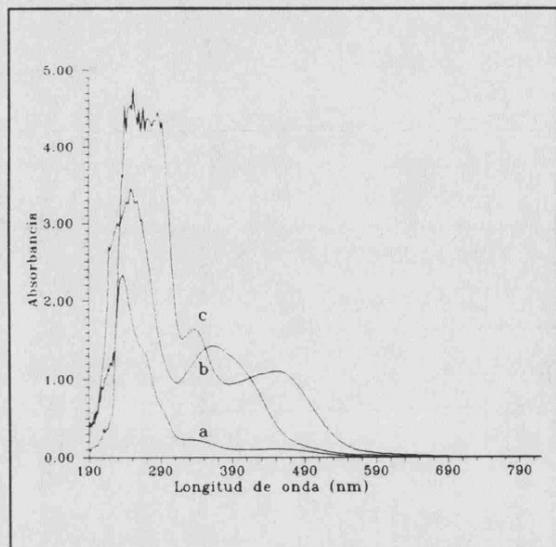


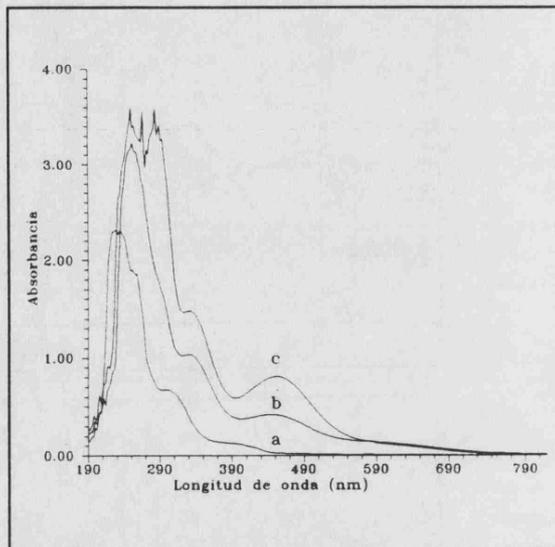
FIGURA 13. Variación de la absorbancia en función del tiempo, de una disolución acuosa de reactivo en presencia de exceso de amina (β -feniletilamina) trabajando en diferentes condiciones de pH. a) pH=14.0, b) pH=7.5 NQS = 6.4×10^{-4} M, β -feniletilamina 1g/L.

En la Figura 14 se muestran los espectros correspondientes a los extractos clorofórmico y acuosos del reactivo NQS y del producto de reacción NQS-amina en exceso de amina. En ambos casos, el porcentaje de extracción es menor a medida que aumenta el pH (Figura 14 B y 14 D). Los espectros de los extractos acuosos amina-NQS (Figura 14 C)) parecen indicar que el producto formado a pH 7.5 que presenta un máximo de absorción a 462 nm (Figura 12 C) se ha extraído totalmente en el disolvente orgánico (Figura 14 D), no existiendo ninguna especie en la fase acuosa que absorba a esta longitud de onda. A pH 10.5 la señal analítica obtenida en cloroformo es menor, por lo que en principio se podría derivar que en estas condiciones el compuesto buscado no se forma en su totalidad o se transforma en otra/s especies que a su vez presentan un máximo a 462 nm pero también a 350 nm (Figura 14 C y 12 B) que no se extraerían en cloroformo.

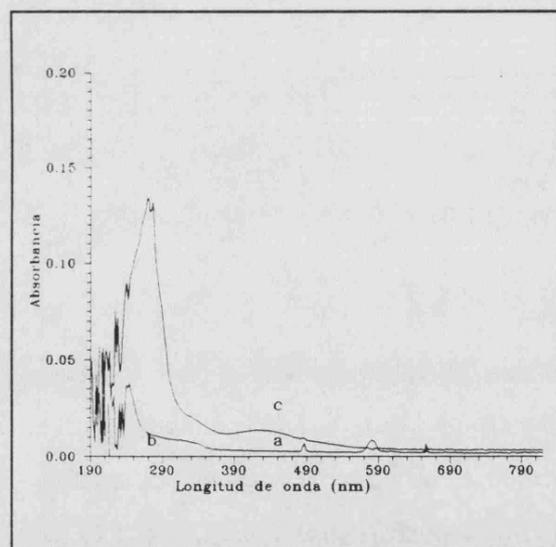
A)



C)



B)



D)

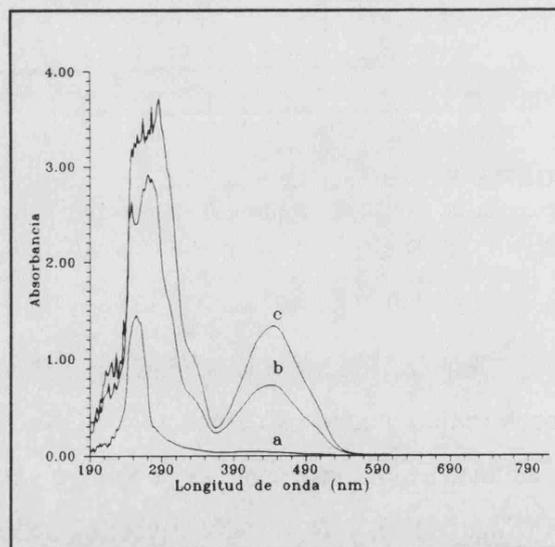


FIGURA 14. Espectros de los extractos A) acuosos del reactivo B) orgánicos del reactivo C) acuosos de reactivo en presencia de amina y D) clorofórmicos del reactivo en presencia de exceso de amina en diferentes condiciones de pH. a) pH=7.5, b) pH=10.5, c) pH=14. NQS $6.4 \times 10^{-4} \text{M}$ β -feniletilamina 1 g/L.

A pH 14.0 el espectro mostrado por el extracto acuoso (Figura 14 C) es igual al obtenido a pH 10.5 pero de mayor intensidad, viéndose que en el extracto orgánico (Figura 14 B) prácticamente no se encuentra el compuesto deseado. Si se comparan los espectros de

los extractos acuosos de NQS-amina en defecto (Figura 14B) y en exceso de NQS (Figura 10) se concluye que son diferentes, siendo estos últimos similares a los registrados por la propia evolución del reactivo (Figura 14 A o 8). Consecuentemente y dado el exceso de NQS sobre la amina presente en el medio habitualmente de trabajo probablemente se produzcan las dos reacciones si bien en los extractos acuosos se observa solo la del reactivo dada su mayor concentración sobre la amina.

El pH es una variable que afecta considerablemente a las naftoquinonas, la bibliografía (96) indica que mientras que la forma 2-hidroxi-1,4 naftoquinona en medio EtOH presenta máximos de absorción a 242.5, 248, 274 y 334 nm ($\log \epsilon$ 4.17, 4.21, 4.14 y 3.40), en medio EtOH/OH⁻ los máximos de absorción se encuentran localizados a 330 nm y 460 nm. Como se observa en la Figura 11 B, el reactivo evoluciona hacia un espectro con máximos de absorción que podrían corresponder a la forma hidroxilada (4-hidroxi-1,2-naftoquinona). Según Garde y col. (97) la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y 4-hidroxi-1,2-naftoquinona son formas tautoméricas. Mientras que las aminas reaccionan con el NQS sustituyendo el grupo sulfónico por el grupo amino, en medio básico el reactivo podrá sufrir además una sustitución por parte de los grupos -OH existentes en el medio. A pH 10.5 el extracto acuoso del NQS (Figura 14 A, 8B) presenta un espectro similar al mostrado por el producto amina-NQS (Figura 14 C), siendo también similares los espectros en cloroformo (Figura 14B, 8 A), lo que justificaría el hecho de que la sustitución en el anillo quinoideo modifica poco el espectro.

En la Figura 15, se muestra la variación de absorbancia en función del pH para el NQS y diferentes productos de reacción amina-NQS extraídos en cloroformo y formados en exceso de reactivo. Para el NQS se observa un porcentaje de extracción máximo a pH 8.4. Cada uno de los analitos ensayados presentó un comportamiento similar en función del pH, al mostrado para la β -feniletilamina.

En principio la utilización de valores de pH en el intervalo 7.5-8.4 no influye en el porcentaje de extracción para anfetamina, β -feniletilamina y efedrina, sin embargo la metanfetamina (amina secundaria) si que se ve afectada por esta diferencia, puesto que a pH 8.4 se obtiene una mayor señal analítica en la fase orgánica. A valores superiores de pH para β -feniletilamina el aumento de pH supone una disminución en la señal analítica como se ha

comentado anteriormente. Lo mismo sucede para anfetamina y metanfetamina a partir de pH 10.

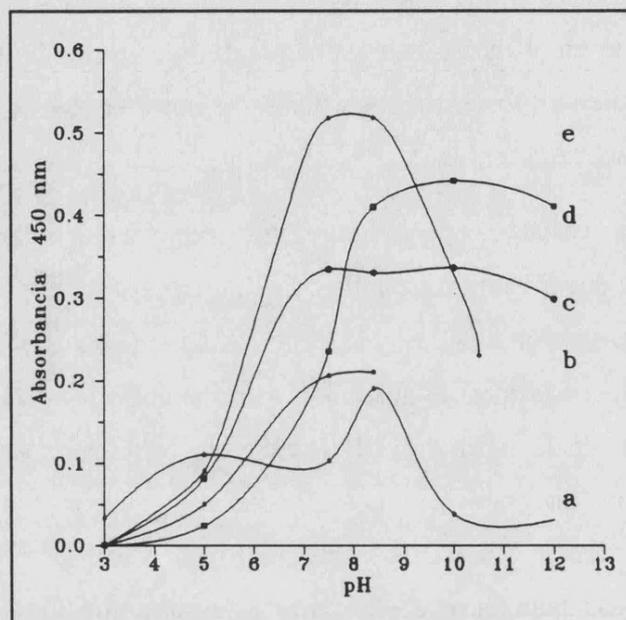


FIGURA 15. Variación de la señal analítica a 450 nm correspondiente al producto de reacción en la fase orgánica en función del pH. a)NQS, b)efedrina, c)anfetamina, d)metanfetamina, e) β -feniletilamina. NQS: $6.4 \times 10^{-3}M$, concentración de analito en la muestra 20 mg/L.

Con estos resultados concluimos que bajo las mismas condiciones de tiempo de reacción (30 minutos) y temperatura de calefacción ($70^{\circ}C$), en presencia de aminas tales como β -feniletilamina, d-anfetamina, dl-anfetamina o efedrina, es indiferente la utilización de pH 7.5 o 8.4, pH 10.5 no es apropiado para la β -feniletilamina. Se considera más adecuado pH 7.5 o 10.5 dada la menor interferencia del blanco reactivo (Figura 8 A). En presencia de metanfetamina(D-metanfetamina o DL-metanfetamina), entre pH 8.4 y 10.5 se obtiene la máxima señal analítica siendo aconsejable pH 10 por el motivo antes mencionado.

3.3.2. -Influencia de la temperatura y tiempo de reacción

Procedimiento experimental

Se tomó un volumen constante 0.3 mL de la disolución de analito (o de agua destilada en el caso del reactivo) al que se añadió 1.0 mL de tampón dihidrogenofosfato / monohidrogenofosfato (pH=7.5) o en su caso tampón bicarbonato/carbonato (0.1 M) (pH=10), agua destilada y 1.0 mL de NQS (0.5%), siendo el volumen final 3.0 mL. La mezcla resultante se calentó a diferentes temperaturas (25°C, 60°C, 70°C, 80°C y 100 °C) durante distintos intervalos de tiempo (5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 90, 110 minutos), siendo después enfriada y mantenida a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, a la mezcla se añadieron 3 mL de cloroformo, se agitó mecánicamente durante 2 minutos y se centrifugó 5 minutos. Finalmente, se separaron ambas fases, registrándose los espectros en el intervalo de longitudes de onda 190-820 nm de la fase orgánica. Las absorbancias fueron medidas frente a blanco reactivo (para las muestras con analito) o frente blanco tampón (para las disoluciones de reactivo) a la temperatura de 25 °C. En todos los casos se realizaron tres réplicas de cada disolución. En relación al extracto acuoso, se tomó 0.1 mL de la disolución a la que se añadieron 1.0 mL de tampón y agua destilada hasta completar un volumen de 2.5 mL, midiéndose la señal analítica frente a blanco reactivo o tampón.

Resultados y discusión

Se estudió la extracción del reactivo o de sus derivados a diferentes temperaturas de calefacción en función del tiempo de reacción. La cantidad de producto/s del reactivo aumenta con la temperatura como se observa en la Figura 16. Bajo las condiciones estudiadas no se observa una estabilización de la señal analítica en la fase orgánica. En consecuencia, tanto el aumento de la temperatura como del tiempo de calefacción incrementan la cantidad de producto/s del reactivo extraído en la fase orgánica.

La Figura 17 muestra la variación de absorbancia a 450 nm correspondiente a la extracción en cloroformo del reactivo a diferentes pHs (7.5, 8.4 y 10.0 y 70°C, en función del tiempo. Como puede apreciarse, cuando el medio es ligeramente básico (pH=7.5) la extracción del reactivo aumenta en función del tiempo transcurrido y de la temperatura observándose el mismo comportamiento a pH=8.4, sin embargo en condiciones de pH=10.0 la extracción del reactivo es pequeña y prácticamente constante.

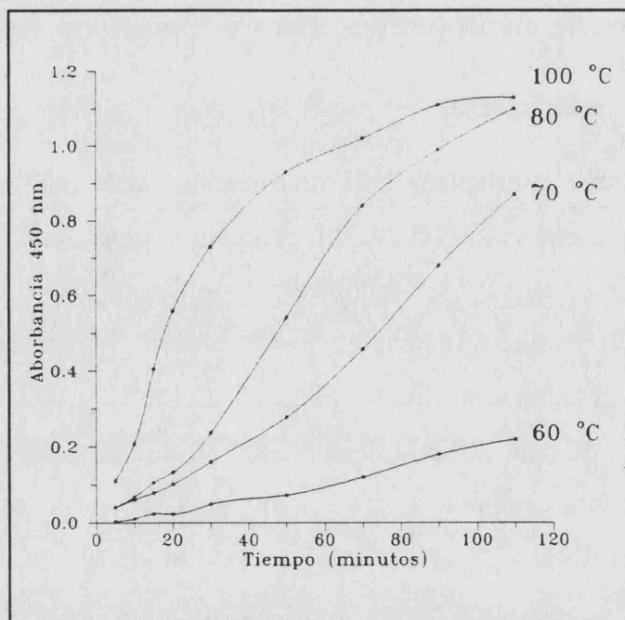


FIGURA 16. Variación de la señal analítica del reactivo en la fase orgánica en función del tiempo y de la temperatura de calefacción. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, pH=7.5. Temperatura 60, 70, 80 y 100 °C.

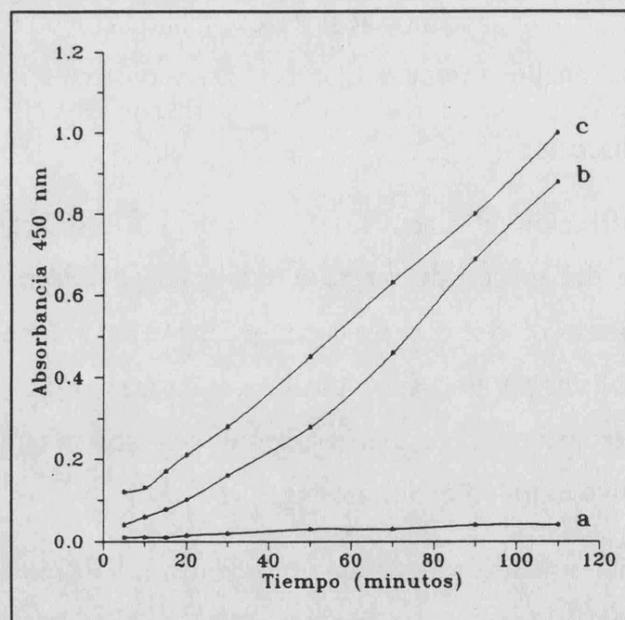


FIGURA 17. Variación de la señal analítica del reactivo en la fase orgánica en función del tiempo y en diferentes medios de reacción. a) pH=10.0, b) pH=7.5 y c) pH=8.4. NQS= $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, 70 °C 30 minutos. Extracción del producto de reacción con CHCl_3 .

Tal como puede verse en la Figura 18 en las mismas condiciones de pH 7.5 y temperatura, los espectros correspondientes a los extractos acuosos son diferentes dependiendo del tiempo de reacción, disminuyendo la intensidad del máximo del reactivo a 366 nm lo que justificaría el incremento de la señal analítica obtenida en la fase clorofórmica (Figura 17).

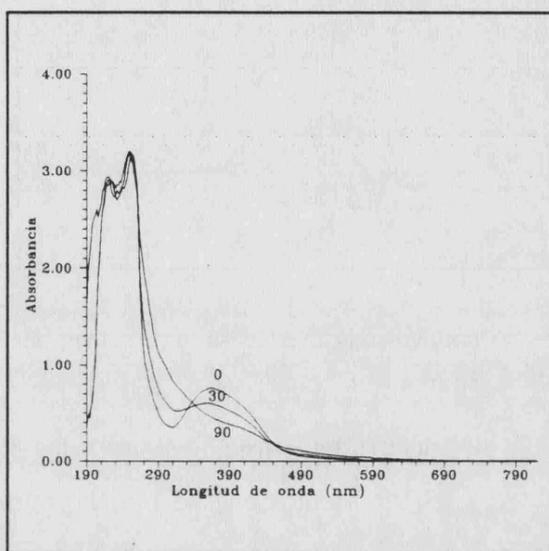


FIGURA 18. Extractos acuosos del reactivo cuando la disolución ha sido sometida a diferentes tiempos de calefacción. pH=7.5. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y calefacción a 70 °C durante 0, 30, 90 minutos.

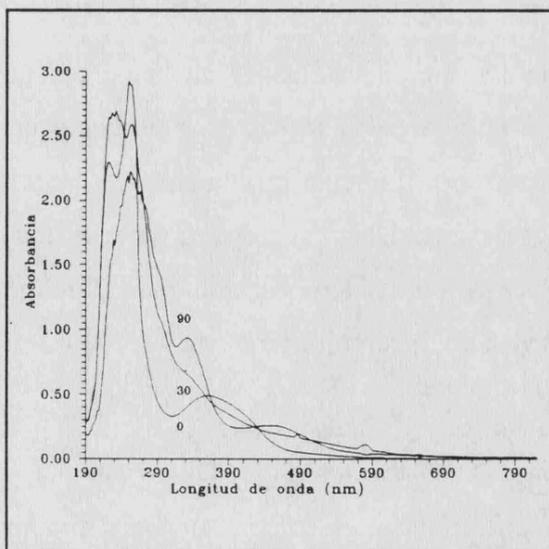


FIGURA 19. Extractos acuosos del reactivo cuando la disolución ha sido sometida a diferentes tiempos de calefacción pH=8.4. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y calefacción a 70 °C durante 30, 90 minutos.

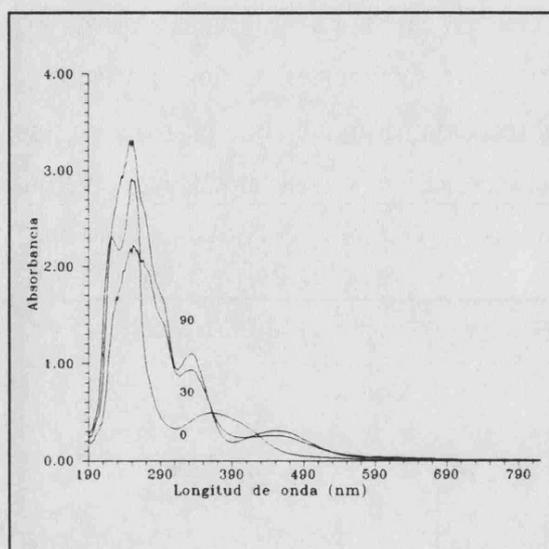


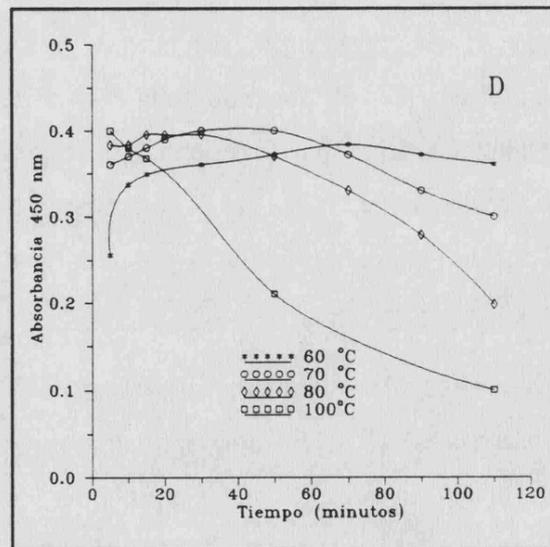
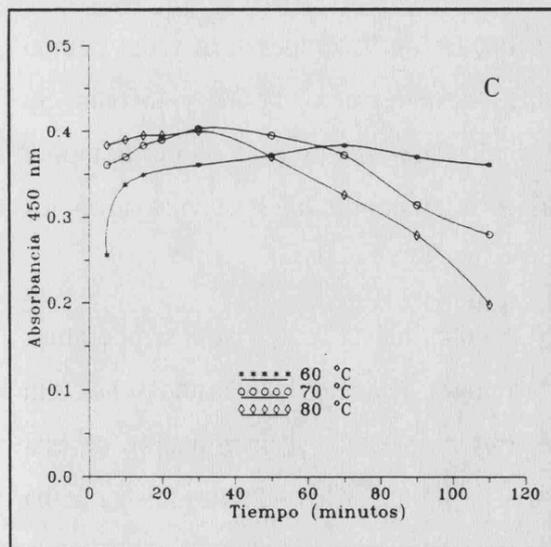
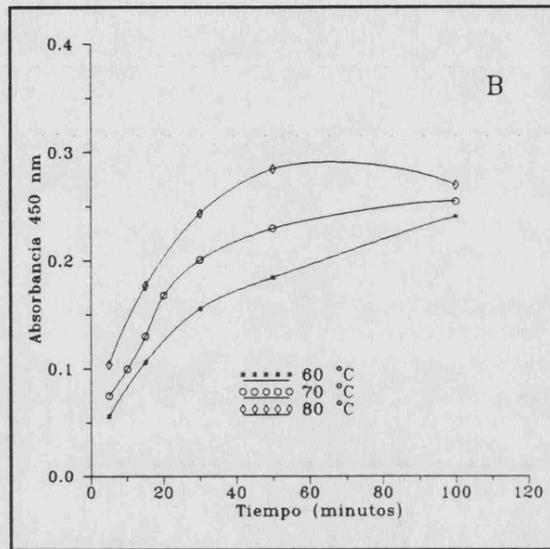
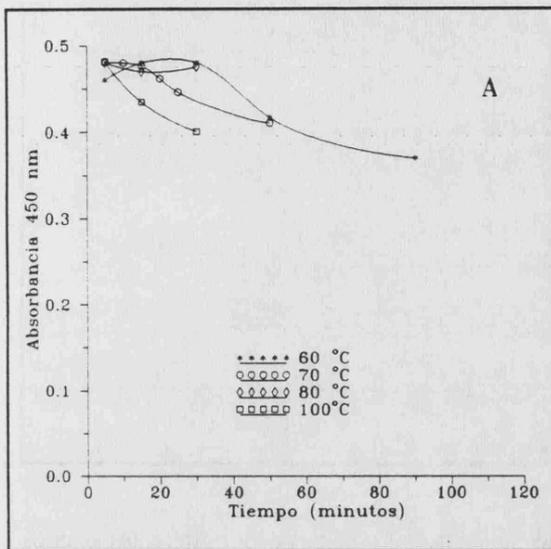
FIGURA 20. Extractos acuosos del reactivo cuando la disolución ha sido sometida a diferentes tiempos de calefacción pH 10.0. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y calefacción a 70°C durante 30, 90 minutos.

A pH 8.4 (Figura 19) el espectro del extracto acuoso a los 30 minutos es similar en cuanto a su forma, al obtenido a los 90 minutos pH 7.5 lo que podría justificar que la señal analítica obtenida en cloroformo sea superior a la registrada a pH 7.5 (Figura 17). A los 90 minutos el espectro obtenido es diferente presentando los mismos máximos que los extractos acuosos a pH 10.5. Sin embargo a pH 8.4 el derivado/s del reactivo está presente en la fase de clorofórmica, mientras que a pH 10.0 no se observa su extracción.

Estas mismas variables fueron estudiadas en presencia de aminas. Como puede observarse en la Figura 21 en general la cantidad de producto de reacción (NQS-amina) obtenido, para un mismo tiempo, aumenta en función de la misma. La utilización de temperaturas elevadas no es recomendable dado que se observa una disminución de la señal analítica por degradación del producto de reacción para β -feniletilamina y anfetamina. Tampoco es adecuado trabajar a temperatura ambiente (25°C) porque se requieren tiempos de reacción muy largos.

Para β -feniletilamina (A) y anfetamina (C,D) la máxima señal correspondiente al producto de reacción NQS-anfetamina es alcanzada con pocos minutos de calefacción (Figura 21). Por el contrario para efedrina (B) y metanfetamina (E y F) se observa un aumento de la señal en función de la temperatura y del tiempo, de este modo en las condiciones de trabajo pH 7.5, NQS 0.5% con temperatura de 70°C la máxima señal es obtenida calentado

la muestra durante 70 minutos, mientras que con calefacción a 80 °C se alcanza a los 30 minutos. Los resultados encontrados para d-anfetamina (C) y dl-anfetamina son iguales, así mismo los son para d-metanfetamina y la dl-metanfetamina, indicando por tanto que el reactivo NQS no presenta en principio diferencias al reaccionar con las distintas formas isoméricas.



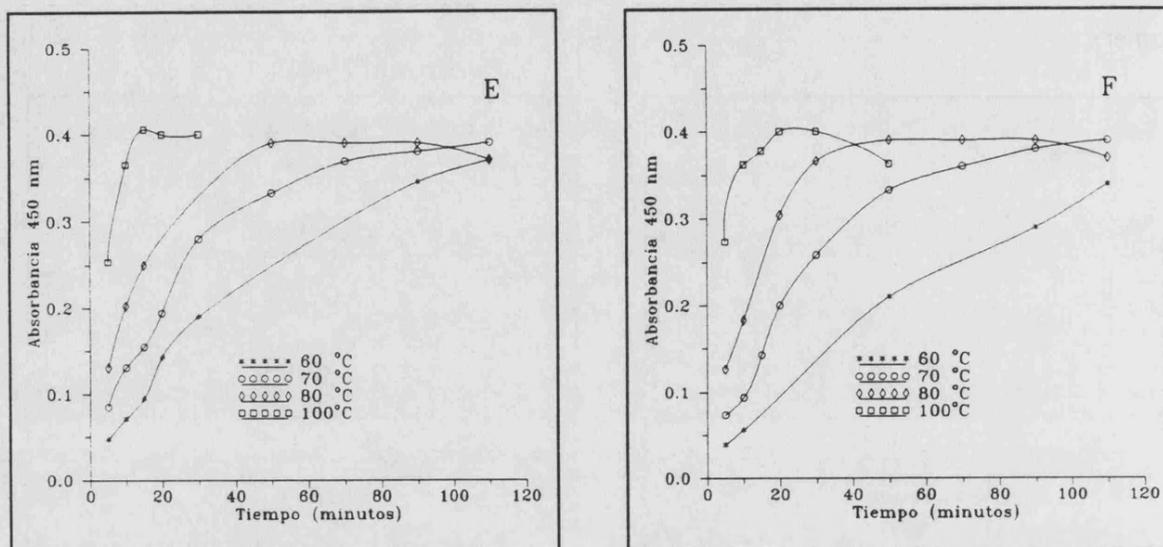


FIGURA 21. Variación de señal analítica del producto de reacción en la fase orgánica de los diferentes analitos en función del tiempo de calefacción de la mezcla a diferentes temperaturas. NQS: $6.4 \times 10^{-3} M$, concentración de los analitos en la muestra 20 mg/L, en medio pH=7.5, A) β -feniletilamina, B) efedrina, C) d-anfetamina, D) dl-anfetamina, E) d-metanfetamina, F) dl-metanfetamina.

A pH 10 el comportamiento del reactivo en función de la temperatura y del tiempo de calefacción es el mostrado en la Figura 22 para las longitudes de onda 464 y 450 nm. Su contribución a la señal analítica total será pequeña siendo constante en función del tiempo y ligeramente dependiente de la temperatura. En las mismas condiciones se ensayaron los productos metanfetamina-NQS y anfetamina-NQS (Figura 22 C y D).

Con relación a la reacción metanfetamina-NQS cuando ésta se realiza a temperatura 25°C se requiere al menos un tiempo de 30 minutos para alcanzar la máxima señal, sin embargo a 60°C la reacción transcurre rápidamente observándose una disminución de ésta en función del tiempo. A una temperatura intermedia de 45°C a los 45 minutos ya se ha alcanzado la máxima señal, siendo aproximadamente constante con el tiempo y superior a la alcanzada a pH 7.5, calefacción 70°C, 30 minutos (Figura 21). En relación al producto de reacción anfetamina-NQS, se observa un comportamiento similar al del producto MA-NQS, siendo además la señal analítica obtenida en estas condiciones similar a la registrada a 7.5.

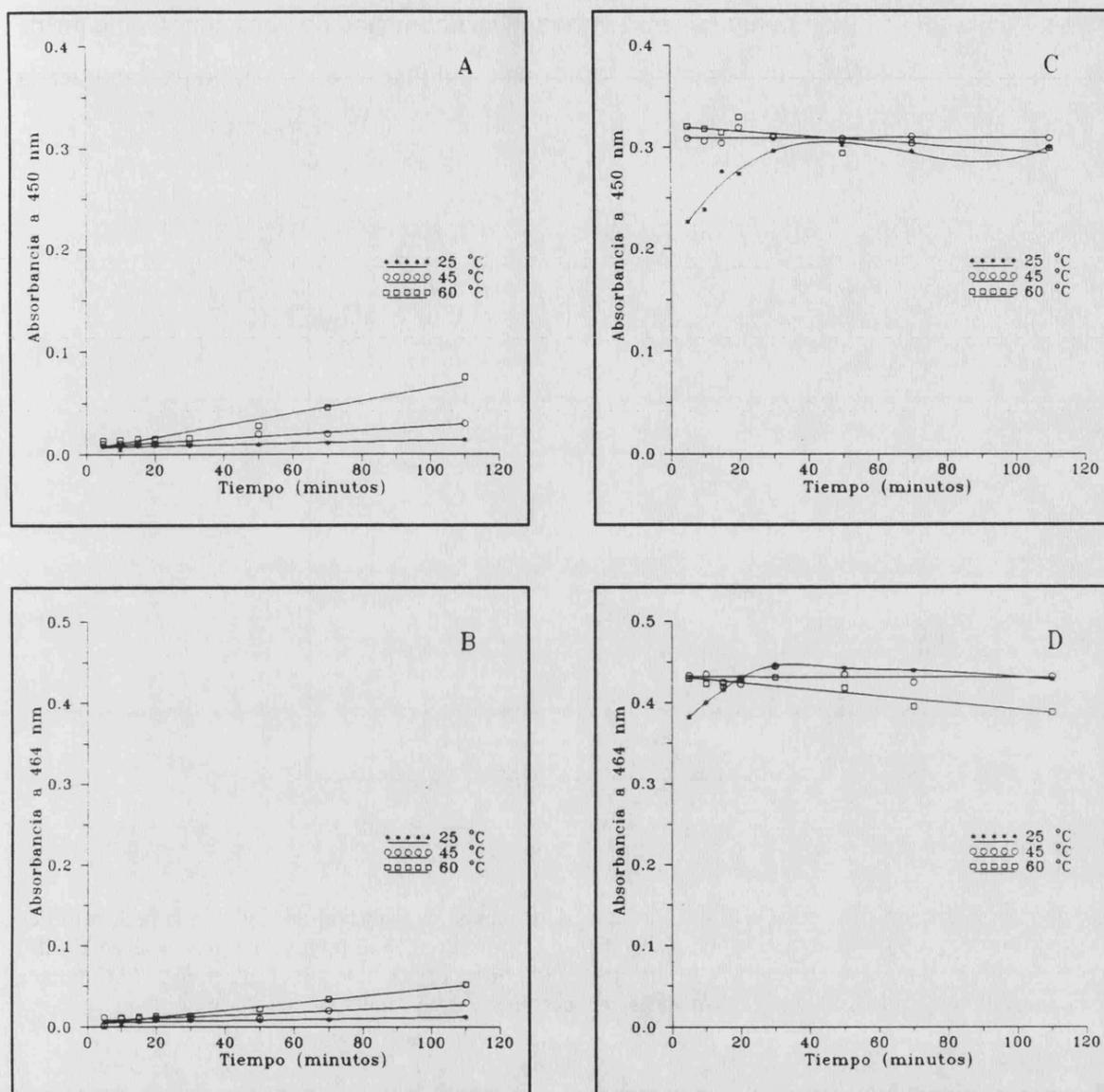


FIGURA 22. Variación de señal analítica del producto de reacción en la fase orgánica de los diferentes analitos en función del tiempo de calefacción de la muestra a diferentes temperaturas. NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración de los analitos en la muestra $20.0 \mu\text{g/mL}$, en medio tampón bicarbonato $\text{pH}=10.0$. A y B) Reactivo, C y D) anfetamina y metanfetamina, respectivamente.

También se estudio la influencia del tiempo de agitación al efectuar la extracción del reactivo, observándose un aumento de la absorbancia a 450 nm en función del tiempo (Figura 23). El aumento de la señal es debido fundamentalmente a la evolución del reactivo con el tiempo, siendo por lo tanto necesario un control del mismo para que en todos los casos la cantidad de reactivo extraído sea constante.

Siempre y cuando se ha completado la reacción entre el reactivo y las aminas, la

extracción del producto NQS-amina no es dependiente del tiempo de agitación. Como puede observarse en la Figura 23 un tiempo de agitación de 2 minutos es suficiente para extraer la máxima cantidad de producto de reacción (NQS-amina) en la fase orgánica.

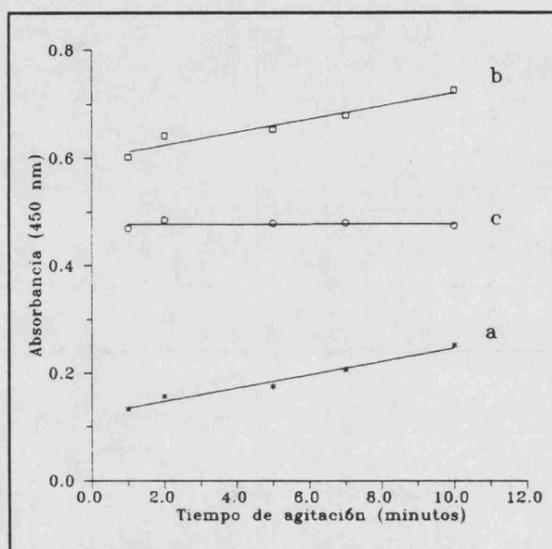


FIGURA 23. Variación de la señal analítica en función del tiempo de agitación utilizado en la realización de la extracción del producto de reacción, correspondiente a) al reactivo, b) al reactivo en presencia de analito, c) correspondiente al reactivo en presencia de analito medido frente blanco reactivo. Temperatura 70°C durante 30 minutos, extraído en CHCl_3 , NQS: $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración de β -feniletilamina 20 mg/L.

3.3.3.- Influencia del disolvente utilizado en la extracción del producto de reacción

De la bibliografía se deriva que el cloroformo es el disolvente más empleado para la extracción del producto de reacción amina-NQS.

Son varios los autores (67-68) (69), que consideran que no es adecuada la determinación de aminas con grupos -OH en posición α (tales como efedrina, norefedrina...etc) dada su baja reactividad con el reactivo NQS y la inestabilidad de los productos de reacción en función del tiempo. Del mismo modo, autores como Lindsay Smith y col.(74), coinciden en que existen casos donde la determinación de aminas con NQS no es adecuada, pero a diferencia de los anteriores, consideran que los efectos estéricos pueden ser parte de la causa del retraso en el proceso de derivatización apuntando que el mayor problema reside en la baja extractibilidad de los derivados hidrofílicos en disolventes orgánicos. Dada la importancia del disolvente en la extracción del producto de reacción se ha realizado un estudio al respecto, utilizándose diversos extractantes con diferentes grados de polaridad, con el propósito de ver si la sensibilidad en la determinación se ve afectada por dicha variable, especialmente en el caso de la efedrina.

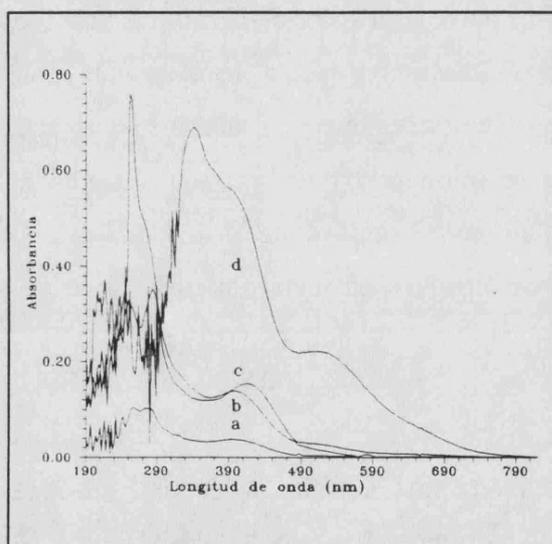
Procedimiento experimental

Se tomaron (0.5 mL) de analito (sulfato de anfetamina, clorhidrato de metanfeamina o clorhidrato de efedrina) a partir de una disolución patrón de cada uno de ellos (100 mg/L) o agua destilada (en el caso del reactivo), a los que se adicionaron 1 mL de tampón fosfato pH 7.5 o en su caso tampón bicarbonato pH 10.0, 1 mL de reactivo NQS (0.5%) y agua destilada hasta completar un volumen de 3 mL. Las muestras fueron calentadas durante 30 minutos a la temperatura de 70°C, siendo después enfriadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, la muestra fue sometida a extracción con disolvente orgánico (utilizando el mismo volumen que el volumen de muestra 3 mL), agitada mecánicamente durante 2 minutos y centrifugada 5 minutos. Finalmente, se separaron ambas fases, registrándose la señal analítica (Absorbancia) entre 190-820 nm de la fase orgánica. Las absorbancias fueron medidas frente a un blanco reactivo a la temperatura de 25 °C. En todos los casos se han ensayado tres réplicas. Los disolventes orgánicos estudiados han sido acetato de etilo, n-hexano:acetato de etilo (1:1), cloroformo y alcohol isoamílico.

Resultados y discusión

En la Figura 24 se muestran los espectros de absorción UV/V del producto/s del reactivo (NQS) extraído en los diferentes disolventes orgánicos. Como puede observarse, el disolvente de extracción influye en la cantidad de reactivo extraído en la fase orgánica, siendo tanto mayor cuanto mayor es la polaridad del mismo. El máximo valor lo proporciona el alcohol isoamílico, mientras que el mínimo la mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:1). De mismo modo, también se observan diferencias entre los espectros obtenidos presentando la mayor diferencia el extracto de alcohol isoamílico.

A)



B)

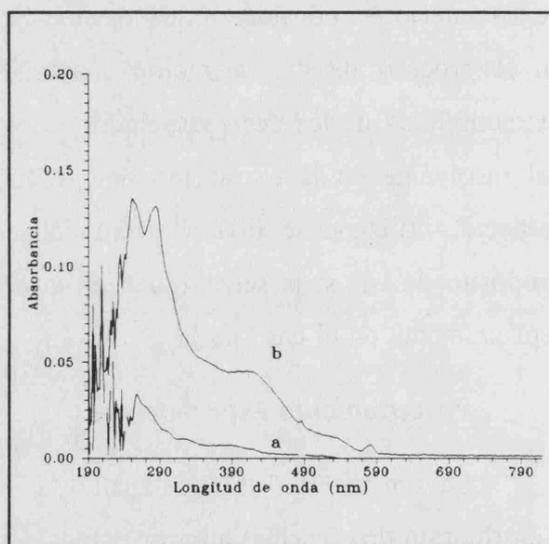
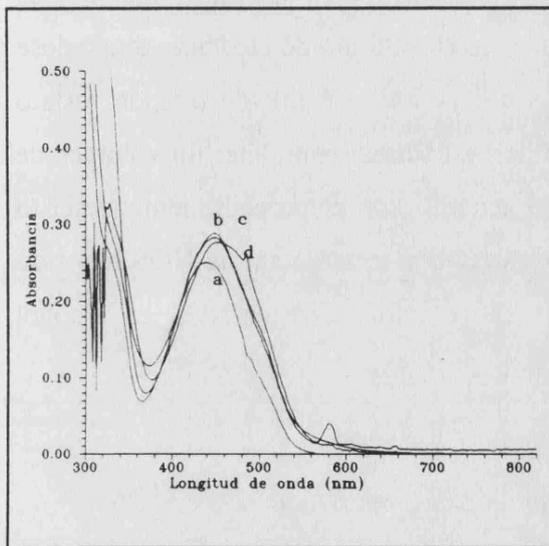


FIGURA 24. Espectros de absorción de los productos del reactivo en distintos disolventes orgánicos. a)n-hexano:acetato de etilo (1:1), b)cloroformo, c)acetato de etilo, d)alcohol isoamílico. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$. A) condiciones de pH=7.5, B) condiciones de pH=10.0.

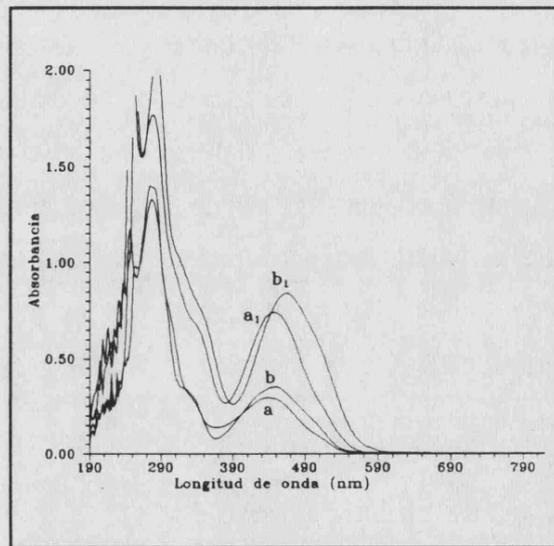
Estos mismos disolventes se ensayaron en presencia de analitos en la muestra. En la Figura 25 se muestran los espectros correspondientes a los diferentes productos de reacción (amina-NQS). Para analitos como anfetamina y metanfetamina la utilización de disolventes de mayor polaridad proporciona tan sólo aumentos no significativos de la cantidad de producto (NQS-amina) en la fase orgánica. Por lo que en la determinación de anfetamina y metanfetamina se descarta la utilización de alcohol isoamílico dado que presenta una interferencia de blanco reactivo mayor sin proporcionar aumento en la sensibilidad para la determinación, siendo los disolventes más idóneos cloroformo y n-hexano:acetato de etilo

(1:1). En el caso de la efedrina, se observa que utilizando disolventes tales como cloroformo y acetato de etilo las sensibilidades obtenidas son similares, por el contrario la utilización de alcohol isoamílico permite aumentar considerablemente la sensibilidad, lo que estaría de acuerdo con Linsay y col.(74), indicando por tanto que bajo las condiciones de trabajo la reacción sí ha tenido lugar, sin embargo cuando el disolvente de extracción no es el apropiado la sensibilidad obtenida es baja y ello por el mayor carácter hidrofílico de este derivado.

A)



B)



C)

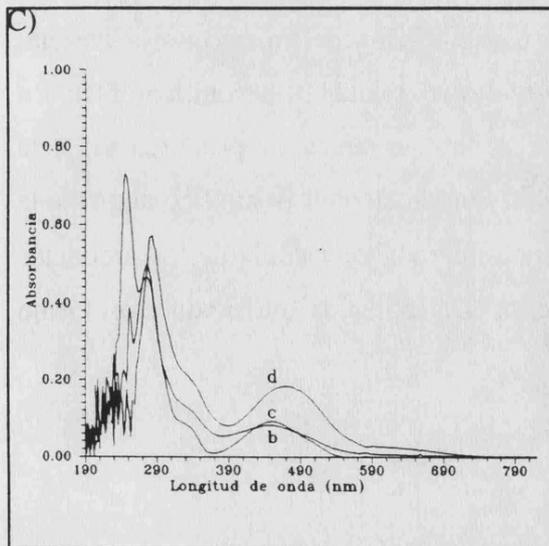


FIGURA 25. Espectros de absorción correspondientes a los productos de reacción en los distintos disolventes orgánicos. a) n-hexano:acetato de etilo (1:1), b) cloroformo, c) acetato de etilo, d) alcohol isoamílico. A) Anfetamina 16.8 $\mu\text{g/mL}$ (pH 7.5), B) Metanfetamina 35.0 $\mu\text{g/mL}$ (1), anfetamina 20.0 $\mu\text{g/mL}$ (pH 10.0), C) Efedrina 10.0 $\mu\text{g/mL}$ (pH 7.5). NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$.

3.3.4.-Influencia de la concentración de reactivo

Procedimiento

A volúmenes diferentes de una disolución patrón de NQS (1% y 2%) de forma que su concentración varia en el intervalo de 2.56×10^{-4} - 25.6×10^{-3} M, se le han añadido 1 mL de tampón fosfato (pH=7.5) y agua destilada hasta completar un volumen de 3 mL. La mezcla resultante se calentó durante 30 minutos a 70°C, siendo posteriormente extraído el producto de reacción con 3.0 mL de disolvente orgánico. Se han ensayado dos concentraciones de sulfato de anfetamina, clorhidrato de metanfetamina y de clorhidrato de efedrina, tomándose en este caso volúmenes constantes de analito a los que se añade 1 mL de tampón fosfato pH=7.5 y volúmenes variables de reactivo y agua destilada hasta completar un volumen de 3.0 mL. Las muestras obtenidas se procesaron de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Los productos de reacción anfetamina-NQS y metanfetamina-NQS han sido extraídos en CHCl_3 , mientras que los productos de reacción efedrina-NQS en alcohol isoamílico.

Resultados y discusión

En la Figura 26 se muestra la variación de la absorbancia correspondiente al producto del reactivo en la fase orgánica en función de la concentración del mismo en la mezcla, utilizando como disolventes de extracción cloroformo(26A) y alcohol isoamílico(26B). En ambos casos, la cantidad de reactivo extraído en la fase orgánica es proporcional a la concentración del mismo en la fase acuosa. La utilización de alcohol isoamílico aumenta la señal analítica del reactivo, sin embargo a la longitud de onda de medida de los productos de reacción esta interferencia es ligeramente superior a la obtenida utilizando cloroformo como disolvente.

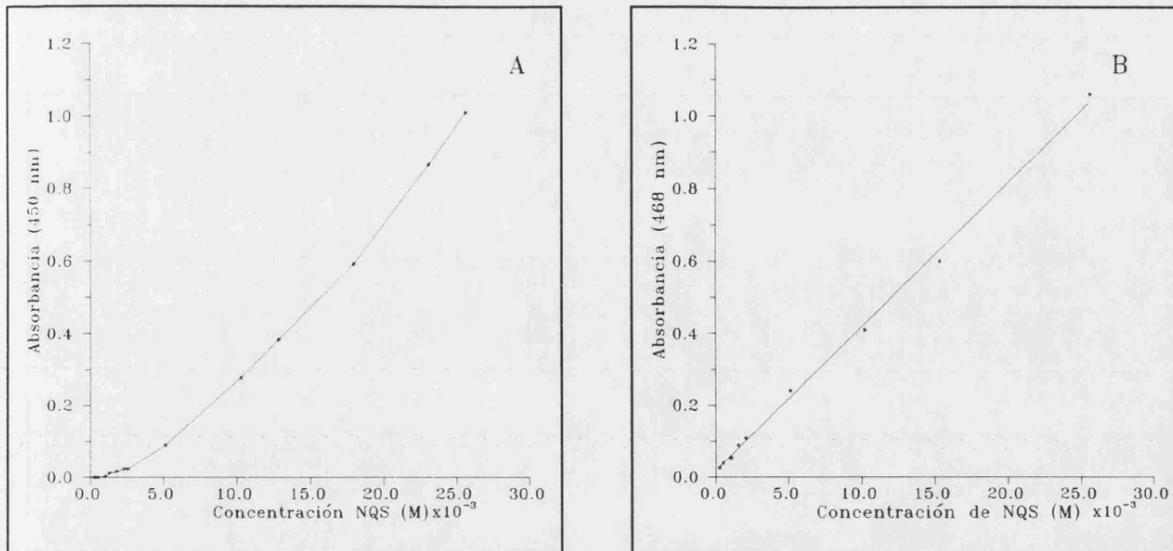


FIGURA 26. Variación de la absorbancia correspondiente a los extractos orgánicos en función de la concentración de reactivo, utilizando como disolvente de extracción A)cloroformo, B)alcohol isomílico.

En la Figura 27 se muestran las curvas de saturación para los diferentes analitos (sulfato de anfetamina, clorhidrato de metanfetamina y clorhidrato de efedrina). En relación a la anfetamina (Figura 27A) se observa que independientemente de la concentración de analito la estabilidad de la señal se alcanza a bajas concentraciones de reactivo. Sin embargo para metanfetamina (27B) y efedrina (27C) la señal es prácticamente constante para altas relaciones reactivo-analito (alrededor de 120) lo que reflejaría la formación de complejos más débiles de estas dos drogas con el reactivo. Se observa que a elevadas concentraciones de reactivo la señal analítica aumenta pudiendo ser debido a la formación de otras especies.

Dado que la interferencia del reactivo en la fase orgánica aumenta en función de la concentración, se seleccionó una concentración de reactivo de 6.4×10^{-3} M. A pH=10, condiciones en que la reacción metanfetamina-NQS se encuentra favorecida, la señal analítica del producto de reacción para la misma concentración de NQS se corresponde con la señal obtenida en la zona de máxima sensibilidad a pH 7.5.

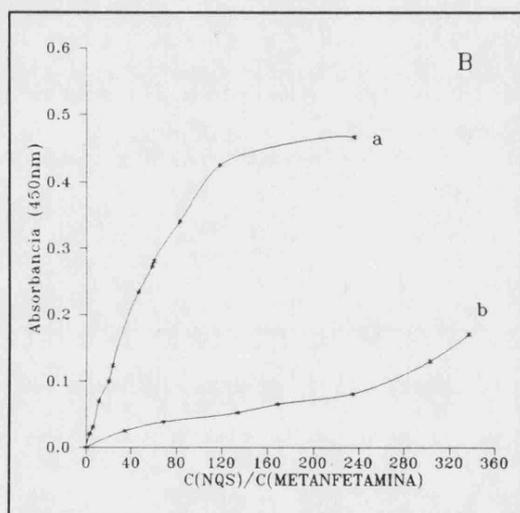
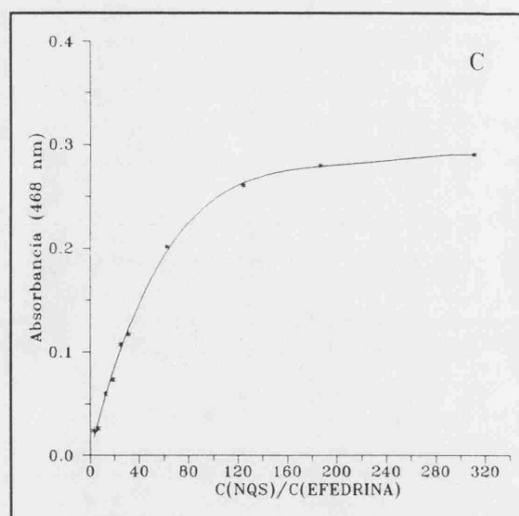
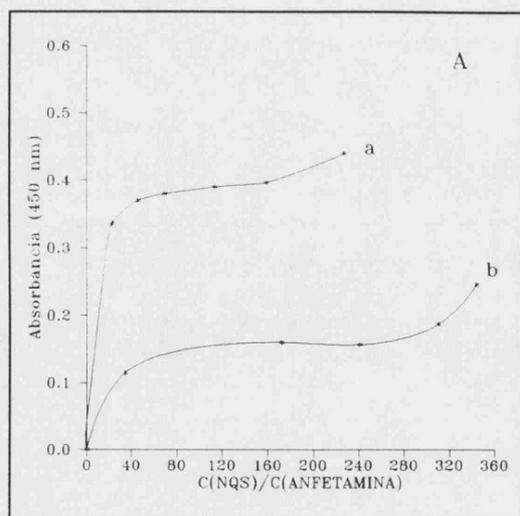


FIGURA 27. Variación de la señal analítica correspondiente a los productos de reacción amina-NQS en función de la relación entre la concentración de reactivo y analito presente en la muestra. Concentración de reactivo entre 2.56×10^{-4} - 2.56×10^{-2} M, 4A) Anfetamina 20 $\mu\text{g/mL}$ y 6.8 $\mu\text{g/mL}$, 4B) metanfetamina 20.0 $\mu\text{g/mL}$ y 6.8 $\mu\text{g/mL}$, 4C) efedrina 16.6 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.5. - Conclusiones

En este apartado se han estudiado las variables experimentales, pH, temperatura, tiempo de reacción, disolvente de extracción y concentración de reactivo. A la vista de los resultados obtenidos se puede derivar que el 1,2-naftoquinona 4-sulfonato experimenta dos reacciones de sustitución del grupo sulfónico. Una de ellas en ausencia de aminas y debida probablemente a su sustitución por el grupo OH, de la segunda es responsable el grupo fenilamina.

Dependiendo de las condiciones experimentales la evolución hacia los productos deseados es más o menos rápida, pudiéndose controlar su formación.

Las condiciones más favorables, en principio, para la determinación de anfetamina serían pH 7.5 (dihidrogenofosfato/monohidrogenofosfato), calefacción a 70°C durante 30 minutos, o pH 10.0 (tampón carbonato), calefacción a 45°C durante 5 minutos. Sin embargo, para metanfetamina las condiciones óptimas resultan ser las últimas señaladas.

El disolvente de extracción más apropiado para la determinación de ambas drogas es la mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:1), mientras que para efedrina sería mejor el alcohol isoamílico.

La concentración de 1,2-naftoquinona 4-sulfonato elegida ha sido $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$.

3.4.- PROCEDIMIENTO EXTRACTO- ESPECTROFOTOMETRICO

3.4.1.- Curvas de calibrado para disoluciones patrón de anfetamina y efedrina

3.4.1.1.- Procedimiento experimental

Se tomaron volúmenes variables (0.1 a 1.0 mL) de una disolución patrón de cada uno de los analitos de concentración (200 o 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a los que se adicionó 1.0 mL de tampón dihidrogeno/monohidrogenofosfato pH 7.5 ó tampón bicarbonato/carbonato pH 10.0, 1.0 mL de reactivo NQS (0.5%) y agua destilada hasta completar un volumen de 3 mL. La mezcla resultante se calentó durante 30 minutos a 70 °C ó 5 minutos a 45 °C y el producto de reacción fue extraído con cloroformo o n-hexano:acetato de etilo (1:1) también alcohol isoamílico en el caso de la efedrina (volumen 3 mL). Finalmente se registró la absorbancia del extracto orgánico entre 190 y 820 nm cada 2 nm, frente a blanco disolvente o reactivo. En todos los casos se realizaron tres replicas de cada disolución. El blanco reactivo se preparó de la misma forma pero en ausencia de analito.

3.4.1.2.- Caracterización del comportamiento del blanco absorbente en la etapa de calibración por el método de adición estándar del punto H

En espectrofotometría es bastante frecuente la determinación de analitos mediante la formación de complejos por reacción entre el analito y un reactivo externo. La absorbancia del producto formado se calcula restando al valor de la señal analítica el valor del blanco reactivo, si éste absorbe a la longitud de onda de medida.

La recta de calibrado obtenida en estas circunstancias con señales analíticas suma de absorbancias reactivo-producto de reacción, puede considerarse como una recta de adición estándar obtenida con una porción de muestra añadida igual a cero. Su ordenada será función de la absorbancia del blanco reactivo a la longitud de onda seleccionada. Por tanto las bases del método de adición estándar del punto H (HPSAM) son extensibles a las curvas de calibrado obtenidas para determinaciones en las que el blanco absorbe, correspondiendo el primer punto de la adición estándar a la señal analítica de la disolución que contiene el blanco.

El HPSAM permite evidenciar, como se demostrará a continuación, diferentes comportamientos del reactivo que han sido observados en distintas curvas de calibrado, lo

que permite clarificar el significado del "blanco reactivo" y elegir éste adecuadamente en un procedimiento analítico en particular.

Para el desarrollo teórico del método se han definido dos clases de blancos:

a) blanco externo, obtenido a partir de disoluciones de reactivo sin analito o del reactivo más placebo, procesado según el procedimiento analítico. Estos tipos de blanco se denominan generalmente "blanco reactivo" o "disolución de referencia".

b) blanco interno, obtenido por extrapolación a partir de los datos de la curva de calibrado del analito en presencia de reactivo, y su valor se corresponde con la ordenada en el origen de la curva de calibrado del analito.

En este sentido a continuación se examinan las posibilidades del HPSAM para procedimientos extracto-colorimétricos que utilizan blanco absorbente como es el caso de la determinación en estudio.

3.4.1.2.1.- Fundamentos teóricos

En base a los fundamentos teóricos del HPSAM aplicados a procedimientos analíticos que presentan blancos absorbentes (95) se seleccionan dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 a ambos lados del máximo de absorción del blanco externo, de forma que presenten la misma absorbancia.

Las curvas de calibrado obtenidas a λ_1 y λ_2 responden a las ecuaciones:

$$A(\lambda_1) = b'_i + b_o + M(\lambda_1) \times C_i ; \quad i=0, 1, \dots, n. \quad (1)$$

$$A(\lambda_2) = A'_i + A_o + M(\lambda_2) \times C_i ; \quad i=0, 1, \dots, n. \quad (2)$$

Donde el subíndice (i) indica las diferentes disoluciones para n adiciones de analito; C_i es la concentración de analito añadida; A_o y b_o son los valores de absorbancia correspondientes al producto de reacción formado a λ_1 y λ_2 , medidas cuando $i=0$ (concentración de analito añadida es cero y por tanto la concentración de producto de reacción formado es también cero, $b_o = A_o = 0$, en este caso). b'_i y A'_i son los valores de absorbancia presentados por el exceso de reactivo libre a λ_1 y λ_2 en las distintas disoluciones preparadas para la aplicación del método; y $M(\lambda_1)$ y $M(\lambda_2)$ son las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas a λ_1 y λ_2 .

Si tomamos como señal analítica $\Delta A = A(\lambda_2) - A(\lambda_1)$ (Figura 28A) y considerando que $b_o = A_o = 0$, y que para cada valor de i $b'_i = A'_i$ dado que el reactivo presenta la misma absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas, a partir de las ecuaciones (1),(2) obtenemos la siguiente expresión:

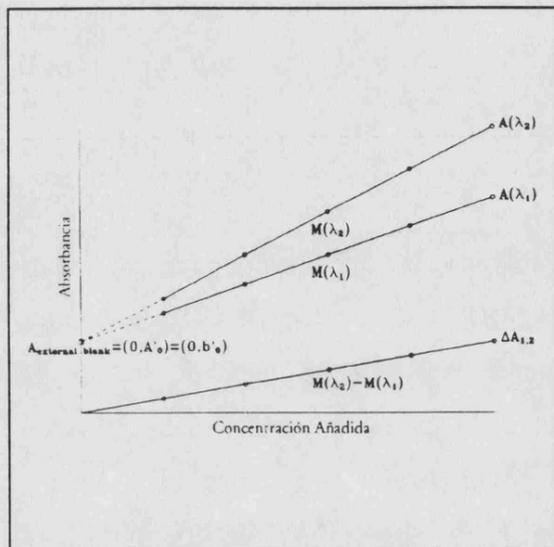
$$\Delta A_{1,2} = A(\lambda_2) - A(\lambda_1) = (M(\lambda_2) - M(\lambda_1)) \times C_i \quad (3)$$

De modo que representando $\Delta A_{1,2}$ frente C_i obtendremos una línea recta con ordenada en el origen igual a cero y de pendiente $(M(\lambda_2) - M(\lambda_1))$. Esta expresión indica que los incrementos de absorbancia dependen exclusivamente de la concentración de analito. El exceso de reactivo libre no afecta a la representación dado que en cada punto su contribución a la señal ha sido eliminada, puesto que presenta la misma señal a las dos longitudes de onda seleccionadas, esto sería válido aunque sus valores de absorbancias fueran diferentes para cada disolución. Según las bases del HPSAM las ordenadas de las rectas $A(\lambda_1)$ y $A(\lambda_2)$ deben ser iguales entre si, e iguales al valor del blanco externo si éste es equivalente al interno.

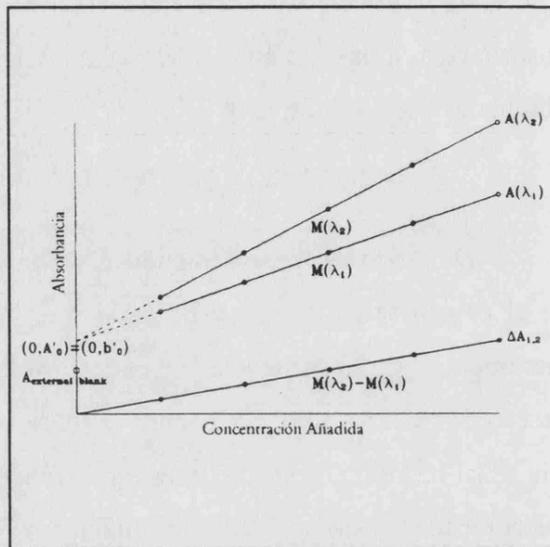
Esta situación corresponde al caso más generalizado (Figura 28A) tal como se desarrolla en (95).

Sin embargo en la práctica pueden plantearse otra serie de casos en los que no exista una coincidencia entre el blanco interno y el blanco externo (Figura 28B y 28C), situaciones que se han podido evidenciar por la aplicación del HPSAM. En lo que sigue se estudia la determinación de anfetamina con NQS en estos términos, proponiendo un procedimiento para evaluar y caracterizar los posibles errores a los que pueden inducir estas situaciones y una guía para optimizar el procedimiento de medida.

A)



B)



C)

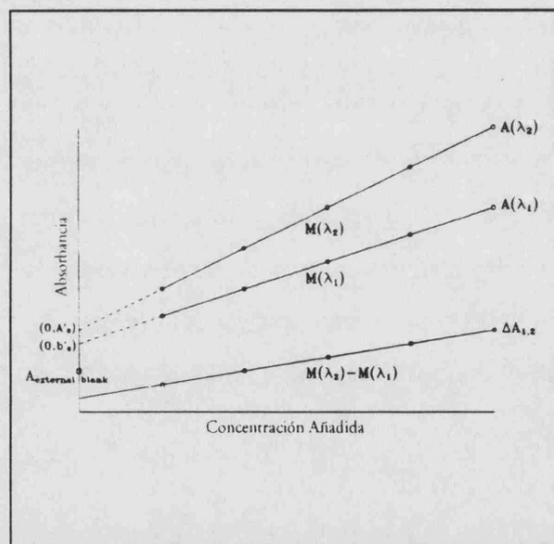
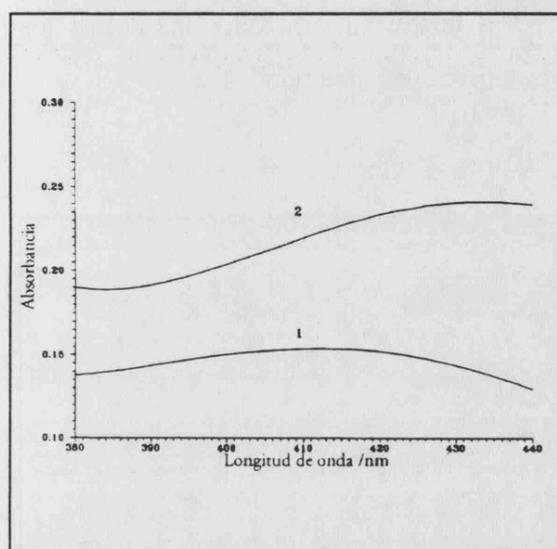


FIGURA 28. Diferentes situaciones en las que la aplicación del método del HPSAM nos lleva a: (A) Las ordenadas en el origen correspondientes a las curvas de calibrado a λ_1 y λ_2 (blanco interno) y el valor correspondiente al blanco externo son coincidentes. (B) Los valores de las O.O a λ_1 y λ_2 son coincidentes entre si pero son diferentes al valor del blanco externo. (C) Las O.O obtenidas a λ_1 y λ_2 son diferentes entre si y diferentes al blanco externo.

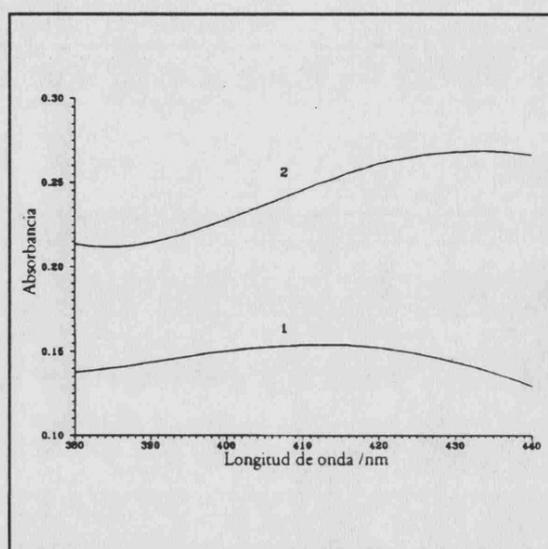
3.4.1.2.2.- Resultados y discusión

En la Figura 28A, se mostraba la situación en la que el blanco interno y el externo son iguales. La recta de calibrado de la dl-metanfetamina-NQS responde a este esquema. En la Figura 29A, se muestran los espectros correspondientes al blanco reactivo y los correspondientes a la disolución de reactivo en presencia de $9.6 \mu\text{g/mL}$ de dl-metanfetamina.

A)



B)



C)

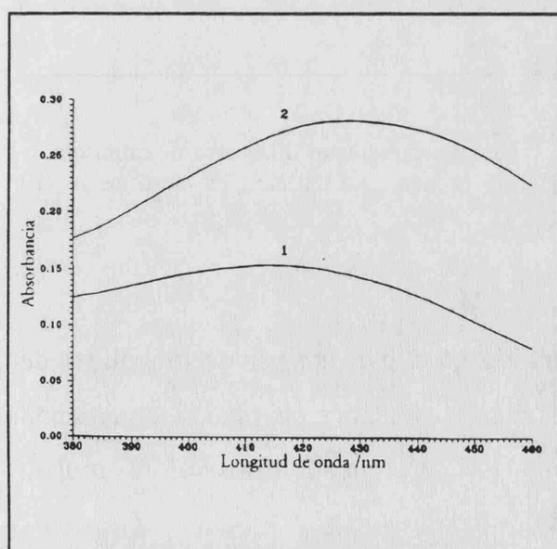
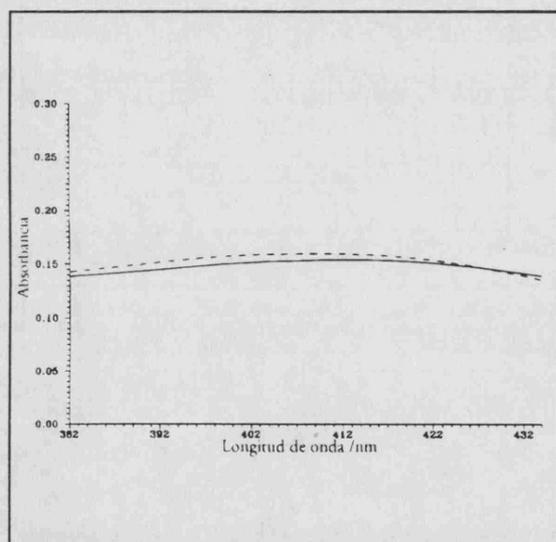


FIGURA 29. (A) Espectro correspondiente al blanco reactivo(1), y reactivo en presencia de $9.6 \mu\text{g/mL}$ de dl-metanfetamina(2). (B) Espectro del blanco reactivo (1) y del reactivo en presencia de $8.66 \mu\text{g/mL}$ de d-metanfetamina (2). (C) Espectro del blanco reactivo (1) y del blanco reactivo en presencia de $8.66 \mu\text{g/mL}$ de dl-anfetamina.

Como puede observarse en la Figura 30A, en este caso el blanco externo y el blanco interno son coincidentes, presentando valores que no difieren en más de un 5%. Por lo tanto seleccionando dos longitudes de onda en las que el blanco externo presente la misma absorbancia, podemos obtener dos rectas que intersectan en el punto H de coordenadas (0, $A_{\text{blanco externo}}$) (Figura 28A). El uso de ΔA como señal analítica permite obtener rectas que intersectan en cero, indicando por tanto que la contribución del blanco ha sido eliminada. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para tres pares de longitudes de onda diferentes, donde la absorbancia del blanco reactivo es la misma. En todos los casos, los resultados obtenidos están de acuerdo con las bases teóricas del método.

A)



B)

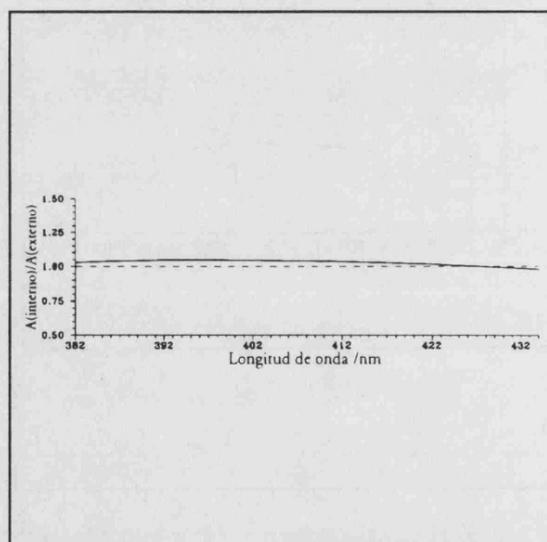


FIGURA 30. (A) Representación de los blancos interno y externo correspondientes a la curva de calibrado de dl-metanfetamina utilizando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción en cloroformo. (B) Cociente entre el blanco interno y el blanco externo.

En la Figura 31A, se muestra el gráfico del HPSAM para un par de longitudes de onda. La aplicación de este método permite cancelar el error constante del blanco, obteniendo curvas de calibrado con ordenadas en el origen cercanas a cero, siendo estos valores mucho más cercanos a cero que los obtenidos por el método tradicional.

TABLA 6. Parámetros analíticos correspondientes a dl-metanfetamina en presencia de NQS. $a \pm s_a$ representa el valor de la ordenada y su desviación típica(100), $b \pm s_b$ corresponde a la pendiente y su desviación típica en ppm, r es el coeficiente de correlación, $t_{\text{calc}} = b/S_b$ es el valor del estadístico usado para un test lineal y n representa el número de puntos utilizados en el trazado de la recta.

Longitud de onda de medida	434	382	430	390	426	396
$a \pm s_a$	0.136 ± 0.005	0.143 ± 0.004	0.143 ± 0.005	0.150 ± 0.005	0.149 ± 0.005	0.155 ± 0.005
$(b \pm s_b) \times 10^{-3}$	11.22 ± 0.11	4.97 ± 0.10	10.46 ± 0.11	4.47 ± 0.10	9.63 ± 0.12	4.67 ± 0.11
r	0.99990	0.99963	0.99988	0.99949	0.99985	0.99947
t_{calc}	101.754	51.986	91.887	44.240	81.091	43.470
$A_{\text{blanco externo}}$	0.1387	0.1385	0.1436	0.1436	0.1478	0.1479

Longitud de onda de medida	464 (blanco reactivo)	$\Delta A(434-382)$	$\Delta A(430-390)$	$\Delta A(426-396)$
$a \pm s_a$	-0.015 ± 0.003	-0.0070 ± 0.0009	0.0074 ± 0.0008	-0.0063
$(b \pm s_b) \times 10^{-3}$	14.67 ± 0.07	6.248 ± 0.019	5.990 ± 0.019	4.962 ± 0.017
r	0.99998	0.99999	0.99999	0.99999
t_{calc}	219.734	314.472	314.608	295.022
n	4	4	4	4
Límite de detección (ppm)	1.32	0.92	0.92	0.98

TABLA 7. Parámetros analíticos correspondientes a d-metanfetamina en presencia de NQS. $a \pm s_a$ representa el valor de la ordenada y su desviación típica, $b \pm s_b$ corresponde a la pendiente y su desviación típica en ppm, r es el coeficiente de correlación, $t_{\text{calc}} = b/S_b$ es el valor del estadístico usado para un test lineal y n representa el número de puntos utilizados en el trazado de la recta.

Longitud de onda de medida	430	390	426	396	424	398
$a \pm s_a$	0.174 ± 0.006	0.175 ± 0.003	0.180 ± 0.006	0.180 ± 0.003	0.182 ± 0.005	0.182 ± 0.003
$(b \pm s_b) \times 10^{-3}$	10.03 ± 0.14	4.09 ± 0.07	9.21 ± 0.13	4.29 ± 0.08	8.79 ± 0.13	4.45 ± 0.08
r	0.99973	0.99958	0.99970	0.99952	0.99968	0.99951
t_{calc}	74.188	59.541	70.354	56.011	68.683	55.285
$A_{\text{blanco externo}}$	0.1436	0.1436	0.1478	0.1479	0.1494	0.1494

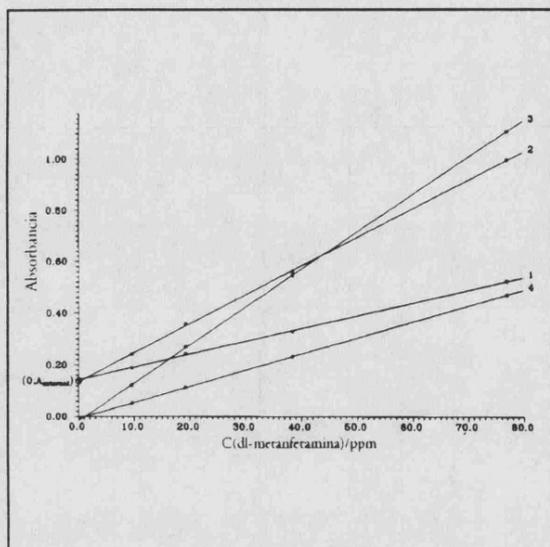
Longitud de onda de medida	464 (blanco reactivo)	$\Delta A(430-390)$	$\Delta A(426-396)$	$\Delta A(424-398)$
$a \pm s_a$	0.014 ± 0.007	-0.001 ± 0.004	0.0008 ± 0.0024	-0.0005 ± 0.021
$(b \pm s_b) \times 10^{-3}$	14.26 ± 0.16	5.94 ± 0.07	4.92 ± 0.06	4.35 ± 0.05
r	0.99982	0.99979	0.99981	0.99981
t_{calc}	90.686	83.688	88.318	87.885
n	5	5	5	5
Límite de detección (ppm)	2.25	2.44	2.31	2.32

TABLA 8. Parámetros analíticos correspondientes a dl-anfetamina en presencia de NQS. $a \pm s_a$ representa el valor de la ordenada y su desviación típica, $b \pm s_b$ corresponde a la pendiente y su desviación típica en ppm, r es el coeficiente de correlación, $t_{\text{calc}} = b/S_b$ es el valor del estadístico usado para un test lineal y n representa el número de puntos utilizados en el trazado de la recta.

Longitud de onda de medida	440	382	432	394	424	404
$a \pm s_a$	0.116 ± 0.003	0.133 ± 0.006	0.132 ± 0.004	0.143 ± 0.005	0.143 ± 0.004	0.150 ± 0.005
$(b \pm s_b) \times 10^{-3}$	18.67 ± 0.11	5.99 ± 0.20	17.72 ± 0.12	8.69 ± 0.17	16.49 ± 0.13	11.26 ± 0.15
r	0.99997	0.99887	0.99995	0.99963	0.99994	0.99981
t_{calc}	176.594	29.761	144.414	51.623	125.176	73.160
$A_{\text{blanco externo}}$	0.1436	0.1436	0.1478	0.1479	0.1494	0.1493

Longitud de onda de medida	450 (blanco reactivo)	$\Delta A(440-382)$	$\Delta A(432-394)$	$\Delta A(424-404)$
$a \pm s_a$	-0.0122 ± 0.0025	-0.016 ± 0.006	-0.011 ± 0.004	-0.0066 ± 0.0022
$(b \pm s_b) \times 10^{-3}$	19.14 ± 0.08	12.68 ± 0.20	9.03 ± 0.13	5.23 ± 0.07
r	0.99998	0.99976	0.99981	0.99983
t_{calc}	240.709	64.528	71.717	76.509
n	4	5	5	5
Límite de detección (ppm)	0.89	3.24	2.93	2.75

A)



B)

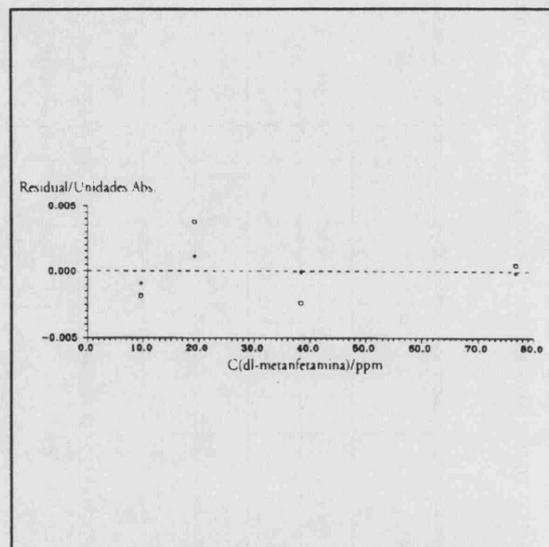


FIGURA 31. (A) Curvas de calibrado de dl-metanfetamina siendo la señal analítica el valor de absorbancia (1) a 382 nm medido frente a blanco disolvente. (2) a 434 nm registrada frente a blanco disolvente. (3) a 464 nm registrada frente a blanco reactivo. (4) ΔA (434-382 nm). Las ecuaciones correspondientes se muestran en la Tabla 6. (B) Representación de los residuales (valores absolutos) vs concentración de d-metanfetamina, \circ ΔA (426-396 nm), \square absorbancia a 464 nm medida frente blanco reactivo.

La utilización de ΔA como señal analítica, permite mejorar la linealidad respecto a la obtenida usando $A - A^{ex}_b = f(C)$, siendo A^{ex}_b el valor medido de absorbancia del blanco externo, presentado el mayor valor de t_{calc} de los valores observados (Tabla 6). Utilizando el HPSAM se obtienen rectas de calibrado con ordenadas en el origen igual a cero, debido a que en cada punto la interferencia del blanco reactivo se anula, incluso cuando la contribución al valor de absorbancia de la muestra difiere de unas disoluciones a otras. Los incrementos de absorbancia van a depender únicamente de la concentración de analito. En la Figura 31B se muestra la representación de los residuales vs la concentración de analito añadido. Como puede observarse, el HPSAM describe mejor los puntos experimentales y permite alcanzar menores límites de detección.

En la Figura 28B, se mostraban las representaciones del HPSAM cuando las ordenadas correspondientes a la rectas de calibrado a λ_1 y λ_2 (blanco interno) eran coincidentes entre ellas pero no con el valor obtenido para el blanco externo. Las causas de esta situación pueden ser diversas, por ejemplo que el reactivo no haya sido preparado correctamente, o la adición del mismo a los patrones de analito no haya sido reproducible.

En este caso es importante tener en cuenta otro factor, como podría ser la extracción ineficiente de reactivo en presencia de analito. En esta situación, la utilización de ΔA como medida de la señal analítica puede eliminar este tipo de error sistemático, que no podría ser eliminado mediante la aplicación del método tradicional. Una curva de calibrado de d-metanfetamina, cuyo espectro del derivado se muestra en la Figura 29B, presenta un comportamiento de blanco de este tipo. En este caso, aunque el blanco interno y externo no son coincidentes, la relación entre ellos en el intervalo de longitudes de onda estudiado es constante, dado que tanto el blanco interno como el externo presentan las mismas propiedades espectrales, sin embargo son de magnitudes diferentes (Figura 32). En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para tres pares de longitudes de onda en las que el blanco externo presenta el mismo valor de absorbancia. En este caso los valores absolutos del blanco interno y externo no son coincidentes, sin embargo son constantes a las mismas longitudes de onda.

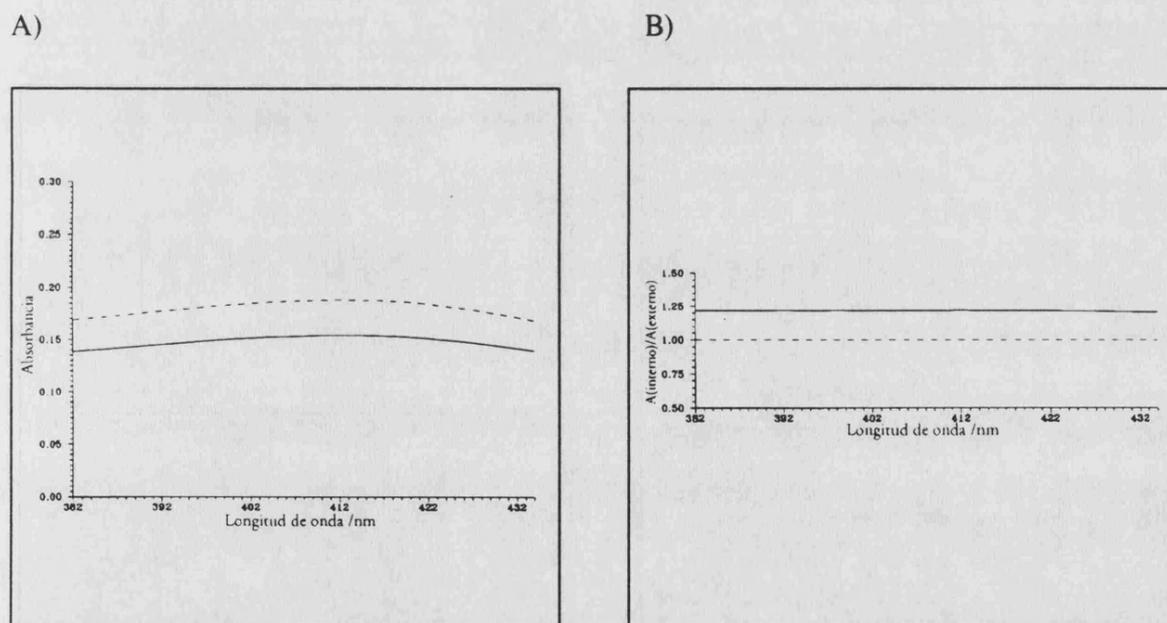


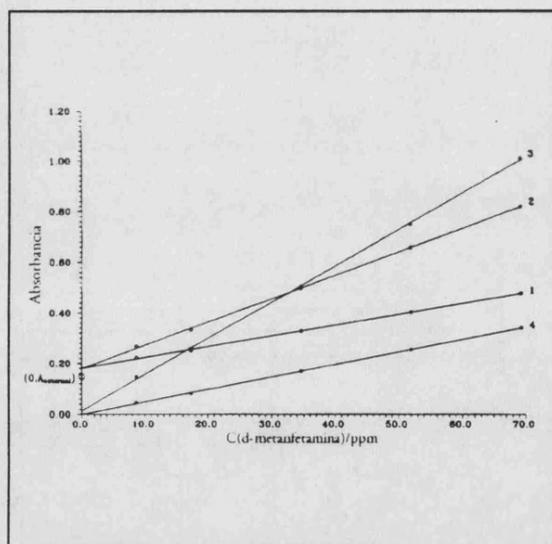
FIGURA 32. (A) Representación de los blancos interno y externo correspondientes a una curva de calibrado de d-metanfetamina utilizando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción en cloroformo. (B) Cociente entre el blanco interno y externo.

En la Figura 33A, se muestra el gráfico del HPSAM para un par de longitudes de onda. La aplicación de este método permite cancelar el error constante del blanco, aunque su señal no sea la que debería de corresponder a la concentración inicial de reactivo en la disolución, obteniendo curvas de calibrado con ordenadas en el origen cercanas a cero, siendo estos valores mucho más cercanos a cero que los obtenidos por el método tradicional.

Estos resultados permiten demostrar que si las características espectrales del blanco de orina interno y externo son iguales, aún siendo diferente su concentración la aplicación del método del HPSAM permite eliminar la interferencia del blanco presente en la muestra, tal como muestra la representación de los residuales vs la concentración de analito añadido (Figura 33B).

También se pueden encontrar ejemplos donde los espectros del blanco externo y del interno no sean coincidentes (Figura 28C), como se ha podido demostrar mediante la aplicación de este método. En este sentido, se ha observado que réplicas de disoluciones clorofórmicas del reactivo presentan diferencias en el intervalo de longitudes de onda entre 380 y 420nm. En estos casos el uso de curvas de calibrado obtenidas a la longitud de onda donde el blanco interno y externo coinciden proporciona el mínimo error.

A)



B)

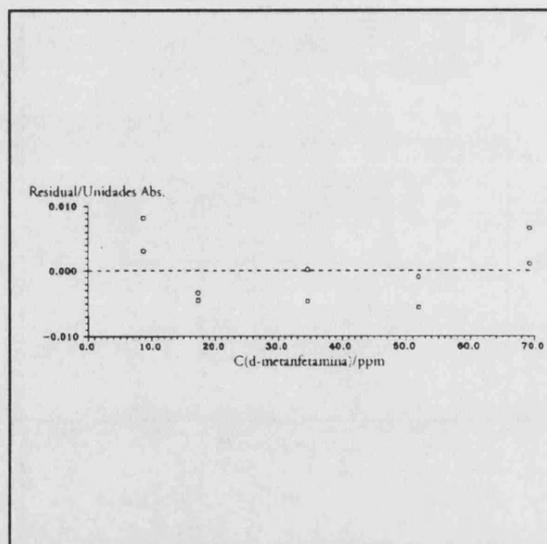
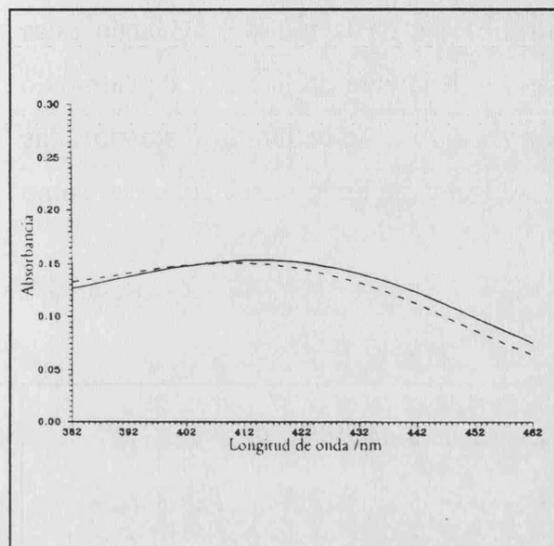


FIGURA 33.(A) Curvas de calibrado de d-metanfetamina, siendo la señal analítica el valor de absorbancia (1) a 396 nm medido frente a blanco disolvente. (2) a 426 nm registrada frente a blanco disolvente. (3) a 464 nm registrada frente a blanco reactivo. (4) ΔA (426-396 nm). Las ecuaciones correspondientes se muestran en la Tabla 7. (B) Representación de los residuales (valores absolutos) vs concentración de d-metanfetamina, \circ ΔA (426-396nm), \square absorbancia a 464 nm medida frente blanco reactivo.

En la Figura 29C se mostraba el espectro del blanco reactivo y del producto NQS-amina para 8.66 $\mu\text{g/mL}$ de dl-anfetamina. El espectro obtenido para el blanco externo y las ordenadas en el origen correspondientes a las rectas de calibrado para la determinación de dl-anfetamina como analito (blanco interno), son diferentes tal como se observa en la Figura

34A. En la Tabla 8 se dan los resultados obtenidos al utilizar ΔA como señal analítica a tres pares de longitudes de onda diferentes donde el blanco externo presenta la misma señal, sin embargo el blanco interno proporcionó diferentes valores tal como se deduce al comparar las ordenadas en el origen obtenidas a las distintas longitudes de onda.

A)



B)

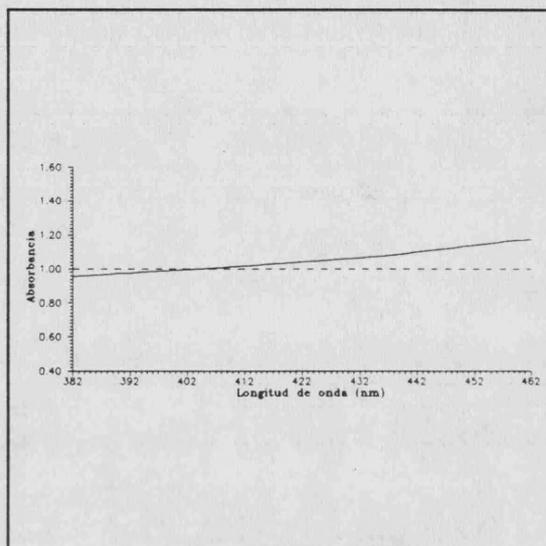
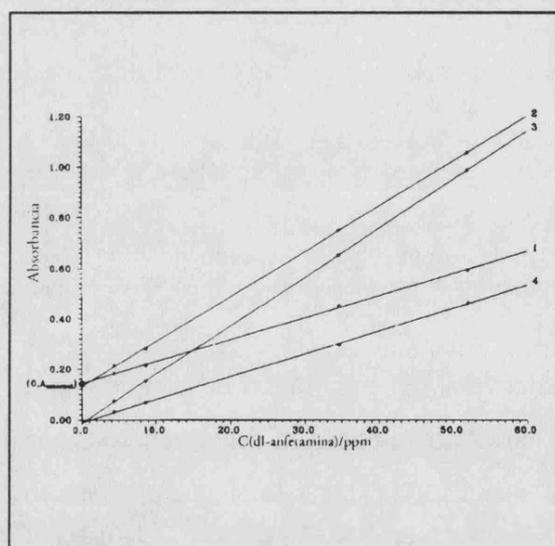


FIGURA 34. (A) Representación de los blancos interno y externo correspondientes a la curva de calibrado de dl-anfetamina utilizando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción en cloroformo. (B) Cociente entre el blanco interno y el externo.

En la Figura 35A, se muestra la aplicación del HPSAM para el par de longitudes de onda 432-394 nm. La curva de calibrado obtenida no es coincidente en cero, debido a que en este caso b'_o distinto de A'_o . Además, el valor del estadístico t_{calc} es menor que el obtenido para la curva de calibrado utilizando los valores de absorbancia como señal analítica, debido a que los fundamentos del HPSAM no son aplicables, y los incrementos de absorbancia no sólo se deberán a la concentración de analito. La representación de los residuales vs la concentración de analito añadido (Figura 35B) muestra que el método describe peor los datos experimentales. Cuando se presenta una situación de este tipo, no se pueden seleccionar dos longitudes de onda en las que el blanco externo presente la misma absorbancia para la aplicación del HPSAM. El tratamiento de los datos de forma tradicional o mediante la aplicación del HPSAM, conduce a la obtención de medidas afectadas de error, sino se aplica

un procedimiento para eliminarlo. El procedimiento tradicional puede ser utilizado si se puede demostrar que al menos existe una longitud de onda en la que el blanco interno y externo son iguales y además la concentración de reactivo puede considerarse constante para todo el intervalo dinámico de concentraciones de analito. Esta última condición no se cumplirá si no trabajamos en condiciones de exceso de reactivo o en el caso de procedimientos extracto-espectrofotométricos si en la fase orgánica no se extrae la misma cantidad, independientemente de la concentración de analito presente en la muestra. Cuando estas condiciones no se cumplen, se obtiene un valor para la pendiente de la curva de calibrado diferente del valor real de la misma. La utilización de curvas de calibrado distorsionadas conducirá a que los resultados analíticos estén afectados por un error sistemático, tal como se demuestra en (95).

A)



B)

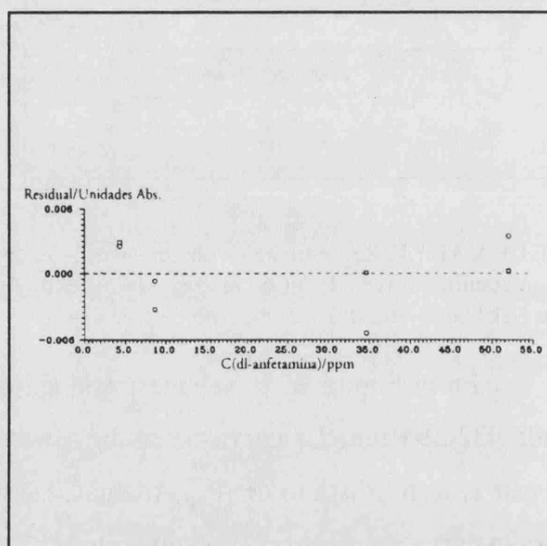


FIGURA 35.(A) Curvas de calibrado dl-anfetamina. (1) a 394 nm medido frente a blanco disolvente. (2) a 432 nm registrada frente a blanco disolvente. (3) a 450 nm registrada frente a blanco disolvente reactivo. (4) ΔA (432-394 nm). Las ecuaciones correspondientes se muestran en la Tabla 8. (B) Representación de los residuales (valores absolutos) vs concentración de dl-anfetamina, ○ usando ΔA (432-394nm) como señal analítica, □ usando como señal el valor de absorbancia a 450 nm medida frente blanco reactivo.

En la determinación estudiada, se ha comprobado que la concentración de reactivo NQS extraído en la fase orgánica es constante e independiente de la concentración de analito presente en la muestra. Este resultado se ha establecido en base a que las pendientes de las rectas obtenidas en exceso de reactivo son las mismas que las obtenidas en defecto. En este

último caso, el reactivo dirige la reacción. En la Figura 36A se muestran las pendientes de las rectas obtenidas correspondientes al producto de reacción anfetamina-(NQS)₂ en exceso y defecto de NQS. Como se puede observar en la Figura 36B los valores obtenidos son iguales en más de un 95%. Esto demuestra que la concentración de reactivo libre extraído en todos los casos es la misma, dado que la saturación de la fase orgánica hace que su concentración sea constante para todas las disoluciones en las que se ha aplicado el método.

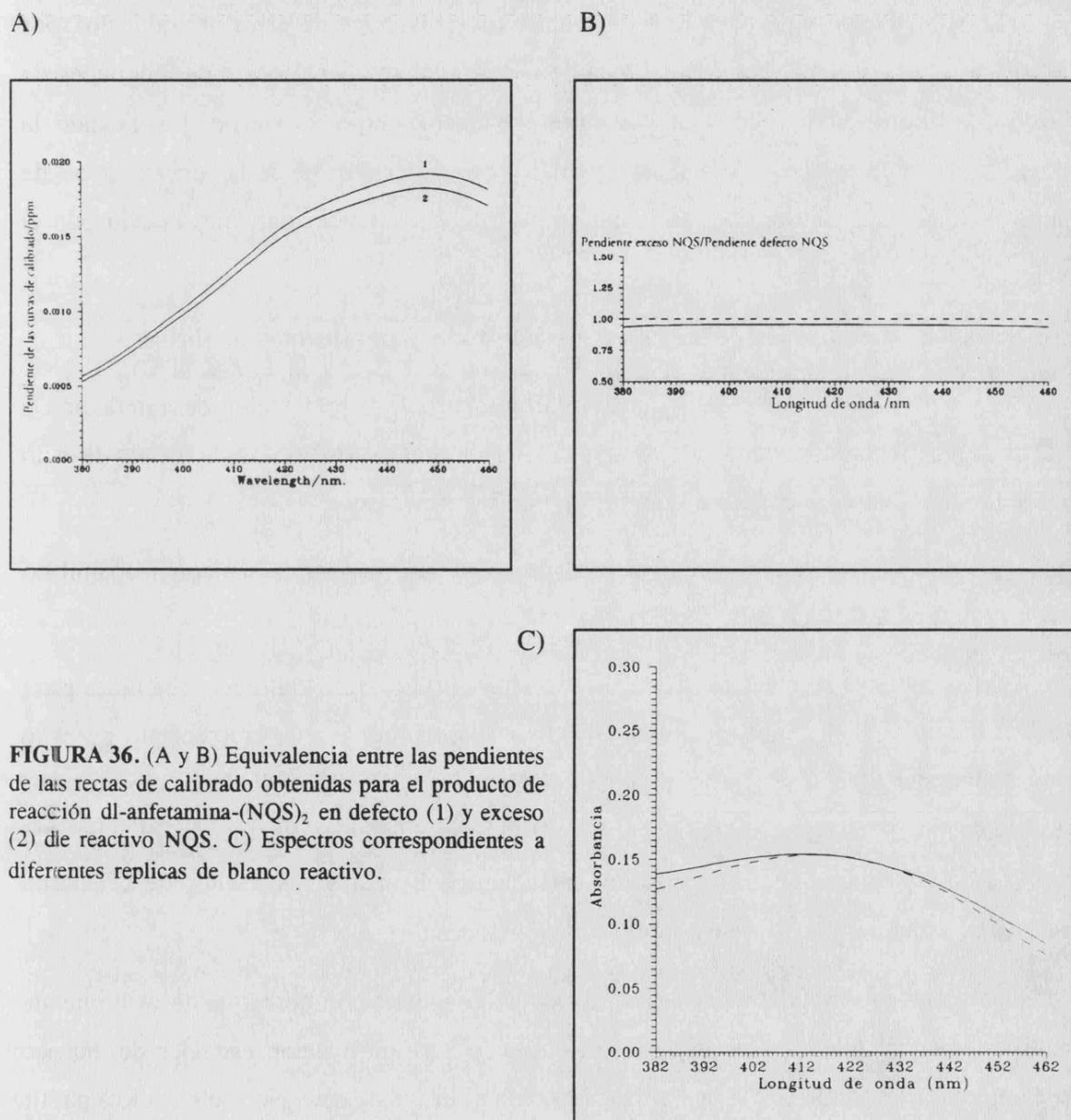


FIGURA 36. (A y B) Equivalencia entre las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para el producto de reacción dl-anfetamina-(NQS)₂ en defecto (1) y exceso (2) de reactivo NQS. C) Espectros correspondientes a diferentes replicas de blanco reactivo.

El comportamiento espectral del blanco es similar trabajando en el intervalo de 430-460 nm (Figura 36C). Por lo tanto habrá que seleccionar una longitud de onda dentro de este intervalo para que el error en la determinación del analito sea mínimo. A esta zona de longitudes de onda pertenecen los máximos de absorción en la región visible de estos productos de reacción, sin embargo estos estudios imposibilitan la utilización de los máximos de absorción de la región ultravioleta.

El HPSAM permite por tanto evidenciar diversos tipos de error introducidos por blancos absorbentes. La aplicación del método o en su defecto la selección de longitudes de onda donde exista máxima coincidencia entre el blanco interno y externo, justificando la constancia de su contribución a la señal analítica independientemente de la concentración de analito, son las dos vías posibles de eliminación del error sistemático introducido por el blanco.

3.4.1.3.- Ecuaciones de las rectas de calibrado y parámetros analíticos

En medio CHCl_3 se ha seleccionado 450 nm para la determinación de anfetamina y efedrina, y 464nm para metanfetamina. Si el disolvente orgánico es n-hexano:acetato de etilo la longitud de onda de medida ha sido 450 nm en los tres casos.

En relación a la determinación de efedrina se ha ensayado también alcohol isoamílico siendo la longitudes de onda de medida 468nm.

En la Tabla 9 se muestran las ecuaciones de las curvas de calibrado obtenidas para a) Anfetamina-NQS, b) Metanfetamina-NQS con cloroformo y n-hexano:acetato de etilo como disolventes de extracción del producto de reacción c) Efedrina-NQS con cloroformo, acetato de etilo y alcohol isoamílico como disolventes. También se incluye el intervalo dinámico de concentración, la desviación estándar del blanco y los límites de detección referidos al volumen inicial tomado de disolución acuosa.

El límite inferior del intervalo dinámico de concentración corresponde al límite de cuantificación, calculado como $10(S_b/m)$ (98), siendo S_b la desviación estándar del blanco reactivo, y m la pendiente de la curva de calibrado. El límite de detección se calculó a partir de la expresión $3S_b/m$ (99). Como puede observarse, para la determinación de anfetamina y metanfetamina cuando se utiliza cloroformo se obtiene la mayor sensibilidad, sin embargo

debido a la dispersión de valores del blanco reactivo se obtienen límites de cuantificación y detección elevados. En base a estos resultados, se optó por usar n-hexano:acetato de etilo (1:1) para la extracción del producto de reacción, que aunque supone una pérdida de sensibilidad permite mejorar los límites de detección y cuantificación.

Con relación a los productos de reacción efedrina-NQS indicar que la utilización de alcohol isoamílico permitió aumentar la sensibilidad en alrededor un 50 % permitiendo mejorar los límites de cuantificación y de detección respecto a los obtenidos utilizando cloroformo o acetato de etilo.

En relación al producto de reacción anfetamina-NQS, se obtiene la misma sensibilidad independientemente de las condiciones de reacción, por lo que la utilización de condiciones de pH 10 permitirá disminuir el tiempo de reacción y la temperatura de calefacción. Para metanfetamina a pH 10 la pendiente del calibrado es superior que a pH 7.5.

Al comparar los resultados obtenidos entre ambos procedimientos, se observa que la utilización de tampón bicarbonato/carbonato de pH 10 permite:

- * Reducir la interferencia del blanco reactivo.
- * Aumentar la sensibilidad (para el producto MA-NQS).
- * Disminuir los límites de detección y cuantificación.
- * Disminuir el tiempo y la temperatura de reacción.

Por lo que un medio de pH=10 es el más idóneo para la determinación de estas aminas mediante su reacción con NQS. En el caso de la efedrina la extracción con alcohol isoamílico aumenta la sensibilidad del método.

TABLA 9. Parámetros analíticos del producto de reacción anfetamina-NQS usando diferentes disolventes orgánicos para la extracción. A) anfetamina, B) metanfetamina C) efedrina.

pH	Disolvente de extracción	Curva de calibrado	Intervalo dinámico mg/L	S _B	L.D (mg/L)
A) pH 10.0	n-hexano: acetato de etilo (1:1) λ450 nm	a = 1.8x10 ⁻³ b = 0.01447 S _{yx} = 5.8x10 ⁻⁴ t _{test lineal}	1.4-50.0	0.006	0.4
	CHCl ₃ λ450 nm	a = 6x10 ⁻³ b = 0.01856 S _{yx} = 6.8x10 ⁻³ t _{test lineal}	1.1-50.0	0.006	0.3
pH 7.5	n-hexano: acetato de etilo (1:1) λ450 nm	a = -8.86x10 ⁻³ b = 0.01460 S _{yx} = 5.9x10 ⁻⁴ t _{test lineal}	1.4-50.0	0.006	0.4
	CHCl ₃ λ450 nm	a = -9.32x10 ⁻³ b = 0.01836 S _{yx} = 9.9x10 ⁻³ t _{test lineal}	6.0-50.0	0.030	1.8
B) pH = 10	CHCl ₃ λ464 nm	a = 2.85x10 ⁻³ b = 0.02627 S _{xy} = 8.1x10 ⁻³ t _{test lineal}	0.6-35.0	0.006	0.2
	n-hexano: acetato de etilo (1:1) λ450 nm	a = 4.90x10 ⁻³ b = 0.02122 S _{xy} = 2.6x10 ⁻³ t _{test lineal}	0.9-35.0	0.006	0.3
pH = 7.5	CHCl ₃ λ464 nm	a = 1.90x10 ⁻² b = 0.01401 S _{xy} = 5.6x10 ⁻³ t _{test lineal}	7.1-50.0	0.030	2.1
	n-hexano: acetato de etilo (1:1) λ450 nm	a = -3.25x10 ⁻⁴ b = 0.01246 S _{xy} = 6.6x10 ⁻³ t _{test lineal}	1.6-50.0	0.006	0.5
C) pH 7.5	Alcohol isoamílico (λ468 nm)	a = -7.40x10 ⁻³ b = 15.7x10 ⁻³ S _{yx} = 5.4x10 ⁻³ t _{test lineal}	2.1-50.0	0.010	0.6
	n-hexano: acetato de etilo (1:1) (λ450 nm)	a = -6.023x10 ⁻³ b = 8.9x10 ⁻³ S _{yx} = 8.6x10 ⁻³ t _{test lineal}	3.7-50.0	0.010	1.1
	cloroformo (λ450 nm)	a = 2.350x10 ⁻³ b = 9.8x10 ⁻³ S _{yx} = 5.6x10 ⁻³ t _{test lineal}	10.2-50.0	0.030	3.1

3.4.2.- Tratamiento preliminar de las muestras de orina

Esta etapa según refleja la bibliografía es prácticamente obligada en este tipo de determinaciones.

Se han comparado diversos tipos de tratamiento preliminar de muestras previamente a la derivatización con NQS, precipitación, extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido. También se ensayó el uso directo de las muestras de orina.

3.4.2.1.- Procedimientos experimentales

Procedimiento I - Utilización directa de las muestras de orina.

Las muestras de orina con o sin analito se prepararon añadiendo 4.0 mL de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfetamina (1 g/mL) o agua destilada a 100 mL de orina. A 1 mL de orina (con y sin anfetamina) se adicionó 1 mL de tampón de pH 7.5 y 1 mL de NQS (0.5%) siendo el volumen final de 3 mL. Posteriormente, se procedió a realizar la derivatización y extracción del producto de reacción tal y como se ha indicado para las disoluciones patrón (página 88).

Procedimiento II - Precipitación de los componentes endógenos de la orina

Se partió de diferentes muestras de orina. Para cada una de ellas, a 100 mL (con o sin anfetamina) se añadió NaOH 1M. La muestra resultante se centrifugó y un volumen conocido del sobrenadante se llevó a pH 7.5. Finalmente, a 1 mL de la orina así tratada, se le añadió 1 mL de tampón de pH 7.5, cantidades variables de sulfato de anfetamina a partir de una disolución patrón de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 0.5 mL de reactivo NQS (1.0%), siendo el volumen total de 3 mL. El procedimiento de derivatización y extracción del producto de reacción se realizó tal y como se ha indicado anteriormente.

Procedimiento III - Extracción sólido-líquido

Las muestras para el análisis fueron preparadas adicionando a 10.0 mL de orina, 1 mL de una disolución acuosa de concentración 110 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfetamina o agua destilada en el caso del blanco de orina, de forma que la concentración final en la muestra fue de aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$. Se han utilizado columnas de extracción en fase sólida de tipo Bond-Elut C18, C8, C2, CH, PH y CN

(Scharlau), con una capacidad de carga de 100 mg/mL. Estas columnas fueron activadas con 500 μ L de metanol, y seguidamente 500 μ L de agua destilada para evitar el contacto directo del metanol con la muestra. A continuación se eluyen 2 mL de muestra de orina, la matriz de la muestra se elimina lavando con 2.5 mL de agua destilada. Los analitos retenidos en la columna son eluidos con 1.0 mL de metanol. Para pasar los disolventes y las muestras a través de la columna se aplicó presión con una jeringa conectada a ésta mediante un adaptador. A las disoluciones de MeOH resultantes se les añade 50 μ L de una disolución de EtOH:HCl (6:1), siendo posteriormente llevadas a sequedad. Las muestras fueron reconstituidas en 1.0 mL de agua destilada, 1.0 mL de tampón dihidrogeno/monohidrogeno fosfato pH 7.5 o tampón bicarbonato/carbonato pH 10 y 1.0 mL de reactivo NQS (0.5%). Finalmente, las muestras se procesaron de acuerdo con el procedimientos descrito para las disoluciones patrón (página 88).

Una vez utilizadas, las columnas fueron regeneradas haciendo pasar 2 mL de metanol, y seguidamente 1 mL de agua, para eliminar los posibles compuestos de baja y alta polaridad, respectivamente, que se pudieron quedar retenidos.

Procedimiento IV - Extracción líquido-líquido.

En base al procedimiento descrito por Endo y col.(57) se realizó la extracción utilizando n-hexano. Para ello, se tomaron volúmenes de orina de 5 o 10 mL a los que previamente se adicionó una cantidad conocida de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfetamina a partir de una disolución patrón de 100 μ g/mL o agua en el caso de los blancos de orina. El procedimiento de extracción se realizó en medio básico, en este caso se añadió 0.1 mL de amoníaco concentrado por cada 5 mL de orina, alcanzándose un valor de pH próximo a 10. A continuación los 5 o 10 mL de la orina fueron extraídos en 5 o 10 mL de n-hexano con agitación mecánica, con posterior centrifugación para eliminar la emulsión formada entre ambas fases. El procedimiento de extracción se realizó 3 veces, disponiendo al final de un volumen total de 15 o 30 mL de n-hexano al que se le adicionó 50 o 100 μ L de una disolución de EtOH-HCl (6:1). Estos extractos se evaporaron con rotavapor y el residuo obtenido se regeneró en 1.0 mL de agua destilada al que se añadió 1.0 mL de tampón pH 7.5 o pH 10.0 y 1.0 mL de NQS (0.5%). Las mezclas así preparadas fueron tratadas según el procedimiento descrito para los patrones (página 88).

3.4.2.2.- Resultados y discusión

3.4.2.2.1.- Sin tratamiento preliminar

Cuando las muestras de orina no se sometieron a ningún tipo de tratamiento la interferencia de blanco de orina fue la que se muestra en la Figura 37a. Al comparar la sensibilidad obtenida (5.92×10^{-3}) en presencia de anfetamina con la correspondiente a las disoluciones patrón, se observa una disminución de este parámetro (Tabla 9, página 105). Por ello, aunque la utilización directa de las muestras de orina supone un importante ahorro de tiempo en el análisis, no es recomendable este procedimiento dada su baja sensibilidad si bien los resultados obtenidos son aceptables en el intervalo de concentración ($30-100 \mu\text{g/mL}$).

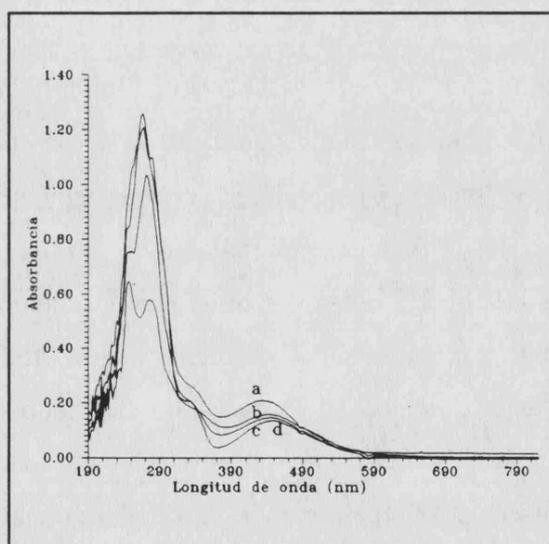


FIGURA 37. Blancos de orina, medidos frente a blanco reactivo, para los distintos tipos de tratamientos de muestra ensayados. a) Utilización directa $V = 1.0 \text{ mL}$, b) Con precipitación de los componentes endógenos $V = 1.0 \text{ mL}$, c) Con extracción sólido-líquido $V = 2.0 \text{ mL}$, d) Con extracción líquido-líquido (3 extracciones) $V = 5.0 \text{ mL}$. Cond: NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{ M}$, temp. 70°C 30 min $\text{pH} = 7.5$.

3.4.2.2.2.- Precipitación de los componentes endógenos de la orina.

Al realizar la precipitación de componentes endógenos de la orina, no se observaron diferencias apreciables en cuanto a la respuesta del blanco de orina en relación a la señal obtenida en el procedimiento I (Figura 37). La sensibilidad en presencia de anfetamina también es menor que la correspondiente a disoluciones patrón aunque mayor que la obtenida con el procedimiento I. Los componentes endógenos de la orina al reaccionar con el reactivo NQSS, presentan un espectro muy similar al obtenido para el producto de reacción anfetamina-

NQS consumiendo reactivo (Figura 25 página 80). Para comprobar este supuesto, se adicionó reactivo después de extraer los productos de reacción. Las muestras fueron nuevamente calentadas a 70°C durante 30 min. y extraídas en disolvente orgánico, permitiendo que la anfetamina existente en la fase acuosa que no había reaccionado anteriormente lo hiciera, de modo que al realizar la segunda extracción se comprueba que la reacción entre el NQS y la anfetamina ha tenido lugar. Análogamente, también se observa que el blanco de la orina sin anfetamina tanto en la primera como en la segunda extracción son iguales. Dichos resultados indican que independientemente de la cantidad de compuestos endógenos de la orina que hayan reaccionado, la señal analítica que se obtiene en la fase orgánica es constante, habiéndose producido por tanto una saturación de la fase orgánica respecto los componentes endógenos de la orina.

A la vista de los resultados, se ensayó una concentración de reactivo de 12.6×10^{-3} M. La utilización de mayor cantidad de reactivo aumentó la señal correspondiente al blanco reactivo (debido a la relación lineal existente entre la concentración de reactivo y la cantidad de éste que se extrae en la fase orgánica) sin embargo la interferencia correspondiente al blanco de orina es similar a la obtenida con los otros procedimientos (Figura 37). En estas condiciones la sensibilidad aumenta, y la pendiente del método de adición estándar ($m=0.01718$) es similar a la obtenida en la curva de calibrado con patrones utilizando cloroformo como disolvente de extracción del producto de reacción (Tabla 9). Estos resultados indicarían la ausencia de efecto matriz. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 38 el blanco de orina introduce un error sistemático de tipo constante que debe de ser evaluado para la determinación de anfetamina exenta de error en la muestra. En este caso, corrigiendo el error introducido por el blanco de orina, la concentración de anfetamina presente en muestras de orina puede ser determinada con una desviación estándar del 2 % para un intervalo dinámico de concentraciones de 30-100 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.2.2.3.- Extracción sólido-líquido

Al igual que en los procedimientos descritos anteriormente, la extracción en fase sólida no ha permitido la eliminación de la interferencia del blanco de orina (Figura 37). Todas las columnas ensayadas dieron blancos de orina similares, siendo iguales entre si e iguales a las obtenidas mediante la aplicación de los procedimientos I y II. Sin embargo, en este caso la sensibilidad obtenida en presencia de analito es considerablemente mayor. Teniendo en cuenta

la interferencia del blanco de orina y por sustitución de la señal analítica en la curva de calibrado de los patrones, se calcularon los porcentajes de recuperación del analito. En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de recuperación de anfetamina y metanfetamina para las distintas columnas ensayadas. Como puede observarse, en todos los casos independientemente de la columna y para ambos analitos se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores al 80% para un volumen de muestra de 2 mL. La utilización de mayores volúmenes de orina (4.5 mL) ensayados con el objeto de alcanzar los límites de detección requeridos no aumenta considerablemente la señal correspondiente al blanco de orina sin embargo la dispersión de resultados es significativamente superior.

TABLA 10. Porcentajes de recuperación de anfetamina y metanfetamina utilizando distintos tipos de columnas de extracción en fase sólida.

Columna	Anfetamina	Metanfetamina
C8	86±1	74±18
C18	92±13	97±4
C2	76±8	86±3
CH	77±1	76±2
PH	85±7	86±8
CN	81±2	96±4

3.5.2.2.4.- Extracción líquido-líquido

Al igual que en los otros procedimientos estudiados, existe una interferencia de blanco de orina (Figura 37). La interferencia de la orina es similar a la obtenida en los otros procedimientos si bien el volumen de orina tomado es superior.

De acuerdo con Endo y col.(57), la realización de tres extracciones consecutivas permite obtener una recuperación de aproximadamente del 100 %, (Tabla 11) tanto en el caso de anfetamina como de metanfetamina, dado que las pendientes correspondientes a la adición estándar son similares a las de la curva de calibrado con patrones. Mientras que si la extracción se realiza dos veces el porcentaje de recuperación disminuye aproximadamente un 20% en el caso de anfetamina y menos de un 10% cuando se trata de metanfetamina. Del mismo modo cuando la extracción se realiza con un volumen la mitad al de la muestra inicial el porcentaje de recuperación es todavía menor disminuyendo aproximadamente un 30%.

Estos han sido obtenidos por comparación de las pendientes obtenidas en cada caso con las pendientes correspondientes a la curva de calibrado con patrones. Aunque la realización de dos extracciones en lugar de tres implica obtener menores porcentajes de recuperación, se ha seleccionado esta opción debido a que la interferencia del blanco de orina es ligeramente inferior y la cantidad de disolvente a evaporar es menor, siendo el procedimiento más rápido.

Cuando la muestra es extraída con n-hexano aunque el volumen de orina utilizado (5 mL) es superior que para el resto de los tratamientos, la sensibilidad obtenida es mayor (Figura 38A) debido a que parte de las sustancias que pueden interferir en la determinación han sido eliminadas, existiendo mayor cantidad de reactivo disponible para reaccionar con la anfetamina presente en la muestra coincidiendo estos resultados con los obtenidos en presencia de mayor cantidad de reactivo. Cuando se representa la absorbancia de la muestra restándole el blanco correspondiente de orina (Figura 38B) la ordenada en el origen obtenida es próxima a cero, indicando por tanto que la orina introduce un error de tipo constante en la determinación y por ello es necesario evaluar lo previamente a la determinación.

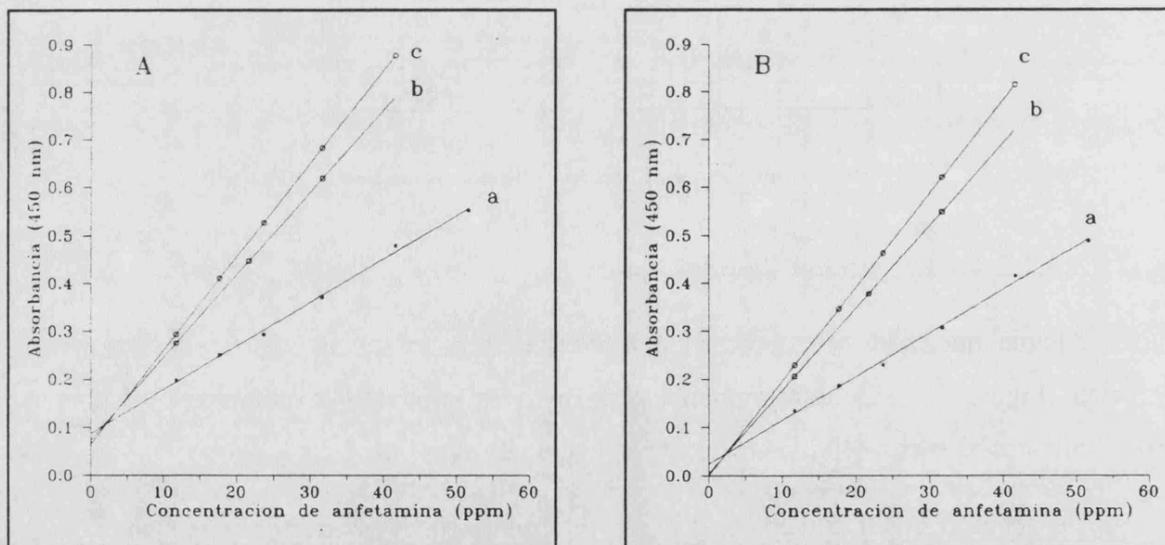


FIGURA 38. Representación de la absorbancia a 450 nm vs concentración de anfetamina, cuando la muestra ha sido procesada con distintos tipos de tratamiento. A) Sin restar el blanco de orina B) restando el blanco de orina. Con precipitación de los componentes endógenos a) NQS 0.5%, b) NQS 1.0% , c) con extracción líquido-líquido 3 veces consecutivas. Condiciones NQS 6.4×10^{-3} M, temp. 70 °C 30 min.

En la Tabla 11 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos mediante los diversos procedimientos ensayados. Como se puede observar tanto para anfetamina como metanfetamina, los mejores resultados son obtenidos mediante la utilización de la técnica de

extracción líquido-líquido tres veces consecutivas. No obstante con la extracción sólido-líquido se obtienen buenos porcentajes de recuperación sin embargo no ha sido aplicable a la determinación espectrofotométrica de estas aminas dada la dispersión de resultados obtenidos en relación al blanco de orina si se utiliza 4.5 mL de orina.

TABLA 11. Porcentajes de recuperación obtenidos para anfetamina y metanfetamina utilizando varios tratamientos preliminares de muestra.

Porcentajes de recuperación obtenidas para los diversos tipos de tratamiento			
Tratamiento		Anfetamina	Metanfetamina
Sin tratamiento		32	-----
Con precipitación de los componentes endógenos	NQS 0.5%	50	-----
	NQS 1.0%	94	-----
Extracción líquido-líquido	3 extracciones	99.0	102.0
	2 extracciones	76 ± 5	92 ± 8
Extracción sólido-líquido (C18)		92 ± 13	97 ± 4

3.4.2.3.- Conclusiones

Independientemente del tratamiento previo de la muestra, precipitación, extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado obtenidas al derivatizar con NQS, han coincidido con el blanco de orina correspondiente. Estos valores han sido similares para diferentes volúmenes de muestra tomados. Dependiendo de las concentraciones existentes en la muestra podremos utilizar un tipo de tratamiento u otro. No obstante, dado que las concentraciones de anfetamina y metanfetamina en orina suelen ser bajas, parece en principio recomendable seleccionar la extracción líquido-líquido con n-hexano como tratamiento previo de muestras puesto que permite obtener límites de cuantificación y detección más bajos utilizando el procedimiento extracto-colorimétrico.

Si se incorpora una etapa de separación tal es el caso de la utilización de la técnica CLAR se tendrá que considerar también la extracción sólido-líquido y estudiar cual de los procedimientos resulta más ventajoso.

3.4.3.- Etapa de calibración para muestras reales

Caracterización de errores sistemáticos

3.4.3.1.- Blanco de orina

Del apartado anterior se deriva que el blanco de orina contribuye a la señal analítica total, por lo que en esta sección se caracteriza el tipo de error sistemático que introduce, apuntando soluciones para eliminarlo en medios de pH 7.5 y 10.0.

3.4.3.1.1.- Influencia del disolvente

Procedimiento experimental

Se han ensayado como disolventes de extracción de los productos de reacción con NQS, cloroformo, acetato de etilo:n-hexano (1:1), alcohol isoamílico y acetato de etilo. Las muestras de orina han sido tratadas según los procedimientos de derivatización descritos en la página 88. El tratamiento preliminar de la muestra ha sido la extracción líquido-líquido con n-hexano (página 107).

Los espectros han sido registrados frente a blanco disolvente en el caso de las muestras de orina sin analito y blanco de orina en las muestras que contenían las drogas. Las muestras de orina tratadas corresponden a sujetos normales.

Resultados y discusión

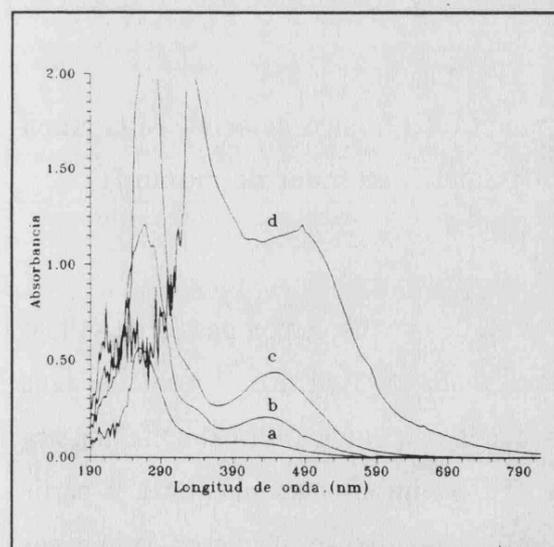
En la Figura 39A se muestran los espectros de absorción de muestras de orina sometidas a extracción líquido-líquido con n-hexano y derivatización con NQS a pH 7.5 (70°C, 30 min.), la menor señal analítica se obtiene utilizando como disolvente de extracción de los productos de reacción una mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:1). La utilización de disolventes de mayor polaridad aumenta la extracción de los productos endógenos de la orina, el caso más extremo y negativo lo constituye el alcohol isoamílico. De ahí se puede derivar que no será factible la determinación de efedrina en muestras de orina en condiciones óptimas, ya que este es el disolvente más adecuado para la extracción de los derivados NQS-efedrina, si bien sí será factible en preparados farmacéuticos como se demostrará en un apartado posterior de esta memoria. Tampoco será posible su determinación en los niveles

exigidos en el análisis de muestras de orina empleando los demás disolventes de extracción, lo que esta de acuerdo con la bibliografía (67-73).

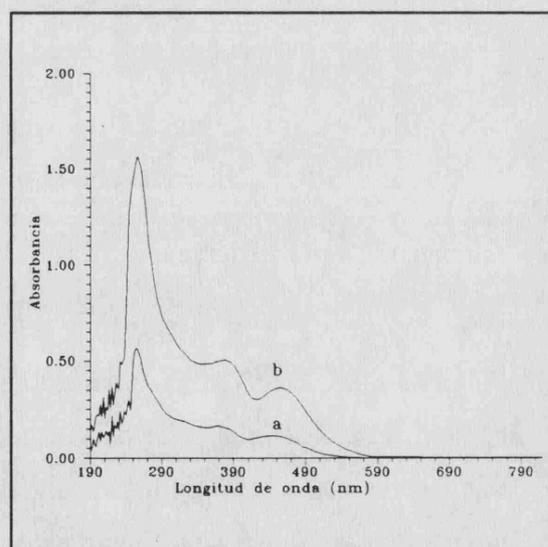
Los espectros de absorción de muestras de orina tratadas con derivatización a pH 10.0 (45 °C y 5 min.) presentan con las mismas características que los expuestas tal como se refleja en la Figura 39C.

La Figura 39 corresponde a los espectros de absorción del producto NQS-anfetamina y NQS-metanfetamina en los diferentes disolventes ensayados, la forma de éstos es semejante a la obtenida con patrones aportando el cloroformo la mayor sensibilidad. Sin embargo, se selecciona la mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:1) con el propósito de disminuir la interferencia introducida por la orina aunque ello suponga una ligera pérdida en la sensibilidad del método. La cantidad de disolvente a utilizar deberá ser igual al volumen de partida (3 mL) ya que volúmenes inferiores afectan negativamente al porcentaje de recuperación.

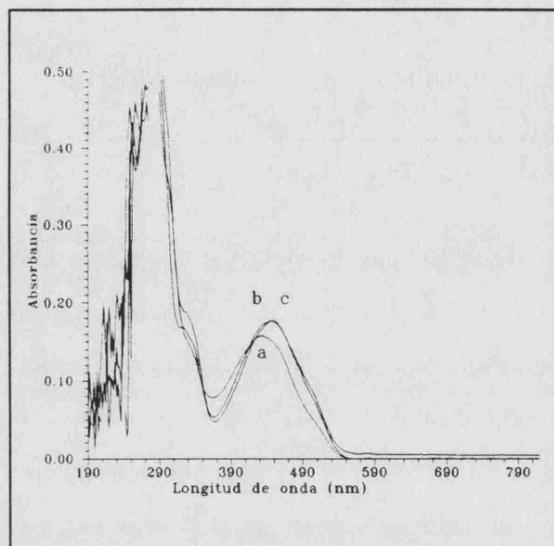
A)



C)



B)



D)

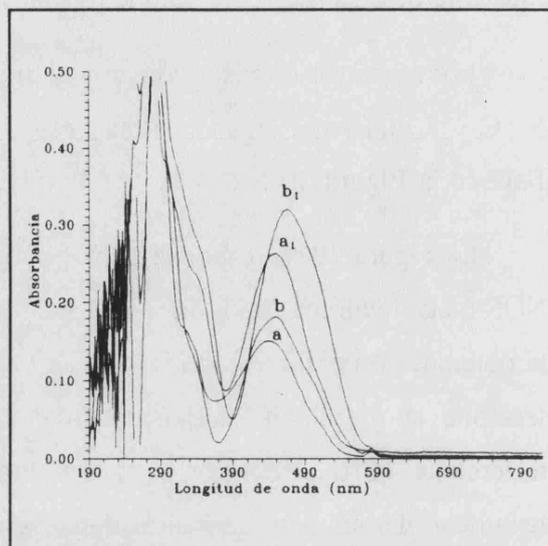


FIGURA 39. Espectros de absorción del blanco orina (medido frente blanco disolvente) utilizando distintos disolventes de extracción del producto de reacción a) n-hexano:acetato de etilo (1:1), b) cloroformo, c) acetato de etilo, d) alcohol isoamílico. Las muestras de orina han sido previamente extraídas con n-hexano (3 extracciones). Condiciones: NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, pH 7.5, Temp. 70°C , 30 min., A) NQS, B) NQS-anfetamina 15.8 mg/L. pH 10.0, Temp. 45°C , 5 min., C) NQS, D) NQS-anfetamina 12.9 mg/L y NQS-metanfetamina (1) 12.9 mg/L.

3.4.3.1.2.- Caracterización del comportamiento del blanco de orina en la etapa de calibración por el método de adición estándar del punto H

Procedimiento experimental

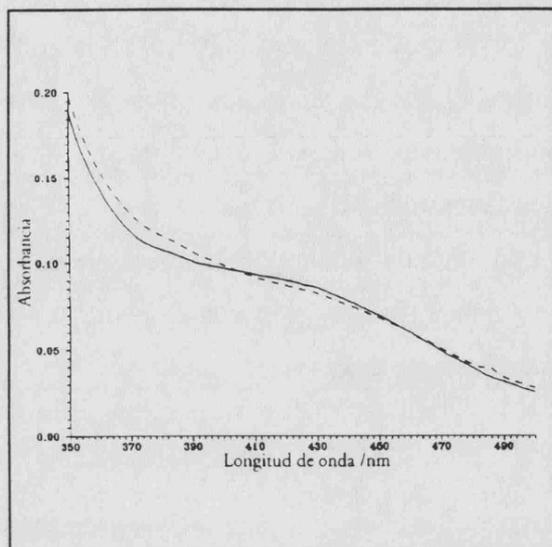
A muestras de orina (100 mL) se adicionó 1 mL de una disolución patrón de sulfato de anfetamina ($465 \mu\text{g/mL}$) ó clorhidrato de metanfetamina ($505 \mu\text{g/mL}$) ó 1 mL de agua destilada (en el caso del blanco de orina), de forma que la concentración final en la muestra fue de aproximadamente $4.6 \mu\text{g/mL}$ de anfetamina o $5.0 \mu\text{g/mL}$ de metanfetamina. A partir de esta muestra se tomaron alícuotas de 5 o 10 mL, a las que se añadieron volúmenes variables de sulfato de anfetamina (232mg/L) o clorhidrato de metanfetamina (250mg/L) o agua destilada (en el caso del blanco de orina) hasta completar un volumen de 5.3 o 10.6 mL. Seguidamente, se añadió 0.1 ó 0.2 mL de amoníaco concentrado y se procedió a la extracción de los analitos de acuerdo con el procedimiento de extracción líquido-líquido (realizándose la extracción con n-hexano dos o tres veces consecutivas). Disponiendo al final de un volumen total de 16 o 32 mL de n-hexano al que se adicionó 50 o $100 \mu\text{g/mL}$ de una

disolución de EtOH-HCl (6:1). Estos extractos se evaporaron utilizando un rotavapor y el residuo obtenido se regeneró en 1.0 mL de agua destilada, en el caso de la determinación de anfetamina se añadió 1.0 mL de tampón de pH 7.5 y 1.0 mL de reactivo NQS (0.5%). La mezcla resultante se calentó a 70°C durante 30 min. Mientras que en la determinación de metanfetamina y también para anfetamina, el residuo obtenido se regeneró igualmente con 1.0 mL de agua destilada, al que se añadió 1.0 mL de tampón de pH=10 y 1.0 mL de NQS (0.5%), la mezcla resultante en este caso se calentó a 45 °C durante 5 min. En ambos casos, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 min. y posteriormente los productos de reacción fueron extraídos en n-hexano:acetato de etilo (1:1).

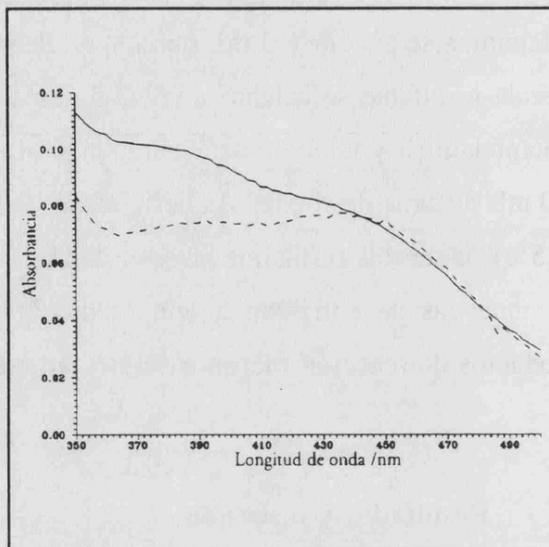
Resultados y discusión

Análogamente al estudio sobre el blanco reactivo por el método de adición estándar del punto H, se ha estudiado el comportamiento del blanco de orina. En la Figura 40, se muestran los blancos de orina interno y externo obtenidos para dos muestras diferentes sometidas a extracción previa con n-hexano y posterior derivatización con NQS (A,B), como puede observarse los blancos obtenidos son diferentes a longitudes de onda menores de 430 nm. Del mismo modo al comparar los blancos internos y externos para cada una de las muestras de orina se observa que éstos presentan diferencias, sin embargo para longitudes de onda comprendidas entre 430 y 480 nm ambos blancos son iguales, tal que al representar el cociente entre el blanco externo e interno (Figura 40) se aprecia que en este intervalo de longitudes de onda son coincidentes entre sí para las dos réplicas ensayadas. Estos resultados indican que ésta sería la zona más idónea para la determinación de analito, correspondiendo a la región del espectro donde aparecen los máximos del producto de reacción NQS-anfetamina, tal como se concluyó en el apartado al respecto sobre la influencia del reactivo en la etapa de calibración con disolución patrón (página 103).

A)



B)



C)

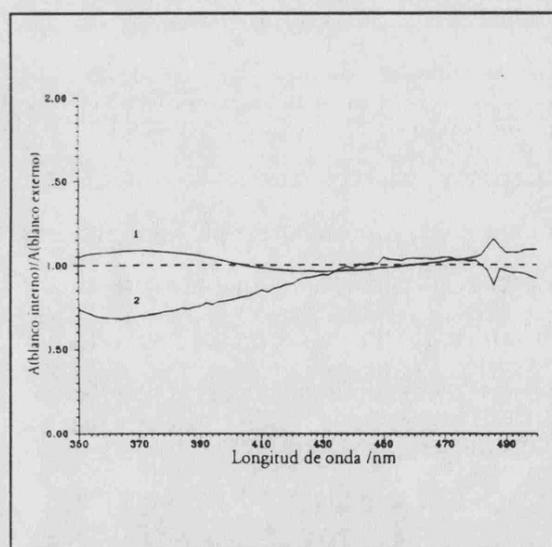


FIGURA 40. (A) y (B) representación de los blancos internos y externos para dos calibrados de anfetamina en muestras de orina. (C) Cociente entre el blanco interno y externo para dos réplicas ensayadas.

3.4.3.1.3.- Método de Youden. Estudio y evaluación del error sistemático constante

Procedimiento experimental

El método de Youden ha sido aplicado a muestras de orina (con y sin analito). A 100 mL de muestra de orina se añadió 1 mL de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfe-

tamina o agua destilada (en el caso de los blancos de orina), se tomaron volúmenes variables de 2, 5, 6, 8 y 10 mL (conteniendo concentraciones de anfetamina de 5.95 a 29.74 $\mu\text{g/mL}$ o de 3.4 a 16.8 $\mu\text{g/mL}$ de metanfetamina). Estas muestras se sometieron a extracción con n-hexano y derivatización, siendo procesadas según los procedimientos descritos anteriormente.

Resultados y discusión

La aplicación del método de Youden permite evaluar la existencia de errores sistemáticos constantes cuando la matriz y el analito están presentes en la muestra. El valor del blanco total de Youden (TYB) se obtiene a partir de la ordenada correspondiente a la representación de la curva de calibrado (señal analítica vs concentración en la muestra), este valor representa el error constante del método correspondiente a una concentración de analito en la muestra de cero, siendo independiente del tamaño de muestra utilizado y no es atribuible al analito. Cuando el valor del TYB es diferente de cero, las medidas analíticas deben de ser corregidas con el fin de evitar la existencia de errores sistemáticos constantes en la determinación del analito.

En la Figura 41 se muestran las representaciones del método de Youden para (A) muestras de orina en presencia y ausencia de anfetamina (B) muestras de orina en presencia y ausencia de metanfetamina.

En el caso de muestras de orina sin anfetamina mediante la aplicación del método de Youden se obtiene una señal analítica constante para todos los volúmenes de muestra ensayados (0.037 ± 0.002 $n=8$), indicando que ésta introduce un error constante que a su vez es independiente del volumen de muestra, lo que indicaría que se produce una saturación de la fase orgánica respecto aquellas sustancias de la orina que son extraídas. En presencia de anfetamina, mediante la aplicación de este método se obtiene una ordenada en el origen diferente de cero (TYB=0.042). Como puede observarse, los valores obtenidos en muestras de orina con y sin anfetamina son similares.

Análogamente, en el caso de muestras sin metanfetamina al aplicar el método de Youden se obtiene también un valor de señal constante independientemente del volumen de orina ensayado (0.059 ± 0.001 $n=5$). En presencia de metanfetamina, mediante la aplicación de este método se obtiene una ordenada en el origen diferente de cero (TYB=0.056).

Los resultados obtenidos tanto en la determinación de anfetamina como en la de metanfetamina indican la existencia de un error sistemático constante debido a otras sustancias presentes en la muestra y que tal error es independiente del volumen de muestra.

Los valores de TYB obtenidos en la determinación de metanfetamina son ligeramente superiores a los obtenidos en la determinación de anfetamina, esto indica que en condiciones de pH 10 la interferencia correspondiente a los componentes endógenos extraídos de la orina es ligeramente superior.

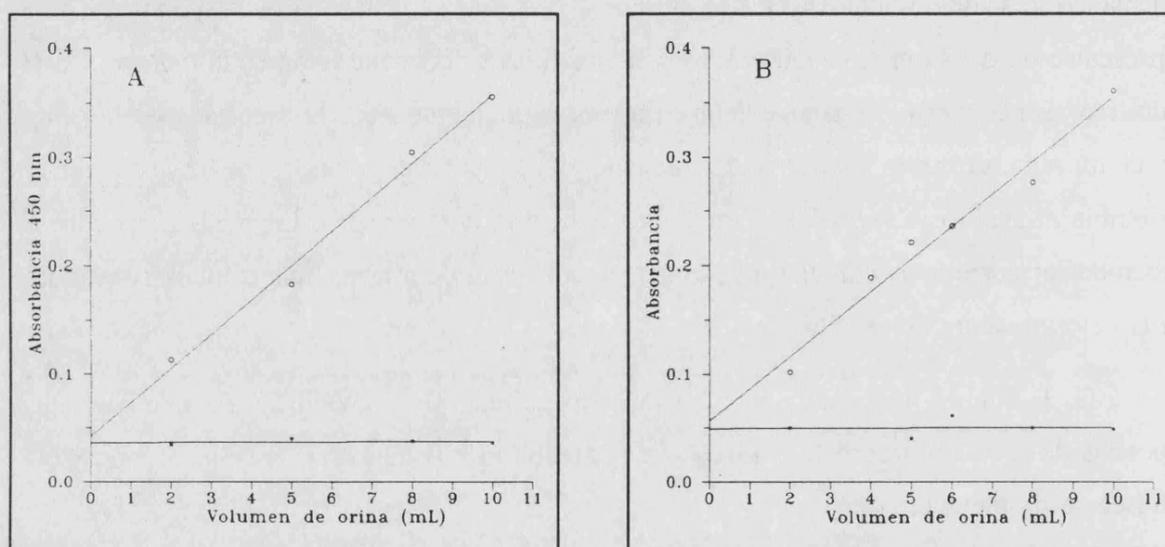


FIGURA 41. Representación de la variación de la absorbancia (450 nm) en función del volumen de muestra, para muestra en presencia y ausencia de amina A) anfetamina, B) metanfetamina. Condiciones: NQS $6.4 \times 10^{-3} M$, A) Temp. $70^{\circ}C$, 30 min. tampón pH 7.5, B) Temp. $45^{\circ}C$, 5 min., tampón pH 10.0. Extracción de la orina con n-hexano y el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1).

3.4.3.1.4.- Estudio de la posibilidad del uso de un placebo para corregir el error sistemático constante

A la vista de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se ensayaron diferentes muestras de orina de sujetos normales con el objeto de proporcionar una alternativa a la utilización del método de Youden para evaluar el error sistemático constante introducido por la orina en estas determinaciones.

Procedimiento experimental

Se tomaron 5 mL de 15 muestras diferentes de orina (sin anfetamina) que fueron procesadas en las condiciones de pH 7.5, 70°C y 30 minutos y 12 se trataron a pH 10.0, 45°C, 5 minutos. En ambos casos éstas se trataron previamente con extracción líquido-líquido en n-hexano. También se ensayó un volumen de 10.0 mL orina. Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la página 107.

Resultados y discusión

Cuando las muestras de orina (5 mL) se procesan a pH 7.5 la señal analítica a la longitud de onda de trabajo ($\lambda = 450 \text{ nm}$) es similar para todas ellas ($n=15$, $A_{\lambda=450 \text{ nm}} = 0.035 \pm 0.007$). A pH 10 sucede lo mismo ($n=12$, $A_{\lambda=450 \text{ nm}} = 0.0615 \pm 0.0095$). Cuando se parte de 10 mL a pH 7.5 la absorbancia ($n=12$, $A_{\lambda=450 \text{ nm}} = 0.037 \pm 0.007$) y a pH 10 ($n=12$, $A_{\lambda=450 \text{ nm}} = 0.063 \pm 0.01$). Estos valores indican que la señal proporcionada por la orina es independiente del volumen de ésta tomado y coinciden con los calculados a partir del método de Youden. La señal analítica correspondiente al blanco de orina introduce un error constante que es prácticamente independiente de la muestra, permitiéndonos usar la orina de un individuo normal como placebo, constituyendo otra posibilidad de corrección del error sistemático constante en la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina.

3.4.3.2.- Método de Adición Estándar, efecto matriz. Estudio del error sistemático proporcional

Procedimiento experimental

Se partió de diferentes muestras de orina. A 100 mL de orina se adicionó 1 mL de disolución patrón de sulfato de anfetamina ($465 \mu\text{g/mL}$) o clorhidrato de metanfetamina ($505 \mu\text{g/mL}$) o 1 mL de agua destilada (en el caso del blanco de orina), de forma que la concentración final en la muestra fue de aproximadamente $4.6 \mu\text{g/mL}$ de anfetamina o $5 \mu\text{g/mL}$ de metanfetamina. De esta muestra se tomaron alícuotas de 5 o 10 mL, a las que se añadieron volúmenes variables de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfetamina o agua destilada (en el caso del blanco de orina) hasta completar un volumen de 5.3 o 10.6 mL. Seguidamente, se añadió un volumen de 0.1 o 0.2 mL de amoníaco concentrado y se

procedió a la extracción de los analitos de acuerdo con el procedimiento de extracción líquido-líquido (realizándose la extracción con n-hexano dos o tres veces consecutivas), disponiendo al final de un volumen total de 16 o 32 mL de n-hexano al que se adicionó 50 o 100 μL de una disolución de EtOH-HCl (6:1). Estos extractos fueron evaporados utilizando un rotavapor y el residuo obtenido fue regenerado en 1.0 mL de agua destilada, en el caso de la determinación de anfetamina se añadió 1.0 mL de tampón de pH=7.5 y 1.0 mL de NQS (0.5%). La mezcla resultante se calentó a 70°C durante 30 min. En el caso de la determinación de metanfetamina el residuo obtenido se regeneró igualmente con 1.0 mL de agua destilada, al que se añadió 1.0 mL de tampón de pH 10 y 1.0 mL de NQS (0.5%), la mezcla resultante se calentó a 45 °C durante 5 min. En estas mismas condiciones se ensayó también la anfetamina. En ambos casos, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 min. y posteriormente los productos de reacción fueron extraídos en n-hexano:acetato de etilo (1:1).

Resultados y discusión

Se aplicó el método de adición estándar con el fin de determinar la existencia o no de errores sistemáticos proporcionales. En el caso en que las muestras de orina se sometieron a tres extracciones con n-hexano, mediante la aplicación del método de adición estándar, la pendiente de la recta obtenida para la determinación de anfetamina (pH=7.5) fue $m=0.01439$ (Volumen de orina 5.0 mL) y $m=0.01432$ (Volumen de orina 10.0 mL) y para la determinación de metanfetamina (pH=10.0) $m=0.02172$ (5.0 mL de orina) siendo en ambos casos similares a las obtenidas con patrones (Tabla 9). Por tanto se puede concluir que esta determinación está exenta de error sistemático proporcional. Cuando las muestras de orina fueron extraídas dos veces consecutivas, con el objeto de que la contribución a la señal analítica de los compuestos endógenos de la orina sea menor y de acortar el tiempo de análisis, las pendientes que se obtuvieron mediante la aplicación del método de adición estándar fueron inferiores ($m=0.011\pm 0.001$ y 0.0194 ± 0.0017 $n=5$, para anfetamina y metanfetamina, respectivamente), correspondiéndoles en estos casos un porcentaje de recuperación de anfetamina de $76\pm 5\%$ a pH 7.5 y de $77\pm 5\%$ a pH 10, y de metanfetamina $92 \pm 8\%$ (los porcentajes de recuperación se calcularon mediante la comparación de las pendientes obtenidas con las correspondientes a la curva de calibrado con patrones).

Por otra parte en base al método establecido por Cardone (101), también se pudo evaluar el valor del TYB aplicando el método de adición estándar para dos volúmenes de muestra diferentes, tomándose en este caso volúmenes de 5.0 y 10.0 mL de muestra. En la Figura 42 se muestra la representación de la señal analítica frente cantidad de analito añadido a la muestra/cantidad de analito en la muestra obtenida utilizando volúmenes de muestra de 5.0 y 10.0 mL de orina a los que se añadió previamente analito.

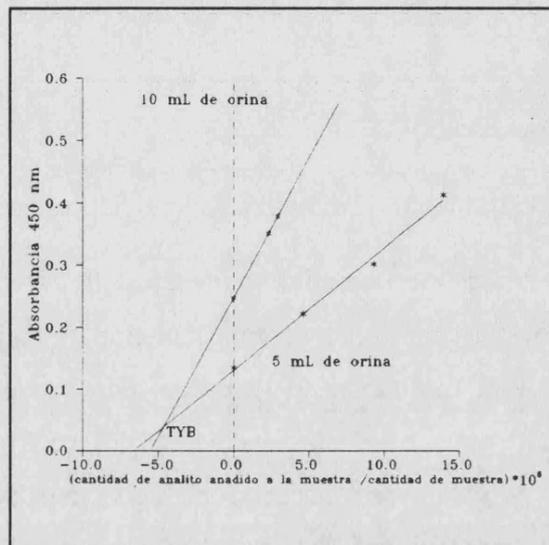


FIGURA 42. Representación de la variación de la absorción (450 nm) en función de cantidad de analito añadido en la muestra/ cantidad de muestra. Condiciones: NQS $6.4 \times 10^{-3}M$, Temp. $70^{\circ}C$, 30 min. tampón pH 7.5, Extracción de la orina con n-hexano y el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1).

Como puede verse en la Figura 42 (correspondiente a la determinación de anfetamina) las dos rectas se cortan en un punto cuyo valor de la ordenada corresponde al blanco total de Youden, siendo en este caso el valor obtenido de 0.043. Como puede observarse este valor es similar al evaluado mediante la aplicación del método de Youden (Figura 41A). El punto de corte entre ambas rectas, también permite determinar la concentración de analito en la muestra por extrapolación en el eje de abscisas. La concentración obtenida fue de $4.8 \mu g/mL$ siendo la concentración real en la muestra de $4.6 \mu g/mL$.

3.4.3.3.- Exactitud y precisión de las determinaciones de anfetamina y metanfetamina

Los resultados obtenidos mediante la aplicación del método de adición estándar y el método de Youden indican que tanto la determinación de anfetamina como la de metanfetami-

na en muestras de orina están exentas de error sistemático proporcional mientras que presentan error sistemático constante. Por lo tanto, para determinar la concentración de anfetamina o de metanfetamina presente en la muestra libre de este error será necesario determinar el valor del TYB. Podremos calcular la concentración de analito, por el método de adición estándar o por interpolación en la recta de calibrado construida a partir de patrones considerando el porcentaje de recuperación en el tratamiento previo de la muestra substrayendo, en ambos casos, el valor del TYB o bien la señal analítica obtenida a partir de un placebo.

Procedimiento experimental

Corresponde al procedimiento descrito para la adición estándar (página 120).

En relación a la determinación de metanfetamina en presencia de anfetamina se han preparado muestras sintéticas con distintas relaciones de concentración anfetamina:metanfetamina. A un volumen constante de esta disolución se le ha añadido volúmenes variables de una disolución patrón de metanfetamina, 1.0 mL reactivo NQS (0.5%), 1.0 mL de tampón de bicarbonato de pH=10.0 y volúmenes variables de agua destilada hasta completar un volumen de 3.0 mL. La muestra resultante se ha calentado durante 5 minutos a la temperatura de 45 °C, se ha dejado enfriar durante 5 minutos y el producto de reacción ha sido extraído en 3.0 mL de una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (1:1), siendo agitada (agitación mecánica) durante 2.0 minutos. Finalmente, se han separado ambas fases, registrándose la señal analítica de la fase orgánica en el intervalo de 190-820 nm.

Análogamente, también se han estudiado muestras de orina a las que previamente se les ha adicionado una cantidad conocida de anfetamina y metanfetamina a partir de las disoluciones patrón de las mismas (estando las concentraciones dentro de los niveles terapéuticos). A alícuotas de 5.0 mL de la muestra de orina resultante se han adicionado volúmenes variables de metanfetamina a partir de un disolución patrón de la misma o agua destilada hasta completar un volumen de 5.3 mL. Las muestras de orina han sido sometidas a extracción líquido-líquido según el tratamiento de la muestra de orina descrito anteriormente y finalmente derivatizadas y extraídos los productos de reacción tal y como se ha indicado en el procedimiento de las disoluciones patrón. Se ha tomado como señal analítica la absorbancia de las muestras a 450 nm. Se realizaron réplicas de muestras que contenían concentraciones

del orden de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en anfetamina o metanfetamina, midiéndose la señal analítica en el mismo día y en días sucesivos.

Resultados y discusión

En las Tablas 12 y 13 se muestran las concentraciones de anfetamina (12A, 13A) y metanfetamina (12B, 13B) calculadas mediante la aplicación de método de adición estándar y la calibración con patrones considerando el % de recuperación, y tomando como blanco de orina el valor obtenido de la aplicación del Youden. En todos los casos tanto en la determinación de anfetamina como de metanfetamina se han obtenido errores relativos menores del 10% (errores aceptables en este tipo de determinaciones).

En las Tablas 12 y 13 también se muestran los resultados de concentraciones de anfetamina o metanfetamina calculadas en muestras de orina mediante la aplicación del método de adición estándar y la curva de calibrado con patrones pero tomando como valor del blanco de orina el valor del placebo obtenido a partir de distintas muestras de orina en ausencia de analito. Los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos mediante la aplicación del método de Youden. Por lo tanto, la utilización de un placebo (orina de un individuo normal) constituye otra posibilidad para la determinación de anfetamina o metanfetamina en muestras de orina exenta de error.

Análogamente, la concentración de estos analitos en muestras de orina también se ha podido calcular utilizando los valores de absorbancia de una muestra (A_m) con una concentración desconocida de analito y con el valor de una muestra de referencia (A_r) con una concentración $C_r = C_m + C_{añadida}$ (conteniendo ambas muestras el mismo volumen de muestra), siendo C_m la concentración de analito desconocida y $C_{añadida}$ la concentración de analito conocida que ha sido añadida a la muestra a partir de una disolución patrón de sulfato de amfetamina o de clorhidrato de metanfetamina. La señal analítica de la muestra resultante vendrá dada por $A_r = A_m + A_{añadida}$, siendo A_r la señal analítica correspondiente a C_r . Por lo tanto la concentración desconocida de analito en la muestra vendrá dada por la ecuación 4.

$$C_m = [A_m / (A_r - A_m)] C_{añadida} \text{ (ecuación 1)}$$

TABLA 12. Concentración de A) anfetamina (pH 7.5 y pH 10) o B) metanfetamina encontrada en diferentes muestras de orina tomando volúmenes diferentes y mediante la aplicación del método de adición estándar. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M. Las muestras de orina fueron extraídas dos veces consecutivas con n-hexano, (*) extracción con n-hexano tres veces consecutivas, (**) Muestras de orina con anfetamina ensayadas en condiciones de pH 10.0, 45°C y 5 minutos.

A)

Muestra	Volumen de orina tomado (mL)	Anfetamina añadida a la muestra de orina (mg/L)	Concentración de anfetamina encontrada en muestras de orina aplicando MOSA (mg/L)			
			Youden	E%	Placebo	E%
1	5	4.6	4.2	-8.7	4.2	-8.7
		10.2	10.4	+2.0	10.6	+3.9
		13.4	12.9	-3.7	13.2	-1.5
2	5	4.6	4.7	+2.0	4.9	+6.5
		9.2	9.1	-1.1	9.4	+2.1
		13.9	13.2	-5.0	13.4	-3.6
	10	4.6	5.1	+10.8	4.8	+4.3
		6.9	7.7	+11.6	7.4	+7.2
		8.1	8.4	+3.7	8.5	+4.9
		9.2	9.7	+5.4	9.8	+6.5
3	5(*)	10.0			10.7	+7.0
		14.2			15.4	+7.0
		20.0			19.5	-2.9
4	5	4.3			4.3	0.0
		8.8			9.3	+5.7
		11.0			10.0	-9.1
5	5	4.6			4.5	-2.2
		10.2			9.6	-5.9
		13.4			12.9	-3.7
1(**)	5	4.5	4.8	+6.6	4.9	+8.8
		7.7	8.3	+7.2	8.4	+9.0
		10.9	10.7	-1.9	10.8	-0.9
2(**)	5	4.5	4.7	+4.4	4.8	+6.6
		7.7	7.8	+1.3	7.9	+2.6

B)

Muestra	Volumen de muestra tomado (mL)	MA añadida a la muestra de orina (mg/L)	Concentración encontrada de metanfetamina en muestras de orina aplicando MOSA (mg/L)			
			Youden	E%	Placebo	E%
1	5	5.0	5.0	0.0	4.8	-4.0
		8.2	8.8	+7.8	8.6	+4.9
		11.4	11.0	-3.5	10.8	-5.3
		14.5	15.2	+4.8	15.0	+3.4
2	10	5.1	5.3	+3.0	5.2	+2.0
		7.7	7.7	0.0	7.6	-1.3
		13.0	12.8	-1.5	12.7	-2.3
3	10	5.1			5.0	+2.0
		13.0			14.1	+8.5
4	5	4.3			4.4	+2.4
		7.2			6.8	-9.1
		10.2			10.1	-1.0
5	5	4.3			4.1	-4.7
		7.2			7.0	-2.8
		13.1			12.8	-2.3

TABLA 13. Concentración de A) anfetamina (pH 7.5 y pH 10) B) metanfetamina encontrada en diferentes muestras de orina tomando volúmenes diferentes y mediante la aplicación de la curva de calibrado con patrones. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). Las muestras de orina han sido extraídas dos veces consecutivas con n-hexano, (*) extracción con n-hexano tres veces consecutivas.(**) Muestras de orina con anfetamina ensayadas en condiciones de pH 10, 45°C y 5 minutos.

A)

Muestra	Volumen de orina tomado (mL)	Anfetamina añadida a las muestras de orina (mg/L)	Concentración de anfetamina encontrada en muestras de orina (mg/L) aplicando la curva de calibrado con patrones			
			Youden	E%	Placebo	E%
1	5	4.6	4.3	-6.5	4.5	-2.3
		10.2	10.8	+5.9	11.0	+7.8
		13.4	13.3	-0.7	13.6	+1.5
2	5	4.6	4.7	+2.2	4.7	+2.2
		9.2	9.5	+3.3	9.7	+5.4
		13.9	13.5	-2.9	13.8	-0.7
	10	4.6	5.1	+10.8	4.8	+4.3
		6.9	7.7	+11.6	7.4	+7.2
		8.1	8.6	+6.2	8.6	+6.2
		9.2	9.9	+7.6	9.8	+6.5
3	5	4.3			4.7	+9.3
		13.1			13.1	0.0
4	5	4.6			4.3	-6.5
		10.2			10.3	+1.0
		13.4			13.1	-2.2
5	5(*)	10.0			10.9	+9.0
		14.0			15.2	+8.6
		20.0			21.6	+8.0
1(**)	5	4.5	4.8	+6.7	4.9	+8.8
		7.7	7.9	+2.6	8.0	+3.9
		10.9	11.8	+8.3	11.9	+9.2
2(**)	5	4.5	4.4	-2.2	4.5	0.0
		7.7	7.5	-2.6	7.7	0.0

B)

Muestra	Volumen de muestra de orina tomado (mL)	MA añadida a la muestra de orina (mg/L)	Concentración de metanfetamina encontrada en muestras de orina mediante la curva de calibrado con patrones (mg/L)			
			Youden	E%	Placebo	E%
1	5	8.2	8.6	+4.9	8.6	+4.9
		11.4	10.9	-4.4	10.7	-6.1
		14.5	15.1	+4.1	14.9	+2.8
2	10	5.1	5.5	+7.8	5.4	+5.9
		7.7	7.8	+1.3	7.7	0.0
		13.0	12.9	-0.8	12.8	-1.5
3	10	5.1			5.4	+5.9
		13.0			14.2	+9.2
4	5	4.3			4.1	-4.7
		7.2			6.8	-9.1
		10.2			10.1	-1.0
5	5	4.3			4.2	-2.3
		7.2			7.0	-2.8
		13.1			12.9	-1.5

En la tabla 14 se muestran los resultados de concentración de anfetamina (14A) y de metanfetamina (14B) en distintas muestras de orina calculada mediante la aplicación de la ecuación 4. Como puede observarse los resultados son comparables con los evaluados mediante la aplicación del método de adición estándar y de la curva de calibrado con patrones. Al igual que en los otros casos, la aplicación del método de Youden o el uso de un placebo permiten obtener resultados satisfactorios.

Debido a que la anfetamina es un metabolito directo de la metanfetamina (Figura 3), se estudió la interferencia de la misma en la determinación de metanfetamina. Según la bibliografía la relación metanfetamina-anfetamina oscila entre 4 y 10 (84,102-103).

Como se ha podido observar a lo largo de la memoria, el reactivo NQS reacciona tanto con la anfetamina como con la metanfetamina, dando lugar a productos de reacción cuyos espectros son muy similares.

TABLA 14. Concentración de A) anfetamina (pH 7.5 y pH 10) y B) metanfetamina encontrada en diferentes muestras de orina tomando volúmenes diferentes y mediante la aplicación de la ecuación 4. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). Las muestras de orina han sido extraídas dos veces consecutivas con n-hexano, (*) extracción con n-hexano tres veces consecutivas.(**) Muestras de orina con anfetamina ensayadas en condiciones de pH 10, 45°C y 5 minutos.

A)

Muestra	Volumen de muestra de orina tomado(mL)	Anfetamina añadida a las muestras de orina (mg/L)	Concentración de anfetamina encontrada (mg/L) en las muestras de orina aplicando la ecuación 4			
			Youden	E%	Placebo	E%
1	5	4.6	4.2	-8.7	4.4	-4.3
2	5	4.6	4.9	+6.5	5.2	+13.4
		4.6	5.1	+10.8	5.5	+2.0
		4.6	4.6	0.0	4.9	+6.5
		9.2	8.8	-4.3	9.0	-2.2
	10	4.6	4.6	0.0	4.7	+2.2
		4.6	5.1	+9.8	5.3	+13.0
		9.2	9.5	+3.3	9.7	+5.4
3	5	4.3			4.0	-6.9
		8.8			9.6	+9.0
4	5	4.6			4.9	+7.1
		4.6			4.9	+7.1
		4.6			4.5	-2.1
		10.1			10.1	0.0
		10.1			9.4	-6.9
5	5 (*)	10.0			10.1	+1.0
		10.0			10.9	+9.0
		13.9			13.8	-0.7
1(**)	5	4.5	4.4	-2.2	4.6	+2.2
2(**)	5	4.5	4.6	+2.2	4.8	+6.6

B)

Muestra	Volumen de muestra tomado (mL)	MA añadida a las muestras de orina (mg/L)	Concentración de metanfetamina encontrada (mg/L) en muestras de orina aplicando la ecuación 4			
			Youden	E%	Placebo	E%
1	5	5.0	5.2	+4.0	5.1	+2.0
		5.0	4.6	-8.0	4.5	-10.0
		5.0	5.0	0.0	4.9	-2.0
		5.0	5.1	+2.0	5.0	0.0
		8.2	8.8	+6.8	8.7	+6.1
		11.4	10.7	-6.1	10.5	-7.9
		11.4	10.9	-4.4	10.7	-6.1
2	10	5.1	5.4	+5.9	5.3	+3.9
		7.7	7.9	+2.6	7.9	+2.6
		7.7	7.2	-6.5	7.2	-6.5
3	10	5.1			4.9	-3.9
4	5	4.3			4.6	+7.0
		4.3			4.3	0.0
5	5	4.3			4.5	+4.7
		4.3			4.3	0.0
		4.3			4.2	-2.3
		4.3			4.2	-2.3
		7.2			7.1	-1.4
		7.2			6.9	-4.2
		7.2			6.9	-4.2

En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de metanfetamina en presencia de anfetamina, tanto en muestras sintéticas como en muestras de orina. Como puede observarse, la interferencia de la anfetamina disminuye al aumentar la concentración de metanfetamina. Tanto en el caso de muestras sintéticas como en muestras de orina, cuando la relación metanfetamina:anfetamina es mayor de 4, la interferencia de la anfetamina es despreciable y la concentración de metanfetamina en la muestra puede determinarse con un error menor del 10%.

TABLA 15. Concentración de metanfetamina en presencia de anfetamina, mediante la aplicación del método de adición estándar, para distintas relaciones anfetamina/metanfetamina en muestras sintéticas y en muestras reales (MA=metanfetamina, AN=anfetamina).

Muestra	Volumen de muestra tomado (mL)	MA añadida a las muestras (mg/L)	AN añadida a las muestras (mg/L)	Concentración de MA encontrada aplicando MOSA (mg/L)	
				$C_{\text{encontrada}}$	E%
Muestras sintéticas		10.6	5.3	13.3	+25.5
		17.2	5.3	19.8	+15.1
		23.9	5.3	26.3	+10.0
		30.6	5.3	32.0	+4.6
		37.2	5.3	39.8	+6.9
Muestras de orina				Placebo	E%
	5	3.7	1.2	4.3	+16.2
	5	7.9	1.2	8.3	+5.1
	5	11.9	1.2	12.5	+5.

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos para distintas muestras cuando los ensayos fueron realizados el mismo día y en días diferentes. Los valores de concentración se han calculado substrayendo a la señal analítica la correspondiente al placebo y por interpolación en el calibrado de orina correspondiente.

TABLA 16. Concentración de anfetamina, metanfetamina y metanfetamina en presencia de anfetamina, en muestras de orina. Condiciones: pH 10, (*) pH 7.5.

Analito	Con. añadida ($\mu\text{g/mL}$)	Con. encontrada ($\mu\text{g/mL}$)					
		En el mismo día			En días diferentes		
		n	Con.	E(%)	n	Con.	E(%)
Anfetamina(*)	5.6	3	5.8 ± 0.1	+3.6	6	5.6 ± 0.4	0.0
Anfetamina	6.4	3	6.2 ± 0.2	-3.1	6	6.2 ± 0.8	-3.1
Metanfetamina	5.9	3	5.9 ± 0.1	0.0	6	6.1 ± 0.3	+3.4
Metanfetamina en presencia de $1.2 \mu\text{g/mL}$ de Anfetamina	8.0	3	7.9 ± 0.3	-1.3	6	7.7 ± 0.3	-3.8

Se observa que los coeficientes de variación oscilan entre 1.7 y 3.8% cuando el análisis se realiza en el mismo día, mientras que si se hace en días consecutivos los valores obtenidos van del 3.9 al 12.9%. Los resultados son exactos en ambos casos.

3.4.3.4.- Límite de detección y cuantificación

El límite de detección se calculó como $3S_B/m$, siendo S_B la desviación estándar del blanco de orina en presencia de NQS y m la pendiente de la curva de calibrado. En la determinación de anfetamina la desviación estándar del blanco de orina fue ($S_B=0.007$) y la pendiente ($m=0.011$) cuando el volumen de orina tomado fue de 10 mL. En este caso el límite de detección calculado ($L.D= 0.6 \mu\text{g/mL}$) fue comparable con el obtenido para las disoluciones patrón. Para la determinación de metanfetamina ($S_B=0.0095$) y ($m=0.019385$), el límite de detección obtenido cuando se tomaron 5 mL de muestra fue de $0.9 \mu\text{g/mL}$, siendo también similar al obtenido con patrones.

El límite inferior del intervalo dinámico de concentraciones es el límite de cuantificación, calculado como $10(S_B/m)(99)$. El límite superior es el último punto incluido en el calibrado por el método de ajuste por mínimos cuadrados. En el caso de la determinación de anfetamina como analito el intervalo dinámico de concentraciones fue $1.9 - 30 \mu\text{g/mL}$ cuando se utilizaron 10.0 mL de muestra y para metanfetamina $2.9 - 50 \mu\text{g/mL}$ cuando se toman 5.0 mL de orina. Para esta última determinación volúmenes superiores de orina afectan negativamente la precisión del resultado.

3.4.3.5.- Conclusiones

En este apartado se propone la determinación extracto-espectrofotométrica de anfetamina o metanfetamina en muestras de orina derivatizando con NQS.

En primer lugar se realizó un estudio comparativo entre diferentes tipos de tratamiento de la muestra, observándose que la extracción líquido-líquido con n-hexano ofrece mayores ventajas que el resto de los procedimientos estudiados, dado que permite obtener porcentajes de recuperación aceptables, así como una disminución considerable de la interferencia del blanco de orina permitiendo obtener límites de cuantificación y detección menores. Del mismo modo, se ha estudiado la influencia del disolvente de extracción del producto de reacción, observando que la utilización de n-hexano:acetato de etilo (1:1) reduce la interferencia del blanco (NQS o NQS más orina), contribuyendo también a disminuir los límites de detección y cuantificación. El procedimiento a seguir se resume en la Tabla 17.

TABLA 17. Esquema del procedimiento de determinación de anfetamina o metanfetamina en muestras de orina mediante reacción con NQS.

Muestra de orina (con o sin Analito). Tomar 5.0 o 10.0 mL	
Extracción 2 veces con n-hexano ($V_1 = 10.0$ o 20 mL). Agitación mecánica	
Evaporar a sequedad	
Reconstituir con :	
Para anfetamina	Para metanfetamina ó anfetamina
1 mL de agua destilada	1 mL de agua destilada
1 mL de tampón fosfato pH=7.5	1 mL de tampón bicarbonato pH 10.0
1 mL de NQS (0.5%)	1 mL de NQS (0.5%)
Calentar 30 min. 70°C	Calentar 5 min. 45 °C
Enfriar a temperatura ambiente 5 min.	
Extraer con 3 mL en n-hexano:acetato de etilo (1:1). Agitación mecánica 2 min	
Centrifugar 5 min.	
Registrar el espectro entre 190-820 nm de la fase orgánica	

Ambos procedimientos se han estudiado quimiométricamente utilizando los métodos adición estándar, Youden, y adición estándar del punto H, observándose la inexistencia de errores sistemáticos proporciones, sin embargo, se evidencia la presencia de errores de tipo

constante (TYB) que deben de ser evaluados para la determinación de los analitos exenta de error en las muestras de orina. El TYB puede ser eliminado mediante la aplicación del método de Youden o mediante la utilización de un placebo, en ambos casos la concentración de analito (anfetamina o metanfetamina) presente en la muestra puede ser determinada con errores relativos menores del 10% y buena precisión.

En el caso de la determinación de metanfetamina también se ha contemplado la existencia de anfetamina en la muestra, obteniéndose que su presencia en la proporción normal en las que está como metabolito de la metanfetamina, conduce a errores inferiores al 1.0% (errores aceptables en este tipo de determinaciones).

3.4.4.- Determinación conjunta de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina mediante la aplicación del método de adición estándar del punto H

Como se ha mencionado en el apartado anterior la determinación de metanfetamina podrá venir afectada de error por la concentración de anfetamina cuando la relación entre ellas sea inferior a 4. Es importante poder determinar la concentración de ambos analitos existente en las muestras independientemente de la relación en que estos se encuentren, por la propia exactitud de la determinación y también porque puede resultar necesario conocer la concentración de ambas drogas.

Los productos de reacción anfetamina-NQS y metanfetamina-NQS presentan propiedades espectrales muy similares, obteniéndose espectros prácticamente solapados, con el inconveniente además de la presencia de error sistemático constante TYB introducido por la orina.

En este sentido, este equipo investigador desarrolló en 1986 para el campo de la espectroscopía, una modificación del método de adición estándar, que se ha denominado método de adición estándar del punto H, que permite la determinación de la concentración de analito en presencia de un interferente directo y/o de blanco total de Youden (90). Este procedimiento ha sido aplicado a la resolución de mezclas de componentes con un solapamiento muy acusado o incluso total de sus espectros de absorción (91-95). También

ha sido adaptado a la determinación cinética de muestras binarias (104) y para la cromatografía líquida con detección UV-V (105-106). En este apartado se demuestran también sus posibilidades ya enunciadas (95) cuando están presentes el TYB y un interferente directo.

3.4.4.1.- Fundamentos teóricos en presencia de TYB.

La aplicación del HPSAM en el campo de la espectroscopía, permite la cuantificación de dos especies X e Y, aún en el caso de que sus espectros de absorción sean muy similares o estén completamente solapados, o bien, la determinación de la concentración de analito libre de error sistemático, cuando el espectro de la matriz es conocido. La determinación de la concentración de analito X, implica la selección de dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 a las que la absorbancia de la especie interferente, Y, es la misma. La adición sucesiva de cantidades conocidas de analito y la medida de la absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas, permite construir dos rectas que intersectan en el llamado "punto H", $(-C_H, A_H)$ donde $-C_H (= -C_X)$ es la concentración desconocida de X y $A_H (= A_Y)$ es la señal analítica de Y. Sin embargo en presencia de un error constante, A_H es la señal debida al interferente y al blanco total de Youden (TYB). (Figura 43).

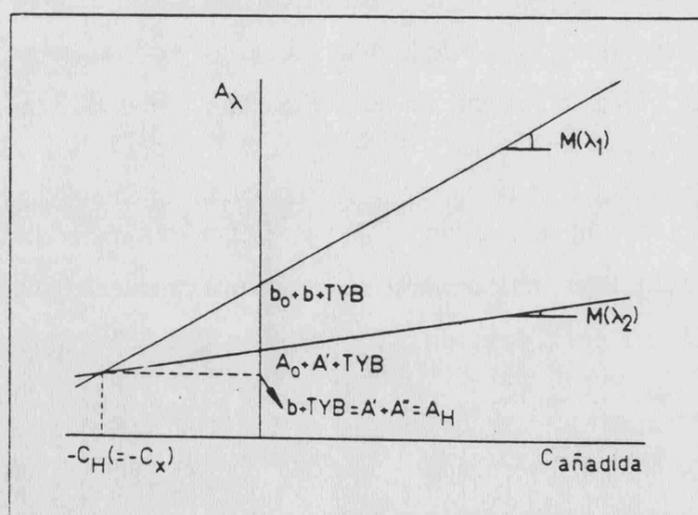


FIGURA 43. Representación del método de adición estándar del punto H.

Considerando que ambos errores sistemáticos están presentes, las absorbancias de X a λ_1 y λ_2 son b_i y A_i y la señales analíticas de Y son b y A' (iguales en este caso) (Figura 44), y suponiendo que el TYB es el mismo a ambas longitudes de onda, situación más habitual, la representación de la absorbancia en función de la longitud de onda puede describirse a partir de las siguientes ecuaciones:

$$X: A_i = b_i + m_i \lambda + \text{TYB} \quad (5)$$

$$Y: A' = b + m \lambda + \text{TYB} \quad (m=0) \quad (6)$$

donde el subíndice i representa las diferentes adiciones de X de las n realizadas en la aplicación del HPSAM; $i=0$ corresponde a la disolución que contiene únicamente la muestra problema. Las absorbancias de la muestra desconocida a las longitudes de onda de trabajo λ_1 y λ_2 serán $A_{\lambda_1} = b_i + b + \text{TYB}$, y $A_{\lambda_2} = A_i + A' + \text{TYB}$, respectivamente.

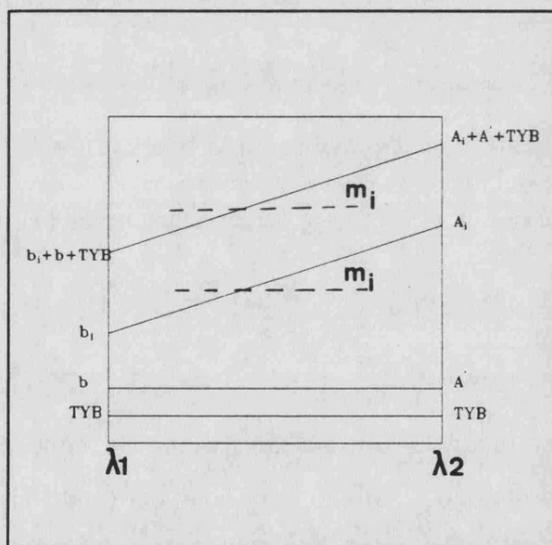


FIGURA 44. Representaciones A vs λ para X e Y en presencia de TYB.

Representando la absorbancia como función de la concentración añadida de analito (C_i) a las dos longitudes de onda seleccionadas, las ecuaciones del método de adición estándar serán:

$$A(\lambda_1) = b_o + b + M(\lambda_1) C_i + \text{TYB} \quad (7)$$

$$A(\lambda_2) = A_o + A' + M(\lambda_2) C_i + \text{TYB} \quad (8)$$

Donde TYB (blanco total de Youden) es el error constante, que normalmente será el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas, b_o y A_o son las absorbancias a λ_1 y λ_2 del analito X en la disolución que contiene únicamente muestra ($i=0$). M_{λ_1} y M_{λ_2} son las pendientes de las representaciones del método a las dos longitudes de onda seleccionadas. Estas rectas intersectan en el punto H, $(-C_H, A_H) = (-C_X, A_Y)$ (Figura 43). En este punto :

$$b_o + b + M_{(\lambda_1)} C_H + TYB = A_o + A' + M_{(\lambda_2)} C_H + TYB \quad (9)$$

por lo tanto
$$C_H = (A' - b) + (A_o - b_o) / M_{(\lambda_1)} - M_{\lambda_2} \quad (10)$$

Como la especie Y presenta el mismo valor de absorbancia a λ_1 y λ_2 , $A' = b$, por lo que

$$C_H = (A_o - b_o) / M_{(\lambda_1)} - M_{\lambda_2} \quad (11)$$

que equivale a la concentración real de analito en la muestra ($= -b_o/M_{\lambda_1} = -A_o/M_{\lambda_2}$)

Análogamente, la sustitución del valor de C_H en las ecuaciones (7) o (8), proporciona A_H :

$$A_H = b_o + b + M_{(\lambda_1)} C_H + TYB \quad (12)$$

como $b_o = M_{\lambda_1} C_H$, entonces $A_H = b + TYB \quad (13)$

Como puede observarse, es posible determinar la concentración libre de error mediante la aplicación del método de adición estándar del punto H, cuando el TYB sea el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas.

La concentración de interferente estará libre de error proporcional, pero no de error constante, que deberá de corregirse mediante el método de Youden (89), por las técnicas de corrección del error corregible (CEC) (107-108), o mediante el conocimiento de la señal analítica del placebo.

Para la obtención de buenos resultados no es necesario que el valor del TYB sea el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas, ya que puede ser evaluado para ambas, y utilizar los valores obtenidos en la construcción de las gráficas del método de adición

estándar del punto H, representando $A_{\lambda_1} - TYB_{\lambda_1}$ y $A_{\lambda_2} - TYB_{\lambda_2}$ como una función de la concentración añadida.

El método permite el cálculo de la concentración de analito (C_H) exenta de error proporcional por las características intrínsecas del método de adición estándar, y de error sistemático constante, dadas las bases del método, aun en presencia de un interferente directo transformando un error incorregible en un error sistemático constante corregible, dado que dicha especie presenta el mismo valor de absorbancia a las dos longitudes de onda seleccionadas.

El método también permite la determinación de la concentración del interferente (Y) a través del valor A_H , previamente corregido en el caso de la existencia del TYB, puesto que se corresponderá con la señal analítica de Y. A partir de la curva de calibrado de esta especie o bien por el método del único patrón es posible determinar su concentración.

En este apartado se ha aplicado el método de Adición Estándar del punto H a la determinación de metanfetamina y anfetamina en presencia de TYB.

3.4.4.2.- Procedimiento experimental

Curvas de calibrado

Se han obtenido las curvas de calibrado de los productos de reacción anfetamina-NQS y metanfetamina-NQS a partir de disoluciones acuosas de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfetamina. Para ello se han tomado volúmenes variables de una disolución patrón de sulfato de anfetamina o de clorhidrato de metanfetamina ($264 \mu\text{g/mL}$) a los que se les ha adicionado 1.0 mL de tampón bicarbonato pH 10.0, 1.0 mL de reactivo NQS y volúmenes variables de agua destilada hasta completar un volumen de 3.0 mL. La mezcla resultante se ha calentado a 45°C durante 5 min. El producto de reacción se ha extraído en 3 mL de disolvente orgánico (n-hexano:acetato de etilo (1:1)). Finalmente, se han separado ambas fases, registrándose la señal analítica entre 190-820 nm de la fase orgánica. Las absorbancias han sido medidas frente a un blanco reactivo a la temperatura de 25°C . En todos los casos se han realizado dos replicas de cada disolución.

Se han ensayado varias muestras metanfetamina:anfetamina que contienen diferentes relaciones de estos dos analitos (6.7:2.0 a 10.6:5.5 $\mu\text{g/mL}$ de metanfetamina y anfetamina,

respectivamente) en presencia de orina. Para cada muestra problema se han preparado disoluciones reproduciendo concentraciones finales similares a las que pueden encontrarse en muestras reales. De cada concentración se han realizado dos replicas.

Inicialmente partimos de una muestra sintética de concentración conocida de sulfato de anfetamina y de clorhidrato de metanfetamina a la que se adicionan volúmenes variables de una disolución patrón de sulfato de anfetamina o de clorhidrato de metanfetamina, 1 mL de tampón de bicarbonato de pH 10.0, 1 mL de NQS (0.5%) y volúmenes variables de agua destilada hasta completar un volumen de 3 mL. La disolución resultante se ha procesado de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente para las disoluciones patrón.

En lo concerniente a muestras reales, se han ensayado distintas muestras de orina (sin analitos) (n=16). De cada muestra se han tomado 5.0 mL de orina y se ha seguido el procedimiento descrito en la página 107 para la determinación de anfetamina y metanfetamina.

De forma análoga para la aplicación del método de adición estándar del punto H, inicialmente a 50 mL de orina se añadió una concentración de sulfato de anfetamina y de clorhidrato de metanfetamina, siendo las concentraciones finales de aproximadamente 3.9 y 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de metanfetamina y anfetamina, respectivamente. De esta muestra de orina, se toman alícuotas de 5 mL a las cuales se les añaden volúmenes variables de sulfato de anfetamina o de clorhidrato de metanfetamina a partir de las disoluciones patrón correspondientes. Posteriormente las muestras son tratadas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para el tratamiento de las muestras de orina.

3.4.4.3.- Resultados y discusión

En la Figura 45 se muestran los espectros de absorción obtenidos para ambos productos de reacción (anfetamina-NQS y metanfetamina-NQS). Estos espectros están completamente solapados, presentando un ligero desplazamiento de los máximos de absorción de la región visible.

Para aplicar el método del HPSAM se ha tomado como intervalo de trabajo 400-500 nm, debido a que en esta región las interferencias del reactivo NQS y de los componentes de la matriz son menores. Las longitudes de onda para la aplicación del HPSAM han sido

elegidas, de entre las distintas posibilidades, de forma que estén lo más próximas al máximo de absorbancia del analito, para que la sensibilidad en la cuantificación de éste sea máxima.

Se han seleccionado diferentes pares de longitudes de onda para las que la absorbancia del interferente es la misma, con el propósito de seleccionar el mejor. Se han elegido los pares 404-460, 414-458, 416-456 y 420-452 nm para metanfetamina como analito y 416-480 y 428-468 nm para anfetamina como analito. En ambos casos, se ha determinado la concentración de la otra especie como interferente. El TYB en muestras sintéticas fue igual a cero.

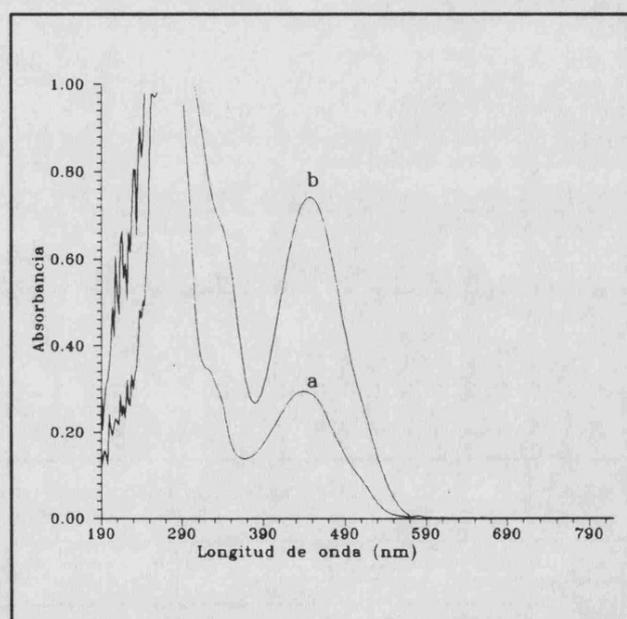


FIGURA 45. Espectro de absorción UV-V del producto de reacción a) anfetamina-NQS y b) metanfetamina-NQS.

En la Tabla 18 se muestran las concentraciones obtenidas de anfetamina y metanfetamina (bien como analitos o bien como interferentes) a las diferentes longitudes de onda seleccionadas para la aplicación del HPSAM. Como se deduce de la observación de esta tabla, cuando la concentración de metanfetamina se calcula considerando esta especie como analito, se obtienen valores adecuados a los cuatro pares de longitudes de onda seleccionados. Cuando se determina la concentración de interferente (anfetamina) en estas muestras a partir de la curva de calibrado con patrones, también se obtienen concentraciones de este compuesto próximas a los valores reales.

TABLA 18. Resultados obtenidos por el HPSAM en la determinación de muestras sintéticas de metanfetamina y anfetamina a diferentes pares de longitudes de onda. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 10.0, calentando la muestra durante 5 min. a la temperatura de 45 °C y extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). ^{a,b} valores de concentración del interferente a las dos longitudes de onda empleadas en el HPSAM mediante la sustitución en la curva de calibrado con patrones.

Concentración en la muestra (mg/L)		Concentración encontrada (mg/L)							
Analito Metanfetamina	Interferente Anfetamina	Analito				Interferente			
		404-460	414-458	416-456	420-452	404-460	414-458	416-456	420-452
6.7	2.0	6.9	6.8	6.9	6.9	1.9 ^a	2.3	1.9	1.9
						1.9 ^b	2.0	1.9	1.9
10.7	2.0	11.2	11.1	11.2	11.4	2.0	2.1	1.9	1.7
						1.9	2.1	1.9	1.7
10.6	5.3	10.2	9.9	10.2	10.5	5.1	5.4	5.1	4.7
						5.2	5.6	5.2	4.8
17.2	5.3	17.5	17.4	16.7	17.9	4.3	4.6	5.4	4.1
						5.2	4.9	5.3	4.2
23.9	5.3	24.3	24.2	23.4	24.7	4.7	4.2	5.1	3.7
						4.9	3.4	5.1	3.7

Concentración en la muestra (mg/L)		Concentración encontrada (mg/L)			
Analito Anfetamina	Interferente Metanfetamina	Analito		Interferente	
		416-480 nm	428-468 nm	416-480 nm	428-468 nm
5.3	10.6	5.7	5.5	9.6 ^a	10.2
				10.2 ^b	10.3
11.9	10.6	13.0	13.0	9.6	9.6
				9.5	9.5
18.6	10.6	19.4	19.0	10.5	11.5
				10.3	10.5

En relación a la determinación de anfetamina como analito, pueden extraerse conclusiones similares, permitiendo determinar el método tanto la concentración de anfetamina como de metanfetamina.

Las representaciones del HPSAM para las muestras a los diferentes pares de longitudes de onda elegidos se muestran en la Figura 46 para anfetamina y en la 47 para metanfetamina.

La mejor sensibilidad se obtiene para los pares de longitudes de onda 404-460 si se determina metanfetamina como analito, y 416-480 nm si se determina anfetamina como analito, por estar más próximas a sus máximos de absorción.

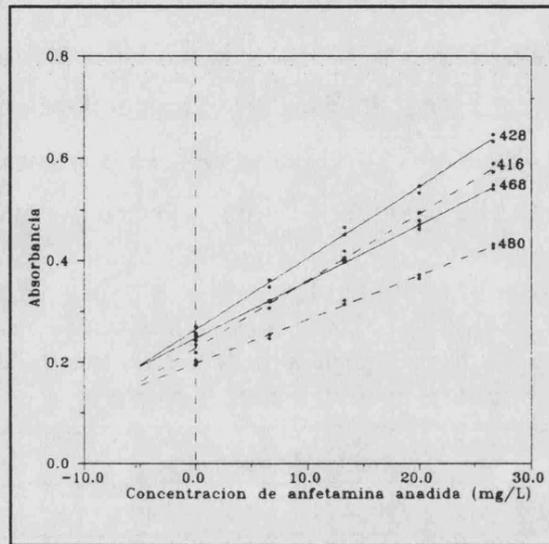


FIGURA 46. Representación del HPSAM para mezclas anfetamina/metanfetamina, estando anfetamina como analito.

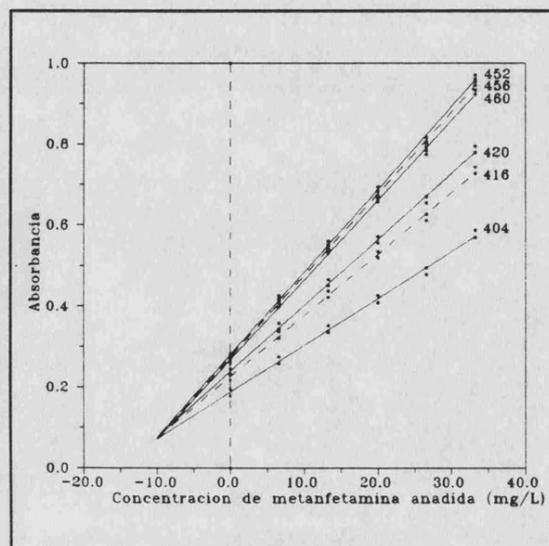


FIGURA 47. Representación del HPSAM para mezclas anfetamina/metanfetamina, estando metanfetamina como analito.

Independientemente de la muestra de orina tratada, el valor calculado del TYB es similar, indicando que las señales obtenidas en la fase orgánica son independientes de la muestra. Del mismo modo, como se muestra en la Tabla 19 las señales analíticas correspondientes a los blancos de orina son iguales entre si para cada par de longitudes de onda seleccionada.

Debido a que el valor del TYB puede considerarse el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas la concentración de analito en la muestra puede ser determinada libre de error mediante la aplicación directa del método del HPSAM a partir de C_H . Sin embargo, la concentración de interferente estará libre de error proporcional pero no constante, para evaluarlo se tendrá que restar de A_H el valor del TYB y sustituirlo en el calibrado correspondiente o comparar este valor con el proporcionado por un patrón de interferente.

TABLA 19. Valores medios de absorbancia obtenidos para diferentes muestras de orina (n=16) a diferentes longitudes de onda.

Longitud de onda (nm)						
	404	414	416	420	428	480
$X \pm S_B$	0.055 ± 0.013	0.054 \pm 0.013	0.055 ± 0.013	0.057 ± 0.013	0.041 ± 0.014	0.059 ± 0.010
	460	458	456	452	468	
$X \pm S_B$	0.057 ± 0.015	0.059 ± 0.015	0.060 ± 0.015	0.061 ± 0.016	0.052 ± 0.013	

Los resultados obtenidos para las distintas situaciones ensayadas en muestras reales, se indican en la Tabla 20.

TABLA 20. Resultados obtenidos en la determinación de metanfetamina y anfetamina en muestras de orina mediante la aplicación del HPSAM a diferentes pares de longitudes de onda. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 10.0, calentando la muestra durante 5 min. a la temperatura de 45 °C y extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). ^{a,b} valores de concentración del interferente a las dos longitudes de onda empleadas en el HPSAM mediante la sustitución en la curva de calibrado con patrones.

Concentración en la muestra (mg/L)		Concentración encontrada (mg/L)			
<u>Analito</u> Metanfetamina	<u>Interferente</u> Anfetamina	Analito			
		404-460	414-458	416-456	420-452
3.9	1.2	----	4.1	4.1	4.1
7.9	1.2	----	7.8	8.0	8.4
11.9	1.2	----	12.1	13.1	----
10.3	3.9	10.5	10.3	9.8	10.1
Concentración (mg/L)		Concentración encontrada (mg/L)			
<u>Analito</u> Anfetamina	<u>Interferente</u> Metanfetamina	Analito		Interferente	
		416-480 nm	428-468 nm	416-480 nm	428-468 nm
3.9	10.3	3.8	3.2	11.2 ^a	11.5
				11.4 ^b	11.5
7.9	10.3	7.9	7.3	10.9	11.4
				11.2	11.5

Para niveles terapéuticos bajos de estas aminos pueden darse casos en que la determinación del interferente no sea posible, debido a que la señal analítica del interferente sea baja. En todos los casos independientemente de la relación anfetamina:metanfetamina, el método proporciona resultados aceptables para la determinación como analito. Cuando la metanfetamina se considera como analito, no es posible la determinación de anfetamina como interferente, por ello para calcular la concentración de anfetamina, se requerirá de la aplicación del método dos veces, para anfetamina y metanfetamina como analitos. Cuando se considera la anfetamina como analito, la aplicación del método permite calcular tanto la concentración de analito como de interferente.

De estos datos se deriva que el HPSAM es un buen método, que permite con éxito la determinación de anfetamina y metanfetamina para diferentes relaciones de concentración, siendo el par de longitudes de onda óptimo 414-458 nm, si el analito es metanfetamina y 416-480 nm si lo es la anfetamina.

Por otra parte, la concentración de anfetamina o metanfetamina también puede calcularse mediante el método del único patrón empleando el HPSAM. En este caso, las señales analíticas serán $\Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$, siendo A_{λ_1} , A_{λ_2} los valores de absorbancia de la muestra a las longitudes de onda seleccionadas para la aplicación del método del HPSAM. Las señales analíticas utilizadas son ΔA_m que corresponde a la señal de la muestra de concentración de anfetamina desconocida (C_m) y ΔA_r que corresponde a la señal de una disolución de referencia con concentración $C_r = C_m + C_{añadida}$, que contiene el mismo volumen de orina que la muestra y una concentración añadida de sulfato de anfetamina o clorhidrato de metanfetamina tomada a partir de una solución patrón ($C_{añadida}$). En este caso la señal analítica será $\Delta A_r = \Delta A_m + \Delta A_{añadida}$. Por lo tanto, la concentración de analito en la muestra puede ser obtenida a partir de la expresión:

$$C_m = (\Delta A_m / \Delta A_r - \Delta A_m) \times C_{añadida} \quad (14)$$

Las concentraciones de anfetamina y metanfetamina en la muestra, calculadas mediante la aplicación de la ecuación, se muestran en la Tabla 21. Como puede observarse, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente (Tabla 20).

Por lo tanto, el método del HPSAM permite determinar la concentración de analito libre de error según las bases del método, en el caso de una mezcla binaria como ésta, y en presencia de un error de matriz constante, proporcionando información acerca de la concentración de interferente, gozando además de las ventajas del método de adición estándar, que corrige el error sistemático proporcional cuando éste está presente; por todo ello puede ser calificado de un método exacto.

TABLA 21. Resultados obtenidos en la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina mediante la aplicación de la ecuación 14. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 10.0, calentando la muestra durante 5 min. a la temperatura de 45 °C y extrayendo el producto de reacción con n-hexano:acetato de etilo (1:1). ^{a,b} valores de concentración del interferente a las dos longitudes de onda empleadas en el HPSAM mediante la sustitución en la curva de calibrado con patrones. (* MA=metanfetamina, AN=anfetamina.)

Concentración en la muestra (mg/L)			Concentración encontrada (mg/L)			
Analito Metanfetamina	Conc. añadida MA*	Interferente Anfetamina	Analito (mg/L)			
			404-460 nm	414-458 nm	416-456 nm	420-452 nm
3.9	6.6	1.2	4.3	4.2	4.1	4.3
	13.3	1.2	4.2	4.0	3.4	4.1
	20.0	1.2	4.4	4.1	4.1	4.2
7.9	6.6	1.2	7.7	7.3	---	7.9
	13.3	1.2	8.6	7.9	8.0	8.0
10.3	4.0	3.9	9.5	---	---	9.5
	8.0	3.9	9.3	9.3	---	10.0
	12.0	3.9	10.7	10.3	10.3	10.1
12.7	4.0	3.9	11.2	---	10.0	13.1
	8.0	3.9	14.2	---	14.6	13.2

Concentration en la muestra (mg/L)			Concentración encontrada (mg/L)	
Analito Anfetamina	Conc. añadida AN*	Interferente Metanfetamina	Analito	
			416-480 nm	428-468 nm
3.9	6.6	10.3	2.8	2.9
	13.3	10.3	3.5	3.2
	26.6	10.3	3.4	3.1
7.9	6.6	10.3	---	8.2
	13.3	10.3	8.7	7.5

3.4.4.4.- Conclusiones

En este apartado se han demostrado las posibilidades del método de adición estándar del punto H en la resolución de dos componentes cuando además está presente el blanco total de Youden.

El método ha proporcionado buenos resultados, estimando la concentración de anfetamina y metanfetamina en orina libres de errores sistemáticos tanto constantes como proporcionales con una buena precisión.

Ambas drogas han sido determinadas como analitos y como interferentes y en ambas situaciones los resultados han sido equivalentes.

Este apartado demuestra la bondad del método de adición estándar del punto H en la resolución de problemas analíticos difíciles: presencia de interferente directo, de blanco total de Youden y similitud de la posición de los máximos de absorción para analito e interferente.

3.4.5.- Determinación de efedrina en preparados farmacéuticos

Como se ha demostrado en apartados anteriores de la presente memoria la efedrina forma con el NQS un producto más polar que los derivados de anfetamina y metanfetamina consecuentemente el disolvente de extracción óptimo resultó ser el alcohol isoamílico. Este disolvente impide la determinación de este estimulante en muestras de orina pero posibilita su determinación en preparados farmacéuticos. En este apartado se desarrolla esta opción.

3.4.5.1.-Procedimiento experimental

Colirio

Mirazol: Siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las disoluciones patrón (página 88), se tomaron volúmenes diferentes (60 y 150 μ l) de la solución farmacéutica a los que se adicionó 1 mL de reactivo NQS (0.5%), 1 mL de tampón pH 7.5 y agua destilada hasta completar un volumen de 3 mL, las muestras fueron procesadas tal y como se ha indicado anteriormente. Otra serie de experiencias fue realizada tomando volúmenes de 0.5 y 1.0 mL a partir de una disolución preparada por dilución del preparado farmacéutico 10 veces.

Solución nasal

Cilinafosal: 1 mL del preparado farmacéutico fue diluido a 25 mL. Se tomaron volúmenes de 0.3 mL a partir de la disolución diluida y se procesaron de acuerdo al procedimiento descrito para las disoluciones patrón.

Comprimidos

En todos los casos, se pesaron y homogeneizaron 3 pastillas de cada preparado farmacéutico. La cantidad requerida (dependiendo de la concentración de efedrina en la muestra) fue suspendido en agua destilada y agitada durante 30 minutos, siendo posteriormente filtrada. El filtrado fue llevado a un volumen determinado con agua destilada. Finalmente, a partir de esta disolución se tomaron volúmenes diferentes que fueron procesados en base al procedimiento descrito para las disoluciones patrón.

A continuación se indican las cantidades tomadas para cada tipo de comprimidos y los volúmenes a los cuales fueron llevados:

Winasma: 1)0.3097, 2)0.3232, 3)0.3049 y aforar a 100 mL

Difilina asmorax: 1)0.1002, 2)0.1002, 3)0.1002 y aforar a 50 mL.

Desabronquisan: 1)0.1664, 2)0.1664, 3)0.1664 y aforar a 50 mL.

Tedral: 1)0.1072, 2)0.1072, 3)0.1072 y aforar a 50 mL.

Tedral Acción Sostenida: 1)0.3000 y aforar a 100 mL.

Jarabes

Estos preparados farmacéuticos fueron diluidos previamente con agua destilada (dependiendo de las concentraciones de efedrina en los preparados iniciales). A partir de las disoluciones diluidas, se tomaron volúmenes diferentes que fueron procesados de acuerdo con el procedimiento descrito para las disoluciones patrón. En el caso de Pazbronquial se diluyó 1 mL o 5 mL del preparado farmacéutico a 10 o 50 mL, respectivamente, tomándose 0.5 mL de las disoluciones resultantes. Para Angiofilina se tomaron 2 mL del preparado farmacéutico que se diluyeron a 10 mL, tomándose finalmente 0.3 mL de la disolución.

Método de Adición Estándar

En este caso se realizaron tres réplicas de cada experiencia tomando volumen constante del preparado farmacéutico (muestras diluidas), a los que se adicionaron volúmenes variables de clorhidrato de efedrina (disolución patrón 400 $\mu\text{g/mL}$) de forma que la concentración adicionada se encontraba entre 0 y 50 mg/L, completando el volumen hasta 3 mL con 1 mL de tampón pH=7.5, 1 mL de reactivo NQS y agua destilada. Estas muestras fueron procesadas de acuerdo con el procedimiento descrito para las disoluciones patrón.

Método de Youden

Para obtener el gráfico de Youden se realizaron tres réplicas de una serie de disoluciones que contenían cantidades variable de muestra. Para ello se prepararon disoluciones con cantidades de muestra diferentes de las que se tomó 1 mL, adicionándose 1 mL de tampón pH 7.5 y 1 mL de reactivo NQS. La mezcla resultante se proceso de acuerdo con el procedimiento descrito para los patrones.

El método de Youden fue aplicado a los comprimidos de Winasma, siendo las cantidades de muestra pesadas de 0.0165g, 0.0331g, 0.0688g, 0.1072g, 0.1430g y aforadas a 50 mL. En el caso de Pazbronquial se tomaron volúmenes variables de muestra entre 0.2 y 1 mL a partir de una disolución diluida (10 veces) del preparado farmacéutico, y en su caso agua destilada hasta completar un volumen de 1 mL, añadiéndose finalmente 1 mL de tampón fosfato pH=7.5 y 1 mL de NQS (0.5%).

3.4.5.2.- Resultados y discusión

3.4.5.2.1.- Colirios

Para la determinación de efedrina-HCl en muestras de colirio, se tomaron distintos volúmenes de muestra. En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos para distintas concentraciones de efedrina en la muestra. Como puede observarse, la concentración de efedrina puede ser obtenida directamente a partir de la curva de calibrado de los patrones (página 105), así como de la curva de calibrado de la primera derivada ($\lambda = 526\text{nm}$, $a = -3.78 \times 10^{-5}$, $b = -2.228 \times 10^{-4}$, $S_{yx} = 3.44 \times 10^{-4}$, $t\text{-test} = \text{lineal}$, intervalo dinámico de concentración (mg//L) 4.8-50, límite de detección 1.4mg/L). Tal y como se observa en la Tabla 22, cuando el volumen de muestra tomado es muy pequeño (60 y 150 μl) el error obtenido es mayor, siendo en parte debido a la imprecisión en la medida del volumen.

En el espectro de absorción de la primera derivada correspondiente a estos preparados farmacéuticos, se observa que todas las muestras (independientemente de la cantidad formada) se unen en el mismo punto que los patrones, teniendo un valor de 0 en el máximo y mínimo del espectro del patrón. Esto significa que la absorción irrelevante, si ésta existe, es función constante de la longitud de onda. De este modo, registrando la curva de la primera derivada este efecto será automáticamente eliminado.

Los resultados obtenidos mediante la recta de calibrado y los correspondientes a la primera derivada son similares, el método carece de error constante.

La concentración de efedrina obtenida en las gotas de colirio es 0.504 ± 0.035 mg/mL ($n=8$). Este valor es similar al indicado por el fabricante (0.5 mg/mL).

TABLA 22. Concentración de clorhidrato de efedrina determinada en disoluciones oculares, mediante la sustitución directa en la curva de calibrado convencional y la derivada correspondiente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción. (*) Tomados a partir de una disolución diluida (1:10). (**) Según la referencia del fabricante.

Volumen de muestra tomado	Conc. añadida (mg/L) (**)	Curva de calibrado convencional		Curva de calibrado de la primera derivada	
		Recuperación (mg/L)	Error (%)	Recuperación (mg/L)	Error (%)
60 μ L	10.0	10.9	+9.0	9.0	-10.0
	10.0	10.2	+1.9	9.2	-7.6
150 μ L	25	26.9	+7.4	25.3	+1.1
	25	27.1	+8.2	25.2	+0.8
0.5 mL(*)	8.3	7.8	-6.2	8.6	+3.4
	8.3	8.3	0.0	8.6	+3.4
1.0 mL(*)	16.6	16.1	-2.9	16.5	-0.5
	16.6	15.9	-3.9	16.7	+0.8

3.4.5.2.2.- Soluciones nasales

La determinación directa del contenido de efedrina en disoluciones nasales de Cilinafosal no es posible utilizando la recta de calibrado de patrones obteniéndose concentraciones mayores a las que cabría suponer presentes según la referencia indicada por el fabricante.

La pendiente de la recta obtenida por el método de adición estándar fue diferente a la recta de calibrado con patrones, pero el MOSA tampoco proporcionó buenos resultados (Tabla 23). Si el método de adición estándar se aplica a las señales analíticas de la primera derivada permite obtener rectas de calibrado con pendientes similares ($m = 2.30185 \pm 6.498 \times 10^{-6}$) a las obtenidas con patrones. Lo que indicará que está ausente el error sistemático proporcional. El error sistemático constante se elimina puesto que los registros de la primera derivada para las disoluciones MOSA pasan por cero en los puntos correspondientes al máximo de absorción del analito. Procediendo de esta forma, la interferencia positiva en la determinación de efedrina en este tipo de preparado farmacéutico se elimina (Tabla 23).

La concentración de efedrina determinada en las gotas de Cilinafosal fue de 6.25 mg/mL, siendo este valor muy similar al indicado como referencia por el fabricante (6 mg/mL).

TABLA 23.Concentración de clorhidrato de efedrina en soluciones nasales (cilinafosal) (mg/L), mediante la aplicación del método de adición estándar a 468nm y mediante el método de la primera derivada a 526 nm. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C.(*).(*) corresponde al volumen de muestra tomado después de la dilución del preparado farmacéutico.

Cantidad de muestra (mL)	Volumen de muestra tomado (mL)*	Conc. añadida (g/L)	Método de Adición Estándar(MOSA)		Primera derivada (MOSA)	
			conc. encontrada (mg/L)	Error %	conc. encontrada (mg/L)	Error %
1	0.3	24.0	29.8	+24.2	25.0	+4.2
1	0.3	24.0	37.8	+57.5	25.0	+4.2

3.4.5.2.3.- Comprimidos.

En la determinación de efedrina en preparados comercializados en forma de comprimidos se analizaron mayor número de muestras, dada su mayor presencia en la farmacopea española. Los preparados farmacéuticos analizados presentaban los siguientes nombres comerciales: winasma, difilina asmorax, dexabroquinsan, tedral y tedral acción sostenida (todos ellos contienen HCl-efedrina o sulfato de efedrina junto con otra serie de principios activos y excipientes).

En todos los casos se suspendió una cantidad determinada de muestra en agua destilada, siendo posteriormente agitada; se observó que la agitación de la muestra durante 30 minutos era suficiente para disolver la efedrina contenida en la muestra, dado que a mayores valores de tiempo el porcentaje de recuperación era el mismo.

En el caso de las comprimidos Winasma, la aplicación del método de Youden dio una ordenada en el origen de 6.15×10^{-3} a 468 nm y 5.10024×10^{-5} a 526 nm. Para las dos longitudes de onda ensayadas $t_{\text{experimental}}$ es menor que el $t_{\text{teórico}}$ por tanto se puede concluir con un riesgo del 5% que la matriz de la muestra no introduce error sistemático constante en la determinación de efedrina.

Las pendientes del método de adición estándar a 468 y 526 nm son similares a las obtenidas para las rectas de calibrado con patrones, indicando la no existencia de error proporcional debido a la matriz de la muestra ($m = 15.2 \times 10^{-3} \pm 4.7 \times 10^{-4}$ y $2.158 \times 10^{-4} \pm 7.212 \times 10^{-6}$, respectivamente). Por lo que la determinación de efedrina en este preparado farmacéutico esta exenta de error sistemático constante y proporcional, pudiéndose determinar la concentración presente en la muestra directamente a partir de la recta de calibrado de patrones. En la Tabla 24 se muestran las concentraciones obtenidas para efedrina en distintas muestras por sustitución directa de la señal analítica en el calibrado, en el calibrado de la primera derivada y mediante la aplicación del método MOSA. Independientemente del método utilizado, en todos los casos los resultados obtenidos son comparables. La concentración de efedrina determinada en la muestra fue 14.1 ± 0.9 mg por pastilla, siendo este valor similar al dado como referencia por el fabricante (15 mg por pastilla).

Muchos de estos preparados farmacéuticos contienen efedrina en presencia de teofilina, tal es el caso de Winasma que contiene además fenobarbital. La teofilina y el fenobarbital en las concentraciones en que se encuentran en las muestras (150 mg y 8 mg, respectivamente, por comprimido), no presentan reacción positiva con el NQS. No obstante, la teofilina dado su mayor carácter apolar se extrae en el disolvente orgánico proporcionando interferencia en la región ultravioleta del espectro.

Se registraron los espectros de la primera derivada, observándose que tanto las muestras como los patrones tenían localizados los máximos a la misma longitud de onda. Este resultado indica que la matriz de la muestra no produce absorción irrelevante o si lo hace, ésta es constante con la longitud de onda.

Siguiendo el mismo procedimiento, se ensayaron otros preparados farmacéuticos tales como Difilina Asmorax, Desabronquisan, Tedral y Tedral Acción Sostenida. En todos los casos independientemente del preparado farmacéutico, las pendientes del método de adición estándar fueron similares a las obtenidas con patrones ($m = 0.01568 \pm 1.45 \times 10^{-4}$, 0.01571×10^{-4} , $0.01602 \pm 4.68 \times 10^{-4}$, y 0.015686 , respectivamente). Lo mismo sucedió utilizando como señal analítica la primera derivada ($m = (2.03647 \pm 0.24139) \times 10^{-4}$, $(2.2122 \pm 0.10409) \times 10^{-4}$, $(2.0715 \pm 0.02638) \times 10^{-4}$, y 2.04865×10^{-4} , respectivamente). Como se muestra en la Tabla 25, la concentración de efedrina presente en la muestra pudo determinarse directamente a partir de la recta de calibrado con patrones.

TABLA 24. Concentración de Efedrina determinada en preparados farmacéuticos en forma de comprimidos mediante la aplicación del método de adición estándar y la primera derivada correspondiente, a las λ 468 nm y 526 nm, respectivamente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. a= Difilina Asmorax, b=Dexabronquisan, c=Tedral y Tedral Acción Sostenida (*).(**) Volumen de muestra tomado después de haber diluido el preparado farmacéutico.

Cantidad de muestra (g)	Volumen de muestra tomado ^{***} (mL)	Conc. añadida (g/L)	Método de Adición Estándar(MOSA)		Primera derivada (MOSA)	
			Conc. encontrada (mg/L)	Error (%)	Conc. encontrada (mg/L)	Error (%)
a)0.1002	0.5	30.0	27.7	-7.6	31.7	+5.6
0.1002	0.5	30.0	26.8	-10.6	30.9	+3.0
0.1002	0.3	18.0	19.3	-7.2	17.5	-2.8
b)0.1664	0.3	25.0	26.2	+4.8	25.9	+3.6
0.1664	0.3	25.0	24.3	-2.8	23.2	-7.2
0.1664	0.3	25.0	24.5	-2.0	23.6	-5.6
c)0.1072	0.3	11.4	11.5	+0.8	11.6	+1.8
0.1072	0.3	11.4	11.9	+4.4	11.9	+4.4
0.1072	0.3	11.4	11.2	-1.8	11.0	-3.6
0.3000*	0.3	33.1	33.2	+0.3	33.1	0.0

Las concentraciones de efedrina determinadas para cada uno de los preparados farmacéuticos se muestran en la Tabla 26. Como puede observarse, en todos los casos las concentraciones determinadas se corresponden con las indicadas por el fabricante.

TABLA 26. Comparación entre las concentraciones obtenidas para distintos preparados farmacéuticos y las indicadas por el fabricante.(mg/ por comprimido)

Preparado farmacéutico	Con.encontrada	Con. referencia
Winasma	14.1 ± 0.9	15
Dexabroquisan	24.6 ± 1.2	25
Difilina Asmorax	25.5 ± 1.0	25
Tedral	15.1 ± 0.5	15
Tedral Acción Sostenida	48.1 ± 0.1	48

TABLA 25. Concentración de Efedrina (EP) determinada en preparados farmacéuticos en forma de comprimidos mediante el calibrado convencional, el calibrado convencional de la primera derivada, la aplicación del método de adición estándar y la primera derivada correspondiente, a las λ 468 nm y 526 nm, respectivamente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón fosfato pH=7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. a= Difilina Asmorax, b=Dexabronquisan, c=Tedral y Tedral Acción Sostenida (*).(**) Volumen de muestra tomado después de haber diluido el preparado farmacéutico.

Cantidad de muestra (g)	Volumen de muestra tomado(*) (mL)	Conc. de EP añadida a las muestras fortificadas (mg/L)	Conc. añadida (mg/L)	Curva de calibrado convencional		Curva de calibrado de la primera derivada		Método de Adición Estándar		Método de Adición Estándar con primera derivada	
				Conc.(mg/L)	Error%	Conc.(mg/L)	Error%	Conc.(mg/L)	Error%	Conc. (mg/L)	Error %
0.3097	0.3	----	13.9	12.2	-12.4	13.1	-5.9	12.5	-10	13.9	0.0
		8.5		8.6	+1.2	8.0	-5.9				
		17.0		16.6	-2.4	16.8	-1.2				
		22.6		22.0	-2.7	22.2	-1.8				
0.3049	0.3	----	14.1	13.7	-3.3	13.9	-1.6	13.6	-3.9	13.8	-2.0
		5.6		5.3	-5.4	5.2	-7.1				
		11.3		11.8	+4.4	11.3	0.0				
		17.0		16.7	-1.8	17.1	+0.6				
0.3049	0.2	----	8.8	9.3	+5.4	7.9	-10.4	101	+14.5	9.6	+8.8
		5.6		5.2	-7.1	4.8	-14.3				
		11.3		10.5	-7.0	10.6	-6.1				
		22.6		20.8	-7.9	21.0	-7.0				
		28.3		26.3	-7.0	26.4	-6.7				
		39.6		36.6	-7.6	37.4	-5.4				
0.0662	1.0	----	9.5	8.5	-11.2	8.3	-12.5				
0.2144	1.0	----	31.0	28.5	-8.1	29.2	-5.6				

3.4.5.2.4.- Jarabes

La determinación de efedrina en jarabes se realizó en dos muestras diferentes (Pazbronquial y angiofilina).

Pazbronquial: Siguiendo el procedimiento descrito, se observó que mediante la aplicación del método MOSA la pendiente de la recta obtenida fue similar a la recta de calibrado correspondiente a patrones ($m=0.01554\pm 4.282\times 10^{-4}$). Dicho resultado indicaba la no existencia de errores proporcionales. Sin embargo, la concentración obtenida en este caso no fue la indicada por el fabricante. Del mismo modo, aunque mediante la aplicación de la primera derivada al método (MOSA), también se obtuvieron pendientes similares a la de la recta de la primera derivada con patrones ($m=2.1792\pm 0.03684\times 10^{-4}$), no se pudo determinar la concentración de efedrina presente.

La ordenada en el origen obtenida aplicando el método de Youden fue (0.039 ± 0.08) siendo este valor diferente de cero. El valor de la $t_{\text{experimental}}$ fue mayor que el valor $t_{\text{teórico}}$, tal que podemos con un error del 5% que la muestra introduce un error sistemático constante en la determinación de efedrina. Por tanto, tal y como se muestra en la Tabla 27 se pudo determinar la concentración de efedrina en la muestra mediante sustitución directa en el calibrado con patrones restando previamente la señal analítica correspondiente al TYB a las señales analíticas de las muestras.

La concentración de efedrina determinada en la muestra fue (0.1026 ± 0.004)g/100 mL, cuyo valor es similar al indicado por el fabricante 0.1g/100 mL.

Se ensayó otra muestra de jarabe (Angiofilina), para la que no pudo determinarse la concentración de efedrina debido a la presencia de otras sustancias en el preparado el farmacéutico que reaccionaban con el reactivo dando lugar a un espectro de absorción diferente con máximo localizado a 506 nm.

TABLA 27. Determinación de la concentración de clorhidrato de Efedrina en jarabe (Pazbronquial) mediante el calibrado convencional y la primera derivada correspondiente, a las λ 468 nm y 526 nm, respectivamente. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, tampón pH 7.5, calentando a 70°C durante 30 minutos y usando alcohol isoamílico como disolvente de extracción del producto de reacción. Temperatura 25°C. (*) Volumen de muestra tomado después de haber diluido el preparado farmacéutico (**) 1 mL diluido a 10 mL. (***) 5 mL diluidos a 50 mL.

Cantidad de muestra (mL)	Muestra tomada después de la dilución (mL)	Conc. añadida (mg/L)	MOSA		Primera derivada MOSA	
			Conc. Encontrada (mg/L)	Error %	Con. Encontrada (mg/L)	Error %
1(*)	0.5	16.6	20.5	+23.7	20.3	22.1
5(**)	0.5	16.6	21.6	+30.1	18.4	+10.8
5(**)	0.5	16.6	20.8	+25.3	20.9	+19.4
			Aplicando el método de Youden		Aplicando el método de Youden	
1(*)	0.5	16.6	16.9	+1.8	17.6	+6.0
5(**)	0.5	16.6	17.8	+7.2	16.3	-1.8
5(**)	0.5	16.6	17.3	+4.2	17.8	+7.2

3.4.5.3.- Conclusiones

Se ha demostrado que la efedrina (feniletilamina con un grupo -OH en posición α) puede ser determinada mediante su reacción con 1,2-naftoquinona 4-sulfonato en preparados farmacéuticos si los productos de reacción se extraen con alcohol isoamílico, dado su mayor carácter polar en referencia con los obtenidos con anfetaminas.

El método se ha aplicado a diversas formulaciones tales como colirios, soluciones nasales, comprimidos y jarabes, que presentan matrices muy diversas, obteniendo buenos resultados para todas ellas, a excepción de un jarabe.

La exactitud y precisión obtenidas son adecuadas para este tipo de determinaciones, no necesitando el procedimiento ningún acondicionamiento previo de la muestra.

**3.5.- DETERMINACION CINETICO ESPECTROFOTOMETRICA
DE FENILAMINAS CON 1,2-Naftoquinona 4-Sulfonato
EN DISOLUCION ACUOSA**

El NQS, en disolución acuosa, tanto en presencia como en ausencia de aminas, experimenta una modificación de los valores de absorbancia con el tiempo. Por otra parte, cuando tiene lugar la reacción entre el reactivo y las aminas aparece un precipitado coloreado correspondiente al producto de reacción que en el procedimiento extracto-espectrofotométrico se extrae en un disolvente orgánico. Este precipitado se solubiliza en presencia de un tensioactivo no iónico como es el Triton X-100.

Basado en estos hechos, en este apartado se realiza un estudio cinético-espectrofotométrico de la reacción, con el propósito de desarrollar un método rápido que permita la determinación de fenilaminas en disolución acuosa eliminando el proceso de extracción del producto de reacción con el disolvente orgánico.

Procedimiento experimental

En cubetas de cuarzo se adicionaron volúmenes adecuados de cada una de las disoluciones de amina de concentración 1mg/mL, disolución amortiguadora que se preparó mezclando NaHCO₃ al 8% con la mínima cantidad posible de NaOH 10M y Triton X-100 al 2%, añadiendo agua destilada hasta 1.5 mL. A esta mezcla se adicionó NQS al 0.42% p/v, siendo el volumen total en la cubeta de 2.5 mL y la concentración final de reactivo 6.4×10^{-3} M. Se consideró como tiempo cero el tiempo en el que cae a la cubeta la última gota de reactivo. Cada experiencia se hizo por triplicado salvo que se especifique lo contrario. Las medidas de absorbancia se realizaron frente a blanco reactivo para las disoluciones que contenían la amina o frente a blanco todos los reactivos excepto NQS para las disoluciones que sólo contenían reactivo.

El procedimiento general, en las condiciones óptimas, es el que se describe a continuación: A diferentes volúmenes de disoluciones patrón de aminas, para obtener concentraciones finales entre 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, se adicionaron 0.3 mL de tampón carbonato-bicarbonato pH=10.5 (0.95M), 0.1mL de Triton X-100 (2%) y agua destilada hasta completar un volumen de 1.5 mL. Finalmente, en la cubeta se adicionó 1 mL de reactivo NQS siendo el volumen final de 2.5 mL, y las concentraciones de reactivo, tampón carbonato-bicarbonato y triton X-100 de 6.4×10^{-3} M, 0.1 M y 0.1%, respectivamente. Las

disoluciones resultantes se calentaron a 45°C, midiendo los valores de absorbancia a 490nm, entre 45 y 180s. En todos los casos se realizaron tres replicas de cada disolución.

3.5.1.- Estudio de las condiciones óptimas de reacción

Las condiciones óptimas se eligieron procurando obtener además de la máxima sensibilidad, los mayores intervalos de linealidad, los mejores coeficientes de correlación y la máxima precisión. Con el fin de encontrar estas condiciones, se estudiaron los principales parámetros que afectan a la reacción entre el NQS y las aminas, como son el tiempo de reacción, el pH, la concentración de Triton X-100, la temperatura de calefacción y la concentración de NQS.

Influencia del tiempo de reacción.

En un estudio cinético, una de las primeras variables que hay optimizar es el tiempo de reacción. Con este objeto, se realizaron los espectros de absorción, entre 460-820nm, en función del tiempo, cada 15s en el intervalo entre 15 y 300s, para disoluciones de NQS en concentración $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ y en presencia de 20 mg/L de β -feniletilamina (Figura 48a) y de 20 mg/L de efedrina (Figura 48b), pH=10.5, Triton X-100 al 0.1% y 45°C, medidos frente a blanco todos los reactivos excepto NQS. Los espectros presentan una banda de absorción, con un máximo alrededor de 490 nm, que se incrementa en función del tiempo alcanzando la β -feniletilamina un valor de absorbancia a los 300s mucho mayor que el obtenido para la efedrina.

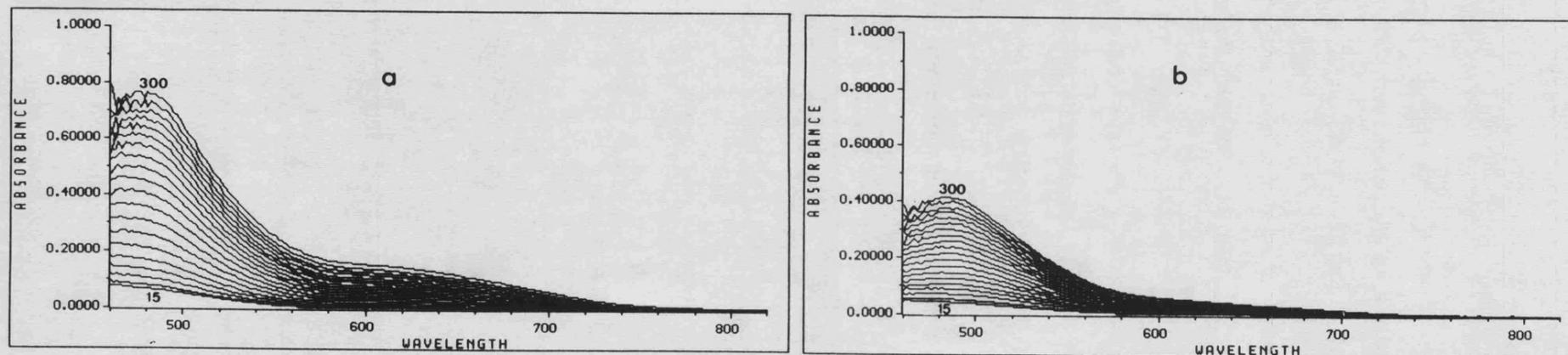
Dado que el aumento de absorbancia con el tiempo durante los primeros 300s fue lineal, la pendiente de la recta ($\tan \alpha$) se pudo utilizar como medida de la velocidad de reacción.

En la Tabla 28 se muestran los valores obtenidos para la velocidad de reacción y la variación de absorbancia a diferentes intervalos de tiempo y a 490nm, tanto para el NQS solo como en presencia de β -feniletilamina y efedrina. El comportamiento observado a esta longitud de onda puede extrapolarse a las otras λ en el intervalo estudiado entre 490-510nm, si bien sólo se muestran los resultados obtenidos a 490nm por obtenerse la sensibilidad mayor.

TABLA 28. Velocidad de reacción e incrementos de absorbancia a diferentes intervalos de tiempo (s), para el NQS β -feniletilamina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y efedrina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{pH}=10.5$, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. (* medidos frente blanco reactivo).

Velocidad de reacción($\times 10^3$)	Intervalo de tiempos (s).					
	30-90	30-180	30-300	15-300	45-180	45-270
NQS	1.69 ± 0.04	1.927 ± 0.054	2.268 ± 0.029	2.234 ± 0.024	1.948 ± 0.082	2.231 ± 0.050
BFN*	2.41 ± 0.04	3.000 ± 0.025	2.731 ± 0.031	2.710 ± 0.026	3.051 ± 0.048	2.815 ± 0.061
EFE*	1.34 ± 0.06	1.606 ± 0.050	1.641 ± 0.021	1.586 ± 0.020	1.677 ± 0.039	1.706 ± 0.049
$(A_u - A_0)$	90-30	180-30	300-30	300-15	180-45	270-45
NQS	0.098 ± 0.003	0.28 ± 0.01	0.611 ± 0.008	0.631 ± 0.009	0.2671 ± 0.0061	0.500 ± 0.003
BFN*	0.14 ± 0.04	0.4303 ± 0.0003	0.700 ± 0.005	0.724 ± 0.005	0.405 ± 0.007	0.61 ± 0.01
EFE*	0.080 ± 0.002	0.229 ± 0.006	0.4068 ± 0.0003	0.418 ± 0.007	0.217 ± 0.004	0.35 ± 0.01

FIGURA 48. Espectro de absorción del NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ b) efedrina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{pH}=10.5$, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min.(espectros medidos frente blanco reactivo).



Tanto los valores de velocidad como los ΔA , a todos los intervalos de tiempo estudiados, aumentan en orden efedrina-NQS, NQS y β -feniletilamina-NQS. Por otra parte, para la reacción entre NQS y β -feniletilamina el mayor valor de la velocidad se obtiene para los intervalos de tiempo 30-180 y 45-180s, mientras que para la reacción entre NQS y efedrina los intervalos fueron 45-180 y 45-270. Además, el incremento en los valores de absorbancia aumenta al hacerlo el intervalo de tiempo eligiendo 45-180s como intervalo de medida.

Efecto de la acidez y de la concentración de tampón

Este estudio se realizó en el intervalo de pH 8.4-12.0 usando disoluciones reguladoras de carbonato-bicarbonato sódico con adición de hidróxido sódico para modificar el pH. A pHs menores la velocidad de la reacción fue demasiado baja. Como puede observarse en la Figura 49, la velocidad de reacción para el NQS aumenta con el pH, siendo esta variación menor a partir de pH 10.5. Por otra parte, para las otras dos reacciones (Figura 49B), las mayores velocidades de reacción se obtienen a pH 10.5. Por lo tanto, se eligió 10.5 como pH óptimo de trabajo.

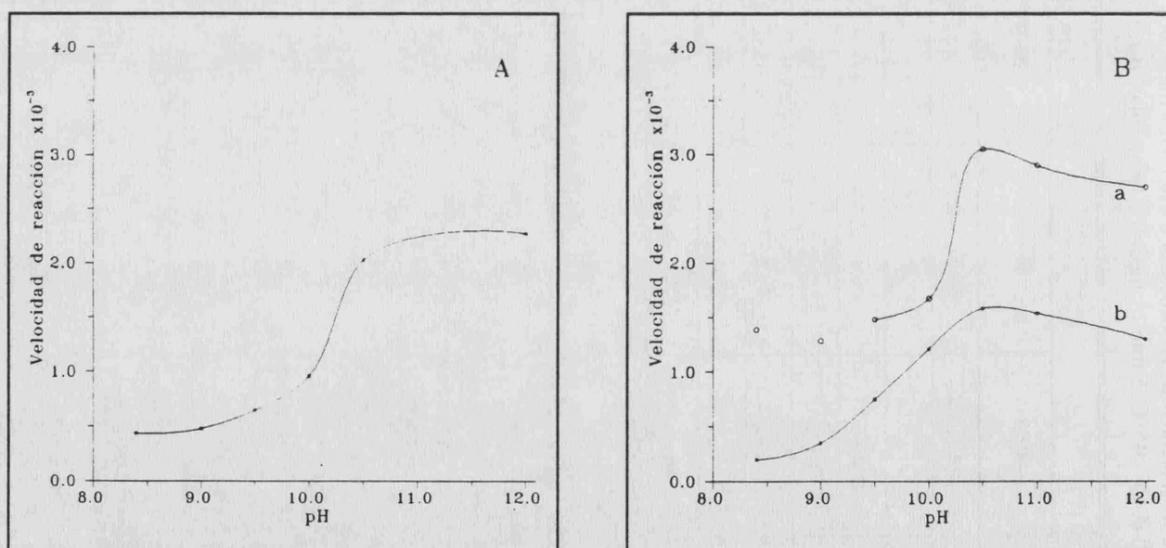


FIGURA 49. Variación de la velocidad de reacción en función del pH del medio. A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, pH=10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490 \text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

Las condiciones en que la evolución del reactivo es mayor coinciden a su vez con las que la extracción del reactivo en el disolvente orgánico es menor, lo que podría indicar que el reactivo bajo estas condiciones evoluciona hacia una/s especie/s que no se extraen en el disolvente orgánico. Sin embargo, a valores de pH menores, la evolución del reactivo es mucho menor, siendo en este caso la extracción del reactivo en el disolvente orgánico mayor.

Aunque bicarbonato al 8% (pH=8.4) es el medio más empleado en la bibliografía, nosotros preferimos la utilización de disoluciones reguladoras de dihidrógeno-monohidrógeno fosfato (pH=7.5) o de carbonato-bicarbonato (pH=10.5), dado que la interferencia del reactivo en la disolución orgánica fue menor.

También se estudio la influencia de la concentración de carbonato-bicarbonato en el intervalo 0.01-0.3 M. Los resultados obtenidos indicaron que tanto en ausencia como en presencia de aminas, la concentración de disolución reguladora influye sobre la velocidad de reacción (Figura 50). Así para la reacción NQS- β -feniletilamina el aumento de la velocidad con la concentración de carbonato-bicarbonato es mayor que para la reacción entre la efedrina y el reactivo. La concentración de 0.1M se elige como concentración de trabajo.

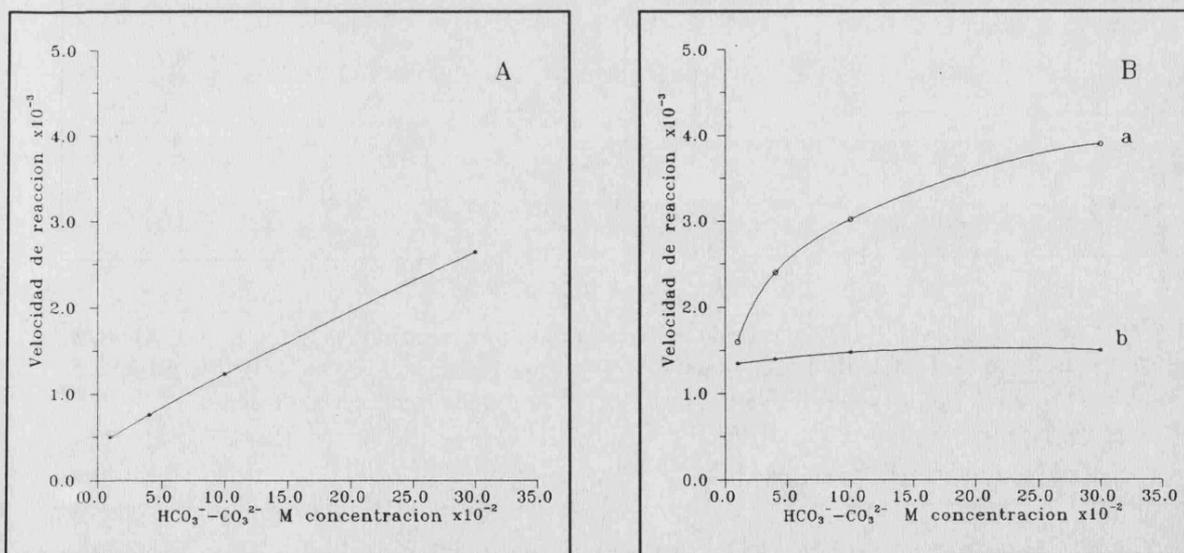


FIGURA 50. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de tampón carbonato/bicarbonato). A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 μ g/mL, b) efedrina 40 μ g/mL. NQS 6.4×10^{-3} M, pH=10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a λ 490 nm. (medidos frente blanco reactivo).

Influencia de la concentración de Triton X-100

A continuación se estudia el efecto de la concentración de tensioactivo sobre la velocidad de la reacción entre el reactivo y las dos aminas.

El intervalo de concentraciones estudiado varió entre 0.1 y 0.8 % de Triton X-100. La presencia de tensioactivo permitió la solubilización del producto de reacción sin afectar prácticamente a la velocidad en el caso del reactivo solo y en presencia de efedrina (Figura 51). Para la reacción NQS- β -feniletilamina, puede considerarse que la velocidad no se modifica en presencia de una concentración de Triton inferior al 0.4%. En base a estos resultados, se eligió una concentración de Triton X-100 de 0.1%.

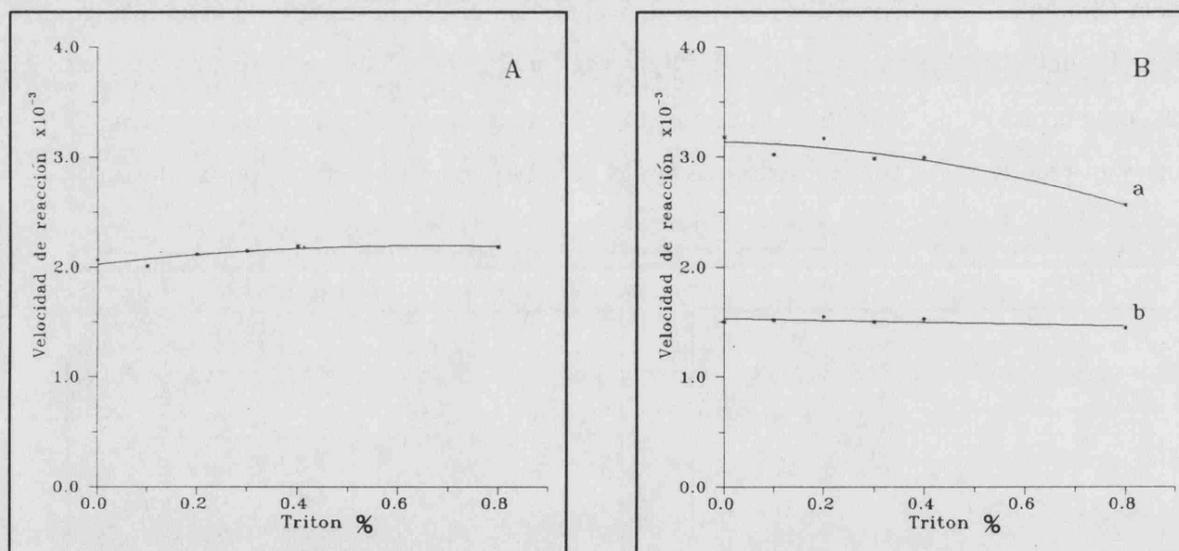


FIGURA 51. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de Triton X-100. A) NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3}\text{M}$, $\text{pH}=10.5$, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490\text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

Influencia de la temperatura

También se estudió el efecto de la temperatura en el intervalo entre 25 y 55°C . En presencia del tensioactivo no se pudieron utilizar temperaturas superiores por producirse un enturbiamiento en las disoluciones que impedían la medida de la señal analítica. En las Figuras 52 A y B puede apreciarse que para las dos reacciones estudiadas la velocidad

aumenta con la temperatura. Dado que la velocidad de reacción del blanco también aumenta con la temperatura, seleccionamos una temperatura de calefacción 45°C, con el propósito de disminuir la señal analítica correspondiente al blanco reactivo.

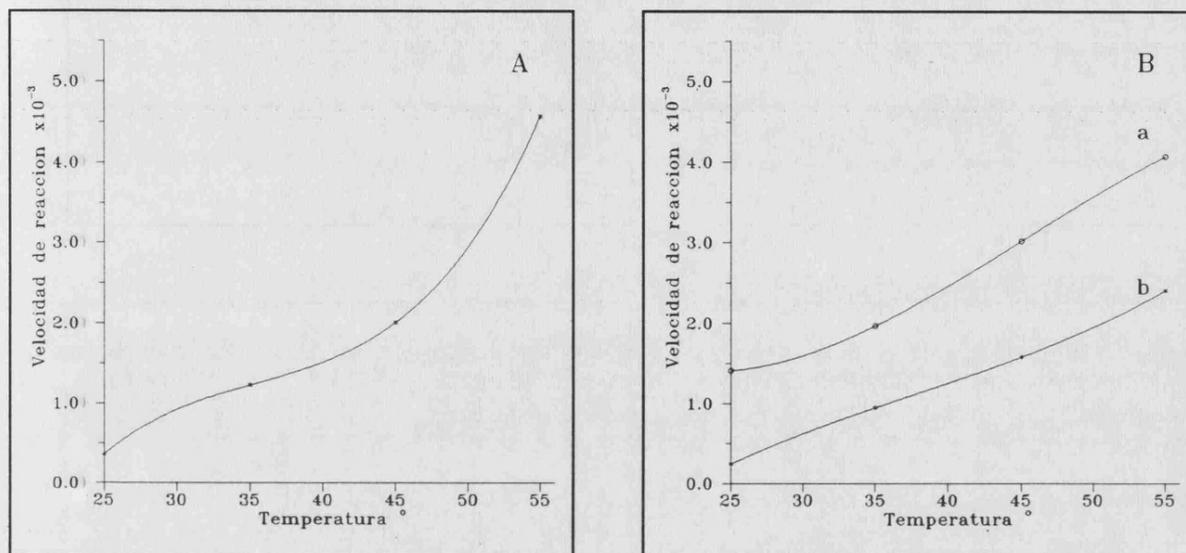


FIGURA 52. Variación de la velocidad de reacción en función de la temperatura. A) NQS, B) NQS en presencia de (a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, $\text{pH} = 10.5$, Triton X-100 0.1 %, 45°C 55 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490 \text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

Influencia de la concentración de NQS

La variación de la concentración de NQS viene limitada por la alta absorptividad molar del reactivo. Este estudio al igual que los anteriores se realizó tanto en presencia como ausencia de aminas. En ausencia de amina, la velocidad de reacción aumenta con la concentración de reactivo (Figura 53 A). En la Figura 53B, se muestran las curvas de saturación en presencia de β -feniletilamina y efedrina, observándose que las velocidades de reacción aumentan con la concentración de NQS hasta $6.4 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $1.02 \times 10^{-2} \text{ M}$, respectivamente. En base a estos resultados elegimos una concentración de NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{ M}$.

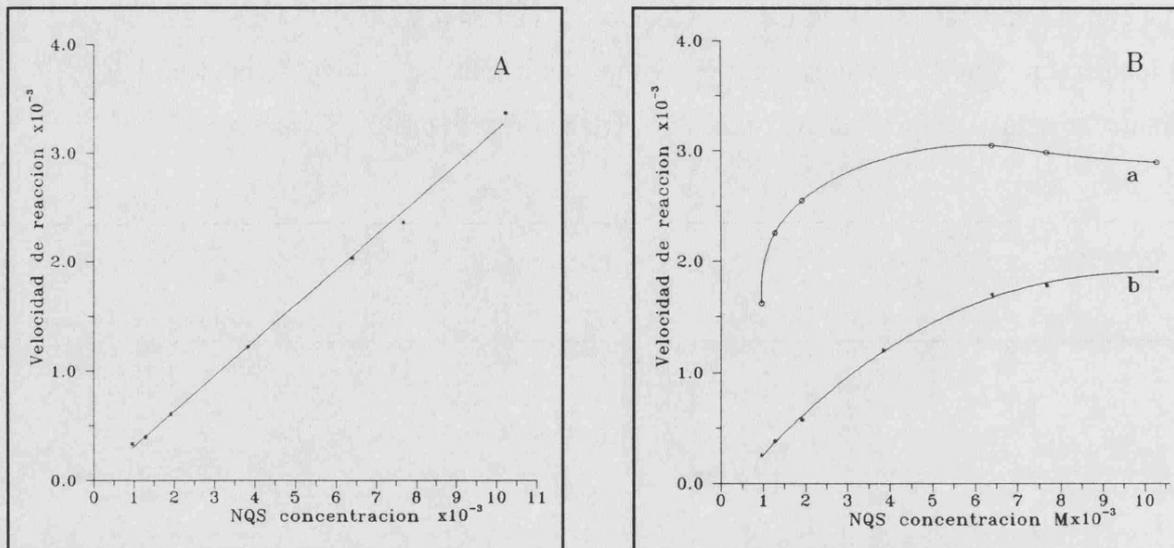


FIGURA 53. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de NQS. A) Reactivo NQS, B) NQS en presencia de a) β -feniletilamina 20 $\mu\text{g/mL}$, b) efedrina 40 $\mu\text{g/mL}$. pH=10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490$ nm. (medidos frente blanco reactivo).

3.5.2.- Orden de reacción

El método diferencial se basa en la medida de las velocidades iniciales de las reacciones determinadas midiendo las pendientes de las curvas concentración-tiempo. Si una reacción es de un orden n , puede relacionarse la velocidad con la concentración de un reactivo mediante la ecuación: $v = kc^n$ (siendo k la constante de velocidad). Por tanto, si se determina la velocidad para distintos valores de concentración de reactivo, la representación del logaritmo de la velocidad frente al logaritmo de la concentración debe de dar una línea recta, donde la pendiente representa el orden de reacción respecto a la sustancia cuya concentración se ha variado y la ordenada en el origen representa el valor de logaritmo de la constante de velocidad.

Aplicando el método diferencial se calcularon los ordenes de reacción correspondientes al NQS, β -feniletilamina, efedrina, dl-anfetamina, d-anfetamina, d-metanfetamina y dl-metanfetamina en las condiciones óptimas de trabajo obtenidas para β -feniletilamina y efedrina: disolución reguladora carbonato-bicarbonato 0.1M (pH=10.5), 0.1% en Triton X-100, 45°C, intervalo de tiempo entre 45-180s y longitud de onda 490nm (Tabla 29). Tanto

para el reactivo como para los analitos en presencia del reactivo, se obtienen reacciones de pseudo-primer orden.

TABLA 29. Orden de reacción para los distintos analitos y el NQS. NQS $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$, pH = 10.5, Triton X-100 0.1%, 45°C 5 min. Intervalo 45-180s a $\lambda 490 \text{ nm}$. (medidos frente blanco reactivo).

Sustancia	n	k	r
NQS	0.96	-1.95	0.994
β -feniletilamina	1.01	-3.84	0.999
efedrina	0.98	-4.08	0.990
d-anfetamina	1.08	-4.35	0.999
dl-anfetamina	0.96	-4.39	0.999
d-metanfetamina	1.02	-4.03	0.999
dl-metanfetamina	0.91	-3.84	0.999

3.5.3.- Ecuaciones de las rectas de calibrado con patrones y parámetros analíticos

Para calcular las curvas de calibrado, se utilizaron dos métodos: el de la velocidad de reacción entre 45-180 s y los incrementos de los valores de absorbancia entre 45 y 180s. Para todas las aminas estudiadas las gráficas de calibrado se evaluaron en las condiciones óptimas obtenidas para β -feniletilamina y efedrina.

En la Tabla 30 se muestran las características analíticas de las determinaciones individuales de β -feniletilamina, efedrina, d-anfetamina, dl-anfetamina, dl-metanfetamina y d-metanfetamina aplicando los dos métodos arriba indicados.

TABLA 30. Características analíticas de la reacción entre el NQS y β -feniletiamina (BFN), Efedrina (EFE), dl-metanfetamina (dl-MET), d-metamfetamina (d-MET), d-anfetamina (d-AMP) y dl-anfetamina (dl-AMP). Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, NaHCO_3 0.1M, pH 10.5, triton X-100 0.1%, Temperatura 45°C e intervalo de tiempo 45-180s a 490 nm. (I.D = Intervalo dinámico, C.R. = coeficiente de regresión, C_{LD} = límite de detección.)

METODO	BFN	EFE	dl-MET	d-MET	dl-AMP	d-AMP
<i>(A₁₈₀-A₄₅)</i>						
Ordenada	-3.04×10^{-3}	2.01×10^{-3}	-5.84×10^{-3}	3.24×10^{-3}	-3.44×10^{-3}	-9.84×10^{-3}
Pendiente	20.03×10^{-3}	9.23×10^{-3}	12.84×10^{-3}	12.47×10^{-3}	5.72×10^{-3}	5.79×10^{-3}
C.R.	0.9999	0.9990	0.9991	0.9992	0.9990	0.9992
C_{LD} (mg/L)	0.92	2.0	1.4	1.5	3.2	3.2
I.D.(mg/L)	3.1 - 50.0	6.7 - 50	4.8 - 50	4.9 - 50	10.8 - 50	10.6 - 50
<i>Velocidad Inicial (45-180s)</i>						
Ordenada	-1.80×10^{-5}	4.81×10^{-5}	-5.77×10^{-5}	-4.07×10^{-5}	-5.29×10^{-6}	-9.01×10^{-5}
Pendiente	15.0×10^{-5}	7.06×10^{-5}	9.57×10^{-5}	9.31×10^{-5}	4.22×10^{-5}	4.32×10^{-5}
C.R.	0.9999	0.9990	0.9994	0.9992	0.9990	0.9993
C_{LD} (mg/L)	1.6	3.5	2.6	2.6	5.8	5.7
I.R.(mg/L)	5.5 - 50	11.6 - 50	8.6 - 50	8.8 - 50	19.4 - 50	19.0 - 50

El límite de detección (C_{LD}) se calculó a partir de la expresión $3 S_B/m$ (98). El límite de cuantificación se evaluó a partir de la expresión $10 S_B/m$ (99) y se corresponde con el límite inferior del intervalo lineal. La determinación más sensible corresponde a la β -feniletiamina y las menos sensibles son las de d-anfetamina y dl-anfetamina. Para todas las determinaciones, utilizando el método de ΔA se obtienen unos intervalos de linealidad mayores y unos límites de detección y de cuantificación menores que empleando el método de la velocidad de reacción.

3.5.4.- Determinación de anfetamina y efedrina en preparados farmacéuticos

En este apartado se realizó la determinación de una amina primaria, anfetamina y de una secundaria, efedrina, en algunos preparados farmacéuticos, en las condiciones óptimas previamente establecidas: tampón carbonato-bicarbonato 0.1M, pH=10.5, Triton X-100 0.1%, NQS 6.4×10^{-3} M, temperatura de calefacción de la muestra a 45 °C. Las lecturas de

absorbancia se realizaron a 490nm. El procedimiento se evaluó quimiométricamente mediante la aplicación del método de adición estándar y del método de Youden.

Los preparados farmacéuticos utilizados son colirio de ojos y comprimidos. El colirio de ojos comercialmente conocido por Mirazul y según la referencia del fabricante con un contenido de 0.5 mg/mL de clorhidrato de efedrina. (Laboratorio de Aplicaciones Farmacodinámicas, S.A.)

La determinación de anfetamina se realizó en comprimidos, comercialmente conocidos con el nombre de Centramina, y con un contenido de 10 mg de sulfato de anfetamina por comprimido.

Procedimiento experimental.

Preparados farmacéuticos

Colirio

Mirazul: volúmenes 1.8 y 1.3 mL del preparado farmacéutico fueron diluidos a 10 mL, de estas disoluciones se tomaron alícuotas de 0.5 y 1.0 mL, respectivamente, a las cuales se les adicionó tampón carbonato-bicarbonato pH=10.5, Triton X-100 y agua destilada hasta completar un volumen de 1.5 mL. Finalmente, se añadió 1.0 mL de NQS, siendo el volumen final en la cubeta de 2.5 mL. Las muestras se procesaron siguiendo el procedimiento descrito para las disoluciones patrón.

Comprimidos

Centramina: En todos los casos, se pesaron y homogeneizaron 3 pastillas del preparado farmacéutico. La cantidad requerida (aproximadamente 0.06 g) fue suspendida en agua destilada y agitada durante 30 minutos, siendo posteriormente filtrada. El filtrado fue llevado a 50 mL con agua destilada.

Métodos de Youden y Adición Estándar

Para la aplicación del método de Youden, se tomaron volúmenes variables, entre 0.2-1.1 mL, de la disolución del preparado farmacéutico, estando las concentraciones finales comprendidas entre 7.1 y 39.1 mg/L. Estas muestras se procesaron de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Para la aplicación del método de adición estándar, a un volumen constante de la disolución del preparado farmacéutico, se adicionaron volúmenes variables de disolución patrón de sulfato de anfetamina o de clorhidrato de efedrina, disolución reguladora carbonato-bicarbonato (pH=10.5), Triton X-100, agua destilada, y NQS, siendo el volumen final de 2.5 mL. La mezcla resultante se procesó de acuerdo con el procedimiento descrito para las disoluciones patrón.

Como puede verse lo largo de la presente memoria, el NQS constituye un blanco que absorbe a las mismas longitudes de onda que el producto de reacción amina-NQS. Cuando se aplicó el método de Youden a muestras de preparados farmacéuticos que contenían anfetamina (Centramina) se observó que la ordenada en el origen en presencia de analito era diferente de cero ($\Delta A_{180-45s} = 0.2634 \pm 0.0041$, $v_{45-180s} = (1.949 \pm 0.002) \times 10^{-3}$) siendo este valor coincidente con el valor correspondiente al blanco de reactivo ($\Delta A_{180-45s} = 0.2671 \pm 0.0061$, $v_{45-180s} = (1.948 \pm 0.082) \times 10^{-3}$). En la Figura 54a, se muestra la representación correspondiente al Youden en presencia de anfetamina. Cuando se resta el valor del blanco reactivo, la ordenada en el origen es coincidente con cero (Figura 54b). Dada la coincidencia entre los valores del TYB y del blanco reactivo se puede decir que la determinación de anfetamina presenta un error de tipo constante debido al reactivo estando libre de cualquier otro tipo de error constante debido a la matriz.

En general se puede afirmar que la determinación de aminas mediante reacción con NQS a través del procedimiento cinético-espectrofotométrico, presenta un error constante debido a la interferencia del blanco reactivo.

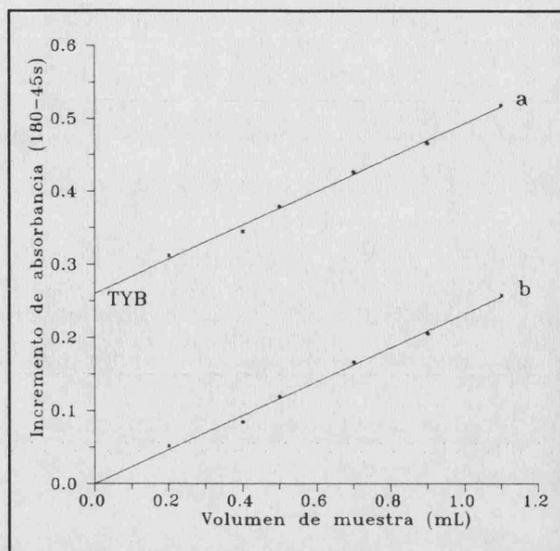


FIGURA 54. Variación de la señal analítica ΔA vs volumen de muestra. a) frente a blanco medio de reacción, b) frente a blanco reactivo. Condiciones: NQS $6.4 \times 10^{-3} M$, $NaHCO_3$ 0.1M, pH 10.5, triton X-100 0.1%, Temperatura $45^\circ C$ e intervalo de tiempo 45-180s a 490 nm.

Determinación del contenido de sulfato de anfetamina en comprimidos y de efedrina en colirio.

Previamente a la determinación del contenido de anfetamina en el preparado farmacéutico, se aplicó el método de adición estándar con el propósito de observar la ausencia o presencia de errores proporcionales debidos a la matriz.

En la determinación de sulfato de anfetamina en comprimidos, la pendiente de la recta obtenida mediante la aplicación del MOSA ($m: \Delta A_{180-45s} = 5.4612 \times 10^{-3}$, $v_{45-180s} = 4.0555 \times 10^{-5}$) fue similar a la correspondiente a la curva de calibrado con patrones ($m: \Delta A_{180-45s} = 5.79 \times 10^{-3}$, $v_{45-180s} = 4.32 \times 10^{-5}$), mostrando la ausencia de errores sistemáticos proporcionales debidos a la matriz. Dicho resultado indica que la concentración de anfetamina presente en la muestra puede ser determinada bien a partir de la aplicación del MOSA o bien directamente a partir de la sustitución de la señal analítica obtenida en la correspondiente curva de calibrado de los patrones. En ambos casos, será necesario evaluar previamente la señal correspondiente al TYB o blanco reactivo, el cual será sustraído a la señal analítica de la muestra, previamente a su determinación.

En la Tabla 31 se muestran los resultados de concentración de sulfato de anfetamina encontrados en la muestra mediante la aplicación del MOSA y de la curva de calibrado con patrones, utilizando como parámetros la velocidad de reacción entre 45-180s y los incrementos de absorbancia entre 45-180s. Usando estos dos métodos, se obtienen resultados comparables.

Finalmente, se determinó la concentración presente de sulfato de anfetamina por comprimido siendo de 9.95 ± 0.39 mg ($n=16$), cuando la cantidad dada por el fabricante es de 10 mg por comprimido. Por tanto la concentración de anfetamina en la muestra puede determinarse con un error máximo del 3.9%.

Análogamente, se determinó el contenido de clorhidrato de efedrina en muestras de colirio. En este caso, la aplicación del MOSA permitió obtener pendientes similares a las correspondientes a la curva de calibrado con patrones ($m: \Delta A_{180-45s} = 10.14 \times 10^{-3}$, $v_{45-180s} = 7.59 \times 10^{-5}$, $\Delta A_{180-45s} = 9.23 \times 10^{-3}$, $v_{45-180s} = 7.09 \times 10^{-5}$, respectivamente) indicando la ausencia de errores sistemáticos proporcionales en la determinación. Consecuentemente, tanto la aplicación del MOSA como de la curva de calibrado permiten determinar la concentración de clorhidrato de efedrina en el preparado farmacéutico, si previamente se ha evaluado la interferencia constante del blanco reactivo. En la Tabla 31 se observa que los valores de concentración encontrados en el preparado farmacéutico mediante la aplicación de ambos métodos son similares. La concentración obtenida fue de 0.50 ± 0.02 mg/mL ($n=8$), cuando la concentración indicada por el fabricante era de 0.5 mg/mL. Estos resultados nos indican que la concentración de clorhidrato de efedrina en la muestra puede ser determinada con un error máximo del 4%.

El valor de concentración obtenido en la determinación de efedrina fue similar al evaluado mediante la aplicación del procedimiento de determinación de efedrina extracto-colorimétricamente con NQS utilizando como disolvente de extracción alcohol isoamílico, en cuyo caso la concentración encontrada fue de 0.504 ± 0.035 mg/mL para $n=8$.

TABLA 31. Resultados de concentración obtenidos en preparados farmacéuticos (Centramina y mirazul). Aplicando el MOSA y la curva de calibrado con patrones.(ANF=anfetamina, EFE=efedrina).(*) Correspondiente a las muestras de colirio para la determinación de clorhidrato de efedrina.

Cantidad de muestra (g)	Vol. de muestra tomado después de la dilución (mL)	Muestras fortificada Con. de ANF o EFE* añadida. (mg/L)	Con. indicada por el fabricante en ANF o EFE* (mg/L)	<i>Incremento de Absorbancia 45-180s</i>				<i>Velocidad de reacción (45-180s)</i>			
				Método de Adición Estándar (MOSA)		Curva de calibrado con patrones		Método de Adición Estándar (MOSA)		Curva de calibrado con patrones	
				Conc. encontrada (mg/L)	Error (%)	Conc. encontrada (mg/L)	Error (%)	Conc. encontrada (mg/L)	Error (%)	Conc. encontrada (mg/L)	Error (%)
0.0623	0.5	----	17.8	18.1	+1.7	18.1	+1.7	17.9	+0.6	17.6	-1.1
		16.0			15.4	-1.9		14.8	-7.5		
		32.0			30.4	-5.0		29.4	-8.1		
		40.0			38.3	-4.3		36.8	-8.0		
0.0633	0.5	----	18.7	19.2	+2.6	19.3	+3.2	19.5	+4.3	18.9	-1.1
		8.0			8.2	+2.5		7.6	-5.0		
		24.0			23.1	-3.9		22.6	-5.8		
		40.0			37.9	-5.2		36.8	-8.0		
0.0623	0.4	----	14.2		14.8	+4.2		14.4	+1.4		
0.0633	0.7	----	26.2		24.7	-5.7		24.3	-7.2		
0.0633	0.9	----	33.6		34.2	-1.8		33.6	0.0		
0.0633	1.1	----	41.1		38.5	-6.3		37.8	-8.0		
(*)1.8 mL	0.5	----	18.0	18.4	+2.2	18.7	+3.9	18.8	+4.4	19.2	+6.6
(*)1.3 mL	1.0	----	26.0	23.8	-8.4	25.9	-0.4	25.1	-3.5	26.5	+1.9

3.5.5.- Conclusiones

En este apartado se ha establecido un procedimiento cinético-espectrofotométrico para la determinación de aminas mediante reacción con el reactivo NQS y en presencia de un tensoactivo (Triton X-100) que permite la solubilización del producto de reacción, evitando por tanto la necesidad de su extracción con disolventes orgánicos. Este procedimiento ha sido aplicado a la determinación de anfetamina y efedrina en preparados farmacéuticos, pudiéndose en ambos casos determinar la concentración de analito presente en la muestra con errores menores del 4 %. Los resultados obtenidos han sido comparables a los evaluados mediante la utilización del procedimiento extracto-espectrofotométrico con extracción del producto de reacción con disolventes orgánicos. Sin embargo, el empleo del procedimiento cinético permite reducir considerablemente el tiempo de análisis así como el consumo de reactivos (especialmente los disolventes de extracción del producto de reacción).

Este procedimiento no es adecuado para la determinación de estas drogas en muestras de orina dados las altas señales analíticas obtenidas para los blancos correspondientes.

**3.6.- DETERMINACION DE ANFETAMINA Y
METANFETAMINA EN MUESTRAS DE ORINA
MEDIANTE CLAR EN FASE NORMAL**

Este apartado se inicia con un estudio del procedimiento cromatográfico descrito por Endo y col.(57) , y reproducido por Farrell y col.(58) para la determinación de anfetaminas en muestras de orina con detección UV/V, estudiando de la separación cromatográfica de los productos de reacción (amina-NQS) para las diferentes condiciones de reacción, siendo el principal objetivo de este apartado incidir en el tratamiento previo de la muestra de orina para la determinación de estos analitos.

3.6.1.- Selección de las condiciones de derivatización

Procedimiento experimental

Con objeto de estudiar las especies presentes en los extractos orgánicos tras previa derivatización con NQS se ha realizado la separación cromatográfica empleando cromatografía líquida de alta resolución tanto en fase reversa como en fase normal. Del mismo modo que en el procedimiento extracto-espectrofotométrico, se ha realizado una comparación de los distintas condiciones de reacción.

El procedimiento experimental ha sido el descrito en la página 88, correspondiente a la preparación de patrones de anfetamina-NQS y metanfetamina-NQS. Se han utilizado las condiciones descritas por Endo y col.(57) y Farrell y col.(58) utilizando bicarbonato (8%) y NQS 0.5%, siendo la mezcla resultante calentada durante 20 minutos a 70°C. De forma análoga, se ha realizado el procedimiento de derivatización en condiciones de pH 10.5 calefacción a 45°C durante 10 minutos. Los productos de reacción han sido extraídos en cloroformo, filtrados e inyectados en el cromatógrafo, utilizando una columna de sílice LiChrospher Si-60 μ 250 mm x 4 D.I y como eluyentes cloroformo:etanol:acetato de etilo:n-hexano (15:15:12:58).

En el caso de la utilización de cromatografía en fase reversa, los extractos de cloroformo fueron evaporados a sequedad y reconstituidos en un volumen igual de metanol, siendo posteriormente filtrados e inyectados en una columna LiChrospher 100 PR-18 (125 x 4) y como fase móvil acetonitrilo: agua (50:50).

Resultados y discusión

En la Figura 55, se muestran los cromatogramas obtenidos trabajando en las condiciones de reacción establecidas por Endo y col. (Tabla 5B) y en condiciones de pH 10.5 con calefacción de la muestra durante 10 minutos a la temperatura de 45°C. En el primer caso, el cromatograma muestra los picos de los productos de reacción anfetamina-NQS, metanfetamina-NQS y β -feniletilamina-NQS, con tiempos de retención 7.1, 7.5 y 8.5 minutos, respectivamente. Sin embargo en la parte inicial del cromatograma se observa la existencia de pequeños picos que también corresponden a productos de reacción amina-NQS, correspondiendo a cada analito dos picos. Análogamente, el cromatograma obtenido en condiciones de pH 10.5 es similar, sin embargo las áreas de los picos obtenidos son diferentes para anfetamina y β -feniletilamina, observándose un aumento de las áreas de los primeros picos y una disminución de los segundos.

La disminución del contenido de etanol en la fase móvil permitió la resolución de los picos iniciales del cromatograma (Figura 55B) mostrándose los picos correspondientes a cada analito y al reactivo.

En la Figura 56, se muestran los espectros correspondientes a los productos de reacción obtenidos. Los espectros tanto de los primeros productos de reacción como los de los segundos son bastante similares, por lo que en principio ambos productos contribuirán a la señal analítica obtenida en el procedimiento extracto-colorimétrico. Las especies indicadas presentan diferentes polaridades siendo los segundos productos de reacción más apolares.

Cuando la fase móvil contiene elevados porcentajes de etanol se observa una alteración en el orden de elución de los productos de reacción, sin embargo en condiciones cloroformo:etanol:acetato de etilo:n-hexano (22:1:32:45) el orden de elución coincide con el indicado en la bibliografía siendo metanfetamina-NQS, anfetamina-NQS y β -feniletilamina-NQS.

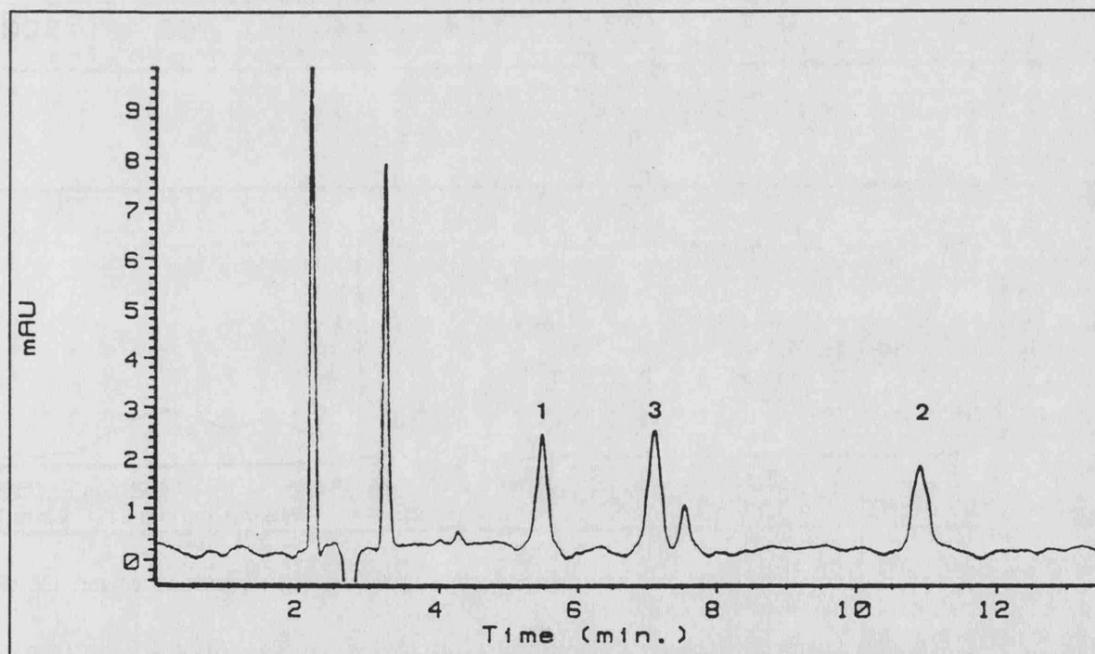
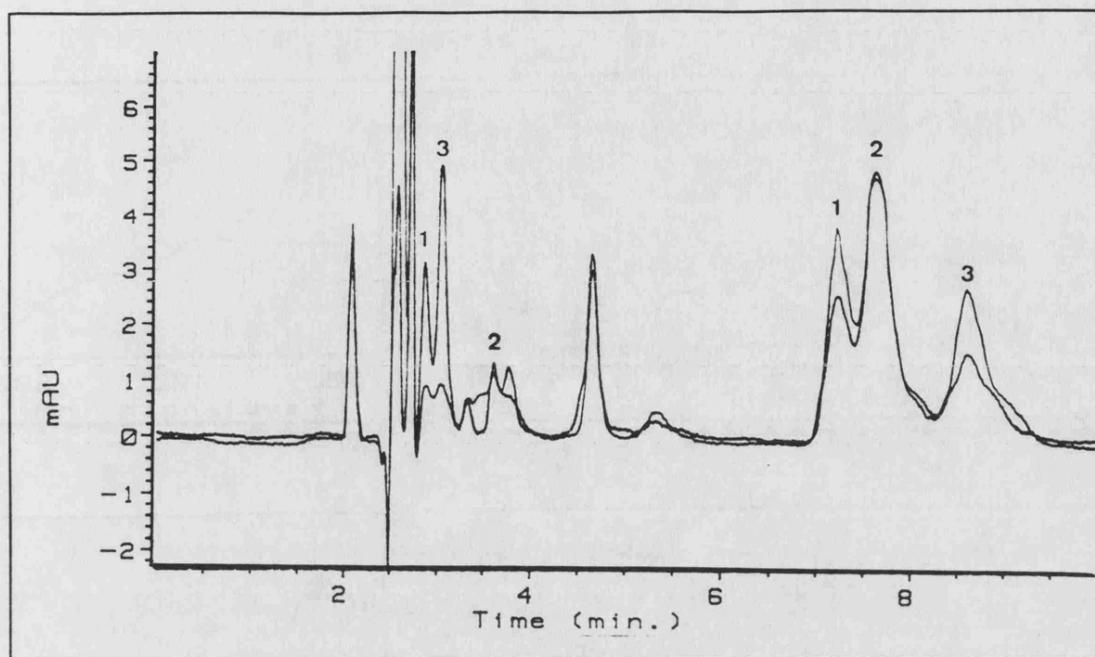


FIGURA 55. Cromatograma correspondiente a los productos de reacción amina-NQS. Utilizando un columna LiChorspher Si-60 $5\mu\text{m}$ 250 x 4 mm D.I. Fase móvil: Cloroforomo:acetato de etilo:n-hexano:etanol A)(15:12:58:15) B)(22:32:45:1) (1: anfetamina, 2: metanfetamina, 3: β -feniletilamina).

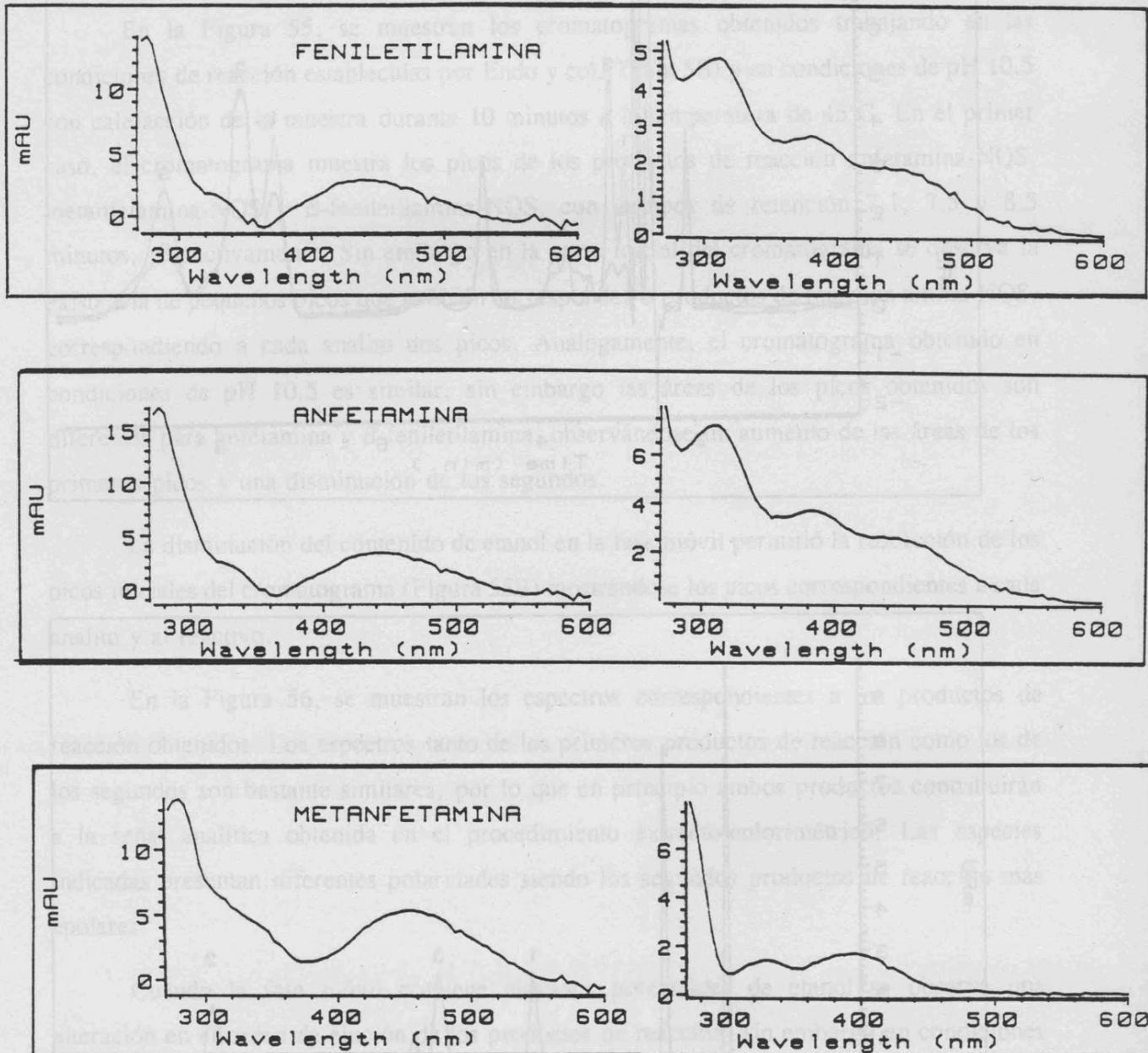


FIGURA 56. Espectros de absorción UV-V de los productos de reacción separados mediante CLAR.

Cuando los productos de reacción son separados utilizando CLAR en fase reversa, el orden de elución de los analitos se invierte, siendo β -feniletilamina, anfetamina y metanfetamina. Bajo estas condiciones los subproductos de reacción dado su mayor carácter apolar eluyen posteriormente apareciendo en la parte final del cromatograma (Figura 57).

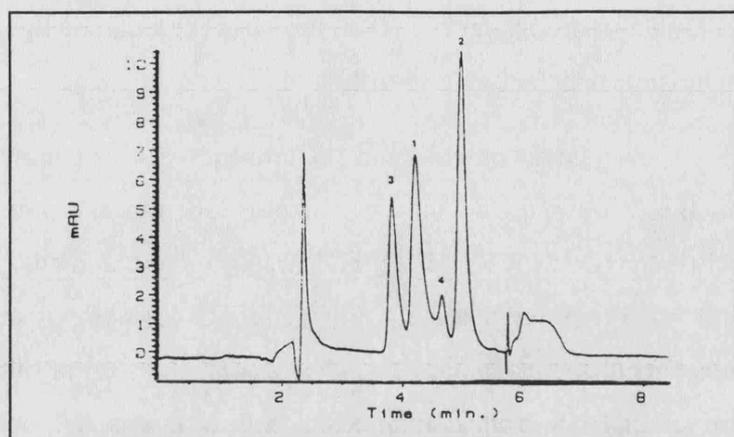


FIGURA 57. Cromatograma correspondiente a los productos de reacción amina-NQS utilizando una columna C18. (1: anfetamina, 2: metanfetamina, 3: β -feniletilamina, 4: efedrina.).

De este estudio se deriva que por lo menos en el extracto orgánico existen dos especies diferentes. La relación entre sus concentraciones depende de las condiciones experimentales de derivatización estando interrelacionadas.

Desde el punto de vista de la determinación CLAR resulta más adecuado la utilización de las condiciones descritas por Endo y col. (Tabla 5B) sobre todo para anfetamina. De ahí que se hayan elegido estas condiciones y como disolvente de extracción cloroformo dado que la recuperación es superior y al introducir una etapa de separación los problemas de blanco son menos graves, incluso despreciables.

3.6.2.- Selección de las condiciones cromatográficas

Procedimiento experimental

Los condiciones cromatográficas descritas por Endo y col.(57), así como por Farrell y col.(58) se muestran en la Tabla 5B. Ambos autores utilizan el reactivo NQS como agente de derivatización de aminas y realizan su determinación en orina por CLAR en fase normal.

El procedimiento de derivatización se realiza mediante calefacción a 70°C durante 20 minutos de una mezcla de amina, tampón bicarbonato al 8% y reactivo NQS 0.5% (Volumen total 2 mL), siendo el producto de reacción extraído en 2 mL de CHCl_3 .

Ambos procedimientos cromatográficos son similares presentando ligeras modificaciones para obtener los mismo resultados.

En este caso se ha utilizado un columna LiChrospher Si-60, tamaño de partícula 5 μm , 125 mmx4 mm DI. Columnas de mayor tamaño (250 mm x 4 mm DI) prolongan considerablemente el tiempo de análisis, requiriéndose además un aumento considerable en el porcentaje de etanol en la fase móvil con el fin de disminuir los tiempos de retención. Con el propósito de obtener resultados comparables a los establecidos en la bibliografía se han estudiado las condiciones cromatográficas (composición de la fase móvil, velocidad de flujo, volumen de inyección de la muestra). La identificación de cada uno de los productos de reacción (amina-NQS), se realizó por comparación de sus espectros y tiempos de retención, con los obtenidos previamente mediante la inyección directa de cada uno de ellos.

El detector ha registrado los espectros del eluato entre 270 y 600 nm. (cada 4 nm) a intervalos de 460 ms, siendo la longitud de onda de referencia 600 nm. Se han elegido diferentes longitudes de onda 254, 280, 450 y 464 nm. La utilización de menores longitudes de onda no ha sido posible debido al elevado ruido de fondo proporcionado por los disolventes utilizados. Las inyecciones cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente.

Resultados y discusión

Los disolventes empleados en la fase móvil fueron etanol, cloroformo, acetato de etilo y n-hexano en las mismas proporciones que las establecidas en la bibliografía por Farrell y col.(57). Sin embargo, en este caso la velocidad de flujo ha sido de 2 mL/min, dado que una velocidad de flujo menor aumenta el tiempo de análisis y la resolución de los picos es peor presentando una gran dispersión. Las condiciones cromatográficas propuestas se muestran en la Tabla 32.

En la Figura 56 se muestran los espectros de absorción de los diferentes compuestos considerados utilizando las condiciones cromatográficas indicadas anteriormente. En general los máximos de absorción de mayor intensidad aparecen en la región de longitudes de onda 230-300 nm. Sin embargo trabajando en cromatografía en fase normal, no se han podido utilizar longitudes de onda menores a 270 nm. Los espectros correspondientes a los productos de reacción de la β -feniletilamina y anfetamina son idénticos, presentando máximos

localizados a 276, 324 y 448 nm. El producto de reacción metanfetamina-NQS presenta un espectro ligeramente diferente estando en este caso los máximos de absorción localizados a 280, 340 y 456 nm. La principal diferencia entre estos compuestos reside en el tiempo de retención, siendo este de 2.6, 3.7 y 4.9 min. para metanfetamina, anfetamina y β -feniletilamina, respectivamente (Figura 58).

TABLA 32. Condiciones cromatográficas.

Condiciones cromatográficas	
<u>Columna</u>	LiChrosfer Si-60, 5 μ m, 125x4mm D.I
<u>Fase móvil</u>	Cloroformo:acetato de etilo:n-hexano:etanol(22:32:45:1)
<u>velocidad de flujo</u> (mL/min)	2.0
<u>Volumen de inyección</u> (μ l)	25
<u>Detección</u>	280 y 450 nm

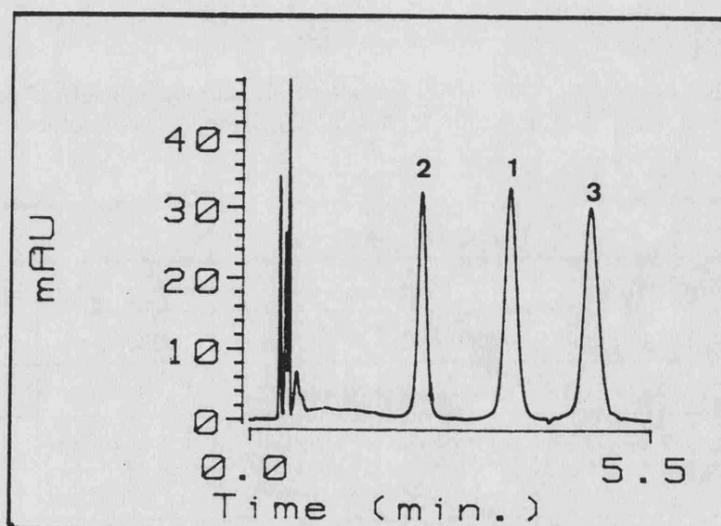


FIGURA 58. Cromatograma correspondiente a los productos de reacción amina-NQS utilizando CLAR en fase normal (LiChrosfer Si 60 5 μ m, 125 x 4 mm D.I.), en las condiciones descritas en la Tabla 32.

3.6.3.- Curvas de calibrado con patrones y parámetros analíticos

Procedimiento experimental

Las curvas patrón se han obtenido a partir de los productos de reacción NQS-amina. Para ello previamente se ha realizado el procedimiento de derivatización partiendo de disoluciones acuosas de los analitos. En este caso se han tomado volúmenes variables de una disolución patrón de analito, a los que se ha adicionado 0.5 mL de una disolución de bicarbonato al 8% y 0.5 mL de reactivo NQS (volumen final 1.5 mL). La mezcla resultante se ha calentado a 70°C durante 20 minutos y el producto de reacción ha sido extraído en 1.5 mL de cloroformo. Se han reproducido concentraciones comprendidas entre 0.66 y 13.33 $\mu\text{g/mL}$. Las condiciones cromatográficas son las descritas en la Tabla 33, realizándose tres réplicas de cada disolución.

Resultados y discusión

Las curvas de calibrado se han construido representando el área de los picos cromatográficos obtenidos para los productos de reacción amina-NQS frente a la concentración de analito en la muestra.

En la Tabla 33 se muestran los parámetros analíticos correspondientes a los tres analitos estudiados. El calibrado es lineal en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

TABLA 33. Parámetros analíticos correspondientes a los productos de reacción amina-NQS. Condiciones: NQS 6.4×10^{-3} M, medio bicarbonato 0.26%, calefacción 20 min. 70°C. Extraídos en cloroformo.

Parámetros analíticos						
	β -feniletilamina		Anfetamina		Metanfetamina	
	280 nm	450 nm	280 nm	450 nm	280 nm	450 nm
$a \pm S_a$	0.8 ± 4.4	1.5 ± 1.97	-1.12 ± 4.8	0.85 ± 1.35	0.3 ± 3.2	3.26 ± 2.05
$b \pm S_b$	35.54 ± 0.6	7.93 ± 0.25	32.09 ± 0.6	7.30 ± 0.2	22.54 ± 0.42	8.42 ± 0.25
r	0.998	0.995	0.998	0.997	0.998	0.995
n	12	13	13	13	13	13
S_{yx}	9.3	4.2	10.4	2.9	6.7	4.4

3.6.4. Tratamiento previo de muestras de orina

Como se deriva de la lectura del apartado dedicado al tratamiento de muestra en los antecedentes, la mayor parte de los procedimientos descritos al respecto, se basan en la extracción líquido-líquido, por lo que estos fármacos son aislados de la matriz biológica, y en ocasiones preconcentrados, en un disolvente orgánico adecuado. Estos procedimientos suelen requerir grandes volúmenes de disolventes puesto que con frecuencia no es suficiente una única etapa de extracción si se desea conseguir un elevado rendimiento o una eliminación suficiente de la matriz, con lo que el tiempo de preparación de la muestra se alarga considerablemente. Además, la inmiscibilidad entre las dos fases puede conducir a la formación de emulsiones, lo que se traduce en la obtención de recuperaciones variables de los analitos.

Como puede observarse en la Tabla 4, son muy pocos los procedimientos descritos en la bibliografía que utilizan extracción en fase sólida en la etapa de tratamiento de la muestra. Estas técnicas se basan en la retención selectiva de los analitos en columnas rellenas con un material similar al que se usa en la separación cromatográfica de las muestras, pero con un diámetro de partícula muy superior. Los compuestos de la matriz que también hayan podido quedar retenidos, se eliminan lavando la columna con un disolvente, en el caso de analitos de baja polaridad es suficiente el empleo de agua o un tampón. Finalmente, los analitos son eluidos con un disolvente apropiado (metanol, acetonitrilo...etc.). Estas técnicas presentan claras ventajas sobre la extracción líquido-líquido al requerir una menor manipulación de la muestra, y un menor consumo de disolventes orgánicos, suponiendo además un ahorro en el tiempo total de análisis.

En este apartado se estudian las posibilidades de las técnicas de extracción en fase sólida para el análisis de anfetaminas en muestras de orina, y posterior determinación CLAR tratando de encontrar las condiciones más favorables para el análisis. Este estudio se ha realizado para diversos tipos de rellenos octadecilo (C18), octilo (C8), etilo (C2), ciclohexilo (CH), fenilo (PH) y cianopropilo (CN), ensayados con anterioridad en el apartado de la determinación extracto-espectrofotométrica. En aquella sección no se eligió este procedimiento dado que la interferencia introducida por el blanco de orina era superior a la presentada por la extracción líquido-líquido, sin embargo en este apartado al incluir una etapa de separación, en principio, puede resultar ventajoso.

Los compuestos ensayados han sido anfetamina, metanfetamina y β -feniletilamina. En la elución de la muestra se ha utilizado una fase móvil (etanol:cloroformo:acetato de etilo:n-hexano 1:22:32:45), según las condiciones optimizadas con anterioridad. Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos mediante un procedimiento convencional de extracción líquido-líquido (57).

3.6.4.1.- Extracción líquido-líquido

Procedimiento experimental

Las muestras para el análisis han sido preparadas adicionando a 5.0 mL de orina 200 μ L de una disolución acuosa de concentración 100 μ g/mL en cada una de las anfetaminas, de forma que la concentración final en la muestra es de aproximadamente 4 μ g/mL.

El tratamiento de la muestra se realiza en medio básico, en este caso se añade a las muestras 0.1 mL de amoníaco concentrado por cada 5 mL de orina, con lo que el pH de la muestra es aproximadamente 10. A continuación 2 mL de la muestra se extraen con 2 mL de n-hexano con agitación mecánica, con posterior centrifugación para eliminar la emulsión formada entre ambas fases. El procedimiento de extracción se realiza 3 veces, disponiendo al final de un volumen total de 6 mL al que se le adiciona 50 μ L de una disolución de EtOH-HCl (6:1). Estos extractos son evaporados con rotavapor y el residuo obtenido es regenerado en 0.5 mL de agua destilada al que se añade 0.5 mL de bicarbonato (8%) y 0.5 mL de reactivo NQS (0.5%). La mezcla resultante se calienta durante 20 minutos a 70°C, siendo posteriormente enfriada a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se trata con cloroformo (utilizando el mismo volumen que el volumen de muestra 1.5 mL), agitación mecánica durante 2 minutos y centrifugación 5 minutos. Finalmente, se separan ambas fases, añadiéndose sulfato sódico anhidro a la disolución orgánica, que es filtrada con un filtro de nylon de un diámetro de poro 0.45 μ m (Tecknokroma) previamente a la inyección de 25 μ L en la columna analítica.

Se han ensayado diferentes muestras de orina, siendo las condiciones cromatográficas las ya descritas con anterioridad: composición de la fase móvil, EtOH:cloroformo:acetato de etilo:n-hexano(1:22:32:45); flujo de la fase móvil 2 mL/min; volumen de muestra inyectado, 25 μ L.

El detector ha registrado el espectro del eluato entre 270 y 600 nm (cada 4 nm) a intervalos de 460 ms, tomando como longitud de onda de referencia 600 nm. Las longitudes de onda de trabajo han sido 280 y 450 nm. Los ensayos se han realizado a temperatura ambiente. El cálculo de los porcentajes de analito recuperado en cada caso, se ha efectuado por comparación entre las áreas del analito obtenido después de la extracción, con el área correspondiente para la misma concentración en patrones. En las concentraciones de trabajo, las determinaciones pueden hacerse simultáneamente para el conjunto de analitos.

Resultados y discusión

Extracción líquido-líquido

Los cromatogramas obtenidos para los blancos de orina tratados de acuerdo con el procedimiento de extracción líquido-líquido descrito aparecen en la Figura (59A) para las dos longitudes de onda de trabajo. Estos cromatogramas muestran muy pocos picos correspondientes a compuestos endógenos. El número de estas sustancias que pasan a la fase orgánica, que a su vez reaccionan con el NQS y que finalmente son extraídos en cloroformo son muy pocos, obteniéndose blancos muy limpios en la zona donde son eluidos los compuestos de interés. Por otra parte la mayoría de los constituyentes de la matriz presentan una absorción mayor a menores longitudes de onda 254 nm, por lo que la interpretación de los cromatogramas obtenidos para las muestras es más fácil a 280 nm o 450 nm.

Bajo las condiciones cromatográficas establecidas, ninguno de los constituyentes de la matriz es eluido en el mismo tiempo de retención de los analitos estudiados, por lo que estos pueden ser identificados sin dificultad, tal como se deriva de la observación de la Figura 59, que muestra los cromatogramas de los blancos de orina y muestras de orina a las que se ha añadido la mezcla de analitos considerada.

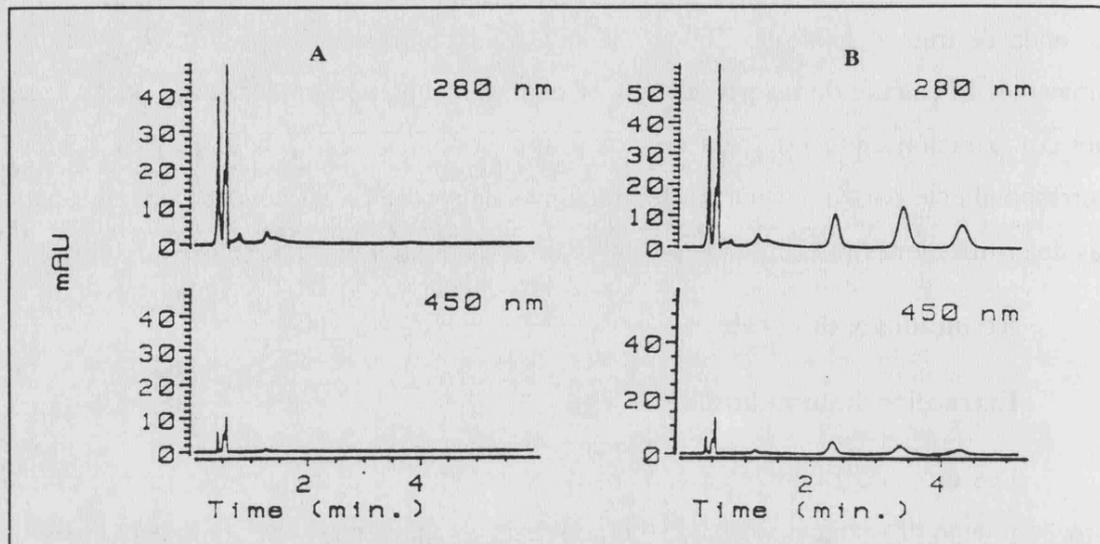


FIGURA 59. Cromatogramas obtenidos para blancos de orina y para muestras de orina con analitos con extracción líquido-líquido.

En la Tabla 34 aparecen los porcentajes de recuperación de cada analito mediante extracción líquido-líquido.

Bajo estas condiciones de extracción tanto la anfetamina como la metanfetamina presentan porcentajes de recuperación de aproximadamente 90%, sin embargo, la recuperación de la β -feniletilamina es bastante menor 44 ± 8 . Por lo que este procedimiento es bastante efectivo para anfetamina y metanfetamina, no siendo demasiado apropiada para β -feniletilamina.

TABLA 34. Eficiencias de la extracción líquido-líquido.

C _{análisis} (µg/mL)			%Recuperación					
			280 nm			450 nm		
β-feniletilamina	Metanfetamina	Anfetamina	β-feniletilamina	Metanfetamina	Anfetamina	β-feniletilamina	Metanfetamina	Anfetamina
-----	2.66	-----	-----	98.4	-----	-----	-----	-----
-----	5.33	-----	-----	93.0	-----	-----	-----	-----
-----	8.00	-----	-----	78.0	-----	-----	76.0	-----
-----	10.66	-----	-----	82.8	-----	-----	82.8	-----
-----	13.30	-----	-----	81.1	-----	-----	87.5	-----
3.5	8.00	-----	44.7	87.8	-----	44.6	91.5	-----
3.5	10.66	-----	41.3	84.9	-----	40.3	88.9	-----
3.5	-----	-----	48.2,38.6,45.3- ,36.5	-----	-----	43.5,37.4,45.1	-----	-----
5.03	5.03	5.03	53.0	81.7	89.3	50.7	81.5	85.3
			58.6	87.4	98.7	58.4	87.7	95.3
			44±8	86±6		44±8	86±5	

3.6.4.2.- Extracción sólido-líquido

3.6.4.2.1.- Estudio de los diferentes rellenos

Procedimiento Experimental

Al igual que en la extracción líquido-líquido el tratamiento de la muestra se realiza en medio básico, añadiéndose 0.1 mL de amoníaco concentrado por cada 5 mL de orina. En este caso la muestra de orina se centrifuga tomándose 2 mL del sobrenadante.

Se han utilizado columnas de extracción en fase sólida de tipo Bond-Elut C18, C8, C2, CH, PH y CN (Scharlau), con una capacidad de carga de 100 mg/mL. Estas columnas han sido activadas haciendo pasar 500 μ L de metanol, y seguidamente 500 μ L de agua destilada para evitar el contacto directo del metanol con la muestra. A continuación se eluyen 2 mL de muestra de orina, y la matriz de la muestra es eliminada lavando con 2.5 mL de agua destilada. Los analitos retenidos en la columna son eluidos con 1.0 mL de metanol. A las disoluciones resultantes se les añade 50 μ L de una disolución de EtOH:HCl (6:1), siendo posteriormente llevadas a sequedad, reconstituidas y filtradas antes de ser inyectadas. Para pasar los disolventes y las muestras a través de la columna se ha aplicado presión con una jeringa conectada a estas mediante un adaptador.

Una vez utilizadas, las columnas han sido regeneradas haciendo pasar 2 mL de metanol, y seguidamente 1 mL de agua, para eliminar los posibles compuestos de baja y alta polaridad, respectivamente, que hayan podido quedar retenidos.

El tratamiento posterior ha sido el mismo que en el caso de la extracción líquido-líquido (página 187).

Resultados y discusión

En la Figura 60A aparecen los cromatogramas a 280 nm obtenidos para blancos de orina al ser tratados en las diferentes columnas de extracción en fase sólida. Se observa que independientemente de la columna utilizada en todos los casos los cromatogramas son similares, apareciendo blancos de orina bastante limpios y no mostrando picos a los tiempos de retención que presentan los analitos, siendo equiparables a los obtenidos con extracción líquido-líquido.

En la Figura 60B se muestran los cromatogramas a 280 nm obtenidos, para muestras de orina que contienen los analitos ensayados, en los distintos materiales utilizados en la extracción.

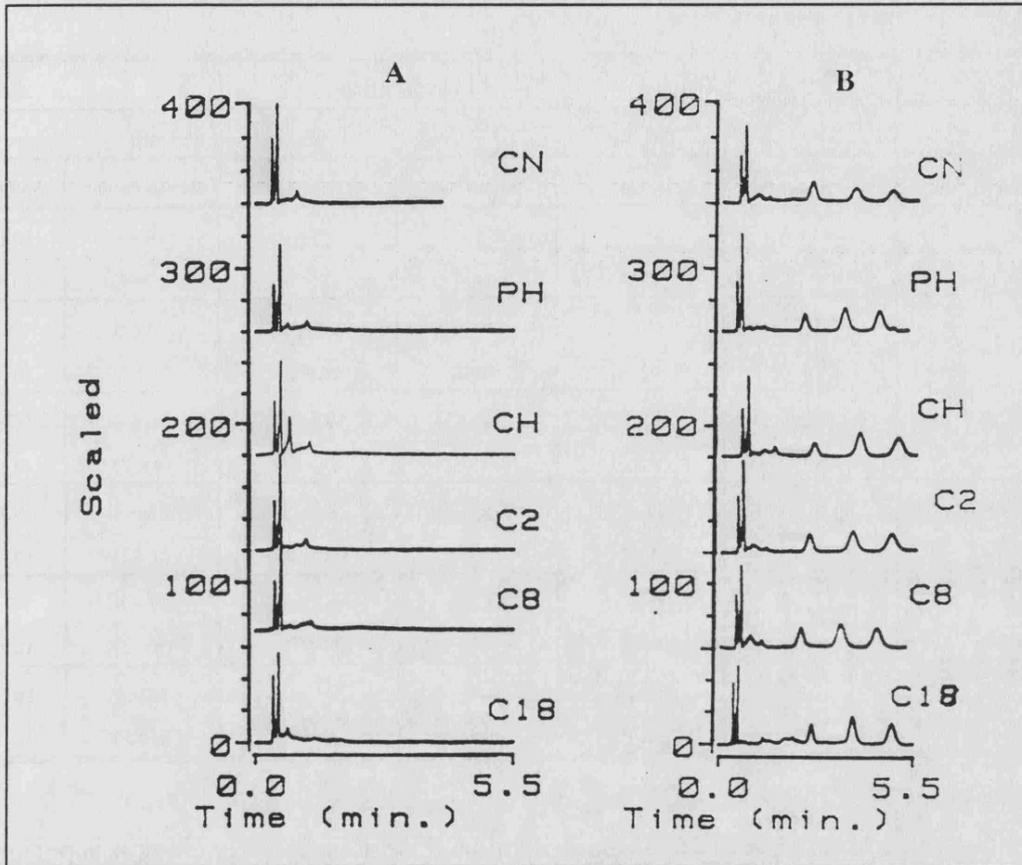


FIGURA 60. Cromatogramas obtenidos para A) blancos de orina, B) muestras de orina con analitos con las diferentes columnas de extracción en fase sólida.

Los porcentajes de analito recuperado en las distintas columnas examinadas aparecen en la Tabla 35. Como puede observarse, la reproducibilidad es similar a la obtenida mediante la extracción líquido-líquido, mientras que los porcentajes de recuperación son más altos, especialmente para la β -feniletilamina.

Al igual que ocurre para la matriz, no se observan grandes diferencias para los analitos entre la utilización de columnas con un tipo de relleno u otro. Por lo tanto independientemente de la polaridad de la columna los resultados son similares no existiendo diferencias significativas entre ellas. Solamente en el caso de la utilización de columnas de

mayor polaridad como cianopropilo CN se obtiene una baja recuperación de la β -feniletilamina dado su mayor carácter polar, mientras que para la anfetamina y metanfetamina se obtienen recuperaciones similares a las obtenidas con las otras columnas.

TABLA 35. Eficiencias de la extracción en fase sólida.

COLUMNA	%Recuperación					
	280 nm			450 nm		
	β -feniletilamina	Metanfetamina	Anfetamina	β -feniletilamina	Metanfetamina	Anfetamina
PH	92 \pm 1 (n=3)	83 \pm 5 (n=3)	105 \pm 9 (n=4)	88 \pm 4 (n=3)	78 \pm 4 (n=4)	102 \pm 8 (n=4)
C8	85 \pm 7 (n=4)	75 \pm 7 (n=4)	95 \pm 2 (n=3)	88 \pm 3 (n=3)	84 \pm 6 (n=3)	95 \pm 6 (n=3)
C2	88 \pm 5 (n=4)	85 \pm 2 (n=3)	100 \pm 5 (n=3)	85 \pm 5 (n=3)	86 \pm 4 (n=3)	97 \pm 5 (n=4)
CN	45 \pm 4 (n=2)	83 \pm 1 (n=2)	91 \pm 3 (n=2)	46 \pm 1 (n=3)	85 \pm 3 (n=3)	93.5 (n=1)
CH	87 \pm 6 (n=4)	81 \pm 1 (n=3)	99 \pm 7 (n=4)	82 \pm 4 (n=3)	91 \pm 8 (n=2)	96 \pm 7 (n=3)
C18	94 \pm 7 (n=8)	80 \pm 3 (n=4)	104 \pm 6 (n=8)	91 \pm 7 (n=6)	84 \pm 5 (n=5)	102 \pm 6 (n=5)

En algunos casos para anfetamina se obtienen valores de recuperación superiores al 100% debido a la contribución de la señal analítica como ruido de fondo de los componentes de la matriz.

El empleo de columnas de extracción en fase sólida proporciona resultados muy adecuados para la separación de anfetaminas, en el tratamiento previo de las muestras de orina. Con empaquetamientos del tipo C18, C8, C2, CH y PH, las recuperaciones de estos compuestos son superiores al 80% para los tres analitos considerados, mejorándose la extracción de la β -feniletilamina en relación a la extracción líquido-líquido.

Tanto en la extracción líquido-líquido como en la extracción en fase sólida, los blancos de orina obtenidos son igualmente limpios, no presentando picos a los tiempos de retención de los productos de reacción amina-NQS.

Por otra parte las técnicas de extracción en fase sólida son mucho más rápidas, el tiempo total de tratamiento de muestra se reduce prácticamente a la quinta parte del requerido si se lleva a cabo una extracción líquido-líquido.

3.6.4.2.2.- Influencia del pH y del disolvente de elución utilizando extracción en fase sólida

Según el procedimiento descrito por Farrell y col. (57) la muestra de orina es alcalinizada con NaOH 5M a un pH=11.4. y eluida utilizando una mezcla de cloroformo:isopropanol (3:1), los mismos disolventes emplean Franceschini y col.(109) pero en proporción (3:2), sin embargo en este caso el pH de la orina es ajustado a 7. En base a la controversia existente respecto al pH de la orina, se ha realizado un estudio de la influencia del pH en la extracción de las aminas en estudio. Del mismo modo, también se ha realizado un estudio comparativo entre la utilización de cloroformo:isopropanol (3:1) y metanol como eluyentes de la muestra, estudiándose los volúmenes requeridos para la obtención de las mayores porcentajes de recuperación.

Procedimiento experimental

Se ha realizado un estudio de la influencia del pH de la orina entre 7 y 11.4, previo a la extracción de aminas. Para lo cual se añade la cantidad de NaOH 5 M necesaria para la modificación del pH original de la misma. Posteriormente, estas muestras son sometidas a extracción sólido-líquido utilizando un columna con relleno C18 de capacidad 200 mg/mL.

El procedimiento de extracción y derivatización a realizar, es el descrito anteriormente en el tratamiento de la muestra mediante extracción en fase sólida. Los disolventes de elución de la muestra han sido CHCl₃:isopropanol (3:1) en volúmenes de 2 y 4 mL, y MeOH 2 mL.

Resultados y discusión

En la Figura 61A se muestran los cromatogramas correspondientes a distintos blancos de orina a diferentes valores de pH, utilizando MeOH como disolvente de elución. Como puede observarse, los blancos de orina se muestran limpios a valores de pH 7, 9 y 10. Sin embargo, en las condiciones indicadas por Farrell y col.(58) pH=11.4 el cromatograma presenta un pico a un tiempo de retención próximo al tiempo de retención correspondiente a la anfetamina (NQS-anfetamina), pudiendo por tanto interferir en la determinación de la

misma, por ello es recomendable la extracción de las aminas a pH inferiores. Cuando la elución se realiza con CHCl_3 :isopropanol (3:1), se observa un comportamiento similar sin embargo el pico a $t_R=3.2$, presenta un área menor indicando por tanto que bajo estas condiciones de extracción la interferencia es menor.

En relación a las muestras de orina que contienen los analitos en estudio, se observa que a valores de pH 7, 9 y 10 el porcentaje de recuperación para β -feniletilamina y anfetamina es similar. Por el contrario, la metanfetamina presenta problemas de extracción a valores de pH inferiores a 10 independientemente del eluyente utilizado. En base a estos resultados, se concluye que la muestra de orina deberá llevarse a un pH de 10 con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación de la metanfetamina y de aumentar la selectividad eliminando la interferencia de sustancias endógenas de la orina que pueden ser extraídas a mayores valores de pH y en este caso puedan presentar solapamiento con la anfetamina.

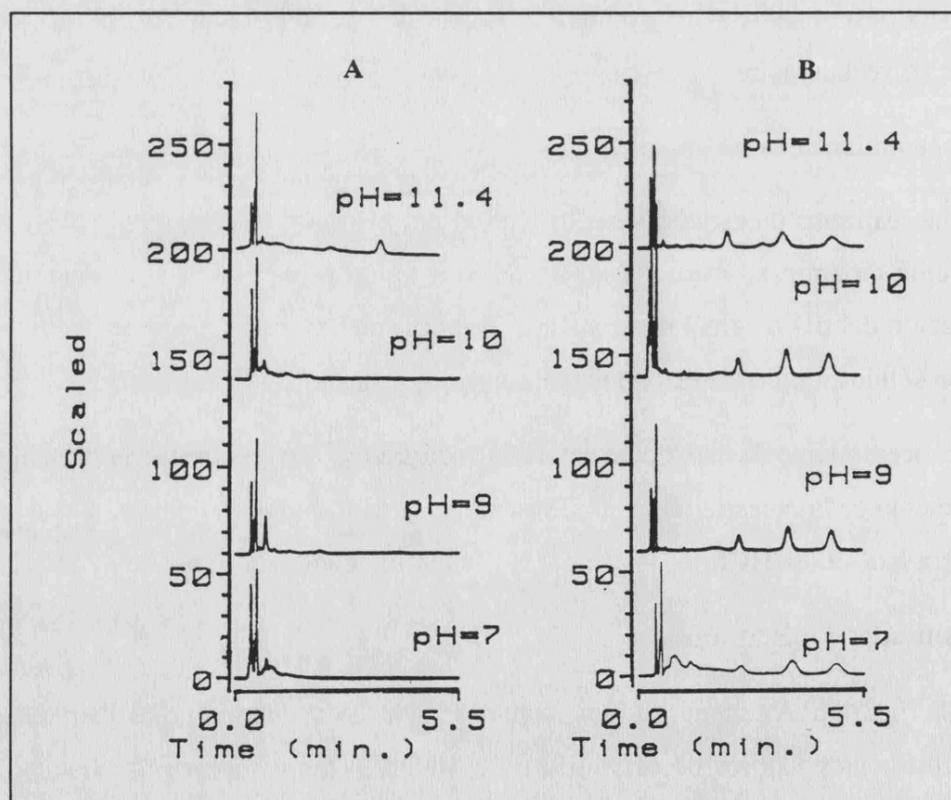


FIGURA 61. Cromatogramas obtenidos a distintos valores de pH de la orina, extracción en columnas C18 y utilizando MeOH como disolvente de elución. A) blancos de orina, B) muestras de orina con analitos.

En relación al volumen de eluyente necesario para la obtención de una mayor recuperación, se observa que en el caso de utilizar MeOH se requieren 2 mL de eluyente, mientras que para la mezcla HCl₃:isopropanol (3:1) se han necesitado 4 mL para obtener los mismos porcentajes de recuperación.

3.6.4.2.3.- Factores de recuperación

Procedimiento experimental

La recuperación de la anfetamina y metanfetamina en las condiciones propuestas se ha determinado por comparación entre las áreas obtenidas en muestras de orina, con las obtenidas en la curva de calibrado correspondiente a una misma concentración. Se han ensayado distintas concentraciones para cada analito comprendidas entre 0.6 y 12.5 µg/mL.

Resultados y discusión

En la Tabla 36, se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para diferentes concentraciones de anfetamina y metanfetamina utilizando los dos tipos de eluyentes anteriormente mencionados. Como puede observarse, independientemente del eluyente los porcentajes de recuperación son similares. En ambos casos, para las concentraciones mas bajas de metanfetamina no siempre se han obtenido valores aceptables, siendo tal efecto independiente del tipo de eluyente utilizado. En la Tabla 37 se presentan las concentraciones obtenidas para anfetamina, metanfetamina y β-feniletilamina en muestras de orina por sustitución del área en el calibrado correspondiente. Independientemente del eluyente utilizado, las concentraciones determinadas son similares a las concentraciones presentes en la muestra. Dichos resultados indican que se puede determinar la concentración de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina con un error menor al 10%.

Se ha ensayado como patrón interno la β-feniletilamina. Al comparar las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas utilizando como señal analítica el cociente de señales analito/patrón interno de patrones y muestras se obtienen porcentajes de recuperación similares a los proporcionados en el caso de no utilizar patrón interno.

3.6.5.- Precisión y exactitud

Procedimiento experimental

Se ensayaron diferentes muestras de orina a las cuales se les había adicionado previamente sulfato de anfetamina, clorhidrato de metanfetamina y β -feniletilamina, siendo la concentración de estos analitos en la muestra de 5.03 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras fueron procesadas de acuerdo al procedimiento de extracción en fase sólida y derivatización descrito en la página 191.

Resultados y discusión

En la Tabla 38, se muestran las concentraciones de anfetamina y metanfetamina encontradas en muestras de orina mediante la utilización o no de patrón interno (β -feniletilamina 5.03 $\mu\text{g/mL}$). En ambos casos, se ha podido determinar la concentración de anfetamina y metanfetamina presente en la muestra con errores menores del 10%. Sin embargo, la utilización del patrón interno permite obtener una mayor precisión y exactitud en la determinación de la concentración. En la Tabla también se muestra de desviación obtenida en medidas realizadas el mismo día y en días diferentes. En el primer caso los coeficientes de variación oscilan entre 1.7 y 6.2, mientras que en el segundo varían en el intervalo 3.0 y 9.2.

3.6.6.- Límites de detección y cuantificación

Procedimiento experimental

Se estimaron en primer lugar los límites de detección a partir de muestras sintéticas disminuyendo progresivamente la concentración de analito en las mezclas hasta obtener una señal 3 veces el ruido de fondo. De la misma forma pero con un umbral de 10 se han determinado los límites de cuantificación. Seguidamente, se han añadido a diferentes muestras de orina cantidades de cada uno de los fármacos considerados, reproduciendo las concentraciones correspondientes a los límites de detección, corregidos por los porcentajes recuperados de cada analito en el procedimiento de preparación de la muestra.

TABLA 36. Porcentajes de recuperación obtenidos distintos eluyentes A) MeOH, B) cloroformo:isopropanol (3:1). (BFN: β -feniletilamina, MET:metanfetamina, ANF:anfetamina).

C _{añadida} ($\mu\text{g/mL}$)			%Recuperación											
			280 nm						450 nm					
BFN	MET	ANF	β -feniletilamina		Metanfetamina		Anfetamina		β -feniletilamina		Metanfetamina		Anfetamina	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
5.03	0.63	0.63	91.1	99.0	58.6	69.2	128.0	108.0	89.4	97.8	50.9	56.0	92.2	103.5
			----	91.5	----	52.2	----	104.9	----	88.4	----	31.5	----	80.0
	2.52	2.52	98.4	95.7	81.1	75.8	99.8	101.1	96.7	90.4	80.9	71.9	91.9	88.5
			93.4	88.0	79.2	73.9	95.1	93.6	93.6	85.2	77.6	61.9	87.5	87.3
	5.03	5.03	90.4	73.5	80.9	84.0	105.1	78.8	89.1	68.6	81.9	79.8	100.7	92.2
			89.0	90.8	78.1	84.4	95.6	107.2	76.3	61.2	66.0	76.6	89.2	80.6
	8.81	8.81	92.5	90.8	84.3	86.6	106.7	115.6	92.0	84.9	80.4	88.2	106.9	109.1
			85.3	85.9	80.4	84.8	105.2	108.2	85.6	73.4	79.3	59.2	105.3	83.1
	12.58	12.58	93.5	101.0	61.4	76.6	104.3	105.5	90.3	93.2	55.8	80.5	105.6	103.6
			84.3	94.7	53.1	48.8	100.0	98.1	85.6	91.1	53.8	53.9	101.4	99.6

TABLA 37. Concentraciones de anfetamina, metanfetamina y β -feniletilamina obtenidos en muestras de orina. Elución A) con MeOH, B) cloroformo:isopropanol (3:1). (BFN: β -feniletilamina, MET:metanfetamina, ANF:anfetamina).

C _{análisis} ($\mu\text{g/mL}$)			Concentración encontrada en muestras de orina aplicando la curva de calibrado con patrones											
			280 nm											
BFN	MET	ANF	β -feniletilamina				Metanfetamina				Anfetamina			
			A		B		A		B		A		B	
			Con. $\mu\text{g/mL}$	Er. (%)	Con. $\mu\text{g/mL}$	Er. (%)	Con. $\mu\text{g/mL}$	Er. (%)	Con. $\mu\text{g/mL}$	Er. (%)	Con. $\mu\text{g/mL}$	Er. (%)	Con. $\mu\text{g/mL}$	Er. (%)
5.03	0.63	0.63	5.00	-0.59	5.45	+7.75	0.44	-30.2	0.51	-19.0	0.76	+20.6	0.62	-1.59
			----	----	4.62	-8.15	----	----	0.38	-39.6	----	----	0.61	-3.17
	2.52	2.52	5.4	+7.35	5.24	+4.17	2.40	-4.76	2.20	-12.7	2.50	-0.79	2.44	-3.17
			5.13	+1.98	4.89	-2.78	2.30	-8.73	2.14	-15.0	2.38	-5.55	2.26	-10.3
	5.03	5.03	4.96	-1.9	4.82	-4.17	4.80	-4.57	4.87	-3.18	5.29	+5.16	5.20	+3.59
			4.43	-11.9	4.08	-18.88	4.60	-8.54	4.84	-3.77	4.82	-4.17	3.86	----
	8.81	8.81	5.07	+0.79	5.05	+0.39	8.70	-1.25	8.74	-0.79	9.43	+7.03	9.86	+11.9
			4.68	-6.9	4.78	-4.97	8.30	-5.80	8.56	-2.33	9.31	+5.67	9.22	+4.65
	12.58	12.58	5.13	+1.98	5.61	+11.53	9.00	-28.5	11.05	-12.16	13.2	+4.93	12.87	+2.31
			4.62	-8.15	5.26	+4.57	7.47	----	7.05	----	12.66	+0.64	11.96	-4.93

TABLA 38. Concentración de anfetamina y metanfetamina encontrada en muestras de orina mediante la utilización o no de S.I.

Concentración encontrada en muestras de orina usando S.I(β -feniletilamina)							
280 nm				450 nm			
Anfetamina (5.03 μ g/mL)		Metanfetamina(5.03 μ g/mL)		Anfetamina(5.03 μ g/mL)		Metanfetamina(5.03 μ g/mL)	
Con. μ g/mL	Er.(%)	Con. μ g/mL	Er.(%)	Con. μ g/mL	Er.(%)	Con. μ g/mL	Er.(%)
4.99	-0.79	4.99	-0.79	5.00	-0.59	4.84	-3.77
5.00	-0.59	4.90	-2.58	5.16	+2.58	4.82	-4.17
5.23	+3.98	5.10	+1.39	5.00	-0.59	5.10	+1.39
5.38	+6.96	5.40	+7.36	5.30	+5.36	4.98	-0.99
4.99	-0.79	4.80	-4.57	5.03	0.00	4.70	-6.56
4.90	-2.58	5.34	+6.16	5.45	+8.35	5.26	+4.57
5.03	0.00	4.95	-1.59	4.98	-0.99	4.15	-17.49
4.98	-0.99	4.90	-2.58	4.96	-1.39	4.35	-13.51
5.07 \pm 0.13*		5.00 \pm 0.10*		5.05 \pm 0.09*		4.92 \pm 0.15*	
5.06 \pm 0.15		5.05 \pm 0.21		5.11 \pm 0.18		4.78 \pm 0.37	
Concentración encontrada en muestras de orina sin utilizar el S.I							
5.03	0.00	5.40	+7.36	5.08	+0.99	5.00	-0.59
5.40	+7.36	5.32	+5.76	5.70	+13.32	5.04	-0.19
5.60	+11.33	5.50	+9.34	5.65	+12.32	5.40	+7.35
4.98	-0.99	4.60	-8.54	5.07	+0.79	4.88	-2.98
5.41	+7.55	4.50	-10.54	5.17	+2.78	4.92	-2.19
5.60	+11.33	4.80	-4.57	5.17	+2.78	4.17	-17.09
5.14	+2.19	4.37	-13.12	4.85	-3.58	4.40	-12.52
5.00	-0.59	4.63	-7.95	4.85	-3.58	4.50	-10.53
5.34 \pm 0.29*		5.41 \pm 0.09*		5.47 \pm 0.34*		5.15 \pm 0.22*	
5.27 \pm 0.26		4.89 \pm 0.45		5.19 \pm 0.30		4.79 \pm 0.40	

Resultados y discusión

Bajo las condiciones cromatográficas establecidas, todas las aminas estudiadas son identificables a 280 nm y 450 nm, los límites de detección obtenidos han sido 2 ng y 5 ng, respectivamente. Estos resultados coinciden con los valores dados en la bibliografía (57), (58), Tabla 5. Los límites de cuantificación han sido 7 y 17.5 ng a 280 y 450 nm.

3.6.7.- Conclusiones

De los resultados anteriormente expuestos se puede concluir que las condiciones óptimas para el análisis de anfetamina y metanfetamina mediante cromatografía en fase normal (utilizando una columna LiChrosfer), son las que se resumen a continuación:

Fase móvil:

Composición: Etanol:cloroformo:acetato de etilo:n-hexano (1:22:32:45)

Flujo: 2 mL/min

Volumen de inyección de muestra: 25 μ L

Detección: 280 nm y 450 nm.

La modificación en la proporción de EtOH permite disminuir los tiempos de retención.

El empleo de columnas de extracción en fase sólida proporciona buenos resultados en la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina utilizando CLAR en fase normal y NQS como agente de derivatización de aminas.

Con todas las columnas ensayadas se han obtenido buenos porcentajes de recuperación, solamente con columnas CN no se ha alcanzado una separación completa de β -feniletilamina. Para esta amina, la extracción en fase sólida proporciona una recuperación doble a la obtenida con extracción líquido-líquido en n-hexano, lo que es importante para la utilización de la misma como estándar interno.

El pH óptimo de la orina (para efectuar la extracción) es de 10, dado que bajo estas condiciones se aumenta el porcentaje de recuperación de los analitos y se reduce la interferencia de componentes endógenos de la orina.

En relación al disolvente de elución de la muestra, tanto el metanol como la mezcla isopropanol:cloroformo (1:3) permiten obtener porcentajes de recuperación de los analitos similares, con la salvedad de que el empleo de este último eluyente requiere la utilización de un volumen superior. Los resultados obtenidos mediante este procedimiento presentan buena precisión y exactitud.

La extracción en fase sólida es rápida (requiriendo cinco veces menos tiempo que la extracción líquido-líquido), es simple y ha permitido obtener resultados satisfactorios para las aminas estudiadas. Además, una única extracción es efectiva para todos los analitos. Dadas las numerosas ventajas de este tipo de extracción sobre la extracción líquido-líquido es preferible su utilización para el análisis de anfetamina y metanfetamina o sus mezclas bien para el análisis cuantitativo o de screening.

4.- CONCLUSIONES GENERALES

Se han estudiado las variables experimentales de la reacción entre fenilaminas y 1,2-naftoquinona 4-sulfonato pH, temperatura y tiempo de reacción, disolvente de extracción y concentración de reactivo. De los resultados obtenidos se puede intuir que el reactivo en el medio de reacción experimenta dos reacciones de sustitución del grupo sulfónico. Una de ellas se verifica aún en ausencia de aminas y es debida a su sustitución por OH, de la segunda es responsable el grupo fenilamina.

Las condiciones más favorables para la determinación de anfetamina son pH 7.5 (tampón dihidrogeno-monohidrogenofosfato), calefacción a 70°C durante 30 minutos, ó pH 10 (tampón bicarbonato/carbonato), calefacción a 45°C durante 5 minutos, siendo estas últimas condiciones las óptimas para la determinación de metanfetamina. La variable más importante para la determinación de efedrina es el disolvente de extracción, dado el mayor carácter polar del compuesto obtenido en referencia a los productos anfetamina-NQS y metanfetamina-NQS. En este caso se eligió el alcohol isoamílico en vez de la mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:1).

Se ha realizado un estudio comparativo de diversos tipos de tratamientos previos de muestras de orina, observándose que la extracción líquido-líquido con n-hexano ofrece mayores ventajas que el resto de procedimientos estudiados si no se incluye una etapa de separación cromatográfica, dado que permite obtener porcentajes de recuperación altos y una disminución considerable del blanco de orina, permitiendo obtener límites de identificación y cuantificación menores.

Se han propuesto procedimientos extracto-espectrofotométricos para la determinación de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina en base a su reacción con NQS. Ambos procedimientos han sido estudiados quimiométricamente mediante la aplicación de los métodos de Youden, adición estandar y adición estandar del punto H, observándose la inexistencia de errores sistemáticos proporcionales, sin embargo se evidencia la presencia de error sistemático constante introducido por la matriz de la muestra (TYB). Dicho error debe ser evaluado y corregido para la determinación de los analitos exenta de error en las muestras de orina. El TYB puede ser calculado a partir del método de Youden o mediante el uso de un placebo como ha sido demostrado. En ambos casos, la concentración de analito presente en la muestra puede ser determinada con errores relativos inferiores al 10%.

En el caso de la determinación de metanfetamina también se ha contemplado la existencia de anfetamina en la muestra, los resultados obtenidos muestran que su presencia en la proporción normal en la que está como metabolito de la metanfetamina no introduce errores superiores al 10%.

Se han demostrado las posibilidades del método de adición estándar del punto H en la resolución de dos componentes cuando además está presente el blanco total de Youden y también su capacidad para caracterizar posibles fuentes de error introducidos por blancos absorbentes. El método ha proporcionado buenos resultados en la determinación conjunta de anfetamina y metanfetamina en muestras de orina. La bondad del método en la resolución de problemas analíticos difíciles ha sido demostrada como es el caso que nos ocupa que reúne la presencia de interferente directo, TYB y similitud en la posición de los máximos de absorción de analito e interferente.

La reacción en estudio para el caso de la efedrina ha sido aplicada a la determinación de este estimulante en preparados farmacéuticos, no pudiéndose extender a muestras de orina dado que el disolvente óptimo de extracción es el alcohol isoamílico. En este disolvente el blanco de orina presenta una interferencia irresoluble, imposibilitando por tanto la determinación de efedrina en fluidos biológicos. El método se ha aplicado a diversas formulaciones tales como colirios, soluciones nasales, comprimidos y jarabes, que presentan matrices muy diversas, obteniendo buenos resultados para todas ellas, a excepción de un jarabe. El procedimiento propuesto no requiere ningún acondicionamiento previo de la muestra.

Se ha establecido un procedimiento cinético-espectrofotométrico en disolución acuosa basado en la reacción en estudio y en presencia de triton X-100, que permite la solubilización de los productos de reacción y evita la etapa de extracción en el disolvente orgánico. Este método no es aplicable a muestras de orina pero sí a preparados farmacéuticos. En este caso, los errores encontrados han sido inferiores al 4% para la determinación de anfetamina y efedrina. Los resultados obtenidos han sido similares a los obtenidos procediendo de acuerdo al método extractivo-espectrofotométrico. Este método permite reducir el tiempo de análisis y elimina el consumo de disolventes orgánicos.

El empleo de columnas de extracción en fase sólida para el tratamiento previo de la muestra de orina proporciona buenos resultados en la determinación de anfetamina y metanfetamina utilizando CLAR en fase normal y NQS como agente de derivatización de aminas. Con todas las columnas ensayadas (C18, C2, C8, CH, PH) se han obtenido buenos porcentajes de recuperación, solamente con columnas CN no se han obtenido buenos resultados para β -feniletilamina. Para esta amina, la extracción en fase sólida proporciona una recuperación doble a la obtenida con extracción líquido-líquido en n-hexano, lo que es importante para la utilización de la misma como patrón interno.

El pH óptimo de la orina (para efectuar la extracción sólido-líquido) es de 10, dado que bajo estas condiciones se aumenta el porcentaje de recuperación de los analitos y se reduce la interferencia de componentes endógenos de la orina. En relación al disolvente de elución de la muestra, tanto el metanol como la mezcla isopropanol:cloroformo (1:3) permiten obtener porcentajes de recuperación de los analitos similares, con la salvedad de que el empleo de este último eluyente requiere la utilización de un volumen superior. Los resultados obtenidos mediante este procedimiento presentan buena precisión y exactitud. Con este tipo de tratamiento previo se ahorra tiempo, una única extracción es efectiva para todos los analitos. Dadas las numerosas ventajas de este tipo de extracción sobre la extracción líquido-líquido es preferible su utilización para el análisis de anfetamina y metanfetamina o sus mezclas bien para el análisis cuantitativo o de screening, siendo el primer paso para la automatización del análisis puesto que es fácil de adaptar en línea al cromatógrafo utilizando válvulas de conmutación.

A continuación se resume una tabla (Tabla 40) indicando los intervalos de concentración y límites de detección de los diferentes procedimientos propuestos, así como el tipo de muestras ensayado y los analitos determinados.

TABLA 39. Resumen de las aplicaciones de determinación de aminas con NQS.

Analito	Muestra	Procedimiento	Intervalo dinámico ($\mu\text{g/mL}$)	Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)
Efedrina	Preparados farmacéuticos	Extracto-colorimétrico	2.1-50	0.6
		Cinético	6.7-50	2.0
Anfetamina	Preparados farmacéuticos	Cinético	10.6-50	3.2
	Orina (5 mL)	Extracto-colorimétrico	3.8-50	1.1
	Orina (10 mL)	Extracto-colorimétrico	1.9-30	0.6
	Orina (2 mL)	CLAR	7 ng (0.28-13.00)	2 ng (0.06)
Metanfetamina	Orina (5 mL)	Extracto-colorimétrico	2.9-50	0.9
	Orina (2 mL)	CLAR	7 ng (0.28-13.00)	2 ng (0.06)

5.- REFERENCIAS

- (1) Kaistha, K.K, *J.Chromatogr.*, **141** (1977) 145.
- (2) Beckett, A.H., Rowland, M., *Nature*, **204** (1964) 1203.
- (3) Rasmussen, K.E., Knutsen.P., *Bull.Narc.*, **37(1)** (1985) 95.
- (4) Budd, R.D., *J.Chromatogr.*, **245** (1982) 129.
- (5) Schwarz, V., Deyl, Z., Macek, K., *J.Chromatogr.*, **340** (1985) 401.
- (6) Wallace, J.E., Biggs, J.D., Ladd, S.L., *Anal. Chem.*, **40** (1968) 2207.
- (7) Mitsui, T., *Eisei Kagaku*, **26(5)** (1980) 264.
- (8) Mitsui, T., *Kagaku Keisatsu Kenkyusho Hokoku, Hokaguku Hen*, **34(1)** (1981) 1.
- (9) Syoyama, M., Nojima, A., *Kagaku Keisatsu Kenkyusho Hokoku, Hokaguku Hen*, **34** (1981) 5.
- (10) Rio, J.G, Hodnett C.N, *J.Anal.Toxicol.*, **5(6)** (1981) 267.
- (11) Matsuoka, T., Mitsui, T., *Eisei Kagaku*, **28(1)** (1982) 26.
- (12) Mitsui, T., Fujimura, Y., *Bunseki Kagaku*, **35(1)** (1986) 51.
- (13) Syoyama, M., Sano, T., *Eisei Kagaku*, **31(6)** (1985) 410.
- (14) Sakai, T., Ohno, N., *Anal.Sci.*, **2(3)** (1986) 275.
- (15) Sakai, T., Ohno, N., *Analyst (London)*, **112(2)** (1987) 149.
- (16) Karawya, M.S., Diab, A. M., Hifnawy M.S., Adbou. S.S., *Egypt.J.Pharm.Sci.*, **25 (1-4)** (1986) 149.
- (17) Kincses, A. M., Dudutz, G., Coroian, G., *Rev.Med (Tirgu-Mures,Rom)*, **33(1)** (1987) 80.
- (18) White, P.C. *Analyst*, **109** (1984) 677
- (19) White, P.C. *Analyst*, **109** (1984) 973
- (20) Krull, I.S., Lankmayr, E.P., *Am. Lab. (Fairfield, Conn)* **14** (1982) 18
- (21) *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*. Lawrence, J.K., Frei, R.W.,Eds. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam, 1976 pp 1-3
- (22) Cochrane, W.P., Sternson, L.A., Frei, R.W., In *Chemical Derivatization in Analytical Chemistry:Introduction*, Volume 1. Frei, R.W., Lawrence, J.F., Eds.;Plenum Press, Inc.:New York, 1981, pp 1,2.
- (23) Krull, I.S., Selavka, C.M., Jacobs, W., Duda, C., *J.Liq.Chromatogr.*, **8(15)** (1985) 2845.
- (24) Blau, K., King, G., *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden and Sons, Ltd, London 1977 pp 1-3.
- (25) Kinberger, B., *J.Chromatogr.*, **213** (1981) 166.
- (26) Leroy, P., Nicolas, A., Moreau, A., *J.Chromatogr.*, **282** (1983) 561.
- (27) Kobayshi, K., Imai, K., *Anal.Chem.*, **52** (1980) 424.
- (28) Hayakawa, K., Hasegawa, K., Imaizumi, N., Wong, O.S., Miyazaki, M., *J.Chromatogr.*, **464** (1989) 343.
- (29) De Montigny, P., Stobaugh, J.F., Givens, R.S., Carlson, R.G., Srinivasachar, K., Sternson, L.A., Higuchi, T., *Anal.Chem.*, **59** (1987) 1096.

- (88) Foster, J.S., Horton, C.A., Proc.R.Soc.London, Ser.B., **123** (1937) 422.
- (89) Youden, W.J., Anal.Chem., **19** (1947) 946.
- (90) Bosch Reig, F., Campíns Falcó, P., Analyst, **118** (1988) 1011.
- (91) Bosch Reig, F., Campíns Falcó, P., Analyst, **115** (1989) 111.
- (92) Campíns Falcó, P., Bosch Reig, F., Molina Benet, A., Fresenius J.Anal.Chem., **338** (1990) 16.
- (93) Campíns Falcó, P., Bosch Reig, F., Verdú Andrés, J., Talanta, **39** (1992) 1.
- (94) Bosch Reig, F., Campíns Falcó, P., Verdú Andrés, J., Anal.Chim.Acta., **283** (1993) 831
- (95) Campíns Falcó, P., Bosch Reig, F., Verdú Andrés, J., Anal. Chim. Acta., **270** (1992) 253.
- (96) Thomson, R.H., Naturally Occurring Quinones, Academic Press, London/New York, 2nd. 1971.
- (97) Garge, P., Padhye, S., Tuchagues, P.J., Inorganica Chimica Acta., **157** (1989) 239.
- (98) ACS Committee on Environmental Improvement, Anal.Chem., **52** (1980) 2242.
- (99) IUPAC, "Compendium of Analytical Improvement", Pergamon Press, Oxford, 1978.
- (100) Sharaf, M.A., Illman, D.L., Kowalski, B.R., Chemometrics., Wiley-Intersciencie, New York, 1986.
- (101) Cardone, M.J., Anal.Chem., **58** (1986) 433.
- (102) Tsuchihashi, H., Nakajima, K., Nishikawa, M., Shiomi, K., Takahashi, S., J.Chromatogr., **467** (1) (1989) 227.
- (103) Gulyás, H., Kemény, G., Hollósi, I., Pucsok, J., J.Chromatogr., **291** (1984) 471.
- (104) Bosch Reig, F., Campíns Falcó, P., Sevillano Cabeza, A., Herráez Hernández, R., Molins Legua, C., Anal.Chem., **63** (1991) 2424.
- (105) Campíns Falcó, P., Bosch Reig, F., Herráez Hernández, R., Sevillano Cabeza, A., Anal.Chim.Acta., **257** (1992) 89.
- (106) Campíns Falcó, P., Bosch Reig, F., Herráez Hernández, R., Sevillano Cabeza, A., Anal.Chim.Acta., **268** (1992) 73.
- (107) Cardone, M.J., J.Assoc.off.Anal.Chem., **66** (1983) 1257.
- (108) Cardone, M.J., J.Assoc.off.Anal.Chem., **66** (1983) 1283.
- (109) Franceschini, A., Duhef, J.M., Vallon, J.J., J.Chromatogr., **541** (1-2) (1991) 109.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha,
 acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
 D. CARMEN MOLINS LEGUA
 la calificación de APTO CUM LAUDE

Valencia, a 12 de JULIO de 1994

El Secretario,

[Firma manuscrita]

El Presidente



[Firma manuscrita]

