



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"ANALISIS DE DROGAS DE ABUSO (BARBITURICOS, ANFETAMINAS Y ALCALOIDES) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION."

TRABAJO MONOGRAFICO

MANCOMUNADO

SUSTENTANTES:

SOLEDAD MEDINA GUADARRAMA

ELVIA ESPINDOLA ORTIZ

Carrera: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
III. LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION	8
1. Bases Teóricas	11
2. Mecanismos de Separación de Formas Diferentes de Cromatografía Líquida de Alta Presión	16
a) Cromatografía líquido-líquido o de partición	16
b) Cromatografía de fase-inversa	17
c) Cromatografía de intercambio iónico	18
d) Cromatografía de exclusión, de permeación o de filtración.	19
3. Instrumentación	21
a) Recipiente para eluyentes	21
b) Bomba	22
c) Programador de Eluyentes	24
d) Sistema de Inyección	25
e) Columna: Empaques, soportes, fases estacionarias líquidas	26
f) Detector, tipos de detectores	39
g) Sistema de registro	45
IV. DROGAS DE ABUSO	47
1. Qué son las Drogas	47
2. Clásificación de las Drogas	47
3. Propiedades Físicas y Químicas (de Barbitúricos, Anfetaminas y Alcalóides)	47
4. Propiedades Farmacológicas (de Barbitúricos, Anfetaminas y Alcalóides)	54
5. Acción Toxicológica (de Barbitúricos, Anfetaminas y Alcalóides)	56

	Pág.
V. ANALISIS DE DROGAS DE ABUSO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION	62
1. Barbitúricos	62
2. Anfetaminas	82
3. Alcalóides	111
VI. CONCLUSIONES	172
VII. BIBLIOGRAFIA	175

## I. INTRODUCCION

La cromatografía es uno de los métodos modernos de análisis que tiene una gran variedad de posibilidades de aplicación.

Por medio de la cromatografía es posible separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de sustancias. Para lo cual, la muestra se distribuye entre dos fases: una estacionaria y otra móvil, siendo cada uno de los componentes de la mezcla, selectivamente retenidos por la fase estacionaria.

Con respecto al tipo de fenómeno involucrado en la separación, la cromatografía se clasifica en cromatografía de adsorción, cromatografía de reparto o partición, cromatografía de intercambio iónico, y en cromatografía de exclusión o permeación en gel; y que a su vez dependerán de la naturaleza de las fases que intervienen. Teniéndose así diferentes modalidades cromatográficas como se observa en el siguiente cuadro.

CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA

C R O M A T O G R A F I A		Fase estacionaria	Fase móvil	Modalidad
	De adsorción	Sólido	-- líquido	C. columna C.C.F. C. líquida de alta presión
Sólido		-- gas	C. gas sólido	
De reparto	Líquido	-- gas	C. gas líquido (C.G.L.)	
	Líquido	-- líquido	C. columna C.C.F. C. papel C. líquida de alta presión	
Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	-- líquido	C. columna C. líquida de alta presión	
Permeación en gel o exclusión	Gel	-- líquido	C. columna C. líquida de alta presión	

Tanto en la cromatografía de adsorción como en la de reparto, la separación tiene lugar cuando los componentes de una mezcla, de naturaleza distinta entre sí, son retenidos en diferente grado unos con respecto a otros por las fases involucradas.

Ya que la adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie, el grado de separación que se alcance en este caso depende en gran parte de la superficie adsorbente que presenten las partículas del sólido utilizado como fase estacionaria.

El proceso de reparto significa una distribución por solubilidad, de los solutos en las dos fases y se rige por el valor del coeficiente de reparto que es característico para cada uno de ellos.

Cuanto mayor es la diferencia de los coeficientes de reparto de los solutos, mayor es el grado de separación.

El presente trabajo revisa exhaustivamente lo referente a el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Presión de algunas drogas como: barbitúricos, anfetaminas y alcaloides.

La H.P.L.C. (High Pressure Liquid Chromatography = Cromatografía Líquida de Alta Presión, también llamada High Performance Liquid Chromatography = Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) puede ser de reparto, de adsorción, de intercambio iónico y de permeación en gel.

## II. ANTECEDENTES

Las técnicas analíticas cromatográficas, como ya se ha señalado, son diversas. De éstas, las que primeramente se desarrollaron como la de columna, papel y capa fina, presentan algunas limitaciones para su ejecución e interpretación de resultados. Actualmente se han implementado otras que permiten mayor rapidez y exactitud en su ejecución, -- así como el empleo de pequeñas cantidades de muestra; entre ellas están principalmente la cromatografía gas líquido (C.G.L.) y la HPLC.

Una diferencia fundamental entre ellas es que en las primeras se realizan en condiciones ambientales de temperatura y presión, lo que requiere mayor tiempo de operación; en tanto que las últimas requieren de temperatura y presión específicas, que conducen a resultados más exactos.

Martin y Synge (1) idearon en 1941 la cromatografía de reparto entre dos líquidos, para lo cual utilizaron columnas de gel de sílice como fase estacionaria. Esta cromatografía es muy apropiada para separar sustancias que tienen diferente solubilidad ante un mismo líquido estacionario. Cuanto menor sea esta diferencia, más difícil será lograr una buena separación; como por ejemplo cuando se trata de separar isómeros estructurales, así como compuestos relativamente no polares, etc.

Posteriormente Condensen, Gordon y Martin (2) describieron la cromatografía de reparto sobre papel que permitía la identificación simultánea de muestra ante sustancias testigo, así como el uso de menor canti-



dad de muestra que en la de columna.

La cromatografía de reparto en fase gaseosa (C.G.L.) que implica un reparto entre un gas inerte portador y un líquido mantenido sobre un soporte sólido dentro de una columna, es una técnica de gran utilidad actualmente; misma que fue dada a conocer por James y Martin (3) en 1952.

En 1968 se lograron avances considerables en la cromatografía de reparto líquido - líquido en columna, pues se comenzó a hacer uso de altas presiones para la elución así como de sistemas de detección continua.

De esta manera se estableció la Cromatografía Líquida de Alta Presión, en la que los aparatos empleados para soportar estas presiones - requieren de un diseño especial.

En suma, la selección del método cromatográfico apropiado, para una determinación específica, se basa en un conocimiento amplio de las propiedades de la muestra. Por ejemplo los polímeros, los polisacáridos, las proteínas y otros compuestos de alto peso molecular; se separan con cierta facilidad utilizando cromatografía de exclusión.

Compuestos tales como aminas, ácidos carboxílicos, aminoácidos, alcaloides, fenoles, sulfonamidas, vitaminas solubles en agua, nucleótidos, etc., pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico.

A su vez, compuestos que tienen peso molecular relativamente bajo (< 2000) y son no iónicos, pueden separarse por la cromatografía de

adsorción o por la de reparto, en cualquiera de sus modalidades.

La Cromatografía Líquida de Alta Presión es una de las técnicas actuales más poderosas para separar y analizar mezclas complejas de sustancias. Esto es debido a la variedad de métodos de separación que dan los mecanismos apropiados para el analista, este tipo de técnica.

La HPLC, se ha desarrollado en los últimos años.

Una de las grandes aplicaciones de la HPLC está en el campo de la toxicología. Esta técnica no es destructiva para la muestra, lo cual es contrario a la cromatografía de gas, detector de ionización de flama; permitiéndole así alta resolución cromatográfica y fácil recuperación de la muestra, misma que puede ser concentrada para nuevos estudios. Una gran variedad de compuestos, tales como polares o sustancias no volátiles, que causan problemas en cromatografía de gas, por esta técnica pueden ser fácilmente separadas.

Una pequeña cantidad de muestra, en baja concentración, así como la interferencia de otros compuestos, no presentan gran problema en esta técnica.

En relación a los problemas que se presentan en toxicología, sabemos que el cuerpo humano metaboliza una droga convirtiéndola sucesivamente en un compuesto más polar. De tal manera que con HPLC en fase inversa, usando un sistema de elución en gradiente, para que haya cambios de polaridad, se favorece la separación de los componentes de la muestra

(suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc.),

En relación a la química forense hay cuatro áreas de análisis químicos que son de importancia. (1) La detección y caracterización de drogas, sus metabolitos y, menos frecuente venenos. (2) Los análisis -- comparativos de una variedad de materiales tales como pinturas, vidrios, suelos, etc., que aparecen como trazas. (3) Los análisis cuantitativos de alcohol en fluidos biológicos. (4) La caracterización de disolventes, particularmente en ruinas de incendios premeditados.

En lo referente a drogas, por ejemplo, el tamaño de muestras puede estar entre intervalos muy amplios desde Kg (ej., grandes cantidades de cannabis, en el transporte de la droga ilícita, etc.) hasta g o mg de drogas aparecidas por ejemplo en el lavado de jeringas. Para trazas, muestras asociadas con un sospechoso (ej., materiales sobre sangre -- coagulada o calzado) se compara con aquellas tomadas en el lugar del crimen, y en la mayoría de los casos las muestras son muy pequeñas. El desafío analítico de la ciencia forense es muy grande y podría ser descrita -- tal vez como inversamente proporcional al tamaño de la muestra.

### III. LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

Los precursores de la Cromatografía Líquida de Alta Presión - son: Hamilton, Kirkland, Huber, Waters, y otros (4).

La técnica ofrece estas ventajas principales;

Selectividad óptima

Tiempo de análisis corto.

Gran sensibilidad, capaz de detectar compuestos en los niveles de picomoles y subpicomoles.

Estabilidad, ya que la temperatura de operación por lo general es la ambiente; lo cual resulta ideal para compuestos térmicamente inestables como lo son los materiales biológicos, y algunas drogas, como las que en este trabajo se investigaron, como la morfina, heroína, LSD, etc.

Estabilidad, ya que la temperatura de operación por lo general es la ambiente: lo cual resulta ideal para compuestos térmicamente inestables como lo son los materiales biológicos, y algunas drogas, como las que en este trabajo se investigaron, como la morfina, heroína, LSD, etc.

Es muy conveniente en el análisis de compuestos polares.

Purificar cantidades grandes de componentes con precisión y exactitud de 1%.

Las sustancias no tienen que ser volátiles necesariamente. -  
La polaridad de la fase móvil es tan variable como la de la fase fija.

Determinación simultánea de diferentes componentes en una --  
muestra.

Generalmente se requiere de cantidades pequeñas de muestras para análisis cualitativos y cuantitativos, es así como para purificación por lo que bajas concentraciones, así como volumen limitado de muestra - en HPLC no es problema.

Ofrece varios modos de separación ya que existen varios tipos de empaque para columna.

Estas ventajas se pueden optimizar variando los siguientes parámetros: tamaño de poro, constitución química de la superficie del material de empaque de la columna, características del poro, las dimensiones de la columna, composición del eluyente.

Las ventajas mencionadas anteriormente, hacen de la HPLC una herramienta muy útil para aplicaciones biomédicas, por ejemplo en separaciones para la identificación y cuantificación de drogas y metabolitos en fluidos biológicos. Aunque los fluidos biológicos pueden ser cromatografiados directamente, es con frecuencia preferible extraer y concentrar -- los compuestos de interés, ya que el resultado en muestras concentradas - dan muy pocas interferencias.

La HPLC ofrece muchas posibilidades de ajuste para seleccionar la fase del sistema combinada con altas eficiencias, lo cual la hace

conveniente para el análisis de compuestos térmicamente lábiles, hidrofílicos e hidrofóbicos.

Los metabolitos de una droga son más hidrofílicos que la droga misma, en este caso se escogería por ejemplo, una fase estacionaria - hidrofóbica, para que los compuestos más hidrofílicos sean eluidos primero, lo cual permitiría fácil detección y cuantificación de metabolitos.

En la mayoría de los casos, el cuerpo metaboliza una droga - convirtiéndola en un compuesto más polar, por lo que se necesitaría un sistema de separación cromatográfico en el que hubiera cambios de polaridad para realizar la cromatografía, y HPLC tiene para este caso el tipo de cromatografía ideal que sería la de fase inversa.

## 1. Bases Teóricas

El proceso de separación se basa en las diversas interacciones entre la fase móvil y estacionaria por un lado, y la naturaleza química de la molécula del problema, por otro. La naturaleza de la fase móvil y estacionaria determina por lo tanto, los mecanismos en que se basa una separación cromatográfica (4).

Los principales factores y variables que involucra una separación cromatográfica son:

Selectividad, que se da por los valores de  $\alpha$

Eficacia de separación, caracterizada por el número de platos teóricos y la altura de ellos.

Una característica cualitativa analítica de una sustancia es el tiempo total de retención ( $t_r$ ), que caracteriza bajo condiciones estandarizadas la separación cromatográfica de una muestra de manera reproducible.

El tiempo de retención ajustado ( $t'_r$ ), indica cuánto tiempo se queda la sustancia en la fase fija, y es la diferencia entre el tiempo total de retención ( $t_r$ ) y el tiempo muerto ( $t_m$ ).

$$t'_r = t_r - t_m \quad (1)$$

$t_m$  tiempo muerto, indica cuánto tiempo necesita una sustancia inerte, la cual no entra en interacción con la fase fija para pasar por la columna de separación. De esta forma corresponde con el tiempo que la sustancia se queda en la fase móvil.

Como el tiempo de retención depende de la velocidad de flujo del medio de elución, se puede usar los volúmenes de retención para identificar las sustancias separadas.

El volumen total de retención ( $V_r$ ), es el producto del tiempo total de retención y la velocidad de flujo del eluyente ( $F_c$ ).

$$V_r = t_r \cdot F_c \quad (2)$$

De esta ecuación se puede definir el volumen muerto, el volumen de la fase móvil  $V_m$ , en la columna de separación:

$$V_m = t_m \cdot F_c \quad (3)$$

El volumen de retención ajustado  $V'_r$ , es igual a la diferencia del volumen total de retención y el volumen de la fase móvil:

$$V'_r = V_r - V_m \quad (4)$$

Si un segundo componente es eluido, después de un tiempo  $t_2$ , la separación entre dos componentes 1 y 2 es medido por el factor de resolución, que es el grado de separación de dos sustancias.



Si un segundo componente es eluido, después de un tiempo  $t_2$ , la separación entre los dos componentes 1 y 2 es medido por el factor de resolución, que es el grado de separación de dos sustancias.

$$R = \frac{(tr_2 - tr_1)}{(W_1 + W_2)} \quad (5)$$

donde  $W_1$  y  $W_2$  es la anchura de los picos medidos en la línea base. - Picos totalmente aislados se logran con una resolución mayor que 1.5 como se indica en la Figura 1.

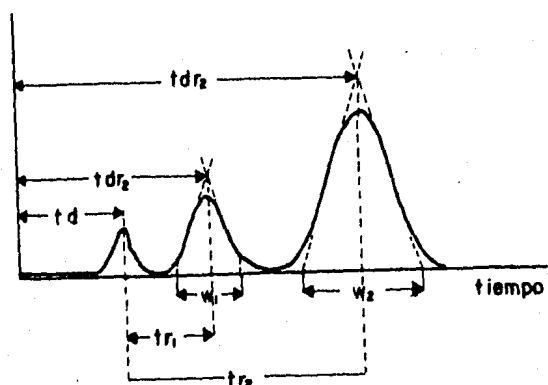


Figura 1. Cromatograma típico y sus principales variables

Durante el paso por la columna la proporción de las cantidades de una sustancia entre la fase fija y la móvil es constante, característica de la sustancia, y es lo que se conoce como factor de capacidad  $k'$ . es decir, es la habilidad de una columna para retener muestras, y está en relación con el coeficiente de distribución de Nernst

K, a través de la proporcionalidad de volúmenes  $V_s/V_m$ .

$$k' = K \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (6)$$

Donde:  $k'$  = factor de capacidad  
 $K$  = coeficiente de distribución de Nernst  
 $V_s$  = volumen de sustancia en la fase estacionaria  
 $V_m$  = volumen de sustancia en la fase móvil

La teoría de la distribución multiplicativa explica la relación entre el factor de capacidad  $k'$  y los datos de retención.

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad (7)$$

Factor de separación o de selectividad ( $\alpha$ ). Es la capacidad de una columna de separar dos o más sustancias al pasar por ella, por medio de diferencias bastante grandes en las interacciones con la fase fija, y es una relación de los factores de capacidad:

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2} = \frac{V_{r_1} - V_m}{V_{r_2} - V_m} = \frac{t_{r_1} - t_m}{t_{r_2} - t_m} = \frac{t'_r_1}{t'_r_2} \quad (8)$$

Cuando es igual a 1, no hay resolución. Un valor grande por ejemplo indica gran selectividad y muy fácil separación. También se denomina retención relativa.

El factor de capacidad y el de separación definen un proceso termodinámico, o sea la distribución de las sustancias entre la fase móvil, y a esto se le conoce como el número de platos teóricos  $N$ , que

representa la eficiencia de la columna.

$$N = 16 \left( \frac{V_r}{W} \right)^2 \quad (9)$$

Para una columna de longitud  $L$  y  $N$  platos teóricos, un plato teórico tiene la altura teórica  $H$ ;

$$H = \frac{L}{N} \quad (10)$$

Las retenciones de los compuestos en el sistema cromatográfico, generalmente son expresados en valores de  $k'$  y la eficiencia de la columna en platos teóricos ( $N$ ). Su relación con la resolución es un valor práctico y está dado por:

$$R_s = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (11)$$

Para una resolución máxima de dos picos el factor de capacidad  $k'$ , tiene un valor de 2 - 5.

Para la separación de dos o más componentes el valor de  $k'$ , es ajustado en el intervalo de  $1 \leq k' \leq 10$ .

## 2. Mecanismos de Separación de Formas Diferentes de Cromatografía Líquida de Alta Presión (5)

Hay cuatro formas de realizar la Cromatografía Líquida de Alta Presión, cada uno se basa en diferentes mecanismos de separación. Mediante un cambio de columnas, es posible utilizar cada uno de ellos.

a) Cromatografía Líquido - Líquido o de Partición. Aquí el mecanismo de separación se basa en la distinta solubilidad que presentan las moléculas de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria, - los compuestos más solubles en la fase estacionaria son selectivamente retenidos por ella en tanto que los menos solubles son transportados más --rápidamente por la fase móvil.

En este tipo de cromatografía, la fase líquida estacionaria - que es inmisible con la fase líquida móvil, está soportada sobre las partículas de un sólido. La fase líquida estacionaria determina fundamentalmente el grado de separación.

Este tipo de separación es apropiado para la investigación de compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular sea inferior a 1500, y no ionizados.

En el caso ideal, la fase fija estacionaria, es completamente inmisible en la fase móvil, situación que casi nunca sucede. Una forma de resolverlo es saturando la fase móvil con la fase estacionaria por medio de una columna que contenga un alto porcentaje de la fase estacionaria. Otra forma es utilizar materiales que contengan la fase estacionaria.

ria químicamente unida a un soporte, a manera de empaque de la columna, para así evitar la pérdida de la fase estacionaria y el uso de precolumnas para saturar la fase móvil.

b) Cromatografía de Fase Inversa. Aquí se superponen mecanismos de la cromatografía líquido - líquido, por lo que no es posible clasificarla claramente en alguno de éstos procesos de separación.

Aquí, al contrario que la cromatografía de adsorción o líquido - sólido, se emplean fases estacionarias o fases fijas no polares y -- fases móviles polares.

La separación consiste en las fuerzas de atracción diferentes según Van der Waals entre la fase fija no polar y las moléculas de muestra no polares hasta polares. Cuanto más fuertes son estas interacciones, más tiempo se quedan los compuestos de ésta fase. Como fase móvil se usan disolventes polares.

Con este método de separación se logran mejores resultados - trabajando con elución en gradiente.

Normalmente se usan como fase móvil: agua/metanol o agua/acetónitrilo; el acetónitrilo tiene la ventaja de poseer una baja viscosidad.

Las fases fijas estacionarias se producen por una modificación química del gel de sílice, los grupos silanol (Si-OH) son transformados con clorodimetil n-alquil-silanos. Los compuestos producidos son

químicamente muy resistentes. La fase ligada cubre la superficie como un cepillo, las características de esta fase fija o estacionaria son parecidas a los sólidos de la cromatografía de adsorción. Los restos alquilo ligados tienen entre dos y dieciocho átomos de carbono.

Para una cromatografía en fase inversa satisfactoria, la ionización de compuestos iónicos debe ser suprimida; por ejemplo, para compuestos ácidos y básicos esto puede lograrse reemplazando el agua de la fase móvil por ácido acético acuoso o carbonato de amonio.

La cromatografía en fase-inversa es el método de separación más aplicado en la HPLC una de las razones para elegir este método, es que es sencillo, los resultados son reproducibles, las columnas son usadas a pH menores de ocho resistiendo más tiempo. Sobre todo es un método de separación de sustancias altamente polares, que solo se disuelven en disolventes polares, como agua, alcohol. Aunque también se pueden separar sustancias no polares. La universalidad de este sistema de separación se muestra en la capacidad de separar hasta sustancias ionizadas, lipofílicas.

c) Cromatografía de Intercambio Iónico. El efecto de separación se produce por medio de la unión entre los iones de la fase móvil -- amortiguada y la sustancia por analizar ionizada, ocupando los sitios activos del intercambiador de iones de la fase fija o estacionaria. Para cumplir con la exigencia de estabilidad de presión, se han desarrollado intercambiadores de iones especiales para HPLC.

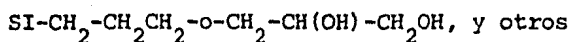
Aquí la fase estacionaria está dada por una resina de intercambio de iones o partículas ácidas o básicas, en las que su superficie sólida está cubierta con resina líquida de intercambio iónico.

La fase móvil es generalmente un disolvente polar, semejante a alcohol o agua.

En la fase móvil se puede variar la fuerza iónica o el pH, ya que ambos influyen en la resolución.

d) Cromatografía de Exclusión, de Permeación o de Filtración, su mecanismo de separación depende de el tamaño diferente de las moléculas de las sustancias analizadas.

La fase fija es un sólido poroso, con una distribución de diámetro de poro definida (ej. vidrios porosos, geles de sílice con superficie desactivada, gel de sílice con una base ligada, por ej.;



Como fase móvil se usan sistemas acuosos y no acuosos. Hay que elegir que la fase móvil no se adsorba en la fase fija.

Los poros del empaque de la columna son de tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedar retenidas, en tanto que las grandes eluyen. Conviene mencionar que el tiempo de elución es proporcional al peso mole-

cular.

Esta técnica es muy aplicada para compuestos de alto peso molecular, como polímeros, proteínas, polisacáridos, enzimas; pero su resolución no es buena y al tiempo de análisis puede resultar largo.



### 3. Instrumentación

Las partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta presión son las siguientes:

- (a). Recipiente para eluyentes
- (b). Bomba
- (c). Programador de eluyentes
- (d). Sistema de inyección
- (e). Columna: empaques, soportes, fases estacionarios líquidos
- (f). Detector
- (g). Sistema de registro

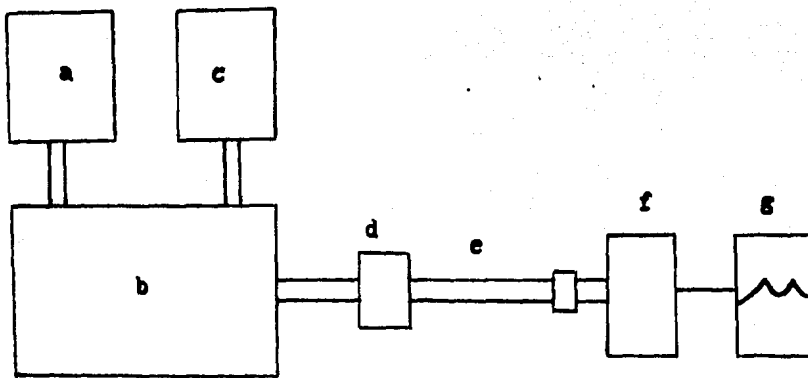


Figura 2. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión

(a). Recipiente para eluyentes. Estos recipientes pueden -- ser de vidrio, acero inoxidable o plástico inerte, con una capacidad entre 1 y 3 litros. Casi todos los aparatos existentes en el comercio, ya --

tienen un desgasificador en el recipiente del disolvente, el cual es necesario para evitar burbujas de aire sobre todo en las fases móviles polares, en donde hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el disolvente. Estas burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y de la columna y por tanto a la determinación. La desgasificación se hace calentando el disolvente o bien por desplazamiento con gases como helio, nitrógeno, o algún otro gas menos soluble e inerte. También se emplea ultrasonido.

(b). Bomba. El sistema de transporte de la fase móvil es una parte muy importante de cada cromatógrafo, y en el caso de los cromatogramas de líquidos de alta presión se usan empaques de columnas de partículas muy pequeñas, lo cual hace que haya una gran resistencia al flujo de la fase móvil. Por esta razón se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a una velocidad razonable, ya que de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

Un sistema de bombeo debe cumplir con éstos aspectos esenciales:

Presión máxima de operación

Intervalo de volúmenes obtenibles

Reproducibilidad y constancia de flujo

Características del flujo

Resistencia a líquidos corrosivos

Facilidad de efectuar cambios de fase móvil, así como de la limpieza del sistema.

Con base en las características de funcionamiento y diseño, -  
existen dos tipos de bombas:

- Bombas mecánicas
- Bombas neumáticas

Las primeras se dividen en dos tipos: bombas recíprocas (de pistón o diafragma), y bombas de desplazamiento continuo.

Las bombas recíprocas. Son las que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, sino mas bien pulsante. La presión máxima que se puede alcanzar es aproximadamente 200 atm, aunque esto puede variar según el diseño.

Bombas de desplazamiento continuo. Conocidas también como bombas de émbolo o de tipo jeringa; son aquellas en que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen, en seguida el líquido fluye a través de una abertura en la misma cámara obteniéndose así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

Bombas neumáticas. En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene. La presión obtenible es limitada por la presión del gas así como del material de fabricación del sistema. Las velocidades

des del flujo obtenidas están libres de pulsaciones y son de presión constante, lo cual significa que si la caída de presión de la columna cambia, el flujo también cambiará. Las desventajas de estas bombas son capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear, y la difusión que presenta el gas en el líquido; esto último se puede resolver utilizando algún -- tipo de interfase entre el líquido y gas, para evitar el contacto directo entre ellos, o desechando las últimas porciones de líquido que han sido - saturadas por el gas.

Para cualquier tipo de bomba utilizado, es conveniente colo-- car un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que partículas extrañas interfieran en el sistema, este filtro debe tener la ca-- pacidad de retener las partículas extrañas sin producir una caída de presión excesiva. Al utilizar bombas que desplazan flujos de volumen cons-- tante, se recomienda usar una válvula o sello de seguridad que libere la presión del sistema cuando alcance un límite superior al normal. Esto -- podría suceder si por alguna razón el sistema se bloquea y la bomba conti-- núa desplazando el mismo volumen e incrementando continuamente la presión.

c). Programador de eluyentes. En la Cromatografía de Líqui--dos de Alta Presión tiene mucha importancia el cambio de la composición - del eluyente o fase móvil, durante el análisis (elución en gradiente). -- Con este método se puede redissolver en una sola separación composiciones muy complejas de sustancias sumamente polares como no polares. Por lo -- general se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varía el porcentaje del disolvente más polar en la mezcla binaria.

Con elución en gradiente los análisis son más rápidos, mejores separaciones, mayor simetría en los picos, mejor detectabilidad.

La formación en gradiente se hace, o en el lado de la baja presión en cámara de mezcla, o en el lado de alta presión, aplicando una segunda bomba.

Este sistema no tiene limitaciones en cuanto a disolventes y garantiza una interfase mínima entre cámaras de mezcla y columna de separación como un flujo continuo sin señales.

Por otra parte sus desventajas son; difíciles de efectuar - en cromatografía líquido - líquido, necesidad de regenerar la columna, in compatibilidad con el detector en algunos casos.

El programador de la fase móvil es un dispositivo muy complejo que puede resultar tan costoso como el instrumento mismo.

d) Sistema de inyección. Esta parte del instrumento exige cuidadoso diseño, puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil. - Aquí en estas cámaras es donde se introduce la muestra que luego es arrastrada a la columna. Existen tres diferentes formas o modos de introducir la muestra; por medio de jeringas de alta presión, por medio de válvulas inyectoras, y suspendiendo el flujo momentáneamente.

Si la inyección se hace por medio de jeringa, se requiere que la presión sea menor a 100 atm.; aquí la muestra se introduce perforando -

con la aguja de la jeringa, un disco o sello de teflón, que es capaz de resistir altas presiones y la acción disolvente de la fase móvil. Si se opera a presiones mayores de 100 atm., se utilizan válvulas inyectoras, si se carece de este tipo de válvulas, se puede recurrir a la técnica de suspensión del flujo, que consiste en interrumpir la presión parando la bomba, se espera que el flujo cese antes de perforar el sello al introducir la muestra, en seguida se restablece el flujo. Con este tipo de inyección no hay pérdida de eficiencia en la separación, ya que las velocidades de difusión en líquidos son muy bajas.

e) Columna. La elección correcta de la columna de separación así como de la fase estacionaria, es la parte más importante para el analista, ya que esto determina la calidad de separación.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. Se ha visto que el material ideal para la columna es el de acero inoxidable, también se usan cobre, vidrio de paredes gruesas, pero con el cual existe el inconveniente de no permitir conexiones metalvidrio herméticas a altas presiones. Las columnas de acero son relativamente resistentes a la corrosión, y se pueden utilizar con cualquier presión, la condición para resultados reproducibles es que sus paredes internas estén finamente pulidas.

Las columnas de cobre se trabajan fácilmente, pero son más sensibles a la corrosión, además se observa con frecuencia efectos catalíticos. Las columnas de tántalo son las más inertes, siendo equivalentes

en muchos casos a las de vidrio, pero su desventaja es la dureza del material, el cual es muy difícil de trabajar, por lo que resulta además muy costoso.

La longitud de la columna varía entre 15 cm y varios metros y el diámetro entre 2 y 3 mm, la capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.

Si se desean realizar trabajos de tipo preparativo, o sea separar y recuperar los componentes de una muestra en cantidad suficiente - para poder utilizarlos en posteriores análisis, se deben de utilizar columnas con materiales de mayor capacidad. Estas columnas efectúan la separación más lenta y con una eficiencia menor.

Normalmente las columnas son de forma recta, se cierran de ambos lados para evitar que las conexiones permitan un volumen muerto innecesario. En algunas ocasiones es necesario usar columnas muy largas para estos casos se pueden utilizar columnas rectas conectadas entre sí o bien columnas enrolladas o en forma de U, L, S, u 8, estas últimas formas facilitan el control de la temperatura. En todo caso, recuérdese que cualquier estrangulamiento de la columna provocará una gran pérdida en la eficiencia y para el caso de las columnas enrolladas, la pérdida será mayor conforme disminuye el diámetro de la columna.

Los materiales de empaque o fase estacionaria de la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión. La condición química de las partículas es variable, para poder lograr una selección variable. El tamaño de -

las partículas oscila entre 5 y 50  $\mu\text{m}$ . Las partículas usadas hoy en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión se dividen en dos clases: Las completamente porosas y las de capa fina, llamados también adsorbentes peculiares, de porosidad superficial o de centro sólido. A la primera clase pertenecen: óxido de aluminio, gel de sílice y alúmina principalmente. Estas partículas tienen una superficie específica grande de 50 a 500  $\text{m}^2/\text{g}$  y un gran volumen de poro de 0.2 a 2  $\text{ml}/\text{g}$ , estas características importantes para la cromatografía las pueden variar los fabricantes.

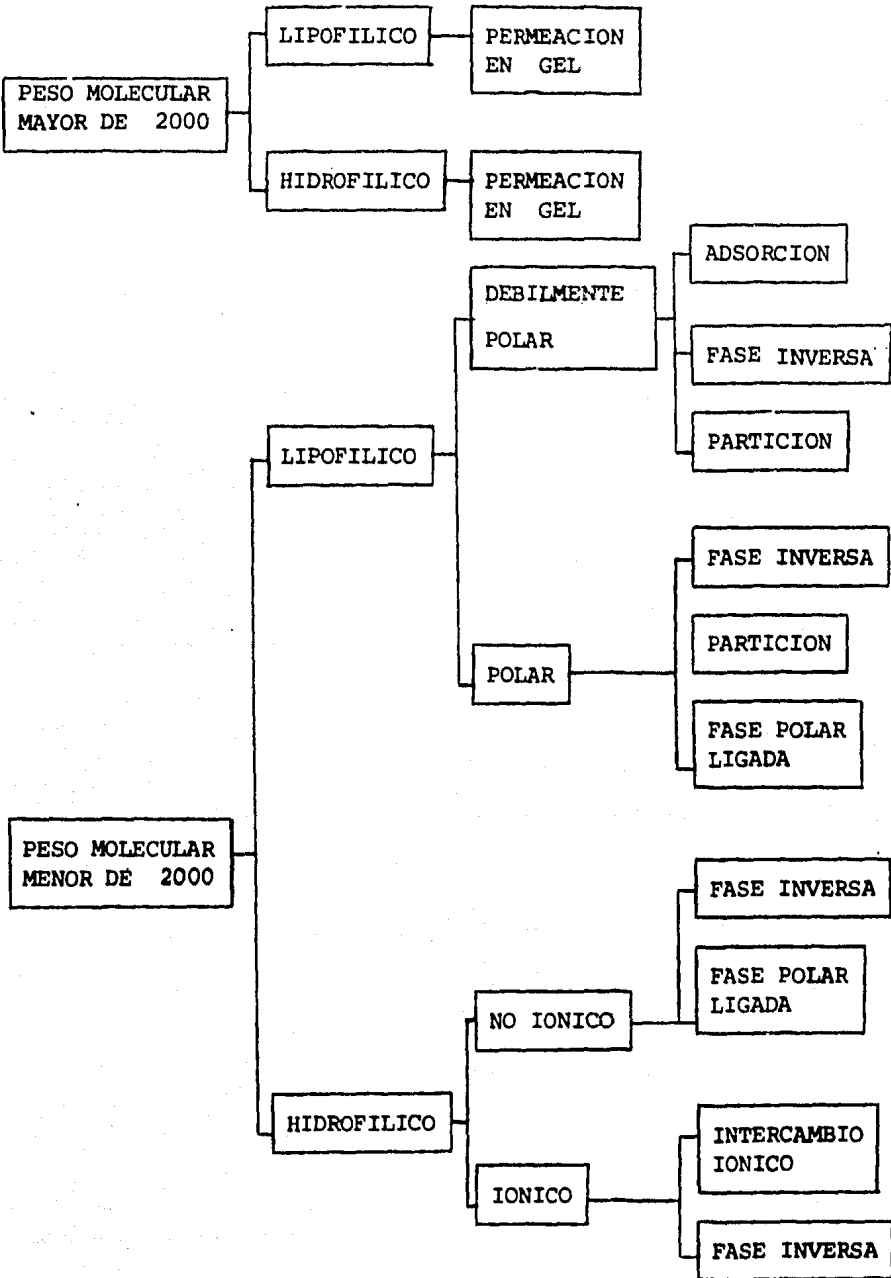
Las partículas de capa fina tienen un núcleo duro e inerte, - esféricas generalmente vítreas, no porosas, cubiertas con una capa fina - porosa y activa como gel de sílice o alúmina, el espesor de esta capa es de 1 a 3  $\mu\text{m}$ .

Los materiales peculiares tienen superficies específicas menores entre 1 y 12  $\text{m}^2/\text{g}$ , un menor volumen de poro o sea que aceptan muestra, de 10 a 20 veces menos que los materiales porosos y su costo es considerablemente elevado.

La elección del material depende de las propiedades físico-químicas de las sustancias por analizar y así se determina el método de separación cromatográfico.



El siguiente cuadro esquematiza la selección de la fase estacionaria (4).



La selección de un disolvente o una mezcla de ellos no es la borioso, ya que éstos poseen propiedades elutrópicas además de que se -- pueden hacer pruebas preeliminares en cromatografía en capa fina para eli-- minar rápidamente disolventes no prácticos. La solubilidad aquí es muy importante, se debe de asegurar que no se precipite los compuestos en la cabeza de la columna.

La densidad del disolvente debe ser más alta que la del disol-- vente eluyente, ya que de lo contrario, el material de empaque puede pa-- sar en bandas propagadas.

El disolvente debe tener una viscosidad adecuada, estabilidad con la fase estacionaria de la columna y compatibilidad con el detector.

Disolventes con baja viscosidad, mantienen alta eficiencia en la columna, permitiendo separaciones rápidas, porque da alta velocidad -- del flujo y genera alta presión, por ej. acetonitrilo es menos viscoso que metanol.

Empaques enlazados tienen un límite de estabilidad químico y en esencial asegurar que el pH y la actividad hidrolítica del disolvente sean compatibles con el empaque. Por ejemplo: ester enlazado a fases -- estables son menos estables que con éter, siendo uniformemente hidrolizadas por alcoholes alifáticos las primeras, mientras que las segundas son esta bles a alcoholes y pueden ser usadas excesivamente en un moderado inter-- valo de pH.

El uso de disolventes puros es importante en los procesos -- cromatográficos, ya que pueden existir por ejemplo impurezas en disolventes no polares.

En lo que atañe a las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida cabe citar;

Disolver la muestra

No degradar o disolver la fase estacionaria

Tener baja viscosidad

Ser compatible con el tipo de detector utilizado

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad.

Esto causaría pérdidas de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben de seleccionar con cuidado.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil debe ser compatible con el detector empleado, lo cual es particularmente importante en el caso de programaciones de la fase móvil, puesto que el cambio de composición de esta puede afectar el

funcionamiento del detector,

La composición óptima de la fase móvil es cuando se tienen --  
pequeños factores de capacidad y altos coeficientes de selectividad,

Como fase móvil o eluyente se usan líquidos de polaridades di  
versas. Los disolventes usados con más frecuencia se citan a continua---  
ción: Agua, hexano, metanol, etanol, benceno, ciclohexano, acetonitrilo,  
ácido acético, tetrahidrofurano, dietil-alil-éter, cloruro de metileno, -  
tetracloruro de carbono.

En la Tabla 1 se da una lista más extensa de eluyentes y sus  
propiedades cromatográficas más importantes:

TABLA 1

## PROPIEDADES CROMATOGRAFÍAS DE LOS ELUYENTES (6)

Disolvente	$E^{\circ}(Al_2O_3)$	Viscosidad (cP, 20°)	I.R. Índice de refracción	Límite de transparencia en U.V. (n.m.)
Fluoroalcanos	0.25		1.25	210
n-Pentano	0.00	0.23	1.358	210
Isooctano	0.01	0.54	1.404	210
Eter de petróleo	0.01	0.3		210
Skellysolve B., etc.				
n-Decano	0.04	0.92	1.412	210
Ciclohexano	0.04	1.00	1.427	210
Ciclopentano	0.05	0.47	1.406	210
Diisobutileno	0.06		1.411	
l-Pentano	0.08		1.371	
Disulfido de carbono	0.15	0.37	1.626	389
Tetracloruro de carbono	0.18	0.97	1.466	265
Cloruro de amilo	0.26	0.43	1.413	225
Xileno	0.26	0.62-0.81	1.50	290
l-Propil éter	0.28	0.37	1.368	220
l-Propil cloruro	0.29	0.33	1.378	225
Tolueno	0.29	0.59	1.496	285
Cloruro de n-propilo	0.30	0.35	1.389	225
Clorobenceno	0.30	0.80	1.525	
Benceno	0.32	0.65	1.501	280
Bromuro de etilo	0.37	0.41	1.424	
Etil éter	0.38	0.23	1.353	220
Sulfito de etilo	0.38	0.45	1.442	290
Cloroformo	0.40	0.57	1.443	245
Cloruro de metileno	0.42	0.44	1.424	245
Metil-i-butilcetona	0.51	0.43	1.381	330
Tetrahidrofurano	0.45		1.408	220
Dicloruro de etileno	0.49	0.79	1.445	230
Metiletilcetona	0.51		1.381	330
l-Nitropropano	0.53		1.400	380
Acetona	0.56	0.32	1.359	330
Dioxano	0.56	1.54	1.422	220
Acetano de etilo	0.58	0.45	1.370	260
Acetano de metilo	0.60	0.37	1.362	260
Alcohol amílico	0.61	4.1	1.410	210

TABLA 1

(continuación)

Disolvente	E° (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Viscosidad	I.R. índice de refracción	Límite de transparencia en U.V. (n.m.)
Dimetil sulfóxido	0.62	2.24	1.477	
Anilina	0.62	4.4	1.586	
Diethyl amina	0.63	0.38	1.387	275
Nitrometano	0.64	0.67	1.394	380
Acetonitrilo	0.63	0.37	1.344	210
Piridina	0.71	0.94	1.510	305
Butil celosolve	0.74			220
i-propanol, n-propanol	0.82	2.3	1.38	210
Etanol	0.88	1.20	1.361	210
Metanol	0.95	0.60	1.329	210
Etilenglicol	1.11	19.8	1.427	210
Acido acético	grande	1.26	1.372	
Agua	muy grande	1.00	1.333	

En la Tabla 2 se citan algunos de los soportes más comunes - que se emplean para empacar columnas de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión y también en la Tabla 3.

## SOPORTES CROMATOGRAFICOS (6)

Tipo	Nombre	Uso	Superficie area m <sup>2</sup> /g	Tamaño de partícula (μ)	Forma	Suministro
Poroso						
Silica	Porasil A	LSC,LLC	350 - 500	37 - 125	S	13
Silica	Porasil B	GPC	125 - 250	37 - 125	S	13
Silica	Porasil C	GPC	50 - 100	37 - 125	S	13
Silica	Porasil D	GPC	25 - 45	37 - 125	S	13
Silica	Porasil E	GPC	10 - 20	37 - 125	S	13
Silica	Porasil F	GPC	2 - 6	37 - 125	S	13
Silica	Porasil T	GPC	300	15 - 50	1	13
Silica	Spherosil XOA 400	LSC,LLC	350 - 500	37 - 150	S	11
Silica	Spherosil XOA 200	GPC	125 - 250	37 - 150	S	11
Silica	Spherosil XOB 075	GPC	50 - 100	37 - 150	S	11
Silica	Spherosil XOB 030	GPC	25 - 45	37 - 150	S	11
Silica	Spherosil XOB 015	GPC	10 - 20	37 - 150	S	11
Silica	Spherosil XOC 005	GPC	2 - 6	37 - 150	S	11
Silica	Biosil A	LSC,LLC	200+	20 - 40	1	2
Silica	Sil-X	LSC	300	36 - 45	1	14
Silica	Lichrosorb	LSC,LLC	200+	5 - 30	1	5,6,12
Silica	Zorbax-Sil	LSC,LLC	250 - 350	10	S	3
Alumina	Woelm	LSC,LLC	200+	18 - 30	1	13
Alumina	Bio-Rad AG	LSC,LLC	200+	74	1	2
Tierra diato-		LLC	1 - 10	50	1	1,12,8
Tierra diato-	Diachrom,	LLC	10	37 - 44	1	1,8
Fase enlazada	Durapak OPN	BPC	50	35 - 75	S	13
Fase enlazada	Durapak Carbowax	BPC	50	35 - 75	S	13

TABLA 2  
(continuación)

Tipo	Nombre	Uso	Superficie área m <sup>2</sup> /g	Tamaño de partícula (μ)	Forma	Suministro
Fase enlazada	Durapak n-octano	BPC	50	75 - 125	S	13
Pelicular						
Silica	Zipaz	LLC	1	25 - 44	S	3
Silica	Liqua-Chrom	LLC	10	44 - 53	I	1
Silica	Corasil 1	LSC, LLC	7	37 - 50	S	13
Silica	Corasil 11	LSC, LLC	14	37 - 50	S	13
Silica	Vydac	LSC, LLC	12	30 - 44	S	1,10
Silica	Pellosil HS	LSC, LLC	4	37 - 44	S	9
Silica	Pellosil HC	LSC, LLC	8	37 - 44	S	9
Silica	Perisorb A	LSC, LLC	10	30 - 40	S	5,6,12
Alumina	Pellumina HC	LSC, LLC	4	37 - 44	S	9
Alumina	Pellumina HC	LSC, LLC	8	37 - 44	S	9
Poliamida	Pellidon	LLC	I	55 - 65	S	9
Poliamida	Zipax Polyamide	LLC	I	25 - 37	S	3
Fase enlazada	Durapak/Corasil Carbowax 400	BPC	7	37 - 50	S	13
Fase enlazada	Vydac fase reversa	BPC	12	30 - 44	S	1,10
Fase enlazada	Vydac					
	Fase polar enlace	BPC	12	30 - 44	S	1,10
Fase enlazada	Bondapak C <sub>18</sub> / Corasil	BPC	7 - 14	37 - 50	S	12
Fase enlazada	Phenil/corasil	BPC	7 - 14	37 - 50	S	2
Fase enlazada	Ax/Corasil	BPC	7 - 14	37 - 50	S	2
Fase enlazada	Permaphase ETH	BPC	I	37 - 44	S	3
Fase enlazada	Permaphase ODS	BPC	I	37 - 44	S	3

I = Irregular S = Esférica



OTROS SOPORTES CROMATOGRAFICOS (6)

Tipo	Nombre	Grupo funcional	Fuerza	Capacidad de intercambio	Tamaño de partícula
<u>Poroso</u>					
Intercambio de Anión	Aminex A14	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	3400	17 - 23
Intercambio de Anión	Aminex A25	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	3200	17.5 ± 2
Intercambio de Anión	Aminex A27	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	3200	12 - 15
Intercambio de Anión	Aminex A28	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	3200	7 - 11
Intercambio de Anión	Durrum DA-X8	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	4000	20 ± 5
Intercambio de Anión	Durrum DA-X8A	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	4000	8 ± 2
Intercambio de Anión	Durrum DA-X4	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	2000	20 ± 5
Intercambio de Anión	Durrum DA-X2	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SB	2000	20 ± 5
Intercambio de Catión	Aminex A4	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	16 - 24
Intercambio de Catión	Aminex A5	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	13 ± 2
Intercambio de Catión	Aminex A6	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	17.5 ± 2
Intercambio de Catión	Aminex A7	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	7 - 11
Intercambio de Catión	Durrum DC1A	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	18 ± 3
Intercambio de Catión	Durrum DC2A	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	12 ± 3
Intercambio de Catión	Durrum DC4A	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	8 ± 2
Intercambio de Catión	Beckman AA-15	-SO <sub>3</sub> H	SA	3000	22 ± 6
Intercambio de Catión	Beckman PA-28	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	16
Intercambio de Catión	Beckman PA-35	-SO <sub>3</sub> H	SA	5000	13

: 37 -

TABLA 3  
(continuación)

Tipo	Nombre	Grupo funcional	Fuerza	Capacidad de intercambio	Tamaño de partícula
<u>Pellicular</u>					
Intercambio de Anión	Pellicular Anión	$-NR_4^+$	SB	10	40
Intercambio de Anión	AS-Pellionex-SAX	$-NR_4^+$	SB	100	44 - 53
Intercambio de Anión	Vydac Anión	$-NR_4^+$	SB	12	25 - 37
Intercambio de Anión	Vydac Anión	$-NR_4^+$	SB	100	30 - 44
Intercambio de Anión	Zipax SAX	$-NR_4^+$	SB	12	25 - 37
Intercambio de Anión	Zipax WAX	$-NR_2$	WB	12	25 - 37
Intercambio de Catión	Pellicular Catión	$-SO_3H$	SA	10	40
Intercambio de Catión	HS-Pellionex SCX	$-SO_3H$	SA	8 - 10	44 - 53
Intercambio de Catión	HS-Pellionex SCS	$-SO_3H$	SA	60	44 - 53
Intercambio de Catión	Vydac Catión	$-SO_3H$	SA	100	30 - 44
Intercambio de Catión	Zipax SCX	$-SO_3H$	SA	3.2	25 - 37

SA = Acido fuerte

SB = Base fuerte

WB = Base débil

f). Detector. Las sustancias separadas en la columna se indican con la ayuda de un sistema detector.

Por mucho tiempo la HPLC se ha visto obstaculizada por la falta de un detector adecuado, ya que su diseño no es fácil y ha requerido de una tecnología avanzada.

El detector tiene por objeto originar una señal proporcional a la concentración en la fase móvil de la muestra, a medida que esta sale por la columna, por medio de mediciones continuas de una magnitud física -- para las sustancias contenidas en el eluyente. Por desgracia, la mayoría de las propiedades de la muestra que pudieran medirse son muy similares -- en magnitud y características a las del disolvente o fase móvil, dificultando así el proceso de detección.

Este problema puede resolverse por dos formas; una consiste en -- eliminar el disolvente, antes del proceso de detección, y la otra en medir alguna propiedad de la solución que contiene la muestra, y de alguna forma, restar a la propiedad medida la cantidad correspondiente al disolvente. Esto prácticamente no es fácil de hacer, ya que por lograr una -- alta sensibilidad se deben controlar además parámetros de operación susceptibles de influenciar dichas propiedades de la solución y del disolvente, aquí también se requiere un control cuidadoso de la velocidad de flujo y de la temperatura.

Para considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, o al evaluar las cualidades de un cierto diseño, debe --

tenerse en cuenta las siguientes propiedades generales:

- Respuesta. Esta puede ser universal o selectiva, es universal si el detector es capaz de trabajar con todo tipo de muestras, y selectivo solo con muestras específicas. En general son más deseables los detectores universales, los selectivos suelen ser más sensibles, ya que detectan ciertos componentes a muy bajas concentraciones.
- Sensibilidad. La sensibilidad en un detector es la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Este es un término relativo, ya que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras. Además nos da una idea clara de la cantidad mínima detectable, ya que puede estar severamente limitada por el nivel de ruido del instrumento.
- Ruido. Es la variación en la señal del instrumento, que no se atribuye a la muestra, y que puede ser atribuida a fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc. La cantidad mínima detectable es la cantidad de muestra que produce una señal igual al doble del nivel de ruido del instrumento. De esto se deduce porqué un detector muy sensible y muy ruidoso puede no ser tan útil, como uno menos sensible pero con un nivel de ruido más bajo.
- Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, ésta señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad es lo que

se conoce como linealidad.

El intervalo lineal de un detector, se define como la razón entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la -- respuesta del detector es lineal. Para obtener resultados cuanti--  
tativos se recurre a gráficas de calibración, que representan la señal en función de la concentración en el intervalo de concentra--  
ciones en que la respuesta del detector es lineal.

- Estabilidad. Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo, y a la vez ser compati--  
ble con programaciones de fase móvil.

Un detector ideal cumple con las siguientes características:

- Bajo límite de comprobación, expresado en la concentración, normal--  
mente expresado como la doble desviación estándar.
- Sensibilidad alta y lineal. Es decir grandes cambios del valor --  
medio proporcional a la concentración, con pocos cambios de con--  
centración en el disolvente.
- Poca desviación, o sea constancia de los valores medidos proporcio--  
nales a la concentración, sumamente importante para la precisión --  
en mediciones en serie.
- Insensibilidad. En cuanto a combinaciones de la fase móvil (elu--  
ción en gradiente). Un detector colocado a la salida de la colum--  
na, proporciona un registro continuo del líquido que sale, lo que

permite obtener un cromatograma similar a los obtenidos en cromatografía de gases.

### Tipos de Detectores

La Cromatografía de Líquidos de Alta Presión utiliza los siguientes detectores:

- Detector de luz-ultravioleta (U.V.). La respuesta de este detector es selectiva ya que su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta.

Aquí se detectarán solo los compuestos que absorben luz en el ámbito del U.V.

Este detector es relativamente insensible a los cambios de flujo y temperatura, y siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro, será muy fácil efectuar programaciones de fase móvil, actualmente este es el detector más sensible en HPLC; en condiciones óptimas se pueden obtener sensibilidades de hasta 0.005 unidades de absorbancia, y si el compuesto absorbe intensamente en el ultravioleta, es posible -- detectar cantidades de muestra del orden 2 nanogramos, como es el caso de la mayoría de compuestos biológicos, así como en las drogas.

La mayor parte de los diseños comerciales operan a una longitud de onda de 254 o 280 nm, utilizando como fuente de luz ultravioleta -

una lámpara de mercurio de baja presión.

- Detector de índice de Refracción. Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; detectándose de esta manera cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón.

Debido a la respuesta universal, es muy difícil efectuar programaciones de la fase móvil con este detector, que además es sensible a las variaciones de flujo y temperatura. Por ejemplo para poder observar diferencias en el índice de refracción del orden de  $1 \times 10^{-4}$  unidades se requiere un control de la temperatura de  $\pm 0.0001^\circ\text{C}$ .

Hay dos modelos diferentes de este tipo de detector: Uno de ellos llamado refractómetro de desviación, basada en el desplazamiento óptico de un rayo de luz, que es proporcional a la diferencia del índice de refracción de dos líquidos. El otro refractómetro se basa en el principio de Fresnel, según el cual en la interfase entre la prisma de vidrio y algún líquido, la cantidad de luz transmitida y reflejada es proporcional a el ángulo de incidencia de la luz y al índice de refracción del líquido.

Los dos refractómetros miden cambios en el índice de refracción de hasta 10 unidades, el refractómetro de desviación es menos sensible

a los cambios de temperatura y es más compatible con la programación de la fase móvil, tiene un intervalo lineal menor, es muy -- sensible a las vibraciones o movimientos del instrumento, sus cel das son tan pequeñas como las del refractómetro de Fresnel, pero este se considera más sensible y menos adecuado para programaciones de fase móvil, es más sensible a los cambios de temperatura y, es necesario además intercambiar prismas para abarcar por completo - el intervalo de índices de refracción.

Los detectores de índice de refracción son de respuesta universal, requieren compensación por el disolvente, que es moderadamente -- sensible, no destruye la muestra, su estabilidad es buena, la se-- ñal que genera puede ser positiva o negativa, según el índice de refracción de la solución que contiene la muestra sea mayor o me-- nor que el índice de refracción del disolvente.

- Detector fluorométrico. Mejora la sensibilidad, ya que su detec-- ción es específica, es también un detector muy selectivo, muy po-- cos compuestos de interés clínico son naturalmente fluorescentes.

Este sistema de detección fluorométrica, es muy adecuada para ana lizar muestras muy pequeñas, o en casos que se tenga que buscar - muy bajos niveles de algún compuesto que podría ser LSD (el cual presenta fluorescencia natural), pueden hacerse fluorescentes por derivación con reactivos fluorescentes.



- Detector de Polarografía. Este detector es muy usado para compuestos que pueden ser oxidados o reducidos electroquímicamente. La sensibilidad de este detector depende de la velocidad de flujo, - coeficiente de difusión del compuesto, así como de su valencia -- electroquímica. Para el funcionamiento del detector móvil debe -- tener suficiente conductividad. Se reportan pocas aplicaciones, - con detecciones en los niveles de picogramos.

- Detector de Ionización de Flama. Por medio de un sistema de alambres, el disolvente es evaporado, y transferido al compuesto o soluto a una cámara de combustión donde es convertido catalíticamente a metano, el cual es detectado por ionización de flama. La respuesta del detector es directamente proporcional al contenido de - carbono, su sensibilidad es comparable a la del detector de índice de refracción.

- Detector de captura de Electrones. Es ideal para compuestos que - contienen grupos que presentan fuerte atracción electrónica; como por ejemplo pesticidas policlorados.

Se utilizan también entre otros detectores, el de infrarrojo, el - de conductividad térmica, el de espectrometría de masas y el radioquímico.

g). Sistema de Registro. Su función es representar gráficamente la señal dada por el detector. Por lo general se utilizan registradores potenciométricos de 1 a 10 MV. Es deseable que se registre la res-

gistre la respuesta rápida de la pluma y que la velocidad del papel sea variable.

Además de las partes esenciales descritas anteriormente, el cromatógrafo de líquidos de alta presión puede contener los siguientes accesorios:

Un segundo recipiente, útil en los casos que se requiera programar la fase móvil, con lo cual como ya se ha mencionado, se logran separaciones más exactas, y se disminuye el tiempo de análisis; este accesorio es semejante al programador de temperaturas en el cromatógrafo de gases. Un modular de la fase móvil u otra bomba, además se puede adicionar al aparato una área termostática para controlar la temperatura, útil en los casos que por ejemplo la temperatura de la columna necesite no ser superior a + 20°C o en la cromatografía líquido - líquido en la que se requiere un control más refinado de la temperatura. En los casos en que se trabaja a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, se utilizan baños de agua, etilenglicol, etc., o bien hornos de tipo eléctrico.

El control de la temperatura del detector, depende del detector usado, ya que muchos no lo requieren, mientras que otros necesitan un control sumamente minucioso. Un recolector de fracciones, este puede ser automático o manual, este accesorio es útil en trabajos preparativos. Un programador o medidor de la fase móvil.

#### IV. DROGAS DE ABUSO

##### 1. Qué son las Drogas

Son compuestos naturales o sintéticos, no necesariamente medicamentosos, de diversos grupos químicos (7).

Se dice que una droga es de "abuso" cuando su uso es excesivo, ya sea en forma persistente o esporádica, generalmente sin relación con la práctica médica habitual por ejemplo, alcaloides del opio, LSD, etc.

##### 2. Clásificación de las Drogas

Las drogas generalmente se clasifican como se señala en la ---  
Tabla 4.

En este trabajo se revisa 3 tipos de drogas: Barbitúricos, - Anfetaminas y Alcaloides del Opio. Se revisa sus propiedades físicas, químicas y toxicológicas; así como técnicas de HPLC por medio de las cuales - pueden determinarse cualitativa y cuantitativamente. Se revisó la bibliografía comprendida entre 1960 a la fecha, encontrándose información relacionada a estos 3 tipos de drogas a partir de 1973.

##### 3. Propiedades Físicas y Químicas

###### a) Barbitúricos.

Introducidos en el uso terapéutico en 1903 por Fischer y Von - Mering. Utilizados adecuadamente son medicamentos muy eficaces y seguros.

TABLA 4.

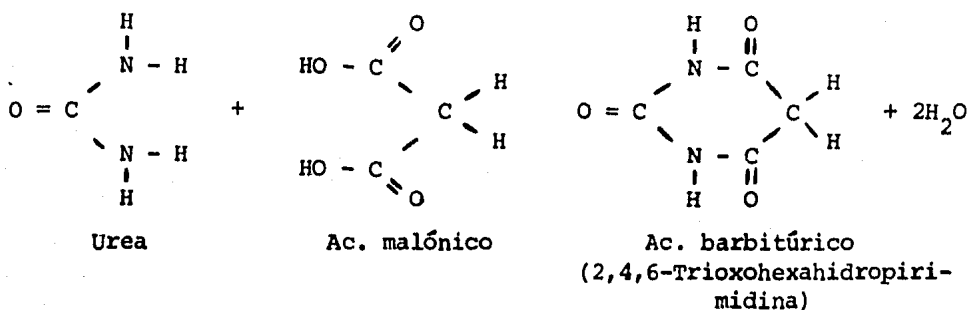
CLASIFICACION DE LAS DROGAS

Estupefacientes	Derivados del Opio	Naturales	{ Morfina Codeína
		Sintéticos	{ Heróina Pentazocina
Psicotrópicos	Psicolépticos	Hipnóticos	{ Barbitúricos Metacualona
		Ansiolíticos	{ Meprobramato Benzodiazepina
		Neurolépticos	{ Fenotiacinas Butirofenonal Reserpínicos Tioxantenos
	Psicoanalépticos	Psicoestimulantes	{ Anfetaminas Cafeína
		Antidepresivos	{ Imao Tricíclicas
			Psicodislépticos
Sustancias volátiles inhalables	Se refieren a diversos gases y líquidos orgánicos muy volátiles incluyendo colas aromáticas, adelgazadores de pinturas (thinners), gasolina, algunos anestésicos y -nitrito de amilo entre otros.		

Aunque los barbitúricos causan hábito y puede incluso originar toxicomanía.

Son ácidos débiles, que atraviezan las membranas biológicas - en forma no disociada por su solubilidad en los lípidos.

La combinación de urea y ácido malónico es la malonil urea o ácido barbitúrico, del cual se deriva toda la serie de los barbitúricos.



La mayor parte de los barbitúricos útiles en clínica se obtienen haciendo sustituciones adecuadas en la posición 5 de la molécula.

Los barbitúricos usados en terapéutica tradicionalmente se clasifican según su duración de acción, a base de experimentos en animales, por lo tanto la literatura farmacológica describe barbitúricos de acción ultracorta, corta, intermedia y prolongada. Pero la experiencia ha demostrado que esta clasificación es algo equívoca. Está justificado pensar que los barbitúricos pueden clasificarse simplemente según sus indicaciones terapéuticas, en barbitúricos sedantes, hipnóticos y anestésicos.

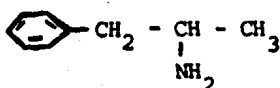
Las variaciones de absorción, distribución, fijación proteínica, rápidez de desintegración proteínica, desintegración metabólica, localización tisular, duración de acción y eliminación renal, guardan buena - correlación con la solubilidad lipídica del derivado no disociado del ácido barbitúrico. Los anestésicos intravenosos de acción ultrarrápida son muy solubles en los lípidos; los hipnóticos de acción corta intermedia, - así como los de acción prolongada como el fenobarbital y barbital son poco solubles en los lípidos.

b) Anfetaminas.

La anfetamina es un líquido móvil de ligero olor característico, sabor acre, fácilmente volátil a temperatura ambiente, ligeramente soluble en alcohol, éter, cloroformo y en ácidos diluidos; la densidad oscila entre 0.930 y 0.935 a 20°C.

En soluciones acuosas es alcalina, expuesta al aire absorbe - dióxido de carbono.

La forma racémica se conoce como anfetamina y el isómero dextrogiro como dextroanfetamina, este último es un estimulante muy poderoso del sistema nervioso central; el isómero levógiro tiene una acción vaso--presora mayor.



Anfetamina  
(1-fenil-2-aminopropano)

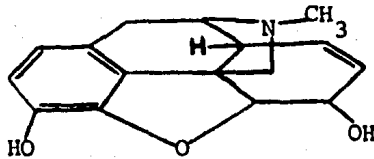
c). Alkaloides del Opio

El opio es el látex seco de las cápsulas inmaduras de la *Papaver somniferum* Linn, familia de las papaveráceas.

Contiene unos 25 alcaloides diferentes, que se encuentran en combinación con el ácido mecóico, el cual esta presente en aproximadamente un 5% y con  $H_2SO_4$ . Otros constituyentes son: pequeñas cantidades de - mucilago, almidón, gauchó, y sales de calcio y magnesio.

Los alcaloides presentes en mayor cantidad en el opio son: -- morfina del 10 al 20%, codeína (metil morfina) del 0.3% al 4%, narcotina del 2 al 8%, tebaína del 0.2 al 0.5%.

El opio no tiene rival como analgésico-narcótico, administrándose frecuentemente para calmar la excitación y aliviar el dolor. Su acción es debida principalmente a la morfina.



Morfina

(7, 8 - didehidro- 4, 5 - epoxy 17 - metil-  
morfina - 3, 6 - diol)

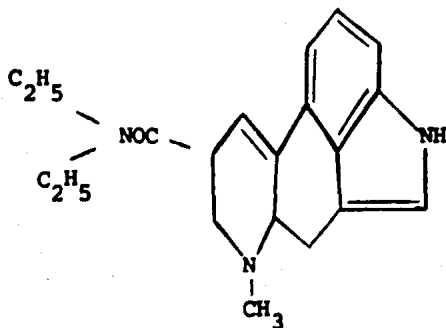
En general los alcaloides son aminas cíclicas, bases ópticamente activas insolubles en agua, solubles en ácidos con los que forman sales, y en disolventes orgánicos.

Dietilamida del Acido Lisérgico (LSD). Se obtiene a partir de los alcaloides del cornezuelo (*Claviceps purpurea*), hongo que se desarrolla sobre el centeno.

Su fórmula condensada es  $C_{16}H_{16}O_2N_3$ ; es un ácido monobásico, su molécula contiene la quinoleína y el indol. Es un producto hidrosoluble, sin olor ni sabor.

El LSD es una droga de potencia considerable, siendo la dosis efectiva oral en el hombre de 1 mg/Kg. El mecanismo de acción de la droga no es conocido. Upshall y Wailing (8), han encontrado que la concentración de LSD en plasma alcanza un valor máximo, 1 hora después de su administración.

La vida media del LSD en el hombre es de cerca de 175 minutos. El LSD es rápidamente absorbido desde el tracto gastrointestinal, y la vía de excreción principal es la urinaria.



LSD  
(Dietilamida del Acido Lisérgico)



#### 4. Propiedades Farmacológicas

##### a). Barbitúricos

La acción primaria de los barbitúricos es sobre el sistema nervioso central. Las consecuencias de esta acción se manifiestan como: Hipnósis y anestesia, efectos anticonvulsivos y efectos diversos.

Pueden producir un estado de depresión del sistema nervioso central parecido al sueño normal, por lo que se les denominan productos hipnóticos, en dosis menores producen un estado de somnolencia; utilizados en esta forma se denominan sedantes. Utilizados en grandes dosis -- pueden producir anestesia, intoxicación y muerte.

En los tiobarbitúricos se ha sustituido el oxígeno ureico por azufre en la posición 2. Los barbitúricos clínicamente útiles, poseen un radical alquilo y un sustituyente de alto peso molecular en el carbón 5. Si se tiene grupos alquilo en los dos átomos de nitrógeno, se obtienen compuestos convulsivantes, pero cuando tienen un solo alquilo en uno de los nitrógenos, con frecuencia aparece una mayor potencia y corta duración de la acción. Los tiobarbitúricos son de acción corta, localizándose rápidamente en el tejido adiposo.

Los barbitúricos son absorbidos rápidamente por estómago, intestino, recto, tejido subcutáneo o músculo. Ya que son productos ácidos, se emplean sus sales sódicas, cuando se administran como soluciones inyectables.

La excreción de los barbitúricos en el organismo depende de su estructura química, por ejemplo el barbital se elimina principalmente por la orina.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los barbitúricos generalmente se distribuyen en todos los tejidos y líquidos orgánicos. A grandes dosis aparecen en la leche materna, huellas en heces, sudor, atraviezan con facilidad la barrera placentaria, encontrándose en los tejidos fetales, en proteínas plasmática, cerebro, hígado, riñón, y líquido cefalorraquídeo.

#### b). Anfetaminas

Para establecer la relación entre la estructura química y acciones farmacológicas de la anfetamina se han estudiado las diferencias que existen con otros estimulantes simpatomiméticos así como con derivados de la misma anfetamina. Se ha observado que la Beta- fenil isopropilamina racémica (anfetamina) esta íntimamente ligada a su estructura química especialmente con la efedrina, la properdina, la metil anfetamina y la paredina.

La estructura de la anfetamina tiene resistencia contra la destrucción enzimática en el organismo, por esto es eficaz administrada por vía oral, sus efectos son prolongados y tiene la notable propiedad de estimular el sistema nervioso central.

La Beta-fenilisopropilamina existe en tres formas, por la -- presencia de un átomo asimétrico en su molécula. La forma dextrógira que es aproximadamente dos veces más potente que la racémica. Lo cual se deduce de pruebas clínicas, practicadas en individuos normales y en pacientes con narcolepsia, enfermedad de Parkinson postencefálica e hipotensión postural.

La forma levógira es la menos potente de las tres, esto es de gran importancia porque los compuestos levógiros generalmente poseen mucha mayor actividad farmacológica que los dextroisómeros y racémicos.

La anfetamina tiene la propiedad de estimular los órganos efectores inervados por los nervios adrenérgicos, por lo que se observa elevación de la presión sanguínea, constricción de los vasos periféricos, estimulación del miocardio, relajamiento de los músculos bronquiales e intestinales, dilatación de la pupila, además de estimular el eje crebroespinal.

#### c). Alkaloides del Opio

Los dos grupos hidroxilo en la molécula de morfina, un fenólico y otro alcohólico, tienen mucha importancia ya que algunos derivados de la morfina se obtienen por simples modificaciones de uno o de ambos.

Por ejemplo, la codeína es la metil morfina, con sustitución - en el hidroxilo fenólico. La heroína es la diacetil morfina.

La acción de la morfina es en el sistema nervioso central, en donde datos recientes indican la existencia de un receptor específico.

Dietilamida del Acido Lisérgico, LSD. No se conoce dependencia física para este producto. Sin embargo rápidamente se desarrolla tolerancia, que también se pierde con rapidez después de interrumpir la administración del LSD.

La dosis inicial usual de 200 a 400 µg suele elevarse hasta varios miles de microgramos, después de unos pocos días de empleo continuo.

Su acción es sobre el sistema nervioso central.

Algunos investigadores opinan que el LSD puede ser útil como agente psicoterápico, si se administra en condiciones estrictamente controladas.

El LSD suele tomarse oralmente, sin embargo, a veces se inyecta, solo o en combinación con otros medicamentos. También se absorbe por los pulmones cuando se fuma marihuana mojada en solución de LSD.

## 5. Acción Toxicológica

### a). Barbitúricos

Producen dependencia física intensa, el individuo puede parecer normal con las dosis usuales. Hay un margen muy estrecho entre las dosis necesaria para evitar síntomas de supresión y la dosis tóxica, por lo que este margen fácilmente se sobrepasa, y la persona parece borracha, con somnolencia, ataxia, palabra furfullante y nistagmo con la mirada --

lateral, dimensiones y reacciones pupilares normales.

La causa de la muerte en la intoxicación barbitúrica aguda es indudablemente el paro respiratorio a consecuencia de depresión del centro de la respiración. Si la dosis ingerida no es mortal, o la absorción por el tubo digestivo se retrasa, el individuo puede sobrevivir horas o días. En estas condiciones muchas veces esta en coma, respira lentamente, y su piel y mucosas están cianóticas; diversos reflejos están disminuídos o ausentes. La temperatura corporal está baja, la presión arterial puede estar disminuída.

Aunque la depresión respiratoria es la causa primaria de muerte, existen otros factores que pueden contribuir, si es que no sucumbe en las primeras horas. Estos factores son trastornos de la circulación, neumonía hipostática y quizá otros mecanismos desconocidos pueden causar la muerte incluso asegurando un aporte adecuado de oxígeno.

Durante años se había dicho, que el hábito crónico de tomar barbitúricos era problema sin importancia si se comparaba con el uso crónico de los narcóticos. Ahora se acepta que la administración crónica de dosis elevadas de barbitúricos origina síntomas graves de supresión. Las manifestaciones de supresión incluye ansiedad, temblores, a veces fenómenos convulsivos y deseo vehemente de la droga, en este caso el barbitúrico.

b). Anfetamina

En estudio sobre los efectos psíquicos de las anfetaminas, las

respuestas dependen de la dosis, estado mental y la personalidad del paciente. Así, con la administración oral de 10 a 30 mg. de la misma, los resultados observados son: insomnio, vivacidad, aumento de iniciativa, - aumento de la confianza, euforia, júbilo, aumento de la actividad motora y del lenguaje, del poder de concentración, de la elevación del ánimo y disminución de la fatiga. Fortalecen al individuo para un mayor período de esfuerzo mental, pero no aumenta la eficacia.

Todos los efectos anteriores no son siempre los mismo, porque la acción benéfica o placentera puede intervenir en las dosis excesivas - o la medicación repetida. Muchos pacientes experimentan cefalea, palpitación, mareo, trastornos vasomotores, agitación, confusión, disforia, -- aprensión, delirio, depresión o fatiga. La dosis elevadas casi siempre van seguidas de fatiga y depresión mental por lo que existe grave peligro con el uso indiscriminado del medicamento.

Las anfetaminas suelen emplearse en forma inadecuada por estudiantes, amas de casa, conductores de camiones y personal que trabaja en las noches y toma este producto por largo tiempo. Las recetas de anfetaminas proporcionadas en forma liberal por médicos para tratamientos dietéticos han contribuido mucho al abuso de estos productos.

El uso prolongado de anfetaminas se acompaña de efectos indeseables y potencialmente peligrosos. Las dosis elevadas de anfetaminas - disminuyen la agudeza mental y perturban la ejecución de actos complejos, incluso en ausencia de fatiga. La conducta puede resultar irracional, un fenómeno peculiar en los que toman anfetaminas en exceso es la situación

que se describe como de "atrasado", el consumidor puede tener una conducta repetitiva.

La administración de anfetaminas en grandes dosis puede causar lesión cerebral.

Algunos toxicómanos una vez desarrollada la tolerancia pueden inyectarse varios centenares de miligramos de anfetaminas en pocas horas. Se ha señalado una dosis total de más de 10 g de anfetaminas en 24 horas.

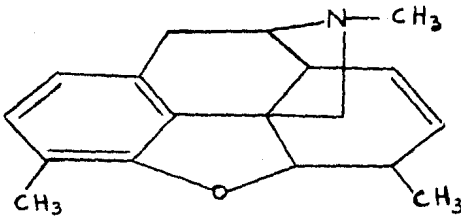
c). Alcaloide del Opio

Produce dependencia física intensa, tolerancia, analgesia, -- eventualmente con depresión del sensorio, el individuo puede estar alerta y parecer normal, con dosis muy fuertes presentan depresión respiratoria.

Cuando se administra la morfina a una persona normal en cantidades de 10 a 15 mg por vía subcutánea, puede que produzcan somnolencia y euforia, o ansiedad y náusea. El individuo puede dormirse, su respiración se vuelve lenta y sus pupilas se contraen.

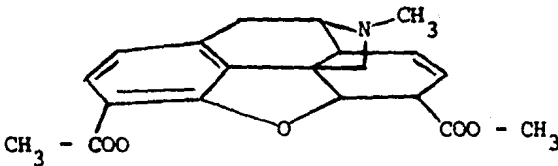
La morfina se absorbe fácilmente después de inyección subcutánea o intramuscular, se calcula que aproximadamente el 60% de la morfina inyectada, es absorbida durante los primeros treinta minutos. La absorción por el tubo digestivo es lenta; por lo que el medicamento no se administra por esta vía. Alrededor del 90% de una dosis administrada, puede recuperarse en la orina en forma conjugada.

La codeína o metilmorfina, es un analgésico y antitusivo muy importante.



En dosis terapéuticas tiene acción sedante y analgésica menor que la morfina, y produce tolerancia más lentamente y causa mucho menos adicción. También tiene menor efecto sobre las vías gastrointestinales y urinarias y sobre la pupila, y provoca menos náuseas y estreñimiento que la morfina.

La heroína o diacetilmorfina es una droga sintética, de acción muy euforizante y analgésica.



Heroína o Diacetilmorfina  
7,8 - didehidro- 4,5  $\alpha$ - epoxy - 17 - metil morfina - 3,6  $\alpha$  diolaceta-  
to (éster).

Los síntomas de abstinencia son iguales para morfina y heroína, y aparecen unas ocho horas después de la última dosis, y alcanzan el



máximo entre las 36 y 72 horas. Hay lagrimeo, rinorrea, bostezo y sudor al cabo de 8 a 12 horas. Poco después, aproximadamente a las 13 horas, puede producir un sueño inquieto. Aproximadamente a las 20 horas hay -- carne de gallina, pupilas dilatadas, agitación y pueden aparecer temblores, en los días segundo y tercero, cuando el trastorno está en su máximo, los signos y síntomas incluyen debilidad, insomnios, escalofríos, -- calambres intestinales, náuseas, vómitos, diarreas, bostezos violentos, dolores musculares en las piernas, dolor intenso en la espalda, aumento de la presión arterial y frecuencia cardíaca, sudación tensa y crisis de piel de gallina. La pérdida de líquidos durante le periodo de supresión a veces ha originado colapso cardiovascular y muerte. Durante el curso de la supresión a veces ha originado colapso cardiovascular y muerte. - Durante el curso de la supresión la administración de un opioáceo en do-- sis adecuadas suprime los síntomas en forma espectacular y restablece un estado de aparente normalidad. La duración del síndrome es de unos 7 a - 10 días.

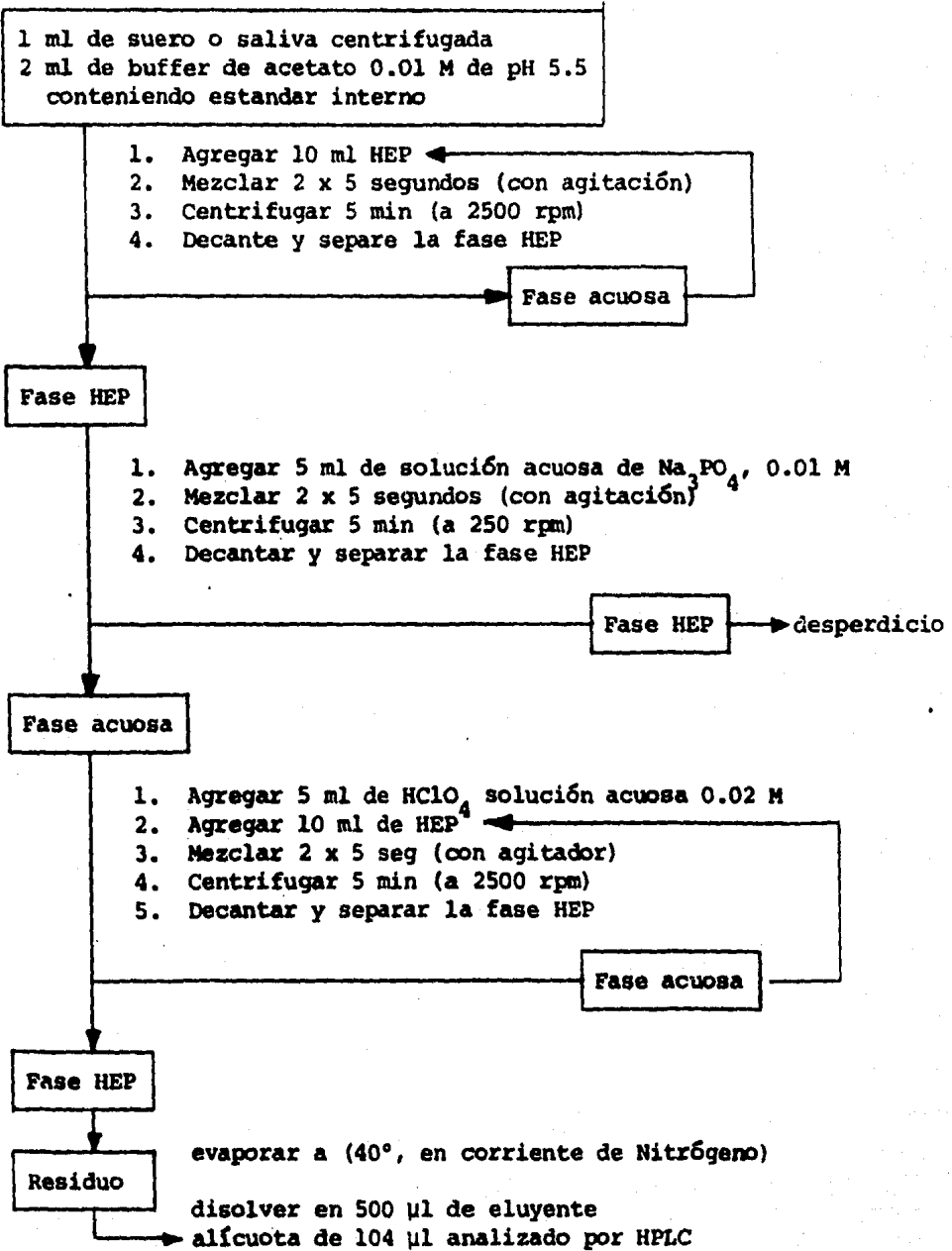
Dietilamida del Acido Lisérgico, LSD. Los efectos fisiológicos son pocos; incluyen midriásis, hiperreflexia, incoordinación muscular. Hay trastornos imprevisibles del ego, que se manifiestan por extrema labilidad de los efectos y disrupción caótica del pensamiento, peligro de conducta perturbada sin control, pupilas dilatadas que reaccionan a la luz. Se han observado crisis de gran mal después de ingerir LSD.

V. ANALISIS DE DROGAS DE ABUSO POR CROMATOGRAFIA  
LIQUIDA DE ALTA PRESION

1. Barbitúricos

Tjaden V.R. y sus colaboradores (9) han descrito un método - para analizar barbitúricos en muestras de sangre y saliva. La preparación de las muestras se hace conforme al siguiente esquema:

Esquema de la extracción de barbitúricos de suero y saliva -  
con n-hexano-dietileter-n-propanol (49:49:2).



## Experimento

Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión, equipado con un detector U.V. (Dupont), una válvula muestra de alta presión, un registrador potenciómetrico lineal y un integrador electrónico (Spectra Phisica, Autolab Sistema I).

La columna es de acero inoxidable tubo 316 con un D.I. de -- 2.8 mm y 6.35 mm D.E. y una longitud de 10 cm.

Para prevenir contaminación de la columna de separación se ins taló una precolumna (500 x 9 mm).

Los reactivos utilizados son: agua bidestilada y disolventes orgánicos de grado analítico (Merck Darmstadt G.F.R).

La metil silica (Lichrosorb S160, Merck) se trató con dimetil diclorosilano, la precolumna se empacó con silica silanizado 63 - 2000  $\mu$ m.

La columna se empacó con 0.8 g de metil silica previamente -- agregado a 5 ml, de mezcla de tetrabromoetano y cloroformo, el 2,2,4 - tri metilpentano fue entonces bombeado adentro del tubo con un alto flujo a -- 1000 bar, después eluir con 100 ml, de acetona y 100 ml de etanol para dis persar el líquido con 100 ml de eluyente.

Fase móvil: mezcla de agua y metanol.

Fase sólida: metil - silice de tamaño de partícula pequeña.

Detección UV a 205 nm.

Se inyectaron muestras con jeringas de una capacidad de 13.6  $\mu$ l. para las mediciones de la altura del plato teórico y de 104  $\mu$ l. para determinaciones cuantitativas en suero y saliva.

La capacidad de selectividad de los barbitúricos cromatografiados, se midió en función de el porcentaje de metanol presente en la mezcla, con agua, que se usó como fase móvil.

El comportamiento de retención de barbitúricos depende del pH; por lo tanto sería mejor utilizar una solución buffer para obtener mejor resultado. En este caso, en lugar del buffer, se utilizó solamente agua destilada.

Esta investigación demuestra que la metil silica es altamente eficiente, pueden prepararse columnas de diámetro pequeño apropiado para analizar huellas o indicios de barbitúricos. La capacidad de la metil - silica se ilustra en la Figura 3).

Ensayos anteriores demuestran que los barbitúricos, que son altamente lipofílicos, pueden ser extraídos cuantitativamente de soluciones ácidas, utilizando disolventes no polares tales como el hexano.

Para barbitúricos menos lipofílicos y sus metabolitos deberán usarse disolventes más polares como el dietil éter y el cloroformo, o mezclas de disolventes polar no polar.

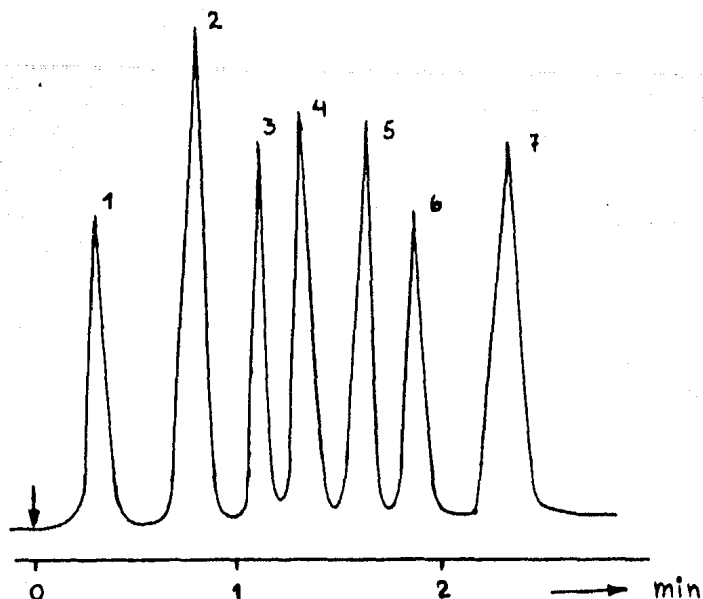


Figura 3. Separación de una mezcla de 6 barbitúricos sobre -- metil silica: Columna 100 x 2.8 mm. Eluyente: -- metanol agua (1:1). Detección UV a 205 nm. 1 = Cro<sub>2</sub> mato de Potasio; 2 = Fenobarbital; 3 = Barotal; 4 = Butobarbital; 5 = Hexobarbital; 6 = Vinylbital; 7 = secobarbital.

Por esta razón se decidió usar el HEP como el disolvente de extracción tanto de barbituratos muy lipofílicos y poco lipofílicos.

La precisión de la determinación cuantitativa de barbituratos por HPLC se investigó inyectando un volumen constante de soluciones de barbituratos de diferentes concentraciones (desde 1 - 2 µg/ml).

La Figura 4 muestra la proporcionalidad del área de cada señal con respecto a la cantidad inyectada de hexobarbital medida en el intervalo de 20 a 5000 ng. Las líneas incompletas muestran los límites de confianza para  $\pm 3$  veces la desviación estándar (99.7% de confiabilidad)'

La desviación estándar relativa es 0.3% para 50 g/ml, 3% para 5 g/ml, y 15% para 0.05 g/ml. La sensibilidad de todo el sistema definida como la pendiente de la curva del área del pico contra la cantidad inyectada del compuesto (hexobarbital), expresada en unidades de integración (U.I.), en 5.18 v/seg/ng, calculados por regresión lineal. La linealidad de la calibración de la gráfica es caracterizada por el coeficiente de correlación, que fue determinado ser 0.99984 indicando la muy alta linealidad.

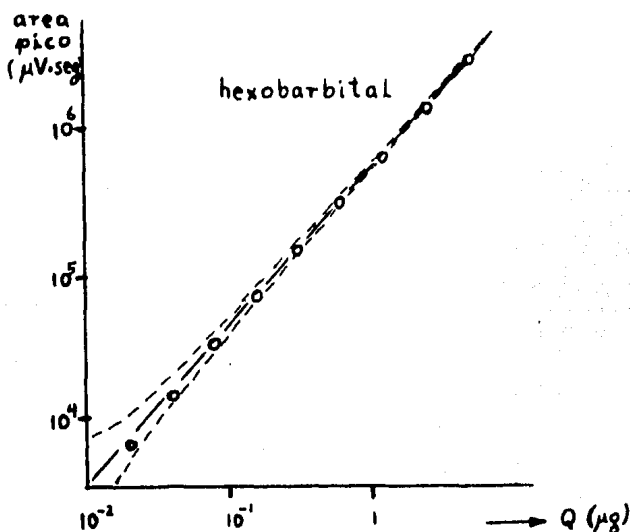


Figura 4. Linealidad y precisión. Las líneas discontinuas muestran 3X la desviación estándar.  $Y = 5.18 \cdot 10^5 \cdot X \cdot 6.20 \cdot 10^{-3}$ , donde X = cantidad inyectada ( $\mu\text{g}$ ), Y = área del pico.

La desviación estándar de la línea base, medida durante el mismo período de tiempo como el pico integral, fue 385  $\mu\text{V} \cdot \text{seg}$ , correspondiente a casi 0.8 ng. de hexobarbital. El límite de detección de hexobarbital para una señal notable conocida de 3 es cercana a 2.4 ng. El rendimiento y reproducibilidad del procedimiento de extracción fueron

probados por extracción de cantidades conocidas de barbituratos de diferente lipofilicidad agregar agua destilada y un blanco de suero. La recuperación de el hexobarbital altamente lipofílico y secobarbital para ambos agua y suero rangos de 90 a 95%. Para el fenobarbital menos lipofílico, una recuperación más pequeña (agua 70% y suero 50%) se encontró.

La reproducibilidad en todas las extracciones fue de cerca a 3% en 10 g/ml y 10% en 1 µg/ml, indicando que la precisión de la determinación total es principalmente determinada por la extracción, Figura 5 muestra la separación de 6 barbitúricos ampliamente usados (300 ng, de cada uno), agregar a el blanco de suero y extraerlo como se describió -- anteriormente.

Para eliminar posibles errores durante la extracción, uno de estos barbitúricos pueden ser seleccionados como un estándar interno para la determinación de los otros.

Transcurso del tiempo de hexobarbital en sangre y saliva después de la administración oral.

Las Figuras 6 y 7, muestran los cromatogramas de los extractos de muestras de suero y saliva, respectivamente, del mismo sujeto se muestran en Figura 8 y concuerda también con los resultados obtenidos por otros trabajos en experimentos similares (10) usando cromatografía de gas. De figuras 6 y 7 puede verse que la determinación de metabolitos, los cuales son esperados en el cromatograma anterior de los barbitúricos, es impedido por interferencia de compuestos presentes en el extracto.



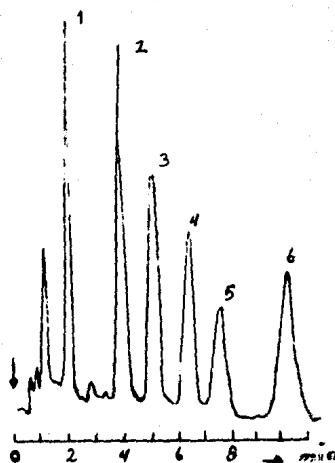


Figura 5. Análisis de seis barbitúricos extraídos de suero. Inyección: 104  $\mu$ l de 500  $\mu$ l de una solución obtenida de 1 ml de suero, a el cual fue agregado -- 1.5  $\mu$ g, de cada componente. Condiciones como en la Figura 7. 1 = Fenobarbital; 2 = ciclobarbital; 3 = Hexobarbital; 4 = Heptabarbital; 5 = Amobarbital; 6 = Secobarbital.

Para examinar el método con muestras naturales, sangre y saliva de hombre fueron examinadas después de la administración oral de -- 400 mg, de hexobarbital en cápsulas de gelatina sólida. Muestras de san gre y saliva fueron tomados aumentando los intervalos de tiempo.

De 1 ml, de suero o saliva centrifugada (5 min, a 2500 rpm), 3.5  $\mu$ g de amobarbital agregado como estándar interno y la muestra fue en tonces tratada como se describió anteriormente. El extracto fue analiza do por HPLC.

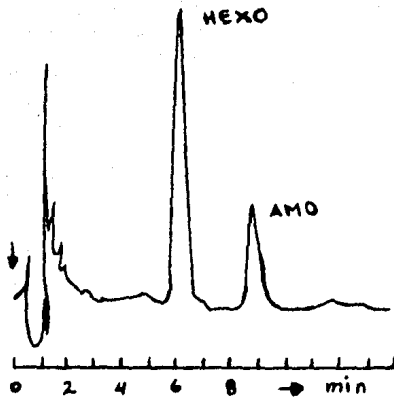


Figura 6. Cromatograma de un extracto de suero de hombre después de la administración oral de 400 mg de hexobarbital en cápsulas de gelatina sólida. - Muestras tomadas 6 horas después de la administración. Condiciones: Columna, 100 x 2.8 mm; empaque, metil silica; eluyente, metanol- agua (2;3) pico correspondiente a hexobarbital 160 ng; Amobarbital a 700 ng.

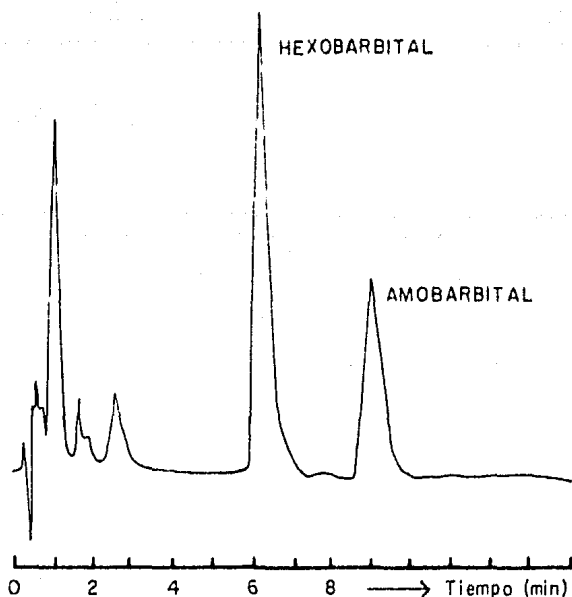


Figura 7. Cromatograma de un extracto de saliva de hombre después de la administración oral de 400 mg de hexobarbital en cápsulas de gelatina sólida. Muestras tomadas 2.5 horas después de la administración. Columna 100 x 2.8 mm; empaque metil silica; eluyente metanol-agua (2:3); detección U.V. a 205 nm. El pico de hexobarbital correspondiente a 140 ng; amobarbital pico correspondiente a 700 ng.

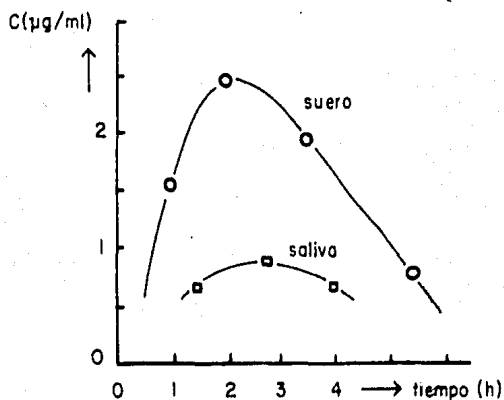


Figura 8. Curvas de concentración de hexobarbital en suero y saliva de un sujeto después de la administración oral de 400 mg de hexobarbital en cápsulas de gelatina sólida.

Dixon P. F. y Stoll M. S. (11) describen un método para la -  
determinación de barbitúricos por HPLC. Emplean la técnica de cromato--  
grafía de adsorción en fase inversa.

### Experimento

El proceso de extracción de barbitúricos consta de las si---  
guientes etapas, similar al de CG.

1. Extraer 1 ml. de suero con 2 ml. de cloroformo con ligera y suave rotación por 5 min.
2. Extraer 1 ml de la mezcla de estándar acuoso y procesarlo para lelamente para identificación y cuantificación.
3. Centrifugar y quitar 1 ml. de la capa inferior.
4. Evaporar, redissolver en 0.1 ml. de metanol acuoso al 60%.
5. Inyectar 10  $\mu$ l. dentro de la columna con C<sub>18</sub> Porasil, metanol acuoso al 60% a una presión de 900 psi. con detección a 200 nm. los resultados se muestran en la Figura 9, muestra un ejemplo - de los resultados alcanzados. Dos diferentes blancos de suero fueron extraídos y cromatografiados seguidos por los mismos sueros adicionados con cantidades de 1 mg/100 ml. de fenobarbitona y butobarbitona.

Se utilizó un cromatógrafo Waters Associates con bomba de presión máxima de 1000 psi, columna de acero inoxidable empacada con sílica, el detector fue un espectrofotómetro, ajustado con un flujo de 8  $\mu$ l y una celda de 1 cm. de espesor.

Longitud de onda fue continuamente variable de 200 a 450 nm.  
Se utilizó un registrador Perkin-Elmer. Como disolvente se usó metanol  
acuoso.

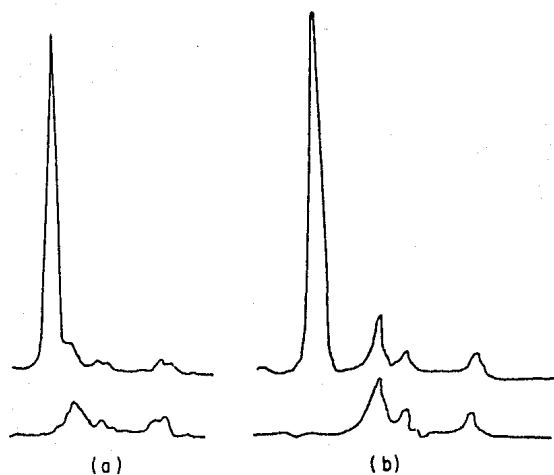


Figura 9. Cromatograma de dos sueros blancos con y sin fenobarbitona, 1 mg/ 100 ml (a) y butobarbitona, -- 1 mg/100 ml. (b).

Los resultados de las primeras separaciones de barbitúricos -  
por este método se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5

SEPARACION DE ALGUNOS BARBITURICOS POR LOS SISTEMAS DE FASE  
 INVERSA: EN SILICA DE ADSORCIÓN Y SILICA ENLAZADA - C<sub>18</sub>

	Corasil 1 benceno/ cloroformo 50:50	C <sub>18</sub> Corasil metanol/agua 60:40	C <sub>18</sub> Porasil metanol/agua 60:40	C <sub>18</sub> Porasil metanol/agua 50:50
	k'	k'	k'	k'
Barbitona	4.47	1.30	2.13	2.39
Phenobarbitona	3.67	1.45	2.57	3.48
Butobarbitona	3.13	1.70	3.04	5.17
Amylobarbitona	3.00	2.20	3.78	8.17
Pentobarbitona	3.00	2.20	3.78	8.17
Quinalbarbitona	2.33	2.67	4.30	10.70 .

Aunque las separaciones son buenas para cinco de las drogas - ellas serían más completas si el tamaño de partícula de empaque fuera de 10 µm como se observa en los cromatogramas siguientes Figura 10.

Aunque las separaciones son buenas para cinco de las drogas - ellas serían más completas si el tamaño de partícula de empaque fuera de 10  $\mu\text{m}$  como se observa en los cromatogramas siguientes, Figura 10.

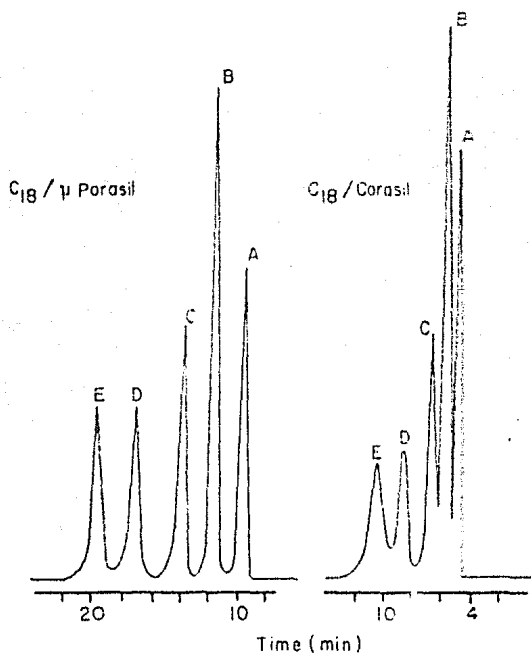


Figura 10. Separación de barbitúricos en un sistema de partición fase inversa, muestra el efecto del tamaño de partícula. A: barbitona; B: phenobarbitona; C; butobarbitona; D: amylobarbitona; E: quinalbarbitona.

El marcado incremento del volumen de retención cuando la polaridad del disolvente es ligeramente disminuída puede observarse en la misma tabla. Los isómeros amilobarbitona y pentobabitona no logran separarse por ninguno de los sistemas de fase inversa.

Se ha encontrado que los barbitúricos tienen una absorbancia máxima en metanol acuoso cerca de 216 nm, y la detección a esta longitud de onda de buena sensibilidad, la cual es todavía mayor a medida que se trabaja a menor longitud de onda como lo indican los resultados en la Figura 11.

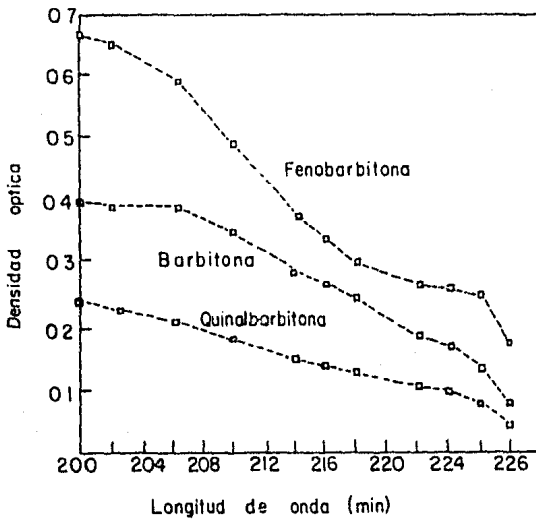


Figura 11. El efecto de detección de la longitud de onda - sobre la sensibilidad para cantidades inyectadas de fenobarbitona, barbitona, y quinalbarbitona.

La linealidad y reproducibilidad de este método se comprobó haciendo las determinaciones por triplicado y utilizando cantidades entre 10 ng a 4  $\mu$ g; siendo lineal la respuesta hasta cerca de 2  $\mu$ g, ya que por arriba de esta cantidad se obtiene una respuesta constante sobre todo para los compuestos altamente absorbentes.



La sensibilidad fue buena para cantidades del orden de 5 ng. de droga inyectada.

Una característica de la Cromatografía Líquida de Alta Presión es la facilidad y reproducibilidad con que se efectúan las inyecciones, por lo cual no se considera necesario usar estándares internos para compensar la variabilidad de la inyección. Por ejemplo cuando se hicieron tres extracciones del mismo suero del paciente que contenían pentobarbitona, las alturas de los picos tuvieron mínima diferencia como lo muestra la Figura 12.

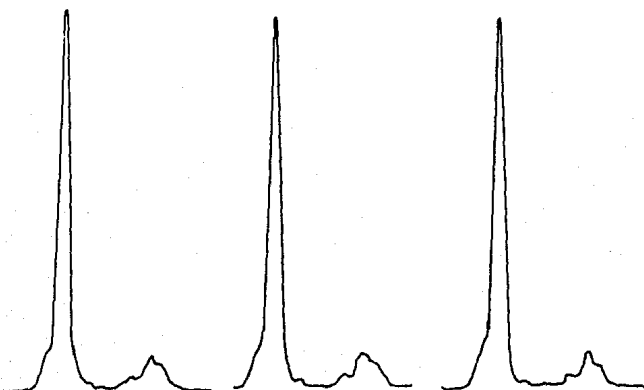


Figura 12. Cromatogramas de tres extractos de el mismo suero conteniendo pentobarbitona, muestra la reproducibilidad del método.

La recuperación de los cinco barbitúricos se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6

RECUPERACION DE BARBITURICOS DEL SUERO

Droga	% recuperación
Barbitona	68
Fenobarbitona	81
Butobarbitona	86
Amilobarbitona	ca. 100
Quinalbarbitona	90

Lurie I. (12), adaptó la cromatografía de fase inversa de partición por iónico a una columna con  $\mu$ Bondapak  $18C$ , usando varios alquil-sulfonatos como iones contrarios, para la determinación de una gran variedad de drogas de abuso por HPLC, en este caso nos referiremos a la separación de barbitúricos.

Método

Cromatógrafo de líquidos de alta presión (Waters Associate, - Inc., Milford, MA), con bomba modelo 6000 A, detector U.V. a 254 nm, modelo 440, e inyector modelo UGK, sistema integrador IVB, registrador de 10 - mV.

Columna de acero inoxidable de 4 mm de d.i. x 30 cm de longitud, empacada con  $\mu$ Bondapak  $18C$ .

Fase móvil: disolver 1.1 g de la sal de sodio del ácido 1 - heptano sulfonato en 1 l. de metanol + ácido acético glacial + agua -- (40 + 1 + 59). La molaridad final deberá ser 0.005 M a un pH de 3.5 .

Velocidad de flujo: 2 ml/min.

Inyección: de 0.25 - 0.20  $\mu$ l.

#### Procedimiento

Disolver las drogas en metanol y diluirlas a una concentración aproximada de 0.5 mg/ml. Cuando sea necesario filtrar las soluciones a través de filtros de poro de 0.45  $\mu$ m. Inyectar de 10 a 20  $\mu$ l seguidas de la inyección de la solución estandar de concentración similar. Cuantificar el ingrediente activo de la droga presente en la muestra por comparación de la altura promedio de los picos o las áreas promedio de los picos de la droga problema ante el estándar, basada en inyecciones dobles de la muestra problema y del estándar.

Los volúmenes de retención relativo de los barbitúricos estudiados se dan en la Tabla 7.

TABLA 7

VOLUMEN DE RETENCION ( $R_r$ ) DE BARBITURICOS  
RELACIONADOS AL SECOBARBITAL

Compuesto	$R_r$
Fenobarbital	0.37
Butobarbital	0.47
Amobarbital	0.78
Pentobarbital	0.78
Secobarbital	1.00 (22.2 ml)

El cromatograma representativo de esta determinación se muestran en la Figura 13.

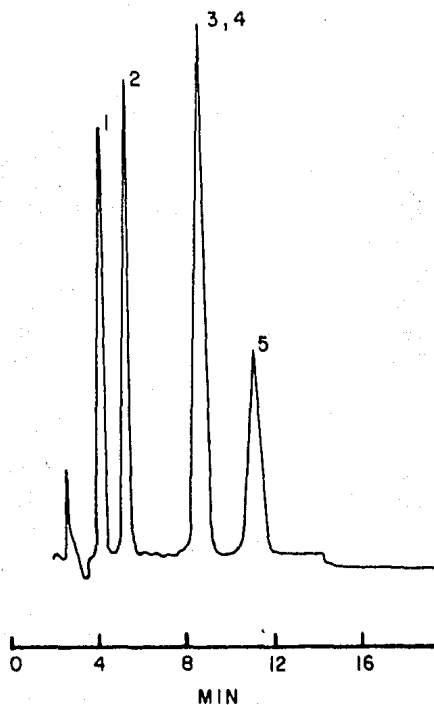


Figura 13. Cromatograma de una mezcla de barbitúricos estándares: 1, fenobarbital; 2, butobarbital; 3, amobarbital; 4, pentobarbital; 5, secobarbital.

La linealidad del método se determinó utilizando clorhidrato de metanfetamina y fenobarbital, utilizando inyecciones de 10  $\mu$ l.

Para fenobarbital, representante de drogas ácidas, fue lineal para cantidades hasta de 100  $\mu$ g por inyección. Este método es aplicable - para el análisis simultáneo de mezclas de drogas ácidas y básicas, a diferencia de otros métodos (13) que son específicos para drogas ácidas o básicas.

La técnica descrita es capaz de separar adecuadamente mezclas complejas de drogas, comunmente encontradas en forma de tabletas.

A su vez, permite el análisis directo de las sales básicas y de las sales de los ácidos débiles, porque al pH trabajado existen los ácidos libres. Ciertas combinaciones de drogas ácidas y básicas, tales como mezclas de barbitúricos y anfetaminas, podrían ser analizadas simultáneamente por este procedimiento, usando una única inyección. Generalmente, - para drogas básicas, uno no podría usar supresión iónica en HPLC en fase inversa porque resultan picos excesivamente anchos (14,15).

Los eluatos pueden ser colectados y analizados por espectrometría de masas, o por cualquier otra técnica instrumental para una identificación confirmativa.

## 2. Anfetaminas

Trinler W. A. y sus colaboradores (16) han desarrollado un método para el análisis por HPLC en fase inversa, de algunas drogas de abuso comunes como anfetamina, efedrina, fenciclidina, y de los excipientes comunes como la cafeína. Entre las enfermedades analizadas están la anfetamina propiamente dicha, la metanfetamina, la metilendioxi-3,4-anfetamina -- (MDA) y la 4-metil-2,5-dimetoxianfetamina (STP).

En este estudio se emplearon los procedimientos de adsorción y fase inversa, siendo este segundo procedimiento el que dió mejores resultados, ya que las muestras se encuentran comunmente como clorhidratos y en la cromatografía de adsorción se requiere disolver estas sales en disolventes no acuosos, lo cual no es siempre fácil.

### Experimento

El sulfato de dextroanfetamina y el clorhidrato de metanfetamina fueron obtenidos de la United States Pharmacopeial Convention Inc. El clorhidrato de efedrina de Baker grado N.F. El clorhidrato de metilendioxi-anfetamina de Terre Haute Police Department.

La cafeína de Merck U.S.P., todas las drogas se utilizaron como fueron proporcionadas o sea sin nueva purificación.

Las soluciones de las drogas estándares fueron del orden de -- 0.25 - 1.0 mg/ml, que fueron preparadas en acetonitrilo/agua (con 0.1% de carbonato de amonio) o metanol/cloroformo (con 0.1% de dietilamina).

El carbonato de amonio y la dietilamina se utilizaron para -- convertir los clorhidratos de las drogas en sus correspondientes bases libres antes de inyectarse al cromatógrafo. El acetonitrilo, el cloroformo y el metanol fueron utilizados sin purificar. El dioxano se purificó por el método Oglukian (etapas 1, 2, y 3) como lo describen Riddick y Bunger - (17). La dietilamina fue redestilada antes de usarse. El carbonato de -- amonio utilizado fue de alta pureza.

Se utilizó un cromatógrafo para líquidos de Water Associa-- tes ALC 202/401.

Las columnas fueron de acero inoxidable, empacadas con Cora-- sil II, Bondapak Fenil/Corasil o Bondapak C<sub>18</sub>/Corasil (Water Associates).

Se utilizó un detector U.V. a 254 nm; y una jeringa de preci-- sión de 0 - 25 µl de capacidad; Sampling Corp. Series C-210.

Se usó un espectrofotómetro registrador Beckman DBG.

### Resultados

Para el sistema de fase inversa las columnas Bondapak C<sub>18</sub>/ Corasil y Fenil/Corasil fueron tratadas con diferentes fases móviles.

Los resultados preliminares indican que la resolución y la se-- paración de todas las drogas estudiadas, fueron superiores en la columna - empacada con Fenil/Corasil; los experimentos sobre C<sub>18</sub>/Corasil fueron dis-- contínuos y solamente se reportan los resultados obtenidos sobre Fenil/Co-- rasil.

Todas las drogas analizadas en fase inversa se disolvieron en una mezcla de acetonitrilo/agua 50/50 v/v con 0.1% en peso de carbonato de amonio.

Los tiempos de retención fueron medidos como una función de la composición de la fase móvil para las mezclas acetonitrilo/agua y como se esperaba, los tiempos de retención disminuyeron cuando el contenido de -- acetonitrilo fue incrementado, esto fue anotado para todas las drogas analizadas. Para la mayoría de las drogas, la composición 50/50 v/v condujo a una mejor separación, como lo muestra la Figura 14.

Sin embargo, las sales de MDA, la anfetamina y la efedrina -- tienen el mismo valor de  $t_r$ . La MDA puede ser separada de la anfetamina y efedrina incrementando el contenido de agua a 15/85 de la mezcla acetoni-- trilo/agua, como se observa en la Figura 15.



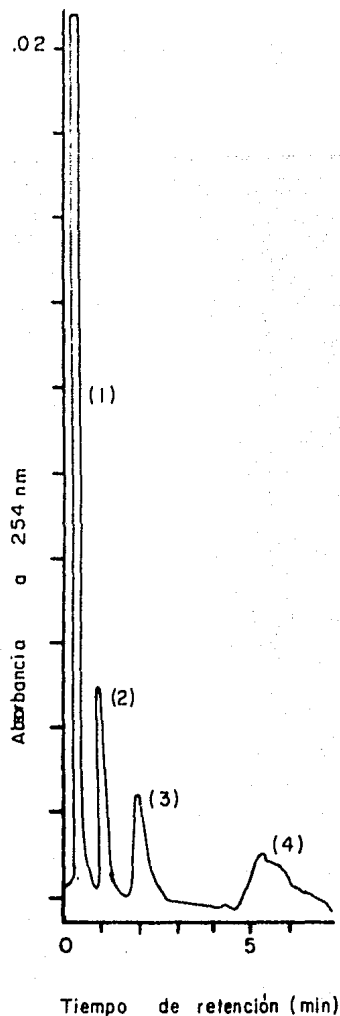


Figura 14. Cromatograma de una muestra de anfetamina (2), cafeína (1), y fenciclidina (4) en 50/50 de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ . La columna empaquetada con Fenil Bondapak/Corasil. La fase móvil fue 50/50 de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  con 0.1% por peso de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Velocidad de flujo 3 ml/min. La inyección fue de  $10 \mu\text{l}$  en una concentración de 1 -- mg/ml para cada componente.

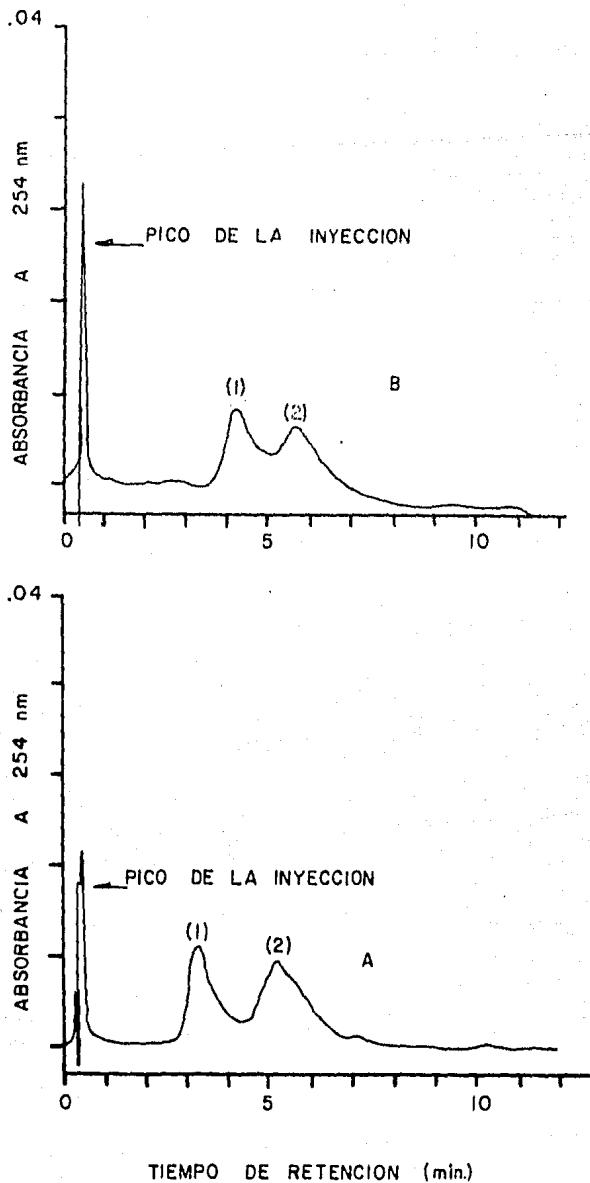


Figura 15. Cromatograma A, una muestra de efedrina (1) y (2) - MDA; y B, una muestra de (1) anfetamina y (2) MDA, en 50/50 de  $\text{CH}_3\text{CH}/\text{H}_2$ . Empaque de la columna Fenil - Bondapak/Coasil. Fase móvil  $\text{CH}_3\text{CH}/\text{H}_2\text{O}$  15/85 con 0.1% por peso de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Velocidad de flujo -- 3 ml/min. La inyección fue de 10  $\mu\text{l}$  a una concentración de 1 mg/ml de cada componente.

La anfetamina y efedrina no se pueden resolver con este sistema de fase inversa, pero sí con un sistema de adsorción como se describe más adelante.

Otras fases móviles ensayadas, por fase inversa, fueron mezclas de metanol/agua, dioxano/agua y dioxano/acetonitrilo/agua. Aunque cada uno de estos sistemas fue capaz de separar anfetamina de MDA, la resolución no fue mejor que la obtenida con la mezcla acetonitrilo/agua -- 15/85; es decir, una resolución de aproximadamente 0.8 - 1.0 (estudiada a partir de la resolución de las curvas estándares). Estos resultados se resumen en la Tabla 8.

TABLA 8

TIEMPOS DE RETENCION EN SEGUNDOS POR SISTEMAS DE FASE INVERSA

Composición v/v de la fase móvil y velocidad de flujo	Cafeína	Efedrina	Anfetamina	MDA	Metil-anfetamina	Fenciclidina
50/50 CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 3 ml/min	23	72	73	73	160	210
15/85 CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O 3 ml/min	np	200	210	330	np	np
15/85 Dioxano/H <sub>2</sub> O 2 ml/min	35	np	135	200	np	np
15/1/84 Dioxano/CH <sub>3</sub> CN/ H <sub>2</sub> O 3 ml/min	np	np	120	170	270	ne
30/70 Metanol/H <sub>2</sub> O 3 ml/min	np	np	225	350	np	np

Los resultados para el sistema de adsorción son los siguientes:

Todas las drogas analizadas en este sistema, fueron destiladas en cualesquiera de las siguientes mezclas: cloroformo/metanol 50/50 ó 90/10 con 0.1% en peso de dietilamina.

Con mezclas de cloroformo/etanol 99/1, 90/10, y 80/20, con 0.1% en peso de dietilamina sobre Corasil II, fueron separadas varias series de éstas drogas, pero fue difícil la resolución entre MDA y la anfetamina. Sin embargo, la efedrina y la anfetamina que no pudieron separarse por el sistema de fase inversa, fueron bien resueltas sobre Corasil II, como se muestra en la Figura 16.

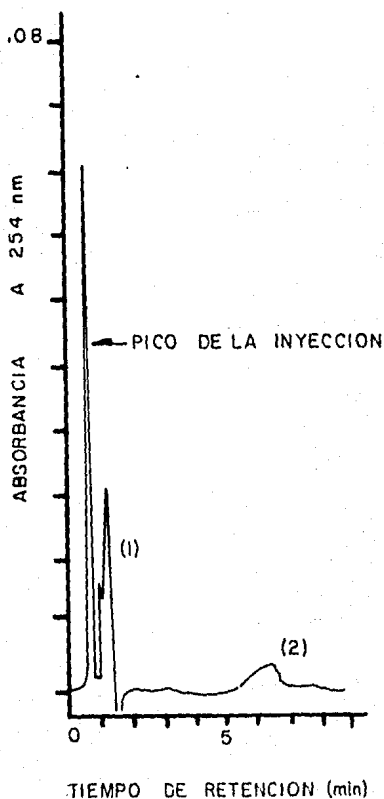


Figura 16. Cromatograma de una muestra de (1) anfetamina y (2) efedrina en 90/10 -  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ . La columna empaquetada con Clorasil II. La fase móvil fue 99/1 de  $\text{CHCl}_3/\text{OH}$  con 0.1% en peso de dietilamina. Velocidad de flujo 2 ml/min. La muestra inyectada fue de 10  $\mu\text{l}$  a una concentración de 1 mg/ml de cada componente.

os resultados correspondientes se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

TIEMPOS DE RETENCION EN SEGUNDOS POR EL SISTEMA DE ADSORCION

Fase móvil composición v/v CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH y velocidad de flujo	Cafeína	Anfetamina	MDA	Metil- anfetamina	Efedrina
99/1 2 ml/min	38	55	55	70	215
90/10 1 ml/min	70	80	80	np	160
80/20	66	80	80	np	130

np = no probada

Mezclas de cloroformo/dioxano 90/10 y 95/5 con 0.1% de dietilamina pudieron separar la MDA de la anfetamina. Sin embargo, debido a la poca solubilidad de las sales en estas mezclas, las drogas fueron disueltas en una mezcla cloroformo/metanol.

En resumen una mezcla de acetonitrilo/agua 50/50 sobre Bondapak Fenil/Corasil provee un sistema apropiado para la mayor separación de las drogas analizadas.

La anfetamina, la MDA y la efedrina no se resuelve bajo estas condiciones. Una mezcla de acetonitrilo/agua 15/85 logra separar la MDA de la anfetamina y efedrina, las dos últimas pueden separarse sobre una columna de Corasil II con una fase móvil de cloroformo/metanol 99/1.

B.B. Wheals (18) observó la importancia que tiene el empaque de la columna para la eficiencia en la separación de un determinado compuesto, en este caso, anfetaminas. Por ejemplo, micropartículas de sílice químicamente modificadas con octadecilclorosilano proporcionan diferentes cargas orgánicas, como puede verse en la Tabla 10.

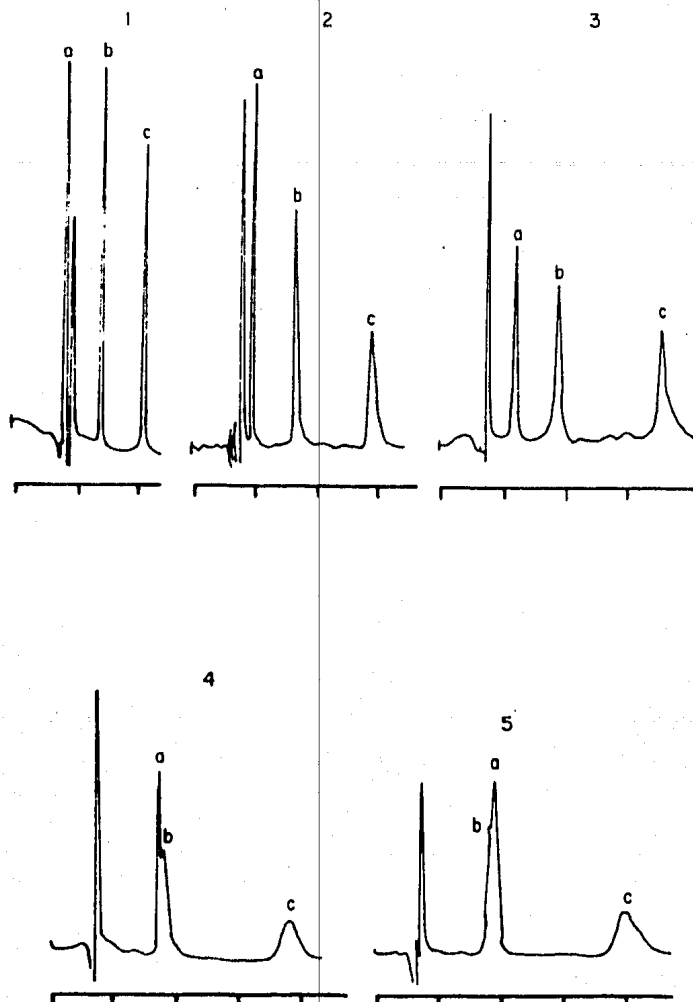
TABLA 10

NIVELES DE CARGA ORGANICA SOBRE SILICE MODIFICADO CON OCTADECILCLOROSILANO (ODS)

Empaque	Disolvente	Temperatura de reacción (°C)	Peso perdido a 600 x 100 Pesos residual
A	Hexano	20	12.0
B	Hexano	69	16.8
C	Isooctano	99	30.7
D	Xileno	139	32.5

Las muestras analizadas, fueron las siguientes preparaciones farmacéuticas: benzoanfetamina, anfetamina y metilanfetamina.

En las Figura 17 se muestran los cromatogramas obtenidos en la separación de (a) benzoanfetamina (b) anfetamina y (c) metilanfetamina, sobre sílice y sílice modificado con ODS, con las diferentes cargas orgánicas mostradas en la Tabla 11, para su comparación y así poder realizar una elección posterior adecuada.



**Figura 17.** Separación de drogas básicas sobre Prtisol 5 y Partisol 5-ODS-modificado con diferentes cargas de ODS. Columna de 25 cm x 4.9 mm d.i. Sistema disolvente, metanol-hidróxido de amonio 2N-nitrato de amonio -- 1N (27:2:1); velocidad de flujo 1 ml/min; presión - 1000, 1000, 1100, 1300, 1500 psi, para 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; detector UV a 254 nm; escala de tiempo marcada en intervalos de 5 min. a = benzoamphetamine; b = amphetamine; c = methamphetamine.

Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 11.

TABLA 11

VARIACION DEL FACTOR DE CAPACIDAD  $k'$  COMO UNA  
FUNCION DE LA CARGA DEL ODS

Empaque	$k'$		
	Benzoanfetamina	Anfetamina	Metilamfetamina
Sílice	0	0.7	1.6
A	0.3	1.3	2.8
B	0.3	1.5	3.7
C	1.4	1.5	4.1
D	2.0	1.7	5.1

Puede observarse que tales compuestos pueden ser separados - muy eficazmente sobre sílice usando como disolvente metanol acuoso en -- solución amortiguadora.

Los autores recomiendan que deben evitarse las separaciones - de éstas drogas básicas, en fase inversa, ya que se obtienen picos exce-- sivamente anchos, sobre el sílice modificado con octadecilclorosilano.

Estudios sobre sílice modificado con ODS disponible comercial mente, también mostró que la eficiencia de la columna fue particularmente mala para drogas básicas, disminuyendo por ésto su utilidad.

Cashman y colaboradores (19), estudiaron la HPLC de estos com puestos sobre DA-X<sub>4</sub>, que es una resina de fuerte intercambio aniónico, y



mostró que bajo condiciones isocráticas fué posible obtener buenas separaciones en disolventes tanto ácidos como básicos. El también estudió la separación basada en la adsorción sobre Corasil II (que es una sílice peculiar) y concluyó alcanzar separaciones comparables a las obtenidas en el sistema de intercambio iónico si usara una elución en gradiente. De nuevo nosotros encontramos que las separaciones sobre sílice usando como disolventes soluciones amortiguadas de metanol acuoso fue el más útil. -- Las condiciones cromatográficas usadas para los alcaloides del opio son también capaces de separar las feniletilaminas de abusc más comunes y mezclas ilícitas adulteradas. Los cromatogramas pueden ser usados para análisis cualitativos y cuantitativos y la separación puede ser hecha sin un procedimiento preeliminar de extracción si fuera requerido.

Randall C. C. y sus colaboradores (20) han estudiado por HPLC y GLC el comportamiento de algunas 4-nitrobenzamidias de anfetaminas y arilalquilaminas relacionadas, que son los compuestos derivados de las anfetaminas y arilalquilaminas correspondientes, ya que los compuestos derivados tienen una absorción mayor en el UV, con lo que se mejora su detección, pudiéndose detectar en los niveles de ng, siendo así un método útil para detectar cantidades trazas en algunas muestras que se manejan en los casos terapéuticos y subterapéuticos.

Las reacciones de derivación son rápidas, químicamente estables y se purifican por extracción.

Estas 4-nitrobenzamidias (4-NBA) fueron separadas por HPLC- en fase inversa usando un sistema de solvente isocrático.

## Experimento

Las anfetaminas son transformadas en sus correspondientes --  
4-nitrobenzamidias, de acuerdo al siguiente procedimiento general:

A una solución de la anfetamina o su sal correspondiente --  
(0.017 ml) y trietilamina (0.034 mol) se le añadieron 150 ml de tetrahi--  
drofurano gota a gota, esta mezcla puesta a reflujo durante 4 horas. El  
exceso de HCl producido fue hidrolizado por la adición de agua, y la fase  
orgánica evaporada. Al residuo se le adicionó 100 ml de cloroformo y se  
le extrajo con una solución al 10% de carbonato de potasio (3 x 50 ml), y  
después lavado con 50 ml de agua.

El cloroformo fue secado con  $MgSO_4$  y evaporado. Los produc-  
tos fueron recristalizados en solución de benceno-hexano, obteniéndose -  
finalmente sólidos cristalinos blancos, los cuales se disolvieron en meta  
no. Cantidades de 5  $\mu$ l de esta solución fueron inyectados en el cromató-  
grafo usando una jeringa de 25  $\mu$ l.

Se utilizó para estas determinaciones:

Columna de acero inoxidable de 30 cm de longitud x 6.3 mm de d.i.

Fase estacionaria: Bondapak  $C_{18}$

Fase móvil: una mezcla de 65% de agua bidestilada y 35% de aceto-  
nitrilo

Velocidad de flujo: 1.5 ml/min.

Detección: U.V. a 254 nm.

Temperatura de operación: la ambiente.

Los resultados muestran que la mezcla de derivación (4-NBA) puede ser cromatografiada directamente si la concentración de anfetamina es alta. No obstante, para concentraciones bajas de anfetamina, se requirió una concentración por medio de extracciones de la muestra, previamente derivada en su correspondiente 4-NBA.

El cromatograma obtenido es el de la Figura 18.

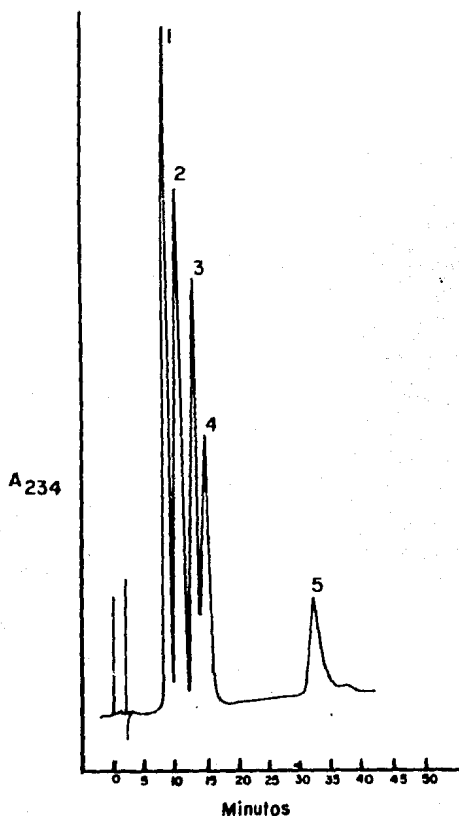


Figura 18. Elución por HPLC de los derivados arilaquil 4-NBA. Pilo (1) bencilamina, (2) feniletilamina, (3) anfetamina (4) metanfetamina, (5) n-propilamfetamina.

El tiempo de separación fue de 25 min, el cual puede reducirse usando un sistema de disolvente programado.

La aplicación cuantitativa del método fue examinada por el estudio de los rendimientos de las amidas a varias concentraciones de --amina. El rendimiento promedio de la 4-NBA fue de  $86\% \pm 3$ .

Lee Ch. M. y sus colaboradores (21) han usado un método cromatográfico empleando un sistema de gradiente, para separar en aproximadamente 30 - 40 minutos 16 drogas de abuso. Las drogas fueron fenciclidina (PCP), metadona, cocaína, tetrahidrocanabinol (THC), metanfetamina, 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina (STP), metilendioxfanfetamina (MDA), heroína, N,N-dimetiltriptamina (DMT), ácido lisérgico dietilamida (LSD), valium, -mezcalina, secobarbital, amobarbital, fenobarbital y dilantina.

Las separaciones fueron investitadas por cromatografía de adsorción sobre Corasil II o Supelcosil-ATF 230; y por cromatografía de partición.

#### Experimento

Columna de acero inoxidable de 2.3 mm de di.i. x 50 cm. de longitud

Detección: U.V. a 254 nm.

Preparación de los Disolventes:

Se recomienda que todos los disolventes sean recientemente -destilados, con el fin de quitar contaminantes que absorban en el U.V.

Preparación de la Muestra.

Los estudios estuvieron restringidos a las formas en que aparecen en el mercado: tabletas, cápsulas, etc.

Una porción de la muestra se pulverizó y se le añadió 1 ml de metanol. Esta solución se filtró, conservándose el residuo sólido.

Al filtrado se le agrega 5 ml de cloroformo y 5 ml de HCl 0.1 N. La capa clorofórmica contendrá sustancias ácidas y neutras, estas capas son colectadas y evaporadas a sequedad, este residuo es redissuelto en 100  $\mu$ l de metanol o etanol (95%), y alícuotas de esa solución se inyectan en el cromatógrafo.

A la fracción acuosa ácida se le agrega NaOH hasta un pH que este entre 10-11, y se extrae con 5 ml de cloroformo. La fase orgánica se coloca y evapora a sequedad. El residuo se redissuelve en 100  $\mu$ l de metanol (95), y alícuotas de esto se inyecta en el cromatógrafo para el análisis. Esta fracción contiene las drogas básicas.

#### Sistemas con un Solo Disolvente

(A) Fase estacionaria: Corasil II, de 37-50  $\mu$ .

Disolvente (a) 0.22% de ciclohexilamina en ciclohexano (8 gotas/100 ml).

Disolvente (b) 0.22% (8 gotas/100 ml) de ciclohexilamina y 1.5% de metanol en ciclohexano. Temperatura de operación: la ambiente.

(B) Fase estacionaria: Alúmina Woelm B 18, 18-30  $\mu$ .

Disolvente (a) 0.22% (8 gotas/100 ml) de ciclohexilamina en ciclohexano.

Disolvente (b) 0.22% (8 gotas/100 ml) de ciclohexilamina y 1.5% de metanol en ciclohexano. Temperatura de operación: la ambiente.

Velocidad de flujo en ambos sistemas: 1.45 ml/min.

Sistema en Gradiente

Fase estacionaria: Corasil II de 37-50  $\mu$ .

Disolventes: (1) 0.5% de etanol (95%), 0.25% de dioxano y 0.13% (5 gotas/100 ml) de ciclohexilamina; (2) 10% de etanol (95%), 20 % de dioxano y 1.4% de ciclohexilamina.

Preequilibrar la columna de Corasil II con el disolvente (a).

#### Calibración para Determinaciones Cuantitativas

Curvas de concentración contra respuesta del detector se obtienen fácilmente por inyección de varias cantidades ( gs/inyección) de muestra y midiendo la respuesta del detector (unidades de densidad óptica). Cada compuesto tiene un coeficiente de extinción molecular diferente, y es necesario obtener este tipo de curva patrón para cada droga, para poderla cuantificar.

#### Análisis Posterior con U.V.

El eluato de la columna conteniendo la muestra de droga se co

lecta en un vial de vidrio, el disolvente se evapora y el residuo se redissuelve en 1 ml de HCl 0.1 N. La solución se transfiere a una celda -- para medir su espectro en el U.V.

Estos investigadores eligieron explorar el método de  cromatografía de adsorción y partición, apoyados en investigaciones anteriores. Se encontró que la adsorción fue la mejor, directamente cuantificables, se pueden elegir parámetros tales como temperatura y disolvente. El incluir una amina en el sistema del disolvente, significó la obtención de mejores formas de picos, permitió más rápida elución, manteniendo una -- adecuada resolución. Se encontró que las aminas volátiles son inadecua-- das y que la composición de los disolventes cambia con el tiempo entre -- más sustituidas sean (aminas 2 aras, 3 aras).

Se encontró que la ciclohexilamina reunía las características para ser usada en todos los disolventes.

La Tabla 12 muestra los tiempos de retención relativos de varias drogas con las cuatro diferentes condiciones de disolventes y columna.

TABLA 12

TIEMPOS DE RETENCION RELATIVOS DE DROGAS REPRESENTATIVAS DE ABUSO

Drogas	Columna con Corasil II		Columna con Alúmina	
	Disolvente a	b	Disolvente a	b
Fenciclidina	0.20	0.24	0.54	0.56
Metadona	0.23	0.24	0.54	0.56
Cocaína	5.91	0.28	0.69	0.72
Tetrahidrocannabinol	1.20	0.38	1.38	1.08
Valium	1.33	0.38	3.54	1.20
Metanfetamina	2.66	0.62	2.56	2.46
STP	d	0.81	8.08	2.40
MDA	d	4.14	d	4.24
Butabarbital	d	1.48	d	d
Secobarbital	d	1.48	d	d
Amobarbital	d	1.48	d	d
Herofina	d	2.14	d	7.21
Dilantina	d	2.43	d	d
DMT	d	2.52	d	2.80
Fenobarbital	d	3.47	d	d
LSA	d	3.81	d	11.45
Mezcalina	d	6.66	d	d

d = indica que la droga no eluye de la columna dentro de los 30 minutos después de la inyección.

Las Figuras 19 y 20 muestran los cromatogramas de mezclas de drogas, demostrando la capacidad del método.



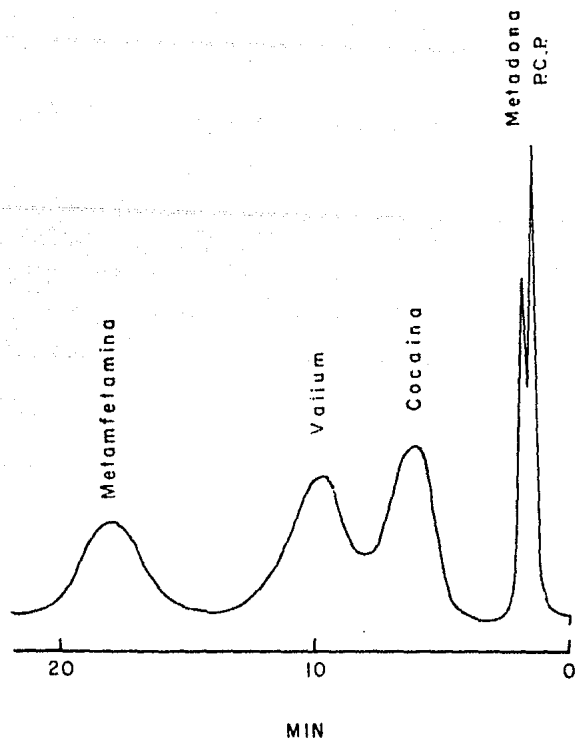


Figura 19. Separación de drogas de baja polaridad. Columna empaquetada con Corasil II, dimensiones: 50 cm de longitud x 2.3 mm de d.i. Disolvente: 0.2% de ciclohexilamina en ciclohexano. Velocidad de flujo 1.45 ml/min. Temperatura: 23°C. Tamaño de muestra: 5 µg de cada sustancia en un volumen total de inyección de 5 µl.

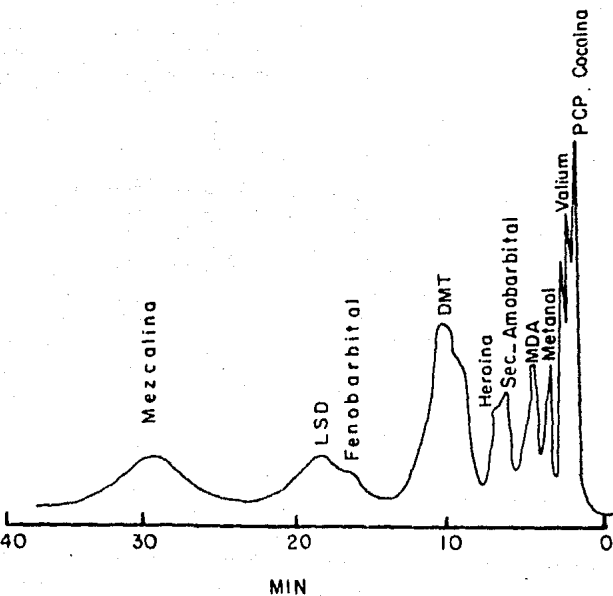


Figura 20. Separación de drogas más polares. Columna empaquetada con Corasil II, dimensiones: 50 cm de longitud x 2.3 mm de d.i. Disolvente: 1.5% de metanol y 0.2% de ciclohexilamina en ciclohexano. Velocidad de flujo 1.45 ml/min. Temperatura: 22°C. Tamaño de muestra: 5-10 µg de cada sustancia en un volumen total de inyección de 8 µl.

Se encontró la siguiente secuencia tentativa para la identificación de una droga:

Conocer primero qué tipo de droga es, usando Corasil II con el disolvente (b) y determinar su tiempo de retención e igualarlo al de una droga conocida.

Si la droga eluyera antes que el valium, puede ser reexaminada usando el disolvente (a), porque con este disolvente se obtienen mejores resoluciones de drogas con cortos tiempos de retención (drogas con baja polaridad relativamente).

Si la droga presenta un tiempo de retención relativamente -- grande y no hay seguridad de que se trate de un barbitúrico, la muestra puede ser reexaminada usando alúmina como empaque y el disolvente (b). - Los barbitúricos tienden a absorberse en este empaque básico y no eluyen de la columna en menos de 30 minutos. Es necesario obtener al menos dos tiempos de retención característicos en dos sistemas diferentes para poder identificarlas.

Cuando se cambia de disolvente, un mínimo de 15 ml del nuevo disolvente debe fluir en el sistema antes de realizarse otra inyección.

La Figura 21 demuestra como puede ser obtenida más exactitud y rápida elución si se incrementa la polaridad disolvente.

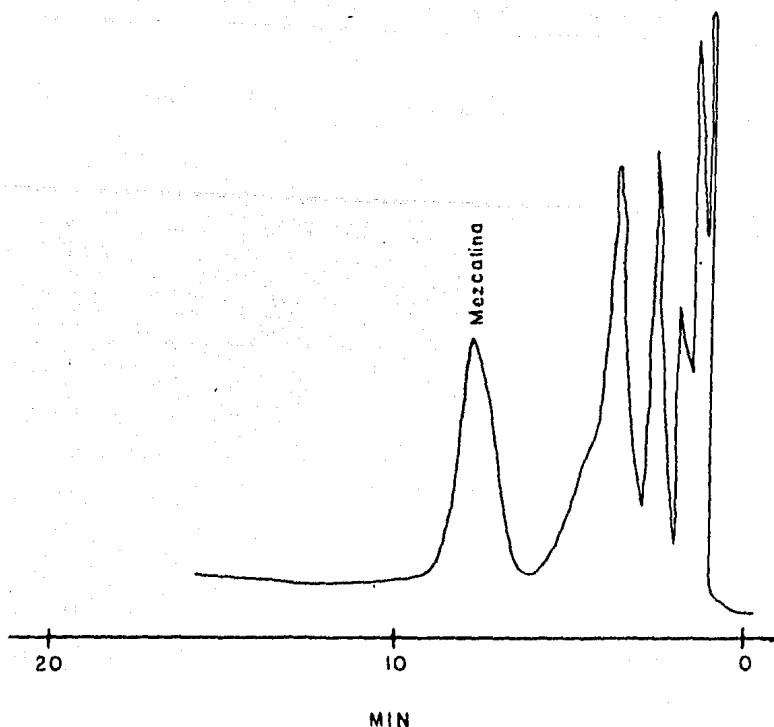


Figura 21. Rápida elución usando un disolvente polar. Columna empaquetada con Corasil II, dimensiones 50 cm de longitud x 2.3 mm de d.i. Disolvente: 4.5% de metanol, 1% de ciclohexilamina en ciclohexano. Velocidad de flujo: 1.45 ml/min. Temperatura: 23°C. - Tamaño de muestra: 5  $\mu$ g de cada sustancia en un volumen total de inyección de 5  $\mu$ l.

No obstante, se observa, hay mucha pérdida de resolución.

El sistema en gradiente es una buena técnica que cubre una gran variedad de drogas polares en períodos cortos de tiempo. Obteniéndose una mejor resolución que con cualquier sistema de disolvente simple, como puede verse en la Tabla 13 y Figura 22.

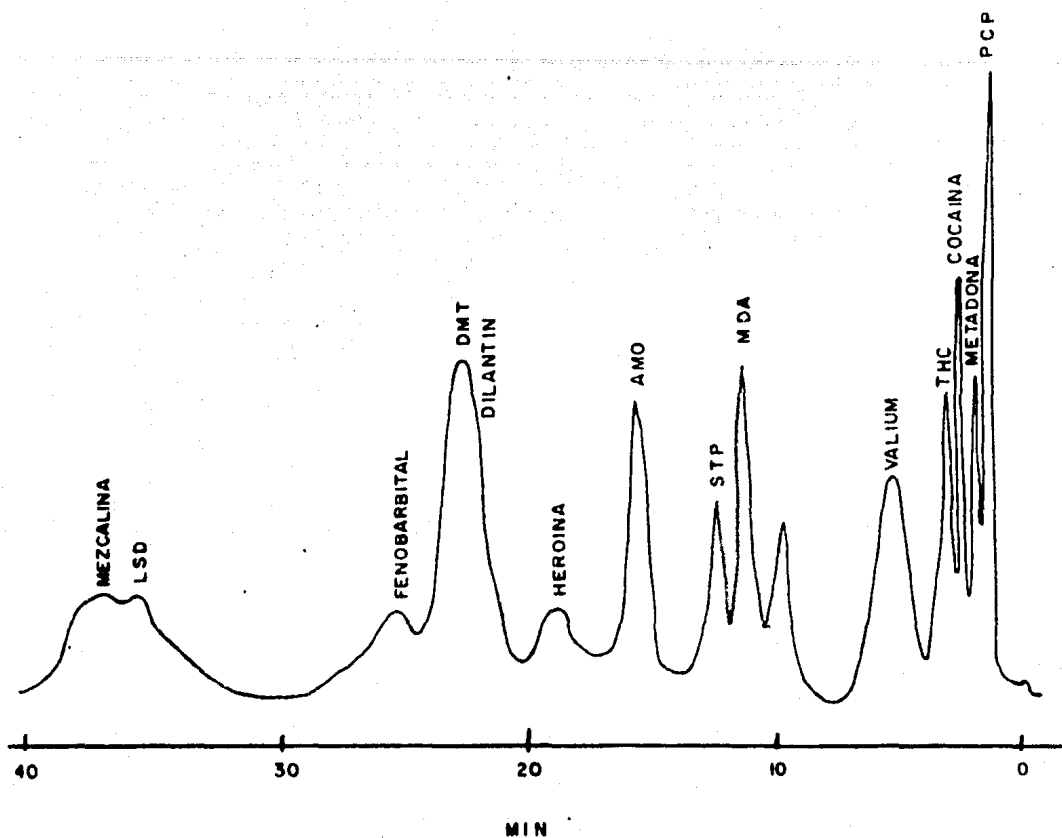


Figura 22. Elución en gradiente de drogas. Columna empaceta da con Corasil II, dimensiones: 1 m de longitud x 2.3 mm de d.i. Disolvente en gradiente: a) -- 0.5% de etanol, 1.25 de dioxano, 0.2% de ciclohexilamina en hexano; b) 10% de etanol, 20% de dioxano 1.2% de ciclohexilamina en hexano. Velocidad de flujo: 1.45 ml/min. Temperatura: 23°C. Tamaño de muestra: 5-8 µg de cada sustancia en un volumen total de 10 µl de inyección.

TABLA 13

TIEMPOS DE RETENCION RELATIVOS DE DROGAS REPRESENTATIVAS  
DE ABUSO USANDO UN SISTEMA DE ELUCION EN GRADIENTE

Droga	Tiempo de Retención
Fenciclidina	0.216
Propoxifeno	0.221
Metadona	0.27
Cocaína	0.35
Metacualona	0.37
Tetrahidrocannabinol	0.42
Valium	0.59
Hidrocarbostiril	8.86
Librium	1.02
Metanfetamina	1.11
Anfetamina	1.18
Benzocaína	1.26
2,5-dimetoxil-4-metilanfetamina	1.32
3,4-metilendioxianfetamina	1.64
Procaína	1.80
Quinina	1.84
Pentobarbital	1.86
Codeína	1.93
Amobarbital	1.95
Heroína	2.22
N,N-dimetiltriptamina	2.47
Dilantino	2.49
Fenobarbital	2.55
Estricnina	2.73
LSD	2.80
Mezcalina	3.06

La reproducibilidad no se obtiene fácilmente, como con un disolvente único.

Cambios en la composición del disolvente afectan la elución modelo de la droga a un tiempo de retención más grande, por lo que recomiendan incluir uno o más estándares con grandes tiempos de retención -- (ejemplo, fenobarbital, DMT, mezcalina, etc.) en la prueba. Para análisis de purificación encontraron adecuada una microcolumna empaquetada con Supelcosil, de dimensiones de 4.6 mm de d.i. x 1 m de longitud.

El potencial cuantitativo del método se muestra en las Figuras 23 y 24, siendo evidente que las cuantificaciones están en el intervalo - de 2 - 5  $\mu$ g.

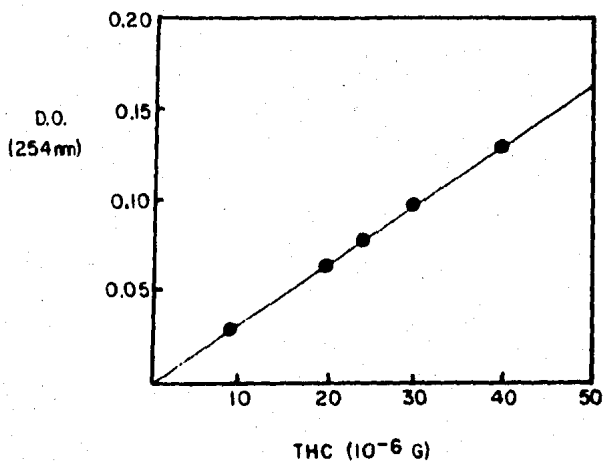


Figura 23. Cuantificación de fenciclidina.

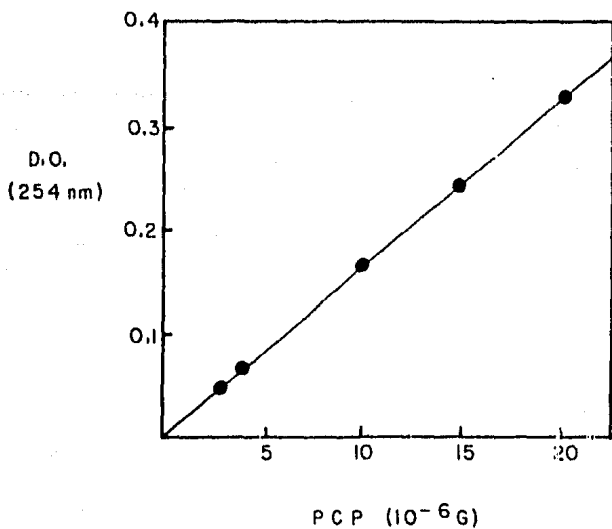


Figura 24. Cuantificación de tetrahydrocannabinol.

Por otra parte, la cromatografía par-iónico en columna  $\mu$  bondapak  $C_{18}$  en fase inversa utilizada por Lurie, I. (15) para barbitúricos, también la aplica en la separación de anfetaminas, bajo las mismas condiciones experimentales.

Los resultados para anfetaminas se dan en la Tabla 14.

TABLA 14

VOLUMEN DE RETENCION ( $R_f$ ) DE COMPUESTOS  
RELACIONADOS A LA FENTERMINA

Compuesto	$R_f$
Acetaminofen	0.28
Pemolina	0.32
Teofilina	0.34
Cafeína	0.40
Fenilpropanolamina	0.59
Efedrina	0.64
Fenmetrazina	0.78
Anfetamina	0.79
Fendimetrazina	0.80
Metanfetamina	0.86
Fentermina	1.00 (15.6 ml)
Estricnina	1.10
Metilfenidato	1.38
Tonzilamina	2.44
Difenhidramina	4.32

El cromatograma de esta separación es el de la Figura 25.



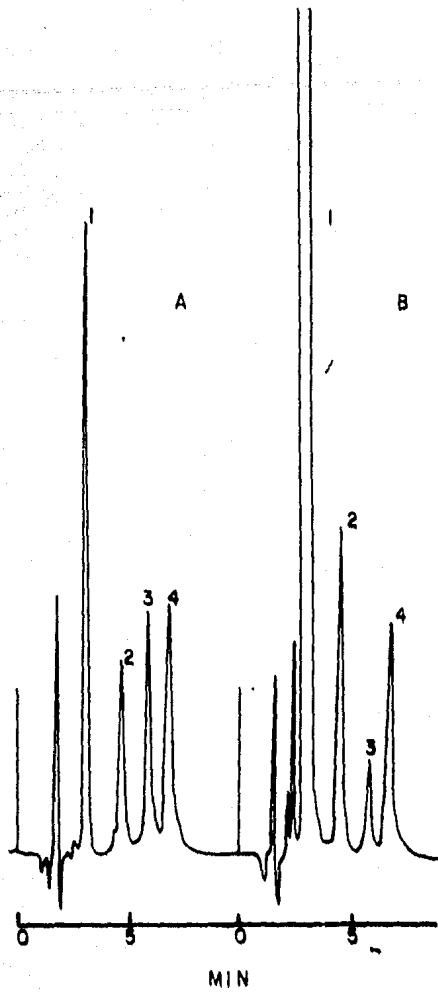


Figura 25. A cromatograma de una mezcla de drogas estándares cuyos picos representan 1, cafeína; 2, efedrina; 3, metanfetamina; 4, fentermina; y B, tabletas cuyos picos representan 1, cafeína; 2, efedrina; 3, metanfetamina; 4, fentermina.

Los estudios de la linealidad del método, para anfetaminas, - se hizo inyectando alícuotas de 10 µl.

Para metanfetamina que es una droga representativa básica, su

respuesta fue lineal de 3-100  $\mu\text{g}$ , usando un integrador. Multiplicando la altura del pico y el volumen de retención, el rango de linealidad resultante fue limitado a 1.5 - 6.5  $\mu\text{g}$ /inyección. Este cálculo manual se limita a los picos simétricos y similares.

Se observa que con altas concentraciones de anfetamina, el agente par iónico se agota, resultando un pico en forma de cola, porque representa una mezcla del complejo de metanfetamina y su sal, también hay variaciones grandes en los volúmenes de retención, observándose que estos disminuyen, debido a que es retenida menos en la columna con  $\text{C}_{18}$ .

El error relativo para metanfetamina fue determinado usando el integrador e inyectando ocho veces soluciones de metanfetamina de concentración conocida e igual a una solución estándar de metanfetamina; y fue de 0.01% y una desviación estándar de 0.96%.

### 3. Alcaloides

Enseguida se describen métodos de análisis por H.P.L.C. para alcaloides del opio, LSD y heroína.

Wittwer y Kluckhohn (22) han descrito un método de análisis por HPLC para LSD usando una columna empacada con sílice y una mezcla de eluyentes de acetonitrilo y eter di-isopropílico. Aunque el procedimiento da una buena separación del LSD con respecto a los alcaloides del ergot, se complica porque usa detección U.V., por lo que fue necesario usar una precolumna para quitar los compuestos que absorban también en el U.V., posteriormente se concentra el LSD antes de su determinación por HPLC.

La alta fluorescencia natural del LSD y la ausencia de excipientes fluorescentes en muchas preparaciones ilícitas indica que la detección fluorométrica acoplada con la HPLC ofrece buena selectividad y sensibilidad. Heacock y colaboradores (23) han hecho énfasis en lo ventajoso que es usar el detector fluorométrico, pero su sistema cromatográfico deja mucho que desear en cuanto a su resolución.

Un procedimiento simple de HPLC ha sido desarrollado (24) -- cuya separación se basa en el uso de una fase inversa, el cual se sustituye por un método de intercambio iónico que emplea sílica con CDS (25).

El procedimiento es el siguiente: una porción de la muestra se disuelve en metanol, y una alícuota de la capa sobrenadante se inyecta al cromatógrafo de HPLC,

Las dimensiones de la columna fueron: 25 cm de longitud x 4.9 mm de d.i.

Fase estacionaria: Partisil 5.

Fase móvil: metanol-carbonato de amonio al 0.3% (60:40)

Velocidad de flujo: 1 ml/min.

W.A. Trinler y D. J. Reuland (26) han demostrado como la HPLC puede utilizarse para análisis rápidos de drogas de abuso con un sistema de fase inversa, pero la separación de cocaína, heroína, metadona y morfina es inferior a la separación lograda sobre sílice, como se muestra en la Figura 26.

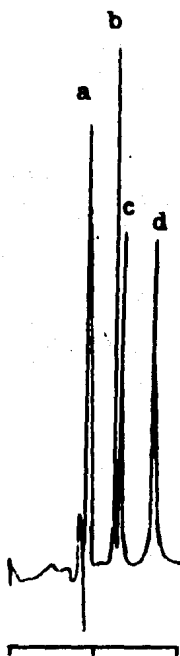


Figura 26. Separación de algunas drogas - comunes de abuso sobre sílice. Columna de 25 cm x 4.9 mm de d.i., disolvente: metanol-hidróxido de amonio 2 N-nitrato de amonio 1 N (27:2:1); velocidad de flujo: 1 ml/min; presión: 900 ps; detector: U.V. a 254 nm. a = cocaína, b= heroína, - c = metadona, d = morfina.

Detección: fluorométrica.

Bajo estas condiciones, el límite de detección del LSD es cerca de 10 ng/7ml de inyección. La intensa fluorescencia del LSD puede proporcionar bases para un análisis muy sensible por HPLC. Es necesario, no obstante, utilizar un detector que opere bajo condiciones óptimas de excitación y emisión y con una fuente de luz intensa.

Cashman y Thornton (27) han logrado la separación de morfina monoacetilmorfina y heroína sobre Porasil T usando como eluyente cloroformo-metanol. Separaciones de intercambio catiónico de algunos compuestos sobre Zipax SCX han sido logradas por Knox y Jurand (28) bajo condiciones de elución isocrática y por gradiente, y una modificación a su método se ha aplicado al análisis de preparaciones ilícitas (29).

Un sistema mejor, para separar este tipo de compuestos se basa en el uso de columnas empacadas con sílica (25). El mecanismo de separación no se entiende claramente, pero la secuencia de elución es: heroína, monoacetilmorfina y morfina. Esta secuencia es la misma que se obtiene en columnas también empacadas con sílica pero operadas en un método cromatográfico de adsorción (27), pero esto es contrario a lo encontrado en columnas empacadas con Zipax SCX (28).

B. B. Wheals (18) ha utilizado para este tipo de separaciones las siguientes condiciones experimentales: columna de 25 cm x 4.9 mm de d.i.; empaque Partisil 5; disolvente metanol-hidróxido de amonio 2 N-nitrato de amonio 1 N (27:2:1); velocidad de flujo 1 ml/min; detector U.V. a 254 y 278 nm. Bajo estas condiciones todos los alcaloides del opio elu

yeron en un tiempo aproximado de 10 minutos. Incrementando la concentración de buffer acuoso en el eluyente se favorece la elución y reduce la resolución.

Con este sistema los alcaloides presentes en el opio pueden ser rápidamente separados, aunque sólo morfina, codeína, tebaína, papaverina y narcotina estén presentes en niveles suficientemente altos para ser detectados sin concentración previa. Los cromatogramas obtenidos de diferentes muestras pueden ser usados para comparación de opio, ver Figura 27.

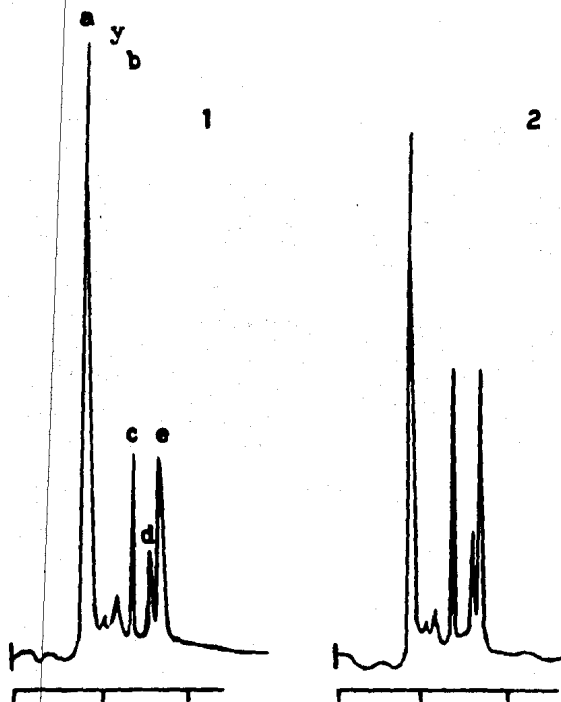


Figura 27. Separación de alcaloides del opio sobre sílica: usarlo en la comparación del opio. Columna de 25 cm x 4.9 mm de d.i. Las muestras 1 y 2 son de diferentes extractos de opio. a = papaverina, b = narcotina, c = tebaína, d = codeína, -- e = morfina.

Heroína frecuentemente encontrada en la forma llamada "heroína de la China". puede ser rápidamente separada de sus compuestos adulterantes, tales como cafeína, estricnina y quinina por el mismo método de HPLC que los alcaloides del opio. Para el análisis la muestra es solamente disuelta en la fase móvil antes de inyectarla. Inyecciones hechas antes y después de hidrólisis alcalina proporciona una simple confirmación química de la presencia de heroína, como se muestra en la Figura 28.

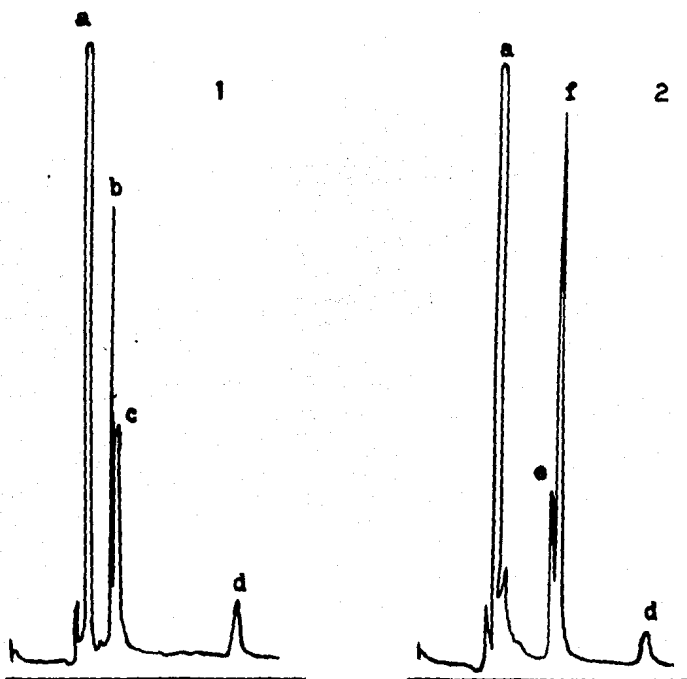


Figura 28. Análisis de una muestra de "Heróna de la China" - sobre sílica. Condiciones cromatográficas iguales a los utilizados para el análisis de los alcaloides del opio. (1): a = cafeína, b = heroína, -- c = monoacetilmorfina o monoacetilcodeína, d = estricnina, (2) la misma muestra después de haberla tratado con un álcali: 3 = codeína, f = morfina.

HPLC puede también ser usada para controlar la presencia de morfina en fluidos biológicos. Jane y Taylor (30) han desarrollado un método sensible basado en la conversión de morfina a pseudomorfina.

Siendo el compuesto posterior altamente fluorescente, el cual es separado y detectado fluorométricamente. El método es particularmente interesante por la incorporación ingeniosa de un reactivo estándar interno que compense la influencia de material extraído en la primera reacción.

Twitchett P.J. y sus colaboradores (31) han dado a conocer un método de análisis de LSD en fluidos biológicos por HPLC. Generalmente la detección de LSD en este tipo de muestras se dificulta por la baja dosis de la droga así como por un rápido metabolismo.

El método emplea un análisis preliminar por radioinmunoensayo (RIA) para eliminar muestras negativas, seguido por un análisis cuantitativo por HPLC, empleando detección fluorométrica.

Las muestras de sangre, orina y lavados estomacales empleadas para el análisis, se obtuvieron de personas que se sospechó habían ingerido LSD, desconociéndose por lo tanto, dosis ingerida y tiempo de ingestión. Tales muestras se analizaron primero por RIA para investigar la presencia de LSD o sus metabolitos.

El tartrato de LSD de referencia y otros alcaloides derivados del ergot fueron proporcionados por el laboratorio Sandox, de Inglaterra.

El esquema de análisis se ilustra en la Figura 29.



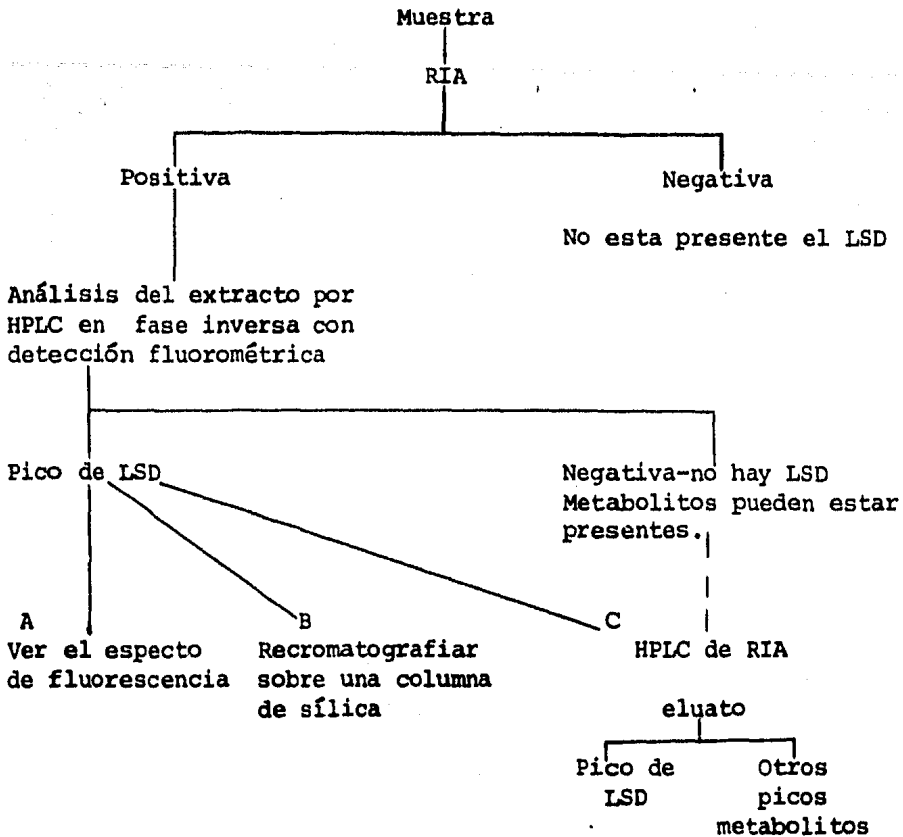


Figura 29. Secuencia del análisis para la detección del LSD en fluidos biológicos. A, B y C son procedimientos confirmatorios cuando la cantidad de muestra disponible es suficiente.

La señal del volumen de retención corregido indica la presencia de LSD, lo cual se confirmó midiendo la excitación de fluorescencia y el espectro de emisión del componente atrapado en la celda del fluorómetro. El material medido se irradió entonces con luz U.V. a 320 nm, y el espectro de fluorescencia se corrió nuevamente. La confirmación posterior para la identificación se obtuvo por cromatografía, sobre una columna de

sílica, y por fraccionamiento de una porción no extraída de la muestra - usando HPLC en fase inversa, las fracciones colectadas se examinaron individualmente por RIA.

El suero y la orina se extrajeron por el método de Axelrod - y colaboradores (32). A un volumen conocido del fluido biológico se ajusta el pH a 8.5 con NaOH 0.1 M acuoso y se satura con NaCl. La mezcla se extrae con tres volúmenes de n-heptano que contiene 2% de isopentanol, - agitando suavemente en la obscuridad en un tubo perfectamente tapado. Un volumen conocido de la capa orgánica se separa, y se evapora hasta cerca de 5 ml y se vuelve a extraer a un volumen conocido más pequeño (por -- ejemplo a 200 µl) con HCl 0.01 M.

El eluyente para la columna de la fase inversa (Spherisorb 5-ODS) consistió en metanol al 65% y fosfato ácido disódico al 35% en -- agua (0.025 M). La mezcla se ajustó a pH de 8 con ácido orto-fosfórico al 10%.

Para la columna de sílica (Spherisorb S5W) se empleó una mezcla de metanol al 60% y solución acuosa de nitrato de amonio al 40%, --- cuya molaridad fue de 0.2. La velocidad de flujo del eluyente fue de -- 1 ml/min.

Los resultados cromatográficos para 24 alcalóides del ergot y derivados del ácido lisérgico se citan en la Tabla 15.

TABLA 15

RETENCION CROMATOGRAFICA DE ALCALOIDES DEL ERGOT Y LSD

Compuesto	Retención (relativa al LSD)	
	Spherisorb 5-ODS	Spherisorb S5W
D-LSD	1.00 (4.9 ml)	1.00 (3.4 ml)
Iso-Lisergoamida	2.04	1.28
D-ácido lisérgico	0.38	2.76
Lisergol	0.23	0.65
2-oxo-LSD	0.65	0.59
D-monoetilamida del ác. Lisérgico	0.52	0.81
Dihidroergocornina	2.60	0.74
Dihidroergocristina	3.68	0.76
Dihidroergocriptina	2.63	0.71
Dihidroergotamina	2.48	0.81
Ergocornina	1.39	0.79
Ergocristina	2.31	0.81
Ergocriptina	1.86	0.78
Ergocriptinina	2.08	0.72
Ergometrina	0.26	0.79
Ergometrinina	0.47	0.79
Ergosina	1.22	0.78
Ergosinina	1.22	0.75
Ergotamina	1.57	0.81
Ergotioneina	6	2.35
Metisergida	0.65	0.85
Metilergometrina	0.39	0.76

La Figura 30 ilustra el grado de correlación de la retención en las dos columnas.

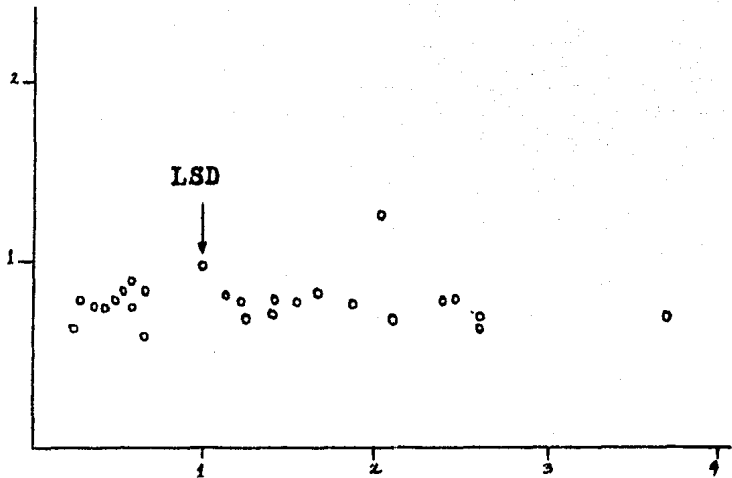


Figura 30. Correlación de retención (relativa al LSD) para los alcaloides en columnas Spherisorb 5-ODS y - Spherisorb S5W.

Aunque el LSD se resuelve con claridad en ambos sistemas, solamente la columna Spherisorb 5-ODS separa adecuadamente los alcaloides del ergot de los demás.

Los niveles de LSD encontrados en las muestras de los supuestos consumidores de esta droga, fueron: en suero o plasma de 6 - 6 -- ng/ml, en orina de 0.8 - 54 ng/ml, y en lavado estomacal de 5-11 ng/ml.

Un cromatograma representativo de una muestra de extracto de plasma conteniendo LSD, es el de la Figura 31.

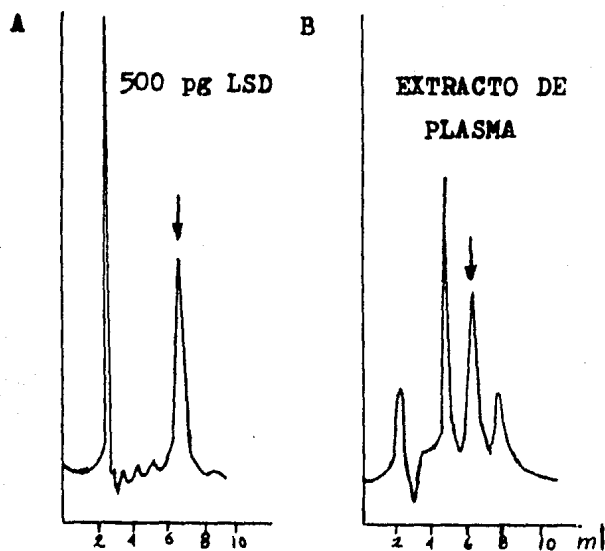


Figura 31. Cromatograma (en fase inversa) de un extracto de -- plasma conteniendo LSD. A, LSD auténtico (500 pg); B; extracto de plasma (equivalente a 0.1 ml de plasma. Las flechas indican los picos debidos al LSD.

El límite de detección de LSD por este método, depende principalmente de la cantidad de sustancia interferente, presente en la muestra. Menos de 100 pg de LSD pueden fácilmente medirse en soluciones -- buffers, pero en fluidos biológicos, niveles menores de 1 ng/ml, presentan dificultades, particularmente en orina.

La Tabla 16 ilustra la aplicación de este método analítico - en muestras de siete casos recientes.

TABLA 16

## RESULTADOS DE SIETE CASOS CONSIDERADOS PARA EL ANALISIS DE LSD

Rv = volumen de retención; RRV = volumen de retención relativa a LSD

Caso	Origen	Muestra	RIA Directo	HPLC-Fluorescencia	HPLC-RIA	Comentario
1	Una muchacha que se sospecho, tomó una tableta de -- LSD, llego inconciente y murió -- aproximadamente - 44 horas después.	Lavado estomacal tomado 12 h después de la ingestión.	4 ng/ml	Inyección directa: 5 ng/ml. Los espectros de excitación y emisión indicaron LSD.		Los análisis iniciales de RIA y HPLC dan valores similares ya que no están presentes los metabolitos de LSD.
2	Un individuo que parece haber tomado LSD en una -- fiesta de drogas.	Orina	15 ng/ml	Extracto de orina: 3 ng/ml.	El pico principal dió un Rv que coincidió con LSD.	El alto nivel de la actividad del LSD encontrado por RIA -- directo, se debió probablemente a los metabolitos de LSD.
3	Un hombre arrestado por crimen, -- sospechoso de haber ingerido alta dosis de LSD.	Sangre tomada una hora después del arresto.	4 ng/ml	Extracto de plasma: 5 ng/ml.	Solamente el pico principal tiene Rv que corresponde a LSD.	La ausencia de picos de metabolitos en HPLC-RIA y la semejanza de los resultados entre RIA inicial y HPLC-de fluorescencia sugiere que el nivel -- del metabolito de LSD fue bajo.
4	Un niño de cinco años de edad admitido en el hospital con psicosis aguda	Orina tomada 4 -- días después, -- aproximadamente, después de la ingestión de LSD.	2 ng/ml	Extracto de orina: 0.8 ng/ml	Resultados inconclusos debido al bajo nivel de LSD.	

TABLA 16  
(continuación)

Caso	Origen	Muestra	RIA Directo	HPLC-fluorescencia	HPLC-RIA	Comentario
5	Un hombre que -- admitió haber - tomado LSD.	Lavado estomacal (3 ml).	72 ng/ml	Inyección directa: 11 ng/ml.	Fuerte reacción cry- sada, en Rv de LSD.	
6	Un niño de 12 -- admitido en el - hospital, con - síntomas de hi- peractividad.	Suero, lavado es- tomacal. Orina.	2 ng/ml negativo negativo	No quedan residuos de suero después del RIA. Extracto de orina: Picos para RRv en 1.1 y 1.8. Lavado estomacal. Pico para RRv en 1.5.		El pico para RRv en 1.5 corres- pondió a ergotamina y el de - 1.1 se encontró que correspon- de a un producto de descompo- sición de la ergotamina en el medio ácido fuerte. LSD no - estuvo presente, pero los ni- veles de ergotamina en orina y lavados estomacales fueron de 10 ng/ml y 620 ng/ml, res- pectivamente. El niño tuvo - acceso a varias drogas inclu- yendo tartrato de ergotamina.
7	Un bebé de 9 me- ses ingirió pas- tillas microdot de LSD. Siete - tabletas se reco- gieron de su vó- mito.	Orina Sangre (hemoliza- da).	175 ng/ml 0.3 ng/ml	Extracto de orina: 54 ng/ml. Extracto de suero: 1.6 ng/ml El espectro de - fluorescencia fue idéntico con el de LSD.	Fuerte reacción cry- sada en el Rv de -- LSD y en el de un - primer pico de su - metabolito.	La presencia de LSD en orina se confirmó por E. Masas de la fracción de HPLC (n/e -- 323, 221). Los bajos niveles en el suero dificultan la com- paración.

Poochikian G. K. y Cradock J.C. (33), reportan un método -- cromatográfico de HPLC en fase inversa para la separación de clorhidratos de heroína (diacetil morfina), cocaína y sus productos hidrolizados.

El método fue usado para estudiar la estabilidad de heroína y cocaína en mezclas Brompton, que son formulaciones orales utilizadas en - pacientes con dolor crónico severo.

El método de C.G.L. requiere para este tipo de estudio, extracción y derivación, pero tiene el inconveniente de presentar degradación - térmica, lo cual es una limitación.

#### Experimento

Los clorhidratos de heroína, 6-monoacetilmorfina, morfina, cocaína, benzoilecgonina, se usaron como se recibieron. El ácido benzóico, la 2-cloro--3-nitropiridina y el estándar interno (clorhidrato de 4-cloropiridina), se adquirieron en el comercio. Acetonitrilo y agua destilada se filtraron a través de filtros de poro de 0.45  $\mu$ .

Se empleó una columna de acero inoxidable de 300 x 4.6 mm de d.i.

Fase estacionaria: sílice de tamaño de partículas de 10  $\mu$  - enlazadas a una capa monomolecular de octadecilsilano, nombre comercial - Bondapak C<sub>18</sub>.



Fase móvil: acetonitrilo-fosfato potásico monobásico 0.015 M (1 + 3); ajustado a un pH de 3 con ácido fosfórico 2 N.

Velocidad de flujo: 0.8 ml/min (presión 620 psi).

Detección: U.V. a 235 nm.

Temperatura: ambiente.

Soluciones de heroína y cocaína se disolvieron en los medios indicados en la Tabla 17, en concentraciones de 1-0.5 mg/ml, respectivamente.

TABLA 17  
COMPOSICION DE VARIOS VEHICULOS

Vehículo	Alcohol % (v/v)	Jarabe (34) % (v/v)	Agua destilada % (v/v)	Buffer de citrato, % (v/v)
I	0	25	75	-
II	12.5	25	62.5	-
III	25	25	50	-
IV	40	25	35	-
V	100	-	-	-
VI	12.5	12.5	75	-
VII	12.5	40	47.5	-
VIII	25	75	-	-
IX	12.5	25	-	62.5 (2.30)
X	12.5	25	-	62.5 (3.00)
XI	12.5	25	-	62.5 (3.50)
XII	12.5	25	-	62.5 (4.50)
XIII	12.5	25	-	62.5 (5.25)

El valor del pH se da entre parentésis.

Soluciones de morfina-cocaína en concentraciones de 1 y 0.5 - mg/ml fueron preparadas en el vehículo estándar II. Las soluciones fueron filtradas a través de filtros resistentes al disolvente, enseguidas puestas en ampulas de 2 ml, 1 ml de cada solución, y almacenadas a  $5^{\circ} \pm 0.1$ ,  $25^{\circ} \pm 0.1$ , y  $50^{\circ} \pm 0.1$ . Periódicamente se tomaban 300  $\mu$ l de muestra y se diluían con 2 ml de la fase móvil conteniendo 85 mg/ml de estándar interno (clorhidrato de 4-cloropiridina). La estabilidad de heroína, morfina y -- cocaína en estas mezclas es controlada en un período no mayor de 65 días.

El tiempo de análisis fue de 22 minutos.

La Figura 32 muestra la separación de una mezcla sintética de estas sustancias, y ácido benzóico.

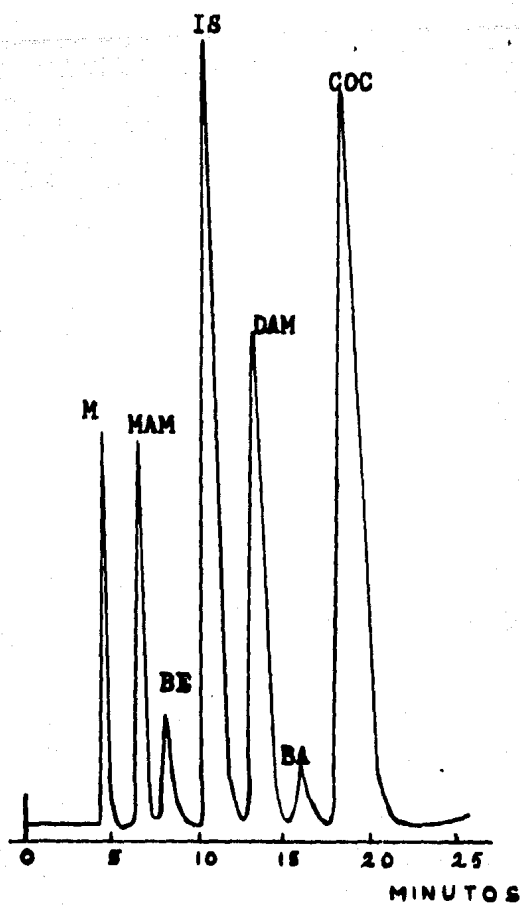


Figura 32. Cromatograma de (M) morfina, (MAM) monoacetylmorfina, (BE) benzoilecgonina, (IS) estándar interno, (DAM) diacetylmorfina, (BA) ácido benzóico, y (COC) cocaína.

La Tabla 18 muestra los resultados de los parámetros de retención correspondientes.

TABLA 18

TIEMPOS DE RETENCIÓN ( $T_r$ ), FACTORES DE CAPACIDAD ( $K'$ ),  
FACTORES DE SEPARACIÓN ( $\alpha$ ) Y RESOLUCIÓN ( $R_s$ )

Compuesto	$T_r$ seg.	$K'$	$\alpha$	$R_s$
Morfina	270	0.42	2.88	4.89
6-monoacetilmorfina	420	1.21	1.35	2.19
Benzoilecgonina	500	1.63	1.48	3.12
4-cloropiridina	648	2.41	1.38	2.87
Diacetilmorfina	820	3.32	1.24	2.14
Acido benzóico	972	4.12	1.22	2.02
Cocaína	1140	5.00	1.26	2.46
2-cloro-3-nitropiridina	1390	6.32		

Las respuestas cromatográficas para estos compuestos fueron - lineales ( $r > 0.999$ ) en el rango de concentración trabajado, 20-200  $\mu\text{g/ml}$ . Los límites de sensibilidad fueron 10 ng para heroína y 3 ng para cocaína.

Clorhidrato de 4-cloropiridina fue seleccionada como estándar interno por su corto tiempo de retención; no obstante, la 2-cloro-3-nitropiridina puede ser usada en su lugar.

También se siguió la desaparición de la heroína y cocaína -- como una función del contenido de alcohol en la mezcla, a varias temperaturas.

Se observó que la cocaína es estable a 25° y 5°C, sin embargo, la heroína es mucho más estable; las recomendaciones que dan son en base a

la estabilidad de heroína en estas mezclas. La  $t_{90}$  para heroína o cocaína en etanol fue mayor de 45 días a 50°C, y cuando se almacena 5°C esta mezcla puede usarse como solución stock para facilitar la preparación de mezclas Brompton.

La influencia del pH en la mezcla Brompton para la estabilidad de la heroína y cocaína es interesante, ya que los valores óptimos de pH para la degradación mínima de diacetilmorfina y cocaína se demostró ser - 4.0 - 4.5 y 2.5 - 3.0 respectivamente, (35,36,37). También se encontró que el pH óptimo para la hidrólisis mínima de heroína y cocaína es de 3.0 y 3.5.

Sullivan A.T. y sus colaboradores (38) han estudiado el metabolismo del LSD, dietilamida del ácido lisérgico. Para lo cual analizaron muestras de plasma y orina de monos Rhesus, a los que se les suministró -- LSD marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  e  $^3\text{H}$ .

El LSD es una droga de potencia considerable, siendo la dosis oral efectiva en el hombre de 0.5 - 1.0 g/Kg y 0.1 mg/Kg intramuscularmente. Su efecto principal es sobre el sistema nervioso central.

El mecanismo de acción de la droga no es conocido.

Upshall y Wailling (8) encontraron en 1972 que la concentración de LSD en plasma, alcanza el valor máximo una hora después de su administración. La vida media del LSD en el hombre es de cerca de 175 min.

La detección de LSD en fluidos biológicos es difícil, debido a las pequeñas cantidades involucradas. Pero aquí desarrollaron método --

sensible para su detección en sangre y orina, empleando una combinación de HPLC y radioinmunoensayo, Twitchett P.J. y colaboradores (39), en 1978. Debido a una variedad de razones, no se pudieron obtener voluntarios humanos que tomaran LSD y proporcionaran sus muestras, por lo que los experimentos fueron hechos usando monos Rhesus, los cuales se ha demostrado, -- tienen caminos de metabolismo semejantes a los del hombre para muchas drogas; Smith, R.L. y William, R.T. (40), en 1974.

Los monos Rhesus fueron machos adultos, con un peso promedio de 3.1 Kg. Antes de la administración de LSD, fueron sedados con cetamina (6 mg/Kg), posteriormente, cada uno fue puesto en una caja construida especialmente para facilitar la colección de orina, heces y sangre.

El LSD, en forma de tartrato, se administró oralmente conforme los datos de la Tabla 19.

TABLA 19  
DOSIFICACION DE LSD A LOS MONOS RHESUS

Animal	Peso (Kg)	<sup>3</sup> H (μg)	<sup>14</sup> C (μg)	μg	mg/Kg
171	3.00	---	630	--	0.21
303	2.85	6.6	---	500	0.18
172	3.50	6.6	---	500	0.15
164	2.80	---	---	2856	1.02
170	3.00	---	---	2910	0.97
172	3.40	---	---	3570	1.05

Se recolectaron muestras de orina y heces antes de administrar el LSD, y se recogieron muestras posteriores a la administración de la siguiente manera:

Sangre: 1 ml a la 1, 2, 3, 4, 6, y 24 horas después de la administración.

Orina: a la 1, 2, 3, 4, 6, 24 y 48 horas después de la administración.

Heces: a las 24 y 48 horas después de la administración.

Orina. Porciones de 0.2 ml fueron puestas en tubos que contenían 0.3 ml de agua + 4 ml de fluido de centelleo. Los tubos se mezclan durante 30 minutos a 10°C.

La radioactividad en los tubos se midió en el contador de centelleo; la cantidad de extinción fue determinada por un método de contador externo.

Plasma. Muestras de 0.05 ml se colocaron en tubos que contenían 0.45 ml de agua y 4 ml de fluido de centelleo. Su radioactividad y grado de extinción se midió de igual manera que en las muestras de orina.

Heces. La muestra fecal se homogenizó con agua destilada, y se dividió en cuatro volúmenes; 0.2 ml del homogenizado + 1.2 ml de solubilizador NCS se colocaron en tubos, los cuales se incubaron durante toda la noche, en un horno a 50°C. Enseguida se agregó 4 ml de fluido de centelleo, y se determinó su radioactividad y grado de extinción, como se describe anteriormente.

Células sanguíneas: cada muestra fue suspendida en solución salina isotónica (0.5 ml); porciones de 0.2 ml de la suspensión se incubó durante toda la noche a 50°C con 2.4 ml de solubilizador NCS.

Después se le adicionó 4 ml de fluido de centelleo, y se midió su radioactividad y grado de extinción, como en los casos anteriores.

#### Radioinmuno Ensayo de las Muestras

La cantidad de material para reacción cruzada en las muestras - de orina a partir de C-LSD-marcado y LSD-sin marcar, se determinó usando - el método de radioinmunoensayo (antisuero II) ya descrito.

#### Fraccionamiento de Muestras de Orina por HPLC

Muestras de orina (0.1 - 0.2 ml) de los monos que recibieron - LSD marcado  $^{14}\text{C}$ , se cromatografiaron bajo estas condiciones:

Columna: de 10 cm de longitud x 4.6 mm de d.i.

Fase estacionaria: Spherisorb-5-ODS

Fase móvil: metanol ( $\text{NH}_4$ ) $_2$ CO $_3$  acuoso (0.1% w/v). 1:1 y v/v.

Velocidad de flujo: 1 ml/min.

Las fracciones obtenidas se analizaron por RIA, y la cantidad de radioactividad  $^{14}\text{C}$  se determinó por conteo del líquido de centelleo, como se ha descrito antes.

Hidrólisis enzimática de muestras de orina. Se mezcló 0.1 ml de orina con 0.2 ml de buffer de acetato 0.2 M a pH de 5  $\pm$  0.2 ml de una preparación de  $\beta$ -glucuronidasa y 1.0 ml de sulfatasa. La mezcla se incubó



durante 48 horas a 37°C, enseguida se agrega 2 ml de metanol para precipitar la proteína, esta suspensión se centrifuga para quitar la proteína -- precipitada. El sobrenadante se reduce a un volumen pequeño bajo una -- corriente de nitrógeno, para después fraccionarse por HPLC. A cada fracción se le determinó su radioactividad.

En la Figura 33 se muestra la cantidad de  $^{14}\text{C}$  en la muestra de orina, respecto al tiempo y se muestra que después de 48 horas de haber administrado el LSD marcado, 24% de la dosis administrada ha sido excretada.

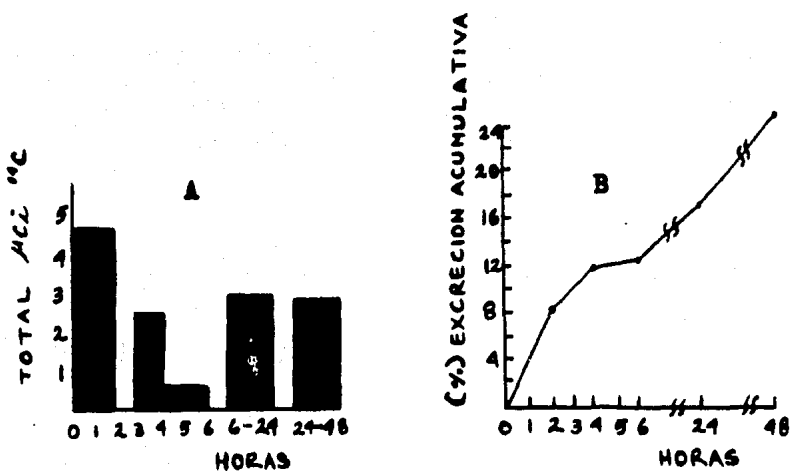


Figura 33. Excreción urinaria de  $^{14}\text{C}$  después de administrar --  $^{14}\text{C}$ -LSD (45  $\mu\text{Ci}$ , mono 171). A: total de  $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$  en cada muestra de orina; B: excreción acumulativa de  $^{14}\text{C}$ , expresado como % de la dosis administrada.

La Figura 34, muestra que en el plasma se alcanza el valor máximo de concentración en una hora o antes, y disminuye sobre las siguientes 23 horas.

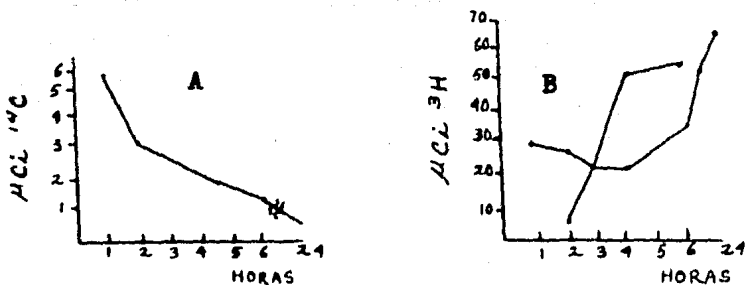


Figura 34. A: Niveles de plasma de  $^{14}\text{C}$  después de la administración de  $^{14}\text{C}$ -LSD (45  $\mu\text{Ci}$ , mono 171). B: Niveles de plasma de  $^3\text{H}$  después de la administración de  $^3\text{H}$ -LSD (225  $\mu\text{Ci}$ ; monos 172 y 303).

En las heces y células sanguíneas no se detectó LSD marcado.

Se encontró que con 50% de metanol-50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (0.1% - acuoso) hay buena separación de los componentes radioactivos en un tiempo de 0-2 horas, de las muestras de orina de los monos que recibieron LSD marcado. Usando este eluyente, se obtuvieron siete picos de compuestos radioactivos, como se muestra en la Figura 35.

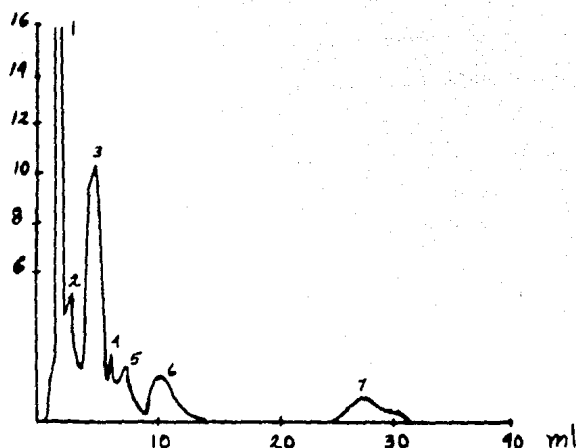


Figura 35. Radiocromatograma de la muestra de orina del mono - 171, en un tiempo de 0-2 hrs, (45  $\mu$ Ci  $^{14}$ C-LSD).

Los resultados del presente experimento indican que el LSD es absorbido rápidamente del tracto gastrointestinal, y que el nivel máximo en sangre se alcanza en aproximadamente una hora después de su administración, y después decrece constantemente. Estos resultados coinciden con los encontrados por Aghajanian y Bing (41) en 1964, Usphall y Wailing -- (8) en 1972.

Los resultados encontrados indican que la principal vía de -- excreción del LSD es la urinaria. Ya que 24 horas después de haber administrado el LSD, 24% de la dosis administrada se recuperó en la orina. Estos resultados difieren a los encontrados por Siddik (42) en 1975, el encontró a las 48 horas después de la administración del LSD, 38% en orina y 22% en heces. Esta diferencia puede deberse a que la ruta de administra-

ción no fue la misma, él administró 0.1 mg/Kg intramuscularmente.

Los resultados obtenidos en los monos indican que después de una ingestión oral de LSD, puede ser posible detectar sus metabolitos en la oringa por mucho tiempo, aunque ya no se detecte el LSD, esta situación puede ser similar en humanos. La presencia de los metabolitos del LSD en una muestra, confirman la evidencia de que la droga estuvo presente, siendo esto de gran significancia forense, ya que como se ha visto la droga no es detectable en el organismo por largo tiempo.

Ziegler H. W. y sus colaboradores (43) describen un método -- para la determinación cuantitativa de morfina, codeína, criptonina, tebaína, y narcotina que son los alcaloides principales del opio por HPLC. Estos alcaloides primeramente se extraen en medioácido, utilizando ácido fósfórico diluído, a un pH cercano a 9.1 que es el ideal.

Luego, se eluyen por la técnica de adsorción, utilizando una columna de resina de Amberlite XAD-2, en la que se hace pasar primero metanol y después cloroformo-metano (3+1). Enseguida el disolvente se evapora a presión reducida para concentrar los eluatos, los alcaloides se redissuelven en cloroformo-metanol (3+1). Después, se inyectan muestras de esta solución más brucina como estándar interno, sobre una columna de Corasil II, usando como eluyentes: hexano + cloroformo-metanol-dietilamina (100+300+1), para la cuantificación de los alcaloides.

Las absorbancias de los alcaloides fueron controladas a 254 nm, en un espectrofotómetro de flujo directo U. V. de doble haz.

La resina de fuerte intercambio catiónico usada (44) para el aislamiento de los alcaloides extraídos de plantas hidrofílicas extrañas, a menudo rindieron residuos indeseables que impidieron una buena recuperación de los alcaloides y enviciaron las columnas.

La Amberlite XAD-2 es una resina no iónica macroreticular con una gran área de superficie y porosidad. Tiene la capacidad de absorber compuestos orgánicos que sean solubles en agua.

#### Experimento.

Fases estacionarias: Amberlite XAD-2, resina preparada y al macenada con baja cantidad de agua; y Corasil II de 37-50  $\mu\text{m}$ .

Reactivos y Disolventes: 85% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , NaOH, y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; hexano. metanol anhidro y  $\text{CHCl}_3$ ; dietilamina y etanol anhidro.

Disolvente programado: diluir 100 ml de  $\text{CHCl}_3$  a 400 ml con metanol, adicionar 1 ml de dietilamina, y mezclar.

Disolvente inicial de la fase móvil: adicionar 15 ml del disolvente programado, a 1 l de hexano.

Solución del estándar interno: pesar exactamente 200 mg del alcaloide de brucina, transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml.

Disolver y aforar con  $\text{CHCl}_3$ -metanol (3+1).

Solución stock: pesar exactamente cada alcaloide, y transferirlos a un matraz de 100 ml; 320 mg de narcotina, 100 mg de papaverina, 200 mg de tebaína, 40 mg de critonina, 400 mg de codeína (secarlos 4 horas a  $80^\circ\text{C}$ ), y 640 mg de morfina monohidratada. Los cálculos se realizan en -

condiciones anhidras después de determinar el agua usando el método de -- Karl Fischer, como lo detalló Reasley (45). Disolver las muestras y aforar con  $\text{CHCl}_3$ -metanol (3+1). Transferir alícuotas de 5 ml en viales con tapón de rosca. Evaporar el disolvente con un flujo de corriente de aire, a temperatura ambiente, no calentar.

Solución estándar concentrada: disolver el contenido de un vial de alcaloide estándar en 5 ml de solución del estándar interno.

Solución diluída: disolver el contenido de un vial de alcaloí de estándar, en 10 ml de solución del estándar interno.

Columnas de acero inoxidable de 2.8 de d.i. x 75 mm, y 2.8 x 1000 mm.

Velocidad de flujo: 2 ml/min.

#### Preparación de la Muestra

Transferir 1 g de opio exactamente pesado, a un vaso de precipitado y añadirle 40 ml de agua. Ajustar el pH a  $2 \pm 0.1$  con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 N. Calentar en baño María, dispersando la muestra con un agitador de vidrio (15 minutos). Filtrar usando succión suave, con un filtro de porosidad media. Lavar el filtrado de 4-5 veces con 5 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.4 N. Colectar el filtrado y los lavados en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con -- agua. Transferir una alícuota de 20 ml a un matraz de 100 ml, adicionar 0.5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , disolver, ajustar el pH a  $9 \pm 0.1$  con solución de NaOH al 4% (p/v).

Transferir a una columna de vidrio de 30 cm x 15 mm de d.i. - provista con llave de paso; 20 ml de resina Amberlite XAD-2. Abrir la llave de paso, y ajustar el flujo a 2 ml/min. Lavar el interior de la columna con 50 ml de agua, eluir y descartar el agua de lavado. Eluir con 50 ml de metanol, colectando el eluato en un matraz de 250 ml.

Cuando 25 ml de metano ha pasado por la columna, cerrar la llave de paso, eliminando el disolvente eluido. Continuar la elución con remanentes de metanol desenchándolo, seguido por 100 ml de  $\text{CHCl}_3$ -metanol (3+1). Evaporar los eluatos bajo presión reducida a 60°C. Cuando está casi seco, adicionar 5 ml de etanol anhidro y evaporar a sequedad. Repetir la deshidratación dos veces, enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 5 ml de estándar interno y tapar, agitar con ultrasonido. Inyectar de esta solución, por medio de una jeringa, la cual contiene fibra de vidrio, para filtrar.

#### Cálculos.

De los cromatogramas de los estándares, calcular la relación de altura del pico de cada alcaloide a la altura del pico del estándar interno brucina. Calcular el peso para cada alcaloide estándar concentrado y diluido, dividiendo mg de cada alcaloide por mg de brucina adicionados en las soluciones estándares respectivos.

Calcular curvas de calibración para cada alcaloide, graficando relaciones de alturas de los picos contra las correspondientes relaciones de pesos. Determinar la altura del pico de los alcaloides en la mues

tra problema. Leer las correspondientes relaciones de pesos en las curvas de calibración y calcular el contenido de alcaloide anhidro, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de peso de alcaloide anhidro} = \frac{\text{relación de peso} \times 10 \times 100}{\text{mg de opio} \times \text{la alícuota}}$$

Areas bajo los picos, también pueden ser usadas para calcular las muestras problemas, por medio de integración manual o electrónica.



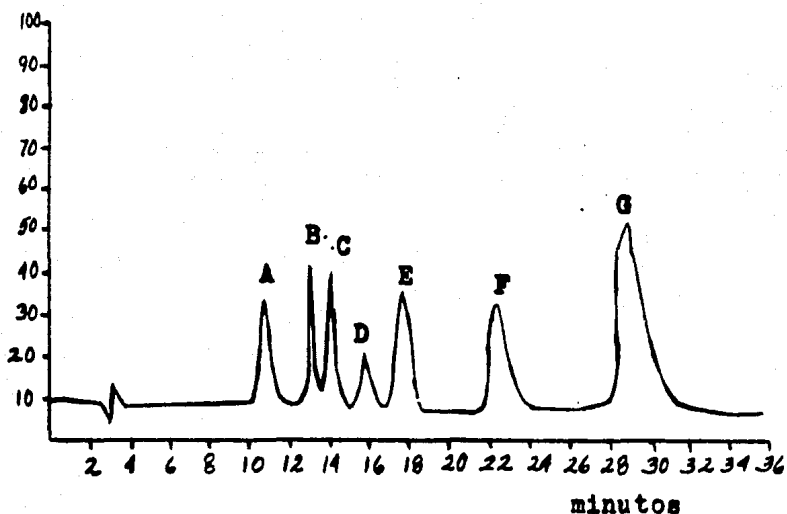
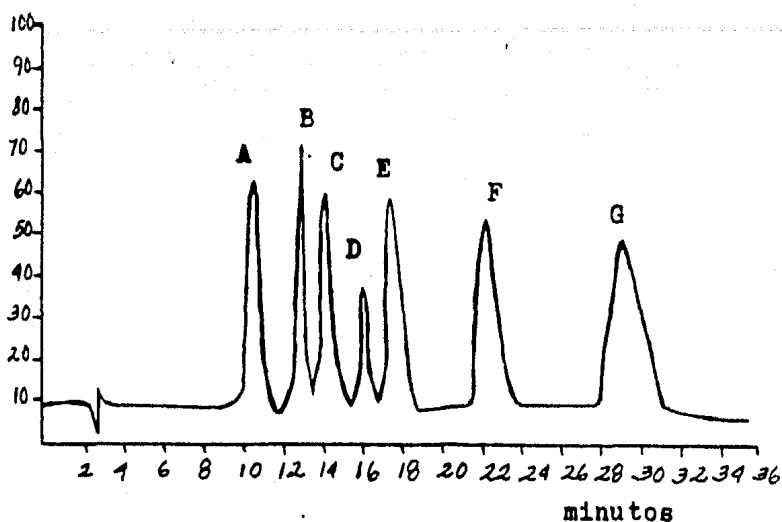


Figura 36. Cromatogramas de una mezcla de alcaloides estándares. En el cromatograma superior: A, narcotina (16  $\mu\text{g}$ ); B, papaverina (5  $\mu\text{g}$ ); C, tebafina (10  $\mu\text{g}$ ); D, criptopina (2  $\mu\text{g}$ ); E, codeína anhidra (20  $\mu\text{g}$ ); F, morfina anhidra (30  $\mu\text{g}$ ); y G, estándar interno brucina (10  $\mu\text{g}$ ). En el cromatograma inferior los mismos estándares, sólo - que están a la mitad de concentración, respecto a los del cromatograma superior, excepto brucina, que esta - en igual concentración.

Resultados obtenidos por HPLC, para alcaloides individuales en muestras de opio de UN pulverizadas, se dan en la Tabla 20.

TABLA 20

ANALISIS POR HPLC DE MUESTRAS DE OPIO DE UN: RESULTADOS REPORTADOS EN POR CIENTO DE ALCALOIDE ANHIDRO

Muestra	Origen	Narcotina	Papaverina	Tebaína	Criptopina	Codeína
UN-M-1	Japón	3.95	1.74	2.59	0.23	4.01
UN-M-2	India	9.89	2.12	1.74	0.25	2.66
UN-M-3	Turquía	5.56	1.59	1.73	0.06	1.56
UN-M-4	Paquistán	7.63	2.99	2.02	0.20	3.75
UN-M-5	Iran	6.38	1.55	3.40	0.10	2.98
Muestra	Origen	Morfina				
UN-M-1	Japón	11.30				
UN-M-2	India	14.98				
UN-M-3	Turquía	14.66				
UN-M-4	Paquistán	13.62				
UN-M-5	Iran	7.26				

Los cromatogramas correspondientes son los de las Figuras 37 a la 41.

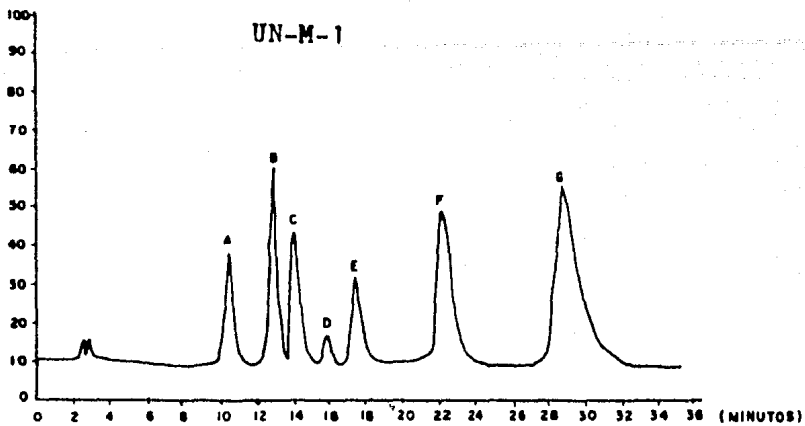


Figura 37

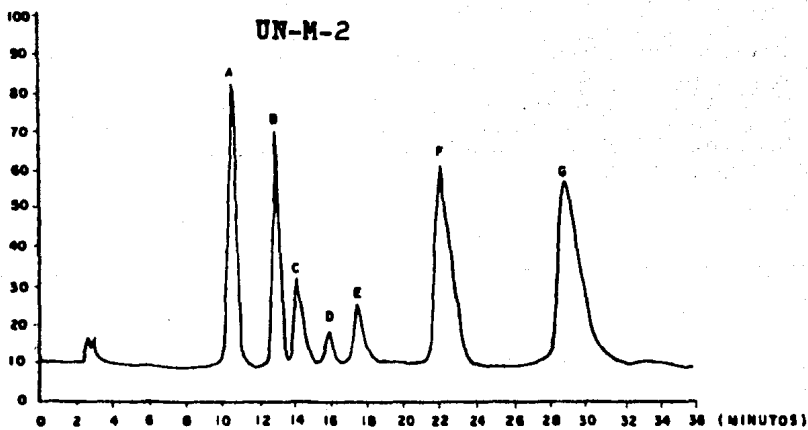


Figura 38

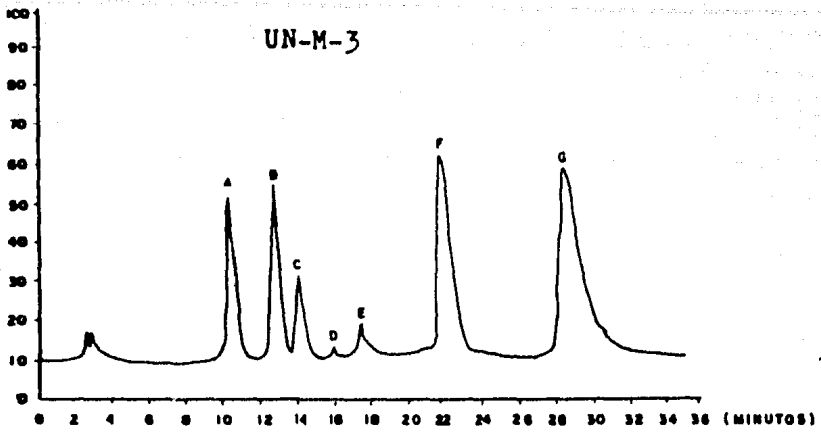


Figura 39

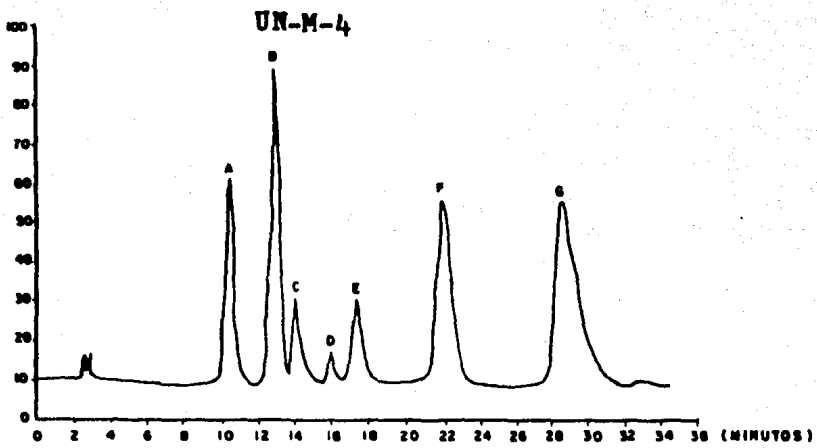


Figura 40

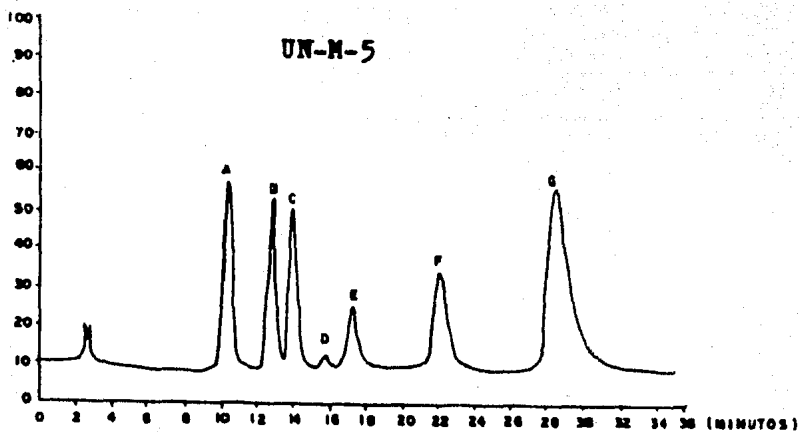


Figura 41

Estos cromatogramas (Figuras 37 - 41) corresponden a muestras de opio en polvo de UN: A, narcotina; B, papaverina; C, tebaína; D, crip topina; E, codeína; F, morfina; y G, brucina.

En la Tabla 21 se hace una comparación de los estudios analíticos para morfina.

TABLA 21

COMPARACION DE ANALISIS PARA MORFINA EN MUESTRAS DE OPIO UN POR VARIOS METODOS; RESULTADOS REPORTADOS COMO POR CIENTO DE MORFINA ANHIDRA

Procedimiento	Muestra				
	UN-M-1	UN-M-2	UN-M-3	UN-M-4	UN-M-5
USP XVIII (46)	10.38	14.74	14.02	12.46	5.81
USP XIX (AOAC) <sup>a</sup> (47)	12.09	15.31	15.42	13.79	7.74
AOAC <sup>b</sup>	12.45	15.74	14.87	13.88	7.82
HPLC (método de Mallinckrodt)	11.30	14.98	14.66	13.62	7.26
Mannich (48)	11.77	15.07	14.54	13.32	7.33
Who <sup>a</sup> (47)	11.14	15.92	14.98	13.92	7.27
Who estudio av. <sup>c</sup>	12.55	16.01	15.06	13.90	7.63

- a) muestras analizadas en nuestro laboratorio para colaborar con el estudio
- b) reportado por Smith (46) empleando 16 colaboradores
- c) reportado por Smith (46) empleando 8 colaboradores. Fue un procedimiento modificado al método de Schultz y Schneckenburger -- (49).

Nelson P. E. y sus colaboradores (5) han establecido un método combinado de HPLC + Inmunoensayo, para la identificación y cuantificación de morfina, codeína y sus metabolitos en fluidos biológicos.

Las técnicas de inmunoensayo pueden ser: la llamada inmunoensayo de la enzima multiplicada (EMIT), la cual es menos sensible y en el presente puede ser usada solo para orina, pero es más rápida y requiere menos destreza; la otra es radioinmunoensayo (RIA), la cual es extremadamente sensible y puede ser usada en muestras pequeñas de sangre

u orina. En ambas técnicas no existe especificidad para un compuesto, ya que hay reacciones con todos los compuestos que tengan estructuras similares.

Estos investigadores reportan el uso de ambos sistemas HPLC - EMIT y HPLC - RIA, para análisis de morfina y compuestos relacionados, en sangre y orina.

Se utilizó un sistema de HPLC en fase inversa que incorpora iones bromuro en el eluyente para la separación de los opiáceos y este sistema se uso en combinación con reactivos comerciales EMIT y RIA para identificar y cuantificar morfina y 3 -glucuronido - morfina en diversos casos fatales en abuso de drogas. Dan a conocer también resultados de análisis de codeína y sus metabolitos presentes en la orina de voluntarios que ingirieron dosis terapéuticas de codeína.

Los materiales y equipo para los inmunoensayos son: muestras y reactivos EMIT se mezclaron usando un pipetor/diluidor Gilford 6065 automático. La actividad enzimática se midió con un espectrofotómetro Gilford Stasar III para micromuestras.

Los materiales de radioinmunoensayo para morfina ( $I^{125}$ ) fueron de Roche Diagnostics. Se empleó un  $\gamma$ -espectrofotómetro A. N. E. 8311 automático para medir la actividad de  $I^{125}$ .

Para la HPLC se empleó:

Columna de acero inoxidable de 100 mm x 4.6 mm.

Fase estacionaria: Hypersil de 5  $\mu$ m ODS

Fase móvil: 12.5% de metanol en solución amortiguadora de fosfato 0.01 M a pH 3 conteniendo bromuro de potasio 0.1 M.

Velocidad de flujo 0.75 ml/min.

En los inmunoensayos se obtuvo las reactividades cruzadas de los opiáceos, los que se dan en la Tabla 22 por comparación de la curva de calibración para cada opiáceos con la de la morfina.

Se tomaron muestras de sangre, ante-mortem y post-mortem, de individuos sospechosos de haber ingerido dosis excesiva de morfina. La sangre se centrifugó para la obtención sólo de suero, que se usó para los análisis; cuando fue posible, también se tomaron muestras de orina.

Además, dos voluntarios proporcionaron muestras de orina después de ingerir 15 mg de codeína oralmente, cada 4 horas, en un total de 48 horas. Todas las muestras fueron analizadas por RIA, pero solo las de orina por EMIT. En HPLC las muestras de orina fueron inyectadas sin pretratamiento, y las de suero fueron diluidas con agua destilada hasta una concentración de casi 300 ng/ml del opiáceos. Con esta dilución se reducen problemas de obstrucción de los filtros en el sistema de HPLC. Entre cada muestra la válvula de inyección fue lavada con HCl (2 ml 2M) seguida por agua destilada (6 ml). Muestras de orina (500  $\mu$ l) de individuos que ingirieron opiáceos, fueron usados como controles. Las muestras de orina, obtenidas después de la ingestión de codeína, se hidrolizaron con  $\beta$ -glucuronidasa y HCl concentrado de la siguiente manera:



Para la hidrólisis ácida: 3 ml de HCl conc. + 3 ml de orina, se mezclan y se calientan en agua hirviendo por 60 min. Enfriar, alcalinizar con KOH, a pH de casi 7, con unas gotas de ácido fosfórico al 20%. El volumen final se mide y alícuotas de 500 µl fueron fraccionadas por HPLC para subsecuente inmunoensayo. En la hidrólisis enzimática, 3 ml de buffer de acetato a pH de 5.6, fueron añadidos a 3 ml de orina, seguidos por 10 000 unidades de β-glucuronidasa, e incubada a 35°C durante toda la noche. Alícuota de 500 µl fue fraccionada por HPLC para posterior inmunoensayo.

TABLA 22

REACTIVIDADES CRUZADAS DE ALGUNOS OPIATOS  
EN EMIT Y RIA CON LA REACTIVIDAD DE MORFINA

Compuesto	Reactividad relativa* de EMIT	Reactividad relativa* de RIA
Morfina	1.00	1.00
Codeína	1.04	1.48
Dihidrocodeína	0.93	0.87
6-Monoacetilmorfina	0.50	0.12
Dihidromorfina	0.43	0.17
Morfina-3-glucuronido	0.24	0.41
Nalorphina	0.11	0.006
Norcodeína	0.08	0.04
Codeína-N-óxido	0.03	0.02
Normorfina	0.005	10 <sup>-4</sup>
Morfina-N-óxido	9 x 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>

\*La Reactividad Relativa está en relación a la cantidad de morfina con la cantidad de opiato requerida para dar una reacción cruzada equivalente a 0.5 µg de morfina por EMIT y 20 ng de morfina por RIA.

Así, el N- oxido de morfina y la morfina no muestran virtualmente, reacción cruzada en ningún análisis. Codeína y dihidrocodeína dieron una reacción cruzada muy fuerte.

Inmunoensayos llevados directamente sobre fluidos biológicos darían por lo tanto un resultado que incluiría todos los compuestos que --reaccionan cruzadamente, ya que tienen estructuras químicas similares.

Como las reactividades relativas de la morfina y sus metabolitos son diferentes en los dos análisis, es de esperar resultados diferentes cuando se analicen muestras biológicas de opiáceos.

En los casos en que se sospecha sobredosis de morfina, el uso del sistema de HPLC de fase inversa da separación muy eficiente, en la mayoría de los opiatos que probablemente estén presentes en muestras toxicológicas. Los volúmenes de retención se dan en la Tabla 23.

TABLA 23

VOLUMENES DE RETENCION DE OPIACEOS EN ODS-HYPERSIL DE 100 mm x 4.6 mm. CON UN ELUYENTE DE METANOL 12.5% EN BUFFER DE FOSFATO 0.01 M DE (pH 3) CONTENIENDO BROMURO DE POTASIO

Compuesto	Volumen de Retención (ml)
Morfina-3-glucoronido	1.0
Normorfina	1.7
Dihidromorfina	1.7
Morfina	1.8
Morfina-N-oxido	1.8
Codeína-N-oxido	4.3
Dihidrocodeína	4.8
Nalorfina	4.9
Codeína	5.3
Norcodeína	5.7
6-Monoacetilmorfina	10.4

El cromatograma de la Figura 42 corresponde a orina y se observan tres picos: dos de ellos corresponden a morfina y morfina-3-glucoronido, considerados además por la reactividad cruzada. El tercer pico se debe probablemente a algún metabolito de morfina.

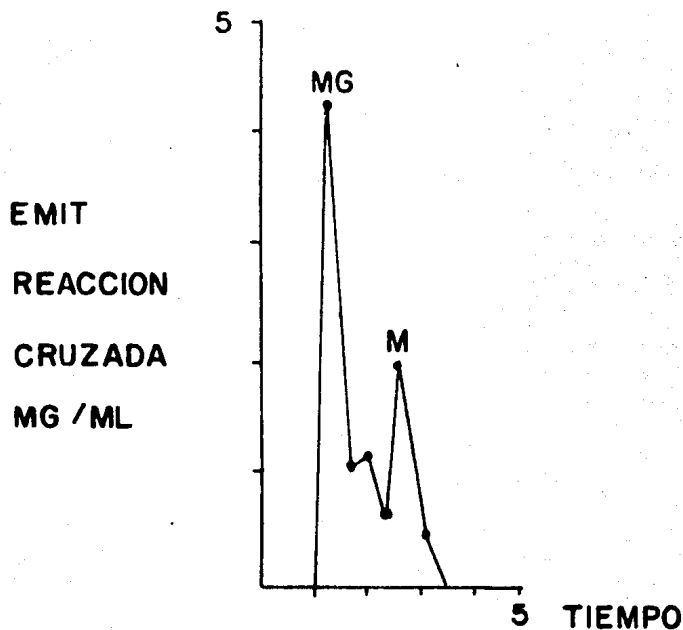


Figura 42. Análisis HPLC-EMIT análisis de morfina-3-glucoronido (MG) y morfina (M) en una muestra de orina de un sujeto que murió enseguida de tomar una sobredosis sospechosa de morfina.

Los resultados obtenidos para HPLC/EMIT (para orina) y HPLC/RIA (para suero) se dan en la Tabla 24 y 25 respectivamente.

TABLA 24

CONCENTRACIONES DE OPIATOS EN REACCIONES CRUZADAS EN MUESTRAS DE ORINA DE INDIVIDUOS POST-MORTEM EN CASOS SOSPECHOSOS DE SOBREDOSIS DE MORFINA DETERMINADO POR HPLC-EMIT

Caso No.	Concentración* (µg/ml)			
	Morfina -3 glucurónido	Morfina	No identificada	Total
1	1.0	0.3	0.4	1.7
2	0.25	5.0	0.5	5.75
3	5.5	2.5	1.5	9.5
4	11.0	7.0	1.6	19.6

\* Expresado como equivalentes de morfina.

TABLA 24

CONCENTRACIONES DE REACCIONES CRUZADAS DE OPIATOS EN MUESTRAS DE ORINA DE INDIVIDUOS POST-MORTEM EN SOSPECHOSOS DE SOBREDOSIS DE MORFINA DETERMINADO POR HPLC-RIA

Caso No.	Concentración* (µg/ml)			
	Morfina -3 glucurónido	Morfina	No identificada	Total
3	0.007	0.03	0.006	0.043
4	0.2	0.3	0	0.5
5	0.46	0.1	0.12	0.68
6	0.74	0.3	0.1	1.14

\* Expresado como equivalentes de morfina.

En ambas se observa que la relación de morfina a morfina-glucoronido en suero u orina no es constante e ilustra muy bien el uso de la combinación cromatografía - inmunoensayo.

Por otro lado, la Figura 43 muestra el cromatograma de una muestra de orina analizada por HPLC - inmunoensayo, de un voluntario que ingirió codeína.

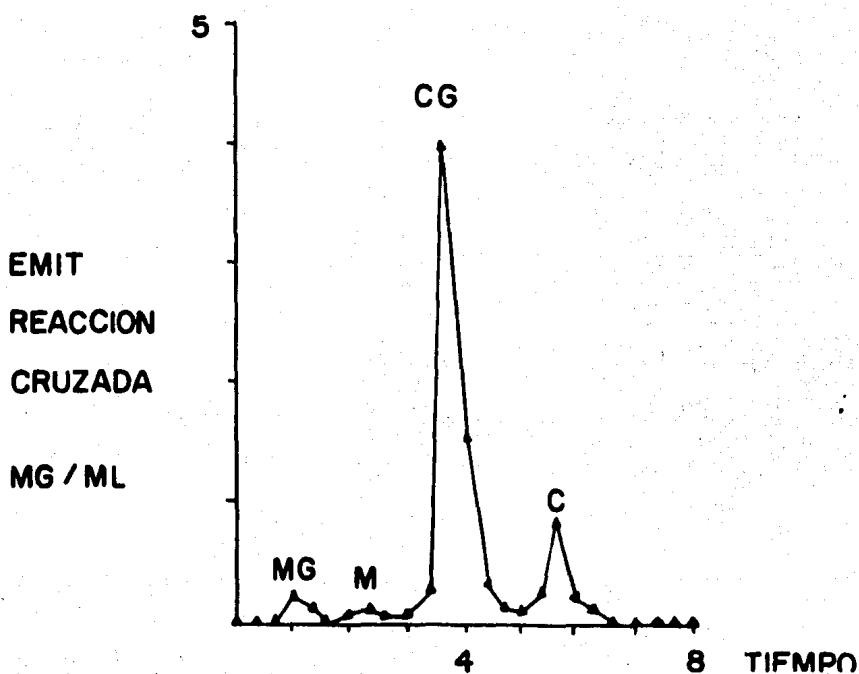


Figura 43. Análisis HPLC-EMIT de morfina -3-glucoronido (MG), morfina (M), codeína-6-glucoronido (CG) y codeína (C) en una muestra de orina tomada 36 horas después a voluntarios que ingirieron 15 mg de codeína cada 4 horas.

Al analizar las muestras por HPLC-RIA, Figura 44, los picos se obtuvieron en las mismas posiciones que para HPLC-EMIT. Sin embargo el pico de CG ( $V_r = 3.7$  ml) es muy pequeño, lo cual indica que hay diferencia en la reactividad cruzada de los 2 inmunoensayos.

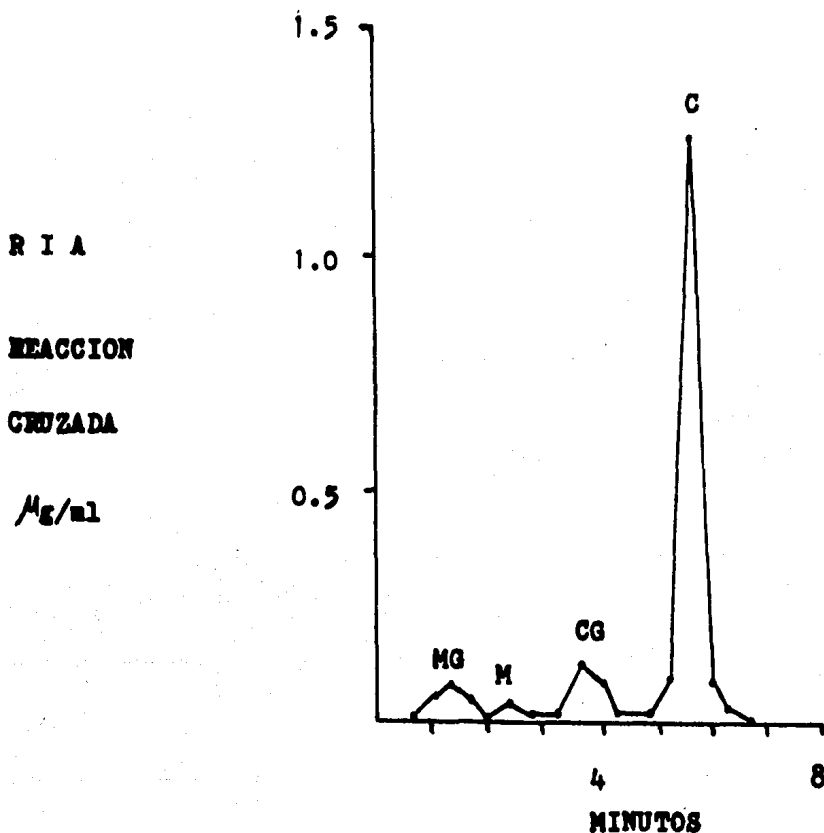


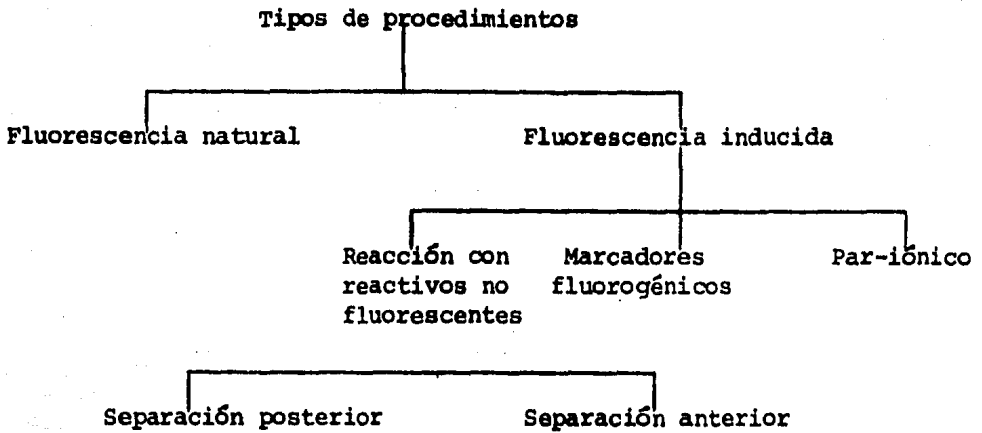
Figura 44. Análisis por HPLC-RIA de morfina-3-glucuronido (MG), morfina (M), codeína-6-glucoronido (CG) y codeína -- (C) en una muestra de orina tomada 36 horas después, a voluntarios que ingirieron 15 mg de codeína cada 4 horas.

Estos investigadores, establecen entonces que la HPLC combinada con EMIT o con RIA para morfina, provee un método eficiente para la separación, identificación y cuantificación de opiatos y sus glucuronidos conjugados. Tal combinación provee un sistema de detección sensible y específico para HPLC, que mejora la especificidad de los inmunoensayos y permite análisis con muestra pretratada o no. La separación de los glucuronidos conjugados de la morfina y la codeína también indica la potencialidad de un sistema combinado para la identificación de metabolitos polares de drogas que normalmente no se hace por métodos convencionales.

Wheals B.B. (51) del Laboratorio Forense de la Policía Metropolitana en Londres ha trabajado en el análisis de drogas por HPLC utilizando un sistema fluorométrico de detección.

Hay pocas drogas de abuso que tienen fluorescencia natural, sin embargo, esta propiedad se puede inducir químicamente, como se indica en el esquema siguiente:

## HPLC CON DETECCION FLUOROMETRICA



### Compuestos Detectados por Fluorescencia Natural

La dietilamina del ácido lisérgico (LSD) es uno de los pocos compuestos que presenta altos niveles de fluorescencia natural  $\lambda$  ex 320 nm  $\lambda$  em 420 nm. Su alta actividad, y por lo tanto la baja dosis de ésta droga (100-150  $\mu$ g/dosis) necesita el uso de una técnica sensible para su detección. Pastillas preparadas ilícitamente pueden analizarse rápidamente para ver la presencia de LSD, extrayendo con metanol e inyectando una alícuota en una columna empacada con sílice y utilizando un detector fluorométrico (52,53). En este análisis pueden también determinarse cualitativa y cuantitativamente alcaloides del ergot. El tiempo de retención es muy característico y diferente al de otros compuestos analizados. En este método, no interfieren los compuestos de la formulación ya que, no son fluorescentes.



Por este procedimiento pueden detectarse cantidades de LSD - del orden de 10 pg. Se ha empleado para detectar LSD en la orina de personas adictas (54).

#### Compuestos Detectados por Fluorescencia Inducida. Reacción con Reactivos no-fluorescentes antes de la Cromatografía

La reacción antes de la cromatografía puede ser un método -- poderoso para inducir la fluorescencia, pero puede obstaculizar la inyección de las muestras en la columna, interfiriéndose así la separación -- cromatográfica.

Un ejemplo típico de este método es el desarrollado para el análisis de morfina en fluidos biológicos usando HPLC con detección fluorométrica (55). La morfina puede convertirse en una pseudo-morfina dimérica fluorescente por oxidación, pero compuestos análogos reaccionarían igual que la morfina, de tal manera, que la reacción no es específica. - Sin embargo, es posible separar estos dímeros por HPLC.

En el método empleado, la dimerización oxidativa sucede en la cabeza de la columna empacada con sílice, seguida de la elución y detec-- ción de la pseudo-morfina. La presencia de los compuestos análogos a la morfina pueden variar los productos de reacción, sin embargo, este pro-- blema fue superado introduciendo una dihidromorfina como estándar inter-- no. Este compuesto también sufre dimerización y cuando está presente con morfina se obtienen tres productos de oxidación (morfina dimérica, dihi-- dromorfina dimérica y morfina-dihidromorfina).

Los tres productos se separan bajo las mismas condiciones cromatográficas y puede conocerse la concentración de la morfina en la mezcla a partir de las alturas de las señales en el cromatograma.

Reacción con reactivos no-fluorescentes después de la cromatografía

Si se coloca un sistema pequeño de reacción después de la columna cromatográfica, es posible usar condiciones drásticas de reacción -- para obtener productos fluorescentes a partir de los compuestos eluidos. -- El problema mayor es un cuidado completo del volumen el cual es suficientemente bajo para dar bandas separadas y picos excesivamente sobrepuestos -- sin indicación. En el presente nosotros no usamos este método para trabajos de tipo forense pero resultados excelentes han sido obtenidos con este método por Katz (56) en el campo biomédico. En su procedimiento una solución de  $Ce^{4+}$  10 N en ácido sulfúrico 2 N es mezclado con el flujo de disolvente eluido. Con compuestos adecuados ocurre la oxidación para formar --  $Ce^{3+}$  que exhibe fluorescencia ( $\lambda$  ex 260 nm  $\lambda$  em 350 nm).

#### Marcación Fluorogénica

Algunas drogas del tipo aminas primarias y secundarias así -- como aquellas con grupos fenólicos pueden convertirse en derivados fluorescentes utilizando ciertos reactivos, como los señalados en la Tabla 26.

TABLA 26

ALGUNOS REACTIVOS FLUOROGENICOS DE VALOR EN ANALISIS DE DROGAS

Reactivos		Derivados formados con:
Cloruro de Dansilo	5 dimetilamino-1 naftalen cloruro de sulfonilo	aminas primarias, secundarias fenoles
Cloruro de NBD	4 cloro 7 nitro-benzofurano	aminas primarias y secundarias
O Diacetil-benceno		aminas primarias
Fluram (fluoroscamina)	4 fenilspiro (furan-2(3H), 1'-ftalan)-3,3' diona	aminas primarias

La marcación fluorogénica puede usarse en HPLC produciéndose derivados fluorescentes de las drogas en estudio, permitiendo detectarlas en muy pequeñas cantidades, sin embargo, existe el problema de que algunas drogas contengan los mismos grupos funcionales o estructuras similares den resultados falsos positivos, o sea reacciones cruzadas. Por lo que es necesario usar estándares de alta pureza.

Por ejemplo, la detección de anfetamina en orina. El derivado correspondiente puede prepararse por calentamiento de la orina con cloruro de dansilo en acetona, y extrayendo posteriormente con acetato de etilo.

Si se usan estándares puros pueden detectarse cantidades del orden de 0.5 ng, tanto de anfetamina como de metilamfetamina en forma de sus dansil derivados. Con muestras de orina, por ejemplo, estas cantidades no son detectables debido a la presencia de sustancias interferentes.

Los cromatogramas en la Figura 45 muestran que un nivel de -- 5 ppm es el límite de detección cuando la muestra de orina se analiza directamente.

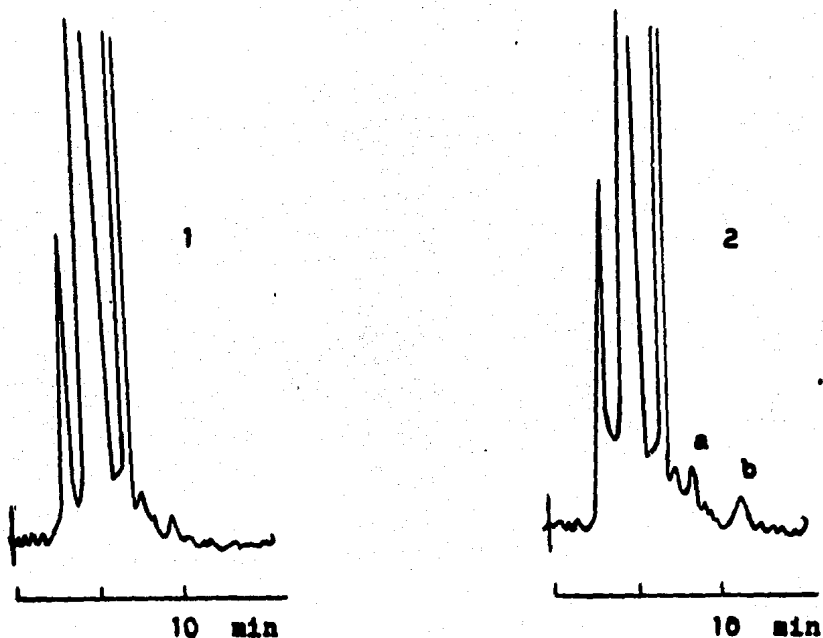


Figura 45. Cromatogramas de los extractos urinarios dansilados. 1. Blanco urinario. 2. Picos de la orina en los niveles de 5 ppm (a = anfetamina, b = metilamfetamina como sus dansil derivados).

Condiciones cromatográficas:

Columna: 25 cm x 4.9 d.i. empacada con Partisil 5 modificado con octadeciltrichlorosilano

Disolvente: Metanol: agua 85:15

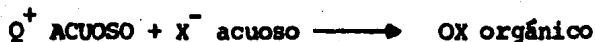
Velocidad de flujo: 1 ml/min a 1100 p.s.i.

Detector: Fluorométrico Perkin Elmer 1000

Exceptuando los problemas anteriores, esta técnica resulta ser muy apropiada para detectar drogas y sus metabolitos presentes en fluidos biológicos en pequeñas cantidades.

Fluorescencia Par-iónico

El principio en el que se basa la extracción par-iónico, es aquel en el que el ión orgánico  $Q^+$  puede transferirse de una solución acuosa a una orgánica por adición de un ión que posea carga  $X^-$ , y extrayendo el par iónico  $QX$  con un disolvente orgánico apropiado.



El principio ha sido aplicado a la extracción de drogas básicas presentes en soluciones acuosas, de tal manera que si se produce un ión contrario fluorescente, a partir de un compuesto tal como el ácido antraceno-2-sulfónico ( $\lambda_{ex}$  305 nm  $\lambda_{em}$  410 nm) el par-iónico deberá mostrar fluorescencia similar.

Este tipo de estudio en cromatografía se encuentra en una primera etapa, siendo posible que pares iónicos producidos a partir de drogas básicas puedan ser separadas cromatográficamente, estableciéndose así las bases de un método analítico sensible.

Love J.L. y Pannell, L.K. (57), han desarrollado un método de análisis por HPLC, para heroína ilícita y sus componentes relacionados, - obteniéndose buena resolución.

La heroína es una de las drogas ilícitas más comunes que es - necesario identificar y cuantificar en muestras de procedencia dudosa; -- las que además contienen morfina, codeína, acetilcodeína, monoacetilmorfina y diluyentes.

#### Experimento

Se emplea una columna micro-bondapack C<sub>18</sub>, de 30 cm de longitud, de fase inversa.

La fase móvil constituida de un 65% de acetonitrilo y 35% de buffer acuosa que contiene 0.75 g de acetato de amonio por 100 ml.

Todos los disolventes se filtraron en un filtro de 0.45 µm - (Millipore FHUPO4700).

Las muestras de las drogas puras se pesaron y se disolvieron en metanol, las concentraciones fueron de 1 a 2 mg/ml. Las soluciones - se filtraron y se almacenaron en el refrigerador hasta el análisis.

El flujo de la fase móvil fue 1.5 ml/min, el detector a una sensibilidad de 0.1 de absorbancia como escala total y luz u.v. de 280 nm.

Se inyectaron por triplicado volúmenes de 10 µl de estándares y muestras y los resultados cuantitativos se obtuvieron por comparación de la altura de los picos en los cromatogramas.

Si es necesario, se puede utilizar un estándar interno.

La papaverina y la tebaina pueden usarse como tal ya que dan respuesta lineal de altura de pico a cantidad inyectada.

Los volúmenes de retención relativa se dan en la Tabla 27 y el cromatograma es el de la Figura 46.

**TABLA 27**  
**VARIACIONES DE LOS VOLUMENES DE RETENCION**  
**RELATIVA A HEROINA**

Compuesto	Contenido de acetonitrilo		
	67%	65%	63%
Morfina	0.58	0.55	0.54
Papaverina	0.61	0.63	0.65
Monoacetilmorfina	0.74	0.72	0.71
Codeína	0.87	0.84	0.78
Acetilcodeína	1.26	1.24	1.19

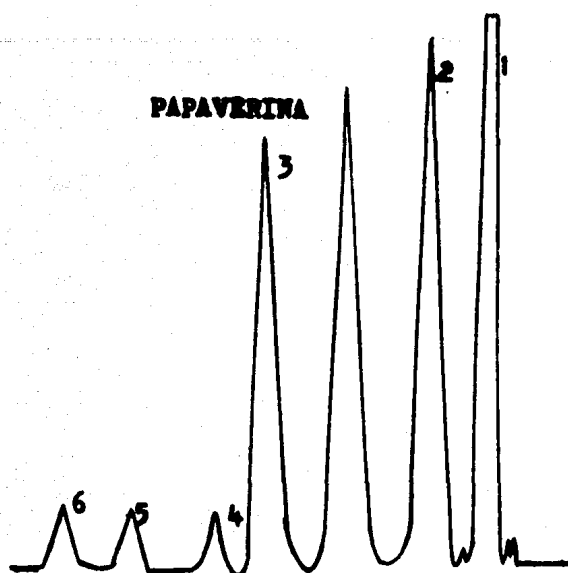


Figura 46. Cromatograma de opiáceos mezclados, cafeína y papaverina son estándares internos: (1) cafeína, - (2) morfina, (3) monoacetilmorfina, (4) codeína, (5) heroína, (6) acetilcodeína.

Este método de análisis de heroína es rápido, la preparación de la muestra es sencilla y usa una mezcla binaria de disolventes muy simple.

La resolución de varios derivados de morfina comunmente asociados con heroína se muestra en la Figura 47, y los volúmenes de retención a heroína son los de la Tabla 29.

Los picos de los derivados de la morfina se resuelven mejor que en cualquier otro método reportado sobre columna de fase inversa.



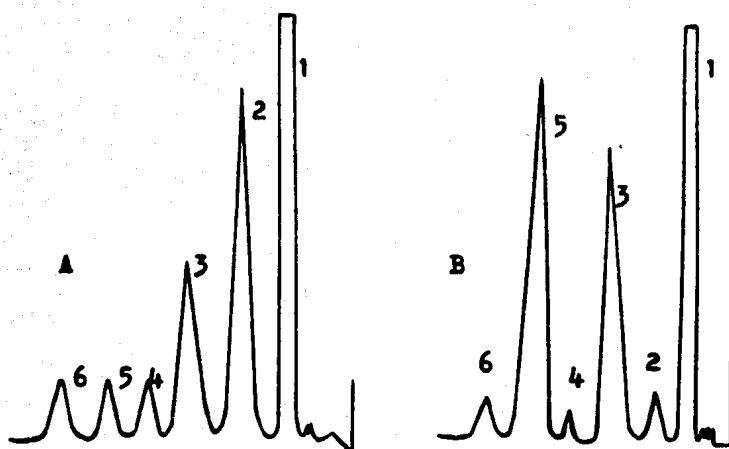


Figura 47. Cromatogramas de (A) mezcla de opiáceos con cafeína. (B) muestra de heroína china: -- (1) cafeína, (2) morfina, (3) monoacetilmorfina, (4) codeína, (5) heroína, (6) acetilcodeína.

TABLA 28

VOLUMENES DE RETENCION DE VARIOS COMPUESTOS  
ENCONTRADOS COMUNMENTE EN HEROINA ILICITA

MORFINA Y OPIO

Compuesto	Volumen de retención (ml)
Cafeína	3.8
Morfina	5.0
Papaverina	5.7
Monoacetilmorfina	6.5
Codeína	7.5
Narcotina	8.4
Heroína	9.0
Acetilcodeína	11.1
Tebaina	13.5
Estricnina	22.2

Finalmente, Lurie I (12) aplica las mismas condiciones experimentales de HPLC que usó en las determinaciones de barbitúricos y anfetaminas, para separar los cinco principales alcaloides del opio en goma: - morfina, codeína, tebaina, narcotina y papaverina, ocupando para ello -- 20 minutos aproximadamente. Demostrando, por otro lado, cómo varios tipos de drogas, ácidas y básicas, se pueden determinar por un sistema único isocrático de HPLC.

## Procedimiento

Disolver todas las drogas excepto opio y LSD en metanol y -- diluirlas a casi 0.5 mg/ml. Si es necesario filtrarlas a través de un -- poro de 0.45 m. Inyectar alícuotas de esas soluciones de 10 a 20  $\mu$ l al cromatógrafo seguidas por inyecciones de las soluciones estándares de -- concentraciones conocidas. La droga activa presente en la muestra se -- cuantifica por comparación con el promedio de la altura o área de los pi-- cos de las drogas estándares. Esto lo hicieron por duplicado.

Las muestras de LSD se preparan similarmente, pero se dilu-- yen a casi 24  $\mu$ g/ml. La muestra de opio es tratada con dimetil-sulfóxi-- do (DMSO). Inyectar alícuotas de 5  $\mu$ l de solución de opio sintético con-- teniendo 74 mg de morfina, 53 mg de sulfato de codeína, 23 mg de tebaína, 74 mg de narcotina y 18 mg de clorhidrato de papaverina en 250 ml de -- DMSO. Comparar los resultados de las alturas de los picos o áreas para cuantificación de morfina y posibles alcaloides relacionados. Este méto-- do tiene la ventaja de que al analizar tabletas coloridas de LSD, no hay interferencia de los excipientes acompañantes; como se observa la Figura 48.

El cromatograma de la muestra de opio es el de la Figura 49.

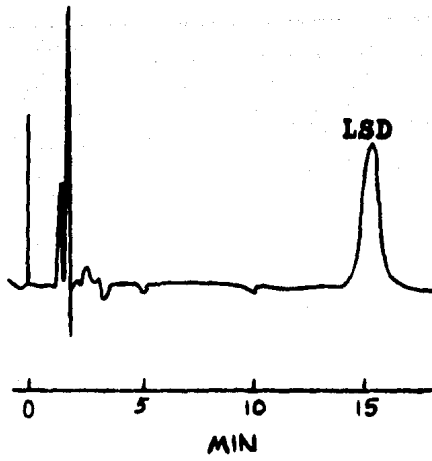


Figura 48. Cromatograma de la separación de LSD encontrado en -  
tabletas microdot; presión 2900 psi.

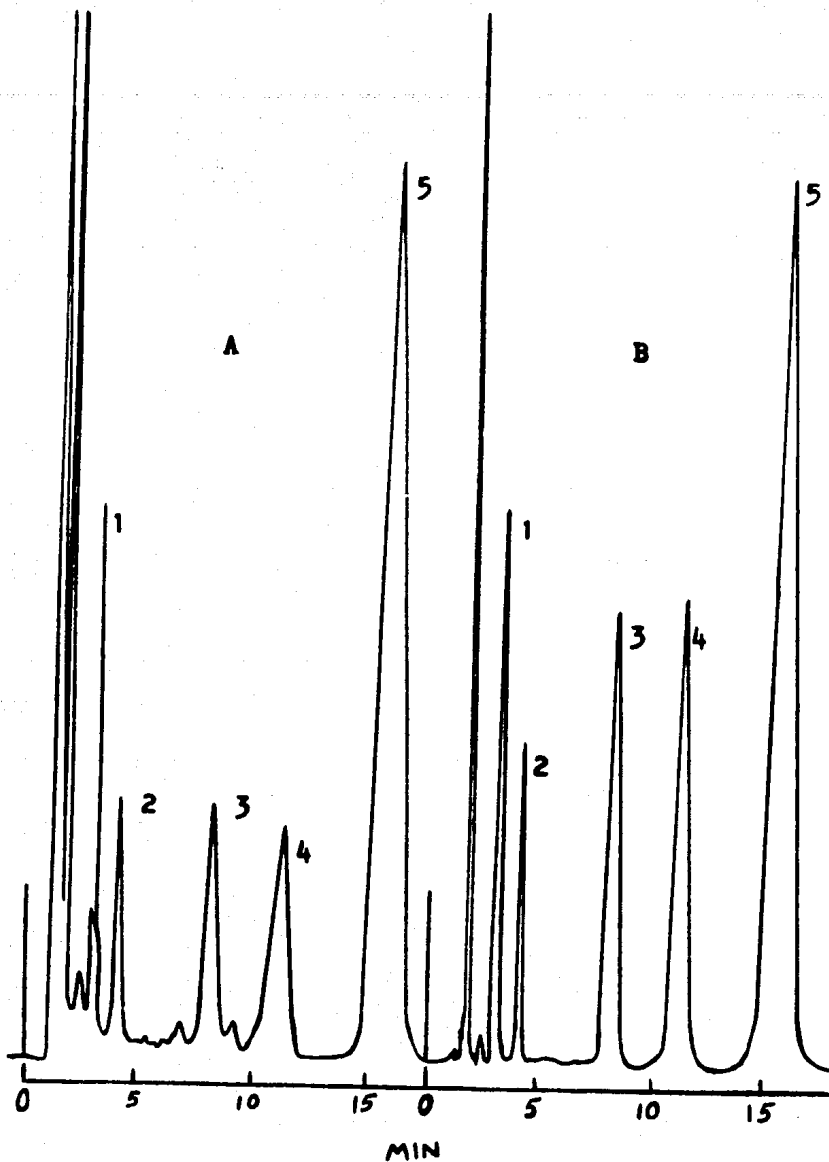


Figura 49. (A) cromatograma de una muestra de opio: 1, morfina; 2, codeína; 3, tebaína; 4, narcotina; 5, papaverina; y (B) una mezcla de alcaloides del opio - sintético, los números de los picos representan - los mismos compuestos que el cromatograma A.

Los volúmenes de retención relativa ( $R_T$ ) para alcaloides del opio se dan en la Tabla 28.

TABLA 28

VOLUMEN DE RETENCION RELATIVA ( $R_T$ ) PARA  
ALCALOIDES DEL OPIO, RELACIONADOS A  
LA NARCOTINA

Compuesto	$R_T$
Morfina	0.28
Codeína	0.36
Monoacetilmorfina	0.37
Procaína	0.38
Acetilprocaína	0.50
Acetilcodeína	0.69
Heroína	0.70
Tebaína	0.73
Narcotina	1.00 (23.0 ml)
Quinidina	1.23
Metapirilen	1.24
Papaverina	1.40
Quinina	1.44

Para los compuestos relacionados al LSD, el ( $R_r$ ) se da en la Tabla 29.

TABLA 29

VOLUMEN DE RETENCION RELATIVA ( $R_r$ ) PARA  
COMPUESTOS RELACIONADOS AL LSD

Compuesto	$R_r$
Acido lisérgico	0.32
Ergonovina	0.32
Amida del ácido lisérgico	0.30, 0.32
Dietilamida del ácido lisérgico (LSD)	1.00 (30.2 ml)
Tiofeno análogo de penicilina	1.03
n-Metil propilamida	1.10
Fenciclidina	1.13
Dietilamida del ácido isolisérgico	1.18
Ergotamina	3.86

## VI. CONCLUSIONES

Muchos de los problemas de análisis químico toxicológicos a los que se enfrentan hoy día los analistas clínicos y forenses, son aquellos que derivan del uso y del abuso que de diversas drogas, mucha gente comete.

Sabemos que para que una técnica analítica cualitativa o cuantitativa, de buenos resultados, es necesario que las sustancias problema sean aisladas, extraídas ó separadas completamente del medio o fluido biológico (plasma, suero, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, tejidos, -- etc.) que originalmente las contiene, para obtener buenos resultados.

La HPLC es una técnica moderna que ayuda a superar las dificultades que implica este desafío de separación analítico; tal y como se ha visto lo largo del presente trabajo:

- a) En relación al tamaño de la muestra (que va desde el orden de kilogramos, en algunos casos, hasta monogramos o picogramos en otros).
- b) En la separación o identificación de los ingredientes de las mezclas de drogas ilícitas, que es difícil de resolver por otras técnicas analíticas como ccF ó C.G.L.
- c) En la detección de drogas en fluidos biológicos
- d) Así como en el estudio e investigación del metabolismo de dichas drogas.



Hemos visto que las drogas ilícitas generalmente son mezclas muy complejas que poseen productos de degradación, precursores sintéticos, así como aditivos y diluyentes, lo cual dificulta en gran medida su análisis.

Por otra parte, se observa en el presente estudio que las condiciones de trabajo más utilizadas en HPLC son la de fase inversa y la de elución por gradiente.

El método de HPLC por gradiente puede separar, en media hora aproximadamente, del orden de dieciseis drogas comunes (21) y trabajando los sistemas de adsorción y partición.

Con respecto a los sistemas de detección en HPLC, hemos visto que los más utilizados son los fotométricos de ultravioleta y de fluorescencia, que dan buena resolución y permiten hallazgos de cantidades del orden de nonagramas y picogramos respectivamente. Esto hace el último sea más apropiado en la búsqueda de cantidades traza, siempre y cuando exista fluorescencia.

Por ejemplo, se ha visto que un caso específico lo constituye el alucinógeno LSD, que es muy difícil de detectar en muestras de fluidos biológicos, debido a que la dosis activa es del orden de 50 a 100 microgramos y su metabolismo no es muy claro; puede analizarse fácilmente por HPLC utilizando un detector fluorométrico, pues el LSD es una sustancia muy fluorescente.

La sensibilidad de este análisis es del orden de picogramos (14,20).

Así mismo hemos encontrado que la innovación de métodos combinados de análisis como HPLC-EM, HPLC-RIA y HPLC-EMIT, han dado resultados satisfactorios en cuanto a exactitud y resolución, sobre todo en el análisis de LSD y muchos alcaloides (5, 38,39,50,58,59).

Finalmente, es importante señalar que en ocasiones es necesario formar derivados de las sustancias problema, con el fin de transformarlas en sustancias mas fáciles de detectar, por ejemplo derivados fluorescentes.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Martin y Singe, J. Biochem., 35, 1358 (1941).
2. Condensen, Gordon y Martin, J. Biochem., 38, 224 (1944).
3. James y Martin, Analyst, 77, 915 (1952).
4. Büge, A. un Peinhart, G., High-Pressure Liquid Chromatography, a Modern and Efficient Separation Methods, J. Pharmazie, 35, No. 7, 443 (1980).
5. McNair, H.M. y Esquivel, B., Cromatografía Líquida de Alta Presion Monografía No. 10. Serie de Química. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Sría. Gral., O.E.A., Washington, D.C. 1973, p. 6.
6. Shorff, A.P., High-Pressure Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis, J. American Laboratory, Publ. 76, Series 8, Issue 5, p. 13, May (1973).
7. Goth, A., Farmacología Médica, Octava Edición, Ed. Internacional, México, 1977.
8. Upsall, D. G. and Wailing, D. G., Clin. Chim. Acta, 36, 67 (1972).
9. Tjaden, U.R., Kraak, J.K. and Uber, J.F.K., Rapid Trace Analysis of Barbiturates in Blood and Saliva by High-Pressure Liquid Chromatography, J. of Chromatography. Biochemical Applications, 43, 183 (1977).

10. Breimer D.D. and Van Rossum, J.M., *J. Chromatography*, 88, 235 (1974).
11. Dixon, P.F., and Stoll, M.S., *The HPLC Detection of Some Drugs Taken in Overdose*, *J. High Pressure Liquid Chromatography, Clin. Chem., Proc. Symp.*, Issue: 76, Academic, London, Engl.
12. Lurie, I., *Application of Reverse Phase Ion-Pair Partition Chromatography to Drugs of Forensic Interest*, *J. of A.O.A.C.*, 60, 1035 (1977).
13. Jane, I., *J. Chromatography*, 111, 227 (1975).
14. Wheals, B.B., *J. Chromatography*, 122, 73 (1976).
15. Twitchett, P.J. and Moffat, A.C., *J. Chromatography*, LLL, 149 (1975).
16. Trinler, W.A., Reuland, D.J. and Hiatt, T.B., *Screening of Street Drugs by High Pressure Liquid Chromatography. Part II. The Screening of Some Common Amphetamines, Ephedrine and Phencyclidine by Reverse Phase HPLC*, *J. Forens. Sci. Soc.* 16, 133 (1976).
17. Riddick, J.A. and Bunger, W.B., *Organic Solvents*, 3rd. Ed., *Techniques of Chemistry*, Vol. II, Wiley-Interscience, N.Y., 1970, p. 708.
18. Wheals, B.B., *Forensic Aspects of High-Pressure Liquid Chromatography*, *J. of Chromatography*, 122, 85 (1976).
19. Cashman, P.J., Tornton, J.I. and Shelman, D.L., *J. Chromatogr. Sci.*, 11, 7 (1973).
20. Clark, C.R., Teague, J.D., Wells, M.M, and Ellis, J. H., *Gas and High Pressure Liquid Chromatographic Properties of Some 4-nitrobenzamidic o Amphetamines and Related Arylalkylamines*, *Analytical Chemistry*, 49, No. 7, 912 (1977).

21. Chan, M.L., Whetsell, Ch. and McChesney, J.D., Use of High Pressure Liquid Chromatography for the Separation of Drugs of Abuse, *J. of Chromatogr. Sci.*, 12, 512 (1974).
22. Wittwer, J.D. and Kluckhohn, J.H., *J. Chromatogr. Sci.* 11, 1 (1973).
23. Heacock, R.A., Langille, K.R., Mcneil, J.D. and Frei, R.W., *J. Chromatography*, 77, 425 (1973).
24. Jane, I. and Wheals, B.B., *J. Chromatography*, 84, 181 (1973).
25. Op. cit. N°. 13.
26. Trinler, W.A. and Reuland, D.J., *J. Forensic Sci. Soc.*, 15, 153 (1975).
27. Cashman, P.J. and Thornton, J.I., *J. Forensic Sci., Soc.*, 12, 417 (1972).
28. Knox, J.H. and Jurand, J., *J. Chromatography* 87, 95 (1973).
29. Twitchett, P.J., *J. Chromatography* 104, 205 (1975).
30. Jane, I. and Taylor, J.F., *J. Chromatography* 109, 37 (1975).
31. Twitchett, P.J., Fletcher, S.M., Sullivan, A.T. and Moffat, A.C., Analysis of LSD in Human Body Fluids by High-Performance Liquid Chromatography, Fluorescence Spectroscopy and Radiimmunoassay, *J. of Chromatography*, 150, 73 (1978).
32. Axelrod, J., Brady, R.O., Witkop, B. and Evarts, E.V., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 66, 435 (1967).

33. Poochikian, G.K. and Gradock, J.C., Stability of Brompton Mixtures: Determination of Heroin (Diacetylmorphine) and Cocaine in Presence of Their Hydrolysis Products, *J. of Pharmaceutical Sciences*, 69, No. 6, 637 (1980).
34. The United States Pharmacopeia, 19th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975. p. 578.
35. Poochikian, G.K. and Gradock, J.C., *J. Chromatography*, 171, 371 (1979).
36. Murray, J.B. and Al-sheura, H., *J. Pharm. Pharmacol., Suppl.*, 28, 24 (1976).
37. Denisor, M.D., *Farm. Zh. Kiev*, 22, 74 (1967); *Chem. Abstr.* 68, 33158q (1968).
38. Sullivan, A.T., Twitchett, P.J., Fletcher, S.M. and Moffat, A.C., The Fate of LSD in the Body: Forensic Considerations, *J. Forensic Science Society*, 18, 89 (1978).
39. Twitchett, P.J., Fletcher, S.M., Sullivan, A.T. and Moffat, A.C., *J. Chromatography*, 150, 73 (1978). En Ref. 38.
40. Smith, R.L. and Williams, R.T., *J. Med. Primatol.*, 3, 138 (1974). En Ref. 38.
41. Aghajanian, G.K. and Bing, O.H.L., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 5, 611 (1964). En Ref. 38.
42. Siddik, Z.H., Ph.D. Thesis, University of London, 1975. En Ref. 38.

43. Ziegler, H.W., Beasley, T.H.Sr. and Smith, D.W., Simultaneous Assay for Six Alkaloids in Opium, Using High-Performance Liquid Chromatography, J. of the A.O.A.C., 58, No. 5, 888 (1975).
44. Beasley, T.H., Sr., Smith, D.W., Ziegler, H.W. and Charles, R.L., J. of the A.O.A.C., 57, 85 (1974).
45. Beasley, T.H., Sr., Ziegler, H.W., Charles, R.L. and King, P., Analytical Chemistry, 44, 1833 (1972).
46. The United States Pharmacopeia, 18th. Rev., Mack Printing Co., Easton, P.A. (1970) p. 460.
47. Smith, E., J. of the A.O.A.C., 53, 603 (1970).
48. Mannich, C., Arch. Pharm. Winheim, 273, 97 (1935). En Ref. 43.
49. Schultz, V.E., and Schneckenburger, J., J. Arch. Pharmacol. 298, 548 (1965). En Ref. 43.
50. Nelson, P.E., Fletcher, S.M. and Moffat, A.C., A Combined High-Performance Liquid Chromatography and Immunoassay Method for the Analysis of Morphine, Codeine and their Metabolites in Biological Fluids, J. Forens. Sci. Soc., 20, 195 (1980).
51. Wheals, B.B., Separation of Drugs by HPLC and the Application of Fluorimetric Detection to Drug Problems, J. High Pressure Liquid Chromatogr. Clin. Chem., Proc. Sym. 211 (1976).
52. Jane, I. and Wheals, B.B., J. Chromatography, 84, 181 (1973).
53. Jane, I., J. Chromatography, 111, 227 (1975).

54. Christie, J., White, M. and Wiles, J., J. Chromatography, (1976).  
En Ref. 51.
55. Jane, I. and Taylor, J.F., J. Chromatography 109, 37 (1975).
56. Katz, S. and Pitt, W.W., Anal. Lett., 5, 177 (1972).
57. Love, J.L. and Pannell, L.K., A High Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Illicit Heroin, J. of Forensic Sciences, 320 (1980).
58. Bruce, R. Keppler and William, W.M., Analytical Instrumentation in toxicology, Aviation Space and Environ. Med. 989 (1980).
59. Twitchett, P. J, Gorvin, A.E.P., Moffat, A.C., Williams, P.L. and Sullivan, A.T. An Evaluation of some HPLC columns for the identification and Quantitation of Drugs and Metabolites. Journal High Pressure Liq. Chromatogr. Clin. Chem. Proc. Symp. Issue: 76 201-209.