

10
Ley.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES³
FAC. DE QUIMICA**

**ESTUDIO CROMATOGRAFICO DEL EFECTO DE
ENMASCARAMIENTO DE LA FENILBUTAZONA
SOBRE DROGAS PROHIBIDAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

P R E S E N T A

BEATRIZ CATTORI LOPEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1988



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 está 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.

Indice

Introducción.....	Pág 3
-------------------	----------

Capítulo I

Antecedentes

1.1	El Control de la Medicación.....	5
1.2	Fenilbutazona, ejemplo de una droga antiinflamatoria no esteroideal	
1.2.1	Generalidades.....	12
1.2.2	Metabolismo.....	17
1.3	Técnicas analíticas en la identificación de drogas	
1.3.1	Extracción.....	21
1.3.2	Espectrometría de Ultravioleta.....	22
1.3.3	Cromatografía en capa delgada.....	24
1.3.3.1	Técnica.....	25
1.3.3.2	Comentarios.....	27
1.3.4	Cromatografía de Gases.....	29
1.3.4.1	Columnas capilares.....	29
1.3.4.2	Introducción de la muestra.....	30
1.3.4.3	Evaluación del proceso cromatográfico.....	31
1.3.4.4	Comentarios.....	33
1.3.5	Generalidades de la cromatografía de líquidos.....	34
1.3.6	Espectrometría de masas.....	35
1.3.7	Inmunoensayos.....	37

Capítulo II

Parte Experimental

2.1	Selección de drogas.....	39
2.2	Cromatografía en capa delgada	
2.2.1	Cromatografía de drogas puras.....	40
2.2.2	Cromatografía de Fenilbutazona y Oxifenbutazona.....	41
2.2.3	Análisis de muestras de orina.....	42
2.3	Cromatografía de gases	
2.3.1	Selección de la columna.....	43
2.3.2	Efecto de la Fenilbutazona en alta concentración.....	44
2.3.3	Análisis de muestras de orina con contenido de Fenilbutazona.....	45

Capítulo III

Resultados y Discusión

3.1	Cromatografía en capa delgada	
3.1.1	Cromatografía de drogas puras.....	46
3.1.2	Cromatografía de Fenilbutazona y Oxifenbutazona.....	47
3.1.3	Análisis de muestras de orina.....	51
3.2	Cromatografía de gases	
3.2.1	Selección de la columna.....	53
3.2.1.1	Factor de capacidad.....	59
3.2.1.2	Eficiencia.....	63
3.2.1.3	Selectividad.....	64
3.2.1.4	Resolución.....	64
3.2.1.5	Tiempo de análisis.....	68
3.2.2	Selección del tipo de inyección.....	67
3.2.3	Efecto de la Fenilbutazona en alta concentración.....	70
3.2.4	Análisis de muestras de orina con contenido de Fenilbutazona.....	77

Capítulo IV

Conclusiones

4.1	Cromatografía en capa delgada.....	82
4.2	Cromatografía de gases.....	84

Capítulo V

<u>Bibliografía</u>	86
---------------------------	----

Introducción

La Fenilbutazona es una droga antiinflamatoria no esteroidal ampliamente utilizada en el tratamiento de problemas musculoesqueletales en caballos de carreras.

La medicación previa a un evento deportivo puede afectar directa o indirectamente la ejecución de cualquier sujeto en competencia. En la mayoría de las jurisdicciones alrededor del mundo cualquier droga clasificada como estimulante, depresor, anestésico local, tranquilizante o narcótico está prohibida.

La Fenilbutazona está sujeta a un programa de medicación controlada en México. Esto significa que puede ser administrada en caballos de carreras el día anterior a la carrera e inclusive el mismo día de la carrera. El tiempo de eliminación de la Fenilbutazona del sistema biológico del caballo es de aproximadamente 48 horas y generalmente aparecen residuos de esta droga en el análisis de sangre y orina que se efectúan para el control de medicación.

Algunos químicos analistas de este área, sostienen que la Fenilbutazona encontrada en orina equina puede interferir con la detección de otras drogas. A este fenómeno se le conoce como enmascaramiento.

Sin embargo, la habilidad que pudiera tener la Fenilbutazona para enmascarar otras drogas ha sido un punto controvertido. Actualmente se sostiene que la concentración de Fenilbutazona en la muestra es un factor determinante para establecer la

posibilidad de enmascaramiento.

En este trabajo se manejan dos de las técnicas analíticas frecuentemente aplicadas para la identificación de drogas: la cromatografía en capa delgada y la cromatografía de gases. Ya que la técnica inicial de detección de drogas para lotes grandes de muestras es la cromatografía en capa delgada, fue necesario hacer el estudio de enmascaramiento en esta técnica.

La cromatografía de gases es considerada como método de confirmación para la identificación de drogas. Aquí, se hizo uso de columnas capilares y además de estudiar el fenómeno ya mencionado, el trabajo se enfocó a demostrar que el uso de dichas columnas puede traer una serie de ventajas.

Capítulo I

Antecedentes

1.1 El Control de la Medicación

En México, el Gobierno Federal a través de la Secretaría de Gobernación y en conformidad con la Ley Federal de Juegos y Sorteos crea en 1943 la Comisión Nacional de Carreras de Caballos y de Galgos. Esta tiene como objeto asegurar el cuidado y vigilancia en la celebración de carreras de caballos y galgos, como una actividad que fomente el deporte y aumente la corriente turística extranjera.

Con el fin de asegurar que las competencias se verifiquen en términos que protejan los intereses de los criadores, propietarios, público en general y el deporte en particular, se hace necesario, entre otras cosas, el control y regulación de la medicación en los animales. (25)

Que la medicación de caballos, galgos e inclusive humanos previa a un evento puede afectar directa o indirectamente la ejecución del sujeto es algo conocido.

Cualquier sustancia puede ser considerada como ilegal dependiendo de las reglas de la jurisdicción. En general, internacionalmente se prohíbe cualquier droga clasificada como estimulante, depresor, anestésico local, tranquilizante o narcótico.

Cualesquiera que sean las reglas de medicación en una determinada jurisdicción, se procede a tomar muestras de orina, sangre y raramente saliva o sudor que se analizan en búsqueda de drogas prohibidas. Estas muestras se analizan en un laboratorio situado en la pista o se mandan a un laboratorio distante, para su

análisis.

El laboratorio generalmente reporta los resultados dentro de 48 horas después de haber recibido la muestra. Si no se encuentra infracción alguna respecto a las reglas de medicación los premios involucrados pueden ser liberados. Cuando el analista encuentra indicios de una droga prohibida en una muestra, se tiene lo que se conoce como sospechoso. Ya que una muestra sospechosa no tiene evidencia ante la ley, inicialmente únicamente se le pone en aviso al entrenador.

Cuando un analista, en su opinión, tiene suficiente evidencia para identificar inequívocamente una sustancia prohibida, se le llama "positivo" a la droga identificada y se notifica a las autoridades para que tomen las medidas necesarias. El propietario involucrado está generalmente representado por un abogado y tiene la posibilidad de apelar ante las autoridades.

De ahí que sea tan importante contar con técnicas analíticas lo suficientemente confiables para poder dar un positivo que este respaldado por datos bien fundamentados. El dar un positivo sin suficiente evidencia puede tener serias implicaciones legales.

La medicación puede administrarse con diversos fines como se observa en la tabla I.

Tabla I

Categorías de la medicación

1. Medicación para ganar:

- a) Estimulantes de acción rápida: amfetamina, cocaína, narcóticos
- b) Crónica, dosis repetidas por semanas: vitaminas, anabólicos

esteroidales.

c) "Animales nerviosos": pequeñas dosis de tranquilizantes
Cualquiera de éstas se consideran ilegales.

2. Medicación para perder

a) Depresores: altas dosis de sedantes o tranquilizantes (ilegal)

3. Medicación para restaurar una ejecución normal

a) Drogas antiinflamatorias no esteroidales, como la
fenilbutazona y sus congéneres. Generalmente están permitidas
por debajo de un límite de concentración.

b) Corticoesteroides: para controlar el dolor en articulaciones,
permitidos ocasionalmente.

c) Anestésicos locales: bloquean conexiones nerviosas para
eliminar el dolor (ilegal).

4. Administración accidental: drogas presentes en el alimento
(cafeína).

5. Medicación para enmascarar otras drogas: administración de
dipirona, tiamina o fenilbutazona en grandes dosis.

6. Medicación para diluir drogas, diuréticos: furosemide,
ácido etacrínico, hidroclorotiazida, etc.

En la incidencia actual de medicación ilegal, los datos
estadísticos más confiables y completos son los de la AORC
(Association of Official Racing Chemists) que tiene los reportes
de todas las drogas detectadas por sus miembros desde 1947.

Tabla II

Drogas reportadas con más frecuencia por miembros de la AORC (1982-1986)

Droga	Veces reportada
Fenilbutazona	2349
Procaina	564
Cafeína	431
Flunixin	400
Furosemide	388
Oxifenbutazona	264
Dimetilsulfoxido	262
Polietilenglicol	259
Teobromina	202
Benzocaina	171
Prednisolona	130
Naproxen	89
Teofilina	86
Dipirona	83
Etorfina	69
Apomorfina	68
Dexametazona	66
Fenilpropanclamina	63
Acepromazina	54
Metilfenidato	39
Nefentermina	37
Acido etacrínico	35
Butorfanol	29
Nalbufine	23

Tabla III

Incidencia de Positivos por Número Total de Muestras

U.S.A y Canada	México	% positivos México	Sudamérica	Oriente	Europa	Total anual mundial	% Positivos anual
<u>1982</u>							
395397	14022		7989	120600	24912	562920	
<u>Positivos</u>							
1035	1	0.0671	60	109	121	135	0.22
<u>1983</u>							
440275	19969		7873	118773	26794	613684	
<u>Positivos</u>							
1035	27	0.1352	55	109	120	1346	0.22
<u>1984</u>							
538161	22183		6991	123960	21577	712872	
<u>Positivos</u>							
1459	168	0.7573	33	109	71	1840	0.26
<u>1985</u>							
509634	22708		6876	146781	22214	708213	
<u>Positivos</u>							
1224	39	0.1717	45	113	74	1495	0.21
<u>1986</u>							
780355	15706		9556	153076	28942	987635	
<u>Positivos</u>							
1304	38	0.66	76	120	133	1674	0.17

Si se analiza la tabla II, es sorprendente ver como la Fenilbutazona en estos últimos años ha estado a la cabeza de las drogas detectadas, comprensible si consideramos que la Fenilbutazona es como la aspirina de los caballos.

En la tabla III se muestran los datos para el periodo de 1982 a 1986. Se puede observar que la incidencia en violación a las reglas de medicación es pequeña, estando alrededor de 0.1-0.25 % del total de muestras analizadas. Si uno deduce de este pequeño porcentaje la proporción de positivos inadvertidos y la incidencia en la detección que es totalmente inefectiva, uno llega a estimaciones de menos de 1 en 1000 del uso de drogas prohibidas. Este sorprendentemente bajo porcentaje respecto a la violación a las reglas, apoya sólidamente la posición de las Comisiones de que la medicación en caballos está bastante bien controlada a nivel global y mundial. (14)

Hace aproximadamente una generación, cuando casi todas las drogas disponibles caían dentro de las categorías de estimulantes, depresores, narcóticos o anestésicos locales, la mayoría de las drogas no eran adecuadas para su uso en caballos de carreras. Sin embargo, a partir de entonces el desarrollo de drogas como la fenilbutazona ha dado lugar a una nueva categoría de drogas que son claramente benéficas para los animales, cuando se administran en concentraciones adecuadas. Este tipo de drogas son agentes terapéuticos legítimos, que se cree permiten correr a los caballos "a toda forma" sin exceder su constitución real. La popularidad y eficacia de estos agentes presionaron a las autoridades para permitir su uso en los 50's y 60's, y a

mediados de los 70' varias jurisdicciones aplicaron los llamados programas de medicación controlada.

Un programa de medicación controlada, es aquel bajo el cual ciertas drogas son aprobadas para su uso en caballos, el día antes de la carrera e inclusive el mismo día de la carrera.

Antes de institucionalizar un programa de medicación controlada, el Comité de Carreras de Caballos en California hizo un cuidadoso estudio del problema y elaboró los datos estadísticos más completos en este sentido. Este comité aprobó el uso de Fenilbutazona en caballos hasta el día antes de la carrera. (5)

El análisis de los niveles encontrados de Fenilbutazona en muestras de Estados Unidos, de una población de caballos que están dentro de un programa de medicación controlada, muestra (fig. 1) que el nivel promedio encontrado en plasma es de 9 ug/ml.

Respecto a la orina, los niveles encontrados son mayores con valores máximos de 165 ug/ml.

En México aún no se ha hecho un estudio estadístico respecto a la concentración de fenilbutazona encontrada en orina.

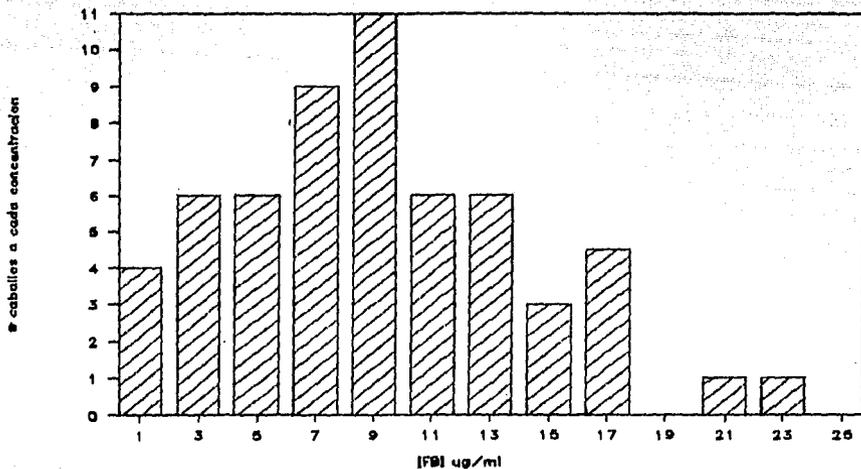


Fig. 1

Concentración de Fenilbutazona en Sangre de una Población de Caballos de un Programa de Medicación Controlada

1.2 Fenilbutazona, ejemplo de una droga antiinflamatoria no esterooidal.

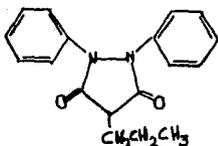
1.2.1 Generalidades

Un caballo de carreras promedio, compite alrededor de nueve veces por año y es galopado varias veces más. A toda velocidad, el caballo de carreras promedio alcanza velocidades de hasta 56 km por hora, poniendo todo el peso de impulso sobre las patas delanteras. Estas son estructuras asombrosamente efectivas para cargar el peso del animal durante la carrera y a veces las áreas en donde se distribuyen estas cargas son reducidas, aumentando la carga por unidad de área y la probabilidad de daño.

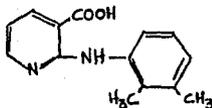
Otro evento que ocurre durante el ejercicio es que el hueso se ablanda al progresar el desgaste microscópico. Para romper el fémur al inicio de una carrera se necesitan alrededor de 78 kg/cm² de fuerza, pero la cantidad de desgaste microscópico que ocurre durante la carrera disminuye esta cifra a 4.4 kg/cm². El resultado final de esto es que la presión de una carrera rápida causa cambios sustanciales en huesos, articulaciones y ligamentos en todos los caballos, y no es de sorprender que un caballo, como cualquier atleta, tenga un daño en los tejidos después de una carrera.

Si se repite el proceso de la carrera y ésta se lleva a cabo en superficies duras, el daño puede dejar imposibilitado al animal. La imposibilidad será debida al dolor y a la inflamación, por lo que tendrá que ser tratado con drogas antiinflamatorias. Las drogas antiinflamatorias utilizadas en medicina veterinaria entran dentro de dos grupos: los corticoesteroides y las drogas antiinflamatorias no esteroideas.

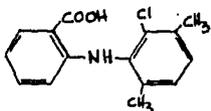
El miembro original de este último grupo es la aspirina. El segundo más antiguo es la Fenilbutazona, la cual se introdujo a la Medicina durante la Segunda Guerra Mundial. Las drogas antiinflamatorias no esteroideas comparten una serie de propiedades que parecen ser requeridas para su acción antiinflamatoria.



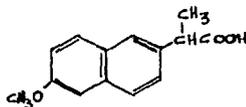
Fenilbutazona



Flunixin



Acido meclofenámico



Naproxen

Todas son drogas con un pK de 4.5 o menor. La naturaleza ácida de estas drogas significa que todas están en un 95-99% unidas a proteínas del plasma. Esta unión con las proteínas del plasma es importante ya que es por esto que las drogas de este grupo no pasan a la saliva, por lo que las pruebas de saliva son inútiles para su detección.

Parece ser que la naturaleza ácida les permite acumularse en tejidos inflamados que también tienden a ser ácidos.

Esta acumulación, les permite tener un mayor efecto en áreas inflamadas que en tejido normal.

Los efectos antiinflamatorios que producen este tipo de drogas se manifiestan por la inhibición de la producción de prostaglandinas. Estas se producen en grandes cantidades en tejidos inflamados y están involucradas con cambios del tejido que causan el enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor que asociamos con la inflamación.

Las prostaglandinas tienen otra acción peculiar, en el sentido de que actúan hipersensibilizando a los receptores del dolor en el área inflamada respecto a los agentes que causan el dolor.

En un caballo de tamaño normal (453.6 kg), una dosis de 2-3 gramos de Fenilbutazona intravenosa, o aproximadamente 4 gramos oralmente, deben producir un efecto antiinflamatorio óptimo. Dos gramos diariamente deben mantener el efecto. A medida que se incrementa la dosis, los niveles en sangre aumentan y la vida media de la droga en el plasma también aumenta (fig. 2). (12)

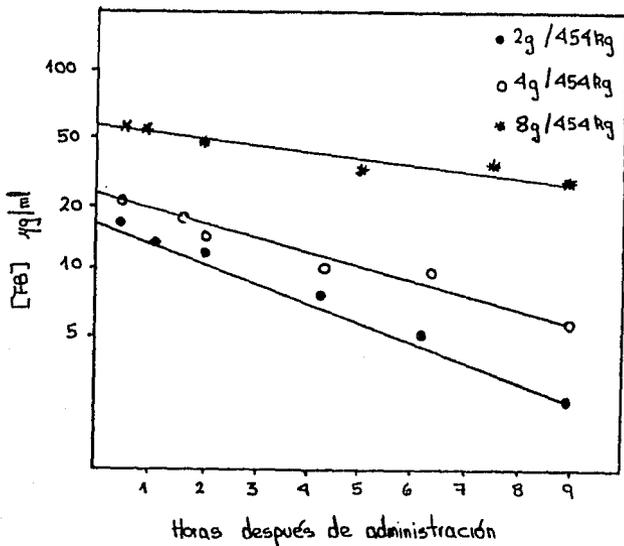


Fig. 2

Niveles de Fenilbutazona en plasma a diferentes dosis

Los niveles de Fenilbutazona en orina son generalmente mayores que los encontrados en plasma y los niveles de orina se detectan hasta por lo menos 24 horas después de la administración de una dosis de dos gramos/450 kg (fig.3).

EXCRECION DE FENILBUTAZONA (2g/1000 lb)

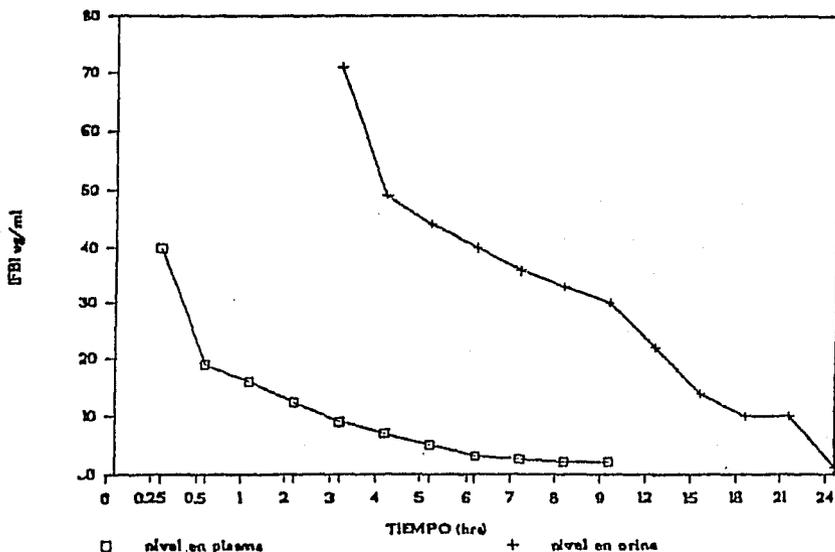


Fig. 3

Aunque la acción farmacológica de la Fenilbutazona se prolonga 24 horas, el tiempo que tarda el animal en eliminar la droga es más largo, como sucede con cualquier droga que se administra a un caballo. Ya que la Fenilbutazona se detecta con relativa facilidad, se puede detectar después de un periodo largo. La figura 4 muestra un experimento en el que se administró a varios caballos diversas dosis de Fenilbutazona hasta por 3 días. Los niveles en plasma empezaron en 20-30 ug/ml, disminuyeron y fueron

detectables 8 días después y en orina hasta 9 días después.

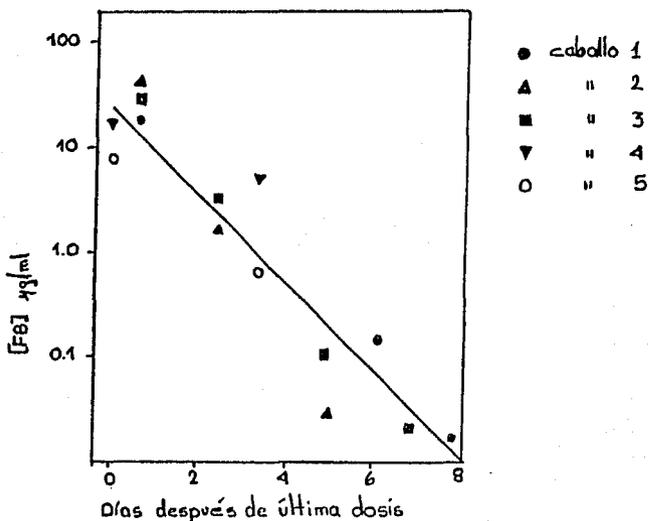


Fig. 4

Niveles de Fenilbutazona en Plasma de diversos Caballos

A pesar de que la detección de los tiempos de eliminación de Fenilbutazona depende de los métodos utilizados, se puede decir que la orina y el plasma están libres de Fenilbutazona después de 48-60 horas de que se administró la última dosis.

1.2.2 Metabolismo

Para poder interpretar los resultados analíticos en una investigación toxicológica, es necesario tener conocimiento acerca de la disposición y metabolismo de la droga.

Para que una droga sea absorbida y distribuida a través de los tejidos de un caballo hasta los puntos en los que produce el

efecto farmacológico debe ser relativamente liposoluble. Ya que esta característica es la que hace que una droga no sea excretada, la maniobra básica en el metabolismo de drogas es la de modificar la droga de tal forma que sea más hidrosoluble y menos liposoluble. Así, en una forma hidrosoluble puede pasar a través del cuerpo vía los riñones e hígado sin ser reabsorbida.

En la mayoría de los animales el metabolismo de las drogas ocurre predominantemente en el hígado. Parte del metabolismo también ocurre en los riñones, pulmones y pared intestinal. En el caballo, que tiene enzimas estererasas relativamente activas en el plasma, puede ocurrir una hidrólisis significativa de drogas que tengan grupos éster.

En las células del hígado ocurren una serie de reacciones que están consideradas en dos fases. En la Fase I el propósito es añadir un sustituyente pequeño que sea adecuado para la droga. Estas reacciones involucran generalmente la adición de grupos $-OH$, $-NH_2$ o $-COOH$. Estos cambios sirven para aumentar la solubilidad en agua y pueden alterar la actividad farmacológica de la droga.

Además estos cambios preparan a la molécula para la Fase II que consiste en una conjugación. En ésta la droga se une con una molécula grande, endógena hidrosoluble. Los productos conjugados son invariablemente farmacológicamente inactivos y propensos a ser rápidamente excretados.

La tabla IV muestra las biotransformaciones más frecuentes para las drogas.

Tabla IV

Grupo Ester: Hidrólisis

Anillos aromáticos: Hidroxilación

Grupo hidroxilo:

alifático: oxidación de la cadena, conjugación glucurónica.

aromático: metilación, conjugación.

Grupo carboxilo: conjugación glucurónica.

Grupo amino:

alifático: deaminación

aromático: acetilación, metilación, conjugación.

Las drogas con un grupo ester o amida son generalmente hidrolizadas en el plasma por esterases hepáticas. El primer paso en el tratamiento de grupos aromáticos es la hidroxilación del anillo. La vía más probable para grupos fenólicos o hidroxilos aromáticos es la conjugación glucurónica. Los grupos amino alifáticos tienden a ser deaminados, mientras que los grupos aminoaromáticos son conjugados o acetilados.

El metabolismo de la Fenilbutazona en el caballo es un buen ejemplo de la hidroxilación de un anillo y la cadena lateral en una droga (fig. 5). (20)

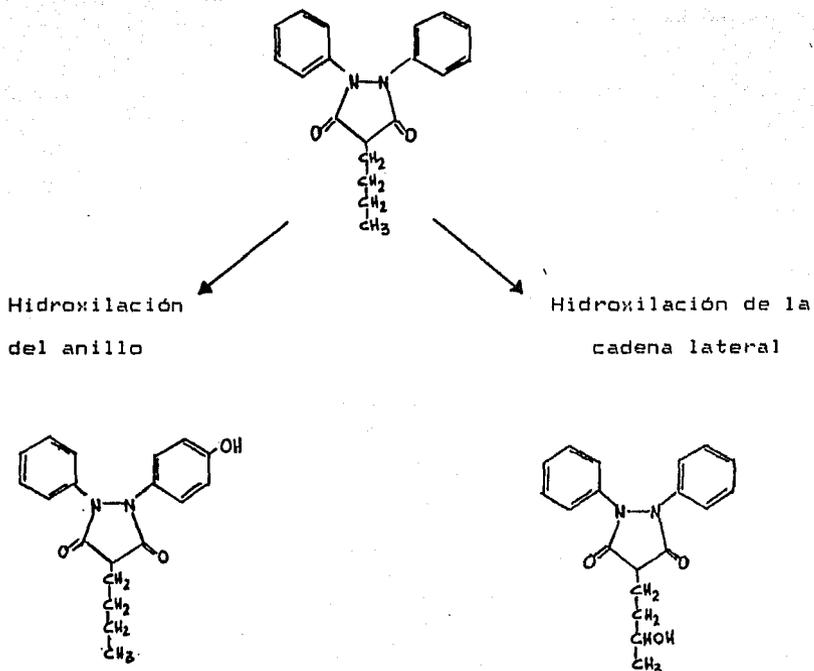


Fig. 5

Biotransformación de la Fenilbutazona

La hidroxilación en el anillo produce la Oxifenbutazona, que comparte muchas de las características farmacológicas de la Fenilbutazona y resulta ser el metabolito más persistente de la Fenilbutazona encontrado en la orina. La hidroxilación de la cadena lateral da lugar a la Hidroxifenilbutazona.

1.3 Técnicas analíticas en la identificación de drogas

1.3.1 Extracción

Los métodos de extracción toxicológica han de proporcionar concentrados o residuos adecuados para aplicar las técnicas de identificación. Estos métodos deben ser capaces de tratar con una gran variedad de muestras, eficientes a bajos niveles de concentración y aplicables a un gran número de diferentes sustancias.

Métodos de extracción directa

Un método típico de extracción directa es:

Transferir un volumen determinado de muestra a un embudo de separación, acidificar con HCl 2N y agregar 10 volúmenes de éter. Agitar por un minuto, separar la fase orgánica (Fracción A). Alcalinizar la fase acuosa remanente con NH_4OH 2N y extraer con 10 volúmenes de cloroformo (Fracción B).

Las fracciones pueden ser secadas filtradas, evaporadas y subdivididas si se trata de una mezcla compleja.

En general los disolventes orgánicos más utilizados son el cloroformo y el éter. La separación está basada en la naturaleza ácida o básica de las drogas.

La desventaja de estos métodos se presenta cuando se ha de trabajar con grandes lotes de muestras.

Extracción con resina no iónica

Cuando se tiene un lote grande de muestras por analizar el uso

de una resina capaz de adsorber sustancias orgánicas del agua, puede sustituir la extracción convencional con disolventes.

La orina se hace pasar por una columna conteniendo resina del tipo Amberlita XAD-2, y el efluente es descartado. Después de lavar la resina con agua, se seca y se eluye con un disolvente orgánico adecuado. El disolvente puede ser filtrado, secado y evaporado para aplicar las diferentes técnicas cromatográficas.

Una ventaja de este método es que pasando la orina por la resina, se extraerán prácticamente todas las drogas. De ahí que una elución pueda dar lugar a un extracto que contenga drogas ácidas, básicas y neutras. La desventaja estriba en que no puede ser fácilmente aplicado en sangre, por el gran volumen de muestra que se requiere.

Métodos de extracción por grupo

Este tipo de extracción está diseñado para extraer grupos particulares de drogas dependiendo de su carácter químico. Son útiles para confirmar la presencia de una droga de la que ya se tiene alguna información. A diferencia de los métodos de extracción directa se pueden utilizar disolventes diferentes a alcohol, éter o cloroformo. Así por ejemplo, se usa CH_2Cl_2 para extraer anticonvulsantes, acetato de etilo para diuréticos y heptano para fenotiazinas.

1.3.2 Espectrometría de Ultravioleta

En espectrometría de ultravioleta, si la droga está presente en concentración suficiente y si absorbe la luz UV, el instrumento detectará la absorbancia de la droga en un intervalo

definido de longitud de onda (generalmente 360-240nm). En la fig. 6 se muestra el espectro típico de la Fenilbutazona.

ESPECTRO UV FENILBUTAZONA

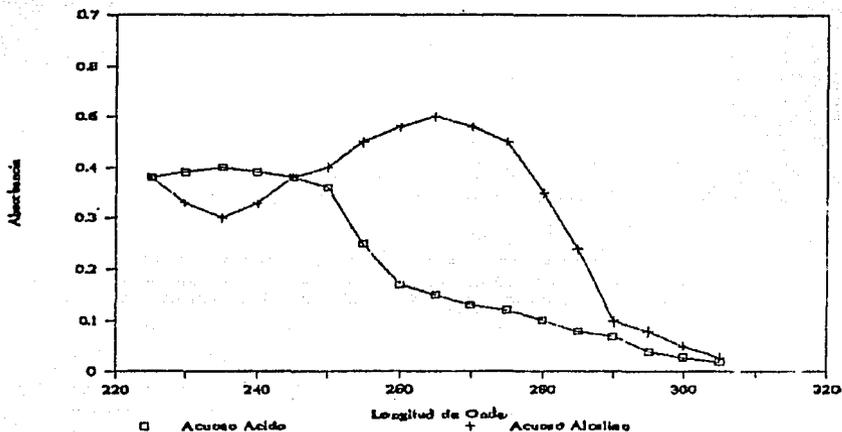


Figura 6
Espectro de UV de la Fenilbutazona

De la forma de la curva de UV y de las longitudes de onda en las que ocurren los picos el analista puede determinar la identidad de la droga.

Existen dos problemas principales con los datos de UV como base para identificar drogas. El primero es que varios compuestos comparten espectros de absorción similares, de tal forma que esta prueba no puede distinguir entre varios agentes. El segundo problema estriba en que la porción de la región utilizada es relativamente pequeña, lo que significa que existen a lo mucho doscientos diferentes valores para los picos de absorción. Si consideramos que alrededor del 20 % de los compuestos químicos conocidos absorben en la región del UV, entonces existen

4000 diferentes candidatos para cada pico de UV. Este problema se complica aún más por el hecho de que los extractos de orina contienen también compuestos desconocidos que absorben en el UV y tienden a confundir el panorama. De ahí que los datos de UV puedan sugerir la presencia de un compuesto pero no puedan identificarlo por completo.

1.3.3 Cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada es una de las técnicas más utilizadas para la separación e identificación de drogas. Es aplicable tanto para drogas puras, aquellas extraídas de formulaciones farmacéuticas y para muestras biológicas. Ha sido una de las técnicas analíticas preferidas debido principalmente a su simplicidad, confiabilidad, bajo costo y selectividad para la detección.

Es un método cromatográfico en el que una fase móvil avanza por acción capilar a través de una capa delgada uniforme (fase estacionaria) de un sólido finamente dividido y soportado en una placa. Cuando se aplica una mezcla de drogas a la placa y se desarrolla con una fase móvil, las drogas avanzan por la placa en diferentes grados, dependiendo de su solubilidad y capacidad de formar Puentes de Hidrógeno.

La cromatografía en capa delgada tiene una serie de ventajas respecto a la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos. El equipo utilizado es barato y simple. Además, se pueden correr varias muestras simultáneamente y debido a la gran flexibilidad para la selección de fase estacionaria y fase móvil,

resulta un método versátil.

Si bien la cromatografía en capa delgada tiene menor resolución y sensibilidad que la cromatografía de gases o de líquidos, la cromatografía en capa delgada de alta eficiencia, ha reducido enormemente estas desventajas.

1.3.3.1 Técnica

Con lo que respecta a la preparación de las placas, actualmente resulta más práctico para el trabajo de grandes lotes de muestra la compra de placas comerciales.

Aplicación de las muestras

La aplicación se realiza a 1 cm de la orilla inferior de la placa dejando 1 cm de espacio entre los puntos de aplicación. La aplicación de muestra no pasa de 10 μ l de volumen., esto se logra con el uso de micropipetas o tubos capilares. Es importante que la mancha no tenga más de 4mm de diámetro. El disolvente utilizado para aplicar la muestra ha de ser volátil.

Desarrollo de las placas

Generalmente se utiliza una cámara de vidrio como la que se muestra en la figura 7.

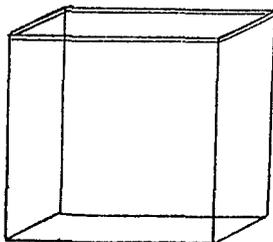


Figura 7

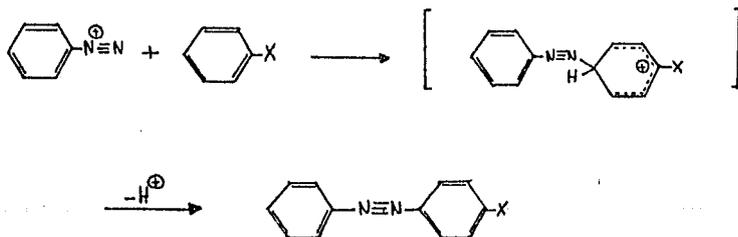
El tanque se deja equilibrar con el disolvente adecuado por 30 minutos. Pasado esto, la placa se introduce verticalmente. Generalmente se permite que el disolvente ascienda hasta 1 cm del borde superior de la placa, se saca la placa de la cámara, se seca con aire caliente y se procede a examinar la placa.

Visualización

Ya que la mayoría de los compuestos orgánicos son incoloros, deben hacerse visibles, preferentemente con ayuda de una técnica no destructiva.

Muchos compuestos pueden ser localizados examinando las placas bajo luz ultravioleta si la fase estacionaria contiene un indicador fluorescente.

También se pueden utilizar reactivos especiales de visualización, los cuales dependiendo de su composición reaccionan con determinados grupos funcionales de la sustancia desconocida, dando un color específico. Así, por ejemplo, la prueba de diazotización se utiliza para compuestos que contengan una amina aromática primaria. Consiste en exponer la placa a vapores de NO y posteriormente rociarla con naftiletilendiamina o -naftol alcalino. (1)



Factor de retención, Rf

La medición cromatográfica fundamental en cromatografía de capa fina es el Rf, expresado como:

$$Rf = \frac{\text{distancia que recorrió la sustancia desde el origen}}{\text{distancia que recorrió el disolvente desde el origen}}$$

Este valor puede verse afectado por una serie de factores que incluyen la composición del disolvente, el tiempo de desarrollo, el tamaño de la cámara y el tiempo que el tanque ha sido equilibrado con el disolvente. De ahí que se tenga que tener cuidado con la interpretación de los valores obtenidos.

1.3.3.2 Comentarios

El número de manchas que uno puede separar por este medio es alrededor de 20. Con aproximadamente 4.2 millones de candidatos químicos (8), uno tiene alrededor de 210,000 sustancias posibles para cada mancha. Una reacción de color u otra reacción marcadora, reduciría este número 100 veces y dejaría solamente a 2000 candidatos para cada mancha. Ciertas condiciones específicas de extracción podrían reducir este número aún más. Este problema de falta de especificidad, también presente en esta técnica, impone limitaciones en la confiabilidad de una identificación positiva.

Aún la cromatografía de capa delgada de alta eficiencia, que bajo condiciones óptimas es dos veces más eficiente, es también incapaz de generar datos suficientemente específicos de identificación.

Debido a esta falta de especificidad se eligen diferentes sistemas de cromatografía en capa delgada, para comparar una droga estándar y un problema. Si nuevamente las manchas migran la misma distancia, la posibilidad de que sea la misma droga se ve aumentada. En un procedimiento experimental, Sunshine (13) cromatografió 138 drogas en 4 sistemas de disolventes diferentes. Así, fue incapaz de separar 25 de estas drogas en estos 4 sistemas y en experimentos con hasta siete sistemas, se encontraron todavía sobreposiciones.

Una conclusión razonable para estos experimentos es que el número de sistemas de disolventes requeridos para separar soluciones puras de sólo las 4000 drogas de uso común, sin que se sobrepongan, sería astronómico e imposible de utilizar en un laboratorio común.

También es importante recordar que este 20% de sobreposición observado en los experimentos de Sunshine, con cuatro sistemas de cromatografía en capa delgada, se refería únicamente a soluciones de drogas puras. Los sistemas múltiples para la identificación de drogas en muestras biológicas complejas deja abierta otra fuente de error, aquella debida a positivos parcialmente falsos. Estos falsos positivos podrán ocurrir debido a la coincidencia de dos sustancias inherentes en la muestra biológica, de las cuales ninguna por sí sola daría lugar a un positivo falso.

De tal forma que la cromatografía en capa delgada es una prueba que puede probar la ausencia de una droga pero no puede, aún con el uso de sistemas múltiples, probar su presencia. Así, no es considerada como una prueba suficientemente específica por las

autoridades forenses.

1.3.4 Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases, como cualquier otra forma de cromatografía, es un método de separación de mezclas.

La separación se lleva a cabo en una columna que contiene una fase estacionaria sólida o líquida, que es mantenida a una temperatura definida en un horno y que tiene un flujo constante de gas acarreador (fase móvil). Cuando se inyecta una mezcla de sustancias, cada componente es transportado hacia el detector, estableciendo un equilibrio de concentración del componente entre la fase estacionaria y la fase gaseosa.

Las moléculas que tengan una mayor afinidad por la fase estacionaria pasarán más tiempo en ésta y consecuentemente tardarán más en llegar al detector. Este detector produce una señal dependiendo de la sustancia que vaya pasando y esta señal es alimentada y procesada en un integrador.

La cromatografía de gases puede estar clasificada en cromatografía gas-sólido (proceso principalmente adsorptivo) y cromatografía gas-líquido (proceso de partición), esto dependerá de si la fase es un sólido o un líquido.

1.3.4.1 Columnas capilares

Existen columnas capilares de vidrio, acero inoxidable y sílice fundida. El diámetro exterior de la columna es generalmente de 0.5 mm mientras que el interno puede variar de 0.05 mm a 0.5 mm. La longitud de la columna puede variar entre 5 y 100 metros, pero

las comúnmente utilizadas están entre 10 y 50 metros.

Si la superficie de la columna está directamente cubierta con la fase líquida, entonces se trata de las columnas WCOT (wall coated open tubular) mientras que si la columna tiene una capa inicial de soporte sólido, se tienen las columnas SCOT (support coated open tubular).

Con las técnicas de recubrimiento se pueden producir espesores de película líquida del orden de 0.1-5.0 μm . Las columnas de alta eficiencia poseen una película delgada, pero tienen una menor capacidad de carga.

Las columnas capilares ofrecen una serie de ventajas, pero requieren un diseño de instrumentos más complejos. La resolución que se obtiene puede ser utilizada para separar mezclas complejas o aumentar la certeza de que un componente sea correctamente identificado.

La alta eficiencia lleva a obtener picos finos y delgados, que permiten aumentar la relación de la señal respecto al ruido y por ende elevar los límites de detección.

Las columnas cortas (2-10 metros) pueden ser utilizadas, dando resoluciones similares a las columnas empacadas, para obtener tiempos de análisis cortos.

1.3.4.2 Introducción de la muestra

Técnicas de inyección para columnas capilares

Inyección con divisor (split)

Un divisor en la entrada del inyector permite que exista un alto flujo en el inyector, pero mantiene un flujo bajo en la

columna, eliminando el exceso de gas y muestra hacia la atmósfera. La relación de los dos flujos (relación de división) es la proporción de la muestra inyectada que entra a la columna. La función del divisor no es sólo la de reducir el volumen de la muestra, también la de asegurar que ésta entre a la columna rápidamente y no sea diluida exponencialmente. El flujo total en el inyector puede ser de 10-400 ml/min, dando relaciones de división del orden de 10:1 hasta 500:1. Un buen divisor debe ser lineal, es decir que ha de dividir en la misma proporción compuestos de alto y bajo punto de ebullición.

Inyección sin divisor (splitless)

La inyección puede ser directa a la columna o utilizando una guía sin división de flujo.

En ambos casos, la parte superior de la columna se mantiene a una temperatura suficientemente baja para que el disolvente que contenga la muestra se condense. Este frente de disolvente condensado actúa como una barrera, haciendo que la muestra sea fuertemente retenida, concentrándose en una banda estrecha. Justo en este momento, la columna es calentada rápidamente hasta la temperatura inicial de operación. El disolvente empieza a evaporarse y la cromatografía empieza.

Es necesario poner mucho cuidado en la selección del disolvente, pues hay que considerar su punto de ebullición, la fase estacionaria y la composición de la muestra.

1.3.4.3 Evaluación del proceso cromatográfico

La evaluación del funcionamiento de una columna, sea empacada o capilar está basada en la eficiencia y la forma del pico

(simetría del pico). Para la selección de una columna adecuada, es necesario considerar también la selectividad, el factor de capacidad y la resolución de los compuestos por analizar.

EFICIENCIA: La eficiencia depende del grado de ensanchamiento de la banda relativa al tiempo en que tarda en eluir. Es medida en platos teóricos (N), por analogía a la destilación. El plato teórico considera el equilibrio del soluto entre las fases móvil y la estacionaria. Se expresa como:

$$N = 16[tr/w]^2 \text{ o } N = 5.54[tr/w_{1/2}]^2$$

Donde tr = tiempo que pasa desde la inyección hasta el máximo del pico.

w = el ancho del pico a la base

$w_{1/2}$ = el ancho del pico a la mitad de la altura

FACTOR DE CAPACIDAD: Expresa la relación entre el tiempo que el soluto permanece en la fase estacionaria y el tiempo que permanece en la fase móvil.

$$k = tr' / tm$$

Donde tr' = tiempo de retención ajustado. Mide el tiempo que el compuesto está realmente retenido en la fase estacionaria.

$$tr' = tr - tm$$

tm = tiempo muerto. Es el tiempo requerido para eluir un componente no retenido. Es el tiempo que cualquier componente está en la fase móvil.

SELECTIVIDAD (α): Se expresa como k_2/k_1 , donde k_2 y k_1 corresponden al factor de capacidad del compuesto 1 y 2. A mayor valor de α , más selectiva resulta la columna y por ende se obtiene una mayor resolución entre el compuesto 1 y 2.

RESOLUCION (R): Es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos y puede ser expresada como:

$$R = 2(tr_2 - tr_1) / (w_1 + w_2)$$

Tanto la eficiencia como la selectividad y el factor de capacidad son elementos que afectan a la resolución. Esto se ve claramente en la expresión de la ecuación general de la resolución:

$$R = \sqrt{N} / 4 (\alpha - 1/\alpha) (k'/1+k')$$

1.3.4.4 Comentarios

Respecto al problema de especificidad, la mayoría de los laboratorios de este ramo, utilizan sistemas que posibiliten la existencia de análisis cortos, del orden de minutos. Con estos sistemas, se pueden separar más de 100 compuestos. En vista de que existen alrededor de 800000 compuestos que pueden ser volatilizados, puede haber 8000 candidatos por pico cromatográfico.

Debido a este problema, el procedimiento usual es cambiar la temperatura de trabajo de la columna y ver si el compuesto sigue teniendo relación con el sospechoso. Después se procede a correr el par, sospechoso-problema, en una columna diferente y a tres temperaturas diferentes. Si la relación resulta ser la misma el analista puede concluir que ha identificado la droga.

Nuevamente, ya que la cromatografía de gases no proporciona datos suficientemente específicos, no se pudo concluir de un análisis de GC que se ha identificado definitivamente la droga. Si bien la cromatografía de gases es más eficiente que la cromatografía de capa delgada, no se tiene en claro que tan confiable es realmente. Algunos analistas sugieren un 10% de error en la identificación por TLC y GC, mientras que otros sostienen que la cromatografía en tres diferentes columnas es una buena evidencia para la identificación, considerando que el factor más importante es la habilidad del analista.

1.3.5 Generalidades de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

Es similar a otros tipos de cromatografía. Trabaja con una fase estacionaria (columna empacada) y una fase móvil (eluyente). Su nombre deriva del hecho de que trabaja con un líquido que funge como eluyente.

Las características físicas de la fase estacionaria otorgan a esta técnica alta eficiencia, resolución y velocidad.

La cromatografía de líquidos complementa a la cromatografía de gases y la de capa delgada. La cromatografía de capa delgada requiere de aparatos relativamente simples y baratos y particularmente es el método general de identificación. Pero no puede competir con la alta resolución y sensibilidad que ofrecen HPLC y la cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es el método de elección para compuestos que son altamente volátiles, pero no es adecuada para sustancias de baja volatilidad o para sustancias con grupos

altamente polares (metabolitos de drogas, drogas conjugadas, etc.). Tampoco es adecuada para compuestos termolábiles. Para estos casos, la opción es HPLC.

Dentro de estos extremos, existen drogas que pueden ser analizadas tanto por cromatografía de gases o de líquidos, dependiendo de la disponibilidad del equipo que se tenga.

Una diferencia entre la cromatografía de líquidos y de gases, concierne también a los métodos con los que la resolución y los tiempos de retención pueden ser controlados o modificados. En la cromatografía de gases, la temperatura y la fase estacionaria son los que tienen un efecto significativo. En HPLC, la composición de la fase móvil puede afectar estos factores.

En sí, la cromatografía de líquidos no es un buen método de identificación general, pues no existe un sistema universal de elución o un detector universal. La cromatografía de gases satisface estos requisitos de universalidad con la utilización de fases de baja polaridad (polidimetilsiloxanos) y el detector de ionización de llama.

1.3.6 Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas se basa en la ionización y subsecuente fragmentación de las moléculas, determinándose la relación masa/carga (m/z) y las abundancias relativas de los iones que se generan. Los grupos funcionales de la molécula son los que dirigen la fragmentación, de tal forma que sabiendo la estructura de las moléculas es posible predecir el patrón de fragmentación. Inversamente, si se sabe el patrón de

fragmentación, se puede sugerir la estructura de la molécula original. Adicionalmente, la técnica permite la determinación de la masa molecular.

La ventaja de la espectrometría de masas, sobre las otras técnicas analíticas utilizadas, estriba en la amplia gama de muestras que pueden ser analizadas. En muchos casos, un solo espectro de masas permite la identificación absoluta de un compuesto. Además, la sensibilidad y especificidad de la técnica, permiten la cuantificación a nivel de picogramos.

Las principales desventajas de este método son su costo y su complejo manejo. La interrelación de los módulos electrónicos que constituyen el equipo, hacen que su manejo se lleve a cabo por un especialista además de que la probabilidad de una falla técnica siempre está latente. Un espectrómetro de masas puede ser muy costoso, dependiendo de las facilidades disponibles. Tomando en cuenta la depreciación, el mantenimiento, las refacciones, etc., el costo mínimo de operación (1985) era de 150 U.S. dólares por hora. En vista de que el análisis de 2-3 muestras provenientes de un equipo de cromatografía de gases, se lleva alrededor de una hora, la técnica resulta ser bastante costosa.

Esto debe considerarse para los resultados que se esperan obtener y por ende, la espectrometría de masas no debe utilizarse para análisis de rutina que podrían ser llevados a cabo con técnicas menos costosas.

Aún así, la espectrometría de masas, ya sea individual o en combinación con un equipo de cromatografía de gases es el método

más efectivo para la identificación de drogas y sus metabolitos.

1.3.7 Inmunoensayos

Este tipo de ensayos desempeñan un papel importante dentro de los métodos de rutina para el análisis de drogas en fluidos biológicos.

La popularidad que tienen actualmente este tipo de pruebas está basada en la alta sensibilidad que ofrecen. Además no necesitan de un paso preliminar de extracción.

La técnica de inmunoensayo utiliza un anticuerpo específico para la droga que se esté analizando y una forma marcada de la misma droga. El método depende de la habilidad que tenga la droga para competir en la reacción por el anticuerpo. Idealmente, la droga marcada debería participar en la reacción como si no estuviera marcada, pero en la realidad, se presentan desviaciones.

El marcador puede ser un radioisótopo, una enzima activa o un marcador fluorescente.

La técnica básica, consiste en situar una cantidad determinada de anticuerpo en un tubo, junto con otra cantidad fija de droga marcada, contando también con la droga no marcada por analizar.

Los sitios específicos del anticuerpo se unirán tanto a la droga marcada (Droga*), como a las moléculas de la droga no marcada (Droga).

Droga*--Anticuerpo

Droga* + Droga + Anticuerpo =====>

Droga --Anticuerpo

Utilizando una técnica de detección adecuada, los resultados se

comparan con una curva de calibración.

En el radioinmunoensayo, la medición se hace en función de la radioactividad. En aquellos ensayos donde el marcador sea una enzima activa o una sustancia fluorescente, la detección se hará con métodos ópticos de análisis, tales como la espectrometría de ultravioleta, fluorometría o luminiscencia.

Actualmente, para el análisis de grandes lotes de muestras, se utilizan sistemas totalmente automatizados. Estos instrumentos, son capaces de llevar a cabo análisis rápidos de grandes lotes de muestras.

Capítulo II

Parte experimental

2.1 Selección de drogas

Las drogas que se seleccionaron como candidatos para el estudio de un posible enmascaramiento por parte de la Fenilbutazona, fueron escogidas de la lista de drogas que formaron parte del examen 1986-1987 que llevó a cabo The Association of Official Racing Chemists para sus miembros en todo el mundo. De esa lista, se trabajaron con las drogas de las que se pudo obtener estándares:

acepromazina	fenobarbital	oxifenbutazona
amfetamina	fenilpropanolamina	promazina
banamina	furosemide	prednisona
benzocaina	fenilbutazona	procaina
butorfanol	guaifenesin	pirilamina
cafeína	hidroclorotiazida	triclormetiazida
clorfeniramina	ibuprofen	teofilina
clorpromazina	lidocaina	tetracaina
dexametazona	mepivacaina	teobromina
diflunisal	ácido meclofenámico	
difilina	mefentermina	
diazepam	metocarbamol	
efedrina	naproxen	
ácido etacrínico		

Se hicieron soluciones de 0.01 g/ml de cada una de las drogas, utilizando disolventes orgánicos adecuados para cada una, dependiendo de su solubilidad (metanol, etanol, éter, cloroformo

y acetona, grado analítico).

Para la Fenilbutazona se preparó una disolución base de 1000 ug/ml. Todas ellas se mantuvieron en refrigeración.

2.2 Cromatografía en placa de capa delgada

2.2.1 Cromatografía de drogas puras

Las técnicas de cromatografía de capa delgada fueron las utilizadas por los Laboratorios Control Químico S.A. de C.V., miembro de The Association of Official Racing Chemists.

Se utilizaron placas Macherey-Nagel de sílica gel de 10x20cm con 0.25 mm de espesor (Sil G 25 UV 254) con indicador de fluorescencia. Las disoluciones de las drogas puras se aplicaron directamente utilizando pipetas Eppendorf, cuidando que el diámetro de la mancha aplicada no fuera mayor de 4mm. Los puntos de aplicación se situaron a 1 cm del borde inferior de la placa y dejando 1 cm entre cada mancha, dando lugar a 20 manchas por placa.

Las placas se desarrollaron dejando que el sistema de disolventes llegara a 75 mm del borde superior de la placa.

Sistemas de disolventes y visualización

Se utilizaron dos sistemas para desarrollar las placas:

-El sistema A consistió en cloroformo:metanol (90:10). Las placas se desarrollaron en este sistema y se examinaron bajo radiación UV (254 y 360 nm). Posteriormente las placas se rociaron con el reactivo Mandelin, consistente de 0.5g de vanadato de amonio en 100 ml de H₂SO₄ concentrado. Las placas se calentaron en una estufa (100-105°C) por cinco minutos.

Posteriormente se rociaron con Na₂NO₂ (1 g de Na₂NO₂ en 99 ml de

agua + 1 ml de H_2SO_4) y naftiletildiamina (solución al 5% en metanol.

-El sistema B consistió en acetato de etilo:metanol:amoníaco (85:10:5). Después del desarrollo y la visualización al UV, las placas se rociaron con ninhidrina (0.5 g de ninhidrina +10 ml de HCl +90 ml de acetona). Se calentaron ($100-105^\circ C$) por cinco minutos y se rociaron con Ludy Tanger (5g de carbonato de bismuto en 15 ml de HCl. Agregar 30 g de KI y 85 ml de agua cuidadosamente. Diluir 1 volúmen de esta solución con 4 volúmenes de agua).

Medición y datos

Todas las manchas visualizadas en cualquiera de los dos sistemas se encerraron en un círculo utilizando un lápiz, en cada paso de visualización. Además se anotaron el color, apariencia y R_f (relativo a cafeína) de las manchas.

2.2.2 Cromatografía en capa delgada de la Fenilbutazona y la Oxifenbutazona

Con respecto a la Fenilbutazona, a partir de la solución base de 1000ug/ml se hicieron diluciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 y 7.8 ug/ml. Se procedió a tomar 1 ml de cada una de estas diluciones y se evaporaron por separado bajo atmósfera de nitrógeno. La aplicación, desarrollo y visualización de cada dilución se llevaron a cabo como se describe en la sección 2.2.1 de esta Parte Experimental.

Considerando que la Oxifenbutazona es el principal metabolito de la Fenilbutazona, se procedió a estudiar su comportamiento a 125 ug/ml y a 500ug/ml, comparándolo con la Fenilbutazona en las

mismas concentraciones. Se procedió a preparar mezclas de FB y OFB en estas concentraciones:

Mezcla I: 1ml FB (125 ug/ml) + 1ml OFB (125 ug/ml)

Mezcla II: 1ml FB (500 ug/ml) + 1ml OFB (500 ug/ml)

El procedimiento de aplicación, desarrollo y visualización fue el mismo que se siguió anteriormente con las diluciones de FB .

2.2.3 Análisis de muestras de orina

De las muestras que se trabajan rutinariamente en Control Químico S.A. de C.V., se escogieron los casos en los que se visualizó la presencia de Fenilbutazona.

De cada muestra se tomaron 100 ml de orina y se les aplicó la técnica de extracción que utiliza el Laboratorio. La cual se basa en el uso de la resina XAD-2. (Veáse Sección 1.3.1 de los Antecedentes)

Se obtuvieron las fracciones AB (básica) y AA (ácida) de cada muestra, se evaporaron y se recuperaron con dos gotas de diclorometano para posteriormente aplicarlas en la placas de cromatografía.

2.3 Cromatografía de gases

Inicialmente se trabajó con las disoluciones de las drogas puras utilizadas para el análisis de cromatografía en capa fina.

(Véase Sección 2.1 de la Parte Experimental)

2.3.1 Selección de la columna

Con el fin de encontrar la mejor columna para trabajar, se consideraron los siguientes factores: tiempo de análisis, selectividad, eficiencia, factor de capacidad y resolución. Este estudio siempre se hizo en relación a la Fenilbutazona.

Se utilizaron tres columnas capilares diferentes:

1. Alltech RSL 300 (polifenilmetilsiloxanos) fase unida de sílica fundida de 30 m de longitud por 0.25 mm de diámetro. Con espesor de película de 0.2 u. (polaridad intermedia)
2. Alltech RSL 150 (metilsilicón) fase unida de sílica fundida de 30m x 0.25 mm. Espesor de película: 0.25 u. (no polar)
3. HP High performance capillary column. Crosslinked Metil Silicene. 6.5m x 0.2mm. Espesor de película: 0.33 u.

(Fase no polar)

Condiciones generales de trabajo

Equipo: Hewlett Packard 5990 y 5980

Gas transportador: Hidrógeno

Detector de ionización de llama: H₂ :30ml/min, aire: 350ml/min

N₂ :25ml/min

Temperatura: 300°C

Inyector: Temperatura: 300°C.

Tipo de inyección: split (con divisor)

Se trabajó a temperatura isotérmica del horno = 225°C

Condiciones individuales para cada columna

Columna	HP	RSL 300	RSL 150
tiempo muerto(seg)	3.6	61.20	61.20
Velocidad lineal de flujo(cm/seg)	188.5	49.02	49.02
Volumen de la columna(ml)	0.20410	1.4719	1.4719
Flujo en la columna(ml/min)	3.4017	1.4430	1.4430
Flujo en split(ml/min)	100	110	116
Relación split	29.39	76.23	80.39

Procedimiento

Dé las dos técnicas de inyección más frecuentes se optó por utilizar la técnica con divisor.

Se inyectó 1 μ l de cada disolución de las drogas puras en cada una de las columnas. Con ayuda del integrador se obtuvo tr, área y la relación area/altura de cada una de las drogas. Datos que fueron útiles para el cálculo de la eficiencia, resolución, selectividad y factor de capacidad de cada caso, respecto a la Fenilbutazona.

2.3.2 Efecto de la Fenilbutazona en Alta Concentración

Se trabajó con la columna HP y con la técnica de inyección con divisor y un programa de temperatura : 130° C \rightarrow 240° C, 20° C/min, con un minuto de temperatura final. La temperatura del inyector y del detector fue de 300° C.

Las condiciones de los gases fueron las mismas que las mencionadas en la sección 2.3.1 de esta Parte Experimental.

Se prepararon soluciones de Fenilbutazona de 100 mg/ml, 4 mg/ml, 24 mg/ml, 9.50 mg/ml y 4.0 mg/ml. Se inyectó 1 μ l de cada una de las disoluciones y se procedió a analizar los cromatogramas.

2.3.3 Análisis de muestras de orina con contenido de Fenilbutazona

Nuevamente de las muestras que se trabajan rutinariamente en Control Químico S.A. de C.V. se escogieron los casos en los que se visualizó Fenilbutazona por cromatografía de capa delgada.

De cada muestra se tomaron 100 ml de orina y se les aplicó la técnica de extracción que utiliza el Laboratorio. La cual se basa en el uso de la resina XAD-2. Por cromatografía de capa delgada se visualizó cual de las dos fracciones (ácida o básica) presentaba a la Fenilbutazona en mayores niveles y se procedió a trabajar con el extracto definido para determinar la concentración de la misma. Los extractos siempre fueron recuperados con 0.5 ml de metanol grado analítico.

Se trabajó con la columna HP y con la técnica de inyección con divisor. La temperatura del inyector y del detector fue de 300° C. El programa de temperatura fue: 130° C -> 240° C, 20° C/min, con un minuto de temperatura final. Las condiciones de los gases fueron las mismas que las mencionadas en la sección 2.3.1 de esta Parte Experimental.

Con el método del estándar externo, utilizando una curva de calibración, se procedió a determinar las concentraciones en las diferentes muestras.

Capítulo III

Resultados y Discusión

3.1 Cromatografía en placa de capa delgada

3.1.1 Cromatografía de drogas puras

La tabla V muestra los datos obtenidos para las drogas puras en los sistemas A y B.

Tabla V

Droga	Rfr	SISTEMA A		Diazo	UV
		Mandelin	Mandelin		
acepromazina	0.51	rosa	rosa	café	+
amfetamina	-	-	-	-	-
banamina	0.37	-	-	-	-
benzocaina	1.2	-	-	bugambilia	+
butorfanol	-	-	-	-	-
cafeína (Rf) 4.5cm	-	-	-	-	+
clorfeniramina	0.19	-	-	-	+
clorpromazina	0.56	rosa	rosa	morado	+
dexametazona	0.65	amarillo	permanece	verde	+
diflunisal	0.14	azul claro	"	-	+
difilina	-	-	-	-	-
diazepam	1.23	amarillo	permanece	canario	+
efedrina	0.30	beige	"	violáceo	+
ac. etacrínico	0.25	-	-	-	+
fenobarbital	0.96	-	-	-	+
fenilpropanolamina	-	-	-	-	-
furosemide	0.23	-	-	rosa mex.	azul
guaifenesin	0.74	blanquecino	"	violáceo	+
hidroclorotiazida	0.22	-	-	rosa	+
ibuprofen	-	-	-	-	-
lidocaina	1.19	-	-	violeta	+
mepivacaina	0.67	-	-	-	+
a.meclofenámico	0.71	morado	permanece	permanece	+
mefentermina	-	-	-	-	-
metocarbamol	0.75	gris	gris	morado	+
naproxen	0.76	-	café	café	+
oxifenbutazona	0.74	amarillo	amarillo	violáceo	+
promazina	0.46	rosa	rojizo	desaparece	+
prednisolona	0.89	-	-	-	+
procaína	0.36	beige	-	bugambilia	blanco
pirilamina	0.38	rosa	permanece	-	+
triclormetiazida	0.36	-	-	-	+
teofilina	-	-	-	-	-
tetracaina	0.55	-	-	violeta	+
teobromina	-	-	-	-	-

SISTEMA B

Druga	Rfr	Ninhidrina	Ludy Tanger	UV
acepromazina	0.36	amarillo	naranja	+
amfetamina	0.95	morado	naranja	+
banamina	0.22	-	naranja	+
benzocaina	1.61	-	rojo	+
butorfanol	0.57	-	rojo	+
cafeina	4.0cm	-	rojo	+
clorfeniramina	0.90	-	"	+
clorpromazina	0.73	rosa	"	+
dexametazona	1.5	rosa	rojo claro	+
diflunisal	0.32	-	-	+
difilina	0.30	-	rojo	+
diazepam	1.37	verde tenue	rojo	+
efedrina	0.54	bugambilia	rojo	+
ac. etacrinico	0.12	rosa	rojo	+
fenobarbital	0.43	-	-	+
fenilpropanolamina	0.68	-	naranja	+
furosemide	0.14	rosa	gris	+
guaifenesin	0.81	-	naranja	+
hidroclorotiazida	-	-	-	-
ibuprofen	0.1	-	rojo, blanco	+
lidocaína	1.47	-	rojo	+
mepivacaina	1.26	-	naranja	+
ac. meclofenámico	0.35	-	rojo	+
mefentermina	0.71	rosa	rojo	+
metocarbamol	0.27	-	rojo	+
naproxen	0.12	-	-	+
oxifenbutazona	0.5	-	naranja	+
promazina	0.40	rosa	naranja	+
prednisolona	1.18	-	naranja	+
procaína	1.32	-	rojo	+
pirilamina	1.4	-	rojo	+
triclormetiazida	0.34	-	decolora	+
teofilina	0.3	-	rojo	+
tetracaina	1.25	-	rojo	+
teobromina	0.73	-	rojo	+

3.1.2 Cromatografía de la Fenilbutazona y la Oxifenbutazona

Con lo que respecta al sistema A (cloroformo: metanol), la concentración tiene un efecto claro respecto al desarrollo de las placas, como se puede observar en la figura 8.

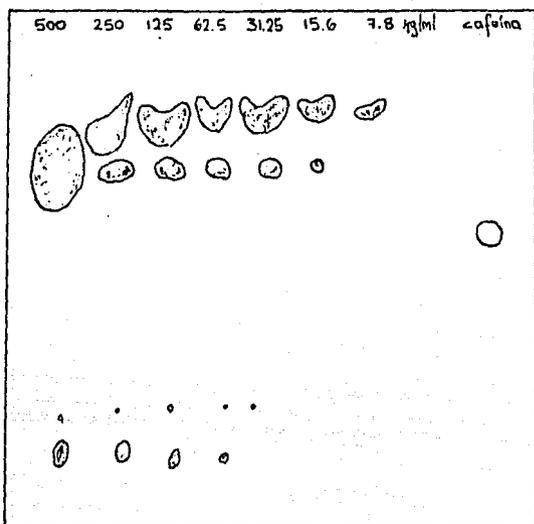


Figura 8
Desarrollo de la Fenilbutazona en el Sistema A a diferentes
concentraciones

En la tabla VI se muestran los Rfr (relativos a cafeína 4.5 cm) de la fenilbutazona en función de la concentración.

Tabla VI

Concentración (ug/ml)	Rfr
7.8	1.51
15.6 (1)	1.51
(2)	1.29
31.25(1)	1.51
(2)	1.29
62.5 (1)	1.49
(2)	1.29
125 (1)	1.49
(2)	1.29
250 (1)	1.44
(2)	1.29

Concentración (ug/ml)

Rfr

500

1.29

Cabe mencionar que la Fenilbutazona en este sistema da un color amarillo crema con Mandelin y un violeta intenso con Diazo, que es el color final en la visualización.

Es interesante ver también como a partir de la concentración de 15.6 ug/ml empiezan a aparecer dos manchas intensas para cada concentración y que a la concentración de 500 ug/ml estas dos manchas se juntan para formar una mancha.

Se podría pensar en una posible contaminación del estándar pero este fue analizado por cromatografía de gases constatando su pureza. Puede tratarse de una descomposición del estándar al interaccionar con la sílica de la placa, dando lugar a dos manchas producto de la descomposición de la Fenilbutazona.

En el sistema B, todas las concentraciones dan un color naranja con Ludy Tanger con un Rfr de 0.1 +/- 0.05.

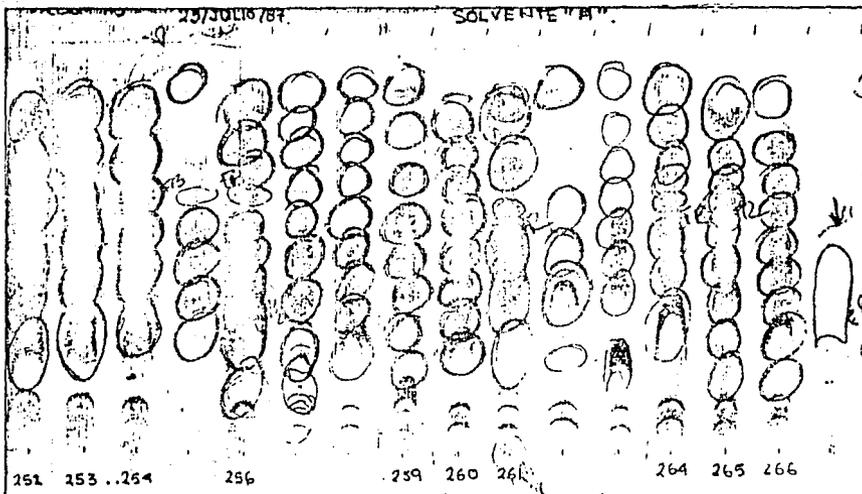
Con lo que respecta al estudio de la Oxifenbutazona, considerando la Mezcla I y la Mezcla II utilizadas en el experimento, en la figura 9 se muestran los resultados con el sistema A:

3.1.3 Cromatografía en capa delgada de muestras de orina

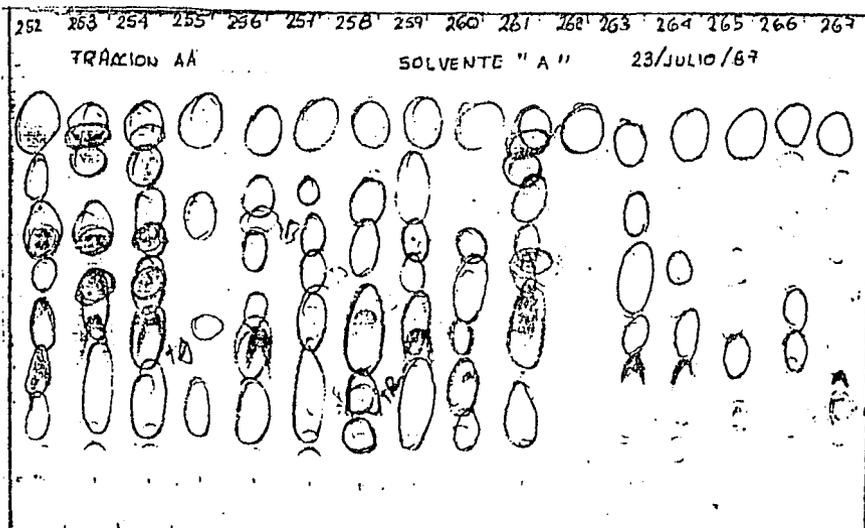
En las figuras 10 y 11 se muestran los cromatogramas para diferentes muestras de orina desarrolladas en el Sistema A.

Los casos de las muestras 252, 253, 254, 256, 259, 260, 261, 264, por ejemplo, muestran la presencia de la Fenilbutazona como una estela violeta después de aplicar el Diazo.

También se observa que aun cuando la Fenilbutazona es una droga ácida, esperándose obtener mayoritariamente en la fracción AA, la fracción AB también la muestra intensamente.



Muestras de orina, Fracción AB
Figura 10



Muestras de orina, Fracción AA
Figura 11

3.2 Cromatografía de Gases

3.2.1 Selección de la columna

Cabe mencionar que lo más importante para la selección de la columna es el punto de vista del analista, en el sentido de qué es lo que desea si una mayor resolución, una mayor capacidad o un mejor tiempo de análisis.

En el caso del análisis de drogas en forma rutinaria es deseable un sistema en el que se puedan analizar una gran variedad de compuestos con una resolución adecuada y en un tiempo de análisis corto.

Considerando que la resolución está determinada por la selectividad, la eficiencia y el factor de capacidad se hace necesario el análisis de estos puntos para las columnas estudiadas.

Las tablas VII, VIII, IX, X y XI muestran los valores calculados para la selectividad, la eficiencia, el factor de capacidad, tiempo de retención y resolución respectivamente.

Tabla VII

Selectividad de las drogas respecto a Fenilbutazona

COLUMNA	RSL 300	RSL 150	HP
DROGA			
acepromazina	11.83	1.30	0.31
amfetamina	-	0.97	0.95
banamina	-	2.21	1.87
benzocaina	-	10.96	0.89
butorfanol	-	-	-
cafeina	4.71	5.12	4.16
clorfeniramina	3.49	2.27	1.46
clorpromazina	0.80	0.67	0.68
dexametazona	-	-	-
diflunisal	3.65	2.48	3.07
difilina	-	1.08	0.70
diazepam	0.73	0.78	0.67
efedrina	28.53	-	10.27
ácido etacrínico	-	-	-
fenobarbital	3.91	3.53	2.68
fenilpropanolamina	-	10.23	10.27
furoseme	-	-	-
guaifenesin	11.02	8.77	6.42
hidroclorotiazida	-	-	-
ibuprofen	24.75	14.62	10.27
lidocaina	6.22	4.15	4.0
mepivacaína	2.90	2.06	1.33
ácido meclofenámico	-	-	-
mefentermina	-	-	-
metocarbamol	11.28	2.96	2.33
naproxen	3.13	2.46	2.26
oxifenbutazona	-	-	-
promazina	1.28	1.09	1.07
prednisolona	-	-	-
procaína	3.26	2.72	2.39
pirilamina	2.06	1.22	0.92
triclormetiazida	-	-	-
teofilina	2.69	3.01	2.21
tetracaína	1.39	1.47	2.06
teobromina	-	-	-

Cabe notar que las drogas que no salieron en ninguna de las columnas son sustancias que por poseer grupos altamente polares (ácidos) o por ser termolábiles no pudieron ser analizados por cromatografía de gases.

Tabla VIII

Eficiencia

COLUMNA	RSL 300	RSL 150	HP
DROGA			
acepromazina	6721.51	357.57	155.54
amfetamina	-	4454.09	314.95
banamina	-	1855.17	149.32
benzocaina	-	10529.86	138.06
butorfanol	-	-	-
cafeina	21561.33	21423.94	616.41
clorfeniramina	432.44	4769.55	660.81
clorpromazina	20781.34	5369.03	313.68
dexametazona	-	-	-
diflunisal	9020.73	186.94	633.16
difilina	-	5220.04	482.86
diazepam	27939.98	5236.10	-
efedrina	9290.45	-	31.03
Ácido etacrínico	-	-	-
fenobarbital	8290.49	7577.42	174.68
fenilpropanolamina	-	922.85	6.72
furosemide	-	-	-
guaifenesin	6721.51	9232.79	597.30
hidroclorotiazida	-	1019.93	-
ibuprofen	36118.50	-	46.73
lidocaina	29640.27	16087.22	460.39
mepivacaina	9531.17	4686.87	587.13
Ácido meclofenámico	-	-	-
mefentermina	-	2794.93	-
metocarbamol	9847.99	6361.08	1782.27
naproxen	10144.10	8073.56	435.36
oxifenbutazona	-	-	-
promazina	10718.31	4608.76	306.91
prednisolona	-	-	-
procaína	25845.79	17649.47	440.01
pirilamina	7834.72	5718.40	214.29
triclormetiazida	-	-	-
teofilina	6573.93	1851.62	214.65
tetracaina	38168.14	13128.20	400.53
teobromina	-	-	-

Tabla IX.

Factor de capacidad

COLUMNA	RSL 300	RSL 150	HP
DROGA			
acepromazina	0.41	2.37	32.83
amfetamina	-	3.18	10.80
banamina	-	1.39	5.5
benzocaina	-	0.28	11.5
butorfanol	-	-	-
cafeina	1.03	0.60	2.47
clorfeniramina	1.39	1.35	7.03
clorpromazina	6.03	4.56	15.13
dexametazona	-	-	-
diflunisal	1.33	0.83	3.35
difilina	-	2.84	14.63
diazepam	6.68	3.92	15.33
efedrina	0.17	-	1.0
Ácido etacrínico	-	-	-
fenobarbital	1.24	0.87	3.83
fenilbutazona	4.85	3.07	10.27
fenilpropanolamina	-	0.30	1.0
furosemide	-	-	-
guaifenesin	0.44	0.35	1.60
hidroclorotiazida	-	0.69	-
ibuprofen	0.19	-	1.0
lidocaina	0.78	0.74	2.57
mepivacaína	1.67	1.49	7.70
ácido meclofenámico	-	-	-
mefentermina	-	0.14	-
metocarbamol	0.43	1.06	4.33
naproxen	1.55	1.28	4.55
oxifenbutazona	-	-	-
promazina	3.79	2.82	9.60
prednisolona	-	-	-
procaína	1.49	1.13	4.30
pirilamina	2.35	2.52	11.17
triclormetiazida	-	-	-
teofilina	1.80	1.02	4.65
tetracaina	2.36	2.09	7.38
teobromina	-	-	-

k' promedio	2.0	1.6	6.7

Tabla X

Tiempo de retención

COLUMNA	RSL 300	RSL 150	HP
DROGA			
acepromazina	1.44	3.44	2.03
amfetamina	-	4.26	0.71
banamina	-	2.44	0.39
benzocaína	-	1.31	0.75
butorfanol	-	-	-
cafeína	2.07	1.64	0.21
clorfeniramina	2.44	2.40	0.48
clorpromazina	7.17	5.67	0.97
dexametazona	-	-	-
diflunisal	2.38	2.28	0.26
difilina	-	3.92	0.94
diazepam	7.83	5.0	0.98
efedrina	1.19	-	0.12
ácido etacrínico	-	-	-
fenobarbital	2.28	1.91	0.29
fenilbutazona	5.97	4.16	0.67
fenilpropanolamina	-	1.32	0.12
furosemide	-	-	-
guaifenesin	1.47	1.38	0.16
hidroclorotiazida	-	1.72	-
ibuprofen	1.22	1.23	0.12
lidocaína	1.82	1.77	0.21
nepivacaína	2.72	2.54	0.52
ácido meclofenámico	-	-	-
mefentermina	-	1.16	-
metocarbamol	1.46	2.10	0.32
naproxen	2.60	2.33	0.33
oxifenbutazona	-	-	-
promazina	4.89	3.90	0.64
prednisolona	-	-	-
procaína	2.54	2.17	0.32
pirilamina	3.42	3.59	0.73
triclormetiazida	-	-	-
teofilina	2.86	2.06	0.34
tetracaína	3.43	3.15	0.50
teobromina	-	-	-

Tabla XI

Resolución de las drogas respecto a Fenilbutazona

COLUMNA	RSL 300	RSL 150	HP
DROGA			
acepromazina	56.3329	1.5426	3.7853
amfetamina	-	0.4337	0.2706
banamina	-	7.9548	3.0544
benzocaina	-	22.1866	0.4409
butorfanol	-	-	-
cafeína	45.9585	20.1174	9.8178
clorfeniramina	12.1167	10.2124	2.7690
clorpromazina	7.6854	5.9040	2.0652
dexametazona	-	-	-
diflunisal	33.6199	4.3076	8.0985
difilina	-	1.1351	2.2320
diazepam	12.3710	3.5987	1.9282
efedrina	58.3073	-	7.5470
ácido etacrínico	-	-	-
fenobarbital	34.4796	15.3263	5.2000
fenilpropanolamina	-	14.9659	4.5282
furosemide	-	-	-
guaifenesin	48.6345	21.1170	11.8497
hidroclorotiazida	-	-	-
ibuprofen	68.3340	-	8.4563
lidocaina	53.3351	18.2652	9.0084
mepivacaína	28.9181	9.1460	2.0215
ácido meclofenámico	-	-	-
mefentermina	-	-	-
metocarbamol	52.3874	13.2405	7.7793
naproxen	31.1190	11.2228	5.3941
oxifenbutazona	-	-	-
promazina	7.1461	1.1937	0.3856
prednisolona	-	-	-
procaína	36.8609	14.5978	5.8598
pirilamina	20.6479	2.5807	0.3822
triclormetiazida	-	-	-
teofilina	24.4473	10.5704	4.3932
tetracaína	27.4384	6.3300	2.0889
teobromina	-	-	-

Es necesario mencionar las características nominales de las columnas estudiadas:

1. Alltech RSL 300: columna de fase unida de sílica fundida (polifenilmetilsiloxanos), de polaridad intermedia. Longitud: 30m. Diámetro interno: 0.25 mm. Espesor de película: 0.2 μ .
2. Alltech RSL 150: columna de fase unida de sílica fundida (polidimetilsiloxanos), columna no polar. Longitud: 30 m. Diámetro interno: 0.25 mm. Espesor de película: 0.25 μ .
3. HP High Performance Capillary Column: Crosslinked Metilsilicone (no polar). Longitud: 6.5 m. Diámetro interno: 0.2mm. Espesor de película: 0.33 μ .

La diferencia entre la columna 1. y 2. es primordialmente el tipo de fase que las constituye.

Si comparamos la columna 2. y 3. el principal factor de diferencia es la longitud.

A continuación se presenta el análisis individual de cada uno de los factores que afectan a la resolución.

3.2.1.1 Factor de capacidad

La tabla XII muestra una serie de datos calculados a partir de la información obtenida de la tabla IX. A partir de estos datos se procedió a hacer el siguiente análisis comparativo:

- a) Los valores observados no coinciden con los esperados de acuerdo a las características nominales de las columnas.
- b) Cabe señalar que las columnas RSL 300 y RSL 150 no eran nuevas y es posible que hayan perdido fase líquida con lo que la razón de fases (β) y el espesor de la película (df) reales pueden ser diferentes de los nominales.

Columna	Longitud (m)	Diámetro interno (mm)	Espesor película (μm)	β nominal	\bar{k}'	$\frac{\beta}{\beta_{HP}}$ nominal	$\frac{\beta}{\beta_{HP}}$ calculado	$\frac{k'_{300}}{K_{150}}$ experimental	$\frac{k'_{300}}{K_{150}}$ calculado
RSL 300	30	0.25	0.2	300	2.0	2.0	12.1	1.25	1.25
RSL 150	30	0.25	0.25	250	1.6	1.7	4.2		
HP	6.5	0.20	0.33	150	6.7				

Tabla XII

Demostración:

Si se considera que k' puede expresarse como:

$$k' = \frac{K}{\beta}$$

Donde $K =$ coeficiente de reparto = $\frac{\text{[soluto] en la fase estacionaria}}{\text{[soluto] en la fase liquida}}$

$$\beta = \text{razón de fases} = \frac{\text{volúmen fase móvil}}{\text{volúmen fase estacionaria}}$$

a) Teniendo en cuenta que para la columna HP y la RSL 150 la fase es la misma entonces:

$$K_{HP} = K_{150} \quad \text{por lo que:}$$

$$\frac{K'_{HP}}{K'_{150}} = \frac{\beta_{150}}{\beta_{HP}} = \frac{6.7}{1.6} = 4.2$$

Comparando con el valor nominal de $\frac{\beta_{150}}{\beta_{HP}}$ se observa que es 2.5 veces mayor.

Ahora bien como:

$$\beta = \frac{\phi_i}{4 df} \quad \text{Donde } \phi_i = \text{diámetro intero} \\ df = \text{espesor de película}$$

Se tiene que:

$$\frac{\beta_{150}}{\beta_{HP}} = \frac{\phi_{i150}}{\phi_{iHP}} \times \frac{df_{HP}}{df_{150}} \rightarrow \frac{df_{HP}}{df_{150}} = \frac{\beta_{150}}{\beta_{HP}} \times \frac{\phi_{iHP}}{\phi_{i150}} = 4.2 \times \frac{0.2}{0.25} = 3.4$$

Comparando con la relación nominal $\frac{df_{HP}}{df_{150}} = \frac{0.33}{0.25} = 1.3$

Se observa que el valor calculado es mayor, por lo que se tiene que se ha perdido al menos 60% de la fase de la columna RSL 150 y el espesor de película máximo para ésta es de aproximadamente 0.1 um comparado con 0.25 um nominales.

b) Por otra parte analizando las columnas RSL 300 y RSL 150 e introduciendo la relación de Snyder, si $\beta_1 = \beta_2$:

$$\frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1} = 10 \quad (P'_2 - P'_1) / 2 \quad P' = \text{polaridad de la fase}$$

Se tiene que el valor teórico de la relación de las constantes de reparto en dos tipos de fases es:

$$\frac{K_{300}}{K_{150}} = \frac{K_{300}}{K_{HP}} = 10 \quad (2.7 - 1.6) / 2 = 3.6 \quad (22)$$

por lo que

$$\frac{\bar{k}'_{300}}{\bar{k}'_{HP}} = 3.6 \frac{\beta_{HP}}{\beta_{300}} \longrightarrow \frac{\beta_{300}}{\beta_{HP}} = 3.6 \frac{\bar{k}'_{HP}}{\bar{k}'_{300}} = 12.1$$

Valor éste último que es mucho mayor que el valor nominal con lo que se ha perdido el 85 % de la fase de la columna RSL 300 y el espesor máximo de película es de 0.03 um.

Para verificar la última aseveración se calcula $\frac{k'}{k'}$ con los valores calculados:

$$\frac{k'_{300}}{k'_{150}} = \frac{K_{300}}{K_{150}} \times \frac{\beta_{150}}{\beta_{300}} = 3.6 \frac{\beta_{150}}{\beta_{HP}} \times \frac{\beta_{HP}}{\beta_{300}} = \frac{3.6 \times 4.2}{12.1} = 1.25$$

Comparando con el valor experimental:

$$\frac{k'_{300}}{k'_{150}} = \frac{2.0}{1.6} = 1.25$$

Se puede concluir que efectivamente en las columnas RSL 300 y RSL 150 el espesor de película real es mucho menor que el nominal.

Volviendo a la tabla IX cabe señalar que los valores de k' para la columna HF son mayores debido a un espesor de película mucho mayor (β es menor).

El valor de k' para la columna RSL 300 es algo mayor que para la columna RSL 150 debido a su mayor polaridad (mayor interacción con los solutos polares) a pesar de que el espesor de película en la columna RSL 300 sea muy pequeño.

Ahora bien, las k' bajas en RSL 300 y RSL 150 favorecen tiempos de análisis cortos a pesar de que tengan una longitud grande.

3.2.1.2 Eficiencia

Las columnas RSL 300 y RSL 150 se operaron a velocidades de fase móvil (49.02 cm/seg) cercanas a la óptima.

La columna RSL 300 es más eficiente debido fundamentalmente a un espesor de película muy pequeño y a una mejor solubilidad de los solutos en la fase estacionaria.

La eficiencia máxima observada en la columna RSL 300 es tres veces menor que el máximo teórico posible (100000-150000). Sin duda por las aportaciones extracolumna (principalmente del inyector) sobre el ensanchamiento de las bandas.

La eficiencia máxima en la columna RSL 150 es seis veces menor

que el máximo teórico debido también a un inyector ineficiente. Sin embargo el valor de la eficiencia es suficiente para obtener valores altos de resolución.

La eficiencia máxima en la columna HP es muy baja, además de la ineficiencia del inyector por la muy alta velocidad de la fase móvil que se utilizó para reducir drásticamente los tiempos de análisis.

A pesar de estas observaciones la eficiencia en todos los casos es suficiente para obtener resoluciones adecuadas.

3.2.1.3 Selectividad

Como era de esperar la selectividad promedio es mayor para la columna RSL 300 (fase más polar) lo que propicia que los tiempos de análisis sean mayores y también se tenga un mejor resolución y por lo tanto una menor probabilidad de enmascaramiento.

La diferencia de selectividad observada entre la columna RSL 150 y HP se debe probablemente a que en la RSL 150 los silanoles libres del tubo de sílice fundida son más accesibles porque el espesor de película es más bajo.

En términos generales en las tres columnas se observa una buena selectividad.

3.2.1.4 Resolución

La resolución es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos y se establece que se tiene una buena resolución cuando ésta es mayor a 1.

Cabe señalar que los valores observados son producto del efecto

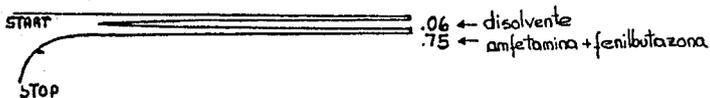
de las variables ya estudiadas.

En la columna RSL 300 los valores de la resolución son mayores debido a que la eficiencia y la selectividad son mayores. Estos valores de la resolución son demasiado grandes (el más pequeño de 7.7) pudiendo reducirse la longitud de la columna hasta 2.5 veces obteniéndose tiempos de análisis 2.5 veces menores o bien aumentando la velocidad lineal de flujo lo cual también traería consigo una disminución del tiempo de análisis.

En promedio en la columna RSL 150 la resolución es buena, sin embargo hay un caso donde $R < 1$ (amfetamina=0.43) pudiéndose presentar un enmascaramiento. El problema podría reducirse si se considera una operación más eficiente del inyector obteniéndose una mayor eficiencia.

En la columna HP debido a las condiciones drásticas de operación (una longitud pequeña de la columna y una velocidad lineal de flujo alta) la resolución se ve afectada. Cuatro son los casos en los que $R < 1$: amfetamina(0.27), benzocaína(0.44), promazina(0.39) y pirilamina (0.38). Aún así la resolución promedio es adecuada.

A continuación presento los cromatogramas de dos de las drogas arriba mencionadas, que podrían ser enmascaradas por la Fenilbutazona, en la columna HP.



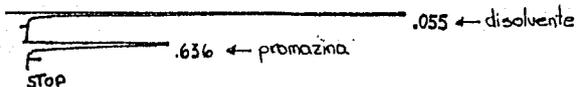
AREA%	RT	AREA	TYPE	AA/HT	AREA
0.06	4.9055E+07	15PP	0.098	71.748	
0.75	1.4317E+07	TBB	0.154	28.252	

TOTAL AREA = 6.9372E+07

Figura 12

-1ul de amfetamina (0.01g/ml) + 1ul de Fenilbutazona
inyectados simultaneamente. (Temp. isotérmica = 225 C)

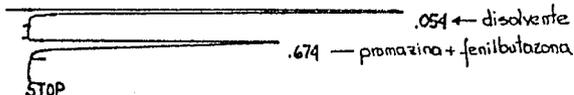
El pico en 0.75 corresponde a la suma de amfetamina y Fenilbutazona. Claramente se tiene aquí un efecto de enmascaramiento.



AREA%	RT	AREA TYPE	NR/HT	AREA%
0.055	2.1914E+07	1588	0.044	97.686
0.636	519790	PB	0.091	2.317

TOTAL AREA= 2.2434E+07

Figura 13
Promazina, 1ul (0.01g/ml) (Temp. isotérmica=225 C)



AREA%	RT	AREA TYPE	NR/HT	AREA%
0.054	2.4407E+07	1588	0.044	95.575
0.674	1130000	PB	0.111	4.425

TOTAL AREA= 2.5537E+07

Figura 14
1ul de Promazina (0.01g/ml) + 1ul Fenilbutazona (0.01g/ml)
Inyectados simultáneamente (T= 225 C).

En este caso el pico en 0.674 representa la suma de la promazina y la Fenilbutazona. Comparándolo con la promazina sola, el pico aumentó aproximadamente a lo doble de altura.

3.2.1.5 Tiempo de análisis

A temperatura isotérmica de 225° C en todos los casos los tiempos de análisis son bajos: 8 minutos en la columna RSL 300, 6 minutos en la columna RSL 150 y 1 minuto en la columna HF.

De tal forma se recomendaría una columna corta de Fenilmetilsilicón con un espesor de película bajo y utilizando una velocidad lineal de flujo alta (considerando un inyector eficiente) para alcanzar el mejor compromiso entre la resolución y el tiempo de análisis.

El uso de una columna con estas características permitiría complementar el análisis de muestras en las que la Fenilbutazona interfiriera a nivel de cromatografía de capa delgada.

Pero es importante comentar que si se tienen muestras complejas (sucias) la utilización de un programa de temperatura es necesario, eliminando las ventajas de tiempos de análisis bajos como los mencionados a temperatura isotérmica.

De ahí que se requieran de métodos de preparación de las muestras que provean extractos más limpios.

3.2.2 Selección del tipo de inyección

De las dos técnicas más frecuentemente utilizadas, con divisor y sin divisor, se optó por utilizar la técnica split (con divisor).

La técnica sin divisor necesita del uso de disolventes de bajos puntos de ebullición (hexano, isooctano) para poder llevar a cabo el efecto de frente de disolvente, con lo que el uso de cualquier muestra está limitado a que éstas sean solubles en este tipo de disolventes. Por otra parte, la inyección directa a la columna de muestras biológicas, puede ensuciarla fácilmente, con lo que se reduciría rápidamente la vida media de una columna y más aún si se trabajan lotes grandes de muestras.

Si bien es cierto que la técnica de la inyección sin divisor permite que entre más muestra a la columna, el límite de detección se ve también aumentado. Una desventaja de la inyección sin divisor es también, la baja reproductibilidad que ofrece frente a la inyección con divisor.

El límite de detección encontrado por la técnica sin divisor fue de 0.8 ug/ml.

El límite de detección encontrado por la técnica con divisor fue de 1.6 ug/ml.

3.2.3 Efecto de la Fenilbutazona en alta concentración.

A continuación, se presentan los respectivos cromatogramas correspondientes a las concentraciones de 100 mg/ml, 40 mg/ml, 24 mg/ml, 9.50 mg/ml y 4.00 mg/ml de fenilbutazona.

(Para las condiciones de trabajo vease la sección 2.3.2 de la Parte experimental)

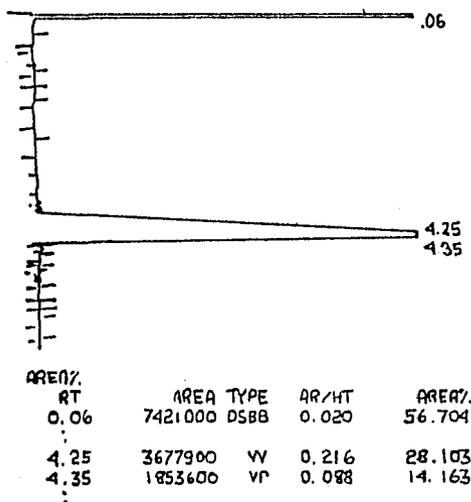
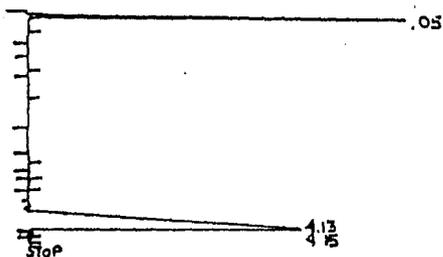


Figura 15

En este cromatograma correspondiente a 100mg/ml, se observa un pico con tiempos de retencion de 4.25 y 4.35 (real)

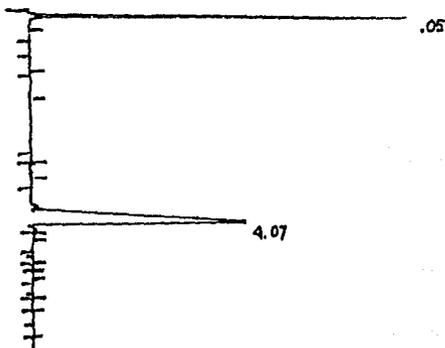


AREA% RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
0.05	6366700	DS08	0.019	76.613
.
4.13	1682200	VV	0.152	20.242
4.15	241700	D Y8	0.022	2.909
.

TOTAL AREA= 8310200

Figura 16

Este cromatograma correspondiente a 40mg/ml presenta también un pico con tiempos de retención de 4.13 y 4.15 (real)

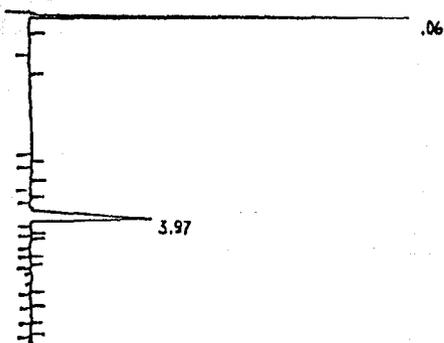


AREA%	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA%
.	0.05	6681400 DSBB	0.019	84 960
.	4.07	1143700 VP	0.129	14.543
.				

TOTAL AREA- 7864200

Figura 17

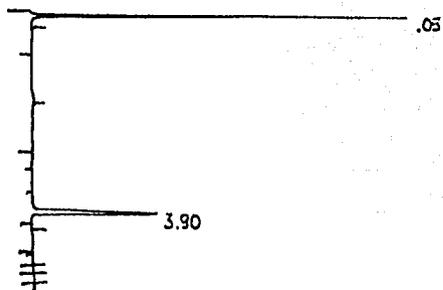
Aquí, el cromatograma de 24 ml/ml sólo muestra un pico intenso en 4.07.



AREA%	RT	AREA	TYPE	AREA%	AREA%
	0.06	6177600	588	0.018	93.315
	3.79		PB		.
	3.97	433220	V8	0.089	6.544

Figura 18

El pico en 3.97 corresponde a la Fenilbutazona en concentración de 9.50mg/ml



AREA	RT	AREA	TYPE	NR/HT	AREA%
	0.05	5992200	SBB	0.018	97.709
	3.90	140500	PS	0.055	2.291

TOTAL AREA= 6132700

Figura 19

Finalmente tenemos a la Fenilbutazona en concentración de 4.00mg/ml, cuyo pico es el 3.91

Por un lado se observa que a menor concentración los tiempos de retención van disminuyendo y a concentraciones elevadas los picos tienen bases muy anchas.

Con respecto a estas observaciones cabe mencionar que la forma asimétrica de los picos ("cabeceado") corresponde a una isoterma del tipo antilangmuir por lo que al variar la concentración, el tiempo de retención varía, disminuyendo al disminuir la concentración.

El frente difuso es común para todas las concentraciones y es una función de la derivada de la isoterma.

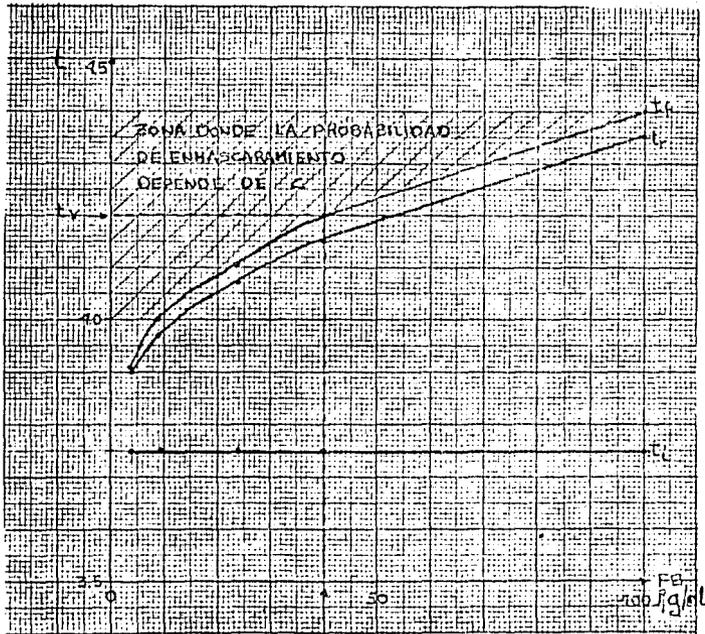
Este comportamiento puede deberse a la incompatibilidad del soluto con la fase estacionaria (baja solubilidad) y/o a la baja temperatura de operación.

Además este fenómeno es indeseable porque pueden enmascarse los picos que eluyen inmediatamente después con lo que aumenta la incertidumbre de la verificación de la presencia o ausencia de drogas.

La figura 20 muestra la gráfica en la que se relaciona la concentración con el tiempo de retención. En la misma gráfica se consideran los tiempos iniciales y finales de elución a cada concentración como se muestran en la siguiente tabla XIII.

Tabla XIII

Concentración (mg/ml)	Tiempo inicial de elución	Tiempo de retención	Tiempo final de elución
100	3.75	4.35	4.40
40	3.75	4.15	4.20
24	3.75	4.07	4.10
9.5	3.75	3.97	4.00
4	3.75	3.90	3.90



Relación de la concentración con el tiempo de retención.

Figura 20

Si se observa la figura 20 se puede ver como existe una zona donde la probabilidad de enmascaramiento depende francamente de la concentración.

Así por ejemplo, si A eluye en un tiempo de retención de 4.20 podrá detectarse si la concentración de fenilbutazona es menor de 40 mg/ml, si la concentración es mayor de 40 mg/ml, será enmascarado.

3.2.4 Análisis de muestras de orina con contenido de Fenilbutazona

Con el método del estándar externo, utilizando una curva de calibración, se procedió a determinar las concentraciones en diferentes muestras.

Curva de calibración.

Para generar la curva de calibración se utilizó el área promedio de tres inyecciones: el volumen inyectado fue siempre de 1ul

Concentración (mg/ml)	Area
9.0	317065
4.0	139985
2.0	70850
1.0	34765

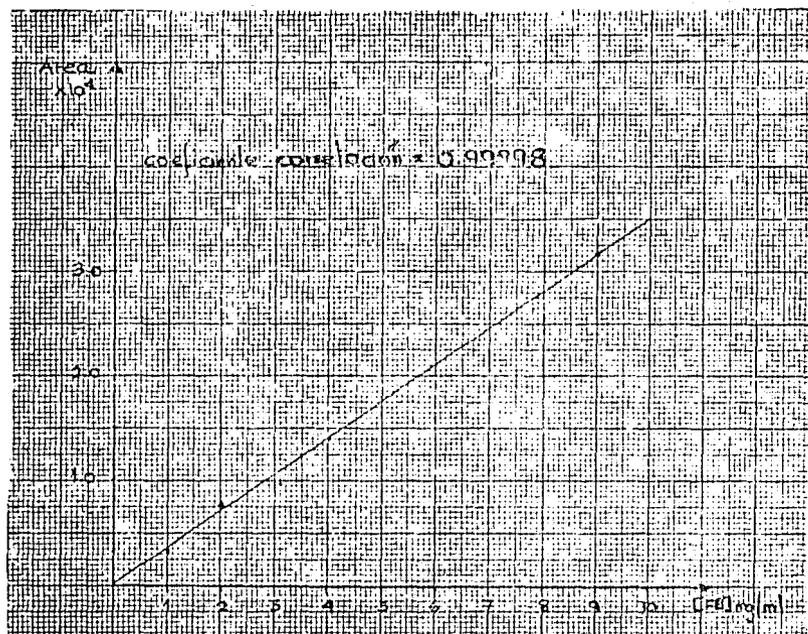


Figura 21
Curva de Calibración de Fenilbutazona

Se graficó la concentración vs. el area promedio y se interpolaron los datos de las diferentes muestras trabajadas.

De diez diferentes muestras se obtuvieron los siguientes datos:

#muestra	Vol.inyectado	Area	tr	Fenilbutazona(ug/ml)
1	1ul	125710	3.99	35.75
2	"	249590	4.02	70.90
3	"	130900	3.97	37.23
4	"	104910	3.97	29.86
5	"	310830	3.99	88.28
6	"	158240	3.97	44.99

#muestra	Vol. inyectado	Area	tr	Fenilbutazona(ug/ml)
7	"	100830	3.99	26.70
8	"	174326	4.00	49.55
9	"	110538	3.97	31.42
10	"	162835	3.98	46.27

Las concentraciones de fenilbutazona se refieren ya al volumen total inicial de orina de 100 ml.

Es importante mencionar aquí la diferencia que existe entre la concentración encontrada en el extracto final previo a la inyección y la concentración correspondiente al volumen total de muestra. Así la concentración correspondiente a los extractos recuperados a un volumen de 0.5 ml de metanol es:

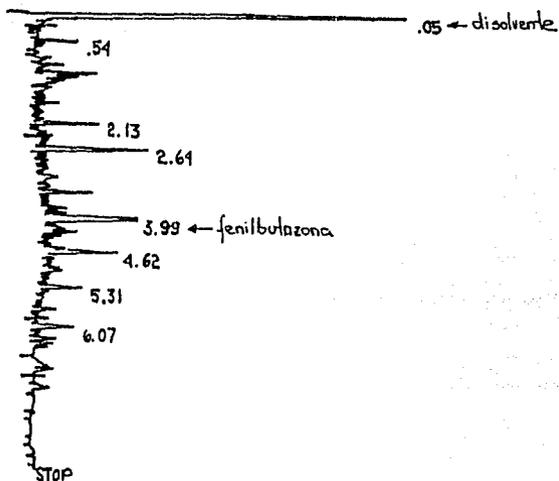
# muestra	Fenilbutazona(ug/ml)
1	7146.2
2	14180.0
3	7440.9
4	5965.1
5	17658.1
6	8993.4
7	5733.4
8	9906.8
9	6284.7
10	9254.3

Se observa que la concentración en los extractos es del orden de 5-20 mg/ml y que es esta concentración la que influye en los resultados observados tanto en la placa de capa delgada como en la cromatografía de gases.

La Figura 22 muestra como ejemplo el cromatograma de una de las

muestras trabajadas. Como muestra biológica, aún después de pasar por una serie de pasos de extracción selectiva, presenta picos que pudieran por si mismos, servir de enmascarantes para drogas que viniesen en concentración baja. El pico de la Fenilbutazona pudo ser identificado por la comparación con estándares de Fenilbutazona a diferentes concentraciones, considerando la simetría del pico y el tiempo de retención.

La cuantificación de Oxifenbutazona por cromatografía de gases no fue posible ya que este metabolito contiene un grupo polar (-OH) que impide su desarrollo por este método. La opción para su cuantificación y análisis es la cromatografía de líquidos.



AREA%	RT	AREA	TYPE	AA/HT	AREA%
0.05	9409100	0588		0.022	76.907
0.54	39947	D PY		0.022	0.327
2.13	92173	YY		0.037	0.753
2.64	182590	PB		0.042	1.492
3.99	310830	VV		0.078	2.541

Cromatograma de una muestra de orina de caballo .
Figura 22

Capítulo IV

Conclusiones

4.1 Cromatografía en capa delgada

a) Se observa que para el sistema B estudiado, la fenilbutazona y la oxifenbutazona dentro del rango de 7.8-500 ug/ml presentan $R_{fr} < 0.2$. De tal forma que en este sistema y en las condiciones establecidas en este estudio, ambas drogas arriba mencionadas no presentan un efecto real de enmascaramiento sobre las drogas puras.

b) En el sistema A la fenilbutazona y la oxifenbutazona presentan productos de descomposición probablemente por interacción con la placa de sílice. Los R_{fr} de la fenilbutazona, la oxifenbutazona y sus respectivos productos de descomposición son mayores a 0.6.

Es evidente que los productos de descomposición aumentan la probabilidad de enmascaramiento.

Basándonos en estos R_{fr} podemos concluir que cualquier droga pura con un valor de R_{fr} menor a 0.6 no será enmascarada por la fenilbutazona, la oxifenbutazona o sus productos de descomposición. Las drogas con R_{fr} mayor a 0.6 que podrían ser enmascaradas se muestran en la tabla XIV.

Tabla XIV

Droga	Rfr
Benzocaína	1.21
Cafeína	1.00
Dexametazona	0.65
Diazepam	1.23
Fenobarbital	0.96
Guaifenesin	0.74
Lidocaína	1.19
Mepivacaína	0.67
Ac. meclofenámico	0.71
Metocarbamol	0.75
Naproxen	0.76
Prednisolona	0.89

c) En las muestras de orina la fenilbutazona y la oxifenbutazona tienden a formar una estela que efectivamente abarca la zona de $R_{fr} > 0.6$. Se podría pensar que por presencia de estas estelas se está trabajando con concentraciones mayores a los 500 ug/ml en el extracto de aplicación.

d) En la cromatografía en capa delgada el principal factor de enmascaramiento está relacionado con el color violeta intenso que adquieren la fenilbutazona y la oxifenbutazona después de la diazotización. Si se considera que ciertas drogas empiezan a dar colores desde la aplicación del Mandelin (acepromazina, metocarbamol, promazina, clorpromazina, diflunizal, ácido meclofenámico y pirilamina) se podrían identificar antes de la

diazotización.

4.2 Cromatografía de gases

De las columnas utilizadas para el presente estudio la RSL 300 y 150 no eran nuevas y se constató que habían perdido un 60 % (RSL 150) y un 85% (RSL 300) de fase líquida con lo que los valores de factor de capacidad, selectividad, eficiencia y resolución se vieron afectados.

Aún así los valores obtenidos fueron aceptables como para llegar a las siguientes conclusiones:

- La fase de fenilmetilsilicón es más selectiva para el análisis de drogas.
- Es posible realizar la determinación de drogas en menos de un minuto con el uso de columnas capilares en operación de altas velocidades.
- Utilizando la columna HP manejando concentraciones elevadas de fenilbutazona se presenta el fenómeno de picos cabeceados correspondientes a isoterms del tipo antilangmuir que pueden contribuir al efecto de enmascaramiento.
- Fue necesario utilizar un programa de temperatura para el análisis de muestras de orina pues aún no se cuenta con un método óptimo de preparación de las muestras para poder aplicar un análisis a temperatura isotérmica y obtener ventajas en el tiempo de análisis.
- Las concentraciones encontradas en las muestras de orina no excedieron los 90 ug/ml en una dilución final de 100 ml de orina utilizada para el análisis.

-Se hace necesario ampliar el número de muestras de orina analizadas para determinar estadísticamente los niveles de concentración de fenilbutazona en orina de caballos del programa de medicación controlada utilizado en México.

-Tomando en cuenta que una dosis de 2-3 gramos diarios de fenilbutazona para un caballo de tamaño normal (450 kg) produce un efecto antiinflamatorio óptimo y que para una dosis como la mencionada los niveles de fenilbutazona encontrada en orina pueden ser de 70 ug/ml, las concentraciones encontradas en este estudio se encuentran dentro de este rango.

-El efecto de enmascaramiento debido a las altas concentraciones de fenilbutazona está relacionado con las altas concentraciones manejadas en el extracto final previo a la inyección al aparato o a la aplicación en placa.

-Las concentraciones encontradas en estos extractos varían de entre 5-20 mg/ml por lo que los fenómenos de enmascaramiento observados en este estudio son válidos.

Si bien se llegan a estas conclusiones en el presente estudio, cabe señalar que en México falta mucho por hacer en el campo de la Química Forense para que en un futuro se tengan mayores y mejores evidencias respecto a la identificación de drogas en actividades deportivas.

Capítulo V

Bibliografía

1. Blake, J.W., "HPTLC Detection of Primary Aromatic and Alkyl Amines by Diazotization and Ninhydrin Reactions". Proceedings of the 37th and 38th Meetings of the AOAC, Toronto Canada, 1984, 72-80.
2. Blake, J.W. and Tobin, T., "The Gas-Liquid Chromatograph and the Electron Capture Detection in Equine Drug Testing", British Journal of Sports Medicine, 10, 129-132, 1976.
3. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, 2nd Edition, London, 1986.
4. Curso: "Avances en Cromatografía de Gases", Facultad de Química, Junio 1987.
5. Controlled Medication in California, California Horse Racing Board, February 1979.
6. Debruyne, D. et al, "Wall Coated Open Tubular Column Coupled with Nitrogen-Selective Detection for Routine GLC Determination of Diazepam, Meprobamate, Phenylbutazone and Thioridazine in Serum", Journal of Pharmaceutical Sciences, 62, (7), (835-838), 1980.
7. Lees, P., Maitho, T.E. and Taylor, J.B., "Pharmacokinetics of Phenylbutazone in Two Age of Ponies: A Preliminary Study", Veterinary Science, 116, (229-232), 1985.
8. Maugh, T.H., "Speaking of Science: Chemicals: How many are there?", Science, 192, (13), pp. 162, 1978.
9. Roberts, J.D. and Caserio, M.C., "Basic Principles of Organic Chemistry", W.A. Benjamin, Inc., New York, pp. 708-709, pp. 892-893 (1965).
10. Schoenfeld, R.G., "A Study of Phenylbutazone and Its Metabolites Using a Computerized Gas Chromatogram-Mass Spectrometer System" (Correo del Dr. Tobin de la Universidad de Kentucky con los Laboratorios Control Químico S.A. de C.V.)
11. Snow, D., and Bogan, J.A., "Phenylbutazone Toxicity in Ponies", Vet. Rec., 105:26-30, 1979.
12. Soma, L.R., Sams, R. et al, "Plasma and Serum Concentration of Phenylbutazone and Oxiphenylbutazone in Racing Thoroughbreds, 24 Hours after Treatment with Various Dosage Regimens". Am. Journal of Vet. Research, 46, (4), 932-938.
13. Sunshine, I. et al, "Identification of Therapeutically Significant Organic Bases by TLC", J. Forensic Sci., 11, (428-439), 1966.

14. Summary of Samples and Detected Drugs as Reported by the Association of Official Racing Chemists. Calendar Year 1986.
15. Tobin, T., "Drugs and the Performance Horse", Charles C. Thomas Publishers, 2nd Edition, Springfield, Illinois, USA., 1981.
16. Tobin, T. et al. "Phenylbutazone in Horses: A Review", University of Kentucky Internal Publication, June 1977.
17. Tobin, T., "Medication of Performance Horses", Equine Medicine and Surgery, American Vet. Public. Inc., 1982.
18. Tobin, T., "Pharmacology Review: the Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. I. Phenylbutazone", J. Eq. Med. Surg., 6, (253-258), 1979.
19. Tobin, T., "Pharmacology Review: the Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. II. Phenylbutazone", J. Eq. Med. Surg., 7, (298-302), 1979.
20. Tobin, T. and Woods, W.E., "Pharmacology Review: Drug Metabolism and Elimination in Horses.", Department of Veterinary Science, College of Agriculture, University of Kentucky, Lexington, KY 40546-0076.
21. Woods, W.E. et al, "Effects of Phenylbutazone and Oxifenbutazone on Acidic Drug Detection in High Performance Thin Layer Chromatographic Systems", Kentucky Equine Drug Research and Testing Programs, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington Kentucky, 40546-0076.
22. Belover, Silvia; Comunicación personal.
23. Diario Oficial de la Federación, 19 de Octubre de 1943.