



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado/Gradu Amaierako Lana
Grado en Química/Kimikako Gradua

Análisis de anfetaminas

Egilea/Autor:
Susana Retes
Zuzendaria/Director/a:
Rosa M. Alonso

Julio 2014

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2 0 0 6



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



TRABAJO FIN DE GRADO GRADO EN QUÍMICA

ANÁLISIS DE ANFETAMINAS

MEMORIA PRESENTADO POR SUSANA RETES

FECHA DE MATRICULACIÓN Y DEFENSA: JUNIO-JULIO 2014

DIRECTORA: ROSA M. ALONSO

DEPARTAMENTO: QUÍMICA ANALÍTICA

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2 0 0 6



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AP: anfetamina

APd5: anfetamina deuterada

CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Fl: detector de fluorescencia

GC: cromatografía gaseosa

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a masas

GC-MS/MS: cromatografía gaseosa acoplada a masas en tándem

HPLC: cromatografía de líquidos de alta presión

LC: cromatografía de líquidos

LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas

LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a masas en tándem

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

MA: metanfetamina

MDA: 3,4-metildioxianfetamina

MDEA: 3,4-metildioxietilanfetamina

MDMA: 3,4-metildioximetanfetamina

MS: detector de masas

MS-MS: detector de masas en tándem

m/z: relación masa/carga

RSD: desviación estándar relativa

S_{o,o}: desviación estándar de la ordenada en el origen



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



S: desviación estándar

SCAN: modo de adquisición que consiste en barridos entre dos masas

SIM: Monitorización Selectiva de Iones

TOF: detector de tiempo de vuelo

\bar{x} : valor medio

$Y_{0,0}$: valor de la ordenada en el origen

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2 0 0 6



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANFETAMINAS	2
1.1.1. Análisis de anfetaminas en matrices biológicas	7
1.1.2. Metodologías analíticas para el análisis de anfetaminas en pelo	12
1.2. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DE ANFETAMINAS	19
1.3. OBJETIVO	27
2. EXPERIMENTAL	27
2.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	27
2.2. INSTRUMENTACIÓN	27
2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	28
2.3.1. Optimización del método cromatográfico	28
2.3.2. Parámetros cuantitativos del método cromatográfico (GC-MS).....	29
2.3.3. Aplicación a muestras reales	31
3. RESULTADOS	31
3.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (GC-MS)	31
3.1.1. Tiempos de retención e iones cromatográficos (m/z) característicos	33
3.2. PARÁMETROS CUANTITATIVOS DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (GC-MS)	35
3.2.1. Límites de cuantificación y detección	37
3.2.2. Repetitividad	37
3.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO GC-MS A UNA MUESTRA REAL	37
4. CONCLUSIONES	40
5. AGRADECIMIENTOS	40
6. BIBLIOGRAFÍA	41



1. INTRODUCCIÓN

Las drogas y su entorno constituyen uno de los principales problemas a los que se enfrenta la sociedad moderna. Las drogas podrían definirse como sustancias que producen bienestar, estupor o euforia y que normalmente originan dependencia, con los consiguientes cambios en el comportamiento.¹

En la década de 1975 a 1985 la problemática asociada al consumo de drogas de abuso se propaga de forma notable en el mundo occidental, y ya entonces se generan en diferentes países comisiones interministeriales para estudiar este tema tras la toma de conciencia de las autoridades. Del mismo modo, surgen las llamadas organizaciones no gubernamentales, centradas en la asistencia a los drogodependientes, y los llamados Programas Libres de Drogas. Pero ha sido en la última década cuando, impactados por el golpe que supuso el SIDA y la mayoría de las enfermedades asociadas al consumo de drogas, se han considerado, como el atentado más grave contra la salud pública que la Humanidad ha experimentado en los últimos tiempos, siendo precisa la elaboración de forma integral de modelos de acercamiento a la asistencia del drogodependiente.²

Los efectos de las drogas de abuso dependen en primer lugar de las características farmacológicas intrínsecas de cada droga en particular, pero varía en gran medida con el ambiente que rodea al consumo y el perfil de cada individuo. Los factores genéticos son determinantes en la existencia de una vulnerabilidad muy heterogénea ante los efectos de las drogas; algunos autores llegan a estimar hasta un 50 % la contribución de la herencia al riesgo de padecer un trastorno adictivo. Por otra parte, los consumidores de drogas utilizan normalmente varias sustancias psicótropas al mismo



tiempo y con mucha frecuencia padecen de forma simultánea otra enfermedad psiquiátrica.³

Las drogas se suelen clasificar en función de sus efectos, como estimulantes, depresoras, narcóticas y alucinógenas.⁴ En este trabajo se han estudiado drogas de tipo anfetamínico pertenecientes al grupo de los estimulantes.

1.1 ANFETAMINAS

La anfetamina, 1-fenilpropan-2-amina, es un compuesto químico con una estructura similar a la del alcaloide vegetal efedrina, sustrato utilizado inicialmente como reactivo para la obtención de este nuevo compuesto. Al igual que la efedrina, la anfetamina es un agente que imita la acción de la hormona adrenalina (análogo adrenérgico) y activa el sistema nervioso simpático, es decir, se trata de una amina simpaticomimética.⁴

La anfetamina tiene diversos análogos, y todos ellos poseen una estructura química similar, cuya base es la fenilisopropilamina con modificaciones estructurales.⁴ En la Figura 1 se muestran las anfetaminas más consumidas, así como la efedrina.

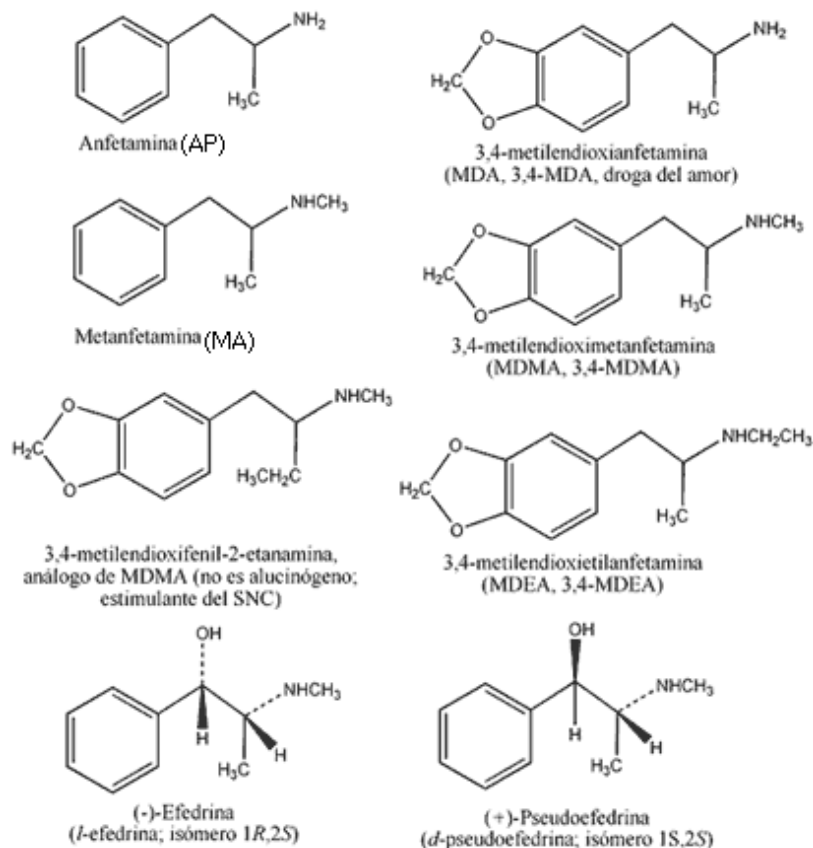


Figura 1. Estructura química de la anfetamina, algunos de sus análogos y la efedrina.

Las anfetaminas que se estudiarán en este trabajo son la anfetamina (AP), Metanfetamina (MA), 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA) y 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA). La anfetamina deuterada (AP_{d5}) se utilizará como estándar interno en el desarrollo del método cromatográfico.

La anfetamina fue sintetizada por primera vez en 1887 por el químico rumano L. Edeleano, pero su actividad psicoestimulante no fue identificada hasta 1927. Se introdujo como fármaco terapéutico en 1930, principalmente, como descongestionante nasal y para contrarrestar los efectos de los sedantes. Durante la Segunda Guerra Mundial las anfetaminas se administraron de forma indiscriminada a los soldados de varios ejércitos para aumentar la alerta y la agresividad y para disminuir el cansancio. También se administraban



a trabajadores de las fábricas de apoyo al ejército, con el fin de que realizaran los trabajos más monótonos.⁵

En la actualidad, su uso terapéutico está muy restringido. Sin embargo, en la década de los 60 y 70, existían muchos preparados farmacéuticos que, pese a necesitar receta médica, se podían conseguir con facilidad. Este hecho condujo a situaciones de dependencia en enfermos que abusaban de estas sustancias al consumirlas como anorexígenos (píldoras para adelgazar), como estimulantes de la atención y memoria (para exámenes), o para paliar los efectos del esfuerzo (sustancias dopantes en el deporte).⁶ En definitiva, las anfetaminas son sustancias que se han utilizado en diferentes contextos y situaciones que van desde el ámbito farmacológico hasta un uso puramente recreativo.

Este tipo de sustancias son adictivas, y por tanto llevan a un uso compulsivo de las mismas. La tolerancia se desarrolla de forma rápida, de manera que los consumidores necesitan dosis mayores para mantener los efectos positivos y euforizantes de la droga. Cuando se detiene el consumo, la persona suele experimentar un síndrome de abstinencia que se caracteriza por un aumento de la tendencia a dormirse y un incremento del apetito. También se debe mencionar que no existe una clara dependencia física, pero sí una caída en picado después de la excitación, a la que se denomina depresión de rebote.⁷

Las anfetaminas actúan liberando catecolaminas (noradrenalina y dopamina), que son aminohormonas, que cumplen funciones de neurotransmisores en el sistema nervioso central. En la actualidad se utilizan en algunas ocasiones como fármacos, para el tratamiento de la congestión nasal y del asma, para el aumento de la estimulación del sistema nervioso central (como el tratamiento de la narcolepsia),



para incrementar el rendimiento físico e intelectual y en el tratamiento de la hiperactividad (hace que la atención aumente).⁶

Los efectos que producen estos compuestos son excitación, euforia, reducción de la sensación de cansancio y sueño, aumento de la capacidad de trabajo y atención y disminución del apetito. En caso de sobredosis se produce una intoxicación aguda, aparece tumefacción facial, palpitaciones, cefaleas y arritmias cardiacas entre otros síntomas.⁶

Hoy en día se consumen en mayor medida como drogas de abuso y se podrían clasificar en tres grupos. El primero, donde la ingesta tiene lugar de forma ocasional, con la finalidad de mejorar el rendimiento físico (dopaje), evitar el cansancio y el sueño (conductores y pilotos), o aumentar la actividad (estudiantes, artistas). El segundo, correspondería al grupo de consumidores habituales, quienes buscan euforia, bienestar, actividad, placer sexual, fuerza y estimulación y se consumen normalmente durante la noche. Y por último, el tercero se emplea de forma terapéutica, pero sin control médico, por las razones anteriormente indicadas.⁶

El consumo de estas drogas estimulantes no es semejante en todo el mundo. En la Figura 2 se puede observar la diferencia de consumo en los diferentes continentes. En la Tabla 1 se muestra el número de consumidores por continente durante el año 2013, así como el porcentaje que supone esos consumidores frente a la población de cada lugar.⁸

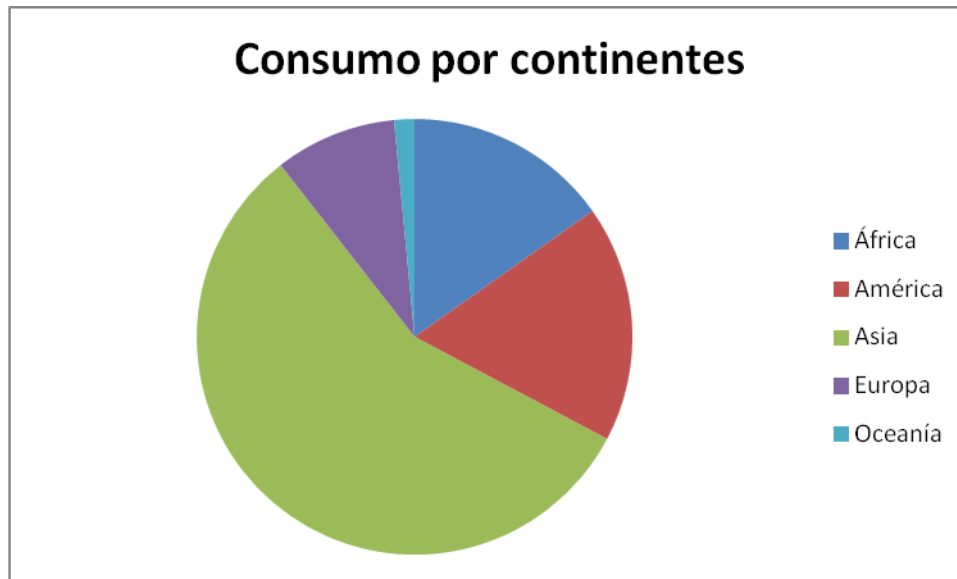


Figura 2. Consumo de anfetaminas en los diferentes continentes en el año 2013.

Tabla 1. Consumo mundial de anfetaminas durante el año 2013.

Región	Número de consumidores	% de consumidores
África	5130	0,9
África del norte	780	0,6
África del sur	600	0,7
América	5930	1,0
Caribe	210	0,8
América central	330	1,3
Norteamérica	3990	1,3
Suramérica	1400	0,5
Asia	19130	0,7
Este/Sureste asiático	8740	0,6
Este cercano y medio	420	0,2
Europa	3050	0,5
Este/Sureste de Europa	870	0,4
Oeste/Centro de Europa	2180	0,7
Oceanía	510	2,1
ESTIMACIÓN GLOBAL	33750	0,7

En lo relativo al consumo de estas drogas en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), lugar donde se tomaron las

muestras a analizar, es superior al de España, Figura 3, pero en los últimos años ha disminuido notablemente.⁹

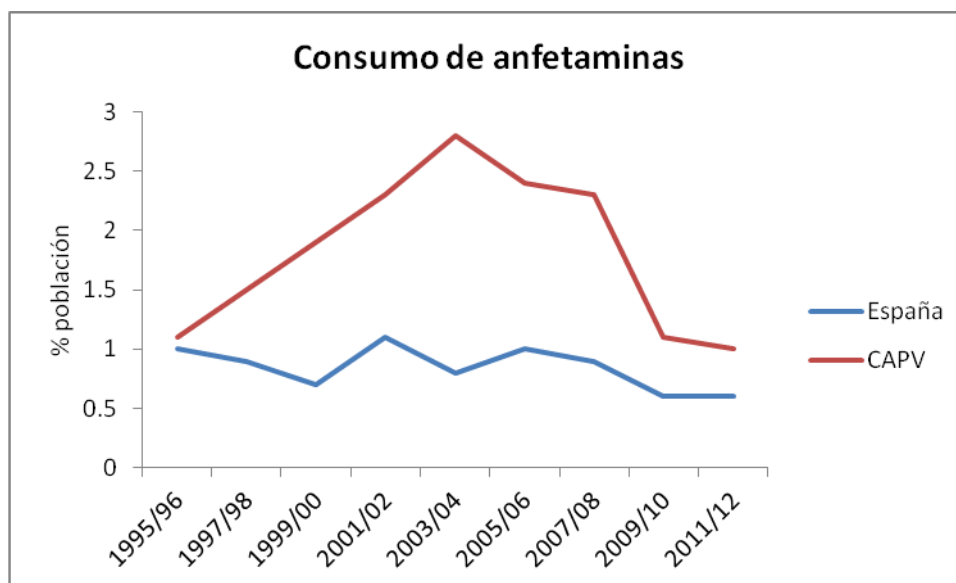


Figura 3. Evolución del consumo de anfetaminas en España y la CAPV.

El análisis de las anfetaminas se lleva a cabo principalmente, en el campo del análisis forense y en el dopaje deportivo (Grupo S6. Estimulantes, dentro de Sustancias y Métodos Prohibidos en competición, BOE nº312/30 de diciembre 2013). Su ingesta se verifica mediante la detección de la droga o alguno de sus metabolitos con ayuda de diferentes metodologías analíticas y en diferentes matrices.

En este trabajo nos centraremos en el análisis de anfetaminas en el campo forense.

1.1.1 Análisis de anfetaminas en matrices biológicas

La identificación de las anfetaminas puede realizarse en diferentes matrices siendo las más empleadas la sangre (plasma), la orina y el pelo. El contenido de droga en cada una de ellas dependerá de la forma de ingestión, siendo mayor en el caso de inyectarse por vía intravenosa, menor en administración oral e intermedia si se inhala.¹⁰

- Sangre

Las anfetaminas son absorbidas por la sangre, por lo que se puede utilizar este fluido para detectarlas.¹¹ El análisis de las anfetaminas se lleva a cabo en plasma, líquido claro y ligeramente amarillento que se obtiene después de sedimentar, mediante centrifugación generalmente, los elementos formes de la sangre no coagulada, como se muestra en la Figura 4.¹²

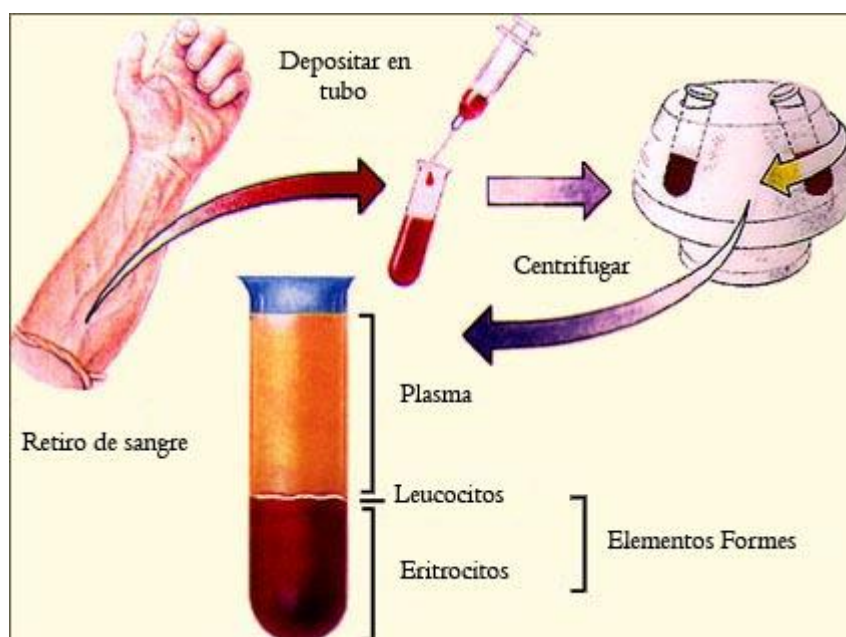


Figura 4. Muestra de sangre para el análisis de anfetaminas.

La vida media de estas drogas en sangre es de aproximadamente 24 horas, por lo que será necesario realizar su análisis a la mayor brevedad posible.¹³

- Orina

Los fármacos, al igual que el resto de sustancias pasan a través del riñón, donde son transformados por las enzimas para poder ser eliminados del organismo.¹¹ Gracias a este proceso se pueden identificar sus diferentes metabolitos en la orina.

En el caso de las anfetaminas o sus metabolitos, su tiempo de aclaramiento es de uno a tres días, tiempo ligeramente superior al de la matriz sangre. Esto permite detectar el consumo de estas drogas a pesar de que el periodo de tiempo transcurrido desde su ingesta sea mayor.¹³

- Pelo

El pelo es una extensión epidérmica, sintetizada en el folículo capilar. Está compuesto por un 65-95 % de proteínas, entre 1 y 9 % de lípidos, un 0.1-5 % de pigmentos (melanina) y pequeñas cantidades de compuestos a niveles de trazas como polisacáridos o agua.¹⁴ En la Figura 5 se muestra el esquema de un pelo.

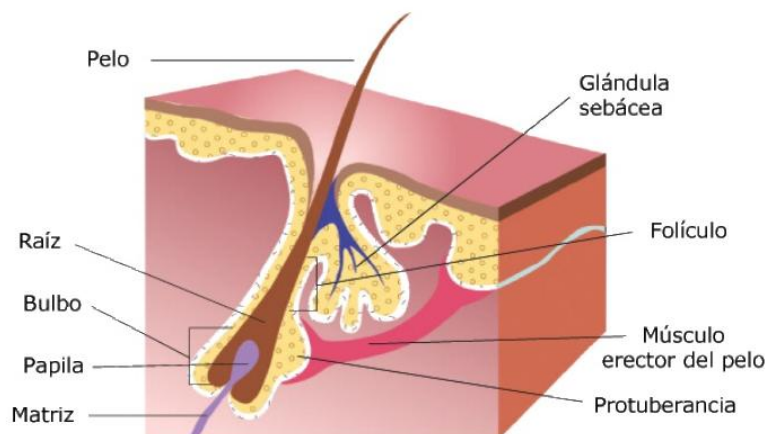


Figura 5. Esquema de la estructura del pelo.

La velocidad de crecimiento del pelo humano es aproximadamente de 0.35 mm por día, tanto en hombres como en mujeres, aunque puede variar mucho en función de las hormonas, la luz, la nutrición, la temperatura, etc¹⁵. El ciclo del pelo, que se muestra en la Figura 6, consiste en periodos de crecimiento e inactividad, y cada folículo capilar tiene su propio ciclo independientemente del resto de sus vecinos. El ciclo del pelo humano empieza con la fase del anágeno, o crecimiento, en ella se desarrolla el folículo y se produce el pelo. La duración de esta fase varía mucho, lo normal es que dure entre 7 y 94

semanas pero puede llegar a durar incluso varios años, dependiendo de la región anatómica en la que se encuentre. La siguiente fase es la del catágeno, en ella el pelo continúa creciendo pero el bulbo se hace menor. Finalmente el pelo se cae en la última fase denominada fase telógena, y el ciclo vuelve a reiniciarse.¹⁴

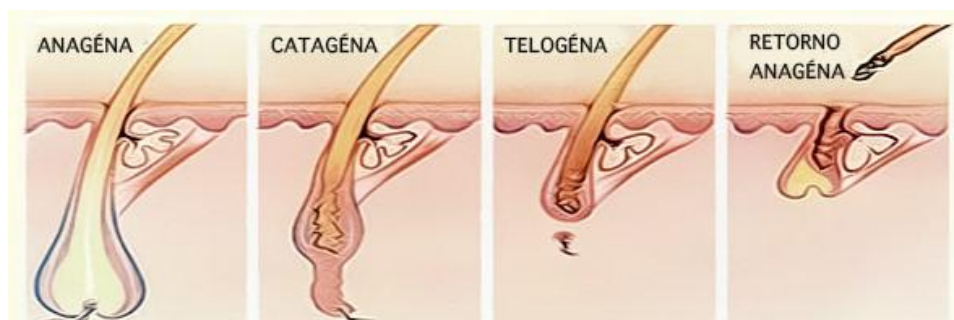


Figura 6. Ciclo de crecimiento del pelo.

El folículo capilar está en contacto con vasos sanguíneos que intercambian materiales entre la sangre y el interior del pelo, uno de esos materiales pueden ser los fármacos. Cuando el pelo se queratiniza (se transforma en un tejido córneo), el intercambio finaliza, tan solo se producirá el desplazamiento de la sustancia que ha sido absorbida en el folículo del pelo, y permanecerá allí hasta que el pelo se corte o se caiga.¹⁶ Además de esta forma de incorporación de la droga al pelo existen otras dos, que serían mediante difusión del sudor u otras secreciones que bañen la fibra del cabello ya maduro o mediante vapores o polvos de una droga externa que lleguen también a la fibra del cabello.¹⁴

El pelo es una matriz que cada vez se emplea más para el análisis de drogas, esto se debe a que presenta ventajas importantes respecto al resto de matrices empleadas con este fin, entre las que se pueden citar:¹⁷⁻¹⁸

- El tiempo de permanencia de la droga en esta matriz es de semanas e incluso meses.



- Puede obtenerse con mayor facilidad y sin los problemas de privacidad que se pueden encontrar al tomar muestras de orina o la agresividad de extraer sangre.
- A pesar de que haya existido un periodo de abstinencia el resultado no se vería alterado.
- Es fácil de manejar e inerte por lo que no requiere unas condiciones de almacenamiento especiales.
- El riesgo de transmisión de enfermedades es mucho más bajo que en el caso de la orina o la sangre.
- La posibilidad de repetir la prueba no supone ningún esfuerzo debido a la sencillez para recoger muestras.
- La manipulación del pelo es prácticamente imposible, mientras que en orina si es factible, por lo que es útil para evitar falsos positivos.
- Es la única matriz disponible para analizar bajo ciertas circunstancias como en el caso de investigaciones postmortem en restos óseos o traumatismos.

Hay que tener en cuenta que no todo son ventajas, también tiene algunos inconvenientes que no se encuentran en las matrices anteriormente mencionadas:¹⁷⁻¹⁸

- La unión de la droga dependerá del tipo de pelo, está demostrado que la absorción de los metabolitos de la droga en pelos africanos y americanos es entre 10 y 50 veces mayor que en pelos caucásicos, lo que aumenta la probabilidad de dar positivo en un test de droga.

- El pelo puede absorber contaminantes del aire y por tanto una persona expuesta a una droga fumada puede poseer metabolitos en su pelo que hagan que de positivo en el análisis de drogas.
- Los análisis suponen un coste mayor, al menos el doble que un análisis en orina, ya que su tratamiento es mucho más complejo.

A pesar de estas desventajas, el gran número de ventajas que presenta hacen que el pelo sea una matriz muy empleada en el ámbito forense

1.1.2 Metodología analítica para el análisis de anfetaminas en pelo

El análisis de anfetaminas en pelo precisa llevar a cabo un proceso que consta de cuatro etapas (Figura 7), previo al tratamiento de datos. La primera de ellas sería la toma de muestra, que consistiría en cortar el pelo a analizar. La segunda será la limpieza de la muestra obtenida. A continuación, en el tercer paso, se llevará a cabo el tratamiento de la misma para extraer la droga que se va a analizar y finalmente, la cuarta etapa, que consistirá en el análisis propiamente dicho, con la técnica analítica elegida.



Figura 7. Etapas del proceso analítico seguido en el análisis de anfetaminas en pelo.

A continuación se describen cada una de estas etapas.

- Toma de muestra

En primer lugar se debe mencionar que es más adecuado utilizar el pelo de la cabeza, pero en caso de que no sea posible se puede emplear el de otro lugar, como el pelo púbico o el de las axilas.¹⁹

Cuando se lleve a cabo la toma de muestra es necesario seguir un protocolo. Inicialmente se debe limpiar con isopropanol las tijeras con las que se va a cortar el pelo, una vez limpias ya se puede proceder a realizar el corte. Este debe hacerse en la parte posterior de la cabeza y lo más cerca posible al cuero cabelludo. La cantidad de pelo recogido debe ser de entre 30 y 50 mg de aproximadamente 3.9 cm de largo (equivalente al grosor de la punta de un cordón de zapato). Si la longitud del cabello es menor se tomará una muestra de mayor grosor. La muestra se guarda en papel de aluminio haciendo que este envuelva la parte por donde se ha cortado, para poder identificarla a la hora del análisis. El papel, a su vez, se guarda en un sobre, donde se escribe un número para poder identificarlo, y se sella.¹⁴ En la Figura 8 se muestra la recogida y almacenaje de la muestra de cabello.



Figura 8. Toma de muestra y almacenaje del cabello.

Este protocolo se debe hacer en presencia del donante, previa identificación del mismo. El donante además debe firmar con sus iniciales en el sobre para asegurar que contiene su pelo. A continuación la muestra se introduce en una bolsa donde se especifican los análisis que se llevaran a cabo con ella, esta también deberá ser sellada. En esta última bolsa además habrá que escribir las iniciales del donante, y además debe ser firmada por quien ha recogido la muestra.¹⁴



En los casos en que el análisis de pelo se lleve a cabo con cadáveres éste debe tomarse al comienzo de la autopsia porque de otra manera podría mojarse o contaminarse con sangre.¹⁴

- Limpieza de la muestra

Una vez obtenida la muestra de pelo, y antes de proceder al análisis, se debe limpiar para eliminar tanto impurezas que puedan existir en su superficie, como drogas que se hayan podido quedar adheridas por su presencia en el aire. Si no se lleva a cabo esta etapa la concentración que se determine será mayor que la que realmente corresponda a la ingesta. En general, una estrategia de descontaminación debe incluir un disolvente orgánico inicial (siendo el diclorometano el más empleado), para eliminar aceites, seguido de lavados acuosos. Otro tipo de lavados consisten en lavar únicamente con un disolvente orgánico, siendo también el diclorometano el más utilizado, o en el simple uso de un champú común. Los lavados, en todos los casos, deben ser almacenados para su posterior análisis, si fuera necesario.¹⁹

Los tratamientos cosméticos del pelo como decoloración o tinte pueden disminuir las concentraciones de algunas drogas en esta matriz. Estos tratamientos causan porosidad, cambios en la estructura molecular de los pigmentos del pelo y daños en la cutícula. Esto puede llevar a la pérdida parcial de la droga por un exceso de lixiviación a partir de la matriz del pelo mediante la destrucción de los puntos de unión al pelo. También se ha demostrado que algunas drogas, entre ellas la metanfetamina, son químicamente inestables en presencia de peróxido de hidrógeno, un componente que se utiliza tanto para teñir como para decolorar.²⁰ En el caso de cabellos que hayan sufrido permanentes, las drogas no se ven degradadas, pero si diluidas, dando por tanto una concentración menor de la real. La



razón por la que no se ven degradadas es que los productos empleados para este tratamiento no son tan agresivos como los que se utilizan en los tintes o decoloraciones.¹⁴

En casos de autopsia o de exhumación, puede ser necesario llevar a cabo un pre-tratamiento adicional del pelo en el laboratorio, dependiendo del estado de la muestra.¹⁹

- Tratamiento de muestra

Tras la limpieza se procede a la extracción, pero previamente es necesario cortar el pelo en pequeños fragmentos para que la extracción sea más eficaz. Al igual que para la limpieza, existen numerosos procedimientos. Tras realizar una revisión bibliográfica de los últimos 10 años (2003-2013) se puede verificar que el procedimiento de extracción más utilizado consiste en el empleo de ácido clorhídrico al 1 % en metanol. En la Figura 9 se esquematiza este procedimiento.

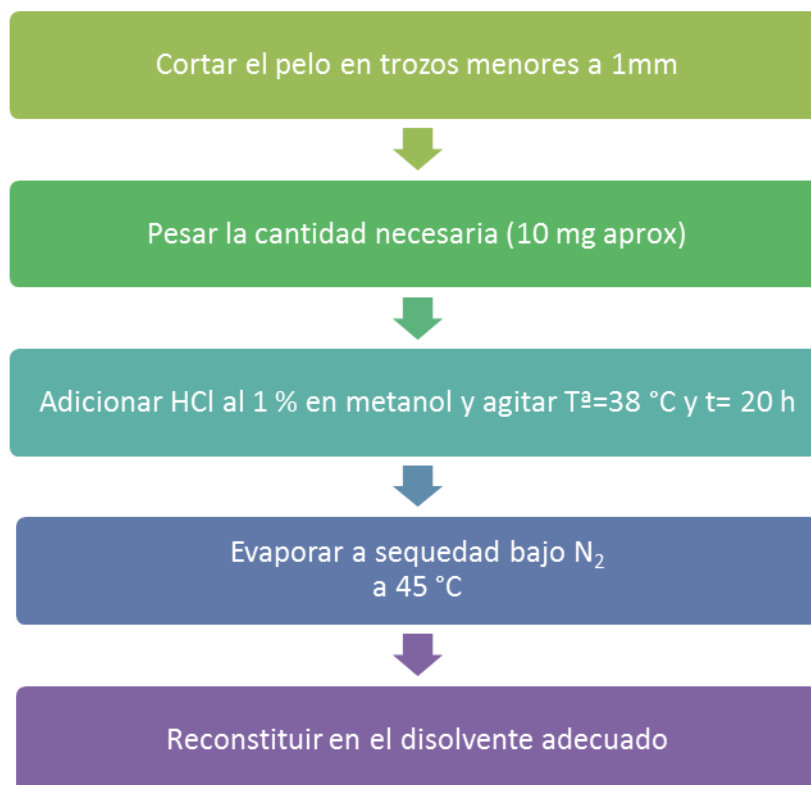


Figura 9. Esquema del tratamiento de muestra con ácido clorhídrico al 1 % en metanol.

- Análisis de la muestra

En muchas ocasiones previo al análisis de anfetaminas se verifica su presencia en la matriz en la que se estén analizando, mediante el empleo de inmunoensayos, siendo el más común el tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Los inmunoensayos son métodos de análisis, sensibles y específicos, basados en la formación de complejos entre anticuerpos y antígenos, generando un resultado medible. Con estos ensayos podremos identificar la presencia de la droga de forma cualitativa, pero no siempre se podrá cuantificar.¹⁶

Otra técnica analítica empleada para la identificación, que además permite la cuantificación, es la cromatografía: cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía de líquidos (LC), utilizando diferentes tipos de detección. Los detectores más comunes son el de



espectrometría de masas (MS) y el de fluorescencia (FI), dentro del primero se puede destacar el de tiempo de vuelo (TOF).²¹

Hasta el año 2010, el método más empleado era la GC acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS). Reciente se ha introducido la utilización de la GC-espectrometría de masas en tandem (GC-MS/MS) para este tipo de análisis.

Se debe mencionar que el uso de la GC como técnica puede precisar una etapa de derivatización del analito. Este procedimiento consiste en modificar químicamente el compuesto para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis, en este caso hacerlo más volátil.²² A su vez también permite reducir la adsorción del analito sobre la columna y mejorar la respuesta del detector, la resolución de los picos cromatográficos y su simetría. El agente derivatizante más empleado para el análisis de anfetaminas es el anhídrido trifluoroacético (TFFA), ya que favorece la acetilación del grupo amino haciendo posible la detección de los analitos en muy bajas concentraciones.²³

- Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica analítica que permite separar compuestos volátiles gracias a una fase móvil, que es un gas relativamente no reactivo (He, N₂, H₂), y una fase estacionaria, que es una columna de normalmente 30 metros. En el cromatograma obtenido aparecen picos que indican cuando ha sido eluido cada soluto y las áreas de estos señalan la concentración del mismo. El compuesto que ha sido eluido puede identificarse comparando su tiempo de retención con una base de datos, siempre que el disolvente utilizado coincida. Si a esta técnica se le añade un detector de espectrometría de masas se puede obtener un espectro

de masas de cada componente, al igual que su masa y ubicación en el cromatograma.²⁴

En la Figura 10 se puede observar un esquema de un GC-MS, la muestra se introduce en el sistema a través del puerto de inyección del cromatografo, donde se separa en la columna cromatográfica antes de pasar al espectrómetro de masas. En él, los compuestos se ionizan (mediante impacto electrónico o ionización química), se clasifican en función de su relación masa/carga (m/z) y se detectan. La información se transfiere desde el detector hasta el sistema de tratamiento de datos para su almacenamiento y posterior procesado.²⁵

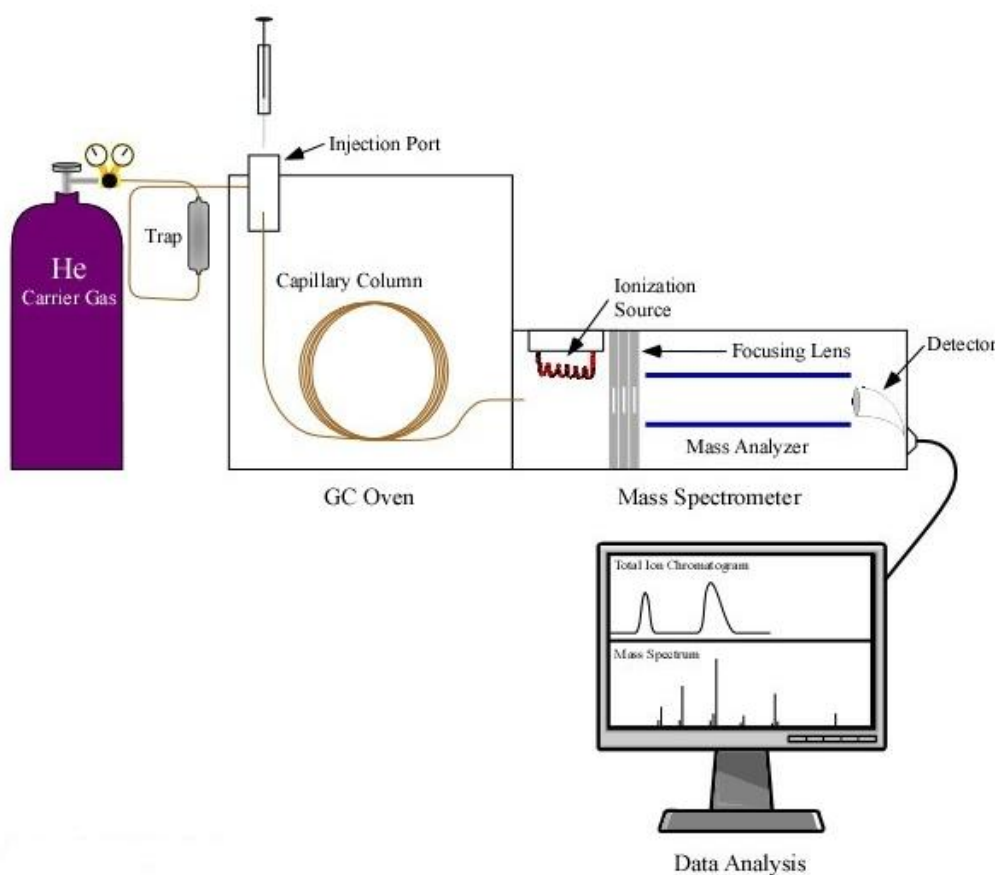


Figura 10. Esquema de un equipo de GC-MS.

La aplicación de todo método cromatográfico precisa llevar a cabo una validación, proceso por el cual se establece que un método es

adecuado en términos de fiabilidad, exactitud y precisión para la aplicación deseada. La validación de un método analítico requiere el cumplimiento de una serie de parámetros; selectividad, modelo de calibración, precisión, exactitud y límite de cuantificación, haciendo uso de guías específicas (Food and Drug Administration, International Conference of Harmonization) para cada campo de aplicación. Este conjunto de parámetros pueden ser ampliados en función de la matriz o el analito a analizar.²⁶

1.2 ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DE ANFETAMINAS

La revisión bibliográfica realizada sobre el tema “análisis de anfetaminas” en los últimos 10 años, ha demostrado que es una problemática vigente en la actualidad, con una media de artículos publicados desde 2003 de 131 artículos por año, Figura 11.

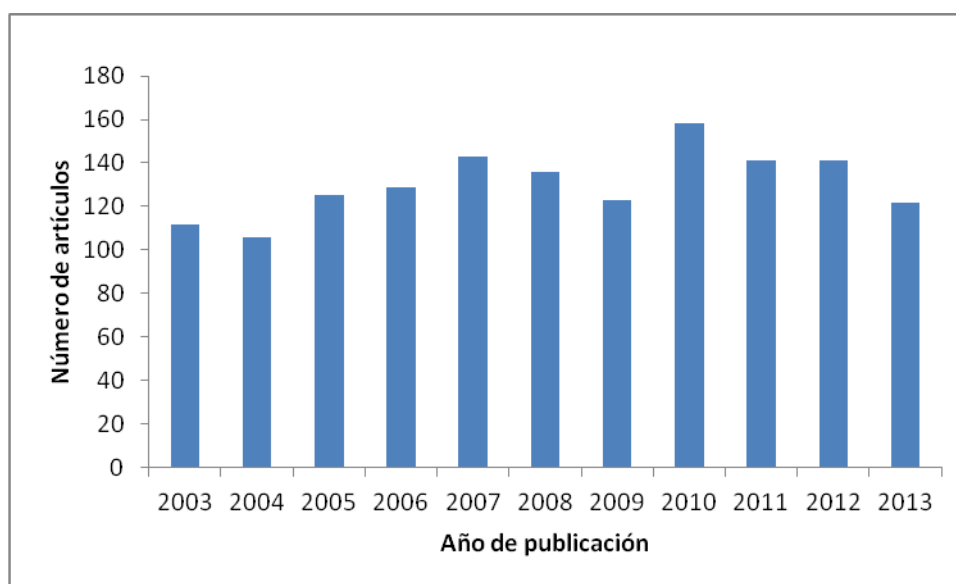


Figura 11. Evolución de las publicaciones sobre análisis de anfetaminas en los últimos 10 años. (Fuente: Sciencefinder, Keywords: amphetamines, analysis).

Si nos centramos en las diferentes matrices en las que se pueden encontrar estos compuestos podríamos dividirlos en dos grupos. El primero se podría denominar de fluidos biológicos, como puede ser la

orina o el pelo y el segundo otro tipo de matrices, como por ejemplo la droga en polvo. En la Figura 12 se compara el número de artículos encontrados para cada uno de estos grupos y se observa con claridad que el análisis en las matrices biológicas es una problemática mucho más estudiada.

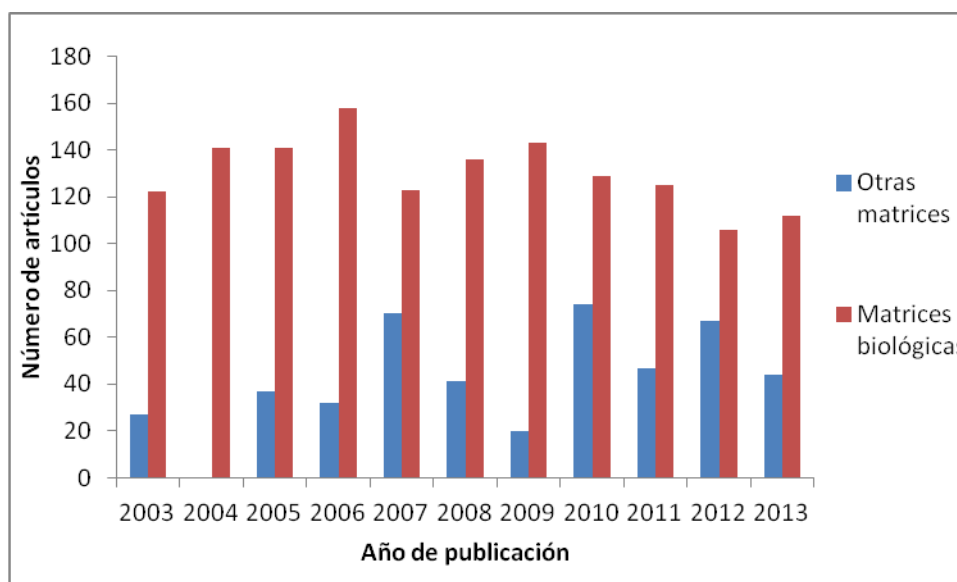


Figura 12. Evolución de las publicaciones sobre análisis de anfetaminas en los últimos 10 años. (Fuente: Sciencefinder, Keywords: amphetamines, analysis, biological matrices).

Por otra parte, se han evaluado las tendencias actuales en el empleo de las técnicas analíticas para el análisis de anfetaminas. En la Figura 13, se puede observar la mayor utilización de la GC-MS, hasta el año 2010, a partir del cual es notable el incremento experimentado por el empleo de la LC-MS respecto a GC-MS.

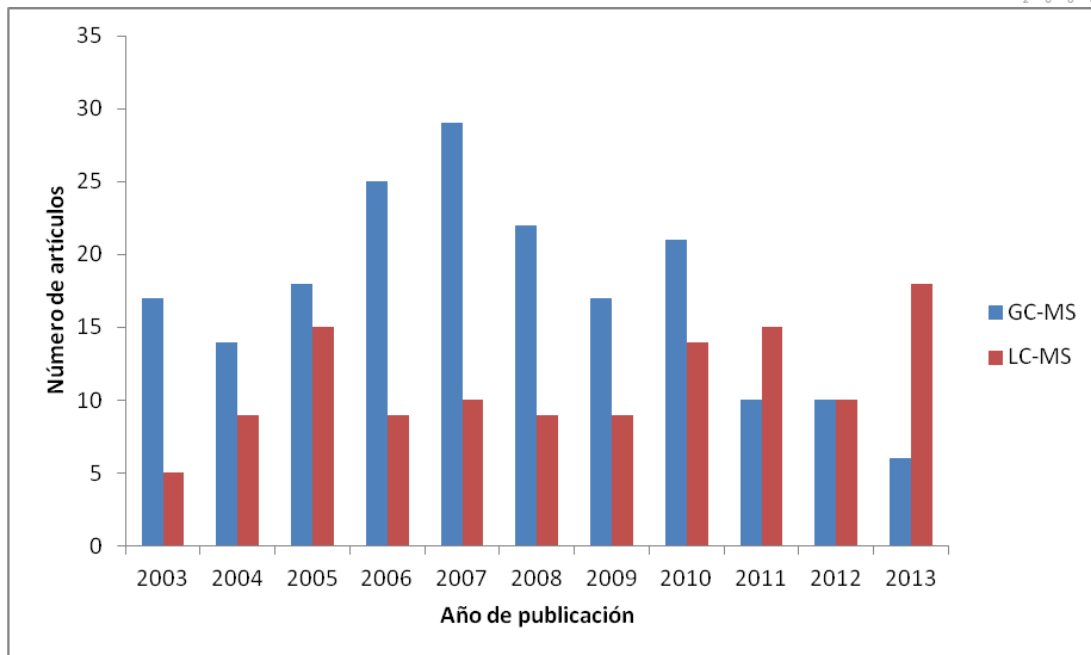


Figura 13. Evolución del empleo de la GC-MS y LC-MS en el análisis de amfetaminas. (Fuente: Sciencefinder, Keywords: amphetamines, GC-MS, LC-MS).

Una vez observada la tendencia en el empleo de las dos técnicas cromatográficas, se procedió a estudiar el impacto bibliográfico de la GC-MS en los análisis de estas drogas de abuso en la matriz de interés el, pelo. En la Figura 14 se muestra como, en esa matriz el uso de GC-MS es más habitual que la LC-MS, sin tener en cuenta el último año dado que muchas publicaciones no han sido recogidas aún por Sciencefinder.

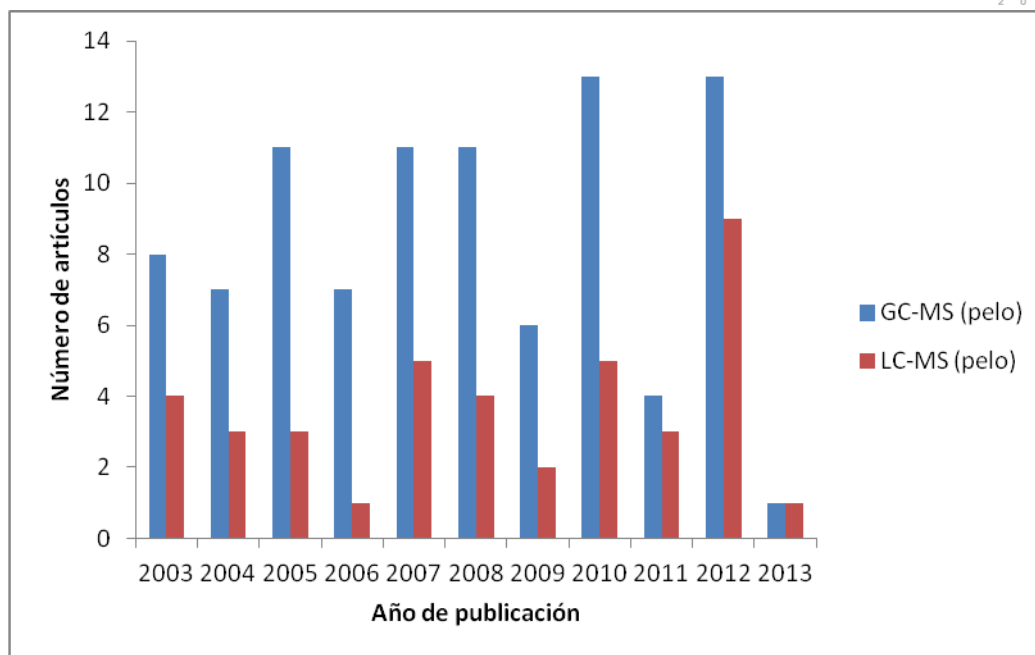


Figura 14. Evolución del empleo de GC-MS y LC-MS en el análisis de amfetaminas en pelo. (Fuente: Sciencefinder, Keywords: amphetamines, GC-MS, LC-MS, hair).

Si se realiza una evaluación de las publicaciones realizadas sobre la matriz pelo de forma comparativa con otras matrices biológicas (plasma, orina), se puede observar, Figura 15, como el pelo es la matriz menos estudiada, a pesar de la potencialidad de ésta para llevar a cabo estudios del consumo de drogas durante periodos de tiempo más largos.

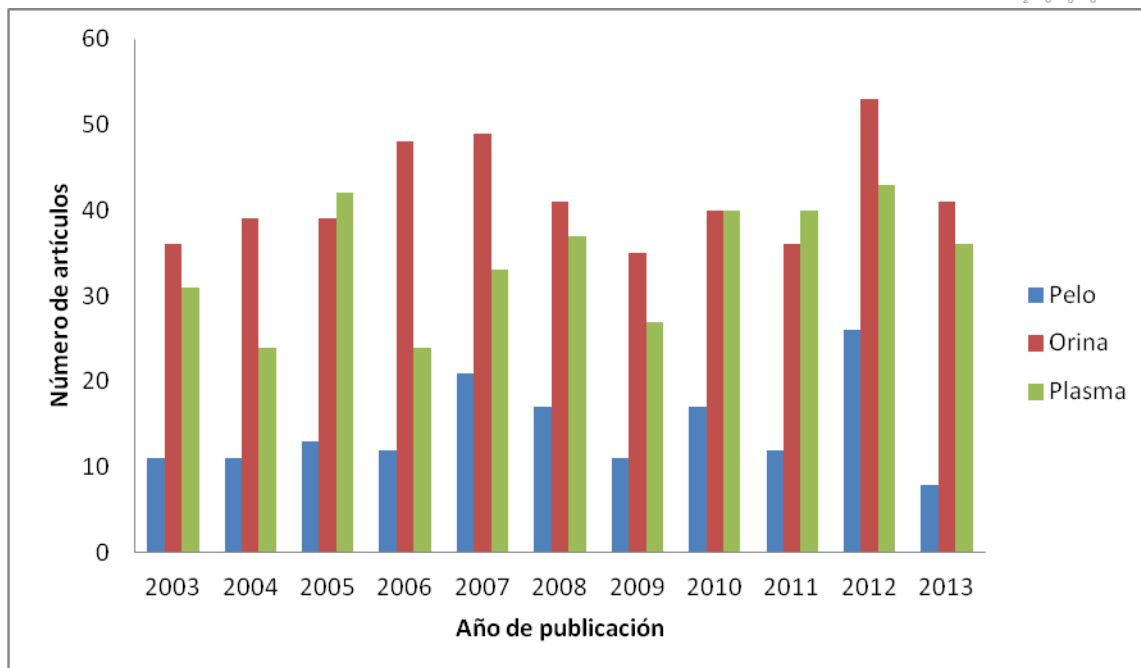


Figura 15. Evolución del empleo de pelo, orina y plasma sanguíneo como matrices para el análisis de anfetaminas. (Fuente: Sciencefinder, Keywords: amphetamines, urine, hair, plasma).

El trabajo que se presenta forma parte de un proyecto de investigación centrado en el análisis de drogas de abuso: anfetaminas en la matriz pelo mediante GC-MS. Por ello se recogen en la Tabla 2, como fruto de la revisión bibliográfica realizada, las metodologías analíticas empleadas para el análisis de anfetaminas en esta matriz mediante GC-MS, especificando las etapas de lavado, extracción y técnica analítica utilizadas.

Tabla 2. Determinación de anfetaminas en pelo mediante GC-MS (Fuente: Sciencefinder, años: 2003-2013).

Anfetaminas	Tratamiento de muestra		Técnica analítica	Referencia
	Lavado	Extracción		
MA, AP	No especificado	Micropulverizada con agua y 3-amino-1-fenilbutano	GC-MS/MS	27
MA, AP	Jabón líquido (pH=6,5) o lavado normal	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	20
MA, AP	No especificado	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	28
MA, AP, MDMA, MDA	Agua y acetona	Digestión con NaOH y extracción en fase sólida	GC-MS	29
MA, AP	No especificado	HCl al 1 % en metanol (agitado) o Metanol:HCl 20:1 (ultrasonidos)	GC-MS	30
MA, AP, MDMA, MDA	Dodecil sulfato de sodio, agua destilada (3 veces) y etanol	Microextracción en fase sólida con NaOH e IS	GC-MS	31
MA, AP	Etanol y diclorometano (5 veces)	Incubación con NaOH y extracción líquido-líquido con hexano:etil acetato (2:1)	GC-ESI-MS/MS	32
MA, AP	No especificado	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	33
AMP, MAMP, MDMA, MDA	Diclorometano (2 veces)	Microextracción en fase líquida con fibra hueca con diexil eter	GC-MS	34
MA, AP	Agua (2 veces) y metanol (2 veces)	HCl al 1 % en metanol (agitado) o Metanol:HCl 20:1 (ultrasonidos)	GC-MS	35
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Diclorometano en ultrasonido (2 veces)	Líquido-líquido con terbutil metil eter o en fase sólida con metanol/trifluoroacético	GC-MS	36

Anfetaminas	Tratamiento de muestra		Técnica analítica	Referencia
	Lavado	Extracción		
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Agua , acetona y hexano	metanol y metanol con ácido clorhídrico	GC-MS	37
MA, AP	Champú y acetona	Metanol (ultrasonidos) o HCl al 1 % en metanol o NaOH	LC-TOFMS (tiempo de vuelo)	38
MA, AP	No especificado	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	39
MA, AP, MDMA, MDA	Detergente	2-metilbencilamina y NaOH	GC-MS	40
MA, AP, MDMA, MDA	Metanol (3 veces)	HCl	GC x GC-TOFMS (tiempo de vuelo)	41
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Metanol	Metanol con ultrasonidos y cloroformo:isopropanol (9:1)	GC-MS	42
MA, AP	Diclorometano y agua destilada	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	43
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Diclorometano	Fase sólida (metanol-TFA)	GC-EI-MS o GC-NCI-MS	44
AP, MA, MDA, MDMA, MDEA	Diclorometano, agua destilada y metanol	1-clorobutano (centrifugado)	LC-APCI-MS	45
MA, AP, MDMA, MDA	Champu, diclorometano, isopropanol y acetona	HCl	GC-MS	46
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Dodecilsulfato de sodio, agua (dos veces) y acetona	n-hexano y etilacetato	LC-HRMS (alta resolución)	47
MA, AP	Diclorometano	Fase sólida (etil acetato y HCl)	GC-MS	48

Anfetaminas	Tratamiento de muestra		Técnica analítica	Referencia
	Lavado	Extracción		
MA, AP, MDMA, MDA	No especificado	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	49
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Jabón líquido neutro	Isopropanol:cloruro de metileno (4:1)	GC-MS	50
MA, AP, MDMA, MDA	Agua destilada y acetona (dos veces)	Pulverizado con polipropileno	GC-MS	51
MA, AP	Sulfato de dodecil sodio	n-heptano	HPLC	52
MA, AP, MDMA, MDA	cloruro de metileno (tres veces)	Fase sólida (cloruro de metileno, isopropanol, hidróxido amónico)	GC-MS	53
MA, AP	Agua destilada y metanol (2 veces)	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	54
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Diclorometano (dos veces)	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	55
MA, AP	Dodecil sulfato de sodio y agua destilada (ultrasonidos)	NaOH	GC-MS	56
MA, AP, MDMA, MDA	Metanol	Microextracción en fase sólida (metanol)	GC-MS	57
MA, MDMA	Agua y agua con metanol (2 veces)	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	58
MA, AP, MDMA, MDA, MDEA	Agua y acetona	Microextracción en fase sólida (HCl)	GC-MS	59
MA, AP	Metanol, agua destilada y metanol	HCl al 1 % en metanol	GC-MS	60



1.3 OBJETIVO

Una vez establecida la importancia del análisis de las drogas de abuso tipo anfetamínico y verificado el empleo de la cromatografía de gases-espectrometría de masas para su análisis, el objetivo de este trabajo se ha centrado en:

“La puesta a punto de un método analítico mediante GC-MS sin derivatización previa para el análisis de anfetaminas en el ámbito forense”.

2. EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los estándares de referencia certificados de los estimulantes anfetamina (AP), metanfetamina (MA), 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y el estándar interno anfetamina- d_5 (AP $_{d5}$), fueron adquiridos en la casa comercial Cerilliant (Round Rock, Texas, EEUU) a través de LGC Standards (Barcelona, España), como disoluciones metanólicas a una concentración de 1 mg/mL. Todas las disoluciones se conservaron refrigeradas a -20°C .

El disolvente metanol, de calidad HPLC, se adquirió en la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España).

2.2 INSTRUMENTACIÓN

Los análisis por GC-MS se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases 7820A (Agilent Technologies, Santa Clara-California, EEUU) equipado con una columna capilar HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), un inyector automático de la misma serie, una fuente de ionización de impacto electrónico y un detector de masas 5975C *Triple-Axis Detector* (Agilent Technologies, Santa Clara-California, EEUU).

2.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 Optimización del método cromatográfico

En primer lugar fue necesario optimizar un método cromatográfico para el análisis de las anfetaminas de interés. Para ello se tuvo en cuenta los métodos recogidos en la bibliografía, así como el empleado previamente por el grupo investigador.

Se realizaron los ensayos con una disolución metanólica de anfetamina deuterada de 5 mg/L. Se inyectó en primer lugar una disolución blanco y posteriormente la disolución de anfetamina deuterada en el sistema cromatográfico (GC-MS) y se aplicaron las condiciones cromatográficas utilizadas en la bibliografía, Tabla 3.

La programación de la T empleada fue: T inicial de 100 °C, se mantuvo durante 1 minuto a esa temperatura y para finalizar se introdujo una rampa de 20 °C/min hasta alcanzar 270 °C, donde permaneció 1 minuto, lo que proporcionó un cromatograma de 10,5 minutos de duración.

A continuación se inyectó la misma disolución, utilizando el método previamente empleado por el grupo investigador, Tabla 3, que difiere del método bibliográfico en el modo de inyección y la programación de temperatura que consistió en:

Programación de T: T inicial de 65 °C durante 1 minuto. Se empezó con una primera rampa de 40 °C/min hasta alcanzar 150 °C, temperatura en la que permaneció 1 minuto, después se aplicó una segunda rampa de 15 °C/min hasta 190°C, donde también se mantuvo 1 minuto y finalmente una tercera de 50 °C/min hasta 300 °C, donde se mantuvo 1 min, lo que proporcionó un cromatograma de 10,99 min de duración.

Para ambos métodos el cromatograma fue adquirido en modo SCAN.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas ensayadas en GC-MS.

	Método bibliográfico	Método grupo investigador
Sistema de inyección	Splitless	Splitless pulsado
Volumen de inyección (µl)	2	2
Flujo de gas portador (He) (mL/min)	1,9	1,9
Presión (psi)	10,73	10,73
T del inyector (°C)	260	270
T de la fuente iónica(°C)	230	230
T de la línea de transferencia (°C)	325	325
Solvent delay (min)	1,5	1,5
Rango de masas en SCAN (u.m.a.)	40-500	40-500

2.3.2 Parámetros cuantitativos del método cromatográfico (GC-MS)

- Intervalo lineal de concentración

Una vez obtenidos los tiempos de retención y los iones característicos de cada anfetamina a partir de los cromatogramas y espectros de masas de cada una de ellas, se procedió al cálculo de los parámetros cuantitativos del método. En primer lugar se determinó el intervalo lineal de concentración del método. Para ello se realizó una curva de calibrado multicomponente de las cuatro anfetaminas estudiadas. Se adquirieron los cromatogramas en modo de monitorización selectiva de iones (SIM) y se establecieron las siguientes ventanas de tiempo, Tabla 4, monitorizando los iones característicos de cada anfetamina.

Tabla 4. Ventanas de tiempo establecidas e iones seleccionados para el análisis de las anfetaminas mediante GC-MS en modo SIM.

Grupo	Drogas	Tiempo (min)	Iones (m/z)
1	AP	2,00-3,20	44 y 91
1	AP _{d5}	2,00-3,20	48 y 92
2	MA	3,20-5,50	58 y 91
3	MDA	5.50-6,20	44 y 136
4	MDMA	6,20-fin del cromatograma	58 y 135

Se prepararon disoluciones multicomponente con AP, MA, MDA y MDMA en un rango de 40 a 400 µg/L (40-112-184-256-328-400), teniendo en cuenta los niveles de concentración esperados en la matriz pelo y se realizó un calibrado para cada una de las anfetaminas. Se utilizó el método de calibración con estándar interno, utilizando la anfetamina deuterada (AP_{d5}) como estándar interno, que se adicionó a todas las disoluciones en una concentración de 256 µg/L.

Los datos de área/área del estándar interno- concentración se trataron mediante el método de regresión lineal de mínimos cuadrados.

- Límite de cuantificación y límite de detección

Se determinaron los límites de cuantificación y detección a partir de los datos de las curvas de calibrado. Ambos límites se definieron por las Ecuaciones (1) y (2).

$$\text{LOQ} \quad y = y_{0,0} + 10s_{0,0} \quad (1)$$

$$\text{LOD} \quad y = y_{0,0} + 3s_{0,0} \quad (2)$$

Una vez obtenidas las señales, por interpolación en las respectivas curvas de calibrado se obtienen las concentraciones correspondientes a ambos límites.

- Repetitividad

Para el cálculo de la repetitividad en el día del método se prepararon disoluciones multicomponente de las anfetaminas estudiadas a diferentes niveles de concentración (100 y 400 µg/L) que fueron inyectados en el sistema cromatográfico. Se realizaron 5 réplicas de cada disolución. Este parámetro se expresa como desviación estándar relativa (% RSD), que se defina con la Ecuación (3).

$$\% \text{ RSD} = (\bar{x} / s) * 100 \quad (3)$$

2.3.3 Aplicación a muestras reales

Para finalizar la parte experimental se inyectó en el cromatógrafo de gases-espectrometría de masas en las condiciones optimizadas una muestra conteniendo una composición. En la Figura 16 se muestra una imagen de la bolsa conteniendo la droga desconocida.



Figura 16. Bolsa conteniendo una muestra con drogas de abuso

3. RESULTADOS

3.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (GC-MS)

La comparación de los cromatogramas obtenidos por ambos métodos demostró la conveniencia de utilizar el método

cromatográfico previamente utilizado por el grupo investigador, debido a la mayor área de los picos cromatográficos. En la Figura 17 se muestra una superposición de los dos cromatogramas obtenidos, donde se puede observar con claridad la diferencia entre ambos, siendo los picos correspondientes a la anfetamina deuterada los que están marcados con un círculo.

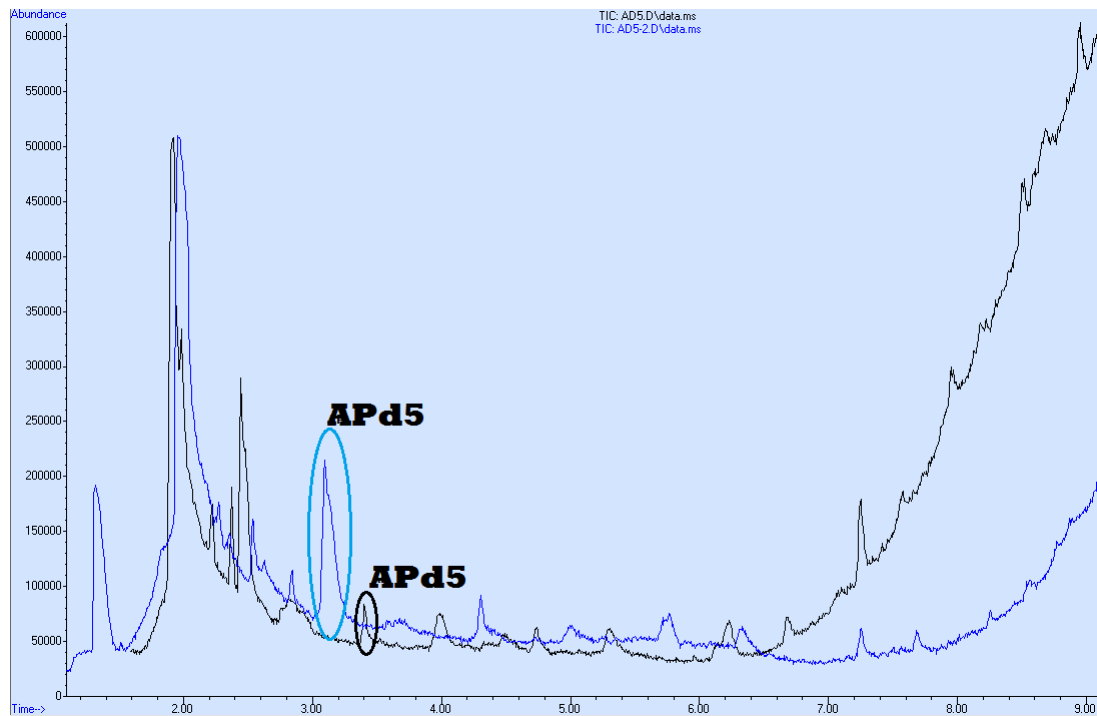


Figura 17. Superposición de los cromatogramas obtenidos por los dos métodos empleados: bibliográfico (negro) y del grupo investigador (azul).

Se estudió la influencia de la temperatura inicial del horno y se comprobó que una temperatura de 100 °C proporcionaba picos cromatográficos con mayor área que la obtenida a la temperatura de 65°C empleada, lo que suponía un aumento de la sensibilidad del método. La nueva programación de la temperatura del horno, daba lugar a un tiempo de duración del cromatograma de 10,12 minutos.

En estas condiciones cromatográficas se inyectaron disoluciones metanólicas del resto de las anfetaminas estudiadas (AP, MA, MDA y

MDMA) en una concentración de 5mg/L. A la vista de los cromatogramas obtenidos, fue necesario disminuir la T de inyección hasta 240 °C para evitar la descomposición del MDA, constatada por la obtención de iones (m/z) distintos a los característicos de esta anfetamina. En la Tabla 5 se recogen las condiciones cromatográficas óptimas.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas óptimas.

Sistema de inyección	Splitless pulsado
Volumen de inyección (µL)	2
Flujo de gas portador (He) (mL/min)	1,9
Presión (psi)	10,73
T del inyector (°C)	240
T de la fuente iónica (°C)	230
T de la línea de transferencia (°C)	325
Solvent delay (min)	1,5
Rango de masas en SCAN (u.m.a.)	40-500
Programa de T	T inicial: 100 °C (mantener 1 min) 1ª rampa: hasta 150 °C a 40 °C/min (mantener 1 min) 2º rampa: hasta 190 °C a 15 °C/min (mantener 1 min) 3º rampa: hasta 300 °C a 50 °C/min (mantener 1 min)

3.1.1 Tiempos de retención e iones (m/z) característicos

Una vez optimizada la separación de las anfetaminas, se procedió a determinar los iones (m/z) característicos de cada anfetamina, recogidos en la Tabla 6 y obtenidos a partir del cromatograma de la Figura 18, donde se han superpuesto los cromatogramas de las cinco disoluciones analizadas y se muestran los espectros de masas de cada una de las anfetaminas.

Tabla 6. Tiempos de retención e iones (m/z) característicos para cada anfetamina.

Droga	Tiempo de retención (min)	iones (m/z)
AP	3,117	44 y 91
AP _{d5}	3,110	48 y 92
MA	3,468	58 y 91
MDA	5,880	44 y 136
MDMA	6,314	58 y 135

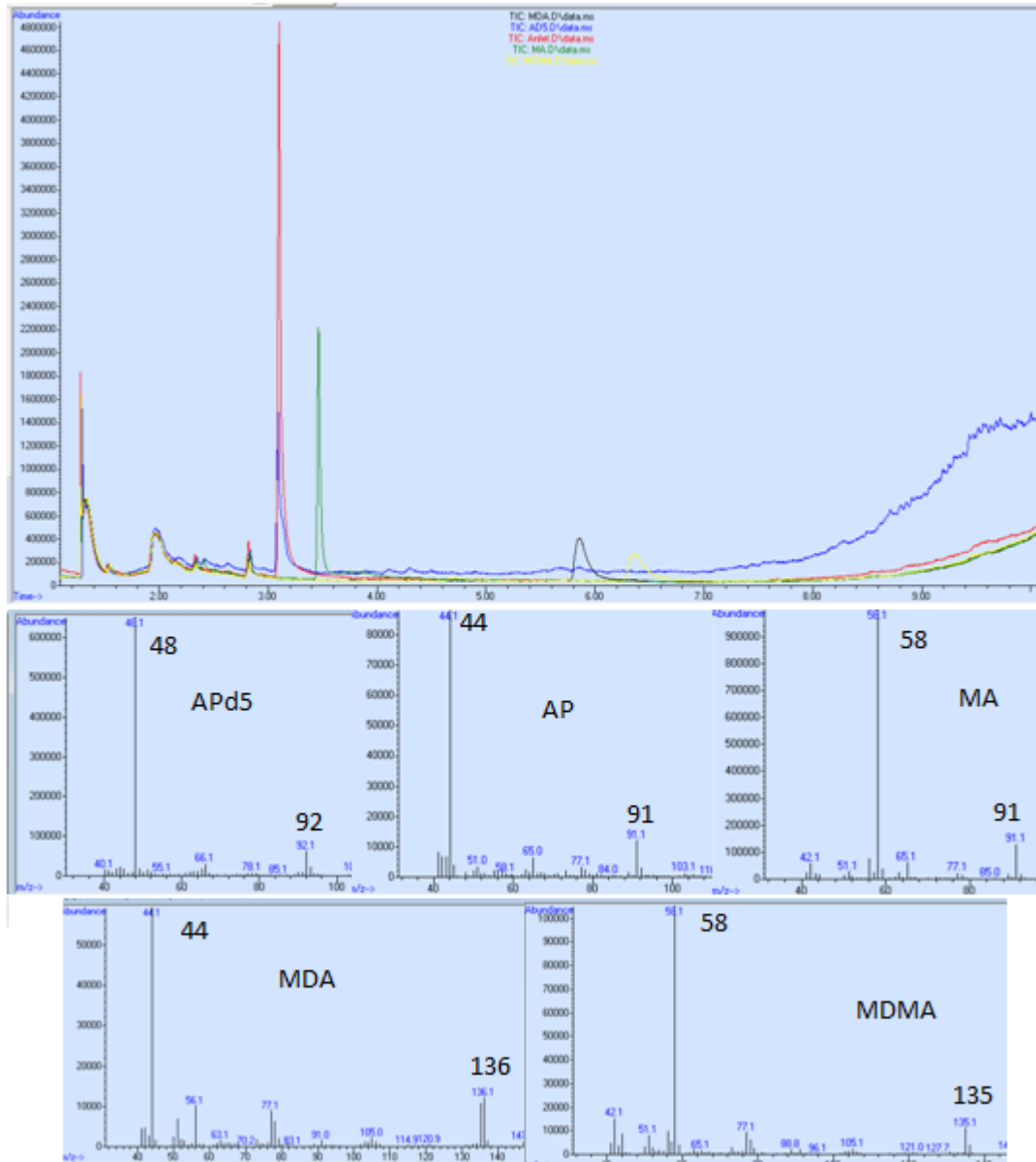


Figura 18. Cromatogramas de disoluciones metanólicas de AP (rojo), APd5 (azul), MA (Verde), MDA (negro) y MDMA (amarillo) en una concentración de 5mg/L y sus respectivos espectros de masas.

Condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 5.

3.2. PARÁMETROS CUANTITATIVOS DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (GC-MS)

Las rectas de calibrado obtenidas para cada una de las anfetaminas se muestran en la Figura 19.

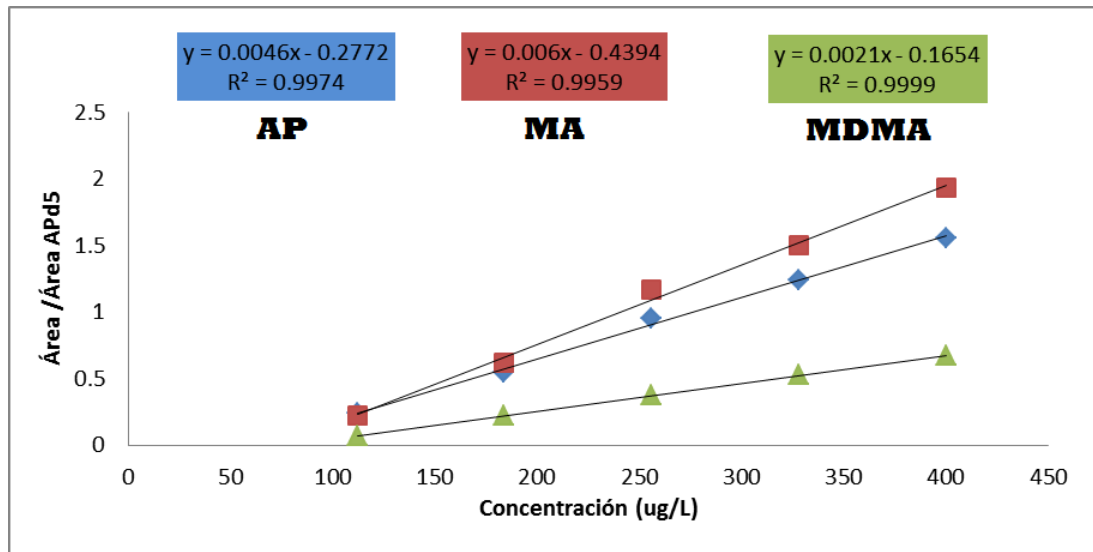


Figura 19. Variación del área de pico con la concentración de las anfetaminas.

No se pudo realizar la recta de calibrado en el intervalo propuesto de 40-400 $\mu\text{g/L}$ para el caso de la MDA, ya que el método no ofrecía la sensibilidad requerida para este compuesto. En la Tabla 7 se recogen las ecuaciones de las rectas de regresión para cada anfetamina analizada, los coeficientes de correlación y los intervalos lineales de concentración establecidos.

Tabla 7. Ecuaciones de regresión lineal de las rectas de calibrado, coeficientes de correlación, intervalos lineales de concentración, límites de detección y cuantificación obtenidos para cada anfetamina estudiada.

	A	MA	MDMA
Ecuación de la recta	$y = (0,0046 \pm 0,0004)x - (0,3 \pm 0,1)$	$y = (0,0060 \pm 0,0007)x - (0,4 \pm 0,2)$	$y = (0,00211 \pm 0,00003)x - (0,165 \pm 0,009)$
Coefficiente de correlación	0,9974	0,9959	0,9999
Intervalo lineal ($\mu\text{g/L}$)	81-400	101-400	13-400
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	81	101	13
LOD ($\mu\text{g/L}$)	24	30	4

3.2.1 Límites de cuantificación y detección.

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de la curva de calibrado para cada anfetamina se recogen en la Tabla 7.

3.2.2 Repetitividad

La repetitividad en el día obtenida para los dos distintos niveles de concentración ensayados ha sido inferior al 15 % en términos de %RSD.

3.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO GC-MS A UNA MUESTRA REAL

El método cromatográfico GC-MS puesto a punto se aplicó a una muestra desconocida, que supuestamente contenía drogas de abuso de tipo anfetamínico.

Se preparó una disolución de la droga desconocida en metanol en una concentración de 1100 mg/L, supuesto que el contenido de la bolsa era una única anfetamina y con una pureza del 100%.

Se inyectó en el cromatógrafo una alícuota de concentración 22 mg/L preparada por dilución en metanol de la disolución anterior y se adquirió el cromatograma en modo SCAN:

En base al cromatograma y el espectro de masas obtenido para la muestra, Fig. 20, se pudo deducir por comparación de los tiempos de retención y de los iones m/z característicos con los de las anfetaminas estudiadas, así como con ayuda de la librería de espectros, que la muestra desconocida contenía la droga de abuso anfetamina.

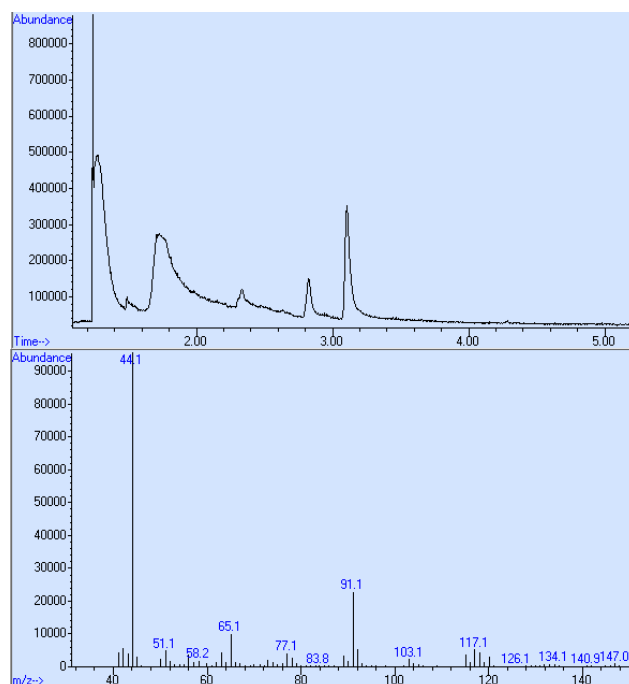


Figura 20. Cromatograma y espectro de masas de una disolución metanólica de la muestra desconocida adquirido en modo SCAN.

Condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 5.

Una vez establecida la existencia de una droga de tipo anfetamínico en la muestra desconocida, se prepararon dos disoluciones más diluidas de la muestra y se inyectaron en el cromatógrafo adquiriendo los datos en modo SIM, utilizando el mismo método que para las disoluciones multicomponente con las que se realizaron las rectas de calibrado.

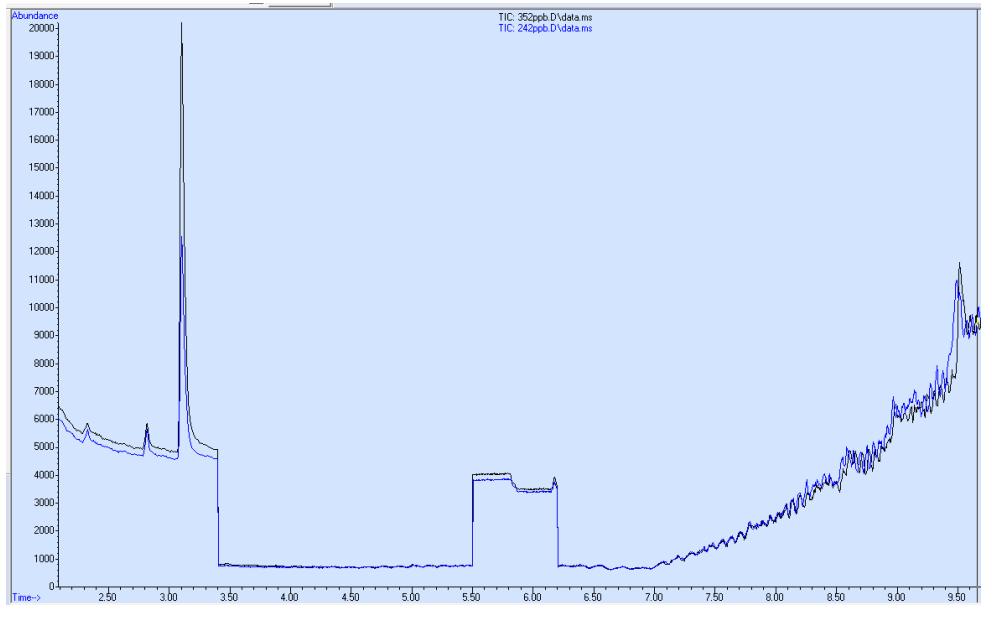


Figura 21. Superposición de los cromatogramas de la muestra desconocida en modo SIM en concentración de 242 (azul) y 352 (negro) $\mu\text{g/L}$. Condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 5.

A partir de los tiempos de retención a los que aparecen los picos cromatográficos y en base a las relaciones m/z monitorizadas se pudo corroborar la composición de la droga. Por otra parte, su concentración y pureza se puede determinar en base al área de los picos cromatográficos obtenidos, por interpolación en la correspondiente curva de calibrado.

Los espectros de masas adquiridos en modo SIM han permitido verificar que el único tipo de anfetamina presente en la muestra es la anfetamina. Por otra parte, en la Tabla 8 se recogen los datos de concentración y pureza obtenidos.

Tabla 8. Pureza y concentración de la droga de composición desconocida.

Conc teórica ($\mu\text{g/L}$)	Área (muestra/área AP_{d5})	Conc $\pm t^*s$ ($\mu\text{g/L}$)	Pureza (%)
242	0,85	244 ± 24	100,5
352	1,34	351 ± 25	



4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir:

1. El análisis de anfetaminas es una problemática con un impacto en la comunidad científica relevante en los últimos 10 años (131 artículos/año)
2. El análisis de anfetaminas se lleva a cabo preferentemente en fluidos biológicos, siendo el plasma la matriz más utilizada, y la técnica más establecida la cromatografía de gases-espectrometría de masas, aunque en los dos últimos años se observa la tendencia hacia el uso de la cromatografía líquida-espectrometría de masas.
3. El uso del pelo como matriz para el análisis de anfetaminas posee especial interés en el campo forense y en todas las metodologías analíticas recogidas en la bibliografía incluyen una etapa de lavado y tratamiento de muestra.
4. Se ha puesto a punto un método cromatográfico GC-MS, sin derivatización previa, para el análisis de anfetaminas que ha permitido la identificación y determinación de una muestra desconocida conteniendo anfetamina. Este método servirá de base para el desarrollo y validación de una metodología analítica aplicada a la matriz pelo.

5. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría agradecer a la Dra. Rosa M. Alonso por aceptar ser mi tutora en este trabajo sin tan siquiera conocerme, permitirme conocer su grupo de investigación y ver cómo funciona todo en ese mundo. También quiero agradecer al Dr. Luis Bartolomé (Txesko) por explicarme y enseñarme con mucha paciencia todo lo relativo al GC-MS y a la parte experimental en general. No puedo olvidarme de dar las gracias a todas las personas del grupo de

investigación Farmarterm y en especial a Sión y Mari Luz que han resuelto todas mis dudas, que no han sido pocas, siempre con una gran sonrisa. Y por último a mi familia, quienes han estado apoyándome pasase lo que pasase y aguantándome todo el tiempo en los buenos y en los malos momentos.

6. BIBLIOGRAFÍA

[1] Cabrera Bonet, R.; Cabrera Forneiro, J. Las drogas de abuso: Un reto sanitario; Universidad Pontificia Comillas: Madrid, 1994.

[2] López-Muñoz, F.; Álamo, C. Historia de la Psicofarmacología. La revolución de la psicofarmacología: sobre el descubrimiento y desarrollo de los psicofármacos; Editorial Médica Panamericana: Madrid, 2006.

[3] Lorenzo, P.; Moreno, A.; Lizasoain, I.; Leza, J. C.; Moro, M. A.; Portolés, A. Farmacología Básica y Clínica; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, 2009.

[4] Sifre, R. B. Toxicología clínica; Universitat de Valencia: Valencia, 2004.

[5] Lorenzo, P.; Ladero, J. M.; Leza, J. C.; Lizasoain, I. Drogodependencias: Farmacología. Patología. Psicología. Legislación; Editorial Médica Panamericana: Madrid, 2009.

[6] Martínez Ruiz, M.; Rubio Valladolid, G. Manual de drogodependencias para enfermería; Díaz de Santos: Madrid, 2002.

[7] Redolar Ripoll, D. Cerebro y adicción; Editorial UOC: Barcelona, 2008.

[8] World Drug Report 2013; United Nations Office on Drugs and Crime, Nueva York, 2013.

[9] Euskadi y Drogas 2012, Drogodependencias; Gobierno Vasco, Vitoria, 2013.

[10] United Nations International Drug Control Programme. Monograph: Recommended guidelines for quality assurance and good laboratory practices. New York: United Nations; 1995.

[11] Goldberg, R. Drugs Across the Spectrum; Wadsworth Cengage learning: Michigan (Estados Unidos), 2013.

[12] Garrido Pertierra, A.; Teijón Rivera, J. M. Fundamentos de bioquímica estructural; Editorial Tébar: Madrid, 2006.

[13] Verstraete, A. G. The Drug Monitoring 2004, 26, 200-205.

[14] Kintz, P. Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair; Taylor & Francis Group: Boca Ratón (Estados Unidos), 2006.

[15] Peña, A. Atlas de Dermatología del Pie; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, 2007.

[16] Siegel, J. A. Forensic Science: the basics; Taylor & Francis Group: Boca Ratón (Estados Unidos), 2007.

[17] Potter, B. A.; Orfali, J. S. Drug Testing at Work: A Guide for Employers; Ronin Publishing: Berkeley (Estados Unidos), 1995.

[18] Levine, B. Principles of Forensic Toxicology; AACC Press: Washington (Estados Unidos), 2003.

[19] http://www.soht.org/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf (accessed 14/17/02) Society of Hair Testing <http://www.soht.org/> (accessed 14/17/02).

Página de internet: Weisstein, E. W. Molecular Orbital Theory <http://scienceworld.wolfram.com/chemistry/MolecularOrbitalTheory.html> (accessed 12/15/03), part of Eric Weisstein's World of Science. <http://scienceworld.wolfram.com/> (accessed 12/15/03).

- [20] Baeck, S.; Han, E.; Chung, H.; Pyo, M. *Forensic Science International* 2011, 206, 77–80.
- [21] Díaz Portillo, J.; Fernández Del Barrio, M. T.; Parede Salido, F. *Aspectos básicos de bioquímica clínica*; Diaz de Santos: Madrid, 1997.
- [22] González Fernández, N.; Alonso, R. M.; Bartolomé, L.; San Román, I. *Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) aplicada a la determinación de estimulantes anfetamínicos en pelo*, Tesis de master, Universidad del País Vasco/EHU, 2013.
- [23] Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*; Editorial Reverté: Barcelona, 2003.
- [24] Atkins, P. W.; Jones, L. *Principios de Química: Los caminos del descubrimiento*; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, 2007.
- [25] Valcárcel, M.; Cárdenas, M. S. *Automatización y miniaturización en Química Analítica*; Springer: Barcelona, 2000.
- [26] Baranda González, A. B. *Determinación de las concentraciones plasmáticas de fármacos calcioantagonistas mediante técnicas cromatográficas*. Ph.D. Thesis, Universidad del País Vasco/EHU, Bilbao, 2004.
- [27] Miyaguchi, H.; Iwata, Y. T.; Kanamori, T.; Tsujikawa, K.; Kuwayama, K.; Inoue, H. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, 4063–4070.
- [28] Lee, S.; Han, E.; Park, Y.; Choi, H.; Chung, H. *Forensic Science International* 2009, 190, 16–18.
- [29] Ferreira Martins, L.; Yegles, M.; Thieme, D.; Wenning, R. *Forensic Science International* 2008, 176, 38–41.
- [30] Lee, S.; Park, Y.; Han, E.; Choe, S.; Lim, M.; Chung, H. *Forensic Science International* 2008, 178, 207–212.

- [31] Nishida, M.; Yashiki, M.; Namera, A.; Kimura, K. *Journal of Chromatography B* 2006, 842, 106–110.
- [32] Chèze, M.; Deveaux, M.; Martin, C.; Lhermitte, M.; Pépin, G. *Forensic Science International* 2007, 170, 100–104.
- [33] Lee, S.; Park, Y.; Yang, W.; Han, E.; Choe, S.; Lim, M.; Chung, H. *Forensic Science International* 2009, 185, 59–66.
- [34] Do Nascimento Pantaleão, L.; Aparecida Passos, B.; Paranhos, B.; Yonamine, M. *Journal of Chromatography A* 2012, 1254, 1–7.
- [35] Lee, S.; Park, Y.; Yang, W.; Han, E.; Choe, S.; In, S.; Lim, M.; Chung, H. *Journal of Chromatography B* 2008, 865, 33–39.
- [36] Pujadas, M.; Pichini, S.; Poudevida, S.; Menoyo, E.; Zuccaro, P.; Farré, M.; de la Torre, R. *Journal of Chromatography B* 2003, 798, 249–255.
- [37] Baumgartner, M. R.; Guglielmello, R.; Fanger, M.; Kraemer, T. *Forensic Science International* 2012, 215, 56–59.
- [38] Domínguez-Romero, J. C.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A. *Journal of Chromatography B* 2011, 879, 2034–2042.
- [39] Han, E.; Paulus, M. P.; Wittmann, M.; Chung, H.; Song, J. *Journal of Chromatography B* 2011, 879, 541–547.
- [40] Meng, P.; Zhu, D.; He, H.; Wang, Y.; Zhang, L. *Analytical Science* 2009, 25, 1115–1118.
- [41] Guthery, B.; Bassindale, A.; Pillinger, C. T.; Morgan, G. H. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 4402–4410.
- [42] Tsanaclis, L.; Wicks, J. F. C. *Forensic Science International* 2007, 170, 121–128.

- [43] Lee, S.; Miyaguchi, H.; Han, E.; Kim, E.; Park, Y.; Choi, H.; Chung, H.; Min Oh, S.; Chung, K. H. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 53, 1037–1041.
- [44] Wu, Y.-H.; Lin, K.; Chen, S.; Chang, Y. *Journal of Chromatography B* 2008, 870, 192–202.
- [45] Stanaszek R.; Piekoszewski, W. *Journal of Analytical Toxicology* 2004, 28, 77-85.
- [46] Cordero, R.; Paterson S. *Journal of Chromatography B* 2007, 850, 423–431.
- [47] Favretto, D.; Vogliardi, S.; Stocchero, G.; Nalessom A.; Tucci, M.; Ferrara, S. D. *Journal of Chromatography A* 2011, 1218, 6583– 6595.
- [48] Berànkova, K.; Habrdová, V.; Balíková, M.; Strejc, P. *Forensic Science International* 2005, 153, 93–97.
- [49] Lee, S.; Kim, J.; In, S.; Choi, H.; Chung, H.; Chung, K. H. *Forensic Science International* 2011, 207, e5–e7.
- [50] Villamor, J. L.; Bermejo, A. M.; Fernández, P.; Taberner, M. J. *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 135-139.
- [51] Kim, J. Y.; Shin, S. H.; Lee, J.; In, M. *Forensic Science International* 2010, 196, 43–50.
- [52] Wada, M.; Sugimoto, Y.; Ikeda, R.; Isono, K.; Kuroda, N.; Nakashima, K. *Forensic Toxicology* 2012, 30, 80–83.
- [53] Angeli, I.; Minoli, M.; Ravelli, A.; Gigli, F.; Lodi, F. *Forensic Science International* 2012, 218, 15–19.
- [54] Han, E.; Yang, W.; Lee, J.; Park, Y.; Kim, E.; Lim, M.; Chung, H. *Forensic Science International* 2005, 147, 21–24.
- [55] Pujol, M.-L.; Cirimele, V.; Tritsch, P. J.; Villain, M.; Kintz, P. *Forensic Science International* 2007, 170, 189–192.



- [56] Nishida, M.; Namera, A.; Yashiki, M.; Kojima, T. *Journal of Chromatography B* 2003, 789, 65–71.
- [57] Aleksa, K.; Walasek, P.; Fulga, N.; Kapur, B.; Gareri, J.; Koren, G. *Forensic Science International* 2012, 218, 31–36.
- [58] Han, E.; Park, Y.; Yang, W.; Lee, J.; Lee, S.; Kim, E.; Lim, M.; Chung, H. *Forensic Science International* 2006, 161, 124–129.
- [59] Gentili, S. Cornetta, M.; Macchia, T. *Journal of Chromatography B* 2004, 801, 289–296.
- [60] Lee, S.; Han, H.; In, S.; Choi, H.; Chung, H.; Chung, K. H. *Forensic Science International* 2011, 206, 19–21.