



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio de Análisis Antidoping / Drogas de Abuso

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EFEDRINA EN ORINA POR HPLC

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

MARCELA TERESA VERSCHAE TANNENBAUM

Profesor Patrocinante

QF Luis Núñez-Vergara
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica

Directores de Memoria

QF Hernán Báez Guerrero
QF Hernán Osorio Torres
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Análisis Antidoping /
Drogas de Abuso

Santiago, Chile

2005

Memoria de Circulación Restringida

Agradecimientos

Quiero agradecer,

A mis padres, hermanos y familia por su continuo apoyo y ayuda.

A mis compañeros y amigos con quienes hemos avanzado en las distintas etapas de la vida universitaria.

A los integrantes del Laboratorio de Análisis Antidoping que me acompañaron durante el período de desarrollo de esta tesis.

A mis profesores por sus aportes de experiencia y conocimientos entregados.

Tabla de Contenidos

| | |
|---|----|
| Resumen | v |
| Abstract | vi |
| I. Introducción | 1 |
| II. Materiales y Métodos | 5 |
| II.A. Materiales | 5 |
| II.B. Métodos | 10 |
| III. Validación de la Metodología Analítica | 13 |
| III.A. Condiciones de trabajo | 13 |
| III.B. Obtención del tiempo de retención | 13 |
| III.C. Selectividad | 13 |
| III.D. Linealidad y rango lineal | 14 |
| III.E. Precisión | 17 |
| III.F. Límite de detección y límite de cuantificación | 18 |
| III.G. Recuperación de la extracción | 19 |
| III.H. Estabilidad | 20 |
| III.I. Incertidumbre | 20 |
| IV. Resultados y discusiones | 22 |
| IV.A. Desarrollo de la metodología analítica | 22 |
| IV.B. Obtención del tiempo de retención | 23 |
| IV.C. Selectividad | 24 |
| IV.D. Linealidad y rango lineal | 24 |

| | |
|--|----|
| IV.E. Precisión | 26 |
| IV.F. Límite de detección y límite de cuantificación | 29 |
| IV.G. Recuperación de la extracción | 30 |
| IV.H. Estabilidad | 31 |
| IV.I. Incertidumbre | 32 |
| V. Conclusiones | 47 |
| VI. Glosario | 49 |
| VII. Bibliografía | 53 |
| Anexos | 56 |

Resumen

En el ámbito del control de doping es importante poder detectar y cuantificar con un nivel de confianza adecuado los compuestos incluidos en la lista de sustancias prohibidas de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) que tienen definida una concentración de corte. Para la efedrina se ha establecido que una concentración superior a 10 µg/ml en orina se considera con resultado analítico adverso, por lo que es necesario tener una metodología analítica validada para su detección y cuantificación.

La efedrina es una amina simpaticomimética, con acción estimulante sobre el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y el sistema respiratorio. Se excreta principalmente en forma inalterada en la orina dentro de las 24 horas siguientes a su administración.

Las plantas de la especie *Ephedra* son la principal fuente natural de efedrina, de éstas la más conocida es el Ma Huang (*Ephedra Sinica*). A partir de extractos de *Ephedra* se elaboran suplementos alimenticios que son comercializados principalmente como supresores del apetito y como estimulantes para mejorar el desempeño de los deportistas.

En este trabajo se presentan los resultados de la validación de una metodología para la detección y cuantificación de efedrina en la matriz biológica orina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La metodología analítica desarrollada comprende la utilización de un detector de longitud de onda variable, una columna de fase reversa y como fase móvil una mezcla de tampón fosfato y metanol. Previo al análisis, las muestras son sometidas a una extracción líquido-líquido con solvente orgánico, para obtener un extracto lo suficientemente limpio que pueda ser analizado sin interferencias de la matriz orina.

Para la validación de la metodología se realizaron pruebas de especificidad, linealidad, precisión, recuperación de la extracción, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad y la determinación de la incertidumbre de la medición.

Abstract

Within the doping control area, it is important to be able to detect and quantify the compounds included in the prohibited list of the World Anti-Doping Agency (WADA) that have a defined threshold concentration, with a suitable confidence level. In the case of ephedrine, it has been established that a concentration over 10 µg/ml in the urine is considered adverse analytical findings; therefore it is necessary to have a valid analytical methodology for its detection and quantification.

The ephedrine is a sympathomimetic amine, with stimulating action on the nervous central system, the cardiovascular system and the respiratory system. It is excreted mainly in unchanged form in the urine within the 24 hours following its administration.

The plants of the *Ephedra* species are the main natural source of ephedrine; the most well-known of them is the Ma Huang (*Ephedra Sinica*). Dietary supplements elaborated from extracts of *Ephedra* are commercialized mainly as appetite suppressors and as stimulants to improve the performance of the athletes.

In the present work, the results of the validation of a methodology for the detection and quantification of ephedrine in the biologic matrix urine by high-performance liquid chromatography (HPLC) are presented.

The analytical methodology developed includes the use of a variable wavelength detector, a reverse phase column and a mixture of phosphate buffer and methanol as mobile phase. Previous to their analysis, the samples are processed through a liquid-liquid extraction with organic solvent to obtain a suitable clean extract that can be analyzed without interferences of the urine matrix.

For the validation of the methodology tests of specificity, linearity, precision, recovery of the extraction, detection limit, quantification limit, stability, and the determination of the uncertainty of measurement, were performed.

I. Introducción

La efedrina es una amina simpaticomimética que tiene una pronunciada acción periférica y una conocida propiedad estimulante del sistema nervioso central, por lo cual está incluida en la lista de sustancias prohibidas, como estimulante, de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) (1).

La efedrina es un agonista tanto α como β -adrenérgico, incrementa la descarga de noradrenalina desde las neuronas simpáticas. Estimula la frecuencia y el gasto cardíacos y aumenta de manera variable la resistencia vascular periférica, por lo que suele elevar la presión arterial, fomenta la broncodilatación y es un estimulante potente del sistema nervioso central (2). Entre sus efectos adversos, los principales sistemas afectados son el cardiovascular y el neurológico. Los efectos cardiovasculares adversos incluyen hipertensión arterial, arritmias cardíacas, ataques e infartos al miocardio. Los efectos adversos neurológicos incluyen cefalea, ansiedad, temblores, insomnio, irritabilidad e incluso manifestaciones psicóticas, además, y al igual que otros estimulantes, su uso reiterado puede producir dependencia (3).

La efedrina sufre metabolización hepática a través de una N-demetilación, transformándose en fenilpropanolamina (norefedrina) y una deaminación oxidativa seguida de conjugación. El 90% de la dosis de efedrina se excreta en la orina en las 24 horas siguientes a su administración, entre el 55% y el 75% de ésta se excreta en forma inalterada, 8% a 20% se excreta como norefedrina y 4 a 13% se excreta como metabolitos deaminados (4). La excreción de la efedrina es dependiente del pH urinario, aumentando su eliminación con la acidificación de la orina. La alcalinización de la orina produce una disminución de la eliminación de efedrina (22-35%) y aumenta la eliminación de norefedrina (11-24%) (5).

La concentración plasmática máxima se alcanza a las 2,4 horas, con un modelo de 1 compartimiento y una cinética de primer orden. La vida media de eliminación tiene un rango de 4,5 a 8 horas y el volumen de distribución es de 2,6 –3,1 L/kg (5, 6).

La efedrina está presente en plantas de la especie *Ephedra*, de las cuales la más conocida comercialmente es la hierba china Ma Huang (*Ephedra Sinica*), en la que la efedrina se encuentra en concentraciones promedio de 1% (5). Las plantas de la especie *Ephedra* contienen, en diferentes concentraciones, un grupo de alcaloides fuertemente relacionados, muy similares estructuralmente, llamados efedrinas, entre los que se incluyen (-)-efedrina, (+)-pseudoefedrina, (±)-norefedrina, (+)-norpseudoefedrina (catina) y (-)-N-metilefedrina. Todas las efedrinas son vasoactivas y pueden afectar en diferentes grados al sistema cardiovascular, respiratorio y central (7).

La administración de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA) prohibió en diciembre del 2003 la comercialización de todos los suplementos dietéticos que contuvieran la planta medicinal *Ephedra*, debido a las reacciones adversas, principalmente problemas cardíacos, que han sufrido varios consumidores de este suplemento dietético, además de algunas muertes asociadas a su consumo.

Las efedrinas, tanto de origen natural como sintéticas, se ofrecen en el mercado farmacéutico como broncodilatadores en medicamentos coadyuvantes en el tratamiento del asma, como descongestionante nasal para la sinusitis y rinitis, como supresores del apetito para la pérdida de peso y como energizantes para incrementar el desempeño de los deportistas. Contienen entre 8 y 24 mg de efedrina por dosis y se pueden adquirir sin una receta médica (5, 8).

La acción de la efedrina deseada por los atletas incluye incremento de los estados de “alerta” y de la “energía”, ayuda en la pérdida de peso y el aumento del desempeño atlético. Dado que la efedrina es un estimulante, inhibe la sensación de fatiga que opera como una señal fisiológica que advierte al atleta que ha alcanzado el límite de sus capacidades naturales y que debe detenerse, aquí entran en acción los psicofármacos estimulantes (anfetamina o amina simpaticomimética) que anulan esta

señal, como resultado el individuo puede exceder sus límites fisiológicos con todos los riesgos que ello involucra (3).

La efedrina y sus similares son frecuentemente detectadas en la orina de los deportistas y constituyen el ejemplo más característico del grupo estimulantes de las aminas simpaticomiméticas, con una variedad de efectos adversos que llevaron a las autoridades deportivas a establecer concentraciones límites sobre las cuales se considera que existe un resultado analítico adverso (9, 10).

La efedrina, pseudoefedrina, norpseudoefedrina y norefedrina se encuentran en bajas dosis en preparados contra el resfrío, rinitis alérgica, etc. Por lo general estos medicamentos no necesitan prescripción médica, por lo que el Comité Olímpico Internacional (COI) recomienda que sólo se usen una vez que se haya constatado con un farmacéutico o un médico que no contiene sustancias prohibidas.

La comisión médica del COI incluyó la efedrina en la lista de sustancias prohibidas en 1990, con sus isómeros ópticos D- y L-. Actualmente, los límites de concentración en orina establecidos por la WADA para considerar una muestra con resultado analítico adverso son: 10 µg/ml para efedrina y metilefedrina, y 5 µg/ml para norpseudoefedrina (catina) (1, 11).

Se han publicado varios métodos para la cuantificación de efedrina en orina, la técnica más usada es la cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masa (CG/MS). Esta técnica requiere una derivatización selectiva previa para mejorar la resolución y la sensibilidad del método, pero la reproducibilidad obtenida no siempre es suficiente porque se puede obtener más de una señal a partir de un mismo compuesto (10, 12). También se han descrito otras técnicas analíticas dentro las que se incluyen cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), electroforesis capilar y cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masa (13).

Es deseable tener un método de cromatografía líquida que pueda cuantificar precisa y exactamente efedrina en orina. Las efedrinas tienen una estructura química similar, son aminas hidrofílicas con grupos funcionales polares, por lo cual su determinación

requiere de una columna de fase reversa con una baja actividad de silanoles y una fase móvil con una elevada fuerza iónica (11, 14).

El propósito de este trabajo fue establecer y validar un método analítico sensible, rápido, reproducible y lo suficientemente exacto para detectar y cuantificar efedrina en orina, usando cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de absorbancia ultravioleta, para ser aplicado en el campo del control de doping. La validación del método contempla las pruebas de especificidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, porcentaje de recuperación de la extracción, estabilidad y la determinación de la incertidumbre.

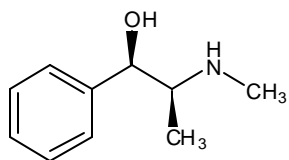
II. Materiales y Métodos

II.A. Materiales

II.A.1. Estándares de referencia

II.A.1.a. Sustancia en estudio

- Efedrina



Número CAS: 299-42-3

Nombre IUPAC: (1*R*,2*S*)-2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ol (15)

Fórmula Global: C₁₀H₁₅NO (16)

Peso Molecular: 165,23 g/mol (16)

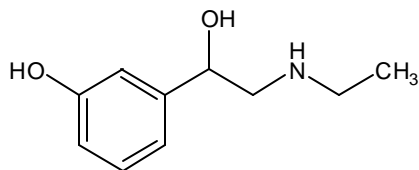
Constante de disociación: pKa 9,6 (25° C) (4)

Origen Principio Activo: Alltech

Pureza: 99.0%

II.A.1.b. Estándar interno

- Etilefrina



Número CAS: 709-55-7

Nombre IUPAC: 3-((S)-2-(etilamino)-1-hidroxietil)fenol. (15)

Fórmula Global: $C_{10}H_{15}NO_2$ (16)

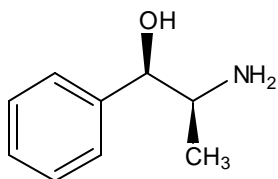
Peso Molecular: 181,23 g/mol (16)

Constate de disociación: pKa 9,0; 10,2 (25° C) (4)

Origen: Alltech

II.A.1.c. Otros estándares

- Fenilpropanolamina (d/-norefedrina)



Número CAS: 14838-15-4

Nombre IUPAC: (1RS, 2SR)-2-amino-1-fenilpropan-1-ol. (15)

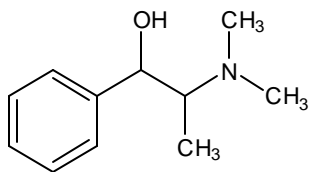
Fórmula Global: $C_9H_{13}NO$ (16)

Peso Molecular: 151,21 g/mol (16)

Constante de disociación: pKa 9,4 (20° C) (4)

Origen: Alltech

- N-metilefedrina



Número CAS: 552-79-4

Nombre IUPAC: (1R,2S)-2-dimetilamino-1-fenilpropan-1-ol. (15)

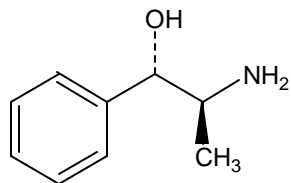
Fórmula Global: C₁₁H₁₇NO (16)

Peso Molecular: 179,26 g/mol (16)

Constante de disociación: pKa 9,3 (25° C) (4)

Origen: Alltech

- Norpseudoefedrina (catina)



Número CAS: 492-39-7

Nombre IUPAC: (1S, 2S)-2-amino-1-fenilpropan-1-ol. (15)

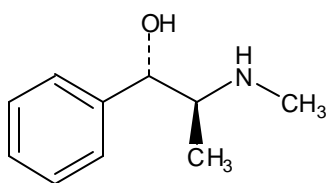
Fórmula Global: C₉H₁₃NO (16)

Peso Molecular: 151,21 g/mol (16)

Constante de disociación: pKa 9,4 (20° C) (4)

Origen: Alltech

- Pseudoefedrina



Número CAS: 90-82-4

Nombre IUPAC: (1S,2S)-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol. (15)

Fórmula Global: C₁₀H₁₅NO (16)

Peso Molecular: 165,23 g/mol (16)

Constante de disociación: pKa 9,8 (4)

Origen: Alltech

II.A.2. Reactivos

Agua grado cromatográfico (Merck)

Metanol grado cromatográfico (Merck)

Fosfato de potasio monobásico p.a. (Merck)

Ácido fosfórico p.a. (JT Baker)

Terbutil metiléter grado cromatográfico (Merck)

Carbonato de potasio p.a. (Merck)

Sulfato de sodio anhidro p.a. (Merck)

II.A.3. Soluciones estándares y de control

Solución estándar de efedrina 1000 ppm en metanol

Solución estándar de etilefrina (estándar interno) 1000 ppm en metanol

II.A.4. Soluciones de trabajo

Solución de carbonato de potasio 25 % p/v

Solución tampón fosfato 50 mM pH 4

II.A.5. Equipo

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Hewlett Packard serie 1050, modelo G130 3A, bomba cuaternaria serie HP1050, detector de longitud de onda variable serie HP1050, inyector manual Rheodyne Modelo 7125 con loop de 20 µl, acoplado a un computador con HP Chemstation for LC, Rev. A.06.01 [403]

II.A.6. Instrumental de uso general

- Medidor de pH HANNA Instruments, modelo pH 210 Microprocesador-basul pH/mV/°C Meters
- Agitador magnético Quimis
- Vortex Heidolph
- Balanza analítica, OHAUS analytical plus
- Balanza granataria Adam QT-200

- Micropipetas automáticas de volumen variable capacidad entre 10 y 1000 μl
- Centrífuga Wifug
- Agitador mecánico, Arthur Thomas CO.
- Equipo de filtración por vacío:
 - Matraz Kitasato
 - Embudo
 - Filtro de 0,45 μm de tamaño de poro

II.A.7. Otros

- Jeringa de inyección para HPLC 100 μl (Hamilton)
- Nitrógeno extra puro
- Papel filtro 0,45 μm
- Papel indicador de pH, colorpHast® 0-14
- Material de vidrio volumétrico clase A.
- Tubos de ensayo con tapa esmerilada
- Tubos de centrifuga desechables de 16 x 100 mm
- Pipetas Pasteur con bulbo gotario

II.B. Métodos

II.B.1. Preparación de las soluciones estándares

Solución estándar de efedrina 1000 ppm: Pesar 5 mg de efedrina en balanza analítica, disolver en matraz volumétrico de 5 ml con metanol grado cromatográfico. Preparar y usar de inmediato.

Solución estándar interno de etilefrina 1000 ppm: Pesar 5 mg de etilefrina en balanza analítica, disolver en matraz volumétrico de 5 ml con metanol grado cromatográfico.

II.B.2. Preparación de soluciones de trabajo

Solución de carbonato de potasio 25% p/v: pesar 25 g de carbonato de potasio en balanza granataria y disolver en agua grado HPLC, llevar a 100 ml.

Solución tampón fosfato 50 mM pH 4: Pesar 6,70 g de fosfato de potasio monobásico en balanza granataria y disolver en aproximadamente 200 ml de agua grado HPLC, ajustar a pH 4 con ácido fosfórico usando medidor de pH, llevar a 1000 ml con agua.

II.B.3. Preparación de la fase móvil

A 950 ml de la solución tampón fosfato 50 mM pH 4 agregar 50 ml de metanol grado cromatográfico. Filtrar.

II.B.4. Preparación de las muestras de referencia en orina negativa

A 2 ml de orina negativa, que previamente ha sido certificada por CG/MS, agregar con jeringa volumétrica el volumen correspondiente de la solución estándar de efedrina de 1000 ppm (Tabla 1), para obtener la concentración deseada de efedrina en la orina. Agitar cada tubo en el vortex para homogenizar las muestras.

Tabla 1: Volumen a agregar de solución estándar a 2 ml de orina negativa para preparar las muestras de referencia.

| Concentración | Volumen |
|----------------------|----------------|
| 10 µg/ml | 20 µl |
| 17 µg/ml | 34 µl |
| 25 µg/ml | 50 µl |

II.B.5. Extracción de las muestras

- Medir una alícuota de 2 ml de las muestras de orina con micropipeta automática de 1000 μ l y colocarla en tubos de ensayos.
- Agregar 20 μ l de solución de etilefrina 1000 ppm (estándar interno) con jeringa volumétrica. Homogenizar agitando en el vortex.
- Ajustar las muestras a pH 12 con una solución de carbonato de potasio 25 % p/v (200 a 300 μ l), verificando el pH con papel indicador.
- Agregar a cada uno de los tubos una punta de espátula (aproximadamente 1 g) de sulfato de sodio anhidro y agitar en el vortex.
- Agregar a cada tubo 3 ml de terbutil metiléter, tapar los tubos esmerilados y agitar por 10 minutos en agitador mecánico.
- Centrifugar por 6 minutos para separar la fase orgánica de la fase acuosa.
- Separar la fase orgánica utilizando una pipeta Pasteur con bulbo gotario y filtrar a través de sulfato de sodio anhidro en papel filtro plegado a un tubo de centrifuga. La fase acuosa se descarta.
- Evaporar el solvente orgánico a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente (20 a 25° C).
- Disolver el extracto seco agregando 100 μ l de fase móvil y agitar en vortex. Inyectar 20 μ l en el cromatógrafo para el análisis.

III. Validación de la Metodología Analítica

III.A. Condiciones de trabajo

1. Columna: LichroCART®, largo 12,5 cm, diámetro 4 mm, tamaño de partícula 5 µm; precolumna Merck LichroCART® 4-4.
2. Detector UV λ = 215 nm.
3. Flujo: 2 ml / min.
4. Temperatura: 40° C.
5. Fase móvil: Tampón fosfato 50 mM pH 4 / metanol (95/5).
6. Volumen de inyección: 20 µl.

III.B. Obtención del tiempo de retención

Se prepararon muestras de concentración baja, media y alta (10, 17 y 25 µg/ml) de efedrina y de 10 µg/ml de etilefrina, en triplicado. Se analizaron en forma independiente cada una de las concentraciones para identificar los tiempos de retención y observar la influencia de la concentración en el tiempo, área, y altura de los picos cromatográficos.

III.C. Selectividad

La selectividad o especificidad de un método analítico puede evidenciarse mostrando en los cromatogramas que los compuestos de interés están separados de su metabolito principal y de fármacos co-administrados y que al menos tres fuentes diferentes de fluidos biológicos están libres de interferencia de picos endógenos a los tiempos de retención del compuesto de interés (17).

Para demostrar la selectividad del método, se utilizaron 3 orinas negativas distintas previamente certificadas por CG/MS. A cada una de las orinas se les adicionó efedrina en concentración de 10 µg/ml, se analizaron utilizando como blanco las respectivas orinas negativas. De esta forma se demostró que los componentes de la matriz biológica orina no interfieren con la determinación de la efedrina.

También fue necesario demostrar que el método es capaz de diferenciar la efedrina de las otras efedrinas que pueden ser coadministradas ya que habitualmente es posible encontrarlas juntas en diversas formulaciones. Para esto se analizó una solución de efedrina con norefedrina, norpseudoefedrina, pseudoefedrina, metilefedrina y etilefrina de concentración 100 µg/ml para cada uno.

III.D. Linealidad y rango lineal

La linealidad de un método analítico es la capacidad de que el resultado del análisis sea, directamente o por una transformación matemática bien definida, proporcional a la concentración del analito en las muestras en un rango dado, define la habilidad del método de obtener una respuesta proporcional a la concentración del analito. (18, 19)

Se preparó una curva estándar en duplicado en el rango entre 1 y 40 µg/ml, se evaluó linealidad y se seleccionó el rango en que la curva es lineal. La linealidad se evaluó finalmente con una curva de calibración en duplicado de siete niveles en un rango de 5 a 28 µg/ml (5, 7, 10, 15, 20, 24 y 28 µg/ml) en orina negativa, utilizando el método de cuantificación de estándar interno (etilefrina 10 µg/ml). Se determinó la curva de regresión sobre los puntos individuales por el método de los mínimos cuadrados y se evaluaron los estimados de regresión en el intervalo de confianza de un 95%.

El método de los mínimos cuadrados entrega la pendiente y el intercepto de la Ecuación 1, y permite realizar tests estadísticos de análisis de varianza y análisis de correlación.

$$Y = b \times X + a$$

Ecuación 1

Donde:

Y: variable dependiente (relación entre las áreas de efedrina y estándar interno),

X: variable independiente (relación entre las concentraciones de los mismos),

b: pendiente

a: intercepto.

Pendiente (b), se evaluó como parámetro de la sensibilidad del método. El límite de confianza para la pendiente se calculó en función de su varianza S_b .

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{x,y}^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$$

Ecuación 2

$$S_{x,y}^2 = \frac{\sum Y^2 - a \sum Y - b \sum XY}{n - 2}$$

Ecuación 3

$$\text{Intervalo de confianza de } b = b \pm t \times S_b$$

Ecuación 4

Intercepto (a), se determinó para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen. El intervalo de confianza se evaluó en función de la varianza S_a .

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \times \frac{\sum X^2}{n}}$$

Ecuación 5

$$\text{Intervalo de confianza de } a = a \pm t \times S_a$$

Ecuación 6

Análisis de varianza, para evaluar la validez de la linealidad del método se realizó un análisis de varianza (ANOVA), mediante el cálculo de tres términos de sumas de los cuadrados, suma de los cuadrados total (SS_{Total}), suma de los cuadrados regresión ($SS_{\text{regresión}}$) y suma de los cuadrados residual (SS_{residual}). (20)

$$SS_{\text{Total}} = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

Ecuación 7

$$SS_{\text{Regresión}} = \frac{[(\sum XY) - (\sum X \sum Y/n)]^2}{\sum X^2 - (\sum X)^2/n}$$

Ecuación 8

$$SS_{\text{residual}} = SS_{\text{Total}} - SS_{\text{regresión}}$$

Ecuación 9

$$F = \frac{SS_{\text{regresión}}}{SS_{\text{residual}}}$$

Ecuación 10

El valor de F calculado se comparó con un valor de F crítico obtenido de la tabla de distribución de F, considerando los grados de libertad asociados con la regresión y con el residual y un nivel de confianza de 95%.

Análisis de correlación, para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto (Ecuación 1) se utilizó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), éstos son usados para estimar la calidad de la correlación entre las variables X e Y.

Para examinar la relevancia estadística del coeficiente de correlación como indicador del modelo lineal, se calculó el test estadístico t_r (Ecuación 11) con $n - 2$ grados de libertad y se comparó con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido. En este caso la hipótesis nula es la no-correlación entre X e Y. (20)

$$t_r = \frac{r \times \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ecuación 11}$$

III.E. Precisión

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad del método analítico bajo circunstancias de operación normales (19). La precisión se analizó matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) en estudios intradía e interdía. Para ambos casos, los límites de aceptación fueron obtenidos a partir de la fórmula empírica de Horwitz, Ecuación 12, que relaciona el RSD de un método dado con la concentración del analito en la muestra. (21)

$$\text{RSD}\% = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde C es la concentración expresada en potencia de 10.

Además para ambos estudios se calculó el error relativo, lo que da una estimación de la exactitud del método.

III.E.1. Estudio interdía

Se preparó una curva de calibración de seis puntos entre 5 y 28 $\mu\text{g/ml}$ y dos sets de controles de concentración baja, media y alta (10, 17 y 25 $\mu\text{g/ml}$), agregando a la orina

negativa soluciones estándar o de control según sea el caso. Esto se realizó durante cinco días consecutivos. Cada día se analizaron cromatográficamente los diferentes niveles de la curva de calibración y los dos sets de controles. (17)

III.E.2. Estudio intradía

Al igual que en el estudio interdía se preparó una curva de calibración y seis sets de controles de concentración baja media y alta (10, 17 y 25 $\mu\text{g/ml}$), agregando a la orina negativa soluciones estándar o de control según sea el caso. La curva y los seis sets de controles se analizaron en el mismo día. (17)

III.F. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación es la menor concentración del analito en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales establecidas (18, 19)

Para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación se utilizaron 4 puntos de la parte inferior de la curva de calibración (concentración 5, 6, 7 y 8 $\mu\text{g/ml}$ en orina), se analizó cada uno de los niveles por triplicado, obteniéndose una nueva curva de calibración, se extrapoló la respuesta a concentración cero obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco Y_{bl} . Además, se determinó la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se calculó la recta correspondiente a cada concentración versus la desviación estándar y se extrapoló la desviación estándar a concentración cero obteniéndose el estimado S_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco (21).

Se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para n medidas individuales como:

$$\text{LOD} = \frac{Y_{bl} + 3 \times S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 13

$$\text{LOQ} = \frac{Y_{bl} + 10 \times S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 14

Donde:

Y_{bl} : estimado de la respuesta del blanco

S_{bl} : estimado de la desviación estándar del blanco

b: pendiente de curva de calibración de todo el rango de trabajo

n: medidas individuales, n = 1

III.G. Recuperación de la extracción

Recuperación de la extracción es la cantidad del compuesto de interés analizado expresado como porcentaje de la cantidad teóricamente presente en el medio, es decir, la relación porcentual entre una muestra extraída con una muestra no-extraída.

Se prepararon por triplicado muestras de concentración baja, media y alta de efedrina (10, 17 y 25 $\mu\text{g/ml}$) extraídas y tres muestras para cada una de las mismas concentraciones baja, media y alta no-extraídas. En las muestras no-extraídas se realizó la extracción a la orina negativa, y al final del proceso se agregaron los volúmenes correspondientes de efedrina y de estándar interno. Se calculó para cada concentración de efedrina así como para el estándar interno, la relación entre las áreas de las muestras extraídas y las no-extraídas. (17)

III.H. Estabilidad

III.H.1. Estabilidad del efecto de ciclos de congelamiento descongelamiento

Se prepararon 10 muestras con una concentración de 10 µg/ml de efedrina, se congelaron todos los tubos, cada día, durante 5 días consecutivos se descongelaron a temperatura ambiente y se volvieron a congelar todos los tubos, separando diariamente 2 tubos para su análisis, recongelando el resto. Cada día se procesaron las dos muestras junto a una curva estándar.

III.I. Incertidumbre

El término incertidumbre es utilizado para describir los resultados de la medición y consiste en una estimación de los “límites de inexactitud”. La evaluación de la incertidumbre es necesaria para cerrar el vacío, o ignorancia, que existe entre un valor medido y la cantidad verdadera asociada.

Para calcular la incertidumbre del método, se utilizó el procedimiento descrito en la Guía Eurachem/Citac, el que comprende 4 pasos: (22)

- Paso 1: Especificar el mensurando, escribir una definición clara de lo que está siendo medido, incluyendo información específica de la descripción del método.
- Paso 2: Identificar las fuentes de incertidumbre, hacer una lista de las posibles fuentes de incertidumbre asociadas con el método. Esto se hace a través de un diagrama de causa y efecto para identificar los efectos en el resultado, además de simplificar y resolver duplicados. Se consideran las etapas del método y cualquier otro factor que pueda aportar incertidumbre al resultado entregado.

- Paso 3: Cuantificar los componentes de la incertidumbre, medir o estimar la magnitud de los componentes de la incertidumbre asociados con cada fuente potencial de incertidumbre identificada. Se representa cada componente de incertidumbre a través de un estimado de su desviación estándar (incertidumbre estándar, u_i).
- Paso 4: Calcular la incertidumbre combinada, que incluye el cálculo de la incertidumbre combinada estándar y de la incertidumbre expandida:
 - Incertidumbre combinada estándar (u_c), combinar los componentes de incertidumbre cuantificados anteriormente. La combinación de estas estimaciones se realiza usando el método de la “raíz cuadrada de la suma de cuadrados”. Para un resultado (y) que es afectado por los parámetros p, q, \dots donde cada parámetro tiene una incertidumbre $u(p), u(q), \dots$ la incertidumbre de y , esta dada por:

$$u_c(y) = y \times \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde:

y : resultado para el cual se está cuantificando la incertidumbre

$u(p), u(q)$: incertidumbre estándar de parámetros p, q, \dots calculada en el paso 3

- Incertidumbre expandida (U), es el intervalo alrededor del resultado de una medición, que se espera comprenda una gran parte de la distribución de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando. La incertidumbre expandida se calcula a partir de la incertidumbre estándar combinada y un factor de cobertura k , usando la Ecuación 16. La elección del factor de cobertura requiere conocer el nivel de confianza.

$$U(y) = k \times u_c(y) \quad \text{Ecuación 16}$$

IV. Resultados y discusiones

IV.A. Desarrollo de la metodología analítica

Se buscó desarrollar un método rápido, sensible y exacto en cromatografía líquida, capaz de separar efedrina de su metabolito principal y de los fármacos relacionados, sin interferencias de la matriz. Para esto se evaluaron las condiciones cromatográficas y las condiciones para la extracción de las muestras.

A partir de la información obtenida en una revisión bibliográfica, se consideraron diversas metodologías para la cuantificación de efedrina por HPLC, las que incluían el uso de una columna de fase reversa, con una fase móvil de elevada fuerza iónica, con pH entre 3 y 6, y una baja proporción de solvente orgánico.

Se evaluaron distintas condiciones de fase móvil, variando la concentración del tampón, el pH, la proporción del solvente orgánico y el flujo. Se observó que al trabajar con un tampón fosfato 50 mM ajustado a pH 4, con mezcla de metanol al 5% se obtiene una adecuada separación, fijando el flujo en 2 ml/min. La temperatura de 40° C, a la que se trabajó con la columna, permite la obtención de picos más definidos con una disminución de los tiempos de retención y un angostamiento de las señales cromatográficas

Para definir el método de extracción líquido/líquido, se evaluaron el pH de extracción, el solvente orgánico a utilizar y la temperatura de secado de las muestras, con el objeto de obtener un extracto limpio, libre de interferentes de la matriz pero con una adecuada recuperación del analito y del estándar interno. Se optó por ajustar a pH 12 con carbonato de potasio 25 % p/v y extraer con 3 ml de terbutil metiléter, secando las muestras a temperatura ambiente (20 a 25° C).

IV.B. Obtención del tiempo de retención

Los resultados de los tiempos de retención para las distintas concentraciones de efedrina se presentan en la Tabla 2, y el resumen de los tiempos de retención para las nueve concentraciones de efedrina y etilefrina se presentan en la Tabla 3.

Tabla 2: Tiempos de retención para distintas concentraciones de efedrina.

| | 10 µg/ml | 17 µg/ml | 25 µg/ml |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Tiempo de retención (minutos) | 6,974 | 6,821 | 6,712 |
| | 7,036 | 6,826 | 6,720 |
| | 6,973 | 6,814 | 6,736 |
| Promedio | 6,994 | 6,820 | 6,723 |
| s | 0,036 | 0,006 | 0,012 |
| RSD % | 0,52 | 0,09 | 0,18 |

Tabla 3: Tiempo de retención promedio para efedrina y etilefrina (minutos)

| | Efedrina | Etilefrina |
|-------------------------|----------|------------|
| Promedio (n = 9) | 6,846 | 2,272 |
| s | 0,121 | 0,006 |
| RSD (%) | 1,76 | 0,25 |

Al analizar los cromatogramas para los tiempos de retención de la efedrina para las distintas concentraciones se puede observar que a medida que aumenta la concentración aumenta el área y la altura de los picos, y se observa una leve disminución en el tiempo de retención, lo que produce una mayor desviación estándar relativa para el promedio de los tiempos de retención del total de las muestras de efedrina. (Anexo 1: cromatogramas para muestras de concentración 10, 17 y 25 µg/ml de efedrina y 10 µg/ml de etilefrina en orina).

IV.C. Selectividad

La selectividad, también llamada especificidad de un método analítico, es la capacidad de éste de medir exacta y específicamente el analito en la presencia de componentes que puede esperarse estén presentes en la matriz de la muestra. La selectividad es una medida del grado de interferencia (o ausencia de ésta) en el análisis de muestras de mezclas complejas. (18, 19)

Del estudio de la selectividad del método se concluye que éste es selectivo para efedrina en la matriz orina, ya que no se observaron señales cromatográficas de componentes de las orinas negativas al tiempo de retención de la efedrina. (Anexo 2: cromatogramas para orina negativa y para muestra de efedrina de 10 µg/ml en orina negativa)

Además, se pudo observar que el método es capaz de separar con una adecuada resolución a la efedrina de otros compuestos relacionados, que podrían estar presentes en muestras de orina que contengan efedrina (norefedrina, norpseudoefedrina, pseudoefedrina y metilefedrina). (Anexo 3: cromatograma para muestra de efedrina, norefedrina, norpseudoefedrina, metilefedrina, pseudoefedrina y etilefrina)

Así, se demostró la capacidad del método de medir el fármaco de interés en presencia de componentes potenciales de la matriz, y compuestos relacionados potencialmente presentes en muestras positivas a efedrina.

IV.D. Linealidad y rango lineal

El rango lineal de un procedimiento analítico es el intervalo entre la mayor y la menor concentración del analito en la muestra (incluidas estas concentraciones), para las cuales ha sido demostrado que tiene un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad. La linealidad es la capacidad, en un rango de datos, de obtener resultados de análisis que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. (24)

Rango lineal: al observar los puntos obtenidos de las muestras analizadas en el rango de 1 a 40 $\mu\text{g/ml}$, se nota claramente que sobre 30 $\mu\text{g/ml}$ existe un cambio en la pendiente. Al graficar las curvas obtenidas con puntos bajo y sobre 30 $\mu\text{g/ml}$ (Anexo 4) se obtuvo que se cruzan en 28,47 $\mu\text{g/ml}$, por lo que el rango superior de trabajo se acotó a 28 $\mu\text{g/ml}$.

Para la curva evaluada de siete niveles en duplicado, en un rango de 5 a 28 $\mu\text{g/ml}$, los parámetros de la curva de regresión obtenidos por el método de los mínimos cuadrados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados Regresión Lineal

| Intervalo de confianza | | |
|------------------------|--------|--------------|
| Pendiente | 0,6162 | $\pm 0,0267$ |
| Intercepto | 0,1454 | $\pm 0,0449$ |
| r | 0,9976 | ===== |
| r² | 0,9953 | ===== |

Análisis de varianza (ANOVA)

- La hipótesis nula establece que no existe relación lineal entre el área y la concentración, la pendiente es igual a cero. $H_0: b = 0$.
- La hipótesis alternativa establece que existe una relación lineal entre el área y la concentración, la pendiente es distinta a cero. $H_a: b \neq 0$.

Tabla 5: Resumen análisis de varianza

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F (tabla) |
|------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------|-----------------------------------|
| Regresión | 1 | 3,2801 | 3,2801 | 2526,93 | 4,75 |
| Residuos | 12 | 0,01558 | 0,001298 | | |
| Total | 13 | 3,2957 | | | |

Comparando el valor crítico de F con el valor calculado de F estadístico, el F calculado es mayor que el F crítico, por lo que se rechaza la hipótesis nula a favor de la hipótesis alternativa. Luego, la pendiente generada por la regresión lineal no es igual a cero, por lo que se puede concluir que la regresión calculada, definida como una regresión lineal, es válida. Por lo tanto, existe una correlación lineal entre la relación de la concentración de la efedrina y la concentración del estándar interno, y la relación de las áreas de los mismos.

Análisis de correlación

- La hipótesis nula establece que la correlación lineal de la población no existe entre las dos variables, que el coeficiente de correlación es igual a 0. $H_0: r = 0$
- La hipótesis alternativa establece que el coeficiente de correlación de la población no es igual a cero, indicando una correlación válida entre las variables. $H_a: r \neq 0$.

De la Ecuación 11 se obtiene $t_r = 50,4$, y de la tabla de distribución t para 12 grados de libertad ($n - 2$) y un nivel de confianza de 95% el t crítico es 2,179.

El valor crítico del t estadístico define las regiones de aceptación y rechazo de la hipótesis nula, en este caso, la región de aceptación de la hipótesis nula está definida como: $-2,179 < t < 2,179$. El t estadístico calculado cae fuera de la región de la hipótesis nula, por lo que ésta se rechaza en favor de la hipótesis alternativa, luego se puede aseverar que el modelo lineal es adecuado para el rango de concentraciones estudiado.

IV.E. Precisión

La precisión es una medida de lo cerca que están uno de otro los resultados para un número de mediciones bajo las mismas condiciones analíticas. Es el grado de concordancia alrededor de un resultado individual. (19)

En la Tabla 6 se presentan los límites de aceptación para los estudios de precisión obtenidos a partir de la fórmula empírica de Horwitz (Ecuación 12), para las concentraciones a las que se realizó el estudio de precisión interdía e intradía.

Tabla 6: Límites de aceptación para el estudio de precisión, según la fórmula empírica de Horwitz

| [c] µg/ml | RSD % |
|-----------|-------|
| 10 | 11,31 |
| 17 | 10,45 |
| 25 | 9,86 |

IV.E.1. Precisión interdía

La precisión interdía entrega los datos de la variabilidad a largo plazo de un procedimiento analítico, que se determinó en un único laboratorio, pero en días distintos (23). Los datos obtenidos del estudio de precisión interdía se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Resultados estudio de precisión interdía

| Día | Control 1 | | | Control 2 | | |
|-------------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| | 10 µg/ml | 17 µg/ml | 25 µg/ml | 10 µg/ml | 17 µg/ml | 25 µg/ml |
| 1 | 10,10 | 17,53 | 26,06 | 10,08 | 17,73 | 23,92 |
| 2 | 10,93 | 17,24 | 25,42 | 10,33 | 19,05 | 25,74 |
| 3 | 10,02 | 17,86 | 25,64 | 9,91 | 17,76 | 26,80 |
| 4 | 9,91 | 17,13 | 24,96 | 9,75 | 16,97 | 24,90 |
| 5 | 10,07 | 16,96 | 23,74 | 10,66 | 17,55 | 25,89 |
| Promedio | 10,21 | 17,34 | 25,16 | 10,15 | 17,81 | 25,45 |
| s | 0,41 | 0,36 | 0,89 | 0,36 | 0,76 | 1,09 |
| RSD % | 4,03 | 2,05 | 3,53 | 3,54 | 4,28 | 4,28 |
| Error relativo % | 2,06 | 2,02 | 0,66 | 1,46 | 4,78 | 1,80 |

IV.E.2. Precisión intradía

El estudio de precisión intradía entrega los datos de la repetibilidad del método, la evaluación de la repetibilidad consiste en múltiples mediciones de una muestra por el mismo analista bajo las mismas condiciones analíticas. Expresa la precisión en un intervalo corto de tiempo bajo las mismas condiciones de operación (24). Los resultados obtenidos del estudio de precisión intradía se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados estudio de precisión intradía

| Control | 10 µg/ml | 17 µg/ml | 25 µg/ml |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 10,97 | 16,55 | 26,11 |
| 2 | 9,83 | 16,11 | 24,83 |
| 3 | 9,45 | 18,24 | 26,59 |
| 4 | 10,56 | 16,98 | 23,79 |
| 5 | 10,38 | 17,28 | 24,82 |
| 6 | 10,41 | 18,27 | 28,57 |
| Promedio | 10,27 | 17,24 | 25,79 |
| s | 0,54 | 0,88 | 1,69 |
| RSD % | 5,27 | 5,10 | 6,57 |
| Error relativo % | 2,70 | 1,41 | 3,16 |

Los errores relativos para todos los controles de ambos estudios de precisión son bajos, siendo el mayor uno de los controles medios del estudio de precisión interdía con un 4,78%, lo que indica que el método tiene una buena exactitud al ser todas las concentraciones promedio cercanas a su valor nominal.

Un resumen de las desviaciones estándar relativa para los estudios de precisión intradía e interdía se presentan en la Tabla 9, además de los límites de aceptación calculados a partir de la ecuación de Horwitz.

Tabla 9: Resumen de los RSDs para los estudios de precisión interdía e intradía y el RSD calculado a partir de la fórmula de Horwitz

| [c] $\mu\text{g/ml}$ | RSD % Interdía | | RSD % | RSD % |
|----------------------|----------------|------|----------|---------|
| | C1 | C2 | Intradía | Horwitz |
| 10 | 4,03 | 3,54 | 5,27 | 11,31 |
| 17 | 2,05 | 4,28 | 5,10 | 10,45 |
| 25 | 3,53 | 4,28 | 6,57 | 9,86 |

La precisión del método es adecuada ya que todos los RSD experimentales, tanto para el estudio intradía como para el interdía, son menores a los límites de aceptación. Además, todas las desviaciones estándar relativas son similares, del mismo orden, lo que indica que la precisión del método es proporcional a la concentración de efedrina en la muestra.

IV.F. Límite de detección y límite de cuantificación

Los resultados obtenidos utilizados para la evaluación del límite de detección y para el límite de cuantificación se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Resumen de los resultados obtenidos para los puntos bajos de la curva de calibración utilizados para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación.

| [Efedrina] $\mu\text{g/ml}$ | [Efedrina] / [St. Interno] | Promedio (n = 3) | | |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|-------|
| | | A Efedrina / A St. Interno | s | RSD % |
| 5 | 0,5 | 0,4460 | 0,0198 | 4,43 |
| 6 | 0,6 | 0,5522 | 0,0164 | 2,98 |
| 7 | 0,7 | 0,6060 | 0,0155 | 2,56 |
| 8 | 0,8 | 0,7284 | 0,0125 | 1,71 |

La curva de calibración obtenida al graficar las concentraciones y las áreas es: $Y = 0,9011 X - 0,0026$; lo que da una estimación de la respuesta a concentración cero de $- 0,0026$.

Al efectuar el análisis de regresión tomando la relación de las concentraciones como X y la desviación estándar como Y se obtiene la recta: $Y = - 0,0227 X + 0,0308$; por lo que la estimación de la desviación estándar del blanco es 0,0308.

Luego, tomando como pendiente el valor obtenido del estudio de linealidad, los valores calculados para el límite de detección (LOD) y para el límite de cuantificación (LOQ), son de 1,37 y 4,64 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

IV.G. Recuperación de la extracción

La recuperación de la extracción se obtiene de la relación entre las áreas bajo la curva de las muestras extraídas y las áreas de las muestras no-extraídas, expresado como porcentaje.

Tabla 11: Recuperación de la extracción para efedrina y estándar interno

| | [c] $\mu\text{g/ml}$ | % recuperación de la extracción | Promedio (n = 9) | s | RSD % |
|-------------------|----------------------|---------------------------------|------------------|-------|-------|
| Efedrina | 10 $\mu\text{g/ml}$ | 70,55% | 67,56% | 3,33% | 4,93 |
| | 17 $\mu\text{g/ml}$ | 66,88% | | | |
| | 25 $\mu\text{g/ml}$ | 65,26% | | | |
| Etilefrina | 10 $\mu\text{g/ml}$ | 64,07% | 64,07% | 1,87% | 2,92 |

No se observa una gran diferencia entre la recuperación de la extracción para las distintas concentraciones de efedrina, sólo una recuperación levemente mayor para el control más bajo, que no es significativa al momento de cuantificar, siendo de todas formas la desviación estándar pequeña.

IV.H. Estabilidad

IV.H.1. Estabilidad del efecto de ciclos de congelamiento-descongelamiento

Debido a que las muestras de orina durante los análisis rutinarios en el laboratorio son almacenadas en frío y congeladas, es necesario poder establecer cómo afectan estos procesos de congelamiento y descongelamiento la concentración de efedrina en las muestras de orina.

Se seleccionó la concentración de 10 µg/ml, por ser la concentración de corte sobre la cual se considera un resultado analítico adverso, por lo que es importante observar el comportamiento de las muestras a esta concentración.

Tabla 12: Efecto de los ciclos de congelamiento-descongelamiento

| control | Días | | | | | Promedio (n = 5) | s | RSD % |
|---------|-------|-------|-------|------|------|---------------------|------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 1 | 9,84 | 9,77 | 9,26 | 9,64 | 9,25 | 9,55 | 0,25 | 2,63 |
| 2 | 10,25 | 10,73 | 10,40 | 9,67 | 9,42 | 10,09 | 0,48 | 4,76 |

Se observa que las desviaciones estándar relativas son pequeñas, además, los valores para la desviación estándar relativa son del mismo orden a los obtenidos en el estudio de precisión interdía, lo que indica que las muestras no sufren cambios en la concentración de efedrina por los procesos de almacenamiento. Tampoco se observa una gran diferencia entre el valor obtenido y el valor nominal de las muestras para ambos controles. De esta forma se demuestra que las muestras de efedrina no presentan problemas de estabilidad frente a ciclos de congelamiento-descongelamiento.

IV.I. Incertidumbre

La incertidumbre de una medición refleja la falta del conocimiento exacto del valor del mensurando, por lo tanto en un sentido más amplio la “incertidumbre de la medición” significa duda en la validez del resultado de la medición.

Se define incertidumbre de una medición como: “un parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores, que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando”. (22)

IV.I.1. Paso 1: Especificación del mensurando

La especificación del método para la preparación y extracción de las muestras se describe en la metodología (II.B.), se presenta un resumen de ésta en un diagrama de flujo (Anexo 5).

IV.I.2. Paso 2: Identificación de las fuentes de incertidumbre

Basado en la descripción de la metodología se identificaron las principales fuentes de incertidumbre de este método, para esto se desarrolló un diagrama de causa y efecto (Anexo 6).

Las fuentes de incertidumbre identificadas para el método son: la preparación de la solución estándar, la recuperación de la extracción, la curva de calibración y la precisión del método.

IV.1.3. Paso 3: Cuantificación de los componentes de la incertidumbre

IV.1.3.a. Incertidumbre de la solución estándar

La incertidumbre de la solución estándar de concentración c_{SE} de 1000 $\mu\text{g/ml}$, está dada por su preparación. Va a tener dos componentes, la incertidumbre de la balanza analítica al pesar 5 mg y la incertidumbre del matraz volumétrico de 5 ml utilizado para llevar a volumen.

a.1. Incertidumbre de la balanza:

La incertidumbre de la balanza analítica OHAUS $u(B)$, se obtuvo del certificado de calibración, que establece una incertidumbre de $\pm 0,00003$ g, con un nivel de confianza de 95% ($k = 2$). Luego la incertidumbre estándar de la balanza al pesar 5 mg es de:

$$u(B) = \frac{0,00003 \text{ g}}{2}$$

$$u(B) = 0,015 \text{ mg}$$

a.2. Incertidumbre del matraz volumétrico de 5 ml

La incertidumbre del matraz volumétrico $u(M)$, se calculó combinando las tres principales influencias en el volumen: la calibración, los efectos de la temperatura y la repetibilidad.

- Calibración: la tolerancia del matraz dada por el fabricante es de $5 \pm 0,04$ ml, se asume una distribución rectangular debido a que no hay información del nivel de confianza.

$$u(\text{cal}) = \frac{0,04}{\sqrt{3}}$$

$$u(\text{cal}) = 0,023094 \text{ ml}$$

- Temperatura: la diferencia entre la temperatura a la que fue calibrado el matraz (20° C) y la variación de temperatura que pueda existir en el laboratorio ($\pm 4^\circ$ C) también da una incertidumbre al volumen. La incertidumbre por este efecto se puede calcular a partir del estimado del rango de temperatura y del coeficiente de expansión térmica del metanol (α), la variación de volumen para el matraz está dada por la Ecuación 17:

$$\Delta V = V \times \Delta T \times \alpha \quad \text{Ecuación 17}$$

$$\Delta V = 5 \times 4 \times 1,259 \times 10^{-3}$$

$$\Delta V = 0,02518 \text{ ml}$$

La incertidumbre estándar asociada a la diferencia de temperatura $u(t)$, se calculó asumiendo una distribución rectangular:

$$u(t) = \frac{0,02518}{\sqrt{3}}$$

$$u(t) = 0,01454 \text{ ml}$$

- Repetibilidad: la variación en el llenado del matraz se estimó realizando un experimento de repetibilidad. La desviación estándar de 10 pesadas de un matraz volumétrico de 5 ml llenado con agua grado cromatográfico fue de 0,01448 ml, este valor se usa directamente como la incertidumbre estándar de la repetibilidad del matraz $u(\text{rep})$.

a.3. Incertidumbre combinada del matraz volumétrico 5 ml

Los componentes individuales de la incertidumbre combinada del matraz volumétrico son independientes de la concentración, por lo tanto se combinan según la Ecuación 18.

$$u(M) = \sqrt{(u(\text{cal}))^2 + (u(t))^2 + (u(\text{rep}))^2} \quad \text{Ecuación 18}$$

$$u(M) = \sqrt{0,023094^2 + 0,01454^2 + 0,01448^2}$$

$$u(M) = 0,03089$$

a.4. Incertidumbre combinada de la solución estándar

Los componentes de la incertidumbre de la solución estándar son proporcionales a la concentración, por lo que la incertidumbre combinada de la solución estándar, $u(s)$, se expresa según la Ecuación 19:

$$u(s) = c_{SE} \sqrt{\left(\frac{u(B)}{\text{Peso}}\right)^2 + \left(\frac{u(M)}{\text{Volumen}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 19}$$

$$u(s) = 1000 \sqrt{\left(\frac{0,015}{5}\right)^2 + \left(\frac{0,03089}{5}\right)^2}$$

$$u(s) = 6,8679 \mu\text{g} / \text{ml}$$

IV.I.3.b. Incertidumbre de la precisión del método

La incertidumbre asociada a la precisión del método se calculó a partir de los datos obtenidos en el estudio de precisión intradía (Tabla 8). Ahí se observa que no existe diferencia significativa entre las desviaciones estándares relativas de cada una de las concentraciones, por lo que se concluyó que la precisión es proporcional a la concentración de efedrina. En este caso las desviaciones estándares relativas obtenidas para cada concentración se combinan según la Ecuación 20 para dar un sólo estimado, que puede ser aplicado al rango de concentraciones que cubre el estudio de precisión (25).

$$RSD_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + (n_3 - 1) \times RSD_3^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + (n_3 - 1)}}$$

Ecuación 20

Donde:

RSD_1 : desviación estándar relativa calculada para la concentración 1,
expresada en tanto por uno

n_1 : número de repeticiones para la concentración 1.

$$RSD_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(6-1) \times (5,27 \times 10^{-2})^2 + (6-1) \times (5,10 \times 10^{-2})^2 + (6-1) \times (6,57 \times 10^{-2})^2}{(6-1) + (6-1) + (6-1)}}$$

$$RSD_{\text{pool}} = 5,68 \times 10^{-2}$$

La incertidumbre asociada a la precisión del método se calculó como la desviación estándar de la media, ya que es un valor obtenido del promedio de la repetición de mediciones. (22)

$$\frac{u(P)}{P} = \frac{0,0568}{\sqrt{6}}$$

$$\frac{u(P)}{P} = 0,0232$$

IV.I.3.c. Incertidumbre de la recuperación

La recuperación de la extracción es la relación entre el valor observado y el valor esperado para la concentración del analito en la muestra. La recuperación R de una muestra en particular debe considerarse que contiene tres componentes: \bar{R}_m , R_s , y R_{rep} . (25)

- \bar{R}_m : Estimado de la recuperación media del método obtenida del análisis de muestras preparadas.
- R_S : es un factor de corrección que toma en cuenta la diferencia en la recuperación de una muestra en particular, comparada con la recuperación observada en el material usado para estimar \bar{R}_m .
- R_{rep} : es un factor de corrección que toma en cuenta el hecho que las muestras preparadas pueden comportarse de forma diferente a muestras reales que contengan el analito.

El producto de estos tres componentes da el estimado de la recuperación, R . La incertidumbre de la recuperación, $u(R)$, se calcula combinando las incertidumbres de cada uno de los componentes asociados a la recuperación.

c.1. Estimación de \bar{R}_m y $u(\bar{R}_m)$

Del estudio de recuperación de la extracción (Tabla 11) se obtuvo que la recuperación para la efedrina expresada en tanto por uno es de $\bar{R}_m = 0,6756$ y la desviación estándar para las 9 muestras estudiadas es de 0,0333. La incertidumbre estándar $u(\bar{R}_m)$ es calculada como la desviación estándar de la media:

$$u(\bar{R}_m) = \frac{0,0333}{\sqrt{9}}$$

$$u(\bar{R}_m) = 0,0111$$

c.2. Estimación de la contribución de \bar{R}_m a $u(R)$

La contribución de \bar{R}_m a la incertidumbre total del método depende de que tan diferente sea de 1, y si se aplica una corrección.

Al calcular el estimado de la recuperación y su incertidumbre $u(\bar{R}_m)$ son posibles tres casos:

1. \bar{R}_m , tomando en cuenta $u(\bar{R}_m)$, no es significativamente diferente de 1, los resultados no son corregidos para la recuperación.
2. \bar{R}_m , tomando en cuenta $u(\bar{R}_m)$, es significativamente diferente de 1 y los resultados son corregidos para la recuperación.
3. \bar{R}_m , tomando en cuenta $u(\bar{R}_m)$, es significativamente diferente de 1, pero no es aplicada una corrección.

Para determinar si la recuperación es significativamente diferente de 1 se usa un test estadístico t, usando la Ecuación 21. Dado que los grados de libertad asociados con $u(\bar{R}_m)$ son conocidos, se compara t con el valor crítico de t para 7 grados de libertad ($n - 2$) a un 95% de confianza, que corresponde a 2,365 (25).

$$t = \frac{|1 - \bar{R}_m|}{u(\bar{R}_m)}$$

Ecuación 21

$$t = \frac{|1 - 0,6756|}{0,0111}$$

$$t = 29,22$$

Debido a que el t calculado es mucho mayor que el t crítico, se puede aseverar que la recuperación es significativamente diferente de 1.

Como la recuperación es significativamente diferente de 1, y se utiliza una corrección a la recuperación mediante el uso de un estándar interno, corresponde el caso 2. Así \bar{R}_m está explícitamente incluido en el cálculo de los resultados, por lo tanto no es aplicable una corrección a la incertidumbre de la recuperación y $u(\bar{R}_m)$ se incluye en el cálculo de la incertidumbre total como $u(\bar{R}_m)/\bar{R}_m$.

c.3. Cálculo de R y u(R)

La recuperación R para una muestra en particular corresponde a la Ecuación 22:

$$R = \bar{R}_m \times R_s \times R_{rep} \quad \text{Ecuación 22}$$

La incertidumbre asociada a la recuperación está dada por la Ecuación 23: (25).

$$u(R) = R \times \sqrt{\left(\frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m}\right)^2 + \left(\frac{u(R_s)}{R_s}\right)^2 + \left(\frac{u(R_{rep})}{R_{rep}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 23}$$

R_s y R_{rep} son asumidos 1, luego, $R = \bar{R}_m = 0,6756$

Considerando que R_s es un término asociado a la diferencia que pueda existir entre la recuperación de muestras de concentraciones distintas a la utilizada para calcular \bar{R}_m , y como para el cálculo de \bar{R}_m se utilizaron tres concentraciones que cubren el rango de trabajo, se puede asumir que la incertidumbre asociada $u(R_s)$ está incluida en $u(\bar{R}_m)$.

Asimismo, la incertidumbre asociada a R_{rep} es despreciable en relación con la incertidumbre de la recuperación, ya que al trabajar con muestras líquidas, las muestras preparadas se comportan de la misma forma que las muestras reales.

Por lo tanto la incertidumbre de la recuperación (Ecuación 23) queda expresada como:

$$u(R) = u(\bar{R}_m) = 0,0111$$

IV.I.3.d. Incertidumbre de la curva de calibración

Se asume que la incertidumbre aportada por la ordenada es muy pequeña en relación con la de la abscisa, dado que la incertidumbre asociada a la concentración de los materiales de referencia utilizados para la calibración es despreciable comparada (i) con la incertidumbre asociada a los valores obtenidos como respuesta del instrumento para la confección de la recta de calibración y (ii) con los componentes de

la incertidumbre asociados a la respuesta del equipo al medir la muestra incógnita. La incertidumbre de la curva de calibración refleja solamente la incertidumbre en la abscisa. (26)

La curva de calibración está dada por la Ecuación 1, y su intervalo de confianza, que en este caso es la incertidumbre, es definida en la Ecuación 24.

$$u(\text{curva}) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c/c_{\text{St.I.}} - \bar{X})^2}{S_{xx}}} \times c_{\text{ST.I.}} \quad \text{Ecuación 24}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - (a + b \times X_i)]^2}{n - 2}} \quad \text{Ecuación 25}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde:

S: desviación estándar residual

S_{xx} : suma de los cuadrados de X

\bar{X} : promedio de X para n niveles de la curva de calibración

p: número de mediciones para la determinación de c

n: número de niveles de la curva de calibración

c: concentración de efedrina medida en la muestra en $\mu\text{g/ml}$

$c_{\text{St.I.}}$: concentración del estándar interno en $\mu\text{g/ml}$

Durante la validación del método, se prepararon curvas de calibración de 6 puntos en orina negativa con una concentración de 5, 10, 15, 20, 24 y 28 $\mu\text{g/ml}$ de efedrina, a partir de una solución estándar de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y una concentración de estándar interno

de 10 µg/ml. En la Tabla 13 se presentan los valores promedio obtenidos de 12 curvas de calibración usadas a lo largo de la validación del método, los que se utilizaron para estimar el aporte de la curva de calibración a la incertidumbre del método.

Tabla 13: Promedio de los valores de regresión obtenidos de 12 curvas de calibración, utilizados para estimar la incertidumbre de la curva de calibración.

| | |
|-----------------|---------|
| b | 0,8713 |
| S | 0,03891 |
| S _{xx} | 3,76 |
| n | 6 |
| \bar{X} | 1,7 |

Luego, la incertidumbre de la curva de calibración para una concentración c de efedrina y p mediciones de la muestra es:

$$u(\text{curva}) = \frac{0,03891}{0,8713} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{6} + \frac{(c/10 - 1,7)^2}{3,76}} \times 10$$

$$u(\text{curva}) = 0,4466 \sqrt{\frac{1}{p} + 0,1667 + \frac{(c/10 - 1,7)^2}{3,76}}$$

IV.I.4. Paso 4: Cálculo de la incertidumbre combinada

IV.I.4.a. Cálculo de la incertidumbre estándar combinada

La incertidumbre estándar combinada para una concentración c de efedrina, es la combinación de la incertidumbre estándar de cada una de las fuentes de incertidumbre analizadas, que son combinadas usando la Ecuación 15, y que va a quedar expresada como se presenta en la Ecuación 27:

$$u(c) = c \times \sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2 + \left(\frac{u(s)}{c_{SE}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{curva})}{c}\right)^2}$$

$$u(c) = c \times \sqrt{\left(\frac{0,0232}{1}\right)^2 + \left(\frac{0,0111}{0,6756}\right)^2 + \left(\frac{6,8679}{1000}\right)^2 + \left(\frac{0,4466 \sqrt{\frac{1}{p} + 0,1667 + \frac{(c/10 - 1,7)^2}{3,76}}}{c}\right)^2}$$

$$u(c) = c \times \sqrt{0,0008553 + \left(\frac{0,4466 \sqrt{\frac{1}{p} + 0,1667 + \frac{(c/10 - 1,7)^2}{3,76}}}{c}\right)^2}$$

IV.1.4.b. Cálculo de la incertidumbre expandida

Para el cálculo de la incertidumbre expandida se utiliza la Ecuación 16, con un valor de $k = 2$ que da un intervalo de confianza de aproximadamente 95%. Luego la incertidumbre expandida para una muestra de concentración c de efedrina calculada luego de p mediciones, queda expresada según la ecuación:

$$U(c) = 2 \times c \times \sqrt{0,0008553 + \left(\frac{0,4466 \sqrt{\frac{1}{p} + 0,1667 + \frac{(c/10 - 1,7)^2}{3,76}}}{c}\right)^2}$$

La incertidumbre expandida calculada para las concentraciones a las que se trabajó la curva de calibración, para muestras analizadas 1, 2 y 3 veces, se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14: Incertidumbre expandida en $\mu\text{g/ml}$ para p mediciones de una muestra.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | Incertidumbre Expandida ($\mu\text{g/ml}$) * | | |
|---------------------------------------|--|------------|------------|
| | p = 1 | p = 2 | p = 3 |
| 5 | $\pm 1,15$ | $\pm 0,96$ | $\pm 0,89$ |
| 10 | $\pm 1,17$ | $\pm 0,99$ | $\pm 0,92$ |
| 15 | $\pm 1,31$ | $\pm 1,14$ | $\pm 1,08$ |
| 20 | $\pm 1,52$ | $\pm 1,38$ | $\pm 1,34$ |
| 24 | $\pm 1,73$ | $\pm 1,61$ | $\pm 1,57$ |
| 28 | $\pm 1,97$ | $\pm 1,86$ | $\pm 1,83$ |

* La incertidumbre reportada es una incertidumbre expandida calculada usando un factor de cobertura de 2, que da un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

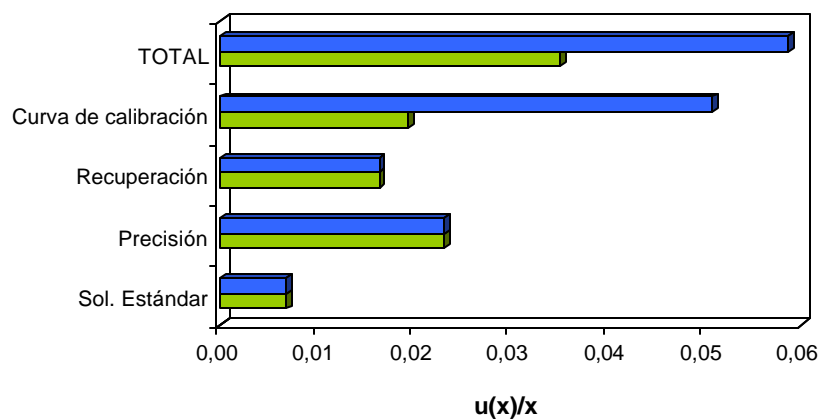
De los resultados de la Tabla 14 de la incertidumbre expandida, se demuestra que al realizar la cuantificación de efedrina en orina luego del análisis de una muestra en duplicado o triplicado, hay una disminución de la incertidumbre asociada a la concentración calculada, con relación a la incertidumbre para la misma concentración de una muestra que ha sido analizada una sola vez.

Las magnitudes relativas de la contribución de las fuentes analizadas a la incertidumbre total (Tabla 15) se comparan usando un histograma (Gráfico 1), que muestra los valores de la incertidumbre estándar relativa para cada una de las fuentes.

Tabla 15: Resumen Incertidumbres estándar y estándar relativa para todas las fuentes de incertidumbre analizadas.

| Fuente | Valor (x) | Incertidumbre estándar $u(x)$ | Incertidumbre estándar relativa $u(x)/x$ |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| Solución estándar | 1000 | 6,8679 | 0,0069 |
| Precisión | 1 | 0,0232 | 0,0232 |
| Recuperación | 0,6756 | 0,0111 | 0,0164 |
| Curva de calibración ($p = 1$) | 10 $\mu\text{g/ml}$ | 0,5086 | 0,0509 |
| | 28 $\mu\text{g/ml}$ | 0,5449 | 0,0194 |
| Incertidumbre Total | 10 $\mu\text{g/ml}$ | _____ | 0,0586 |
| | 28 $\mu\text{g/ml}$ | _____ | 0,0351 |

Gráfico 1: Incertidumbres estándar relativa y su contribución a la incertidumbre total para muestras de concentraciones de 10 y 28 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 14)

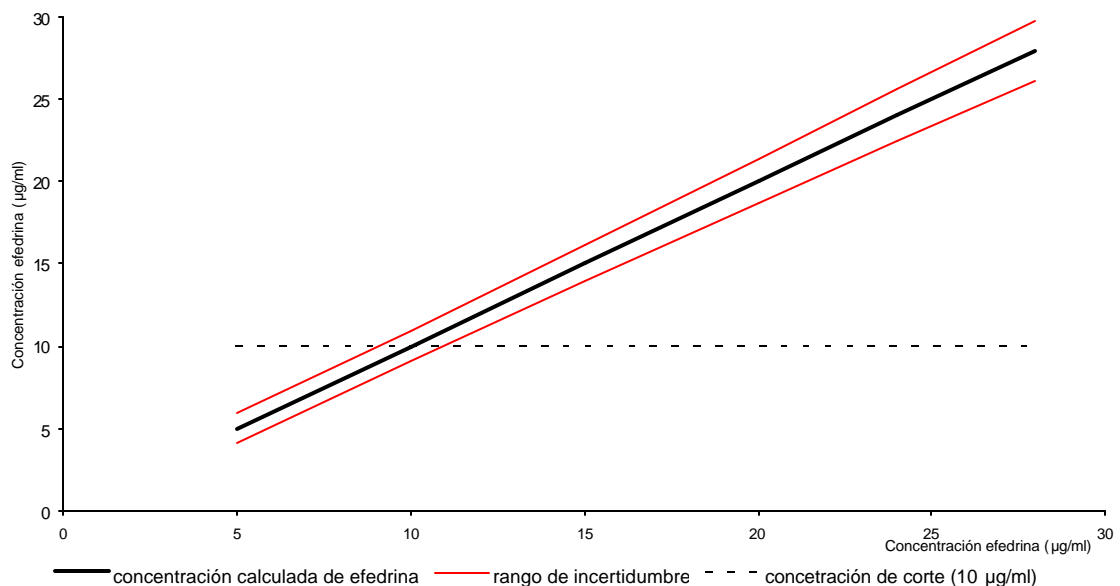


La incertidumbre de la preparación de la solución estándar es prácticamente despreciable en comparación con las otras fuentes de incertidumbre, su valor es menos de un tercio del valor total de la incertidumbre, su contribución a la incertidumbre total del método es despreciable.

Del histograma se puede concluir que las incertidumbres estándar relativas de la recuperación, de la precisión y de la solución estándar son independientes a la concentración calculada de efedrina en la muestra. Al contrario, la incertidumbre de la curva de calibración va a depender de la concentración de efedrina en la muestra, y por lo tanto la incertidumbre total también va a depender de la concentración. La incertidumbre estándar relativa de la curva de calibración para las concentraciones bajas (10 $\mu\text{g/ml}$) es mucho mayor que para concentraciones más altas (28 $\mu\text{g/ml}$), teniendo una gran influencia en la incertidumbre total para las concentraciones bajas. Para las concentraciones más altas la precisión pasa a ser la principal fuente de incertidumbre.

En el Gráfico 2 se observa la concentración calculada en $\mu\text{g/ml}$ de efedrina (línea negra) con su rango de incertidumbre (líneas rojas) para el rango de concentraciones que comprenden el método. La línea punteada corresponde al corte de 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre el cual las muestras son consideradas con un resultado analítico adverso.

Gráfico 2: Rango de incertidumbre para el método de cuantificación de efedrina en orina para una muestra analizada en triplicado.



Se puede aseverar que muestras analizadas por triplicado y posteriormente cuantificadas por el método descrito, que den una concentración mayor o igual a 10,95 $\mu\text{g/ml}$ (concentración en que el rango inferior de la incertidumbre está sobre el corte de 10 $\mu\text{g/ml}$, con una incertidumbre expandida de $\pm 0,94 \mu\text{g/ml}$) se pueden considerar, con un nivel de confianza adecuado, que tienen una concentración de efedrina superior a 10 $\mu\text{g/ml}$.

V. Conclusiones

De este trabajo se puede concluir que:

- La separación de las efedrinas, debido a que son bases débiles con grupos funcionales polares y de similar estructura química, se logró utilizando una columna de fase reversa y una fase móvil tamponada (pH 4), con elevada fuerza iónica y una concentración baja de metanol. El método es selectivo para la efedrina en presencia de sustancias relacionadas posibles de encontrar en muestras positivas a efedrina, ya que es capaz de separarla de los componentes potenciales de la matriz orina y de las otras efedrinas (norefedrina, norpseudoefedrina, metilefedrina y pseudoefedrina) que habitualmente están presentes en los suplementos alimenticios que contienen efedrina, y por lo tanto son posibles de detectar en muestras de orina positivas a efedrina.
- La extracción líquido-líquido a la que son sometidas las muestras de orina previo a su análisis cumple su objetivo, ya que se obtiene un extracto limpio y una recuperación promedio de 67,56% para la efedrina con una desviación estándar pequeña y de 64,07% para el estándar interno, lo que se considera adecuado como criterio de aceptación para una extracción de este tipo.
- El rango superior de trabajo se acotó a una concentración de efedrina de 28 $\mu\text{g/ml}$, ya que sobre esta concentración se observó gráfica y analíticamente un punto de inflexión con un cambio de pendiente. El rango utilizado finalmente de 5 a 28 $\mu\text{g/ml}$ es adecuado para el alcance del método al incluir la concentración de corte para efedrina establecida por la WADA de 10 $\mu\text{g/ml}$.

- Existe una correlación entre la respuesta del equipo (relación entre las áreas de los picos cromatográficos de efedrina y de estándar interno) y la concentración presente en las muestras, y esta correlación lineal es estadísticamente significativa para el rango de trabajo escogido, con un coeficiente de correlación que cumple con los tests estadísticos. Esto prueba que el método es lineal para el rango de concentración de 5 a 28 $\mu\text{g/ml}$ de efedrina en orina.
- La precisión, evaluada en estudios interdía e intradía, cumple los criterios de aceptación para todos los controles de concentración baja, media y alta con los que se trabajó. El método tiene una buena exactitud ya que todas las concentraciones promedio obtenidas son cercanas a su valor nominal.
- Se evaluó la estabilidad de efedrina en las muestras de orina sometiéndolas a ciclos de congelamiento–descongelamiento; de este estudio se puede concluir que las muestras de orina no ven afectada la concentración de efedrina al someterse a cambios de temperatura asociados con su almacenamiento.
- El valor calculado de la incertidumbre, permite saber el límite sobre el cual se puede asegurar, con un nivel de confianza de un 95%, que una muestra cuantificada con esta metodología analítica se encuentra sobre la concentración de corte establecida por la WADA de 10 $\mu\text{g/ml}$, (10,95 $\mu\text{g/ml}$, \pm 0,94 $\mu\text{g/ml}$), ya que muestras cuantificadas con concentraciones menores a ésta pueden encontrarse bajo el nivel de corte, por lo que no se podría aseverar con un nivel de confianza adecuado que tengan una concentración superior a 10 $\mu\text{g/ml}$ de efedrina.
- De acuerdo a la información obtenida de la validación del método, se puede aseverar que éste tiene una adecuada selectividad, precisión y exactitud, por lo que los objetivos propuestos de este trabajo se cumplieron al establecer y validar un método analítico sensible, rápido, reproducible y con una incertidumbre conocida para ser adoptado en el ámbito del control de doping para la detección y cuantificación de efedrina en orina bajo y sobre el corte de 10 $\mu\text{g/ml}$, con un nivel de confianza adecuado.

VI. Glosario

1. Desviación estándar para una muestra (s): Estimación de la desviación estándar de la población para una muestra de n resultados, se usa para medir la dispersión de los datos alrededor de la media en una distribución de valores, matemáticamente se expresa: (20)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

2. Desviación estándar de la media ($s_{\bar{x}}$): Desviación estándar de la media \bar{X} para n valores tomados de una población está dada por la ecuación: (22)

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

3. Desviación estándar relativa (RSD): Término que expresa la variabilidad de un set de datos, y se define como la relación entre la desviación estándar y la media. Es frecuentemente conocida como coeficiente de variación. Normalmente se expresa como porcentaje: (20)

$$\text{RSD}\% = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

4. Distribución rectangular: Función de distribución que se utiliza para calcular la incertidumbre estándar de un parámetro (u(x)), cuando un certificado u otras especificaciones dan límites sin especificar el nivel de confianza (por ejemplo 25 ml \pm 0,05 ml), o cuando un estimado es presentado en la forma de un rango máximo (\pm a) sin conocimiento de la forma de la distribución. (22)

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

5. Error relativo: Describe el error como una proporción del valor verdadero

$$\text{Error relativo\%} = \frac{O - E}{E} \times 100$$

Donde: O es el valor observado y E es el valor esperado (verdadero). (20)

6. Exactitud: Diferencia entre la media de un set de resultados o un resultado individual y el valor aceptado como verdadero para la cantidad medida. (18)

7. Factor de cobertura (k): Factor numérico usado como múltiplo de la incertidumbre estándar combinada en orden de obtener la incertidumbre expandida. (22)

Nota 1: El factor de cobertura está típicamente en el rango de 2 a 3

8. Incertidumbre (de la medición): Parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores, que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando. (22)

Nota 1: El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo de ella), o la mitad del ancho de un intervalo que tiene un nivel de confianza establecido.

Nota 2: En general la incertidumbre de una medición comprende muchos componentes. Algunos de estos componentes pueden ser evaluados a partir de la distribución estadística de una serie de mediciones y pueden ser caracterizados utilizando desviaciones estándar. Los otros componentes que también pueden ser caracterizados utilizando desviaciones estándar se determinan a través de distribuciones de probabilidad supuestas, basados en la experiencia u otra información.

Nota 3: Se entiende que el resultado de la medición es la mejor estimación del valor del mensurando, y que todos los componentes de la incertidumbre contribuyen a la dispersión, incluso aquellos resultantes de efectos sistemáticos, tales como los componentes asociados con correcciones y patrones de referencia.

9. Incertidumbre estándar (u(x)): Incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar. (22)

10. Incertidumbre estándar combinada ($u_c(y)$): Incertidumbre estándar del resultado de una medición (y) cuando ese resultado es obtenido a partir de los valores de un número de otras cantidades, es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo los términos las varianzas o covarianzas de éstas otras cantidades ponderadas, de acuerdo a cómo los resultados de las mediciones varían con estas cantidades. (22)

11. Incertidumbre expandida (U): Cantidad definida como un intervalo alrededor del resultado de una medición, que se espera envuelva una gran fracción de la distribución de los valores que pueden razonablemente atribuirse al mensurando. (22)

Nota 1: La fracción puede ser considerada como la probabilidad de la cobertura o el nivel de confianza del intervalo.

Nota 2: Para asociar un nivel de confianza específico con el intervalo definido por la incertidumbre expandida requiere considerar suposiciones explícitas o implícitas de la distribución de probabilidad caracterizada por el resultado de la medición y su incertidumbre estándar combinada. El nivel de confianza que puede atribuirse a este intervalo puede conocerse sólo en la medida en la cual tales suposiciones pueden justificarse.

Nota 3: Una incertidumbre expandida (U) es calculada de la incertidumbre combinada estándar $u_c(y)$ y el factor de cobertura k usando:

$$U(y) = k \times u_c(y)$$

12. Límite de cuantificación: Menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con una precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas. (19)

13. Límite de detección: Menor cantidad de analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto, bajo las condiciones experimentales establecidas. (19)

14. Linealidad: Capacidad de que el resultado del análisis sea, directamente o por una transformación matemática bien definida, proporcional a la concentración del analito en las muestras en un rango dado. (19)

15. Media aritmética o promedio (\bar{X}): Valor promedio de una muestra de n resultados:
(20)

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

16. Mensurando: Cantidad particular sujeta a medición

17. Precisión: Medida de cuan cerca están uno de otro los resultados para un número de mediciones bajo las mismas condiciones, es el grado de concordancia alrededor de un resultado individual. (18)

18. Rango lineal: Intervalo entre la menor y la mayor concentración del analito en la muestra (incluidas estas concentraciones) para las cuales ha sido demostrado que éste tiene un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad. (18)

19. Recuperación: Corresponde a la relación entre la concentración medida en una muestra y la concentración esperada de obtener. (18)

20. Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. (24)

21. Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios. (1824)

22. Selectividad (o especificidad): Capacidad de un método de determinar exacta y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes, que puede esperarse estén presentes en la matriz de la muestra bajo las condiciones experimentales establecidas. (18)

VII. Bibliografía

1. WORLD Anti-doping Agency. The World Anti-Doping Code: The 2004 Prohibited List, International Standard, Valid 26 March 2004 [en línea] <<http://www.wada-ama.org/>> [consulta: 18 agosto 2004]
2. GOODMAN and Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica por Hardman “et al”. 9ª ed., México, McGraw-Hill, 1996. vol 1
3. LOMBARDO, J. Supplements and Athletes. Southern Medical Journal. 97 (9): 877-879, 2004
4. MOFFAT A., OSSELTON M.D.; WIDDOP B. Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons. 3ª ed, London, Pharmaceutical Press, 2004, vol. 2
5. BASELT, R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 5ª ed. California, USA. Chemical Toxicology Institute, 1967. 919p.
6. MAGKOS, F. y KAVOURAS, A. Caffeine and Ephedrine Physiological, Metabolic and Performance-Enhancing Effects. Sports Medicine 34 (13): 871-889, 2004
7. KARCH, S., Karch's Pathology of Drug Abuse, 3ª ed., USA, CRC Press, 2002.
8. HALLER C. “et al”. Concentrations of Ephedra Alkaloids and Caffeine in Commercial Dietary Supplements. Journal of Analytical Toxicology, 28(3):145-151, 2004.
9. IMAZ C., “et al”. Determination of Ephedrines in urine by High-Performance Liquid Chromatography Journal of Chromatography, 631:201-205, 1993.
10. VAN DER MERWE, P.J., BROWN, L.W., HENDRIKZ S.E. Simultaneous quantification of ephedrines in urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 661: 357-361, 1994.

11. IMAZ C. "et al". Comparison of various reversed-phase columns for the simultaneous determination of ephedrine in urine by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 870:23-28, 2000
12. TRABELSI, I., RAOUAFI, F., BOUZOUITA, K. Simultaneous determination of Ephedrine in Urine by RP-HPLC. En: Recent Advances in Doping Analysis, Proceedings of the 19th Cologne Workshop on Dope Analysis, 2001, pp 215-220
13. JACOB P. III, "et al"., Determination of Ephedrine Alkaloids and Caffeine Concentration in Dietary Supplements And Biological Fluids por Journal of Analytical Toxicology, 28 (3): 152-159, 2004.
14. ROMAN, M. C. Determination of Ephedra Alkaloids in Urine and Plasma by HPLC-UV: collaborative Study. Journal of AOAC international, 87: 15-24, 2004
15. ADVANCE Chemistry Development. ACD/ILab Web service (ACD/IUPAC Name Free 8.05) [en línea] <http://www.iupac.org/nomenclature/ACD/calc_3dparty.html> [consulta: 20 agosto 2005]
16. MERCK Research Laboratories. The Merck Index. 13^a ed., New Jersey, USA, MERCK CO, 2001.
17. GAI, N. Procedimiento Operativo Estándar (POE) para la validación y resultados de un Método analítico Utilizado en el Análisis de Muestras Biológicas, 1999
18. EURACHEM Working Group. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. [en línea]. LGC, 1998, <<http://www.eurachem.ul.pt/>> [consulta: 30 noviembre 2004]
19. UNITED States Pharmacopeia XXII, General Chapter <1225> Validation of Compendial Methods. National Formulary XVII. The United States Pharmacopeia Convention, INC, Rockville, MD; 1990, pág. 1710-1712.
20. JONES, D. Pharmaceutical Statistics. London, Pharmaceutical Press, 2002, 582p.
21. QUATOCHI, O., ABELAIRA, S., LABA, R. Validación de Métodos. En: Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Bs. Aires, Argentina, 1992. pp. 301-328.

22. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. [en línea], 2ª ed, 2000. 120p <<http://www.eurachem.ul.pt/>> [consulta: 3 abril 2005]
23. BARRERA G., DÍAZ C. Detección y cuantificación de Fenilbutazona y Furosemida por HPLC en fluidos biológicos de Caballos Finos de Carrera. Tesis (Químico Farmacéutico). Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2002. 64p.
24. INTERNATIONAL Conference On Harmonization. Text On Validation Of Analytical Procedures. [en línea] October 1994 <<http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html>> [consulta: 1 diciembre 2004]
25. BARWICK, V.J., ELLISON, S.L.R. Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles, Part(d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, [en línea], Valid Analytical Measurement, January 2000, <<http://www.vam.org.uk/>> [consulta: 20 mayo 2005]
26. PUGLISI, C., KORNBLIT, F. Incertidumbre de medición en química analítica. Recta de calibración. [en línea] <http://www.science.oas.org/SIM/publications/sim_2002/incertidum.pdf> [consulta: 10 junio 2005]

Anexos

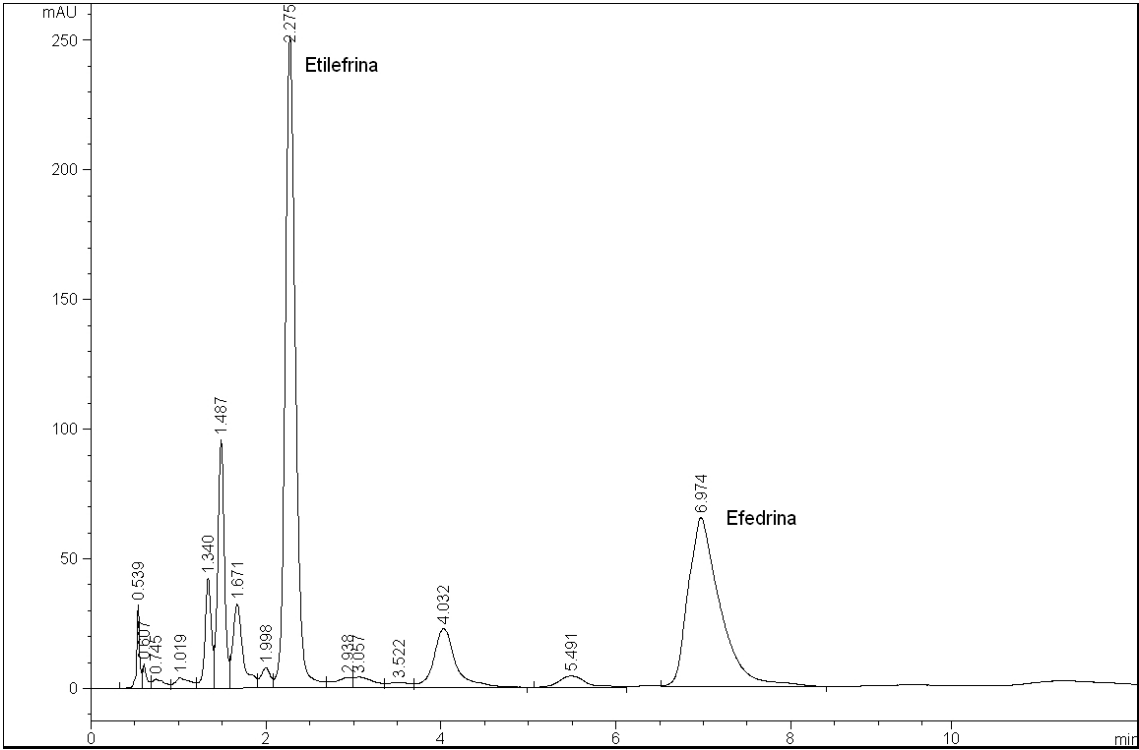
Anexo 1

Cromatogramas de extractos de muestras de concentraciones 10, 17 y 25 µg/ml de efedrina y 10 µg/ml de etilefrina en orina.

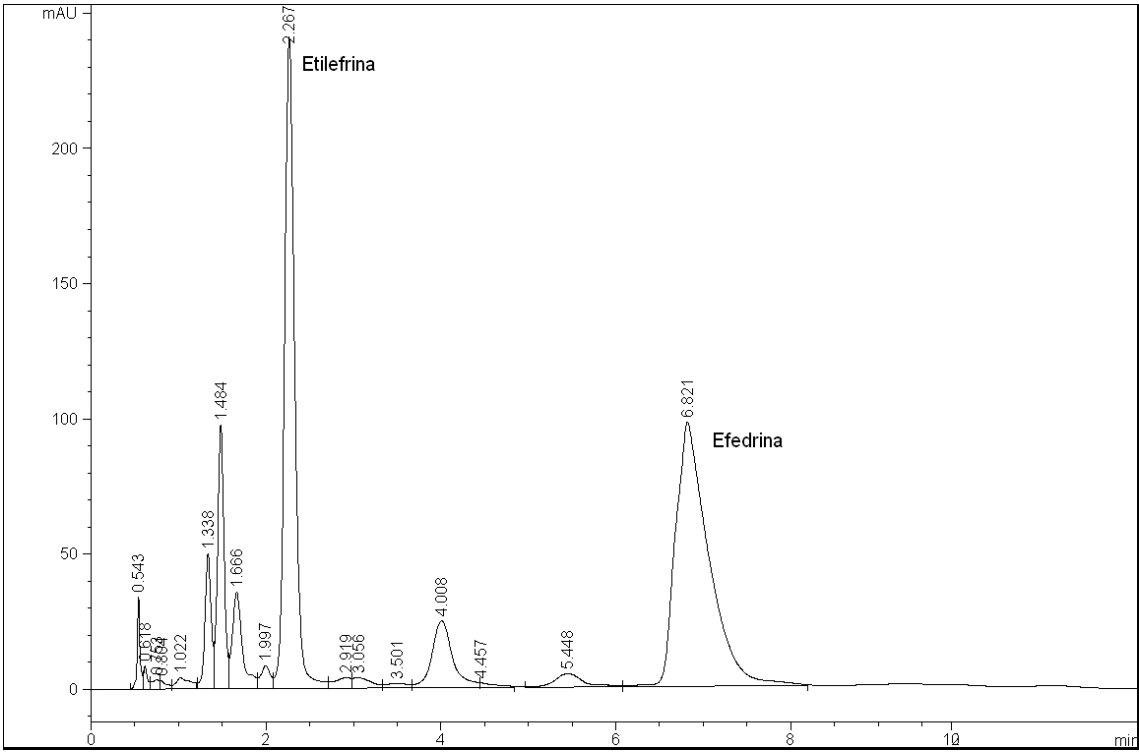
Condiciones de trabajo:

- Columna: LichroCART®, largo 12,5 cm, diámetro 4 mm, tamaño de partícula 5 µm; precolumna Merck LhicroCART® 4-4.
- Temperatura: 40° C.
- Fase móvil: Tampón Fosfato 50 mM pH 4 / Metanol (95/5).
- Flujo: 2 ml / min.
- Detector UV λ = 215 nm.
- Volumen de inyección: 20 µl.

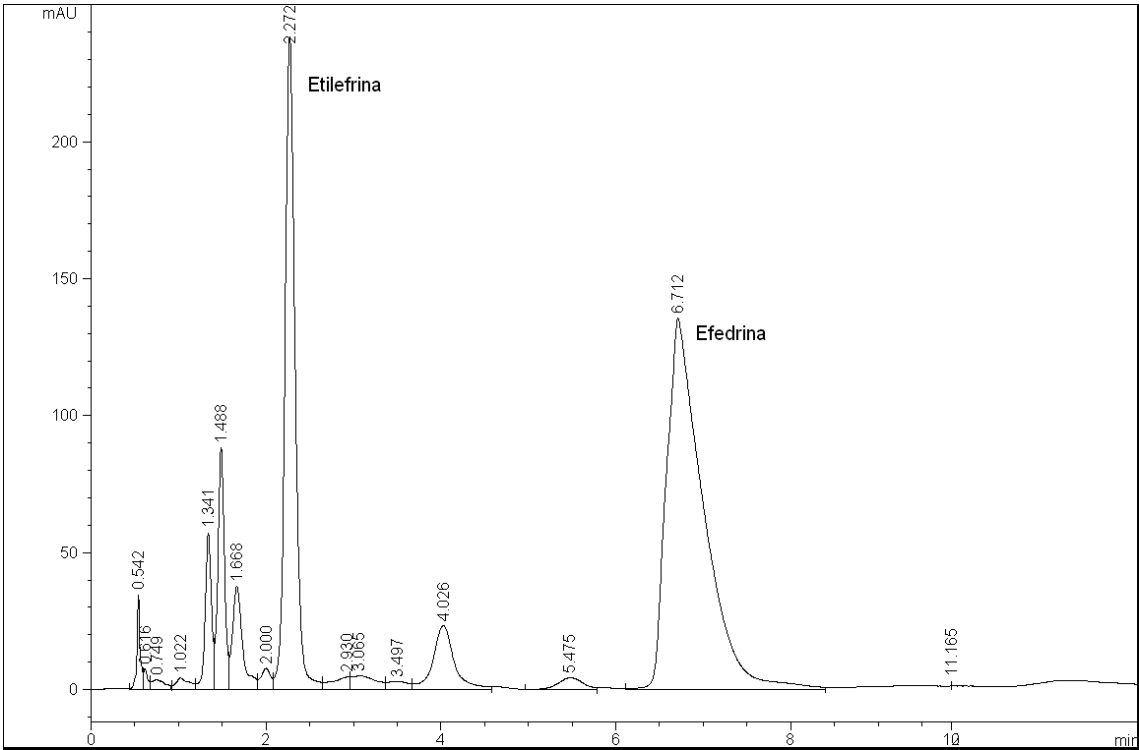
Cromatograma 1: extracto de muestra de concentración 10 µg/ml de efedrina y 10 µg/ml de etilefrina en orina.



Cromatograma 2: extracto de muestra de concentración 17 µg/ml de efedrina y 10 µg/ml de etilefrina en orina.



Cromatograma 3: extracto de muestra de concentración 25 µg/ml de efedrina y 10 µg/ml de etilefrina en orina.

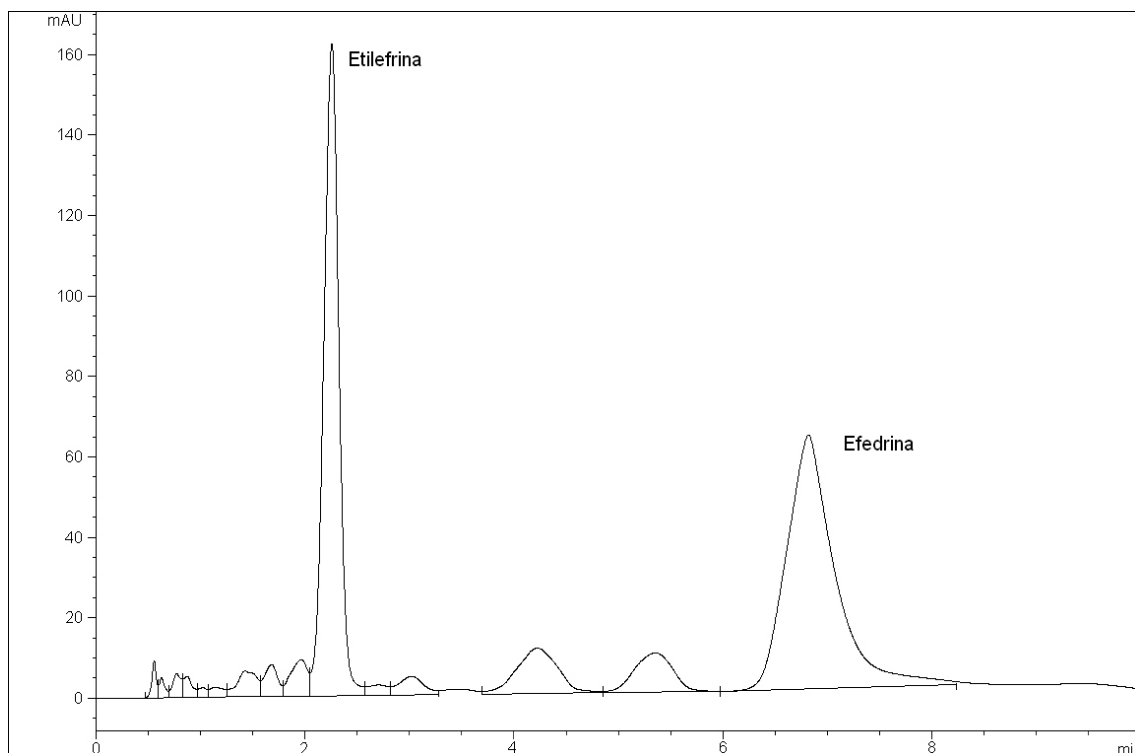


Anexo 2

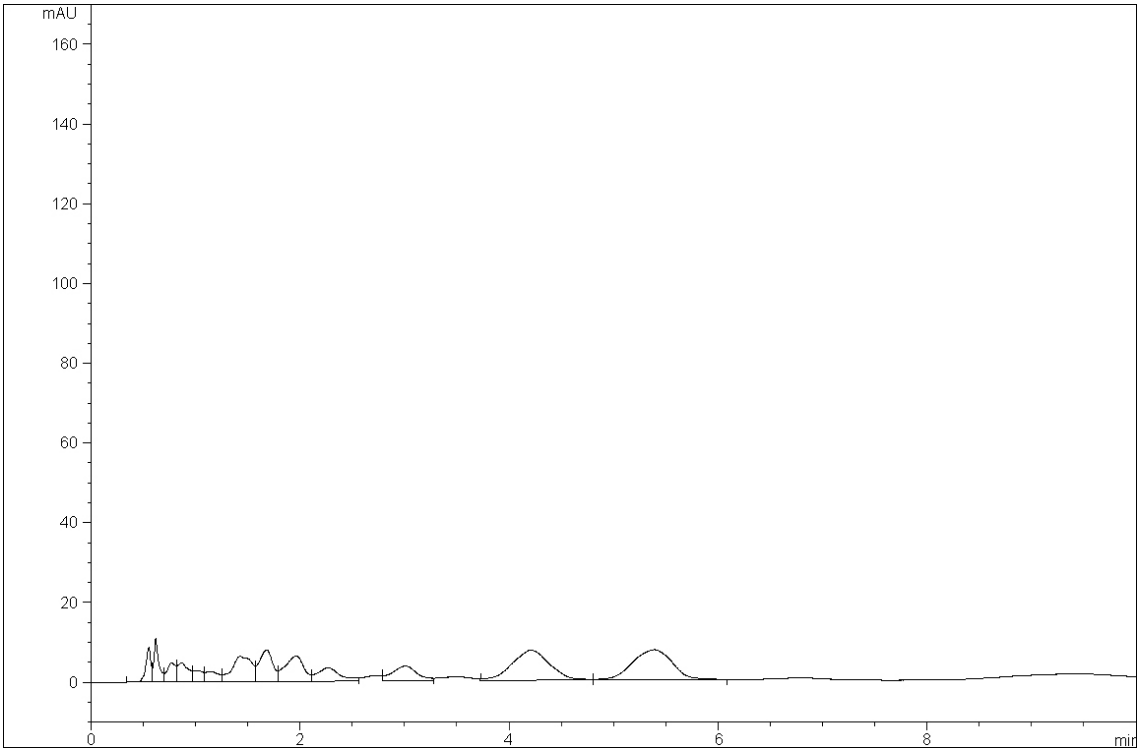
Cromatogramas para la evaluación de la selectividad del método para medir efedrina con respecto a la matriz orina.

Condiciones de trabajo: ver Anexo 1

Cromatograma 4: extracto de muestra de referencia de efedrina 10 µg/ml y etilefrina 10 µg/ml, en orina negativa.



Cromatograma 5: extracto de orina negativa

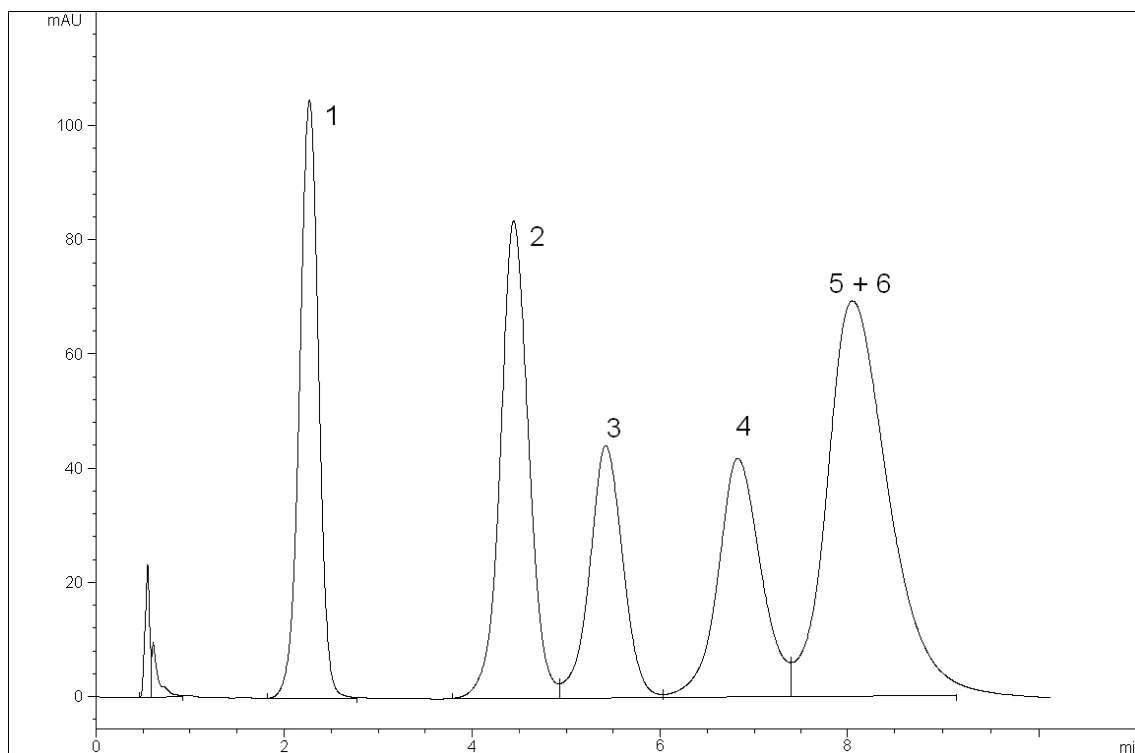


Anexo 3

Cromatograma de la evaluación de la selectividad del método para detectar efedrina en presencia de otros compuestos relacionados posibles de encontrar en muestras de orina que contengan efedrina.

Condiciones de trabajo: ver Anexo 1

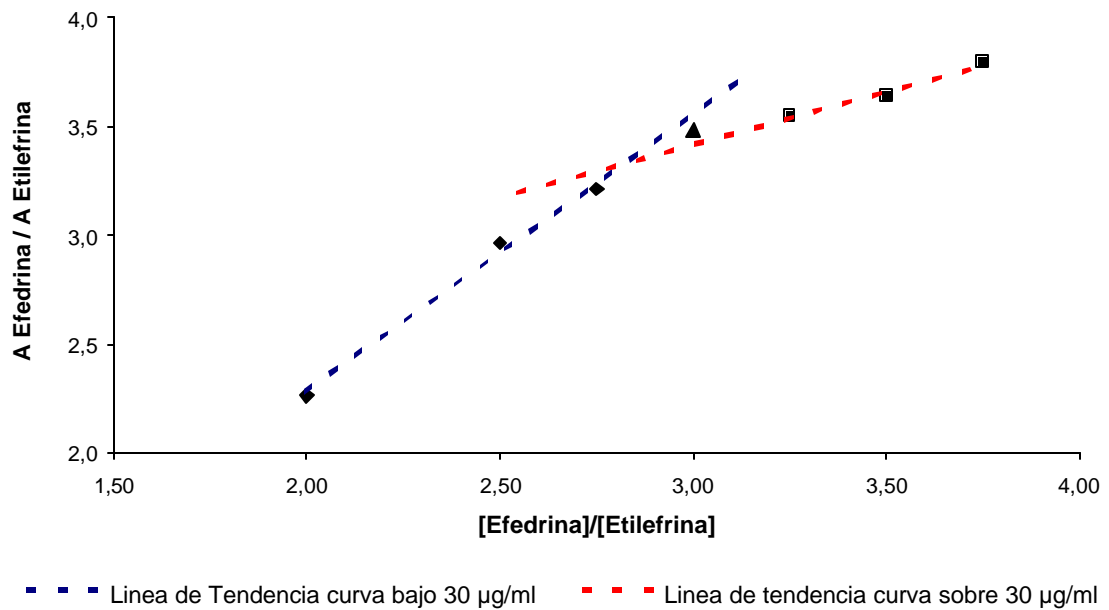
Cromatograma 6: muestra de efedrina, norefedrina, norpseudoefedrina, metilefedrina, pseudoefedrina y etilefrina de concentración 100 ppm para cada uno.



1: Etilefrina; **2:** Norefedrina; **3:** Norpseudoefedrina; **4:** Efedrina; **5:** Pseudoefedrina; **6:** Metilefedrina

Anexo 4

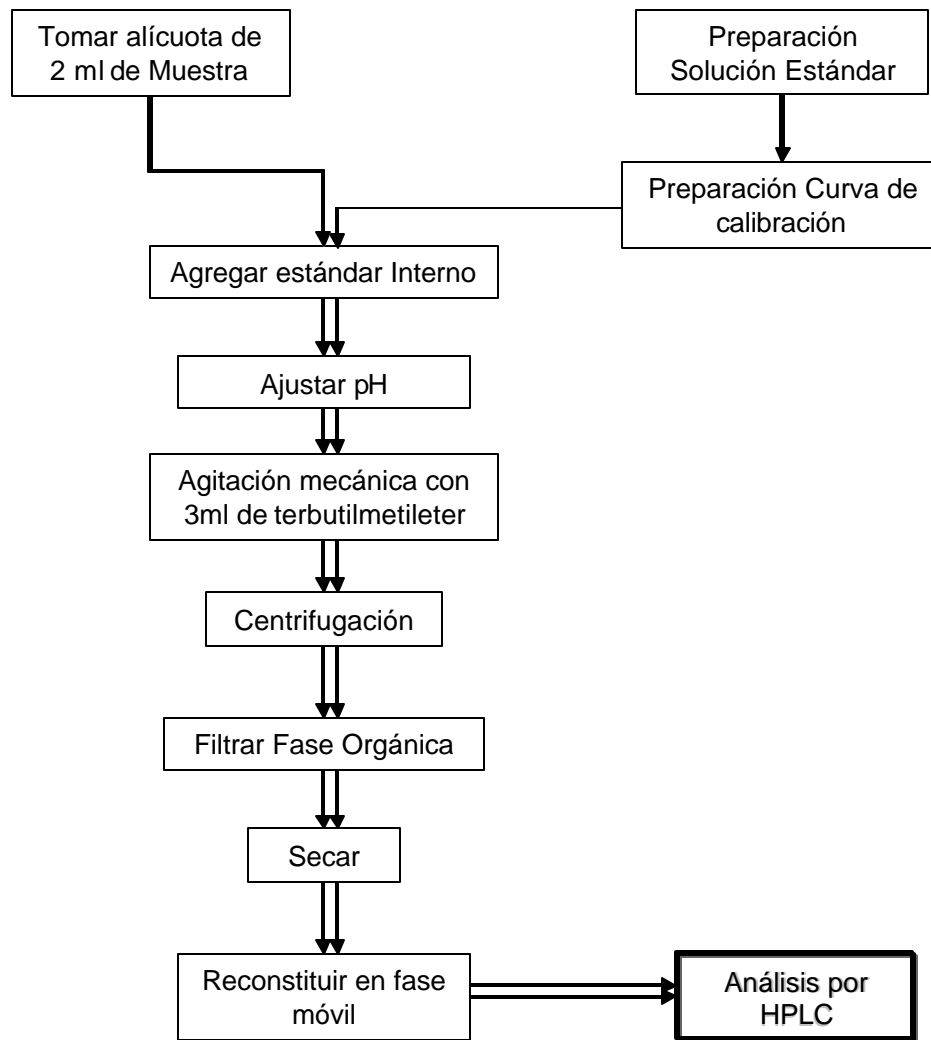
Gráfico 3: Intercepto de curvas bajo y sobre 30 µg/ml de efedrina en orina (el punto de 30 µg/ml no se incluyó en ninguna de las curvas).



| | Curva 1 (azul) | Curva 2 (roja) |
|----------------|-------------------|-------------------|
| Pendiente | 0,1284 | 0,0492 |
| Intercepto | -0,2892 | 1,9379 |
| r | 0,9969 | 0,9885 |
| r ² | 0,9939 | 0,9773 |

Anexo 5

Diagrama de Flujo: Cuantificación de efedrina en orina por HPLC



Anexo 6

Diagrama de causa y efecto: Fuentes de incertidumbre para el método de cuantificación de efedrina en orina por HPLC

