

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS



***IMPLEMENTACION DE DOS METODOLOGIAS
ALTERNATIVAS PARA LA DETERMINACION DE
ALUCINÓGENOS DERIVADOS DE
FENILETILAMINA 25-C, 25-I Y 25-B NBOMe EN
MUESTRAS INCAUTADAS Y BIOLÓGICAS***

Tesis para optar al Grado Académico de Magister en Bioquímica
Área de especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular

BORIS ETTIENNE DUFFAU GARRIDO

Director de Tesis
Dr. QF. Cristián Camargo Grandón

SANTIAGO - CHILE

2016

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
SUMMARY.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA DEL USO DE ALUCINÓGENOS.....	3
1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DERIVADOS NBOME Y FORMAS DE OBTENCIÓN.....	6
1.3. TOXICODINAMIA Y TOXICOCINÉTICA DE 25-C-NBOME, 25-B-NBOME Y 25-I- NBOME.....	8
1.4. CROMATOGRAFÍA PLANAR INSTRUMENTAL HPTLC EN ANÁLISIS DE MUESTRAS FORENSES..	12
1.5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA MUESTRAS FORENSES EN MATRICES BIOLÓGICAS E INCAUTACIONES.....	14
1.6. IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS FORENSE.....	15
1.6.1. Especificidad (selectividad).....	16
1.6.2. Límite de detección y de cuantificación LOD y LOQ.....	16
1.6.3. Precisión.....	16
1.6.4. Linealidad y rango de trabajo.....	17
1.6.5. Exactitud y Recuperación.....	17
1.6.6. Incertidumbre de la medición.....	18
1.6.7. Estabilidad.....	18
1.6.8. Robustez.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MATERIALES.....	21

3.1. REACTIVOS QUÍMICOS	21
3.2. MATERIALES DE REFERENCIA	21
3.3. INSUMOS PARA CROMATOGRAFÍA	21
3.5. MATERIAL DE LABORATORIO	22
4. MÉTODOS	23
4.1.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE MATERIAL DE REFERENCIA	23
4.2. IMPLEMENTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA HPTLC.....	23
4.2.1. Selección de fase móvil para HPTLC	23
4.2.2. Condiciones cromatográficas de HPTLC.....	24
4.2.3. Extracción de muestras incautadas (estampillas).....	25
4.3. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA MATERIALES INCAUTADOS POR HPTLC.....	26
4.3.1. ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD	26
4.3.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN LOD Y LOQ.....	26
4.3.3. PRECISIÓN	26
4.3.4. LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO	27
4.3.5. EXACTITUD Y RECUPERACIÓN	27
4.3.6. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN.....	27
4.3.7. ESTABILIDAD	27
4.3.8. ROBUSTEZ	28
4.4. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD DE MUESTRAS INCAUTADAS POR GC/MS.....	28
4.5. ELABORACIÓN DE BIBLIOTECAS DE ESPECTROS ULTRAVIOLETA UV Y MASA MS	29
4.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE INCAUTACIONES.....	29
4.7. METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE 25-C-NBOME EN ORINA.....	29
4.7.1. SELECCIÓN DE LA MATRIZ A ANALIZAR, EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CONDICIONES INSTRUMENTALES DE CONFIRMACIÓN DEL ANALITO	29
5.0 RESULTADOS	32
5.1. IMPLEMENTAR UNA NUEVA METODOLOGÍA POR HPTLC Y GC/MS PARA ANÁLISIS DE TRES DERIVADOS DE FENILETILAMINA EN NUESTRAS DE ESTAMPILLAS (25-I-NBOME, 25-C-NBOME Y 25- B-NBOME).....	32

INTERNACIONALES VIGENTES	32
5.2.1. ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD	32
5.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN LOD Y LOQ	36
5.2.3. PRECISIÓN	36
5.2.4. LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO	38
5.2.5. EXACTITUD Y RECUPERACIÓN	40
5.2.6. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN	41
5.2.7. ESTABILIDAD	42
5.2.8. ROBUSTEZ	44
5.3. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD DE MUESTRAS INCAUTADAS POR GC/MS	45
5.3.1. ELABORACIÓN DE BIBLIOTECAS DE ESPECTROS ULTRAVIOLETA UV Y MASA MS 47	
5.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE INCAUTACIONES	48
5.4.1. ESTABLECER EL PERFIL QUÍMICO DE ESTAS SUSTANCIAS ALUCINÓGENAS (COMPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN) EN MUESTRAS INCAUTADAS POR LAS POLICÍAS DE PAÍS	48
5.5. IMPLEMENTAR UNA METODOLOGÍA QUE PERMITA CONFIRMAR LA PRESENCIA DEL PRINCIPAL DERIVADO ESTRUCTURAL DE FENILETILAMINA DETECTADO EN CHILE EN ORINA COMO DIAGNÓSTICO DE INTOXICACIÓN AGUDA MEDIANTE EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA SPE.	59
5.5.1. METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE 25-C-NBOME EN MATRIZ BIOLÓGICA ORINA	59
6. DISCUSIÓN	63
6.1.1. SELECCIÓN DE FASE MÓVIL PARA HPTLC	63
6.2. VALIDAR LAS METODOLOGÍAS IMPLEMENTADAS SEGÚN NORMATIVAS INTERNACIONALES VIGENTES	63
6.2.1. ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD	63
6.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN LOD Y LOQ	64

6.2.3. PRECISIÓN (EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD O PRECISIÓN INTERMEDIA)	64
6.2.4. LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO	65
6.2.5. EXACTITUD Y RECUPERACIÓN (EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD)	66
6.2.6. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN	66
6.2.7. ESTABILIDAD	67
6.3.7. ROBUSTEZ	67
6.4. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD DE MUESTRAS INCAUTADAS POR GC/MS	68
6.5. ELABORACIÓN DE BIBLIOTECAS DE ESPECTROS ULTRAVIOLETA UV Y MASA MS	68
6.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROVENIENTES DE INCAUTACIONES	69
6.6.1. ESTABLECER EL PERFIL QUÍMICO DE ESTAS SUSTANCIAS ALUCINÓGENAS (COMPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN) EN MUESTRAS INCAUTADAS POR LAS POLICÍAS DE PAÍS	69
6.7. IMPLEMENTAR UNA METODOLOGÍA QUE PERMITA CONFIRMAR LA PRESENCIA DEL PRINCIPAL DERIVADO ESTRUCTURAL DE FENILETILAMINA DETECTADO EN CHILE EN ORINA COMO DIAGNÓSTICO DE INTOXICACIÓN AGUDA MEDIANTE EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA SPE.	70
7. CONCLUSIONES	72
8. BIBLIOGRAFÍA	76

Índice de figuras

	Página
FIGURA 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA FENILETILAMINA.....	7
FIGURA 2: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES REPRESENTANTES NBOME	7
FIGURA 3: ESQUEMA EN EL QUE UNA BANDA DE ANALITO ES TRANSFORMADA EN UN CROMATOGRAMA MEDIANTE ESCANEADO EN UN DENSITÓMETRO.....	13
FIGURA 4: COMPONENTES DE UN SISTEMA DE HPTLC MARCA CAMAG	13
FIGURA 5: ESQUEMA DE UN SISTEMA SPE Y EQUIPO DE VACÍO MANIFOLD®.	15
FIGURA 6: MUESTRA UN DENSITOGAMA EN SUPERPOSICIÓN DE 25-B-NBOME (R _f 0.34), DMT (R _f 0.10) Y LSD (R _f 0.06) A 298NM.....	34
FIGURA 7: SE MUESTRAN LOS R _f DE LOS TRES ANALITOS, ADEMÁS DEL ESTUDIO DE PUREZA DE CADA ESPECTRO DE CADA PICO	35
FIGURA 8: DENSITOGAMA DE 25-B-NBOME.....	36
FIGURA 9: LINEALIDAD DE NBOMES EN MATRIZ ESTAMPILLAS	39
FIGURA 10: GRÁFICO PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE CADA FACTOR EN LA INCERTIDUMBRE RELATIVA TOTAL PARA 25- C-NBOME ANALIZADOS POR HPTLC.....	41
FIGURA 11: GRÁFICO PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE CADA FACTOR EN LA INCERTIDUMBRE RELATIVA TOTAL PARA 25-I-NBOME ANALIZADOS POR HPTLC	42
FIGURA 12: GRÁFICO PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE CADA FACTOR EN LA INCERTIDUMBRE RELATIVA TOTAL PARA 25-B-NBOME ANALIZADOS POR HPTLC	42
FIGURA 13: GRÁFICO ESTABILIDAD DE ESTÁNDAR 25-C-NBOME PREPARADO EN METANOL Y ALMACENADO EN 2-8°C	43
FIGURA 14: GRÁFICO ESTABILIDAD DE ESTÁNDAR 25-I-NBOME PREPARADO EN METANOL Y ALMACENADO EN 2-8°C	43
FIGURA 15: GRÁFICO ESTABILIDAD DE ESTÁNDAR 25-B-NBOME PREPARADO EN METANOL Y ALMACENADO EN 2-8°C	44
FIGURA 16: GRÁFICO ESTABILIDAD DE MUESTRA DE ESTAMPILLA REAL DE 25-C-NBOME ALMACENADA A TEMPERATURA AMBIENTE	44
FIGURA 17: PICO CROMATOGRÁFICO Y ESPECTRO DE MASAS EN MODO FULL SCAN DE 25-C- NBOME	45
FIGURA 18: PICO CROMATOGRÁFICO Y ESPECTRO DE MASAS EN MODO FULL SCAN DE 25-B- NBOME	46
FIGURA 19: CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS EN MODO FULL SCAN DE 25-I-NBOME ..	46

FIGURA 20: PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN PROPUESTO PARA EL 25-C-NBOME EN EI A 70 eV ..	47
FIGURA 21: SUPERPOSICIÓN ESPECTROS UV DE NBOMES	48
FIGURA 22: ESPECTROS UV DE ESTÁNDARES Y MUESTRAS REALES DE ESTAMPILLAS DE 25-C-NBOME INCAUTADAS	56
FIGURA 23: CURVA DE CALIBRACIÓN EN GC/MS DE 25-C-NBOME MODO SCAN EMPLEADA PARA LA COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON HPTLC.....	56
FIGURA 24: GRÁFICO DE CAJA Y BIGOTE PARA LOS RESULTADOS DE 10 MUESTRAS ANALIZAS SIMULTÁNEAMENTE POR GC/MS Y HPTLC	57
FIGURA 25: COMPARACIÓN DE MUESTRAS FORTIFICADAS DE ORINA Y ESTÁNDARES DE 25-C-NBOME	60
FIGURA 26: DENSITOGRAMAS A 298 NM DE LA EXTRACCIÓN DE ORINA FORTIFICADA CON ESTÁNDAR DE 25-C-NBOME EN ORINA.	61
FIGURA 27: CROMATOGRAMA MODO SIM Y ESPECTRO DE MASAS DE 25-C-NBOME A 100 NG/ML EN ORINA (ARRIBA) Y DEL ESTÁNDAR DE 25-C-NBOME A 25 μ G/ML (ABAJO)	61

TABLA 1: INICIO DE ACCIÓN Y DURACIÓN DEL EFECTO DE 25C NBOMe SEGÚN LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN.....	9
TABLA 2: RESUMEN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS SEGÚN EL TIPO DE FASE DE ADSORBENTE PARA SPE.....	15
TABLA 3: DISTINTAS FASES MÓVILES PROBADAS PARA EL ANÁLISIS DE DERIVADOS DE FENILETILAMINA POR HPTLC.....	24
TABLA 4: LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA (NM) ABSORCIÓN PARA CADA DERIVADO DE FENILETILAMINA.....	25
TABLA 5: CONDICIONES DE GC/MS PARA IDENTIDAD DE MUESTRAS INCAUTADAS.....	28
TABLA 6: EVALUACIÓN DE COMPOSICIÓN DE FASES MÓVILES PARA ANÁLISIS POR HPTLC.....	32
TABLA 7: RESULTADOS DE ESTUDIO DE SELECTIVIDAD DEL MÉTODO POR HPTLC.....	33
TABLA 8: RESULTADOS DE LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPTLC.....	36
TABLA 9: RESULTADOS DE ESTUDIO DE REPETIBILIDAD POR HPTLC.....	37
TABLA 10: RESULTADOS DE REPRODUCIBILIDAD POR HPTLC.....	38
TABLA 11: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LINEALIDAD POR HPTLC.....	39
TABLA 12: RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE EXACTITUD MEDIANTE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.....	40
TABLA 13: RESULTADOS DE INCERTIDUMBRE PARA LOS TRES ANALITOS POR HPTLC.....	41
TABLA 14: RESULTADOS DE TIEMPO DE RETENCIÓN Y FRAGMENTOS M/Z DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS "NBOMes" POR GC/MS.....	45
TABLA 15: RESULTADOS DE 100 MUESTRAS REALES DE ESTAMPILLAS INCAUTADAS, ANALIZADAS POR HPTLC Y CONFIRMADAS POR GC/MS.....	55
TABLA 16: RESULTADOS OBTENIDOS DE LA COMPARACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE 10 MUESTRAS POR GC/MS Y HPTLC.....	57
TABLA 17: NUMERO DE MUESTRAS Y CONCENTRACIÓN PROMEDIO POR ESTAMPILLA DE PRINCIPALES DISEÑOS DE ESTAMPILLAS DE NBOMes.....	58
TABLA 18: RESULTADOS DE IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA POR HPTLC PARA DERIVADOS DE NBOMes EN ORINA.....	59
TABLA 19: ANÁLISIS POR HPTLC DE 25-C-NBOMe EN MUESTRAS FORTIFICADAS DE ORINA A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN.....	62