



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y
Bromatología

Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**DETERMINACIÓN DE BUPRENORFINA EN
MUESTRAS DE PLASMA MEDIANTE
CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Lucía Bascoy Otero

Julio 2016



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
FORENSES, ANATOMÍA
PATOLÓGICA, GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA, Y PEDIATRÍA
Facultade de Medicina e Odontoloxía
15782 Santiago de Compostela
Telf. 881 812216- Fax 881 812459

María Jesús Taberner Duque, Profesora Contratada Doctora del Área de Medicina Legal y Forense, y **Antonio Moreda Piñeiro**, Profesor Titular del Área de Química Analítica de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

A la Alumna **LUCÍA BASCOY OTERO** a la presentación del estudio “DETERMINACIÓN DE BUPRENORFINA EN MUESTRAS DE PLASMA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS” que ha sido realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Toxicología Forense del Departamento de Ciencias Forenses, Anatomía Patológica, Ginecología y Obstetricia, y Pediatría de la Universidad de Santiago de Compostela, como **Traballo de Fin de Grado en Química**,

Santiago de Compostela, 11 de Julio de 2016.

María Jesús Taberner Duque

Antonio Moreda Piñeiro

ÍNDICE

ÍNDICE:

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Historia de las drogas.....	4
2.2. Opio, opioides y opiáceos	5
2.2.1. El Opio a lo largo de la historia	5
2.2.2 Opio y opioides.....	6
2.3. Buprenorfina.....	6
2.3.1. Propiedades Químicas.....	7
2.3.2. Vías de administración.....	7
2.3.3. Farmacología y farmacocinética.....	8
2.3.4. Mecanismo de acción	8
2.3.5. Metabolismo y eliminación	9
2.4. Análisis de la buprenorfina en medios biológicos	9
2.4.1. Uso del plasma como matriz biológica	10
2.5. Técnicas analíticas empleadas.....	11
2.5.1. Extracción líquido-líquido	11
2.5.2. Cromatografía de gases- Espectrometría de masas	11
2.5.2.1. Instrumentación en cromatografía de gases	12
2.5.2.2. Interfase de la GC-MS	14
2.5.2.3. Instrumentación en espectrometría de masas	14
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	17
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	18
4.1. Medios experimentales.....	18
4.1.1. Equipos.....	18
4.1.2. Material	18
4.1.3. Reactivos	18
4.1.4. Preparación de las disoluciones de trabajo	19
4.2. Metodología analítica	19
4.2.1. Condiciones cromatográficas	19
4.2.2. Procedimiento de extracción	21
4.2.3. Derivatización	23
4.3. Validación de la metodología analítica	23
4.3.1. Selectividad.....	23
4.3.2. Sensibilidad: límites de detección y cuantificación	24

4.3.3. Linealidad	24
4.3.4. Exactitud, precisión y recuperación.....	26
5. RESULTADOS	28
5.1. Identificación de los compuestos.....	28
5.2. Verificación de la metodología analítica.....	30
5.2.1. Selectividad.....	30
5.2.2. Sensibilidad.....	31
5.2.3. Linealidad	32
5.2.4. Exactitud, precisión y recuperación.....	34
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Datos para las rectas de calibrado.

Tabla 2: Iones cuantificadores y cualificadores.

Tabla 3: Límites de detección y cuantificación para la buprenorfina.

Tabla 4: Concentraciones y relación de áreas empleadas para la recta de calibrado.

Tabla 5: Ecuación de la recta y coeficiente de correlación obtenidos para la buprenorfina mediante regresión.

Tabla 6: Precisión y exactitud. Ensayos interdía.

Tabla 7: Precisión y exactitud. Ensayos intradía.

Tabla 8: Resultados recuperaciones obtenidas para cada nivel de concentración.

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Comparación buprenorfina frente a morfina.

Figura 2. Estructura de la buprenorfina.

Figura 3. Esquema de la metabolización de la buprenorfina.

Figura 4. Composición del plasma sanguíneo.

Figura 5. Esquema de un cromatógrafo de gases.

Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas.

Figura 7. Programa de temperaturas.

Figura 8. Esquema de extracción.

Figura 9. Reacción de derivatización.

Figura 10. Cromatograma de la buprenorfina y la buprenorfina-d4.

Figura 11. Espectro de masas de la buprenorfina.

Figura 12. Espectro de masas de la buprenorfina deuterada.

Figura 13. Cromatograma de una muestra de plasma blanco.

Figura 14. Cromatograma del nivel de concentración de 150ng/mL.

Figura 15. Recta de calibrado de la buprenorfina en plasma.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

AAFS: American Academy of Forensic Science

CV: Coeficiente de Variación

DC: Corriente continua

EI: Electronic Ionization

ELL: Extracción líquido-líquido

FDA: Food and Drug Administration

GC-MS: Gas Chromatography- Mass Spectrometry

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LC-MS: Liquid Chromatography- Mass Spectrometry

LLOQ: Límite inferior de cuantificación

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

RF: Radiofrecuencia

SCAN: Modalidad de barrido en GC-MS

SIM: Modalidad de ión único en CG-MS

SNC: Sistema nervioso central

SPE: Extracción en fase sólida

SPME: Microextracción en fase sólida

ULOQ: Límite superior de cuantificación.

RESUMEN

1. RESUMEN:

ABSTRACT:

Buprenorphine is a powerful drug frequently used either as analgesic or for the treatment of patients addicted to other opioids. During the last decades there has been registered an increase in both buprenorphine's sales and consumption, which has brought several cases of intoxications and fatalities related to the abuse of this substance.

Buprenorphine entails an enormous risk for population due to the high number of patients who are being treated with it and its great potential as abuse drug, hence, the need to develop an analytic methodology which allows its detection in different biological samples arises.

The purpose of the present project is centered in the development and validation of an analytic method which allows detection and quantification of buprenorphine in plasma samples by Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) in order to analyze cases in which its presence is suspected.

RESUMEN:

La buprenorfina es un potente fármaco opioide usado frecuentemente como analgésico y para el tratamiento de pacientes adictos a otros opioides. En las últimas décadas se ha registrado un aumento tanto en las ventas como en el consumo de buprenorfina, lo que originado numerosos casos de intoxicaciones y muertes relacionadas con el abuso de esta sustancia.

La buprenorfina implica un enorme riesgo para la población debido al elevado número de pacientes sometidos a tratamiento con la misma y el gran potencial de ésta como droga de abuso, de ahí que surja la necesidad de desarrollar una metodología analítica que permita su determinación en distintas muestras biológicas.

El propósito del presente proyecto se centra en desarrollar y validar un método analítico que permita la determinación y cuantificación de esta sustancia en muestras de plasma mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS) con el fin de poder analizar casos en los que se sospeche de su presencia.

RESUMO:

A buprenorfina é un potente fármaco opioide que se usa habitualmente como analxésico e para o tratamento de pacentes adictos a outros opioides. Nas últimas décadas rexistrouse un incremento tanto nas vendas como no consumo de buprenorfina, o cal orixinou numerosos casos de intoxicacións e mortes relacionadas co abuso desta substancia.

A buprenorfina implica un enorme risco para a poboación debido ó elevado número de pacentes sometidos a tratamento coa mesma e o gran potencial desta como droga de abuso, de ahí que xorda a necesidade de desenrolar unha metodoloxía analítica que permita a súa determinación en distintas mostras biolóxicas.

O propósito do presente proxecto céntrase en desenrolar e validar un método analítico que permita a determinación e cuantificación desta substancia en mostras de plasma mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) co fin de poder analizar casos nos que se sospeite da súa presenza.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN:

2.1 HISTORIA DE LAS DROGAS:

El consumo de drogas es uno de los mayores problemas de la sociedad actual, sin embargo no es nada nuevo, la tradición de su consumo se pierde en el tiempo. Cada pueblo y cultura ha ido teniendo sus propias drogas y hábitos de consumo, sustancias como el cannabis, la cerveza o el tabaco, vienen siendo usados desde civilizaciones tan antiguas como la egipcia o la griega, sin embargo, su consumo no estaba tan extendido como hoy en día a pesar de que ahora si se tiene conocimiento sobre sus efectos nocivos sobre la salud.

A lo largo de la historia han sido muchas y muy variadas las sustancias psicotrópicas utilizadas por la humanidad con todo tipo de fines.

Ya en la Edad Antigua se usaban venenos de animales y extractos de plantas para cazar, como el *Curare*, utilizado por algunas tribus indígenas para impregnar las flechas con las que cazaban a sus presas alrededor del 1500 AC. Muchas eran usadas con fines bélicos y homicidas, como el acónito empleado en la Grecia y Roma clásicas. Asimismo el empleo de estas sustancias con fines medicinales y rituales estaba muy extendido, por ejemplo el alcohol como ofrenda para los dioses; el Laurel, que debido a sus propiedades alucinógenas era consumido por las pitonisas de los oráculos para vaticinar el futuro; el *Cannabis* usado en Asia por sus propiedades analgésicas y relajantes, la Cocaína en el imperio incaico como analgésico y energizante, etc.

Durante la Edad Media el uso de drogas se hacía principalmente por motivos religiosos, místicos y supersticiosos. En Occidente el vino se convirtió en portador del espíritu, mientras en Oriente triunfaban los destilados e infusiones de plantas como el Cannabis o la adormidera¹.

Más adelante los nuevos descubrimientos y el inicio de la globalización propiciaron la propagación y comercialización de nuevas sustancias, de forma que en S. XVIII ya constituían un negocio rentable, especialmente de sustancias como el Opio y el alcohol que se extendieron rápidamente entre clases populares e intelectuales como manera de evadirse de las duras condiciones de vida.

Gracias a los continuos avances científicos, durante los siglos XIX y XX se lograron aislar muchos de los principios activos de muchas drogas (el LSD a partir del cornezuelo de centeno, la morfina del opio...) y a finales del S.XX y principios del S.XXI la investigación alcanzó un nivel de desarrollo tal, que permitió el diseño y síntesis de nuevas drogas, dando lugar a una auténtica revolución en la industria de los psicofármacos. Inicialmente estas sustancias habían surgido como medicamentos, pero desgraciadamente muchas de ellas acabaron convirtiéndose en drogas de abuso.

Como podemos ver, el hombre siempre ha recurrido a todo tipo de sustancias hoy incluidas dentro del concepto de drogas para satisfacer todo tipo de necesidades, pero

sin duda, las más extendidas dentro de este grupo son la cafeína, el tabaco, el alcohol, el cannabis, la cocaína y los opiáceos.

2.2 OPIO, OPIOIDES Y OPIÁCEOS:

2.2.1 EL OPIO A LO LARGO DE LA HISTORIA.

El opio es el jugo desecado de los frutos de la adormidera (*Papaver somniferum*). Este complejo extracto vegetal ha sido uno de los medicamentos más importantes de toda la historia de la humanidad, y constituye, junto con las bebidas alcohólicas, el psicoactivo más antiguo.

El opio es una de las drogas más antiguas de las que se tiene constancia. La primera referencia sobre el opio nos llega de Mesopotamia sobre el año 3000 aC, donde se mencionaba bajo el nombre de Hul gil o planta de la felicidad y se usaba para tratar el dolor y hacer olvidar todo malestar².

Durante la época grecorromana empezaron a achacársele propiedades divinas y adquirió una gran relevancia en medicina. Hipócrates, padre de la medicina, desmiente sus atributos mágicos pero reconoce su utilidad como fármaco.

Al comenzar la Edad Media su uso se extiende por Europa, donde se emplea como analgésico, para calmar la tos y provocar sueños, aunque su consumo decae drásticamente alrededor del S.XV por prohibición de la Inquisición, que tachaba su consumo de costumbre pagana.

En el S.XVI el opio se reintroduce en Europa y en China empieza a dar problemas de salud y sociales vinculados con la adicción, que se agravan a principios del S.XVIII, cuando su consumo incrementa de forma alarmante y la producción interna ya no es suficiente para abastecerse. El comercio internacional de dichas sustancias se convierte en objeto de sucesivas controversias políticas que llegan a extremos bélicos a principios del siglo XIX³ (guerras del opio).

Hasta finales del S. XIX el consumo de opio no constituyó un verdadero problema en Occidente. Durante la guerra civil norteamericana (1861-1865), miles de soldados se convirtieron en adictos a la morfina tras serles administrada para mitigar los dolores provocados por las heridas bélicas. Otra droga derivada del opio muy consumida a finales de siglo fue la heroína, aislada por el químico Heinrich Dreser en 1883 cuya comercialización permitió prosperar a la gran empresa farmacéutica Bayer, que usaba esta sustancia para la elaboración de jarabes antitusivos, pero en 1913 (un año después de comercializada) la tuvieron que eliminar de la producción debido a que era muy adictiva³. De esta manera el consumo de opiáceos con fines recreativos se popularizó haciendo sonar la alarma social. En España el consumo de opiáceos ha disminuido en los últimos años, siendo la heroína la que produjo mayores problemas de drogadicción durante 1998 (380'2% por consumo de heroína y 1'1% por consumo de otros opiáceos)⁴.

2.2.2 OPIO Y OPIOIDES.

El opio tiene una composición compleja con un elevado número de alcaloides. El término opioide incluye tanto a los opiáceos propiamente dichos, como otras sustancias con estructuras y propiedades químicas similares, que son capaces de unirse a los receptores opioides, situados principalmente en el sistema nervioso central (SNC) y el tracto gastrointestinal, y modular la liberación de neurotransmisores. Se incluyen en este conjunto: sustancias de origen natural (endorfinas, morfina, tebaína), de origen semisintético (heroína, buprenorfina) o de síntesis artificial (metadona, fentanilo).

La mayoría de los opioides son lipofílicos y se absorben fácilmente por vía digestiva y parenteral. Se metabolizan principalmente en el hígado, los riñones, células del SNC y pulmones sometiéndose a procesos de conjugación glucurónica, hidrólisis, oxidación o N-desalquilación para aumentar su solubilidad en agua y luego se excretan mayoritariamente por orina.

2.3 BUPRENORFINA:

La Buprenorfina es un potente fármaco opioide derivado de la tebaína que se usa en el tratamiento de adicción a otros opioides tales como la morfina o la heroína.

Su efecto analgésico se debe a su acción como agonista parcial de los receptores opioides μ y antagonista de los receptores κ . Presenta una actividad analgésica mucho más potente que la morfina (entre unas 25 y 30 veces mayor), ya que se necesitan dosis bastante menores para producir los mismos efectos farmacológicos, sin embargo es menos eficaz que ésta, dado que presenta un efecto máximo menor que el de la morfina.

Potencia y eficacia de la buprenorfina en comparación a la morfina:

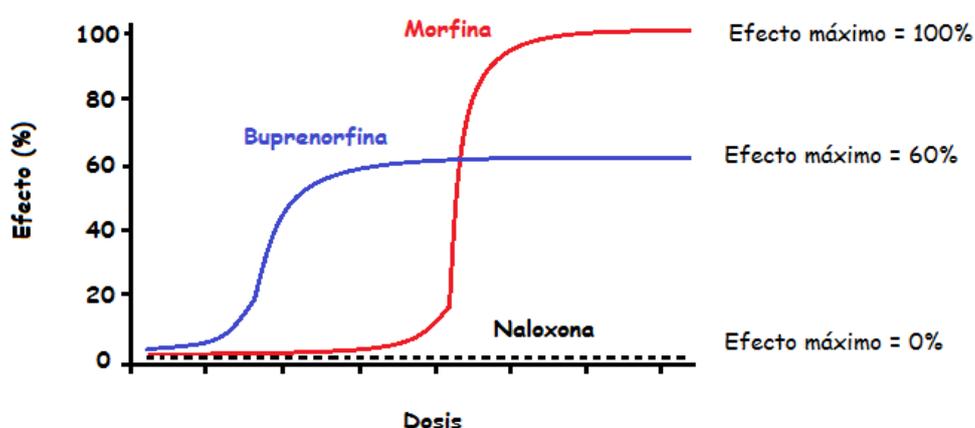


Figura 1. Comparación buprenorfina frente a morfina.

2.3.1 PROPIEDADES QUÍMICAS.

El nombre sistemático de la buprenorfina según la IUPAC es: (2S)-2-[-(-)-(5R, 6R, 7R, 14S)-9 α -ciclopropilmetil-4,5-epoxi-6,14-etano-3-hidroxi-6-metoximorfinan-7-il]-3,3-dimetil-2-butanol², y presenta la estructura que se muestra a continuación:

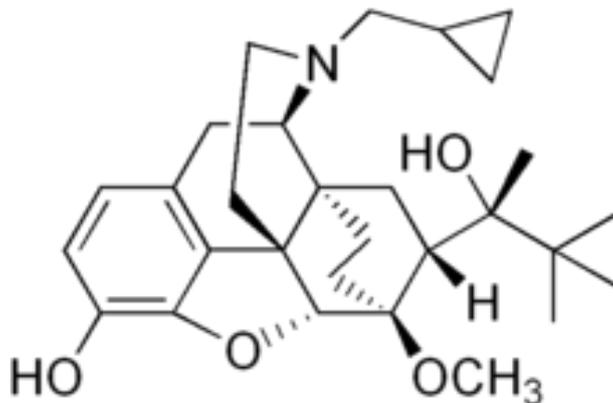


Figura 2. Estructura de la buprenorfina.

- Fórmula molecular: C₂₉H₄₁NO₄
- Peso molecular: 467,64 g/mol
- Punto de fusión: 218°C⁵.
- Solubilidad: Notable solubilidad en agua y disolventes apolares. Elevada liposolubilidad, conferida en parte por el grupo terbutilo que posee en el C-7.
- Pka: 8,31. Droga básica⁶.

2.3.2 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN:

La buprenorfina se puede administrar por vía oral, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Tras su administración oral, el fármaco se absorbe lentamente, observándose un pico en concentraciones plasmáticas a las 2 horas, mientras que si se hace por vía intravenosa, el máximo se observa aproximadamente a los 5 minutos. Administrada vía transdérmica se evita el metabolismo hepático de primer paso, lo cual permite controlar la velocidad de liberación del medicamento y proporciona concentraciones plasmáticas estables, evitando las concentraciones máximas y mínimas que caracterizan la administración oral o parenteral de medicamentos⁷.

La buprenorfina se une en un 96% a las proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente. Debido a su alta lipofilia es absorbida con rapidez en los tejidos ofreciendo un efecto analgésico de 6 a 8 horas para dosis moderadas, y entre 24 y 48 para dosis más elevadas (en el tratamiento de pacientes con dependencia).

2.3.3 FARMACOLOGÍA Y FARMACOCINÉTICA:

La absorción de la buprenorfina es alta sea cual sea la vía de administración. Administrada por sí sola o en presencia de dosis bajas de un agonista puro, potenciará los efectos analgésicos del éste, sin embargo en presencia de dosis más elevadas de agonista competirá por la unión a los receptores μ actuando como antagonista⁸. Por esta razón, se puede usar tanto para lograr un efecto analgésico moderado como para el tratamiento de adicción a otros opioides impidiendo la aparición del denominado síndrome de abstinencia.

La buprenorfina muestra ligeros efectos bradicárdicos e hipotensores y produce muchos de los efectos adversos que producen otros opiáceos: dolor de cabeza, náuseas, vómitos, sedación, estreñimiento, fatiga, etc. Además puede originar una depresión respiratoria dosis-dependiente con incidencia similar a la de la morfina, no obstante, que su eficacia máxima sea relativamente baja, nos proporciona un margen de seguridad significativo.

Tiene una vida media en el organismo de 2- 5 horas y se elimina del mismo en un periodo de entre 20-25 horas.

Según la bibliografía consultada⁹ el rango de concentraciones terapéuticas en sangre oscila entre 0,5 ng/mL y 7 ng/mL en la mayoría de los casos, siendo 0,67ng/mL la media, pero debido al potencial adictivo que posee el fármaco, también se han dado casos terapéuticos en que las concentraciones plasmáticas llegan a ser de hasta 30-40 ng/mL para pacientes habituados a su consumo. Se describen casos de niveles tóxicos a partir de 8-15 ng/mL con un rango muy variable que llega hasta cerca de 100 ng/mL, y encontramos casos letales por encima de 100 ng/mL (generalmente con niveles superiores a 140ng/mL).

2.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN:

La buprenorfina interacciona con los receptores opioides del sistema nervioso μ (como agonista o antagonista en presencia de otros agonistas) y κ (como antagonista). En ambos casos se trata de receptores extracelulares acoplados a proteínas G.

Cuando la buprenorfina actúa sobre los receptores μ , la proteína G interacciona con la adenil ciclasa haciendo que disminuya la concentración de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, y que se cierren los canales de Ca^{2+} dependientes de AMPc y se abran los de K^+ , provocando una disminución en la liberación de neurotransmisores relacionados con la transmisión del dolor, de forma que se reduce la intensidad tanto de la señal como del dolor.

Cuando la buprenorfina se une a los receptores κ , actúa como antagonista bloqueando su activación por otros opioides, que en otro caso, se unirían a estos receptores y reducirían la excitabilidad de la neurona afectando a la transmisión del impulso nervioso.

2.3.5 METABOLISMO Y ELIMINACIÓN:

La buprenorfina se metaboliza vía hepática. Principalmente se transforma en nor-buprenorfina por N- desalquilación por acción del citocromo P450. La nor-buprenorfina es un metabolito activo pero con tan sólo 1/4 de la potencia analgésica que presenta la buprenorfina⁹.

Tanto la buprenorfina como la nor-buprenorfina son metabolizadas (también en el hígado) por conjugación glucurónica a metabólicos inactivos, la mayor parte de estos metabolitos conjugados se excretan al intestino delgado vía biliar, donde la flora intestinal los hidroliza y finalmente son eliminados a través de las heces en su forma no conjugada. El resto de metabolitos se eliminan vía urinaria en su forma conjugada con muy poca cantidad de fármaco inalterado.

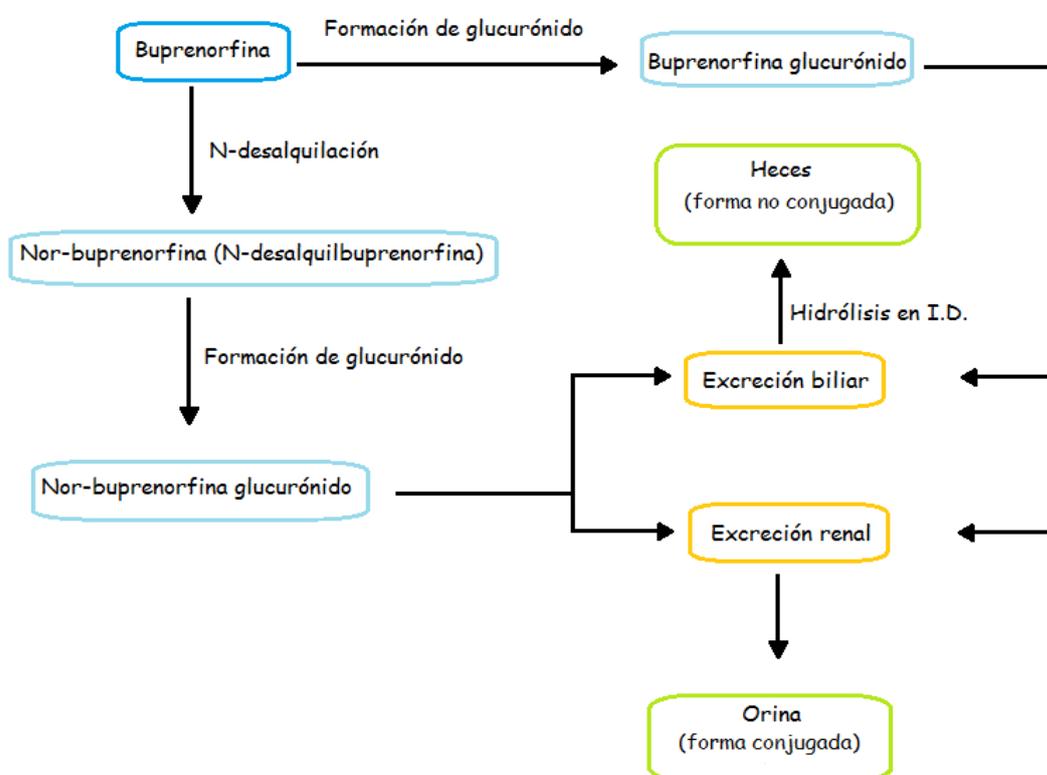


Figura 3. Esquema de la metabolización de la buprenorfina.

2.4 ANÁLISIS DE LA BUPRENORFINA EN MEDIOS BIOLÓGICOS:

Los análisis de drogas y sus metabolitos se pueden realizar en cualquier fluido y tejido biológico.

La orina siempre ha sido una de las muestras más empleadas junto con los análisis de sangre, aunque a día de hoy también se utilizan muestras de pelo, saliva, sudor y

otros fluidos y tejidos biológicos sólidos como matrices alternativas y complementarias a las anteriores. Cada una de estas matrices posee unas características determinadas que proporcionan diferente información, de forma que en función de lo que se esté buscando se escogerá una u otra.

El análisis de sangre es el único que permite extrapolar los valores correspondientes al mismo momento en que se recogieron las muestras, permitiendo así establecer una hipótesis sobre la concentración de la droga en el momento de interés y deducir el posible grado de afectación del individuo en un momento dado¹⁰.

2.4.1 USO DEL PLASMA COMO MATRIZ BIOLÓGICA:

La sangre es un medio idóneo para realizar análisis toxicológicos, también en el caso de la buprenorfina.

La sangre total está compuesta por dos fracciones bien diferenciadas: células sanguíneas (o elementos formes) y el suero sanguíneo. El plasma es la parte acuosa de la sangre a la que se le ha añadido un anticoagulante y para cuya obtención se han eliminado las células sanguíneas¹¹. Es equivalente al suero sanguíneo, solo que en el caso del suero no se añade anticoagulante, primero se permite la formación del coágulo y luego se elimina junto con las células sanguíneas tras un proceso de centrifugado. Por motivos técnicos muchas determinaciones se realizan con mayor facilidad en suero, aunque las concentraciones de la mayor parte de los analitos son las mismas en cualquiera de los dos elementos.

El plasma es una matriz compleja cuyo componente principal es el agua con un gran número de solutos disueltos y partículas en suspensión tales como proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, sales, hormonas, metabolitos, enzimas, anticuerpos, gases y productos de degradación.

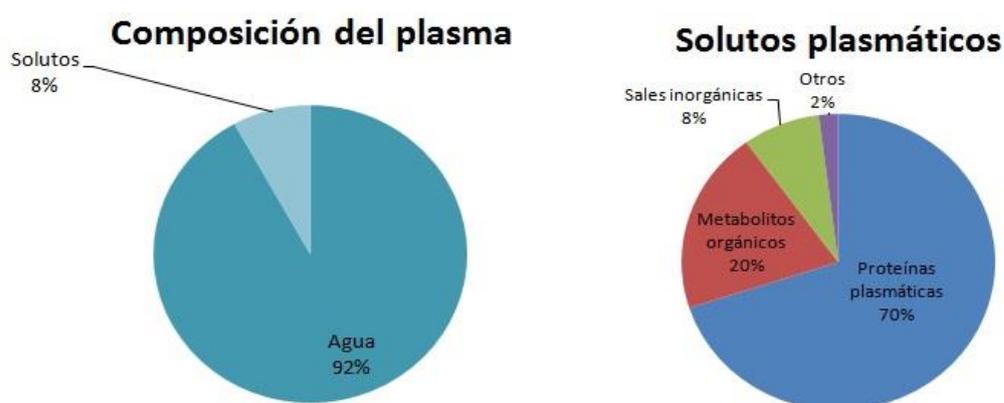


Figura 4. Composición del plasma sanguíneo.

Debido a la gran complejidad constitucional del plasma, es necesario realizar una separación del analito de su matriz antes de realizar su determinación a fin de disminuir la presencia de interferencias.

2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS:

2.5.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL):

La mayoría de los procesos de análisis para la determinación de un analito en una muestra biológica suele requerir una etapa de extracción para aislarlo de su matriz a fin de disminuir la presencia de interferencias debidas a la constitución de la propia matriz.

Los métodos más empleados en el campo de la toxicología forense son: la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME).

En la bibliografía consultada se describen múltiples métodos para extraer la buprenorfina de su matriz biológica ya sea orina, pelo, vísceras o plasma; mediante extracciones líquido- líquido (ELL) o en fase solida (SPE) (12, 13, 14, 15, 16, 17). A la vista de las diferencias entre los distintos métodos, se puede decir que no existe un método de extracción ideal o universal, por lo tanto para hacer una buena selección deben tenerse en cuenta los siguientes factores: naturaleza de la droga, farmacocinética y distribución de la droga y sus metabolitos, solubilidad en diferentes disolventes, tipo de técnica instrumental que se aplicará para sus posterior análisis y finalmente economía de reactivos.

Teniendo en cuenta estos factores, hemos decidido realizar la extracción de la buprenorfina con una extracción líquido- líquido simple. Este tipo de extracción es una de las técnicas de más empleadas para separar componentes de una mezcla y se basa en la repartición de un soluto entre dos fases no miscibles (generalmente una acuosa y otra orgánica). A una temperatura dada, la relación de concentraciones del compuesto entre ambos disolventes es constante, y se llama coeficiente de reparto, su valor determinará la eficacia de la extracción. Al principio el soluto se encontrará disuelto en uno de los disolventes, pero tras la extracción la mayor parte pasará al otro, como éstos no son miscibles, se formarán dos fases fácilmente distinguibles (la más densa se situará en la parte inferior) y luego se cogerá la fase de interés en la que tengamos nuestro soluto para seguir trabajando con ella.

2.5.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

CROMATOGRAFÍA DE GASES:

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una de las técnicas híbridas más utilizadas en el laboratorio analítico, esto es debido a que constituye una potente herramienta para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas¹⁸ con una excelente sensibilidad y selectividad.

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y una móvil que se mueve en una dirección determinada¹⁹.

A diferencia de otros tipos de cromatografía, en la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas químicamente inerte (gas portador) que solo cumple la función de transportar la muestra a través de la columna sin interactuar para nada con el analito. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido fijado en la columna cromatográfica, dando lugar a cromatografía gas-sólido y gas-líquido respectivamente. En el primer caso la fase estacionaria retiene los analitos por adsorción y el segundo el mecanismo de interacción es el reparto. La cromatografía gas-sólido tiene una aplicación limitada debido a que la adsorción no es lineal, es por ello que la cromatografía gas-líquido es más ampliamente utilizada.

Esta técnica presenta una elevada eficacia de separación, excelente reproducibilidad (sobre todo en cuanto a tiempos de retención se refiere) y tiene la ventaja de que necesita muy poca cantidad de muestra, lo que la hace una técnica idónea para el análisis de drogas.

Para que una sustancia pueda ser analizada adecuadamente mediante cromatografía de gases ha de ser volátil o transformable en un compuesto volátil (derivatización), estable a la temperatura de trabajo, de peso molecular inferior a 1000 g/mol y preferiblemente no iónica y poco polar.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo para la determinación de estructuras moleculares que, acoplada a la GC, es usada como sistema de detección. Los compuestos separados cromatográficamente, se inyectan en fase gaseosa en una cámara que se mantiene a elevado vacío en el que las moléculas pueden moverse libremente y son ionizadas en sus fragmentos como iones característicos. Una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a su relación masa-carga (m/z) y finalmente son detectados mediante un dispositivo adecuado, obteniendo así un espectro de masas que representará los diferentes tipos de iones en función de su relación masa-carga y su abundancia relativa. Este espectro de masas es como una huella dactilar del compuesto que permite identificarlo perfectamente.

2.5.2.1 INSTRUMENTACIÓN EN CROMATOGRFÍA DE GASES:

Componentes básicos de un cromatógrafo de gases:

- Fuente de gas portador y sistema neumático o electrónico para el control del flujo de gas.
- Sistema de inyección.
- Horno y columna cromatográficos.
- Sistema de detección.
- Sistema de adquisición de datos.

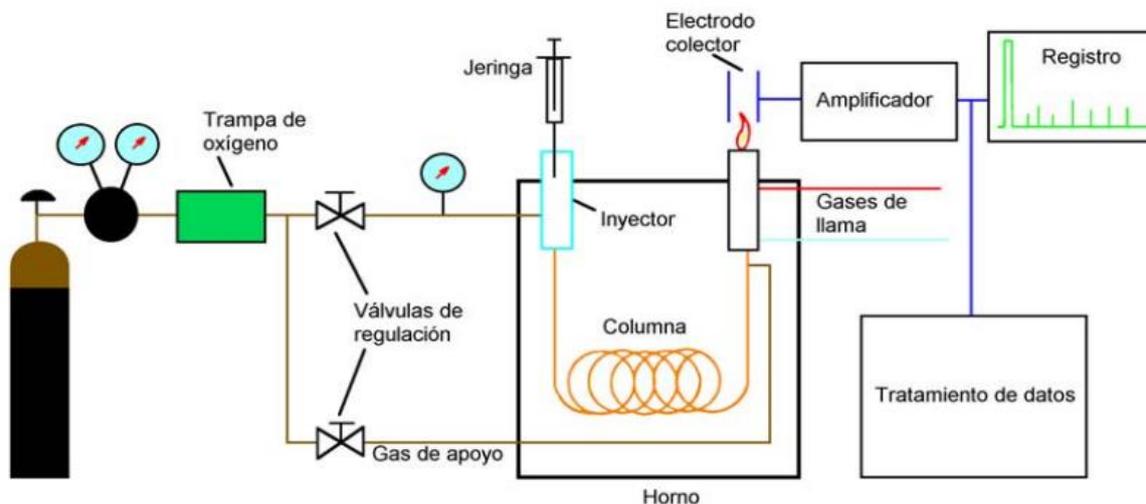


Figura 5. Esquema de un cromatógrafo de gases.

Gas portador:

Los gases portadores son químicamente inertes y no afectan a la separación, sin embargo influyen ligeramente sobre la velocidad óptima de la fase móvil y esto a su vez sobre el tiempo de análisis. Los más utilizados son el helio, el nitrógeno y el argón.

Inyector:

La eficacia de la columna requiere que la muestra sea de tamaño adecuado y que se introduzca como un “tapón” de vapor. La inyección lenta de muestras demasiado grandes da lugar a un ensanchamiento de bandas y una resolución pobre, y si son demasiado pequeñas puede que no lleguen a ser detectadas. Normalmente se suele emplear una micro-jeringa para inyectar la muestra a través de un séptum de goma en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna, que estará aproximadamente a unos 50°C por encima del punto de ebullición del compuesto menos volátil de la muestra²⁰.

El inyector más usado para columnas capilares es el inyector caliente Split/ Splitless que puede operar de dos modos diferentes:

- Modo Split: Con división de flujo, de forma que solo cierta cantidad de la muestra inyectada llega a la columna, el resto es expulsado a través de una válvula. Se usa para muestras puras (no disueltas) o para muestras en las que la concentración de analito es relativamente grande.
- Modo Splitless: Sin división de flujo. Toda la muestra que se inyecta llega a la columna. Se emplea con muestras diluidas o para detectar trazas de analito.

Horno:

Mantiene la columna termostata a una temperatura determinada y permite ir variando la temperatura a una velocidad prefijada y constante predeterminada por la programación, de manera que podemos controlar la retención de los analitos en

función de la temperatura. El rango de trabajo de un horno cromatográfico suele encontrarse entre la temperatura ambiente y unos 400°C- 450°C. En la práctica las condiciones de trabajo están determinadas por la sensibilidad de la fase estacionaria a la temperatura y presión.

Columna cromatográfica:

Las columnas de cromatografía de gases son unos tubos huecos delgados y con una longitud que va de 2 a más 50 metros en los que realiza la separación de los componentes de una muestra gaseosa. En su interior contienen una fase estacionaria con la que interaccionan los analitos quedando retenidos de manera selectiva.

Existen principalmente dos tipos de columnas:

- Columnas Rellenas: La fase estacionaria se deposita sobre partículas solidas que se encuentran llenando completamente el interior de la columna.
- Columnas abiertas o capilares: La fase estacionaria se deposita sobre las paredes internas del tubo. En la actualidad son las más empleadas ya que son más eficaces y rápidas.

Deben de estar fabricadas con materiales que resistan las temperaturas con las que se trabaja en el interior del horno, hoy en día suelen ser de acero inoxidable, vidrio, teflón o sílice fundida.

2.5.2.2. INTERFASE DE LA GC-MS:

El principal problema que se plantea a la hora de acoplar la cromatografía de gases con la espectrometría de masas es que la primera trabaja a una presión ligeramente superior a la atmosférica mientras que la otra trabaja bajo alto vacío, además de que la mayor parte del gas que sale del cromatógrafo es gas portador, de forma que si lo introducimos en el espectrómetro de masas directamente obtendríamos picos enormes para el gas portador y los correspondientes nuestra muestra serían casi invisibles en comparación. Ambos problemas se pueden solucionar fácilmente introduciendo un dispositivo de conexión intermedia (interfase) que sea capaz de acoplar las dos presiones y eliminar la mayor parte de gas portador. El extremo de la columna se introduce directamente en el interior de la fuente de iones dando lugar a una interfase directa. La mayor ventaja que presenta es que garantiza que toda la muestra entra en la cámara de ionización, el problema es que cuando hay que cambiar o limpiar la columna hay que romper el vacío y luego re alinear el extremo de la columna en la fuente, lo cual es un trabajo largo y tedioso.

2.5.2.3 INSTRUMENTACIÓN EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

Elementos principales de un espectrómetro de masas:

- Fuente de ionización.
- Analizador de masas.

- Detector de iones.
- Fuente de vacío.
- Ordenador: Controla tanto la adquisición como el tratamiento de datos.

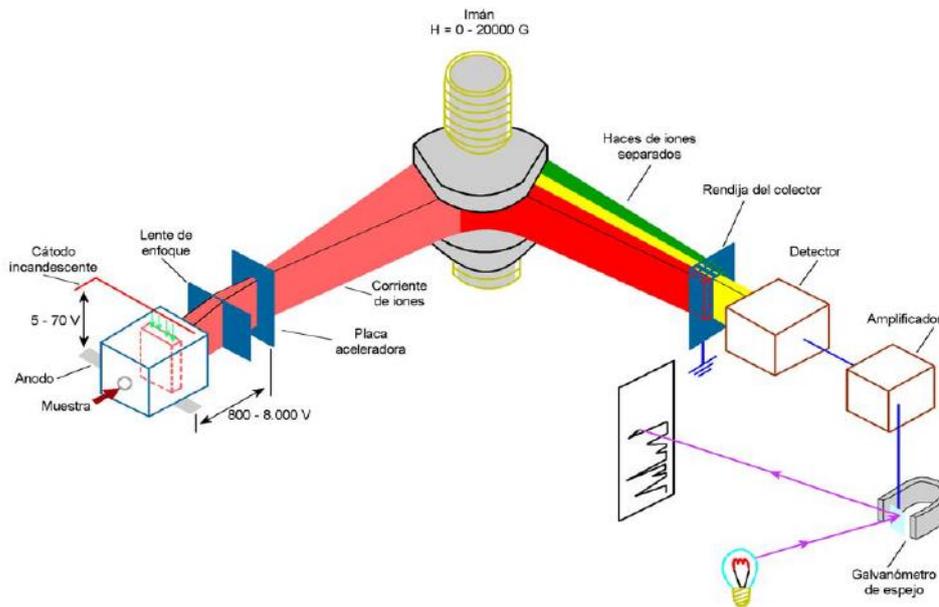


Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas.

Fuente de ionización:

Principalmente existen dos tipos de ionización: la química y la electrónica.

- Ionización por impacto electrónico (EI): Las moléculas de la muestra en estado gas son bombardeadas e ionizadas por un haz de electrones de alta energía. Cuando el haz de electrones colisiona con las moléculas se producen varios procesos que conducen a la formación de iones (especialmente de iones positivos por eliminación de un electrón) y se genera energía que provoca la fragmentación de la molécula en todos los iones positivos posibles, formados en mayor o menor abundancia en función de la estructura molecular de cada compuesto. Además al trabajar bajo alto vacío, las moléculas e iones no chocan entre sí y es posible separarlos, originando espectros de masas característicos para cada compuesto.
- Ionización química: El proceso de ionización química es bastante similar al de la ionización electrónica, lo único que variaría sería el agente ionizante, que en este caso serían iones.

Hoy en día, el método de ionización más empleado es el de impacto electrónico, en el que se trabaja con energías de ionización de 70 eV, ya que energías menores

producen pocos fragmentos dando lugar a espectros poco característicos y energías mayores generan excesivos fragmentos, haciendo que el ion molecular casi no aparezca y la información que nos proporcione sea insuficiente.

Analizador de masas:

Una vez ionizada la muestra y fragmentadas las moléculas, se emplea una placa cargada positivamente para repeler los iones y expulsarlos fuera del haz de electrones hacia el analizador de masas que los separará y analizará de forma individual. Los analizadores más utilizados para acoplar a CG son el de campo magnético y el analizador cuadrupolar.

- Analizador de masas de sector magnético: Cuando los iones abandonan la cámara de ionización llevan una cierta velocidad suministrada por el campo eléctrico al que han sido sometidos y que dependerá de su masa. Luego, se les aplica un campo magnético perpendicular al movimiento que llevan que les obligará a describir una trayectoria diferente dada por su relación m/z .
- Analizador de masas cuadrupolar: Está compuesto por cuatro rodetes dispuestos sobre una circunferencia, de forma que el haz de iones que sale de la cámara de ionización incide sobre el centro del dispositivo. Sobre estos rodetes, por pares alternos, se aplica una combinación de potenciales de radiofrecuencia (RF) y de corriente continua (DC) iguales pero de signo opuesto, que van variando de forma que solo permiten avanzar a los iones que tienen una relación m/z determinada, que serán los únicos que puedan atravesar el filtro del analizador por completo. En función del potencial aplicado a los pares de rodetes pasan unos iones u otros.

Estos últimos analizadores son muy veloces y pueden trabajar tanto en modo SIM (Selected Ion Monitoring) como en SCAN (modalidad de barrido de GC-MS), por lo que son ideales para acoplar con la técnica de CG. Este tipo de analizadores pueden trabajar en un rango que va desde 10 a 2000 m/z , aunque el rango de trabajo típico en CG está entre 10- 800 m/z .

Se trabaja en modo SIM cuando se conoce de antemano la sustancia que se va a determinar así como su espectro de masas, de forma que solo llegaran al detector los iones de la m/z que hayamos seleccionado y el resto se perderán en los rodetes, logrando así maximizar la sensibilidad.

Usaremos el modo SCAN cuando no sepamos que compuestos puede haber en una muestra, de forma que en vez de seleccionar iones determinados hacemos un barrido de iones de un amplio rango de masas, obteniendo un espectro que luego se compara con otros de la librería de espectros del equipo cromatográfico para identificar los compuestos que se hayan presentes en la muestra.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

En la actualidad la buprenorfina es ampliamente usada en el tratamiento de un gran número de pacientes, ya sea como analgésico o como terapia para tratar la adicción a otros opioides. Se cree que sus efectos adictivos son menores que los de la morfina, sin embargo debido a que el fármaco ha comenzado a utilizarse como droga de abuso (generalmente en combinación con otras drogas como cocaína, cannabis o alcohol) supone un riesgo para la población, habiendo llegado a darse numerosos casos de intoxicaciones y muertes relacionados con su consumo.

Dada la situación actual, el elevado número de pacientes que están siendo tratados con el fármaco y el enorme potencial del mismo como droga de abuso, es necesario desarrollar y optimizar un método validado para la determinación de esta sustancia en muestras biológicas.

Por estas razones, en el presente trabajo, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Desarrollo de una técnica de extracción líquido-líquido para aislar la buprenorfina de muestras plasmáticas con la mayor eficacia posible.
- Desarrollo y optimización de un método analítico que nos permita detectar y cuantificar esta sustancia en sangre mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Validación del método desarrollado para garantizar su reproducibilidad, sensibilidad y selectividad.

PROCEDIMIENTO
EXPERIMENTAL

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

4.1. MEDIOS EXPERIMENTALES

4.1.1 EQUIPOS:

- Agitador mecánico Reax 2000 (Heidolph®)
- Agitador mecánico con rotación (Selecta®)
- Cámara frigorífica.
- Campana de extracción.
- Centrífuga Mixtasel (Selecta®)
- Cromatógrafo de gases HP 6890 Series (Hewlett-Packard®)
- Espectrómetro de masas HP 5973 Network (Hewlett-Packard®)
- Estufa (Raypa®)
- Baño termostático EC 1 (VLM®)
- Ordenador HP 1702 (Hewlett-Packard®)

4.1.2 MATERIAL:

- Chupona.
- Frascos lavadores.
- Gradillas en Z.
- Insertos para el automático GC-MS.
- Jeringa de inyección de 10 µL HP (Hewlett-Packard®)
- Micropipetas automáticas (mirar capacidad) (Eppendorf®)
- Parafilm.
- Pipetas Pasteur (Brand®)
- Probeta de 10 mL.
- Reloj.
- Septum para el automático GC-MS.
- Tubos de vidrio con tapón
- Tubos de fondo cónico con tapón de vidrio.
- Vasos de precipitados de 25 y 50 mL
- Viales de vidrio tintado de 5 mL para guardar las disoluciones patrón
- Viales para GC-MS (automático)

4.1.3 REACTIVOS:

- Agua destilada.
- Agua mili-Q.
- BSTFA (Merck®).
- Disolución patrón de Buprenorfina en metanol de 1mg/mL (Cerilliant®).

- Disolución patrón de Buprenorfina-d4 (deuterada) en metanol de 1mg/mL (Cerilliant®).
- Hidróxido Sódico (Merck®)
- Metanol (Merck®)
- Plasma blanco.
- Tertbutil metil éter (Panreac®)
- TMCS (Merck®).

4.1.4 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO:

Patrones de Buprenorfina y de Buprenorfina-d4: En ambos casos, las disoluciones patrón de buprenorfina se prepararon a partir de disoluciones comerciales de 1mg/mL. Se trabajó con dos patrones, uno de 10 µg/mL y el otro de 1 µg/mL. Para prepararlos se cogieron respectivamente 10 µL y 1 µL de disolución comercial de buprenorfina de 1 mg/mL y se diluyó cada uno en 1mL de MeOH. Los patrones de buprenorfina-d4 se prepararon de la misma manera pero partiendo de la disolución comercial de buprenorfina-d4 de 1mg/mL.

Derivatizante: BSTFA/TMCS (99:1).

El derivatizante se preparó a partir de dos patrones comerciales de BSTFA y TMCS, cogiendo 990 µL de BSTFA y 10 µL TMCS para preparar 1 mL de disolución.

4.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA:

4.2.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

El primer paso para el desarrollo del método cromatográfico fue el establecimiento de las condiciones cromatográficas más adecuadas para analizar el compuesto, mejorando así tanto la calidad como el tiempo de análisis.^{13, 15, 16, 17, 18}

Las condiciones finalmente empleadas fueron:

INYECTOR:

La temperatura empleada fue de 250°C, con un tiempo de purga de 2 minutos (es decir, el gas portador no arrastra la muestra hasta pasados 2 minutos desde su inyección). Las inyecciones se realizaron en modo splitless (sin división de flujo).

COLUMNA CROMATOGRÁFICA:

La columna empleada ha sido una columna capilar HP-5 de 30 m de longitud y 250 µm de diámetro interno, recubierta interiormente por una capa de fenilmetilsiloxano al 5% como fase estacionaria. Como gas portador se ha utilizado Helio, con un flujo de 1,8mL/min.

HORNO:

Para conseguir una buena resolución cromatográfica entre picos, se necesita aplicar un programa de temperaturas, ya que un método de temperatura constante no proporcionaría buenos resultados. Tras probar varios diferentes, se estableció el siguiente programa de temperaturas:

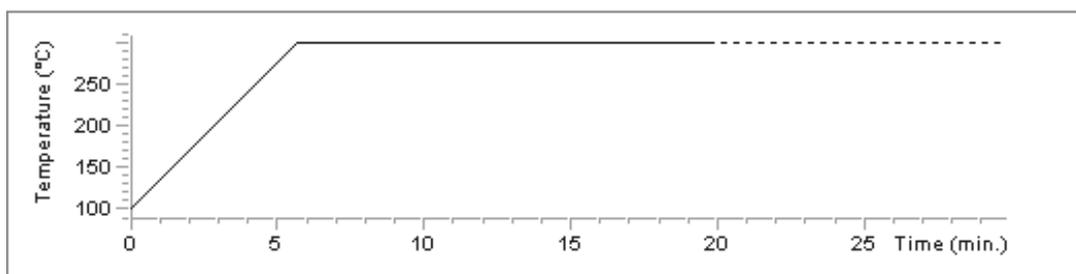


Figura 8. Programa de temperaturas.

El programa, comienza a 100°C y rápidamente se incrementa hasta 300°C a razón de 35°C/min, esta temperatura final se mantiene durante 14 minutos. Finalmente se mantiene una temperatura de 300°C durante 10 minutos para favorecer la limpieza de la columna. La buprenorfina sale a 17,15 minutos, mientras que la buprenorfina-d4 sale en el minuto 17,05. El tiempo total del cromatograma es de 19,71 minutos.

DETECTOR:

El detector selectivo de masas, se mantuvo a una temperatura constante de 320°C, que usaba el impacto electrónico con una energía de 70 eV como método de ionización de la muestra y un analizador cuadrupolar como analizador de masas.

Primero, hemos inyectado el patrón de buprenorfina derivatizado y hemos operado con el método SCAN para identificar nuestro compuesto. Cuando el detector trabaja en este modo, realiza un barrido de masas con un rango de entre 50 y 550 m/z, con una velocidad de barrido de 1,5 scans/s y un tiempo de parada en cada masa de 100ms. Esto nos permitió conocer el espectro de masas de la buprenorfina, y el de la buprenorfina-d4, con los iones más representativos de cada compuesto.

Posteriormente, una vez identificados los compuestos, se trabaja con el modo SIM, en el que elegimos los iones de mayor abundancia. En el caso de la buprenorfina son: **450 m/z**, 482 m/z y 506 m/z. Y en el de la buprenorfina-d4: **454 m/z**, 486 m/z y 510 m/z.

El modo de trabajo empleado se seleccionará en función de la naturaleza y objetivo del análisis. Cuando el detector trabaja en modo SCAN se realiza un barrido por un rango de valores masa/carga (modo de barrido total o de ión múltiple). El tiempo invertido en realizar un barrido de masas/carga entre 50 y 550 es menor de un segundo (1.5 scans/seg), con un tiempo de parada en cada masa de 100 mseg. Las repeticiones constantes de estos barridos proporcionan información sobre las masas de todos los compuestos que llegan al detector de masas. El modo SCAN es apropiado para el análisis de compuestos desconocidos y para conocer también sus tiempos de retención. El modo SIM (modalidad de ión único) aumenta en gran medida la sensibilidad de la detección, ya que se monitorizan un número reducido de iones. Se eligen aquellos iones de mayor abundancia para los compuestos (siempre que sea posible, ya que a veces surgen incompatibilidades o coincidencias). Además, en el modo SIM es mucho menor el ruido de fondo provocado por impurezas de la columna.

Así pues, este trabajo se ha desarrollado trabajando con el modo SIM, aumentando así la sensibilidad de detección del compuesto analizado.

4.2.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN:

Dado que las matrices biológicas son muy complejas, necesitamos extraer nuestro analito con la mayor eficacia y rendimiento, disminuyendo en lo posible las interferencias.

Para extraer la buprenorfina de su matriz plasmática, hemos empleado una extracción líquido-líquido debido a su sencillez, rendimiento, economía y eficiencia.

Se han llevado a cabo diversas pruebas con diferentes disolventes para elegir el mejor a la hora de extraer la buprenorfina del plasma. Tras probar 4 disolventes: una mezcla de tolueno/acetato de etilo en relación (9:1), acetonitrilo, diclorometano y tertbutil metil éter (los 3 primeros encontrados en la bibliografía ^{13, 17, 18}), se comprobó que el que mejores resultados ofrecía era el Tertbutil metil éter, por lo que, finalmente, fue el disolvente seleccionado para llevar a cabo nuestro trabajo.

Para hacer la extracción, en un tubo de vidrio con tapón añadimos 1mL de plasma, 20µL de patrón interno de buprenorfina deuterada de concentración igual a 10µg/mL y 20µL de NaOH 2M. Se agita la mezcla brevemente y se comprueba que el pH esté sobre 10. Luego se le añaden 5mL de Tertbutil metil éter y se agita en un agitador mecánico con rotación durante 20 minutos para extraer los analitos hacia la fase orgánica.

Tras este tiempo se centrifuga la mezcla durante 10 minutos a 4000 r.p.m. para separar la fase orgánica de la acuosa. Ayudándonos de una pipeta Pasteur, transferimos la fase orgánica a un tubo de vidrio de fondo cónico y evaporamos el disolvente en seco. Esta evaporación tiene lugar en un baño termostático a 40°C y bajo corriente de nitrógeno.

El procedimiento de extracción se puede ver en el siguiente esquema:

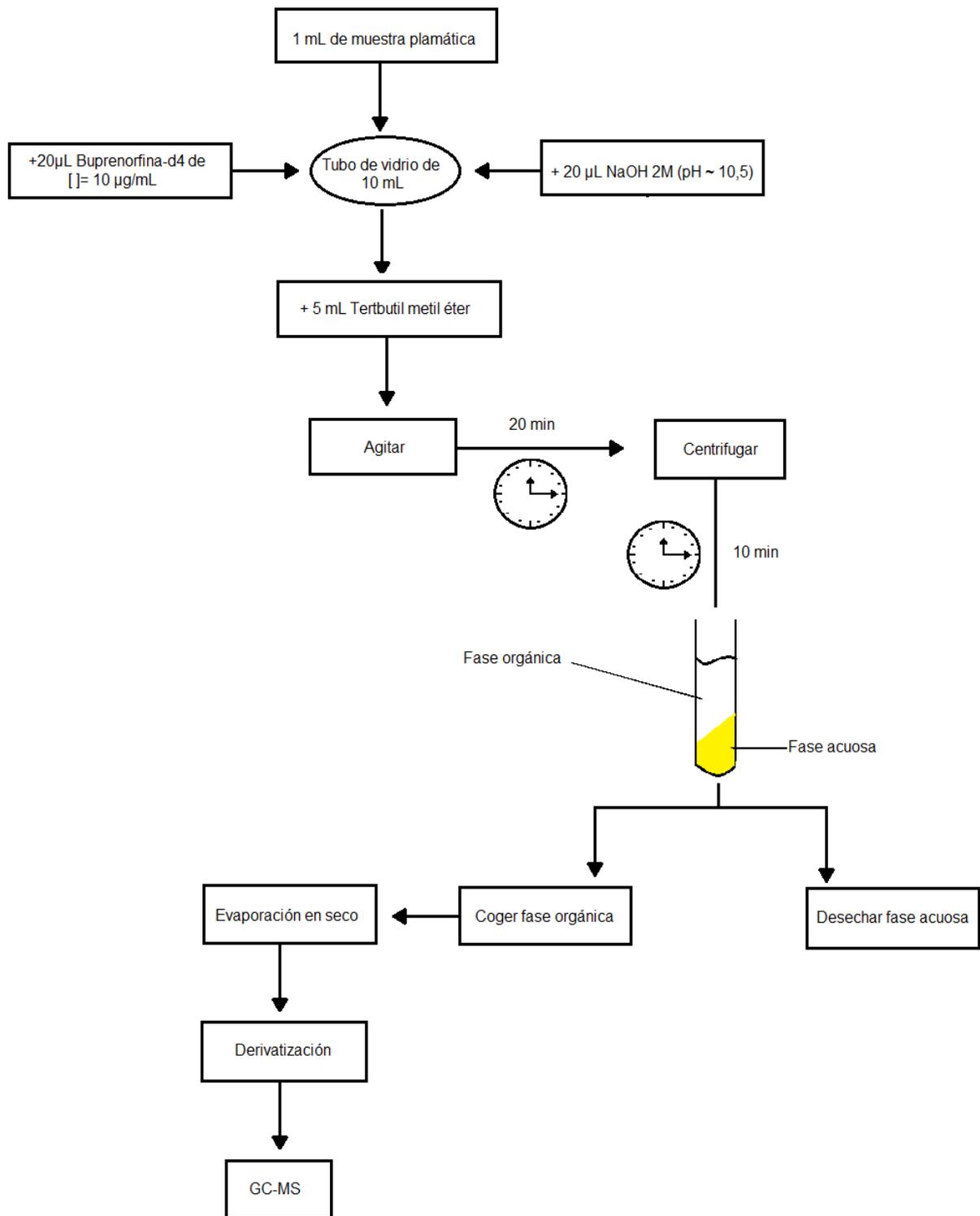


Figura 9. Esquema de extracción.

4.2.3 DERIVATIZACIÓN:

En muchas ocasiones para poder analizar una sustancia por GC es necesario derivatizarla antes con el fin de aumentar su volatilidad. Algunos agentes sililantes tales como el BSTFA, TMCS o el MSTFA son perfectos para este propósito, gracias a su capacidad para reaccionar con un amplio espectro de grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo, amino...). Además tras la derivatización no es necesario eliminar el exceso de reactivo antes de introducir la muestra en el cromatógrafo, aunque la derivatización ha llevarse a cabo en condiciones anhidras debido a la elevada sensibilidad de estos reactivos al agua.

El derivatizante empleado en este caso es una disolución de BSTFA con un 1% de TMCS.

Después de llevar a cabo el proceso de extracción y tras la evaporación del disolvente, derivatizamos la muestra añadiendo 40 µL de BSTFA/TMCS (99:1), luego, tapamos el tubo con un tapón de vidrio y lo introducimos en la estufa a 100°C durante 20 minutos.

La reacción que tiene lugar durante este proceso es la siguiente:

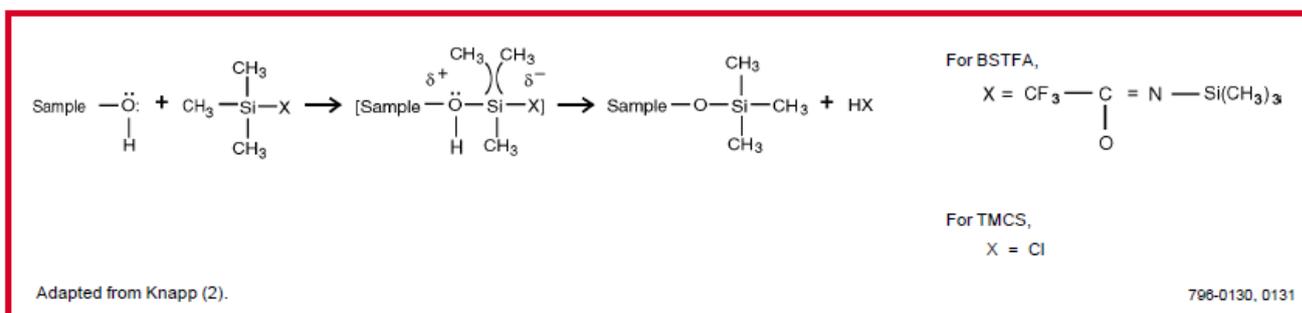


Figura 10. Reacción de derivatización²².

Una vez derivatizada la muestra, se coge 1µL de muestra y se inyecta en el cromatógrafo para ser analizada.

4.3 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA:

Para poder asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos con cualquier método, es necesario llevar a cabo una puesta a punto y validación del mismo, es decir, corroborar que el método proporciona resultados fiables dentro de un margen de error preestablecido y que es adecuado para el fin que se persigue.

Para ello, hemos de demostrar que cumple una serie de requerimientos o parámetros de calidad que explicaremos a continuación.

4.3.1. SELECTIVIDAD:

La selectividad se define como la capacidad de un método para diferenciar y cuantificar un determinado analito en presencia de otros componentes en una muestra.

Para evaluar la selectividad del método deben analizarse, por lo menos, 6 muestras blanco de distinta procedencia. Con esto se pretende demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco de nuestra matriz biológica, en este caso, plasma, para garantizar que no vamos a tener interferencias en nuestras determinaciones²³.

4.3.2 SENSIBILIDAD: LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La sensibilidad de un método analítico mide su capacidad para detectar un cambio mínimo en la concentración de un analito. La sensibilidad de un método se evalúa mediante los límites de detección (LOD) y cuantificación (LLOQ).

- **Límite de detección (LOD):** El límite de detección se define como la mínima concentración de analito que podemos detectar, es decir el nivel más bajo detectable (no cuantificable). Para un nivel de confianza dado, el LOD, debe ser estadísticamente diferente de la muestra blanco. Para hallar el límite de detección se realiza un análisis de una serie de muestras de concentraciones conocidas y decrecientes hasta hallar la mínima concentración detectable. Para que el límite de detección sea válido, la señal proporcionada por esta concentración, ha de ser, por lo menos, 3 veces mayor que la línea de base (ruido).

$$LOD = \frac{3S}{b}$$

Donde S es la desviación estándar del blanco y b la pendiente de la curva de calibrado.

- **Límite de cuantificación (LLOQ):** El límite de cuantificación puede definirse como la mínima concentración de analito con la que se pueden realizar determinaciones cuantitativas. Es el punto más bajo en la recta de calibrado y la respuesta del analito en el LLOQ debe ser, por lo menos, 10 veces mayor que la respuesta del blanco (que la línea de base). Además la respuesta del analito debe ser identificable y reproducible con una precisión de mínimo el 20% y una exactitud de entre 80%-120%²².

$$LLOQ = \frac{10S}{b}$$

Donde S es la desviación estándar del blanco y b la pendiente de la curva de calibrado.

4.3.3 LINEALIDAD:

Para que un método sea válido, es necesario que proporcione una respuesta lineal en el intervalo de trabajo con el fin de asegurar que los resultados que se derivan del análisis proporcionan información real.

La linealidad mide el grado en que la respuesta analítica, respecto a la concentración del analito, se ajusta a una función lineal²⁴.

Dentro de la linealidad se incluye la proporcionalidad entre concentración de analito y la señal obtenida, así como el rango de concentraciones de analito para el cual el método es capaz de proporcionar buenos resultados.

De acuerdo con la bibliografía consultada⁹, las concentraciones terapéuticas en plasma, normalmente oscilan entre 3-7ng/mL, pero con un rango muy variable (casos de 30-40ng/mL en algunos pacientes habituados). Nosotros hemos seleccionado que nuestro método empiece en torno a 10 ng/mL (LOD) aunque exista un pequeño gap entre los niveles terapéuticos y tóxicos. Esto es debido a que las concentraciones terapéuticas varían mucho en función de los casos y la bibliografía que se consulte y porque además la mayoría de casos tóxicos son de concentraciones mayores, en torno a 100 ng/mL (80, 100, 140...), que en un laboratorio de toxicología forense será con lo que más se trabaje.

Para el estudio de la linealidad, hemos trabajado con varias curvas de calibrado para el analito en plasma blanco (sin buprenorfina).

Se debe trabajar con un mínimo de 5 puntos de concentraciones ascendentes (incluyendo el LLOQ) además de un blanco. Nosotros hemos empleado 8 puntos en total: un blanco y siete de concentraciones que se hallan incluidas en un rango que va de 0-200 ng/mL.

Hemos hecho 7 rectas de calibrado en diferentes días para mediar la linealidad (ensayos interdía).

El calibrado se realiza en base a la relación de áreas de los picos cromatográficos proporcionados por el analito y el patrón interno (en este caso buprenorfina y buprenorfina-d4 como patrón interno).

Concentración Buprenorfina (ng/mL)	Concentración Patrón Buprenorfina (µL/mL)	Volumen patrón Buprenorfina (µL)	Volumen patrón Buprenorfina-d4 de []= 10µg/mL (µL)	Volumen Plasma (mL)	Volumen Tertbutil metil éter (mL)
0	-	-	20	1	5
40	1	40	20	1	5
50	1	50	20	1	5
60	1	60	20	1	5
80	1	80	20	1	5
100	10	10	20	1	5
150	10	15	20	1	5
200	10	20	20	1	5

Tabla 1. Datos para las rectas de calibrado.

Una vez obtenidos los datos experimentales para determinar la curva de calibrado, se hace un análisis de la regresión por mínimos cuadrados con el fin de ajustar nuestros datos a una recta del tipo de:

$$y = a + bx$$

Donde a es la ordenada en el origen; b es la pendiente de la recta; y es el valor de la respuesta; y x es el valor de la concentración de analito.

4.3.4 EXACTITUD, PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN:

- Exactitud:** La exactitud de un método analítico se describe como la proximidad del valor analítico al valor real. Para evaluar la exactitud del método, se hacen análisis de replicados de muestras que contienen cantidades conocidas de analito. Para medir la exactitud de un método, deben hacerse un mínimo de 5 determinaciones para un mínimo de 3 concentraciones dentro del rango elegido para la recta, normalmente se cogen el LLOQ, el límite de cuantificación superior (ULOQ, punto alto de la recta de calibrado), y un punto de concentración intermedia²³

Para el cálculo de la exactitud se emplea el parámetro de error medio relativo (expresado en porcentaje), que viene dado por la siguiente fórmula:

$$Er = \left| \frac{\bar{x} - x_i}{x_i} \right| \times 100$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_0^n x_i}{n}$$

Siendo: \bar{x} valor de la media, x_i cada una de las muestras individuales y n el numero de medidas realizadas.

Como criterio de validación, el error medio relativo debe ser menor o igual al 15% con respecto al valor real (excepto en el caso del LLOQ que no debe superar el 20%)²³.

- Precisión:** La precisión describe la reproducibilidad de los resultados, es decir, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. Siempre que se realizan varias mediciones para una misma muestra, se producen errores aleatorios, que provocan cierta variabilidad entre los datos obtenidos. La precisión viene dada por la dispersión entre estos valores y es una forma de medir dichos errores.

Debe medirse haciendo un mínimo de 5 réplicas para cada nivel de concentración de un mínimo de 3 concentraciones diferentes dentro del rango de la curva de calibrado (LLOQ, ULOQ, y un punto medio).

La precisión se evalúa mediante el coeficiente de variación (CV), cuya fórmula se muestra a continuación:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Siendo: \bar{x} valor de la media, x_i cada una de las muestras individuales y n el número de medidas realizadas.

La precisión calculada a cada nivel de concentración no debe superar el 15% del CV (con excepción del LLOQ, que no debe exceder el 20% del CV) ²³.

Tanto la exactitud como la precisión se deben evaluar mediante ensayos intradía para evaluar la repetitividad, es decir, bajo las mismas condiciones de operación y en un intervalo corto de tiempo; y mediante ensayos interdía (a lo largo de diferentes días), lo que permite evaluar las variaciones dentro de un laboratorio y garantizar la reproducibilidad del método.

- **Recuperación:** La recuperación o rendimiento de extracción, nos proporciona una idea sobre la eficacia de la extracción, es decir, de la cantidad de analito que somos capaces de extraer de la matriz con nuestro método.

La recuperación viene dada por la proporción entre la respuesta del detector a una concentración de analito dada añadida a la matriz biológica y luego extraído; y la respuesta del detector para la verdadera concentración de la sustancia añadida tras el proceso de extracción²³.

Para medirla, se eligen dos concentraciones (una alta y otra baja) y se analizan por quintuplicado. Los resultados obtenidos, se comparan con un valor que representa el 100% de extracción, que se corresponde con el medido al añadir la misma concentración de analito después de la extracción.

En nuestro caso, para cada concentración de buprenorfina, se cogieron 10 muestras de plasma, a 5 de ellas se les añadió tanto la droga como el patrón interno deuterado (buprenorfina- d4); mientras que a las otras 5 solo se le añadió el patrón interno.

Tras realizar el proceso de extracción y la evaporación del disolvente para todas las muestras, las 5 muestras a las que ya se les había añadido droga previamente fueron derivatizadas e inyectadas en el cromatógrafo de gases. A las otras 5, se les añadió la cantidad exacta de droga disuelta en metanol y se volvió a evaporar para lograr la concentración máxima y luego fueron igualmente derivatizadas e inyectadas en el cromatógrafo.

El cálculo de la recuperación se hizo en base a las relaciones de áreas entre analito y patrón interno, comparando las de las muestras extraídas con las muestras no extraídas (que representaban el 100%).

RESULTADOS

5. RESULTADOS:

5.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS:

La identificación de los compuestos se ha realizado a partir de sus tiempos de retención y de sus espectros de masas.

Para identificar los compuestos, se realizaron inyecciones de los patrones de buprenorfina y buprenorfina-d4 para determinar sus tiempos de retención y espectros de masas, primero en modalidad SCAN (barrido) y luego en SIM (Selected ion monitoring) cuando ya hayamos determinado los iones identificadores de cada compuesto. Para ello, en dos tubos de fondo cónico, se cogieron 20 μL de cada patrón de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, luego, ambos se evaporaron en seco bajo corriente de N_2 a 40°C y una vez evaporado el disolvente, se derivatizaron con 40 μL de BSTFA-TMCS (99:1) cada uno y se metieron en la estufa 20 minutos a 100°C.

Una vez derivatizados, se inyectaron en el cromatógrafo para obtener los correspondientes cromatogramas y espectros de masas (figuras 10, 11 y 12), en los que nos hemos basado para seleccionar los iones cuantificadores y cualificadores de cada especie y seguir desarrollando el método.

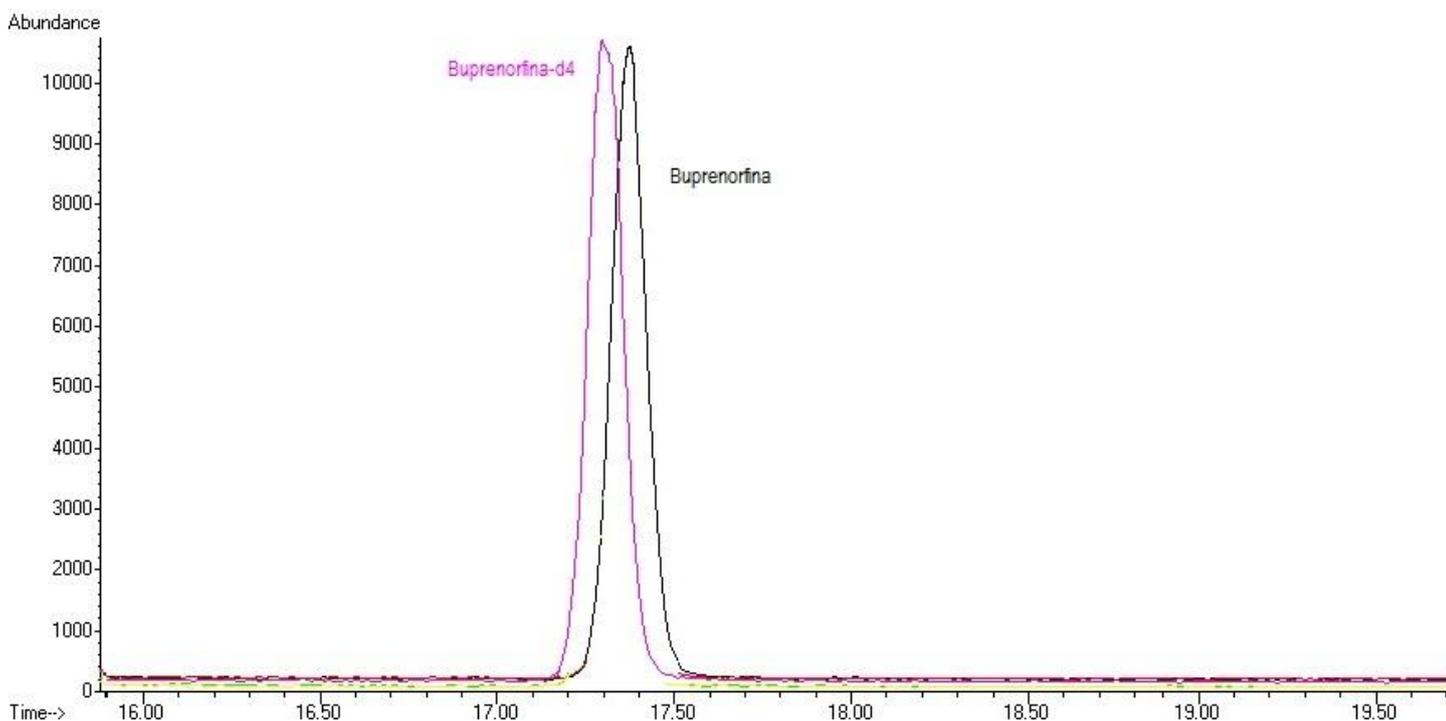


Figura 10. Cromatograma de la buprenorfina y la buprenorfina-d4.

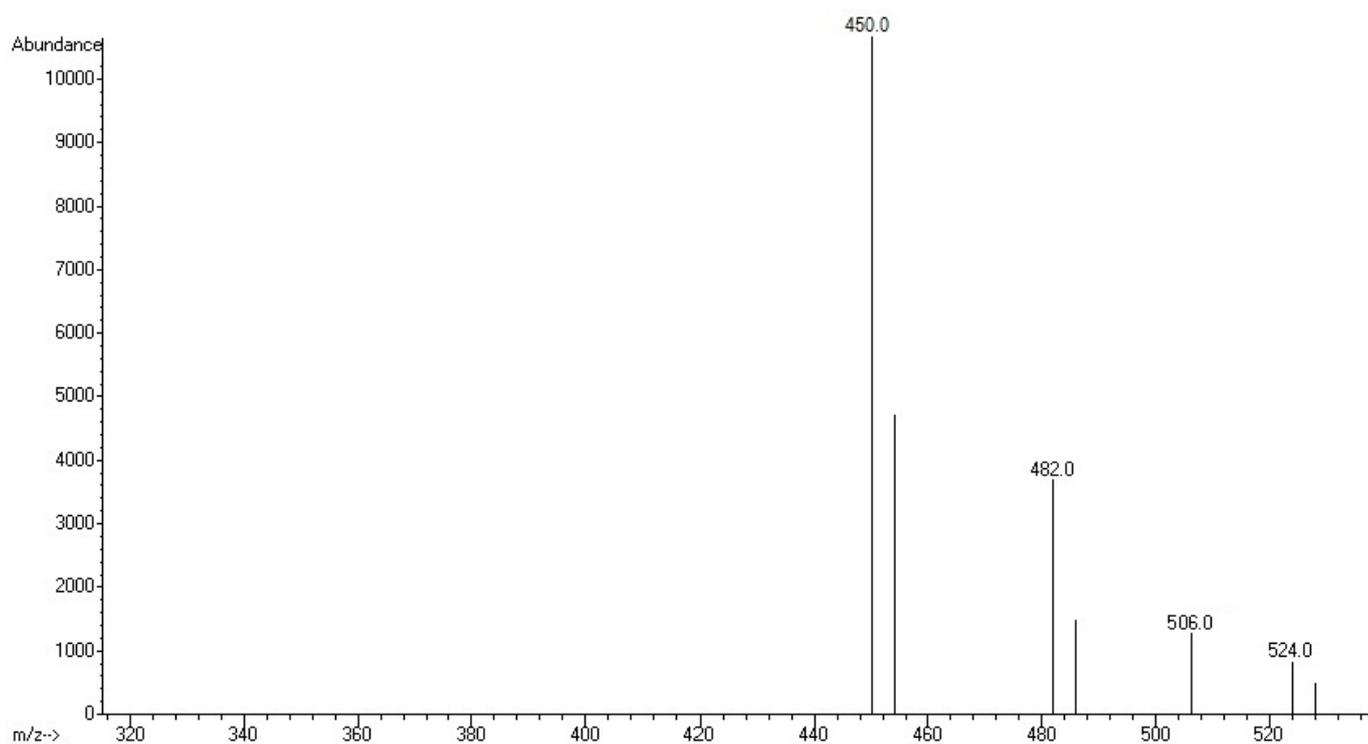


Figura 11. Espectro de masas de la buprenorfina.

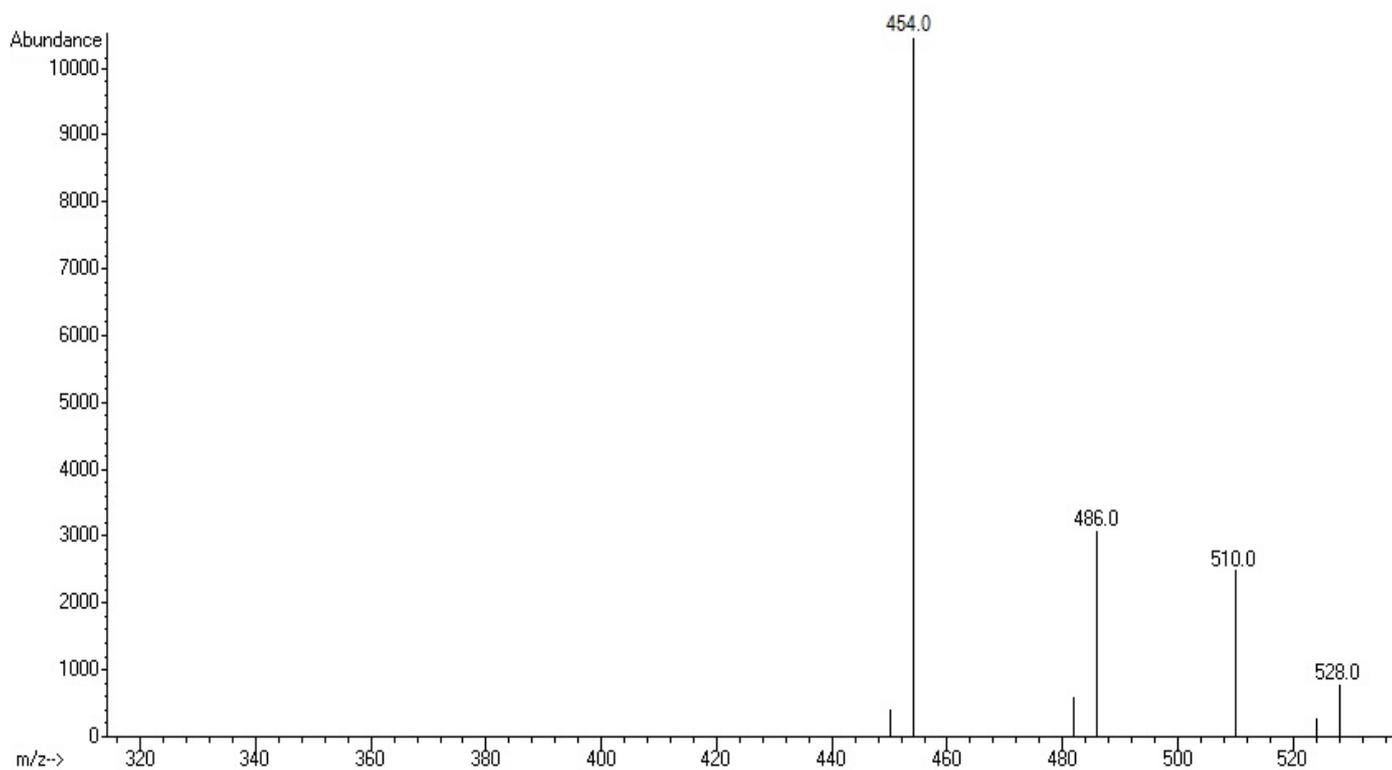


Figura 12. Espectro de masas de la buprenorfina deuterada.

Como se puede observar en la figura 10 con el método cromatográfico empleado se ha obtenido una buena separación, los picos aparecen resueltos en el cromatograma, lo que nos ha permitido la monitorización de los iones a partir del espectro de masas y operar luego en modalidad SIM.

La buprenorfina aparece a 17,15 minutos y la buprenorfina-d4 a 17,05 minutos. La razón de que los tiempos de retención de los dos compuestos sean tan próximos, se debe a que la sustitución de hidrógenos por deuterio no altera sus propiedades físico-químicas, por lo que será prácticamente igual que la buprenorfina en todo a excepción del peso molecular, lo cual nos facilitará la identificación del analito a la hora del análisis de muestras plasmáticas.

Para cada compuesto se tomó como ion cuantificador el más abundante, debido a que son éstos los que mayor sensibilidad proporcionan (450 m/z para la buprenorfina y 454 m/z para su análogo deuterado).

En función de los datos obtenidos en los espectros, se han decidido tomar los iones recogidos en la siguiente tabla para la identificación de cada compuesto:

Compuesto	Ion cuantificador (m/z)	Iones cualificadores (m/z)	Tiempo de retención (minutos)
Buprenorfina	450	482, 506	17,15
Buprenorfina-d4	454	486, 510	17,05

Tabla 2. Iones cuantificadores y cualificadores.

Una vez determinados los iones identificadores de cada compuesto, procedemos a trabajar en modalidad SIM, que nos permite disminuir las interferencias y mejorar la sensibilidad.

5.2 VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA:

5.2.1 SELECTIVIDAD:

Tras realizar varios análisis de diferentes muestras blanco de plasma de distinta procedencia, se ha comprobado la ausencia de interferencias en los tiempos de retención de los analitos.

A continuación se muestra un ejemplo de un cromatograma de una muestra blanco a la que se le ha añadido patrón interno con el fin de facilitar la localización de la buprenorfina.

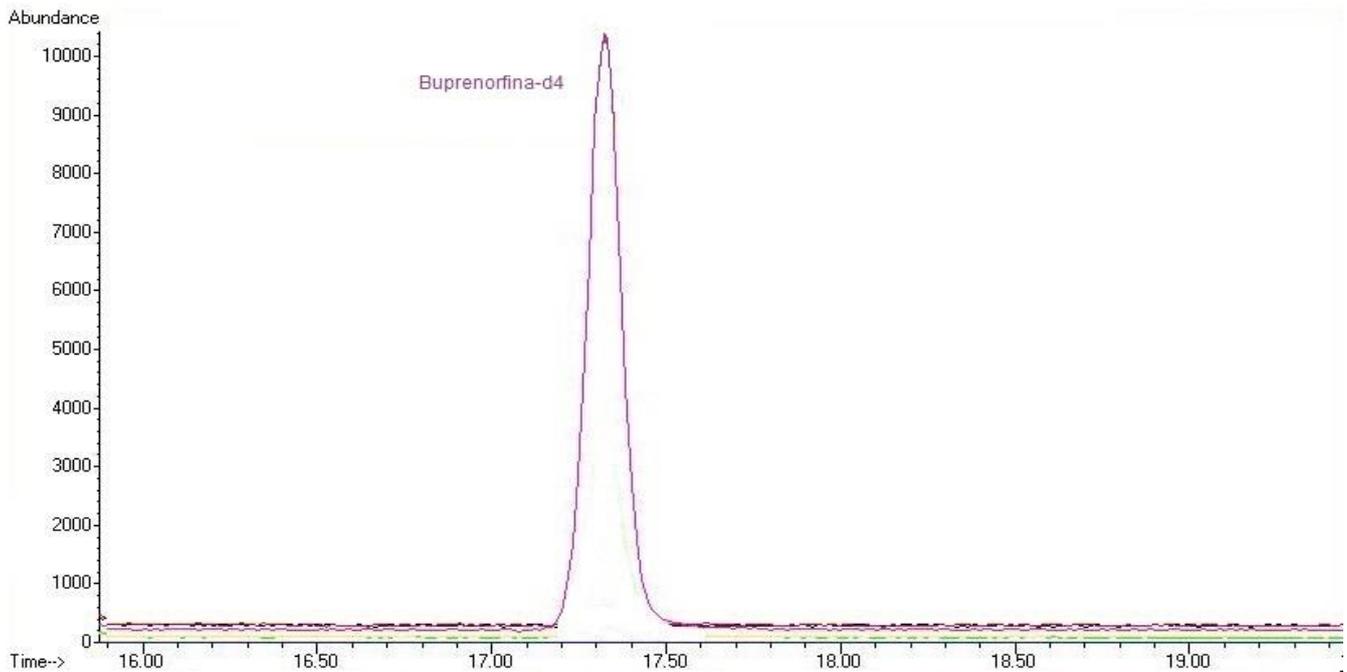


Figura 13. Cromatograma de una muestra de plasma blanco.

Como se puede observar, solo aparece el pico del patrón interno que hemos adicionado. Buscando el compuesto mediante la introducción sus iones característicos en modo SIM, comprobamos que la muestra está exenta de compuestos que puedan interferir con la determinación de la buprenorfina en su tiempo de retención, por tanto podemos concluir que el método es selectivo a la hora de trabajar con muestras plasmáticas.

5.2.2 SENSIBILIDAD:

La sensibilidad del método fue evaluada mediante el cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LLOQ). Su cálculo se realizó mediante el análisis de muestras de plasma blanco a las que se les añadió patrón deuterado en concentraciones conocidas y decrecientes, luego se les aplicó el proceso de extracción y finalmente fueron analizadas mediante nuestro método por GC-MS.

Para que el LOD y el LLOQ sean válidos, sus señales han de ser respectivamente 3 y 10 veces mayor que la línea de base (como mínimo). Para calcularlos se han empleado las siguientes ecuaciones:

$$LOD = \frac{3S}{b}$$

$$LLOQ = \frac{10S}{b}$$

En donde S representa la desviación estándar del valor medio de la señal de los blancos y b la pendiente de la recta de calibrado.

Los resultados obtenidos para dichos parámetros se recogen en la siguiente tabla:

Analito	Desviación estándar del blanco (S)	Pendiente recta calibrado (b)	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
Buprenorfina	0,014	0,004	10	40

Tabla 3. Límites de detección y cuantificación para la buprenorfina.

5.2.3 LINEALIDAD:

La linealidad de la respuesta se evaluó empleando 7 rectas de calibrado hechas en diferentes días y elaboradas a partir de 8 niveles de concentración crecientes de buprenorfina entre 0 y 200 ng/mL.

Para establecer la linealidad se estudió la respuesta del aparato, definida por el área del pico cromatográfico según la concentración de buprenorfina empleada. Las curvas de calibrado fueron representadas gráficamente por la relación de áreas (cociente entre el área del pico cromatográfico del ion cuantificador de la buprenorfina y el área del de su análogo deuterado) en función de la concentración.

En la siguiente figura se muestra un cromatograma del nivel de concentración 150 ng/mL, que ilustra la diferencia entre las áreas de los picos cromatográficos de los iones cuantificadores de cada compuesto, en función de los cuales se calculará la relación de áreas necesaria para elaborar la recta de calibrado. (Figura 14)

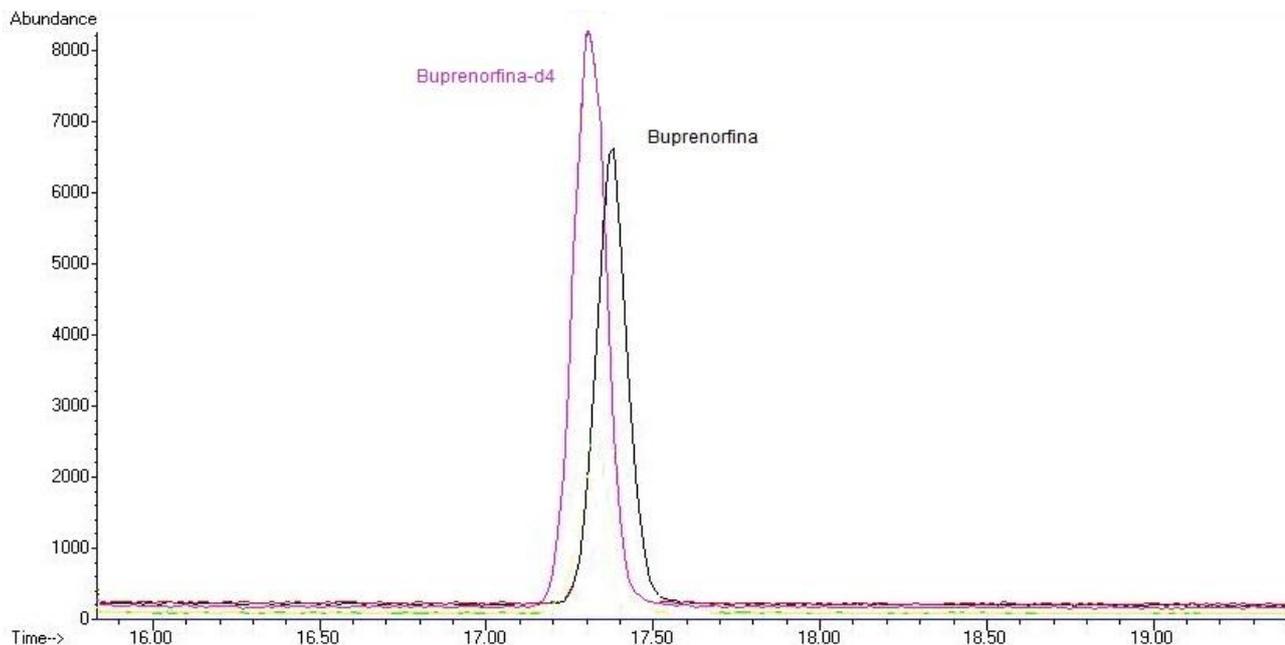


Figura 14. Cromatograma del nivel de concentración de 150ng/mL.

A continuación se muestran los resultados de las medias de las relaciones de áreas y las concentraciones empleadas para realizar la recta de calibrado:

Concentración Buprenorfina (ng/mL)	Concentración de Buprenorfina-d4 (ng/mL)	Relación de áreas
0	200	0
40	200	0,2
50	200	0,25
60	200	0,3
80	200	0,4
100	200	0,5
150	200	0,75
200	200	1

Tabla 4. Concentraciones y relación de áreas empleadas para la recta de calibrado.

Los datos obtenidos se someten a un análisis estadístico mediante regresión por mínimos cuadrados y se define el coeficiente de correlación r^2 que refleja el ajuste de los datos experimentales al modelo lineal (en todos los casos ha sido superior a 0,99, lo cual significa una buena adecuación al modelo lineal). En la tabla 4 se muestra el resultado del análisis de regresión y en la figura 15 la recta de calibrado obtenidas por este método para la buprenorfina en plasma.

Analito	a	b	R ²	Ecuación de la recta
Buprenorfina	0,001	0,004	0,999	$y = 0,004x + 0,001$

Tabla 5. Ecuación de la recta y coeficiente de correlación obtenidos para la buprenorfina mediante regresión.

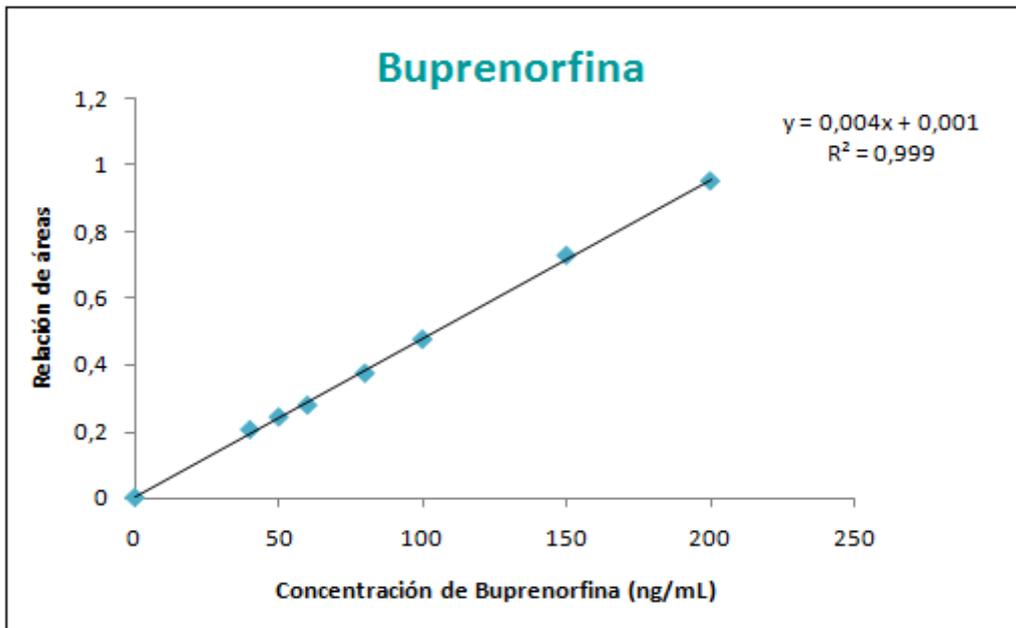


Figura 15. Recta de calibrado de la buprenorfina en plasma.

En base a los resultados obtenidos, se puede decir que hemos conseguido un buen ajuste de los datos experimentales a un modelo lineal, lo cual nos proporciona una respuesta lineal en el intervalo de trabajo seleccionado y por tanto nos permite asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos con el método.

5.2.4 EXACTITUD, PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN:

Exactitud y precisión:

Para evaluar la repetitividad y reproducibilidad del método, se realizaron varios ensayos para analizar su exactitud y precisión. Para el cálculo de estos parámetros, se tuvo en cuenta la variabilidad de las mediciones durante un mismo día (ensayos intradía) y durante días diferentes (ensayos interdía) con objeto de poder observar las posibles fluctuaciones.

Se efectuaron ensayos con 5 réplicas para 3 niveles de concentración de buprenorfina distintos (alta, baja y media). Las concentraciones seleccionadas para realizar dichos ensayos fueron: 40 ng/mL (LLOQ), 100 ng/mL y 200 ng/mL (ULOQ).

Como ya hemos mencionado anteriormente, dichos parámetros se calculan en función del error medio relativo (Er) para la exactitud (repetitividad); y del coeficiente de variación (CV) para la precisión (reproducibilidad de los resultados), cuyas fórmulas son las siguientes:

$$Er = \left| \frac{\bar{x} - x_i}{x_i} \right| \times 100$$

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Los datos obtenidos se muestran en las tablas 6 y 7.

- Ensayos interdía:

Concentración Buprenorfina (ng/mL)	Concentración media estimada (ng/mL)	Exactitud (Er %)	Precisión (CV%)
40	41,44	3,61	2,50
100	100,13	0,13	3,08
200	199,82	-0,09	2,67

Tabla 6. Precisión y exactitud. Ensayos interdía.

- Ensayos intradía:

Concentración Buprenorfina (ng/mL)	Concentración media estimada (ng/mL)	Exactitud (Er %)	Precisión (CV%)
40	46,89	17,22	2,64
100	102,20	14,20	0,68
200	212,93	11,81	3,87

Tabla 7. Precisión y exactitud. Ensayos intradía.

La precisión y exactitud calculadas, no deben superar el 15% del CV y Er respectivamente a cada nivel de concentración (con excepción del LLOQ, que no debe exceder el 20%)²³. En nuestro caso se cumplen estos requisitos, por lo tanto podemos afirmar que el método desarrollado es exacto y preciso según las especificaciones admitidas en las guías de diferentes organizaciones internacionales.

Recuperación:

La recuperación nos permite evaluar el rendimiento de la extracción y se calcula como:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Señal de la [] extraída}}{\text{Señal de la [] total sin haber extraído}} \times 100$$

El cálculo de la recuperación se ha realizado por quintuplicado para 3 concentraciones diferentes: una alta, una media y una baja. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

Concentración Buprenorfina (ng/mL)	Rendimientos de la extracción (%)	Precisión (CV%)
40	117,22	2,64
100	102,20	0,68
200	106,46	3,87

Tabla 8. Resultados recuperaciones obtenidas para cada nivel de concentración.

Para la validación de un método, el porcentaje de rendimiento de la extracción puede variar entre un 80-120%²⁵ para ser considerado aceptable. En nuestro caso el máximo es de 117,22%, que sigue siendo un valor aceptable, por lo que podemos determinar que el proceso de extracción es eficaz.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN:

El propósito de este proyecto se centró en el desarrollo, puesta a punto y validación de un método para la determinación de buprenorfina en plasma. En primer lugar, se desarrolló un procedimiento de extracción que fue la extracción líquido-líquido. En la bibliografía consultada, se describen métodos de extracción en fase sólida (SPE)^{14, 16, 17} y algunos de extracción líquido-líquido^{13, 15, 18}. La técnica de extracción elegida en nuestro caso fue la extracción líquido-líquido, ya que es una técnica rápida, sencilla y económica que demostró una elevada eficacia.

De entre los disolventes empleados en la bibliografía para hacer una extracción líquido-líquido, se probaron 3: una mezcla de tolueno/acetato de etilo en relación (9:1), diclorometano y acetonitrilo. A mayores decidimos probar un cuarto disolvente, el tertbutil metil éter, y experimentalmente se observó que la extracción con este último era la que mayor abundancia y recuperación proporcionaba, así que fue el seleccionado como extractante.

Para alcalinizar la muestra y poder extraer nuestro analito, fue necesario añadirle 20 µL de NaOH 2M para llevar la muestra aproximadamente hasta un pH de 10 tal y como comentan algunos autores¹⁸.

Comparado a otros autores^{16, 18}, el rendimiento de extracción proporcionado por nuestro método es mayor, y fue elevado para las 3 concentraciones de buprenorfina en las que se evaluó.

El método de derivatización escogido para aumentar la volatilidad del compuesto demostró ser de gran utilidad para la determinación de la buprenorfina. Fouad Chiadmi y Jöel Schlatter¹⁷ ya habían descrito antes un método de derivatización que empleaba BSTFA con 1% de TMCS como derivatizante, aunque con una ligera variación en las condiciones de derivatización, mientras que otros autores emplean otros derivatizantes^{13, 14, 18}.

La elección de la técnica analítica a emplear depende en la mayoría de los casos de la disponibilidad y necesidades de cada laboratorio y, aunque en general la técnica más empleada para la determinación de buprenorfina en muestras biológicas es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), en este proyecto se optó por desarrollar un método para la determinación de buprenorfina en plasma mediante GC-MS, debido a que era la tecnología existente en el laboratorio, y la que se suele emplear en la mayoría de los laboratorios de toxicología.

En relación a las condiciones cromatográficas, el programa de temperaturas seleccionado ha permitido la detección del compuesto con un tiempo total de 19,71 minutos. Otros autores^{13, 15, 16, 17} emplean temperaturas más elevadas y rampas más suaves, pero nosotros hemos empleado temperaturas inferiores y una rampa más acusada porque temperaturas tan altas como las que alcanzan con sus métodos podrían dañar el cromatógrafo empleado, y experimentalmente se observó que eran las más adecuadas.

Para la cuantificación del compuesto, el detector selectivo de masas ha operado en modalidad SIM, dado que así se incrementa enormemente la sensibilidad.

Al igual que otros autores^{13, 14, 15, 16, 17, 18}, como patrón interno se ha elegido la buprenorfina deuterada (buprenorfina-d4) debido a la similitud de sus propiedades fisicoquímicas con el analito. Esta similitud se debe a que la única diferencia entre los dos compuestos es que en la buprenorfina-d4 varios átomos de hidrógeno han sido sustituidos por sus isótopos de deuterio, por lo que ambos compuestos presentan prácticamente los mismos tiempos de retención, lo que varía son los espectros de masas, lo que facilita la identificación del analito.

La selección de los iones para la identificación de los analitos, viene dada por la mayor abundancia y especificidad encontradas para ambos, y como para la determinación de la buprenorfina se emplea su análogo deuterado, hay que tener en cuenta que algunos iones van a ser comunes para los dos.

Los iones elegidos para la monitorización en modalidad SIM son los recogidos en la tabla 2 (vista anteriormente en el capítulo 5). Estos iones coinciden con los empleados por otros autores en la bibliografía consultada^{13, 15, 16, 17}. Como ion cuantificador se ha usado el mayoritario, que en el caso de la buprenorfina es el **450 m/z** y en el de la buprenorfina-d4 el **454 m/z**. Otros iones se han seleccionado como iones cualificadores por su presencia significativa en el espectro de masas, que son el 482 m/z y el 506 m/z para la buprenorfina y el 486 m/z y el 510 m/z para la buprenorfina-d4. En cuanto al rango de trabajo (40- 200 ng/mL), se definió en función de las concentraciones tóxicas encontradas para el fármaco en la bibliografía consultada⁹. Elegimos movernos en un rango de concentraciones tóxicas debido a que las concentraciones terapéuticas varían mucho en función de los casos y la bibliografía que se consulte (normalmente las concentraciones terapéuticas son de entre 3-7 ng/mL, pero ha llegado a haber casos de hasta 30-40 ng/mL en tratamiento de pacientes adictos y/o con alta tolerancia). Además en un laboratorio de toxicología forense la mayoría de casos con que se trabaja son de concentraciones tóxicas o letales (normalmente en torno a 100 ng/mL⁹) por lo que el rango seleccionado es el más adecuado para los fines con los que se va a emplear el método.

Los límites de detección y cuantificación fueron 10 ng/mL y 40 ng/mL respectivamente. Autores como Fuller Dwain et al, Kathun Nahar et al y Chiadmi Fouad et al^{13, 16, 17}, emplean límites de detección y cuantificación menores debido a que han escogido un rango de trabajo terapéutico en vez de tóxico, en nuestro caso como vamos a trabajar en un laboratorio de toxicología forense, el LOD y el LLOQ se ajustan a los fines para los que está destinado.

El método ha demostrado una buena exactitud y precisión tanto en los ensayos interdía como en los intradía, lo que garantiza su fiabilidad para poder aplicarse en un laboratorio toxicológico.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES:

CONCLUSIONS:

This project has focused on both development and validation of a fast, reliable and reproducible analytical method for the detection and quantification of buprenorphine in plasma by using a simple liquid-liquid extraction to extract the analyte from its matrix and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for its analysis.

By carrying its development out, we have come to the following conclusions:

- The liquid-liquid extraction procedure used for Buprenorphine in plasma saves time, simplifies extraction, and provides optimum efficiency.
- The analysis of Buprenorphine by GC-MS provides high sensitivity and selectivity when determining this substance in plasma samples.
- The method shows a good linear correlation which is statistically significant and reproducible for the working range (40-200 ng / mL), which allows us to quantify this substance reliably and accurately.
- The analytical methodology developed has exceeded all parameters and validation criteria established in the guidelines of various international organizations such as the FDA (Food and Drug Administration) or AAFS (American Academy of Forensic Sciences), which ensures reproducibility, sensitivity and selectivity of the method, and allows its application to samples' analysis in a toxicology laboratory.

Thereupon we can conclude that we have successfully met the goals we had set and that our method is valid to be applied in a toxicology laboratory to real samples.

CONCLUSIONES:

Este proyecto se ha centrado en el desarrollo y validación de un método analítico rápido, fiable y reproducible que permite la detección y cuantificación de buprenorfina en plasma empleando una extracción líquido-líquido simple para aislar el analito de la matriz y cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) para su análisis.

De su desarrollo se han podido sacar las siguientes conclusiones:

- El procedimiento de extracción líquido-líquido empleado para la buprenorfina en plasma supone un ahorro de tiempo así como la simplificación de la extracción, y proporciona una eficacia óptima.

- El análisis de buprenorfina mediante GC-MS nos proporciona una alta sensibilidad y selectividad a la hora de determinar dicha sustancia en muestras plasmáticas.
- El método muestra una buena correlación lineal que es estadísticamente significativa y reproducible para el rango de trabajo empleado (40-200 ng/mL), lo cual nos permite cuantificar esta sustancia de manera fiable y precisa.
- La metodología analítica desarrollada ha superado todos los parámetros y criterios de validación establecidos en las guías de las diversas organizaciones internacionales como la FDA (Food and Drug Administration) o la AAFS (American Academy of Forensic Sciences), lo que garantiza la reproducibilidad, sensibilidad y selectividad del método y permite su aplicación para análisis de muestras en un laboratorio toxicológico.

Con lo cual podemos concluir que hemos cumplido con los objetivos que nos habíamos planteado satisfactoriamente y que el método es válido para ser aplicado en un laboratorio toxicológico a muestras reales.

CONCLUSIONES:

Este proxecto centrouse no desenvolvemento e validación dun método analítico rápido, fiable e reproducible que permitise a detección e cuantificación de buprenorfina en plasma empregando unha extracción líquido-líquido simple para aislar o analito da matriz e cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) para o seu análise.

Do seu desenvolvemento puidéronse sacar as seguintes conclusións:

- O procedemento de extracción líquido-líquido empregado para a buprenorfina en plasma supón un aforro de tempo así como a simplificación da extracción, e proporciona unha eficacia óptima.
- O análise de buprenorfina mediante GC-MS proporcionanos unha alta sensibilidade e selectividade á hora de determinar dita substancia en mostras plasmáticas.
- O método amosa unha boa correlación lineal que é estadísticamente significativa e reproducible para o rango de traballo empregado (40-200 ng/mL), o cal nos permite cuantificar esta substancia de maneira fiable e precisa.
- A metodoloxía analítica desenvolta superou todos os parámetros e criterios de validación establecidos nas guías das diversas organizacións internacionais como a FDA (Food and Drug Administration) ou a AAFS (American Academy of Forensic Sciences), o que garante a reproducibilidade, sensibilidade e selectividade do método e permite a súa aplicación para análises de mostras nun laboratorio toxicológico.

Co cal podemos concluir que cumprimos os obxetivos que nos plantexáramos satisfactoriamente e que o método é válido para ser aplicado nun laboratorio toxicolóxico a mostras reais.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. SYBILA. *El consumo de las drogas a lo largo de la historia*. 5 de Octubre de 2012. Disponible en: <http://quhist.com/drogas-alcohol-historia/> (Fecha de acceso: 10.06.2016).
2. REPETTO Manuel. 1985. *Toxicología de la drogadicción*. Carrasco I, DOMÍNGUEZ C., JURADO M.C., LÓPEZ-ARTÍGUEZ M., MARTÍNEZ D., RICO-LARA M., RODRÍGUEZ- CONSUERGA M.A., RODRÍGUEZ- VICENTE C., SANZ P., VILLAR M.P. España: Ediciones Díaz Santos, S.A. ISBN: 9788486251185
3. FEDERICO Mauro. 2015. *Historia de la droga en la Argentina: De la cocaína legal y los fumaderos a los narcos y las metanfetaminas*. RAMÍREZ Ignacio. Argentina: Editorial Aguilar. ISBN: 9789877351200
4. GISBERT Calabuig. 2004. *Medicina legal y toxicológica*. España: Ediciones Elsevier Masson. 6ª Edición. ISBN: 9788445814154
5. STINCHCOMB AL, PALIWAL A., DUA R., IMOTO H., WOODARD RW & FLYNN GL. 1996. "Permeation of buprenorphine and its 3-alkyl-ester prodrugs through human skin". *Pharmaceutical Research*. Vol. 13. P. 1519-1523.
6. AVDEEF, A. et al. *Boiling Pt, Melting Pt, vapor pressure estimations*. 1996. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00921> (Fecha de acceso: 03.06.2016).
7. RODRÍGUEZ René, DAZA Paola & FERNANDO RODRÍGUEZ Mario. 2006. "Uso de buprenorfina transdérmica en el alivio del dolor por cáncer". *Revista Colombiana de Anestesiología*. Vol 34. P. 253- 257
8. PEDRERO GLAGOVSKY Nydia. 2015. "Estudio comparativo entre el tratamiento con metadona y el tratamiento con suboxone: efectos adversos, calidad de vida, y estado de bienestar y salud". Memoria de trabajo de fin de grado. Facultad de farmacia, Universitas Miguel Hernández.
9. MOFFAT A.C. 2004. *Clarke's analysis of drgs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. OSSELTON M. and WIDDOP B. Editorial Pharmaceutical Press. 3ª edición. ISBN:978-0853694731
10. MOLL SÁNCHEZ JAVIER. 2008. "Estudio farmacocinético de la buprenorfina tras la administración intravenosa y transdérmica. Determinación de la actividad analgésica de la buprenorfina administrada subcutánea y transdérmicamente en perras ovariectomizadas". Tesis doctoral.

Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.

11. CABARCOS FERNÁNDEZ PAMELA. 2009. "Determinación rápida de fentanilo en plasma por cromatografía de gases ligada a espectrometría de masas mediante extracción líquido-líquido". Tesis doctoral. Departamento de anatomía patológica y ciencias forenses, Facultad de medicina, Universidad de Santiago de Compostela (USC).
12. GONZÁLEZ Hernández Álvaro. 2010. *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Elsevier. ISBN: 8480860766
13. FULLER Dwain C. 2008. "A Simple Gas Chromatography–Mass Spectrometry Procedure for the Simultaneous Determination of Buprenorphine and Norbuprenorphine in Human Urine". *Journal of analytical toxicology*. Vol. 32. P. 626-630.
14. KUHLMAN James J., LALANI Shairose, MAGLUILO Joseph, LEVINE Barry, DARWIN William D, JONHSON Rolley E. & CONE Edward J.. 1996. "Human pharmacokinetics of Intravenous, Sublingual, and Buccal Buprenorphine". *Journal of analytical toxicology*. Vol.20. P. 369-378.
15. VINCENT François, BESSARD Janine, VACHERON Jérôme, MALLARET Michel & BESSARD Germain. 1999. "Determination of Buprenorphine and Norbuprenorphine in Urine and Hair by Gas Chromatography- Mass Spectrometry". *Journal of analytical toxicology*. Vol. 23. P. 270-278.
16. KHATUN Nahar Limon, ANDREWS Rebecca & PATERSON Sue. 2015. "Validated Method for the Quantification of Buprenorphine in Postmortem Blood using Solid- Phase extraction and Two- Dimensional Gas Chromatography- Mass Spectrometry". *Journal of analytical toxicology*. Vol. 39. P. 519-525.
17. CHIADMI Fouad & SCHLATTER Joël. 2014. "Buprenorphine and Norbuprenorphine Determination in Mice plasma and Brain by Gas Chromatography- Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry Insights*. Vol. 9. P.9-16.
18. MOODY David E., LAYCOCK Jonh D., SPANBAUER Alan C., CROUCH Dennis J, FOLTZ Rodger L., JOSEPH Jonathan L., AMASS Leslie & BICKEL Warren K.. 1997. "Determination of Buprenorphine in Human plasma by Gas Chromatography- Positive Ion Chemical Ionization- Mass Spectrometry and Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry". *Journal of analytical toxicology*. Vol. 21. P.406-414.

19. GUTIÉRREZ M.C., DROGUET M. 2002. "La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". *Boletín Intexter*. Vol. 122. P. 35-41.
20. ETRRE, L.S. 1993. "Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993)". *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 65. P.819-872.
21. DOUGLAS A. Skoog. 2000. *Principios de Análisis Instrumental*. F. HOLLER James & NIEMAN Timothy A.. Chile: Editorial McGrawHill. 5ª Edición. ISBN: 9789706868299
22. KNAPP D.R.. 1979. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Ediciones: John Wiley & sons. ISBN: 978-0-471-03469-8
23. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001. "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation". (10.02. 2016). <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (Fecha de acceso: 14.05.2016)
24. HARRIS Daniel C. 2007. *Análisis Químico Cuantitativo*. Barcelona: Editorial Reverté. 3ª Edición. ISBN: [9788429172249](https://www.isbn-international.org/product/9788429172249).
25. ABBOTT Michael, HAYWARD Stephen, ROSS William, GODEFROY Samuel, BENREJEB Ulberth Franz, VAN HENGEL Arjon, J; ROBERTS James, AKIYAMA Hiroshi, POPPING Bert, YEUNG Jupiter M., WEHLING Paul, TAYLOR Steve L, POMS Roland Ernest & DELAHAUT Philippe. 2010. "Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices". *Journal of AOAC International*. Vol. 93. P.442-450.