



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE METILHEXANAMINA EN ORINA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

FÉLIX JESÚS ARAUJO GONZÁLEZ

TUTOR: DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ
FACULTAD DE QUÍMICA, JULIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Presidente	Dra. Josefina de Gyves Marciniak
Vocal	M. en C. Santiago Capella Vizcaíno
Vocal	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
Vocal	Dra. Martha Patricia García Camacho
Secretario	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias químicas y a la Facultad de

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada (número: 273472).

Al programa PAIP Facultad de Química 2013-2014.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN.....	11
1. ANTECEDENTES	13
1.1 METILHEXANAMINA	13
1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA METILHEXANAMINA.....	13
1.1.2 METILHEXANAMINA EN EL DOPAJE	14
1.1.3 FARMACOLOGÍA DE LA METILHEXANAMINA	15
1.1.4 EXCRECIÓN DE DROGAS	16
1.2 ORINA	17
1.2.1 MUESTREO	18
1.3 SUSTANCIAS PROHIBIDAS DETERMINADAS EN MATRICES BIOLÓGICAS	19
1.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	20
1.5 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS QUIRALES	22
1.6 DERIVACIÓN.....	23
1.6.1 SILILACIÓN.....	25
1.6.2 FORMACIÓN DE CARBAMATOS	26
1.6.3 DERIVACIÓN DE LA METILHEXANAMINA	27
1.7 TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA	29
1.7.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO ASISTIDA POR ADICIÓN DE SAL (SALLE).....	30
1.7.1.1 INTRODUCCIÓN.....	30
1.7.1.2 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	31
1.7.1.3 PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN.....	32
1.7.1.3.1 HIDROFOBICIDAD.....	32
1.7.1.3.2 SOLUBILIDAD	33
1.7.1.3.3 PH.....	34
1.7.1.3.4 ADICIÓN DE SAL.....	35
1.7.2 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (MEFS).....	35
1.7.2.1 INTRODUCCIÓN.....	35
1.7.2.2 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	36
1.7.2.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN	37
1.7.2.4 PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN.....	38
1.7.2.4.1 ELECCIÓN DE LA FASE DE EXTRACCIÓN	38
1.7.2.4.2 MODO DE EXTRACCIÓN	40
1.7.2.4.3 TIEMPO DE EXTRACCIÓN	40
1.7.2.4.4 TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN	41
1.7.2.4.5 FUERZA IÓNICA.....	42
1.7.2.4.6 PH.....	42
1.8 VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS.....	42

1.8.1 PRECISIÓN.....	43
1.8.2 LINEALIDAD.....	43
1.8.3 LÍMITE DE DETECCIÓN.....	44
1.8.4 EXACTITUD.....	44
2. OBJETIVOS.....	45
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	46
3.1 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	46
3.2 SOLUCIONES ESTÁNDAR.....	46
3.3 MUESTRAS.....	46
3.4 INSTRUMENTACIÓN.....	47
3.5 SELECCIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVACIÓN DE LA METILHEXANAMINA.....	47
3.5.1 FORTIFICACIÓN DE AGUA / ORINA BLANCO.....	48
3.6 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN SALLE-CG-EM.....	48
3.7 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN HS-MEFS-CG.....	49
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1 DERIVACIÓN DE LA METILHEXANAMINA.....	51
4.2 OPTIMIZACIÓN SALLE-CG-EM.....	59
4.2.1 SELECCIÓN DEL PH.....	59
4.2.2 INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE IBCF EN LA DERIVACIÓN.....	60
4.2.3 TIEMPO, TEMPERATURA Y ADICIÓN DE SAL.....	60
4.2.4 AGITACIÓN.....	66
4.2.5 ESTÁNDAR INTERNO.....	68
4.2.6 CONDICIONES EM PARA LA METODOLOGÍA SALLE-CG-EM.....	71
4.2.7 METODOLOGÍA OPTIMIZADA SALLE-CG-EM PARA EL ANÁLISIS DE METILHEXANAMINA.....	73
4.2.8 VALIDACIÓN SALLE-CG-EM.....	75
4.2.8.1 PRECISIÓN.....	75
4.2.8.2 EXACTITUD.....	75
4.2.8.3 LINEALIDAD, LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	76
4.2.9 APLICACIÓN DE SALLE-CG-EM A MUESTRAS DE ORINA.....	77
4.3 OPTIMIZACIÓN HS-MEFS-CG.....	80
4.3.1 INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE IBCF.....	80
4.3.2 TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN.....	81
4.3.3 CONDICIONES HS-MEFS-CG.....	83
4.3.4 METODOLOGÍA OPTIMIZADA HS-MEFS-CG PARA EL ANÁLISIS DE METILHEXANAMINA.....	84
4.3.5 VALIDACIÓN DE HS-MEFS-CG.....	86
4.3.5.1 PRECISIÓN.....	86
4.3.5.2 EXACTITUD.....	86
4.3.5.3 LINEALIDAD Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	87
4.3.6 APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA HS-MEFS-CG.....	87
CONCLUSIONES.....	90
ANEXOS.....	91
A. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	91
B. CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS.....	95
REFERENCIAS.....	96

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA METILHEXANAMINA.....	13
TABLA 2. ALGUNOS REACTIVOS SILILANTES COMERCIALES.....	25
TABLA 3. ALGUNOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA MHA.....	28
TABLA 4. ESTRUCTURA DE MHA Y LOS DERIVADOS DE LAS REACCIONES DE SILILACIÓN Y FORMACIÓN DE CARBAMATOS Y SUS CORRESPONDIENTES COEFICIENTES DE REPARTO OCTANOL-AGUA.	51
TABLA 5. AGENTES DERIVATIZANTES Y CONDICIONES DE REACCIÓN DE MHA (CLORHIDRATO).	52
TABLA 6. CODIFICACIÓN DE DISEÑO FACTORIAL 2^3 PARA TIEMPO, TEMPERATURA Y ADICIÓN DE SAL (MHA/SALLE).	61
TABLA 7. COMPUESTOS ANALIZADOS POR CG-FID PARA SELECCIONAR ESTÁNDAR INTERNO DE MHA.	69
TABLA 8. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA SALLE-CG-EM.....	74
TABLA 9 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO SALLE-CG-EM.....	76
TABLA 10. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LINEALIDAD DE SALLE-CG-EM.....	77
TABLA 11. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA HS-MEFS-CG.	85
TABLA 12 CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA LA VARIACIÓN DE IBCF EN LA REACCIÓN(STATGRAPHICS; $N=2$, $\alpha=0.05$).	91
TABLA 13. TABLA ANOVA PARA LA RESPUESTA DE MHA-IBCF VARIANDO %NaCl.....	91
TABLA 14. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS LSD DE FISHER PARA OPTIMIZACIÓN DE %NaCl ($N=2$).....	92
TABLA 15. TABLA ANOVA PARA LA RESPUESTA DE MHA-IBCF VARIANDO TEMPERATURA.....	92
TABLA 16. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS LSD DE FISHER PARA OPTIMIZACIÓN DE TEMPERATURA ($N=2$).	92
TABLA 17. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA PARA AGITACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN EN LA OBTENCIÓN DE MHA-IBCF.....	92
TABLA 18. PRUEBA LSD DE FISHER Y PRUEBA DE LEVEN PARA MHA-IBCF EN FUNCIÓN DE LA AGITACIÓN.	93
TABLA 19. COMPARACIÓN DE LAS RESPUESTAS DEL DODECANOATO DE METILO EN CG-FID POR INYECCIÓN DIRECTA Y DESPUÉS DE EXTRACCIÓN SALLE.	93
TABLA 20. ÁREA RELATIVA OBTENIDA DEL DERIVADO MHA-IBCF Y DODECANOATO DE METILO AL DISMINUIR LA CONCENTRACIÓN DE METILHEXANAMINA.	93
TABLA 21. FRAGMENTOS UTILIZADOS EN CG-EM EN MODO SIM PARA MHA-IBCF Y EI.	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCTO QUE REPORTA EL CONTENIDO DE METILHEXANAMINA ENTRE SUS COMPONENTES....	14
FIGURA 2. METILHEXANAMINA Y ANFETAMINA.....	15
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN NEFRÓN. ²⁶	17
FIGURA 4. DISPOSITIVO PARA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. ⁸³	37
FIGURA 5. ESQUEMA ANALÍTICO BASE PARA EL DESARROLLO DE METODOLOGÍA SALLE-CG.EM.	49
FIGURA 6. ESQUEMA ANALÍTICO BASE PARA EL DESARROLLO DE METODOLOGÍA HS-MEFS-CG.	50
FIGURA 7. CROMATOGRAMAS DE LAS REACCIÓN DE MHA CON BSTFA+4%TMCS (A) Y BLANCO DE REACTIVOS (BR).....	53
FIGURA 8. CROMATOGRAMAS DE LA REACCIÓN DEL CLORHIDRATO DE MHA CON BSTFA (B) Y BLANCO DE REACTIVOS (BR).....	54
FIGURA 9. CROMATOGRAMAS DE LA REACCIÓN DE MHA CON MSTFA (C) Y BLANCO DE REACTIVOS (BR).55	
FIGURA 10. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA REACCIÓN DE MHA CON MSTFA/ACETONITRILLO (D) Y BLANCO DE REACTIVOS (BR).	56
FIGURA 11. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL DE LA REACCIÓN MHA CON MSTFA EN ACETONITRILLO Y ESPECTRO DE MASAS (SCAN) DE MHA-TMS.....	57
FIGURA 12 CROMATOGRAMA DEL DERIVADO MHA-IBCF (E).....	58
FIGURA 13. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL DE LA REACCIÓN MHA CON IBCF (E) Y ESPECTRO DE MASAS (SCAN) DEL DERIVADO MHA-IBCF.	59
FIGURA 14. GRÁFICA DE PROBABILIDAD NORMAL PARA LOS EFECTOS DEL DISEÑO MHA/IBCF.	62
FIGURA 15. GRÁFICA DE INTERACCIONES ENTRE TEMPERATURA Y ADICIÓN DE NaCl.....	63
FIGURA 16. SUPERFICIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA MHA/SALLE MANTENIENDO TIEMPO EN SU NIVEL BAJO.	63
FIGURA 17. OPTIMIZACIÓN DEL PORCENTAJE DE NaCl MANTENIENDO TEMPERATURA CONSTANTE.....	64
FIGURA 18. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA MANTENIENDO EL PORCENTAJE NaCl CONSTANTE.	65
FIGURA 19. GRÁFICOS DE DISPERSIÓN PARA LA EVALUACIÓN DEL DERIVADO MHA-IBCF EN FUNCIÓN DE LA AGITACIÓN.	66
FIGURA 20. VARIACIÓN DE LA RESPUESTA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE AGITACIÓN CON VORTEX (2500 RPM).	68
FIGURA 21. CROMATOGRAMAS DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS COMO ESTÁNDAR INTERNO PARA MHA-IBCF.....	70
FIGURA 22. CROMATOGRAMA IONICO TOTAL Y ESPECTRO DE MASAS (SCAN) DE MHA-IBCF EN AGUA FORTIFICADA 100 NG/ML MHA.	72
FIGURA 23. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL Y ESPECTRO DE MASAS (SCAN) DE MHA-IBCF DE ORINA FORTIFICADA 100 NG/ML MHA.	72
FIGURA 24. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL PARA MHA-IBCF A 100 NG/ML.	73
FIGURA 25. ESQUEMA ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE MHA POR SALLE-CG-EM.	74
FIGURA 26. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL DE UNA MUESTRA DE ORINA OBTENIDA DE CONADE (MHA > 100 NG/ML) ANALIZADA POR SALLE-CG-EM.	78
FIGURA 27. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL DE UNA MUESTRA DE ORINA FORTIFICADA A 141 NG/ML ANALIZADA POR SALLE-CG-EM.....	78
FIGURA 28. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL DE UNA MUESTRA DE ORINA OBTENIDA DE CONADE (MHA < 50 NG/ML) ANALIZADA POR SALLE-CG-EM.	79
FIGURA 29. CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL DE UNA MUESTRA DE ORINA FORTIFICADA A 40 NG/ML ANALIZADA POR SALLE-CG-EM.....	79

FIGURA 30. CROMATOGRAMA DE MHA-IBCF (10 μ g/ML MHA, 10 μ L IBCF) QUE MUESTRA DAÑO DE LA FIBRA PDMS/DVB.	80
FIGURA 31. CROMATOGRAMA DE MHA-IBCF (1 μ g/ML MHA, 1 μ L IBCF) EXTRAÍDO CON FIBRA PDMS/DVB.	81
FIGURA 32. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN A TEMPERATURA CONSTANTE (42 °C) PARA EXTRACCIÓN DE MHA-IBCF EN AGUA FORTIFICADA POR HS-MEFS.	82
FIGURA 33. OPTIMIZACIÓN DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN PARA EXTRACCIÓN DE MHA-IBCF EN ORINA FORTIFICADA POR HS-MEFS.	83
FIGURA 34. CROMATOGRAMA DE MHA-IBCF CON LAS CONDICIONES ÓPTIMAS HS-MEFS-CG.	84
FIGURA 35. ESQUEMA ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE MHA POR HS-MEFS-CG.	85
FIGURA 36. CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE ORINA OBTENIDA DE CONADE (MHA > 100 NG/ML) ANALIZADA POR HS-MEFS-CG.	88
FIGURA 37. CROMATOGRAMA DE ORINA FORTIFICADA A 143 NG/ML ANALIZADA POR HS-MEFS-CG.	88
FIGURA 38. CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE ORINA OBTENIDA DE CONADE (MHA < 50 NG/ML) ANALIZADA POR HS-MEFS-CG.	89
FIGURA 39. CROMATOGRAMA ORINA FORTIFICADA A 20NG/ML ANALIZADA POR HS-MEFS-CG.	89
FIGURA 40 GRÁFICA DE INTERACCIONES PARA EL DISEÑO MHA/SALLE.	91
FIGURA 41. ÁREAS OBTENIDAS DEL DERIVADO MHA-IBCF DEPENDIENDO DE LOS FRAGMENTOS SELECCIONADOS EN CG-EM (SIM).	94
FIGURA 42. CROMATOGRAMA IONICO TOTAL Y ESPECTRO DE MASAS (SCAN) DE EI EN AGUA FORTIFICADA.	95

ABREVIATURAS

AAF's	Adverse analytical findings
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas
CL	Cromatografía de líquidos
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CLAR-EM masas	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con espectrometría de
CONADE	Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte
CV	Coefficiente de variación
DMAA	Dimetilamilamina
ECD	Electron capture detector
EM	Espectrometría de masas
FID	Flame ionization detector
HS	Headspace (espacio de cabeza)
HS-MEFS-CG gases	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza seguida de cromatografía de
IBCF	Isobutilcloroformiato
Kow	Coefficiente de partición octanol-agua
m/z	Relación masa/carga
MEFS	Microextracción en fase sólida
MHA	Metilhexaneamina
MHA-IBCF	Derivado de la metilhexaneamina con isobutilcloroformiato
MHA-IBCF	Derivado de metilhexanamina e isobutilcloroformiato
R²	Coefficiente de determinación
SALLE	Salting-out assisted liquid-liquid extraction
SALLE-CG-EM	Extracción líquido-líquido asistida por adición de sal seguida de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas
TIC	Total ion chromatogram
TMS	Trimetilsilano
WADA	World Antidoping Agency

RESUMEN

Se desarrollaron dos métodos sensibles, precisos, sencillos y rápidos para la determinación de metilhexanamina (MHA) en orina, basados en la derivación *in-situ* de la metilhexanamina con isobutilcloroformiato (IBCF) y en la extracción selectiva del derivado (MHA-IBCF) por extracción líquido-líquido asistida por adición de sal (SALLE salting out assisted liquid-liquid extraction) seguida de su análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada con espectrometría de masas (EM) y microextracción en fase sólida (MEFS), en espacio de cabeza (HS) seguida por cromatografía de gases con detector de ionización de llama. Las metodologías SALLE-CG-EM y HS-MEFS-CG se validaron y mostraron linealidad en el intervalo de 20 - 201 ng/mL y 20 - 205 ng/mL respectivamente, con coeficientes de determinación $R^2 \geq 0.998$; los límites de detección obtenidos fueron 5 ng/mL y 10 ng/mL respectivamente. Se evaluó la precisión para SALLE-CG-EM en los niveles bajo (20 ng/mL), medio (100 ng/mL) y alto (201 ng/mL) del intervalo lineal con $\%CV \leq 3\%$ y la precisión para HS-MEFS-CG se estimó en los niveles medio y bajo con $\%CV \leq 10\%$. La exactitud se estimó calculando el porcentaje de recuperación; para la metodología SALLE-CG-EM el % recuperación se encontró entre el 94% y 108% mientras que la metodología HS-MEFS-CG fue entre 92% y 110% de recuperación. Los métodos optimizados fueron aplicados a dos muestras de orina proporcionadas por la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE, México). El nivel mínimo de desempeño exigido a los laboratorios por la WADA (World Anti-Doping Agency) es: 100 ng/mL de metilhexanamina en orina, por lo que los métodos propuestos pueden ser utilizados para la determinación de metilhexanamina en el análisis del control de dopaje.

INTRODUCCIÓN

Se considera dopaje al uso de un artificio (sustancia o método) potencialmente peligroso para la salud de un deportista y/o susceptible de mejorar su rendimiento; se refiere también a la presencia de alguna sustancia, en el organismo de un deportista, especificada en la lista de sustancias prohibidas del Código Mundial Antidopaje de la WADA.¹ El Código Mundial Antidopaje es el documento que armoniza las normas del antidopaje en todos los deportes en todos los países. Trabaja conjuntamente con cinco estándares internacionales: Pruebas, Laboratorios, Exenciones de Uso Terapéutico, Lista de Sustancias Prohibidas y Protección de la Privacidad e Información Personal.² La lista de sustancias prohibidas de la WADA considera a los estimulantes, incluyendo todos los isómeros ópticos, cuando corresponda, como sustancias prohibidas en competencia. Estas sustancias se clasifican en no específicas, como la amfetamina y metanfetamina, y específicas como la adrenalina, efedrina y metilhexanamina. Los suplementos dietéticos de venta libre, pueden contener estimulantes prohibidos como la metilhexanamina; algunos suplementos de este tipo son ofertados en México sin ninguna restricción. Un suplemento dietético es un producto destinado a sustituir la dieta y contiene uno o más ingredientes dietéticos (incluyendo vitaminas, minerales, hierbas, amino ácidos, y otras sustancias) o sus constituyentes.³ El aumento en el uso de este tipo de productos es un fenómeno observado a nivel mundial, basado en la percepción de que son productos naturales y seguros, que previenen enfermedades, que reemplazan medicamentos prescritos o que pueden compensar una alimentación deficiente.⁴ Algunas sustancias prohibidas usadas para mejorar el rendimiento se han detectado en el control de dopaje por diferentes técnicas analíticas que incluyen CG y CG-EM.⁵ Por otro lado, la extracción de drogas de matrices biológicas representa un desafío debido a que son más complejas que algunas otras (pueden contener proteínas, sales, ácidos, bases y numerosos compuestos orgánicos con química similar que los analitos de interés).⁶ Es por ello que se requieren metodologías rápidas, sencillas, precisas y sensibles para la determinación de este tipo de sustancias. El objetivo de este trabajo es desarrollar, optimizar y validar dos metodologías

analíticas para la determinación de metilhexanamina en orina (estimulante prohibido utilizado para mejorar el rendimiento de los deportistas en competición), basadas en las técnicas de preparación de muestra extracción líquido-líquido asistida por adición de sal (SALLE salting out assisted liquid-liquid extraction) y microextracción en fase sólida (MEFS), seguidas por cromatografía de gases, las cuales se han utilizado para determinar sustancias prohibidas.^{6,7}

1. ANTECEDENTES

1.1 Metilhexanamina

1.1.1 Características de la metilhexanamina

La metilhexanamina es una amina primaria alifática de cadena corta $C_7H_{17}N$, producida naturalmente por la planta de origen africano *Pelargonium graveolens* conocida comúnmente como geranio; se cultiva principalmente para la preparación de esencias derivadas de su aceite destilado,⁸ cuyo contenido de MHA se encuentra reportado en concentraciones de ng/mL.^{9,10} Sintéticamente es obtenida de la reacción de 4-metilhexan-2-ona y la hidroxilamina, seguido de un proceso de reducción.¹¹ En su estructura molecular presenta dos centros estereogénicos (Figura 2), por lo que la metilhexanamina no es un solo compuesto sino la mezcla de cuatro estereoisómeros, dos pares de enantiómeros con configuraciones [S,S- y R,R-] y [R,S- y S,R-] respectivamente. La metilhexanamina presenta actividad óptica debido a que guarda cierta relación entre sus diastereoisómeros.¹² En la Tabla 1 se presentan algunas propiedades físicas y químicas de la metilhexanamina.^{13,14}

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la metilhexanamina.

Nombre	4-Metil-2-hexanamina	Punto de Ebullición	130-135 °C a 760 mmHg
Nombre IUPAC	4-Metilhexan-2-amina	Soluble	Cloroformo, éter, ácidos diluidos
Formula Molecular	$C_7H_{17}N$	n_D^{25}	1.4150-1.4175
Peso Molecular	115.21	Solubilidad en Agua	Muy poco soluble
Apariencia	Líquido, olor aminas	pKa	10.54
Densidad	0.7620-0.7655 g / cm ³	Log P	2.102

1.1.2 Metilhexanamina en el dopaje

En el año 2007 una muestra destinada al análisis del estimulante tuaminoheptano (2-heptilamina) fue reportada como un resultado analítico adverso (AAF por sus siglas en inglés, Adverse Analytical Finding). Varios laboratorios observaron un pico desconocido con espectro de masas similar y tiempo de retención cercano al tuaminoheptano. Se encontró que este nuevo estimulante era una estructura análoga del tuaminoheptano, la metilhexanamina.¹⁵ En el año 2009 la Agencia Mundial Antidopaje reportó 31 casos de AAF's para este estimulante.¹⁶ En el año 2010 la Agencia Mundial Antidopaje incluyó al estimulante MHA en la Lista de Sustancias Prohibidas. La metilhexanamina era un medicamento patentado en 1944 como descongestionante nasal, que retomó popularidad como suplemento dietético, con presunción de efectividad para incrementar el desempeño atlético y como apoyo para la pérdida de peso. También se vende como una droga estimulante recreativa.¹⁷ En los productos que contienen este estimulante se puede encontrar la metilhexanamina bajo diferentes nombres: MHA; metilhexaneamina; dimetilpentilamina; dimetilamilamina; DMAA; geranamina; 2-amino-4-metilhexano; forthane; 4-metil-2-hexanamina; 4-metil-2-hexilamina; pentilamina; floradrena; 2-hexanamina, 4-metil; 2-hexanamina,4-metil-(9CL); 1,3-dimetilamilamina; 4-metilhexan-2-amina; 1,3-dimetilpentilamina.^{18, 19} En la Figura 1 se muestra un ejemplo de un producto que contiene MHA bajo el nombre 4-methyl-2-hexylamine.

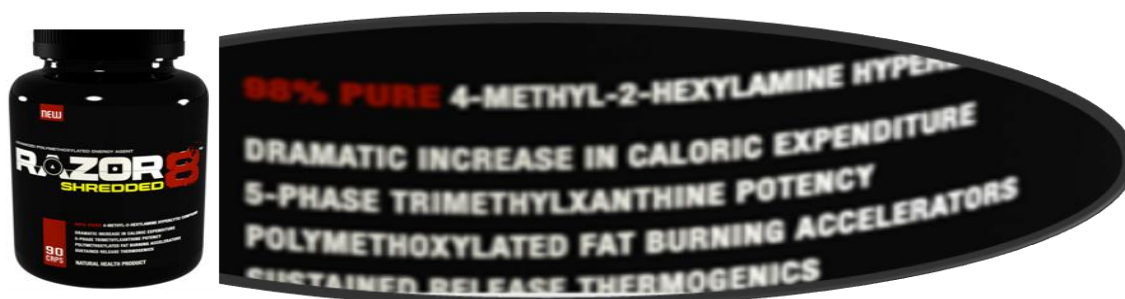


Figura 1. Producto que reporta el contenido de metilhexanamina entre sus componentes.

Este tipo de productos que contienen MHA representan un problema para los programas de pruebas de drogas. En el año 2011 el Departamento de Defensa de

los Estados Unidos de América reportó que de 134 muestras con falsos positivos para anfetaminas, el 92.3% fueron causados por la presencia de metilhexanamina a una concentración aproximada de 6 mg/L. La MHA muestra reactividad con los anticuerpos empleados en algunos inmunoensayos comunes, lo anterior puede ser debido a la similitud estructural que presenta con las anfetaminas (Figura 2), elevando el costo de este tipo de pruebas debido a los análisis de confirmación realizados por técnicas cromatográficas (CG-EM y CL-EM-EM).²⁰

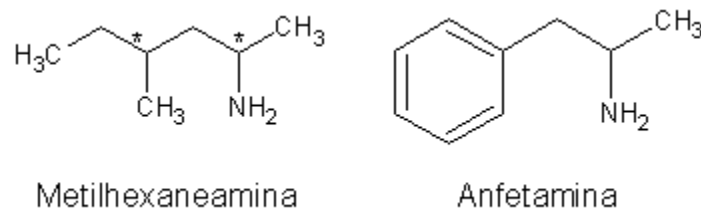


Figura 2. Metilhexanamina y Anfetamina.

1.1.3 Farmacología de la metilhexanamina

La metilhexanamina se introdujo inicialmente como descongestionante nasal y para el tratamiento de hipertrofia bucal.¹¹ En un estudio publicado en el año 2012 por Venhuis y Kaste²¹, se reportaron algunos efectos farmacológicos observados en diferentes especies animales (perros, ratas, ranas, puerco de guinea, ratones), que afectaron los sistemas cardiovascular (incremento en la presión arterial, vasoconstricción, taquicardia), respiratorio (broncodilatación), sistema nervioso central (narcosis), sistema renal, (diuresis), intestinos (depresión de la actividad peristáltica), órganos reproductivos (contracción inducida del útero). Para consumo humano, la dosis encontrada en los suplementos dietéticos varía entre 25-65 mg por dosis. La ruta principal de administración de esta droga es por ingestión.¹¹ Schilling *et al*,²² publicaron en el año 2013 un estudio sobre los efectos farmacocinéticos de la metilhexanamina administrada por vía oral (25 mg) a ocho hombres sanos entre 23-26 años de edad; el tiempo de vida media plasmático obtenido para esta sustancia fue de 8.45 horas, el tiempo promedio que tardó en aparecer la droga en el torrente sanguíneo fue aproximadamente 8 minutos, la

concentración de metilhexanamina determinada (CLAR-EM) entre 3-5 horas fue en promedio de aproximadamente 70 ng/mL. Con la cantidad suministrada de metilhexanamina (25 mg), no se observó impacto significativo en la frecuencia cardíaca, presión sanguínea o temperatura sanguínea de los sujetos de estudio. En este mismo año Bloomer *et al*,²³ publicaron un perfil de seguridad de cafeína y metilhexanamina suministradas combinadas y por separado, a 50 hombres jóvenes sanos durante 12 semanas (dosis MHA: 50 mg/día). En este estudio se encontró que los sujetos que ingirieron MHA tuvieron un incremento en su frecuencia cardíaca de aproximadamente 5 pulsaciones por minuto, lo cual incrementó la presión sanguínea.

Algunos reportes de uso de MHA indicaron que esta sustancia produce un efecto simpaticomimético provocando estimulación del sistema nervioso central, euforia, aumento en la concentración y productividad. También se han reportado efectos sobre el apetito. En base a estos efectos se incrementó su uso como droga psicoactiva, suplemento dietético y suplemento deportivo alrededor del mundo. La dosis letal media para la metilhexanamina en ratones es 39 mg/Kg cuando es inyectada intravenosa y 185 mg/Kg administrada en la cavidad intraperitoneal.¹¹

1.1.4 Excreción de drogas

La disposición de drogas en el organismo depende de los procesos de absorción, distribución y eliminación, metabolismo y excreción, los cuales controlan el tiempo de acción de una droga. Estos procesos determinan la concentración de drogas y sus metabolitos en la orina.²⁴ La excreción de drogas puede tener lugar por distintas vías: urinaria, biliar, sudor, saliva, leche y epitelios descamados. La urinaria es la más importante vía de excreción, sobre todo si se elimina de manera preferente o exclusiva por esta vía.²⁵ El riñón tiene una estructura adecuada para la excreción, contando con el funcionamiento de más de un millón de unidades estructurales especializadas denominadas nefrones ordenados anatómicamente. En base a las características del nefrón (ver Figura 3), se puede explicar el

proceso de excreción urinaria y que sustancias pueden excretarse por esta vía,²⁶ dicho proceso consta de las siguientes etapas: Filtración glomerular (glomérulo), secreción tubular (arteriola eferente) y reabsorción tubular (túbulo proximal) la cual dependerá de la liposolubilidad de la droga y del pH de la orina. El pH de la orina puede variar entre 4.5 y 8.0. La orina alcalina favorece la eliminación de ácidos débiles (ej. Barbitúricos, salicilatos) y la orina ácida aumenta la eliminación de bases débiles (ej. anfetaminas, quinidina).²⁵

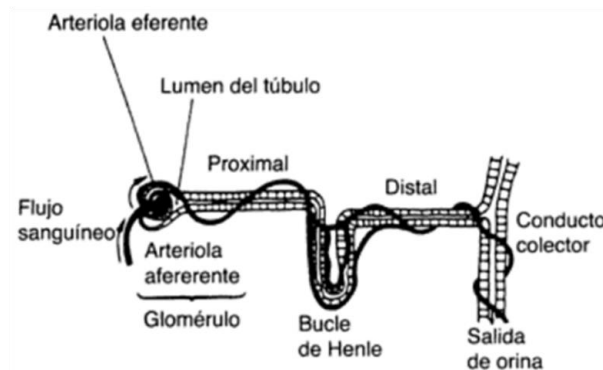


Figura 3. Representación esquemática de un nefrón.²⁶

La cantidad de una sustancia excretada por la orina es la suma de la filtración glomerular más la secreción tubular menos la reabsorción tubular.²⁵ Algunas drogas estimulantes que son generalmente administradas por vía oral, son rápidamente absorbidas por el intestino y pueden ser detectadas en orina pocos minutos después.²⁴ Lisi *et al*,²⁹ describieron un estudio de excreción de la metilhexanamina detectándola hasta 29 horas después de ser suministrada. Perrenoud *et al*,³⁰ detectaron la metilhexanamina en orina hasta 4 días después de ser suministrada, reportando la máxima concentración encontrada 4 horas después de ser suministrada.

1.2 Orina

La orina es una matriz biológica que consiste de un fluido excretado por los riñones, almacenado en la vejiga y descargado al exterior a través de la uretra.²⁷

La composición y características de la orina varían dependiendo de diversos factores como la ingesta de alimentos, características físicas del individuo, condiciones de vida, etc. Los principales componentes orgánicos de la orina son productos nitrogenados como la urea que es un producto del metabolismo de las proteínas, ácido úrico producto final del metabolismo de las bases nitrogenadas purinas, creatinina producto de la ciclización de la creatina proveniente del metabolismo muscular, y aminoácidos libres. Otros compuestos orgánicos que se encuentran en la orina son las hormonas y algunos de sus metabolitos y los urocromos que son pigmentos producidos por la degradación de la hemoglobina que contribuyen al color amarillo característico de la orina. Los constituyentes inorgánicos principales de la orina son los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y NH_4^+ y los aniones Cl^- , SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} . El NaCl es el electrolito más abundante en la orina representando aproximadamente dos terceras partes de todos los electrolitos en la orina final.²⁸ La metilhexanamina se ha logrado determinar en orina por extracción líquido-líquido seguida de su análisis por cromatografía de gases²⁹ y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas,³⁰ extracción en fase sólida seguida por CG-EM y por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.³¹

1.2.1 Muestreo

Hay muchas formas de recolectar la muestra de orina, la técnica elegida dependerá de los parámetros buscados. La técnica utilizada debe ser no invasiva, ya sea en un solo muestreo o en varios, dentro de un periodo corto de recolección (entre 2-4 horas) y el volumen de muestreo debe ser mayor a 50 mL²⁷. El código mundial antidopaje especifica un volumen mínimo de orina de 90 mL dividido en dos contenedores (contenedor A: 60 mL y contenedor B: 30 mL) además, la gravedad específica mínima debe ser de 1.005-1.010.³² Para la preservación de las muestras biológicas es muy importante tomar en cuenta la elección del empaque apropiado que las contiene y el almacenamiento bajo las condiciones

apropiadas (protección de humedad externa, calor excesivo y protección de la luz solar), con el fin de proteger su integridad y evitar su degradación.³³ Algunas condiciones de almacenamiento recomendadas para muestras de orina son: si se utilizará en menos de 24 horas, entre 2°C – 8°C y a largo plazo, por debajo de -10°C;³⁴ sin embargo, en un estudio en el que se determinó MHA en orina, la muestra de orina se dividió en contenedores de 20 mL y fue almacenada sin aditivos a -20 °C hasta el análisis.³⁰

1.3 Sustancias prohibidas determinadas en matrices biológicas

El efecto de la matriz que contiene al analito que se quiere determinar juega un papel muy importante en las mediciones analíticas.³³ Dependiendo de la sustancia química, será el medio biológico que se debe muestrear: aire exhalado, orina, sangre, etc.²⁷ De todas las matrices biológicas, la orina es la matriz más comúnmente muestreada para análisis de drogas; los riñones, los cuales la producen, son los órganos más importantes responsables de la eliminación/excreción de drogas y metabolitos del cuerpo humano.³⁵ Se han desarrollado métodos sensibles para la determinación de estimulantes prohibidos (anfetamina y metanfetamina entre otros) en muestras de orina, sangre y cabello humano.^{36- 39} Algunas alquilaminas estimulantes consideradas en la lista de sustancias prohibidas de la Agencia Mundial Antidopaje, entre ellas la metilhexanamina, se han detectado en muestras de orina utilizando como técnica de preparación de muestra: extracción en fase sólida³¹ y extracción líquido-líquido^{9,29}, seguido de cromatografía (gases y/o líquidos) acoplada a espectrometría de masas.

1.4 Cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los estimulantes representan una clase importante y frecuente de agentes dopantes, esto se debe a que afectan directamente los resultados de los atletas durante una competición. El análisis de algunas sustancias prohibidas usadas para mejorar el rendimiento en los atletas se ha realizado, entre otras técnicas, utilizando cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.^{5,15} En los métodos por cromatografía de gases se pueden identificar los siguientes pasos: preparación de la muestra y análisis cromatográfico (introducción de la muestra (inyección), separación cromatográfica y detección).⁵

Cromatografía de gases es un método de separación en el cual los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria y la otra un gas (fase móvil) que pasa a través de la fase estacionaria.⁴⁰ El instrumento en el que se lleva a cabo el proceso de separación es el cromatógrafo de gases, en el cual la muestra es volatilizada en un puerto de inyección a alta temperatura, el gas acarreador o fase móvil arrastra la muestra del inyector, a través de la columna y hasta el detector. La columna contiene la fase estacionaria que es un líquido no volátil, en donde la separación de los compuestos es determinada por el reparto de cada componente entre el gas acarreador y la fase estacionaria.⁴¹ El reparto de la muestra dentro de la fase estacionaria líquida, está basado en sus solubilidades a determinada temperatura. Los analitos serán separados en base a su presión de vapor, peso molecular y afinidad por la fase estacionaria. Los componentes separados y el gas acarreador llegan al detector, en donde es medida la cantidad proporcional de cada analito presente en la muestra. El detector más común es el detector de ionización de llama (FID por sus siglas en inglés), por tener características deseables tal como alta sensibilidad y linealidad.⁴⁰ El detector FID utiliza hidrógeno como gas de combustión el cual es quemado en un pequeño mechero (jet) situado dentro de un electrodo cilíndrico (colector); al aplicar una diferencia de potencial entre el jet y el electrodo, cuando pasa por la llama algún

componente de la muestra que contiene carbono en su estructura, se forman por un proceso de oxidación fragmentos oxidados o parcialmente oxidados que generan electrones por emisión termoiónica. Los pares ion/electrón formados son colectados y la corriente generada es amplificada y registrada en un sistema computacional de adquisición de datos para obtener un cromatograma.⁴²

Algunas desventajas de la CG es que solo se utiliza para el análisis de muestras volátiles, para compuestos no volátiles es necesario derivarlos, no es adecuada para muestras termolábiles además, utilizando un detector convencional como el FID no es posible confirmar la identidad o estructura de los compuestos separados.⁴⁰ Por otra parte la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases como sistema de detección, tiene la habilidad de proporcionar información estructural para identificación de los compuestos separados. Los componentes de la muestra separados por el CG se introducen en el espectrómetro de masas por medio de una línea de transferencia calentada. Los componentes de la muestra son ionizados en la cámara de ionización del espectrómetro, seguido por la separación en el analizador de masas de los fragmentos ionizados en función de su relación masa-carga (m/z). Las señales generadas son amplificadas por un electromultiplicador, para ser detectadas y la adquisición de los datos es almacenada en un sistema computacional para su posterior procesamiento. Al final de un análisis por CG-EM se genera un cromatograma de corriente iónica total (TIC por sus siglas en inglés) de la muestra y un espectro de masas de los componentes de la muestra. El TIC es análogo a un cromatograma de gases de detección universal, en el cual la suma de las abundancias de cada ion detectado sobre un intervalo de masas específico, trazan la corrida cromatográfica a través del tiempo. El espectro de masas es una visualización del patrón de fragmentación de los componentes de la muestra de acuerdo con la abundancia de los iones detectados en base a su relación m/z .⁴³

La reproducibilidad en la inyección a menudo representa un problema en cromatografía de gases debido a que se inyectan volúmenes muy pequeños. Para resolver este problema, se han utilizado métodos que establecen relaciones entre

la muestra y una sustancia de características similares a los analitos de interés que se denomina estándar interno, con el fin de que muestra y estándar sean afectados por las mismas variables que afectan la inyección. El estándar interno debe ser una sustancia que produce un pico separado de los picos de la muestra, con una resolución mayor o igual que 1.25 pero que se encuentre cerca de estos. El principio del estándar interno se basa en los cálculos de los valores relativos del analito y el estándar interno, determinados dentro del mismo análisis. El tiempo en el cual se adiciona el estándar interno depende de los requerimientos del análisis.⁴⁴

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se ha utilizado para determinar si el extracto de geranio contiene metilhexanamina o si este estimulante es adicionado^{29,9}. También se encuentra reportado el uso de esta técnica (CG-EM) para identificar los diastereoisómeros de metilhexanamina en suplementos nutricionales⁴⁵, para confirmar la identificación de metilhexanamina y diferenciarla de otras alquilaminas de bajo peso molecular en orina³¹.

1.5 Separación de compuestos quirales

La quiralidad molecular juega un papel importante en las funciones biológicas y físicas que se generan a través del reconocimiento molecular preciso de las enzimas, receptores y otros sitios naturales de unión con los que los sistemas biológicos interactúan con diferentes enantiómeros. Como resultado de este reconocimiento quiral, las drogas enantioméricas pueden diferir en sus propiedades farmacológicas o toxicológicas. Las técnicas de separación quiral empleadas en cromatografía se pueden clasificar como directas e indirectas. El método más comúnmente empleado de separación directa es el basado en la formación de complejos diastereoméricos reversibles entre el analito y una molécula huésped estereoselectiva que representa la fase estacionaria quiral (por ejemplo las ciclodextrinas).⁴⁶ La separación indirecta se basa en la formación de derivados diastereoméricos al reaccionar con un agente quiral

enantioméricamente puro seguido de la separación de los diastereoisómeros en una columna convencional con fase estacionaria no quiral, debido a que los diastereoisómeros tienen propiedades fisicoquímicas diferentes entre sí. La separación indirecta es menos costosa por el hecho de utilizar columnas cromatográficas convencionales, además tiene mayor flexibilidad al utilizar diferentes tipos de columnas no quirales y numerosos tipos de reactivos derivatizantes.⁴⁷

1.6 Derivación

La naturaleza de los compuestos a analizar afecta al tipo de cromatografía a utilizar, para algunos, la cromatografía de gases o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es la mejor y para algunos otros la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). CG y CG-EM a menudo requieren reacciones de derivación. Los procedimientos por cromatografía de gases son los que más utilizan derivación pre-cromatográfica, pues el análisis en fase vapor requiere derivados volátiles.⁴⁸ La baja volatilidad de un compuesto puede ser a causa del gran tamaño de las moléculas resultando en fuerzas de dispersión grandes que mantienen las moléculas unidas. En moléculas pequeñas la baja volatilidad puede venir de la fuerte atracción intermolecular entre grupos polares. En el primer caso la derivación no puede incrementar la volatilidad, pero en el último caso el enmascaramiento de los grupos polares por derivación puede producir un incremento espectacular en la volatilidad.⁴⁹ El análisis por CG de aminas libres por lo general presenta varios inconvenientes inherentes, las aminas libres tienden a ser adsorbidas y descomponerse en las columnas, resultando en la elución de picos coleados, fenómeno de picos fantasma y baja sensibilidad en la detección. La capacidad de adsorción de aminas en los sistemas analíticos, (por ejemplo contenedores de la muestra, sistema de inyección, lana de vidrio y columnas de CG), es en el orden primarias > secundarias > terciarias, y es generalmente más difícil de separar aminas alifáticas que aromáticas. Un método común para superar estos problemas es convertir compuestos polares a derivados

relativamente no-polares más adecuados para el análisis por CG. Los métodos de derivación son empleados para reducir la polaridad de los grupos amino y mejorar su capacidad para ser separados en columnas de CG.⁵⁰

La derivación se suele utilizar para conferir mejor detectabilidad a los compuestos de la muestra. Los derivados de halógenos en particular se usan para aumentar la sensibilidad en análisis de trazas con el detector de captura de electrones (ECD). En general los sustituyentes halógenos incrementan la afinidad electrónica en el orden $I > Br > Cl > F$. La derivación química puede también emplearse para reducir la contribución a la descomposición térmica o catalítica en los espectros de masas, estabilizando la formación de iones en el espectrómetro de masas para favorecer a la información estructural de los patrones de fragmentación.⁴⁹ Desde el punto de vista analítico, los estimulantes, narcóticos y β -bloqueadores se pueden agrupar juntos debido a su comportamiento analítico similar. La mayoría de estas sustancias son bases que contienen nitrógeno, excretadas en orina como compuestos libres o conjugados simultáneamente con sus metabolitos.⁵ La derivación de grupos amino constituye una de los más grandes campos de aplicación de las reacciones de derivación analítica. Aunque muchos amino compuestos son suficientemente volátiles para su análisis directo por CG y EM, los grupos polares N-H y los electrones libres en el nitrógeno pueden causar adsorción y coleo en CG. En efecto, analizando en muy bajos niveles, tal adsorción llega a causar la pérdida total de la muestra. Entonces los métodos de derivación se utilizan para reducir la polaridad de los grupos amino y mejorar el comportamiento en CG de los compuestos. La derivación de los grupos amino puede también ser empleada para lograr la separación de compuestos que de otra manera no se separarían.⁴⁹ Las reacciones de derivación, las cuales son a menudo selectivas por el tipo de amina (por ejemplo, aminas primarias, secundarias o terciarias), se han utilizado para mejorar su detección y separación. Además, la derivación puede ayudar a incrementar las propiedades en espectrometría de masas, obteniéndose espectros de masas más fáciles de interpretar, con iones de masas de mayor calidad y derivados de los iones moleculares, que pueden ser utilizados para análisis de trazas. Entre los derivados

utilizados para el análisis de aminas por CG están los derivados de sililo, acilo, alquilo, carbamato, sulfonamida, bases de Schiff y tiourea.⁵⁰

1.6.1 Sililación

Los derivados de sililo se forman por el reemplazo de un hidrógeno activo en los grupos NH.⁴⁹ La sililación es probablemente la técnica más versátil disponible para mejorar el desempeño en CG. Esto implica el bloqueo de sitios próticos, de este modo se reducen las interacciones dipolo-dipolo y se incrementa la volatilidad y las propiedades para CG, produciendo picos estrechos y simétricos. Sin embargo, los derivados de sililo son poco utilizados para el análisis por CG de aminas, debido a su inestabilidad hidrolítica y su alta actividad sililo-donadora.⁵⁰ Los grupos amino no son muy reactivos con los compuestos sililantes, y su conversión a un derivado de sililo es difícil. Utilizando agentes fuertemente sililantes y catalizadores, es posible preparar los derivados sililo de aminas.⁵¹ Algunos reactivos sililantes se muestran en la Tabla 2.⁵²

Tabla 2. Algunos reactivos sililantes comerciales.

Reactivo	Sinónimo	Características especiales
Aliltrimetilsilano	Allyl-TMS	Solamente propeno como subproducto
N, O-Bis(trimetilsilil) acetamida	BSA	Reactivo universal
N, O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	BSTFA	Altamente reactivo, más volátil que BSA
Hexametildisilazano	HMDS	Subproductos gaseosos
n-Metil-N-trimetilsililacetamida	MSA	Puede actuar como disolvente para compuestos polares
N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida	MSTFA	Altamente reactivo, incluso más volátil que BSTFA
Clorotrimetilsilano	TMCS	Universal
N, N-Dietiltrimetilsililamina	TMSDE	Subproductos volátiles, selectivo para grupos hidroxilo ecuatoriales
1-(Trimetilsilil)imidazol	TMSI	Altamente reactivo, discrimina grupos amino

Sin embargo, estos reactivos no solamente reaccionan con grupos amino, sino que también reaccionan con grupos hidroxilo y carbonilo bajo condiciones anhidras. La facilidad de reaccionar con estos reactivos es en el orden alcoholes > fenoles > ácidos carboxílicos > aminas > amidas. Un problema adicional en la silylación de aminas primarias surge de la posibilidad de reemplazar ambos protones, resultando en la formación de productos mono- y di-TMS.

1.6.2 Formación de carbamatos

Los cloroformiatos con grupos simples alquilo, por ejemplo metilo, etilo e isobutilo, se conocen desde hace años como reactivos favorables para la derivación de grupos amino en cromatografía de gases. La mayoría de las reacciones de derivación utilizan reactivos no polares que requieren disolventes orgánicos los cuales no son compatibles directamente con muestras acuosas; por el contrario, los cloroformiatos se han utilizado ampliamente para convertir aminas en carbamatos en medio acuoso tamponado. Además, estas reacciones proceden rápidamente a temperatura ambiente.⁵³ La determinación de aminas alifáticas (n-propilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina) en muestras de agua se ha realizado satisfactoriamente por CG-EM después de la formación de sus correspondientes derivados tricloroetil carbamatos.⁵⁴ Los alquilcloroformiatos se han utilizado para la determinación de estimulantes en matrices biológicas. La determinación de anfetaminas en matriz de orina, se ha llevado a cabo ajustando las muestras a pH=10.8, seguido de la adición del cloroformiato correspondiente (butil-, propil- o metilcloroformiato) para obtener como productos carbamatos estables, que fueron extraídos por microextracción en fase sólida con una fibra de polidimetilsiloxano y analizados por cromatografía de gases.⁵⁵ Los alquilcloroformiatos constituyen un grupo de reactivos derivantes con características muy favorables para la determinación de compuestos con grupos amino por cromatografía de gases, convierten fácil y cuantitativamente las aminas en carbamatos, los cuales exhiben buenas propiedades cromatográficas. Además, los derivados formados generalmente presentan propiedades interesantes en

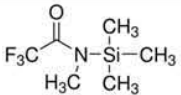
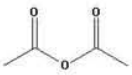
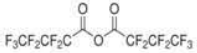
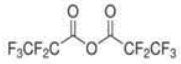
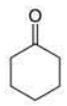
espectrometría de masas. Entre los clorofomiatos, el isobutilcloroformiato se ha utilizado adecuadamente para la determinación de aminas biogénicas en bebidas alcohólicas,⁵⁶ 4-(5)metilimidazol (compuesto con fuerte actividad convulsiva) en colorantes alimenticios,⁵⁷ determinación de aminas alifáticas y aromáticas en matrices ambientales que incluyen: aguas residuales, agua de río, mar y sedimentos.⁵⁸

1.6.3 Derivación de la metilhexanamina

Otra forma de derivación de grupos polares como NH utilizada comúnmente es la acilación derivación.⁴⁹ En EM los derivados de acilo tienden a producir patrones de fragmentación claros de interpretar y proporcionan información útil de las estructuras de dichos compuestos.⁵⁹ La acilación es una de las reacciones más populares de derivación para aminas primarias y secundarias. Las reacciones tipo base de Schiff se utilizan para condensar aminas primarias con compuestos carbonílicos,⁵¹ se desarrollan a temperatura ambiente para minimizar la formación de subproductos.⁶⁰ Se ha reportado un método para la determinación de anfetamina, metanfetamina y efedrinas en muestras de orina, que fue superior a los métodos basados en la derivación con reactivos acil y trimetilsililados.⁶¹

La metilhexanamina es una amina alifática primaria de cadena corta que puede presentar problemas de adsorción en los sistemas de cromatografía de gases debido a la considerable polaridad de la molécula ($\text{Log } P_{\text{OW}} = 2.1$) por la presencia del grupo $-\text{NH}_2$. Este tipo de inconvenientes se han superado al convertir los compuestos polares a derivados menos polares por medio de una reacción química de derivación. La Tabla 3 muestra algunas reacciones que se han utilizado para obtener derivados de la MHA más aptos para su determinación en diferentes matrices por cromatografía de gases.

Tabla 3. Algunos métodos de extracción y condiciones de reacción de la MHA.

Matriz	Condiciones de reacción y tipo de extracción	Tipo de reacción y referencia	Reactivo derivatizante
Orina	SPE T: 60°C t: 10 min	<u>Sililación</u> J. Chrom. A, 1298 (2013) 76-85	 N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA)
Suplemento	Extracción S – L T: 80°C t: 30 min	<u>Acilación</u> Forensic Sci. Int. 231 (2013) 113-119	 Anhídrido trifluoroacético (TFAA)
Aceite esencial	Extracción L – L pH: 9-10 T: ambiente t: 1 h	<u>Acilación</u> Journal Anal. Tox. 36 (2012) 457-471	 Anhídrido heptafluorobutírico (HFBA)
Suplemento	Extracción L – L pH: 9-10 T: 50 °C t: 30 min	<u>Acilación</u> J. Drug and Test. A. 4 (2012) 986-990	 Anhídrido pentafluoropropionico (PFPA)
Orina	Extracción L – L pH: KOH 5M T: 25°C t: 20 min	<u>Bases de Shiff</u> J. Chrom. B 877 (2009) 3767- 3770	 Ciclohexanona

1.7 Técnicas de preparación de muestra

En general, el análisis de compuestos específicos presentes en matrices biológicas, incluida la orina, no se pueden analizar directamente. La compleja composición de las matrices biológicas puede provocar interferencias en la detección. Además, en el caso de las técnicas cromatográficas, la presencia de compuestos con retención alta por su baja solubilidad en la fase móvil o escasa presión de vapor provoca que se ensucie el sistema aumentando la señal de fondo y el ruido, e incluso modificando la retención de los analitos de interés. Debido a esto, la muestra tiene que ser “preparada” con el fin de que los analitos sean extraídos o aislados de la matriz. La preparación de muestra consiste en una o más operaciones necesarias para modificar la muestra a modo de liberar los analitos de forma conveniente para su análisis por el procedimiento cromatográfico elegido; es el paso intermedio entre la muestra y el análisis cromatográfico. La preparación de muestra es un proceso necesario en la transformación de una muestra a modo de hacerla idónea para el análisis químico o mejorar el análisis. Se utiliza cuando una muestra dada no se puede analizar directamente o cuando el análisis directo genera pocos resultados debido a interferencias con los analitos de interés, baja sensibilidad o nula detección de los analitos. La preparación de muestra se utiliza en general para eliminar interferencias e incrementar la sensibilidad.⁶² La disminución o ausencia de disolventes, la reducción del tiempo y costos del análisis son de suma importancia en el desarrollo de procedimientos modernos, efectivos y aplicables en la práctica.⁶³ Se ha logrado modificar antiguos métodos para incorporar procedimientos que utilicen menos compuestos químicos peligrosos o para reducir las cantidades de disolventes y residuos.⁶⁴ Las técnicas miniaturizadas son una tendencia importante en la química analítica que cumplen con las exigencias mencionadas. El uso de las microextracciones como técnicas alternativas para preparación de muestra reduce el número de errores que resultan comunes en los procedimientos que involucran muchos pasos, y limita el impacto negativo sobre el ambiente y la salud de los químicos analíticos que desarrollan trabajo de laboratorio. La reducción de la cantidad de disolventes orgánicos empleados durante los procesos de extracción se traduce en la

disminución de costos en el tratamiento y disposición final de residuos y disolventes utilizados.⁶⁵ Ejemplos típicos de técnicas de miniaturización para preparación de muestra incluyen: extracción en fase sólida en disco y en línea, microextracción en fase sólida, extracción por sorción con barra de agitación,³³ extracción líquido-líquido asistida por adición de sal (SALLE por sus siglas en inglés), microextracción: líquido-líquido dispersiva (DLLME por sus siglas en inglés), con gota suspendida (SDME por sus siglas en inglés), líquido-líquido asistida por vortex (VALLME por sus siglas en inglés), en fase líquida sobre fibra hueca (HF-LPME por sus siglas en inglés), líquido-líquido asistida por aire (AALLME por sus siglas en inglés), entre otras.^{65- 69}

1.7.1 Extracción líquido-líquido asistida por adición de sal (SALLE)

1.7.1.1 Introducción

La extracción líquido-líquido es una de las más antiguas técnicas de extracción utilizadas frecuentemente para matrices acuosas con composición compleja. Esta técnica se basa en el tratamiento secuencial de la muestra con porciones frescas de un disolvente o una serie de disolventes de diferente polaridad inmiscibles con la muestra, obteniendo varias fracciones del extracto enriquecidas con un analito o un grupo de analitos. Sin embargo, al ser un procedimiento analítico multi-pasos, requiere mucho tiempo e intensa labor así mismo el riesgo de perder los analitos o de contaminar la muestra se incrementa al tener un mayor número de operaciones sobre la misma muestra.⁶⁵ A través del tiempo se han utilizado variantes de diferentes técnicas para mejorar la técnica original o para disminuir el consumo de reactivos, disolventes, costos, tiempo de preparación, etc. La extracción líquido-líquido ha sido modificada con el fin de cumplir estas exigencias. La extracción líquido-líquido asistida por microondas se ha utilizado para extraer varios narcóticos (triamcinolona, prednisolona, clorotiazida, clortalidona y oxandrolona) en tiempo de 30-60 segundos.⁶³ La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME por sus siglas en inglés) se ha utilizado para la determinación de aminas aromáticas en muestras acuosas utilizando simultáneamente butilcloroformiato

como derivatizante y extractante.⁶⁸ La microextracción líquido-líquido asistida por vortex se ha utilizado para la determinación de aminas alifáticas primarias de cadena corta y derivados del furfural en matrices alimenticias con tiempos de preparación de muestra de menos de 15 minutos.^{66,70} La extracción líquido-líquido asistida por adición de sal se ha aplicado en la determinación simultánea de un fármaco hidrófobo (codificado como ABT-869) y su metabolito (codificado como A-849529) en plasma, determinación de sulfonamidas en matrices alimenticias (miel), ambientales (agua de río) y biológicas (orina), fluoroquinolonas en leche, análisis de biomarcadores en orina, determinación de fungicidas bencimidazoles en muestras con alta salinidad, etc.^{71- 75}

1.7.1.2 Descripción de la técnica

La extracción líquido-líquido asistida por adición de sal (SALLE por sus siglas en inglés: salting out-assisted liquid-liquid extraction) es una técnica basada en la extracción líquido-líquido en la cual se adiciona una determinada concentración de sal para lograr la separación de la fase acuosa de la parcialmente miscible fase orgánica.⁶⁹ La extracción líquido-líquido se refiere a la transferencia de un compuesto o compuestos desde un líquido (por ejemplo: agua o matrices acuosas) a otro líquido inmiscible generalmente orgánico⁷⁶. La extracción del compuesto químico **X** de la fase líquida **A** se realiza al poner en contacto la solución de **X** con una segunda fase **B**, la cual es inmiscible con la fase **A**. Ocurre entonces una distribución entre las dos fases; el analito es recuperado de la fase **B**. En base a la teoría de equilibrio químico, la distribución se puede describir como una reacción reversible (*ecuación 1*):



la constante de equilibrio, la cual se conoce como *ley de distribución de Nerst*, está dada por la *ecuación 2*:

$$K_D = \frac{[X]_B}{[X]_A} \quad \dots\dots\dots 2$$

los corchetes denotan la concentración de **X** en cada fase a temperatura constante. Por convención la concentración del extracto en la fase **B** aparece en el numerador de la *ecuación 2*. La constante de equilibrio es independiente de la velocidad a la cual es alcanzado el equilibrio. Al optimizar las condiciones de extracción se puede lograr que la distribución del soluto entre las fases se favorezca hacia el lado derecho de la ecuación 1, en este caso el valor de K_D es grande indicando un alto grado de extracción de la fase **A** a la fase **B**. Cuando K_D es pequeño, una menor cantidad de **X** es transferida de la fase **A** a la fase **B**. si K_D es igual a 1, entonces hay concentraciones equivalentes en cada fase.³³ La técnica SALLE conlleva la reducción de la solubilidad de un no electrolito en una fase acuosa miscible (combinación de agua y un disolvente orgánico miscible en agua) por la adición de un electrolito que promueve la separación de esta, seguido por la extracción simultánea del soluto objetivo en la fase orgánica separada⁷⁷. El método SALLE es sencillo, rápido, con posibilidad de automatización, libre de etapas de secado y ambientalmente amigable.⁷⁸

1.7.1.3 Parámetros de optimización

Algunas propiedades químicas de los analitos son fundamentales en el proceso de extracción (presión de vapor, solubilidad, hidrofobicidad y pH), así como las propiedades del medio líquido en el cual están disueltas y el líquido que se utilizará como extractante.³³

1.7.1.3.1 Hidrofobicidad

La interacción hidrofóbica se define como la tendencia de solutos con grupos o cadenas hidrocarbonadas a formar agregados intermoleculares en un medio acuoso, y análogamente interacciones intramoleculares. El nombre surge de la atribución del fenómeno aparente de repulsión entre el agua e hidrocarburos.⁷⁹ La

expresión de la constante de equilibrio en la ecuación 2, puede ser reescrita para expresar la distribución del soluto **X** entre agua (**W**) y n-octanol (**O**) (ecuación 3):

$$K_{OW} = K_D = \frac{[X]_O}{[X]_W} \dots\dots\dots 3$$

El coeficiente de partición n-octanol/agua K_{OW} (también es encontrado como P_{OW} , P , P_{oct}), es una definición operacional o fenomenológica adimensional de la hidrofobicidad basado en el sistema de referencia n-octanol/agua. La cantidad de un soluto transferida de agua a un disolvente inmiscible específico no es idéntico a la transferencia de masa observada en el sistema n-octanol/agua, pero el K_{OW} es a menudo directamente proporcional a el reparto de un soluto entre agua y otras fases hidrófobas variadas. Entre mayor es el valor K_{OW} , mayor es la tendencia del soluto a escapar del agua y ser transferido a una fase hidrófoba. La base en el proceso de extracción es que, los compuestos hidrofílicos más polares prefieren la fase acuosa (polar) mientras que los compuestos hidrofóbicos más no-polares prefieren el disolvente orgánico.⁸⁰ Cuando se comparan los valores de K_{OW} de dos solutos, aquel con el mayor número es el más hidrófobo de los dos. La magnitud del coeficiente de reparto n-octanol/agua varía con la estructura molecular orgánica e incrementa generalmente con el peso molecular. Debido a que las diferencias en K_{OW} son de varios órdenes de magnitud, los valores de hidrofobicidad a menudo se encuentran reportados en escala logarítmica ($\log K_{OW}$ o $\log P$).³³

1.7.1.3.2 Solubilidad

El principio de la extracción líquido-líquido se basa en que una muestra se distribuye entre dos líquidos inmiscibles o fases en las cuales el compuesto y la matriz tienen diferentes solubilidades.⁸⁰ La solubilidad se define como la composición analítica de una solución saturada; la solubilidad de un soluto es la proporción de ese soluto en un disolvente designado.⁷⁹ Existe una relación inversa entre la solubilidad en agua y la hidrofobicidad, una alta solubilidad es generalmente acompañada por una baja hidrofobicidad y viceversa. Sin embargo

la solubilidad en agua es una propiedad medida a la máxima capacidad o saturación mientras que el coeficiente de reparto n-octanol/agua mide la distribución a través de una interfase, lo que no permite que sea formal esta relación inversa pues corresponden a diferentes fenómenos. No obstante la solubilidad en agua de un soluto puede servir de apoyo cuando el K_{OW} no está disponible. Aunque los disolventes pueden formar dos diferentes fases visibles cuando se mezclan, tienen a menudo una parte soluble del otro disolvente, saturándose mutuamente cuando ambos se mezclan. Los datos de la solubilidad de varios disolventes en agua así como la solubilidad del agua en estos disolventes deben ser considerados al desarrollar metodologías por extracción líquido-líquido. Por ejemplo, la solubilidad del acetato de etilo en agua es de 8.7% (peso/peso) mientras que la solubilidad de un hidrocarburo como el n-hexano es de 0.014% (peso/peso); por otro lado la solubilidad del agua en acetato de etilo es de 3.3% (peso/peso).³³

1.7.1.3.3 pH

El valor de pH en extracción líquido-líquido tiene un impacto significativo en la relación de distribución para compuestos ácidos o básicos. Por lo tanto, el ajuste del pH juega un papel muy importante en extracciones ácidas o básicas. Como regla general, las especies iónicas prefieren permanecer disueltas en la fase acuosa, mientras que las especies neutras en la fase orgánica. En base a lo anterior, ciertos compuestos pueden ser separados entre fase acuosa y orgánica ajustando el valor de pH.³⁵ El carácter ácido o básico de un compuesto y el pH de la fase acuosa determinan la distribución de las especies ionizadas - no ionizadas en solución.³³

1.7.1.3.4 Adición de sal

El término desplazamiento salino (“salting-out”) se refiere a la adición de un electrolito a una fase acuosa con el fin de incrementar la relación de distribución de un soluto, además se utiliza también para describir la adición de electrolitos para reducir la miscibilidad parcial de dos líquidos.⁸¹ En química analítica es muy diverso el uso de esta técnica, se ha utilizado para incrementar la volatilidad de los analitos en extracciones por espacio de cabeza (headspace), para promover la precipitación de proteínas en muestras biológicas o para mejorar los recobros en extracciones líquido-líquido.⁸²

1.7.2 Microextracción en fase sólida (MEFS)

1.7.2.1 Introducción

Los procesos analíticos consisten en varios pasos (separación, cuantificación, análisis de datos, entre otros), los cuales son críticos para obtener resultados exactos y reproducibles. Un paso de preparación de muestra es a menudo necesario para aislar los componentes de interés de la matriz de la muestra, así como purificar y concentrar los analitos. Sin embargo, a causa de la contaminación y el daño ocasionado por hidrocarburos, nacieron iniciativas internacionales para eliminar la producción y uso de disolventes orgánicos, de los cuales muchos métodos de preparación de muestra dependían. Estos hechos representaron la oportunidad para la comunidad científica de desarrollar alternativas prácticas para los métodos existentes. Una técnica de preparación de muestra ideal debería ser libre de disolventes orgánicos, simple, selectiva y compatible con un amplio intervalo de métodos de separación y aplicaciones. La microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica de preparación de muestra libre de disolventes que puede integrar el muestreo, extracción, concentración e introducción de la muestra en un solo sistema.⁸³ MEFS fue introducida por Arthur y Pawlisyn en 1990. Se desarrolló con el objetivo de tener una preparación de muestra rápida, tanto en el laboratorio como en el sitio de muestreo. El nombre de la técnica, microextracción

en fase sólida, se nombró originalmente por los primeros experimentos en los que la extracción se realizaba sobre fibras de sílice fundida sólida sin embargo, se reconoce que la fase extractante no es siempre sólida.⁸⁴ La microextracción en fase sólida se ha utilizada para muchas aplicaciones en el análisis de drogas de abuso y fármacos, al acoplarla con instrumentos cromatográficos como CG, CG-EM, entre otros.⁸⁵ El análisis de algunos compuestos traza en agua o aire se ha logrado mejorar al acoplar MEFS con la derivación de los analitos por las siguientes formas: directamente en la matriz de la muestra, en el recubrimiento de la fibra MEFS o en el puerto de inyección. Existen muchas reacciones de derivación *in-situ* dependiendo del grupo funcional, en algunos casos el mismo reactivo puede ser utilizado para diferentes grupos funcionales.^{86,87} Se ha logrado determinar una amplia variedad de aminas aromáticas al derivatizarlas directamente en la matriz acuosa previo a la extracción MEFS;^{88,89} algunas aminas biogénicas también se han determinado combinando MEFS y derivación *in-situ* en orina con propilcloroformiato.⁹⁰ Se han reportado métodos basados en microextracción en fase sólida y derivación *in-situ* con isobutilcloroformiato para la determinación simultánea en orina y suero de estimulantes como las anfetaminas y éxtasis⁹¹, anfetamina y metanfetamina⁹², entre otros.

1.7.2.2 Descripción de la técnica

Es un método de extracción libre de disolvente que emplea una fibra de sílice fundida recubierta con una fina película de sorbente, para extraer analitos (volátiles o semi volátiles, cuando el método de análisis es por CG) de una muestra. La fibra está alojada dentro de una aguja de jeringa que la protege y permite una fácil penetración en el septo del vial de la muestra y del cromatógrafo. La Figura 4 muestra una representación del dispositivo MEFS. Hay dos formas para el muestreo de MEFS para compuestos orgánicos volátiles: modo directo o inmersión y espacio de cabeza o “headspace”. En el muestreo por inmersión, la fibra se coloca directamente dentro de la matriz de la muestra y por headspace la fibra se sitúa en el espacio en fase gaseosa por encima de la muestra.³³ La

extracción en MEFS se lleva a cabo cuando la fase sorbente se pone en contacto con la matriz de la muestra o el espacio de cabeza por determinado tiempo. Si el tiempo es suficientemente grande, se alcanza el equilibrio entre la matriz y la fase de extracción. Cuando las condiciones de equilibrio se alcanzan, la exposición de la fibra por más tiempo no incrementa más la concentración de los analitos en la fibra.⁹³

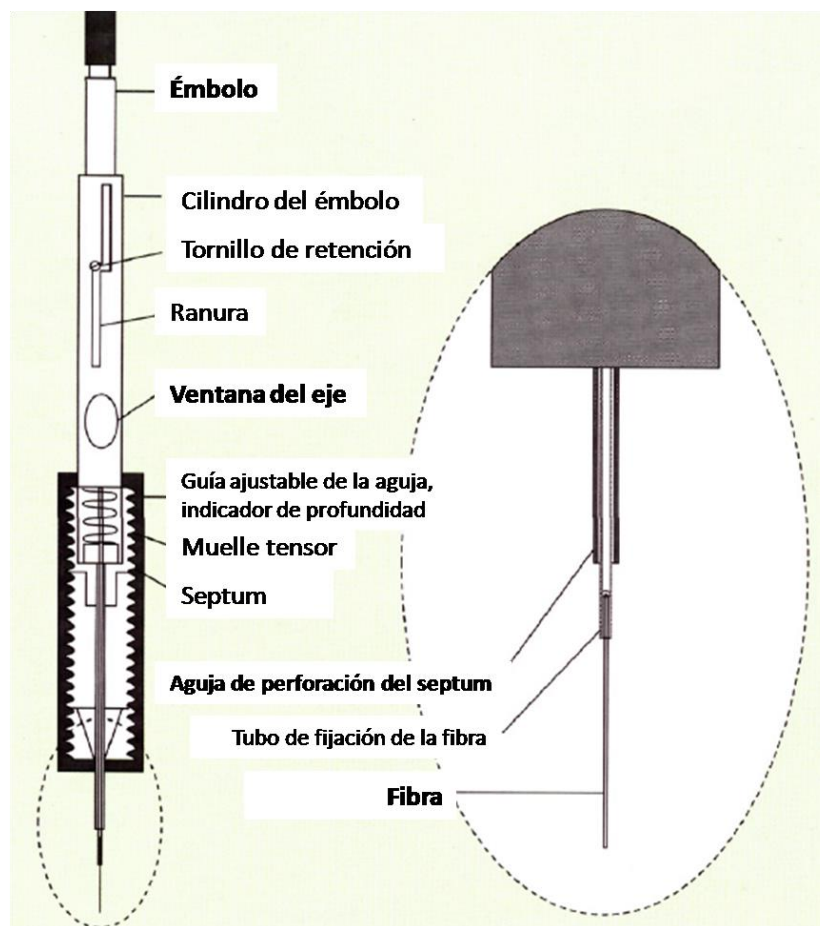


Figura 4. Dispositivo para microextracción en fase sólida.⁸³

1.7.2.3 Proceso de extracción

La microextracción en fase sólida consta de un paso de extracción y otro de desorción. El mecanismo de extracción en modo de espacio de cabeza de un analito "i" se basa en el equilibrio de reparto entre tres fases, muestra (s), espacio de cabeza (h) y la fibra (f), como se muestra en la ecuación 4.

$$i_s \stackrel{K_{hs}}{\rightleftharpoons} i_h \stackrel{K_{fh}}{\rightleftharpoons} i_f \dots\dots\dots 4$$

La constante de reparto K_{hs} corresponde al equilibrio entre el analito en el espacio de cabeza y la muestra. El equilibrio entre el analito en el recubrimiento de la fibra y el espacio de cabeza está dado por la constante de equilibrio K_{fh} .

$$\text{si } K_{hs} = \frac{C_h}{C_s} \text{ y } K_{fh} = \frac{C_f}{C_h} \dots\dots\dots 5$$

$$\text{el balance de masa } C_o V_s = C_f V_f + C_h V_h + C_s V_s \dots\dots\dots 6$$

$$\text{se puede expresar } C_f V_f = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f C_o V_s}{K_{fh} K_{hs} K_f + K_{hs} V_h + V_s} \dots\dots\dots 7$$

La *ecuación 7* relaciona la cantidad del analito que se extrae en el recubrimiento de la fibra con la cantidad inicial del analito en la muestra, asumiendo que se ha alcanzado el equilibrio.

1.7.2.4 Parámetros de optimización

El objetivo del desarrollo de métodos MEFS es la optimización de los parámetros que influyen la sorción selectiva y la desorción de los analitos. Entre los parámetros a optimizar se encuentran: naturaleza de la fase de la fibra, elección entre extracción directa o en espacio de cabeza, tiempo de extracción, temperatura de extracción, ajuste de fuerza iónica, pH de la muestra, temperatura de desorción en análisis por CG, tiempo de desorción, entre otros.⁶²

1.7.2.4.1 Elección de la fase de extracción

La eficiencia del proceso de extracción MEFS es dependiente de la constante de distribución de la fibra y la muestra (ver *Ecuación 7*), éste es un parámetro característico que describe las propiedades del recubrimiento y su selectividad

hacia el analito de interés descartando otros componentes de la matriz. Se encuentran disponibles comercialmente fibras MEFS recubiertas con diferentes materiales poliméricos (líquidos y sólidos porosos) o mezclas de estos de diferentes polaridades, espesor y longitud. Los mecanismos de extracción de los analitos con fibras MEFS que contienen recubrimientos líquidos (ejemplo: polidimetilsiloxano y poliacrilato) o sólidos porosos (divinilbenceno, carboxen) son muy diferentes; si se utiliza un recubrimiento líquido, los analitos se distribuyen sobre la fase extractante y son disueltos por las moléculas del recubrimiento, en este caso el mecanismo de extracción del analito será por absorción. Por otro lado, en los recubrimientos sólidos la extracción se lleva a cabo sobre la superficie del recubrimiento o por un mecanismo de adsorción⁹⁴. La absorción es un proceso que se basa en la distribución de un compuesto entre dos fases inmiscibles. El proceso de distribución es determinado por la fugacidad relativa de un compuesto en cada fase, y el equilibrio puede ser descrito por un sistema de dos fases por una constante de equilibrio adimensional (constante de distribución). Por otro lado, los mecanismos de adsorción pueden ser numerosos. Las moléculas pueden ser asociadas con las superficies de los adsorbentes por fuerzas intermoleculares de Van Der Waals y dipolo-dipolo entre otras. Las interacciones hidrofóbicas llevan a las moléculas de la fase acuosa hacia la superficie del adsorbente. Si el sólido es poroso y los poros son pequeños (menos de 100 Å), algunas moléculas tenderán a condensarse dentro de los pequeños poros (condensación capilar) afectando la capacidad de adsorción del sólido. Una diferencia importante entre los mecanismos de absorción y adsorción es que en la adsorción hay un número limitado de sitios en la superficie en donde el proceso se lleva a cabo, entonces cuando los sitios activos son ocupados, no pueden ser atrapados más analitos. Esto significa que el intervalo dinámico del sólido, no es tan amplio como en los recubrimientos líquidos, y que la dependencia entre la concentración de un analito en la muestra y la cantidad extraída por el recubrimiento MEFS tipo adsorción puede ser lineal solamente en un intervalo estrecho de concentraciones⁹⁵. Además la idoneidad de la fibra para un compuesto específico está determinada por la polaridad del recubrimiento (“lo igual disuelve a lo igual”); las fases con un solo

polímero no polares como PDMS y polares como poliacrilato (PA) proporcionan alta capacidad para la extracción de compuestos no polares y polares respectivamente. Las fases mixtas como PDMS/divinilbenceno o divinilbenceno/carboxen/PDMS son adecuadas para la extracción de analitos volátiles de baja masa molecular y analitos polares. En la literatura se encuentra recomendado el uso de la fase polimérica mixta PDMS/DVB para el análisis de aminas por CG.⁹⁴

1.7.2.4.2 Modo de extracción

La elección del modo de extracción, inmersión directa o en espacio de cabeza (HS por sus siglas en inglés), está basada en la naturaleza de la muestra. Para compuestos con alta solubilidad en agua o con baja volatilidad, se utiliza generalmente extracción por inmersión. Compuestos altamente volátiles y con baja solubilidad en agua son extraídos comúnmente en el espacio de cabeza. Es importante considerar en este punto del desarrollo la degradación de la fibra, al utilizarla por inmersión en matrices complejas se debe tomar en cuenta que no solo los analitos son sorbidos en la fibra, también otros componentes de la matriz de la muestra.⁶² Cuando se utiliza el modo de extracción por espacio de cabeza, se debe considerar el efecto del volumen del HS. Los compuestos muy volátiles preferirán acumularse en el espacio de cabeza, resultando en una pérdida sustancial en la sensibilidad cuando el espacio de cabeza sea más grande. La concentración de compuestos semi volátiles en la fase gaseosa a temperatura ambiente es baja, esto puede mejorar al utilizar una agitación eficiente o por el incremento en la temperatura de extracción.

1.7.2.4.3 Tiempo de extracción

La optimización del tiempo de extracción depende de la naturaleza de la muestra, cantidad de muestra, tipo de fibra, entre otros. Es común que los tiempos de

extracción no se optimicen para alcanzar el equilibrio pero si para obtener la cantidad suficiente de analitos en la fibra para el análisis cromatográfico.⁶² El tiempo de incubación es un periodo durante el cual la muestra se mantiene antes de la exposición con la fibra. La incubación permite el equilibrio de los componentes de la muestra y la transferencia de los analitos al espacio de cabeza. El tiempo de extracción se optimiza para alcanzar los siguientes objetivos: alta recuperación de los analitos, alta sensibilidad y buena reproducibilidad; dependiendo de los objetivos que se deseen alcanzar se puede trabajar bajo condiciones de equilibrio, en donde el control del tiempo no es crítico o en condiciones de pre-equilibrio en las cuales el control del tiempo es bastante crítico.⁹⁴

1.7.2.4.4 Temperatura de extracción

La temperatura de la muestra durante la extracción es un parámetro que tiene que ser optimizado en el desarrollo MEFS. Desde el punto de vista cinético, el incremento de la temperatura de la muestra es seguido por coeficientes de difusión más altos y equilibrio más rápido. Termodinámicamente, el incremento de la temperatura de la muestra resulta en mayor concentración del espacio de cabeza debido al incremento de la presión parcial y de la constante de Henry. En consecuencia se obtienen tasas de extracción más rápidas, transferencia de masa más rápida desde la matriz de la muestra hacia el recubrimiento de la fibra y tiempos de equilibrio más cortos. Por otro lado, la termodinámica predice una disminución en la constante de distribución matriz de la muestra / recubrimiento de la fibra (la sorción del recubrimiento de la fibra es un proceso exotérmico) cuando la temperatura de extracción se incrementa. La elección de la temperatura de extracción óptima es también afectada por diferentes propiedades fisicoquímicas de los analitos de interés³⁵.

1.7.2.4.5 Fuerza iónica

La adición de una sal soluble incrementa la fuerza iónica de la solución muestra y puede disminuir la solubilidad de compuestos orgánicos en disolución acuosa. En consecuencia incrementa la constante de distribución matriz de la muestra / recubrimiento de la fibra y por consiguiente incrementa la sensibilidad del método. Las sales más comúnmente empleadas para ajustar la fuerza iónica incluyen a NaCl, Na₂SO₄, K₂CO₃ y (NH₄)₂SO₄. El efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción, así como la cantidad óptima de sal, están fuertemente relacionadas con las propiedades fisicoquímicas del analito de interés y deben ser determinadas experimentalmente³⁵.

1.7.2.4.6 pH

La mayoría de los recubrimientos MEFS extraen solamente especies neutras. Por lo tanto, uno de los parámetros que pueden ser modificados con el objetivo de incrementar la sensibilidad del método para especies con protones dissociables, es el ajuste de pH, siempre que asegure la conversión del analito a su forma neutra. Mientras que los valores de pH bajos mejoran la extracción de compuestos ácidos, los valores de pH altos son más idóneos para la extracción de compuestos básicos. Para compuestos que poseen ambas funcionalidades, el pH óptimo debe ser determinado experimentalmente. Para el análisis de muestras semisólidas heterogéneas complejas, donde el ajuste de pH no es factible, la acidificación de la fase de extracción antes de la extracción puede tener resultados equivalentes y mejorar la eficiencia de la extracción de los compuestos ionizables³⁵.

1.8 Validación de metodologías analíticas

Validación de un método analítico es el proceso que establece, por estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método reúnen los requerimientos necesarios para la aplicación analítica destinada. Las

características analíticas típicas que deben ser consideradas en la validación son: exactitud, precisión linealidad, especificidad, límite de detección, rango y robustez⁹⁶. Con base en estas características, se puede evaluar qué tanto, un método es apropiado para cierta aplicación. Antes de que un nuevo método analítico o técnica de preparación de muestras sea implementado, es necesario que sea validado. La validación del método depende del tipo y propósito del análisis.³³

1.8.1 Precisión

Es una medida de la reproducibilidad que es afectada por los errores aleatorios. Teniendo en cuenta que todas las mediciones contienen errores aleatorios, el resultado de una sola medición no puede ser aceptado como valor real. Un estimado de este error se realiza repitiendo las mediciones varias veces y calculando el promedio de estas y la variabilidad de la medición. La media aritmética es el estimador del promedio de las mediciones más ampliamente utilizado. Considerando que el error aleatorio sigue una distribución normal, la estimación de la variabilidad (precisión) es la desviación estándar. Otro estimador de la precisión comúnmente utilizado es el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (DER), los cuales pueden ser expresados en porcentaje. Este último parámetro es el elegido para expresar la precisión en mediciones analíticas.³³

1.8.2 Linealidad

Es la capacidad de la metodología analítica de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo de concentraciones que se adapte a un modelo lineal. Un estimador de la linealidad ampliamente utilizado es el coeficiente de correlación (r) o el coeficiente de determinación (r^2). Para estudiar la linealidad generalmente se utilizan curvas

de calibración, de las cuales se puede estimar la sensibilidad en el intervalo de concentraciones de interés.³³

1.8.3 Límite de detección

El límite de detección es una característica de prueba límite. Esto es, la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de detección es generalmente expresado como concentración del analito en la muestra⁹⁶.

1.8.4 Exactitud

La exactitud es la desviación del valor aceptado respecto al valor verdadero, es una medición del error sistemático. El valor aceptado se estima con el promedio muestral. El valor verdadero puede o no ser conocido, puede provenir de un material de referencia interno, material de referencia certificado o el valor obtenido al aplicar un procedimiento analítico repetidamente.³³

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar, optimizar y validar metodologías analíticas por SALLE-CG-EM y HS-MEFS-CG para la determinación de metilhexanamina en orina.

2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar y optimizar una reacción de derivación de metilhexanamina *in situ* en orina.
- Optimizar las condiciones de extracción líquido-líquido asistida por adición de sal para la determinación de metilhexanamina en orina.
- Seleccionar un estándar interno adecuado para la cuantificación de metilhexanamina por SALLE-CG-EM.
- Validar el método desarrollado SALLE-CG-EM.
- Optimizar las condiciones de microextracción en fase sólida para la determinación de metilhexanamina en orina.
- Validar el método desarrollado HS-MEFS-CG
- Aplicar las metodologías optimizadas y validadas a dos muestras de orina provenientes del laboratorio de control de dopaje (CONADE, México) que se presume que contienen metilhexanamina.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y equipos

Clorhidrato de metilhexamina 98% (Sigma-Aldrich, EUA). Isobutilcloroformiato 98% (Aldrich, EUA). Acetato de etilo 99.99%, metanol 99.90%, KHCO_3 99.9%, cloruro de sodio 99.9% y sulfato de sodio anhidro 99.87% (J. T. Baker, México). Dodecanoato de metilo, solución tampón pH= 10.00 (ácido bórico / cloruro potásico / hidróxido sódico) y K_2CO_3 99.9% (Merck, Alemania). Equipo Vortex REAX TOP 2500 rpm (Heidolph, Alemania). Parrilla de agitación y calentamiento (Cole-Parmer serie 04644, EUA).

3.2 Soluciones estándar

Se preparó una disolución madre de clorhidrato de metilhexamina con una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MHA en metanol y partiendo de esta, una solución estándar de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MHA en metanol; ambas soluciones se almacenaron en refrigerador a 4°C para su uso posterior.

3.3 Muestras

Las muestras de blancos de orina se recolectaron en una sola toma. Los donadores reportaron ser sanos y no consumir ninguna droga. En el transcurso del proyecto se obtuvieron tres muestras blanco de individuos diferentes. Para cada blanco se recolectó 100 mL de orina de cada individuo y estas no se mezclaron. Todas las muestras fueron filtradas al momento de ingresar al laboratorio y congeladas a -18°C hasta el momento de ser utilizadas. Dos muestras problema fueron proporcionadas por la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE, México).

3.4 Instrumentación

El desarrollo experimental para SALLE-CG-EM y el desarrollo experimental y validación para HS-MEFS-CG se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies serie 6890N equipado con sistema de inyección split/splitless y detector de ionización de llama (250°C) con flujo de hidrógeno a 40 mL/min y aire 250 mL/min; hidrógeno comprimido de ultra alta pureza (Praxair) como gas portador (1mL/min). Para CG-FID y CG-EM se utilizó una columna capilar de sílice fundida ZB-5 (Phenomenex) 30m x 0.25mm d. i. x 0.25 µm de espesor (5% difenil – 95% polidimetilsiloxano), temperatura del puerto de inyección de 250°C en modo splitless con un tiempo de purga de 1 min. La temperatura del horno se programó como sigue: 80°C (durante 2 min) enseguida se incrementa hasta 300°C a 10°C/min y se mantiene en 300°C (durante 5 min). El tiempo total para el análisis cromatográfico fue 29 min. La validación SALLE-CG-EM se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies serie 6890N equipado con sistema de inyección split/splitless y detector selectivo de masas Agilent serie 5973 Network (modo SIM) con ionización electrónica a 70 eV; helio comprimido de ultra alta pureza (Praxair) como gas portador (1 mL/min); la temperatura de la línea de transferencia fue 280°C y de la fuente de iones 230°C. Los iones utilizados en el modo de monitoreo selectivo de iones fueron: 87, 126, 144 y 214 m/z.

3.5 Selección de la reacción de derivación de la metilhexanamina

Con el objetivo de obtener derivados de metilhexanamina, se propusieron las reacciones de sililación y formación de carbamatos que darían como productos los respectivos derivados trimetilsililados y carbamatos de la MHA. Se obtuvieron los coeficientes de reparto octanol-agua simulados teóricamente de los derivados esperados para evaluar los cambios en la polaridad con respecto a la MHA. Se realizaron cinco reacciones con diferentes agentes de derivación para seleccionar la reacción a utilizar.

3.5.1 Fortificación de agua / orina blanco

Partiendo de una disolución estándar de clorhidrato de metilhexanamina (78.9 $\mu\text{g/mL}$), se tomaron diferentes alícuotas (10, 20, 100 y 200 μL) y se transfirieron a un matraces volumétricos de 1 mL, se evaporó el disolvente en baño de agua a 50°C por 5 min bajo una suave corriente de nitrógeno. Se adicionó agua u orina blanco hasta el 85% del volumen de aforo y se agitó en vortex por 2 min. Se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se llevó al volumen de aforo con agua u orina blanco.

3.6 Optimización de la extracción SALLE-CG-EM

La reacción seleccionada para obtener el derivado MHA-IBCF se realizó en medio acuoso, lo que hizo posible aplicarla *in situ* en la matriz de orina. Sin embargo, la distribución de las especies de la metilhexanamina sería determinada por el pH de la matriz. Con base en lo anterior se evaluaron dos soluciones buffer, la primera fue de $\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{KHCO}_3$ con un valor de $\text{pH}=10.5$ ($\text{pH} = \text{pKa}$), preparada en el laboratorio; mientras que la segunda fue de $\text{H}_3\text{BO}_3 / \text{KOH}$ (Merck) con un valor de $\text{pH}=10.0$ ($\text{pH} = \text{pKa}-0.5$). Al corroborar que no existe diferencia significativa entre el uso de las diferentes disoluciones amortiguadoras, se puede elegir la solución comercial ($\text{H}_3\text{BO}_3 / \text{KOH}$, Merck) con el objetivo de evitar la introducción de error debido a la preparación de la disolución tampón en el laboratorio. Utilizando agua fortificada con MHA se prepararon los derivados MHA-IBCF como se muestra en la Figura 5:



Figura 5. Esquema analítico base para el desarrollo de metodología SALLE-CG.EM.

Se comparó la obtención del derivado MHA-IBCF variando la cantidad del reactivo de derivación. Se utilizó un diseño de experimentos factorial completo a dos niveles (2^3) con el que se evaluaron los parámetros tiempo de reacción (5 min – 10 min), temperatura de reacción (21°C – 30°C) y adición de NaCl (0% – 90%); el diseño fue analizado con el software STATGRAPHICS Centurion XV. La agitación se realizó utilizando un equipo vortex para favorecer la cinética de la reacción y la extracción.

3.7 Desarrollo y optimización de la extracción HS-MEFS-CG

El desarrollo de la metodología se hizo utilizando una fibra MEFS con recubrimiento PDMS/DVB de $65\ \mu\text{m}$; se acondicionó bajo las condiciones indicadas por el proveedor. Se tomó como base la reacción optimizada de la metilhexanamina con isobutilcloroformiato utilizando agua fortificada y orina fortificada, siguiendo el procedimiento de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza que se muestra en la Figura 6.

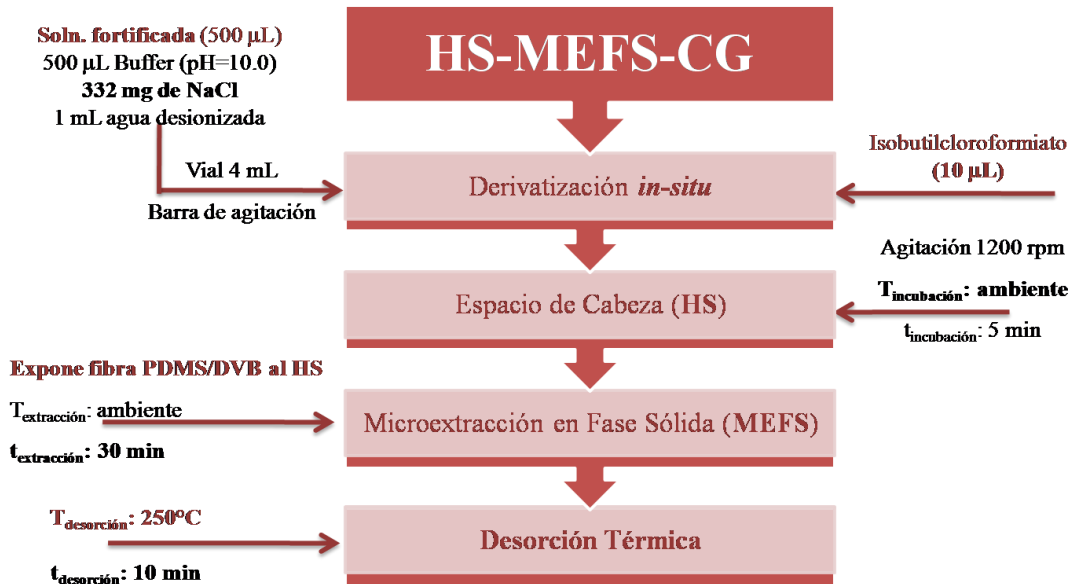


Figura 6. Esquema analítico base para el desarrollo de metodología HS-MEFS-CG.

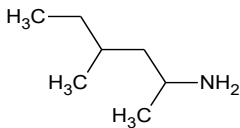
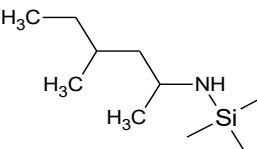
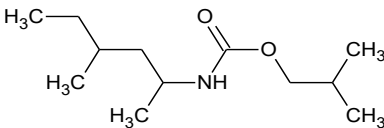
Se utilizó la cantidad del derivatizante para la extracción previamente optimizada. Se evaluaron los parámetros tiempo y temperatura de extracción en muestras de agua fortificada y orina fortificada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Derivación de la metilhexanamina

Se utilizó el programa computacional ACD/ChemSketch (Freeware version, Advanced Chemical Development, Inc. 1994-2010, Product Version: 12.01), para simular las estructuras de los derivados que se esperaban y predecir sus coeficientes de reparto octanol-agua. En la Tabla 4 se observa que al formar los derivados con la metilhexanamina se protege el grupo NH_2 , en el primer caso al sustituir un hidrógeno por un grupo trimetilsililo (TMS) y en el último caso se sustituye un hidrógeno por un grupo isobutil ester. En ambos derivados se incrementan la cadena alifática y el peso molecular del compuesto, aproximadamente 72 unidades del TMS y 100 unidades en el caso del isobutil ester. Lo anterior impacta en la disminución de la polaridad de la metilhexanamina, que se puede evaluar con el incremento en los logaritmos de los coeficientes de reparto octanol-agua estimados. La MHA presenta un $\text{Log } P_{\text{OW}} = 2.1$ mientras que para el derivado trimetilsililado $\text{log } P_{\text{OW}} = 3.8$ y para el derivado carbamato $\text{log } P_{\text{OW}} = 4.1$. En el primer caso existe una diferencia de más de una orden de magnitud entre los valores de P_{OW} del MHA y el derivado y con el carbamato la diferencia es de dos órdenes de magnitud (ver Tabla 4). Estas diferencias indican que el derivado MHA-IBCF es menos polar que el trimetilsililado, lo que se reflejará en los tiempos de retención en el análisis por cromatografía de gases.

Tabla 4. Estructura de MHA y los derivados de las reacciones de sililación y formación de carbamatos y sus correspondientes coeficientes de reparto octanol-agua.

Metilhexanamina	Derivado trimetilsililado	Derivado carbamato
		
$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}$ 115.21658 Log $P_{\text{OW}} = 2.10$	$\text{C}_{10}\text{H}_{25}\text{NSi}$ 187.3977 Log $P_{\text{OW}} = 3.81$	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NO}_2$ 215.3324 Log $P_{\text{OW}} = 4.12$

Para seleccionar el derivado de metilhexanamina más adecuado para esta metodología, se experimentaron cinco reacciones de derivación con el objetivo de

proteger el grupo NH₂ para disminuir los problemas de adsorción al hacer menos polar el analito y obtener una mayor retención en una columna de baja polaridad (5% difenil – 95% polidimetilsiloxano). La Figura 6 muestra los agentes de derivación y las condiciones de reacción que se utilizaron para seleccionar el derivado de MHA, haciendo uso de las reacciones de sililación con tres diferentes derivantes y la formación de carbamatos con isobutilcloroformiatos. Un parámetro importante en estos experimentos fue el tiempo de preparación del derivado, que para los experimentos **A** y **B** fue de 80 y 100 min respectivamente mientras que para los experimentos con los reactivos MSTFA e IBCF fue de 50 y 20 min (Tabla 5). El tiempo de reacción es trascendente debido a que se suma al tiempo consumido en los pasos de preparación de muestra y separación cromatográfica aumentando el tiempo total del análisis. Otro factor evaluado fueron las condiciones de reacción, las reacciones de silanización requirieron condiciones anhidras debido a la inestabilidad hidrolítica de los reactivos y derivados, entonces se requiere un paso de extracción previo a la reacción para aislar al analito. Por otro lado, la estabilidad de los alquil cloroformiatos en medio acuoso hizo posible que la reacción con isobutilcloroformiato se realizara directamente en solución acuosa, con esto se abría la posibilidad de realizar la derivación directamente en la matriz.

Tabla 5. Agentes derivatizantes y condiciones de reacción de MHA (clorhidrato).

Derivatizante	Condiciones de reacción	t (min) preparación
BSTFA+4%TMCS (A)	10µg MHA + 1mL agua desionizada + 30µL NH ₄ OH (pH≈10), se extrae con 1mL de Tolueno, se concentra a sequedad (80°C/N ₂) y se adiciona 50µL de BSTFA+4%TMCS (80°C/1h)	100
BSTFA(B)	10µg MHA + 50µL de BSTFA (80°C/1h)	80
MSTFA(C)	1µg MHA + 50µL de MSTFA (80°C/30min)	50
MSTFA/acetonitrilo (D)	2µg MHA + 50µL : 50µL de MSTFA:MeCN (80°C/30min)	50
IBCF (E)	10 µg MHA en agua desionizada + buffer (pH=10) + 20µL IBCF (30°C/5min); se extrae con acetato de etilo (1mL)	20

*BSTFA: N, O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida, TMCS: Clorotrimetilsilano, MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida, IBCF: Isobutilcloroformiato

Los productos de las reacciones descritas anteriormente se evaluaron por CG-FID bajo las condiciones cromatográficas descritas en la sección 3.4. La Figura 7 muestra los cromatogramas de la reacción de sililación de la metilhexanamina con BSTFA+4%TMCS (**A**) y blanco de reactivos (**BR**). En el cromatograma **A** se puede observar la presencia de cuatro pares de picos (indicados por flechas) a tiempos de retención 5.3, 6.9, 7.0 y 7.5 min, aunque las señales a tr: 5.3 min son las de mayor respuesta, los otros grupos de picos indican la formación de más de un producto de reacción y no solamente el derivado trimetilsiliado de metilhexanamina esperado. Este problema es común en las reacciones de silanización de aminas y ocurre por la posibilidad de reemplazar más de un protón en las aminas primarias produciendo la formación de derivados monosustituidos y disustituidos; estos productos están favorecidos por la alta reactividad del BSTFA incrementada por la acción catalítica del TMCS al reaccionar con la amina en su forma neutra. La presencia de dos picos correspondientes al derivado de MHA, se deben al par diastereoisomérico de metilhexanamina pues al ser una molécula con dos centros quirales, forma derivados compuestos por un par de diastereoisómeros.

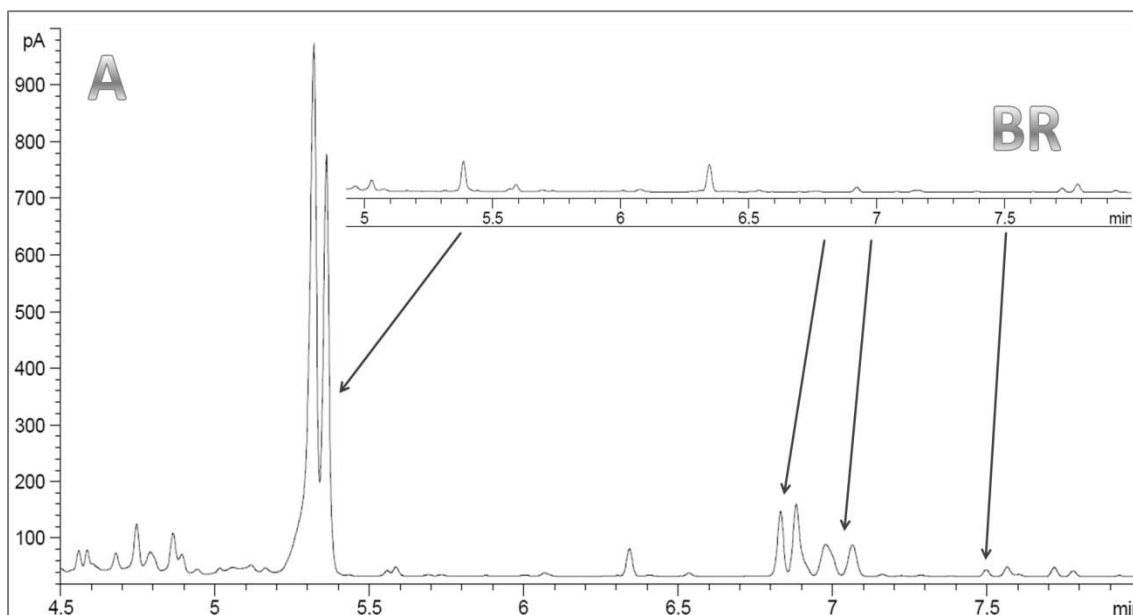


Figura 7. Cromatogramas de las reacción de MHA con BSTFA+4%TMCS (**A**) y blanco de reactivos (**BR**).

El experimento **B** se centró en la reacción directa del clorhidrato de metilhexanamina con BSTFA que se esperaba se favoreciera la formación de un solo derivado. Las sales amónicas a temperaturas elevadas se disocian en cierta medida en sus componentes. La reacción de MHA con BSTFA (Figura 8), produjo picos a tiempos de retención similares que el experimento **A** sin embargo, se observaron ciertas diferencias, las señales a tr: 7.0 min prácticamente desaparecen en el experimento **B** mientras que las de tr: 7.5 min se incrementan. Por otra parte en el cromatograma **B** se observa un conjunto de picos no resueltos a tr: 5.1 min que no apareció en el experimento anterior.

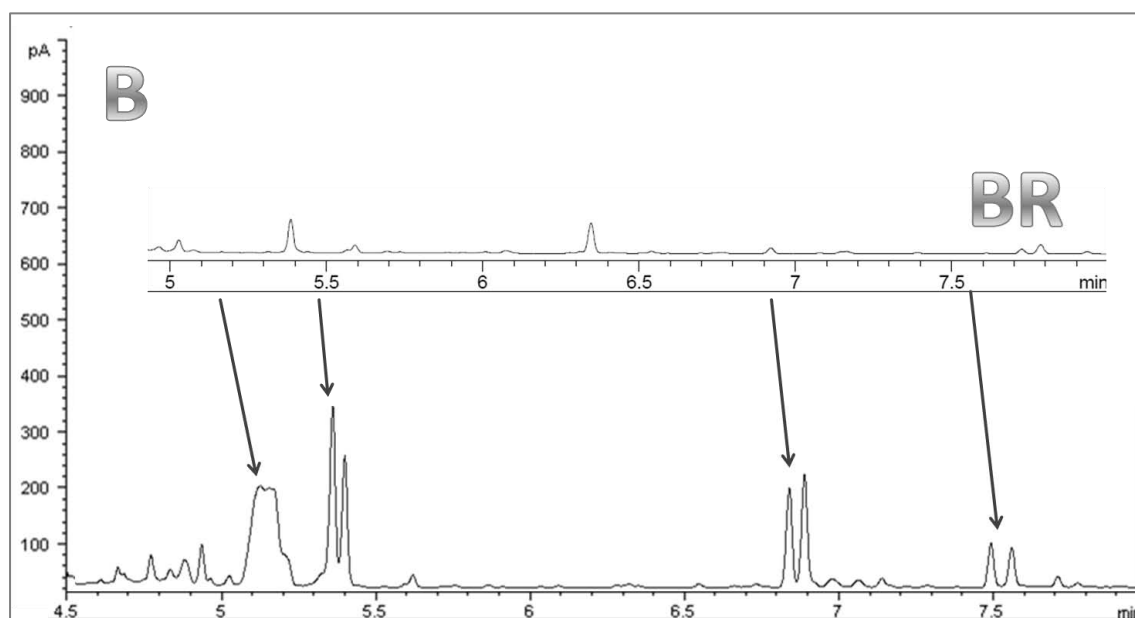


Figura 8. Cromatogramas de la reacción del clorhidrato de MHA con BSTFA (**B**) y blanco de reactivos (**BR**).

La Figura 9 muestra los cromatogramas de la reacción de sililación realizada con el clorhidrato de la MHA y MSTFA (**C**). En el cromatograma **C** se observó un conjunto de picos no resueltos a tr: 5.3 min que no aparecieron en el blanco de reactivos (**BR**), estas señales fueron similares a las observadas en el experimento **B** con la diferencia que con el MSTFA, no se observaron más señales distintas al blanco de reactivos, lo que sugirió la posibilidad de tener solamente un producto de reacción.

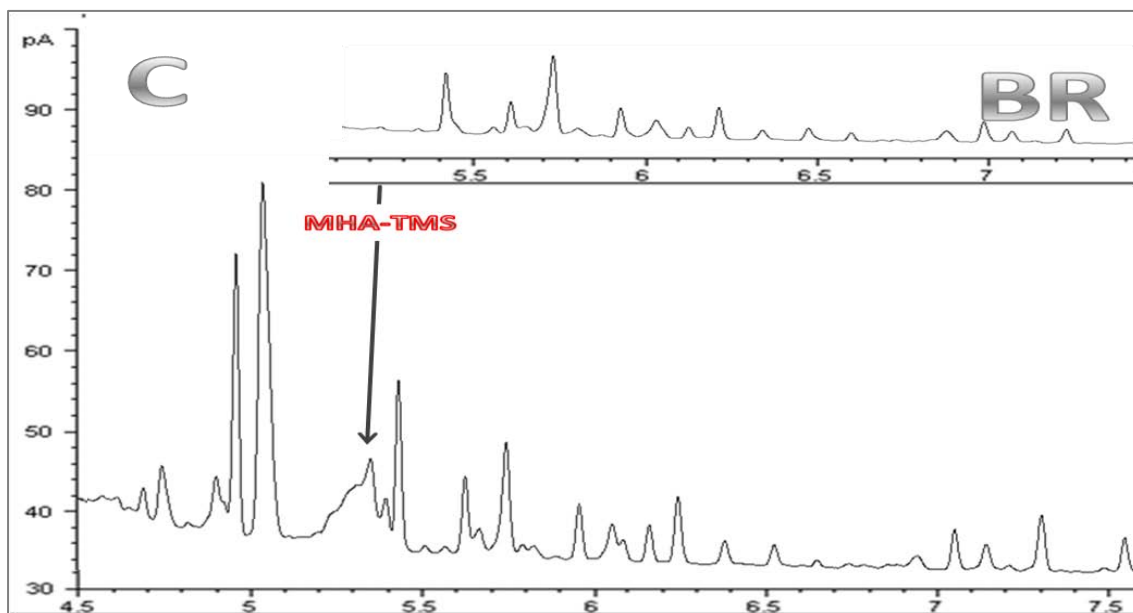


Figura 9. Cromatogramas de la reacción de MHA con MSTFA (C) y blanco de reactivos (BR).

Sin embargo, la posibilidad de incrementar la respuesta del producto obtenido de la reacción MHA con MSTFA, se amplió al adicionar acetonitrilo a la reacción. La Figura 10 corresponde a la reacción de MHA con MSTFA en acetonitrilo. En el cromatograma D se puede ver que al realizar la reacción en estas condiciones, se obtuvo una respuesta mayor que la obtenida en ausencia de disolvente (C) además, el perfil cromatográfico en D y BR se observó más limpio, con picos presentes en el blanco de reactivos y de menor respuesta en comparación con el pico correspondiente al derivado.

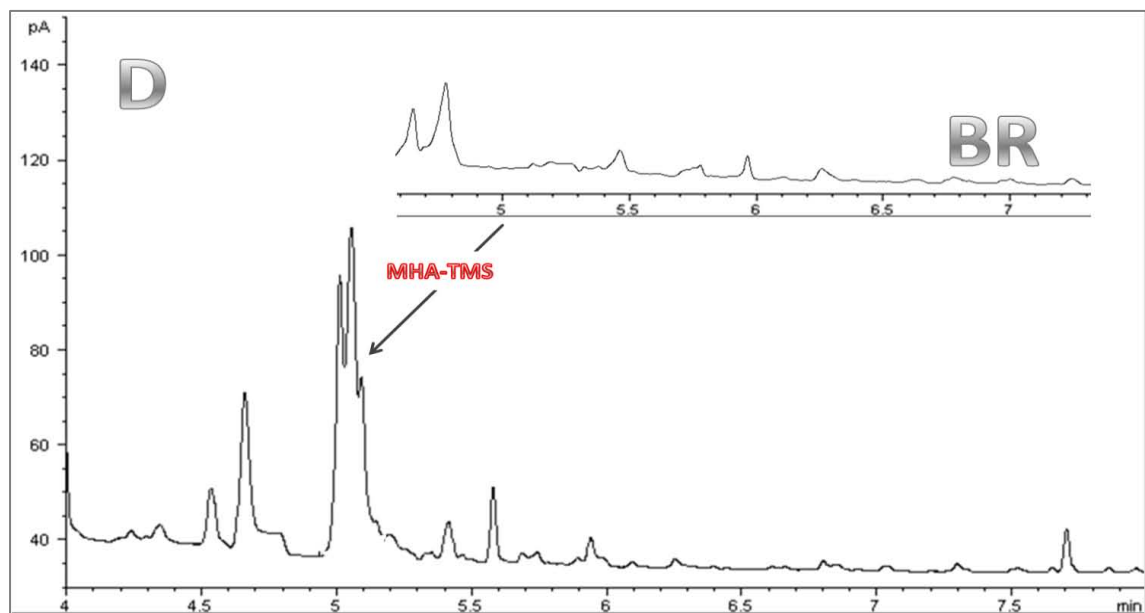


Figura 10. Cromatogramas representativos de la reacción de MHA con MSTFA/Acetonitrilo (**D**) y blanco de reactivos (**BR**).

El derivado trimetilsiliado de metilhexanamina se confirmó por CG-EM (Figura 11). El espectro MHA-TMS de la Figura 10 correspondiente al pico a tr: 5.7 min en el cromatograma iónico total **D**, presentó los fragmentos característicos con relación m/z del derivado trimetilsililado de la metilhexanamina, reportados en la literatura:³¹ 116 m/z (pico base), 172 m/z y 102 m/z , los dos últimos en similar proporción.

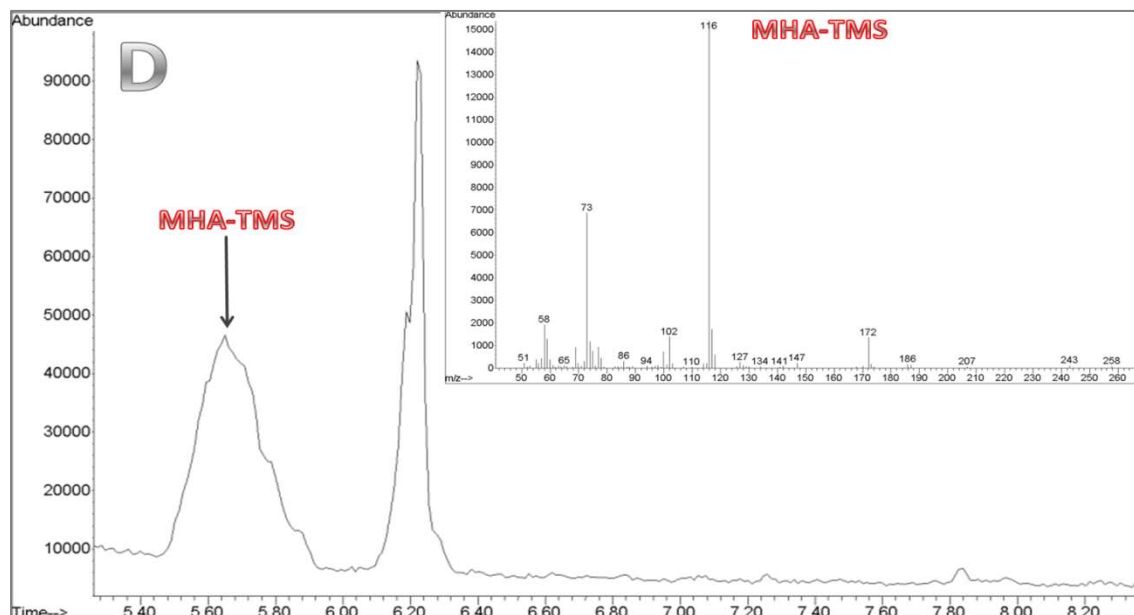


Figura 11. Cromatograma iónico total de la reacción MHA con MSTFA en acetonitrilo y espectro de masas (scan) de MHA-TMS.

Una desventaja del derivado trimetilsilado de MHA (MHA-TMS) reportado en la literatura fue su pobre retención en CG-EM (antes de los 2 min del análisis cromatográfico) y la co-elución con interferencias presentes en la matriz de orina. Con las condiciones cromatográficas propuestas en este proyecto, el derivado MHA-TMS se obtuvo a un tiempo de retención alrededor de cinco min sin embargo, la probabilidad de co-elución con interferencias de la matriz de orina era aún elevada.

El último experimento fue la reacción para formación del carbamato de la metilhexanamina (MHA-IBCF). La Figura 12 muestra el cromatograma correspondiente al derivado MHA-IBCF obtenido de la reacción entre metilhexanamina e isobutilcloroformiato (E). En el cromatograma E se puede ver la presencia de un par de picos a tiempos de retención mayores a 10 min, aproximadamente el doble de tiempo que el derivado MHA-TMS; esto coincidió con los valores calculados del coeficiente de reparto octanol-agua, ya que el aumento de la cadena alifática y peso molecular del derivado MHA-IBCF, aumentó

el Log P_{OW} dos órdenes de magnitud con respecto a la MHA mientras que el derivado MHA-TMS incrementó solamente en un orden de magnitud.

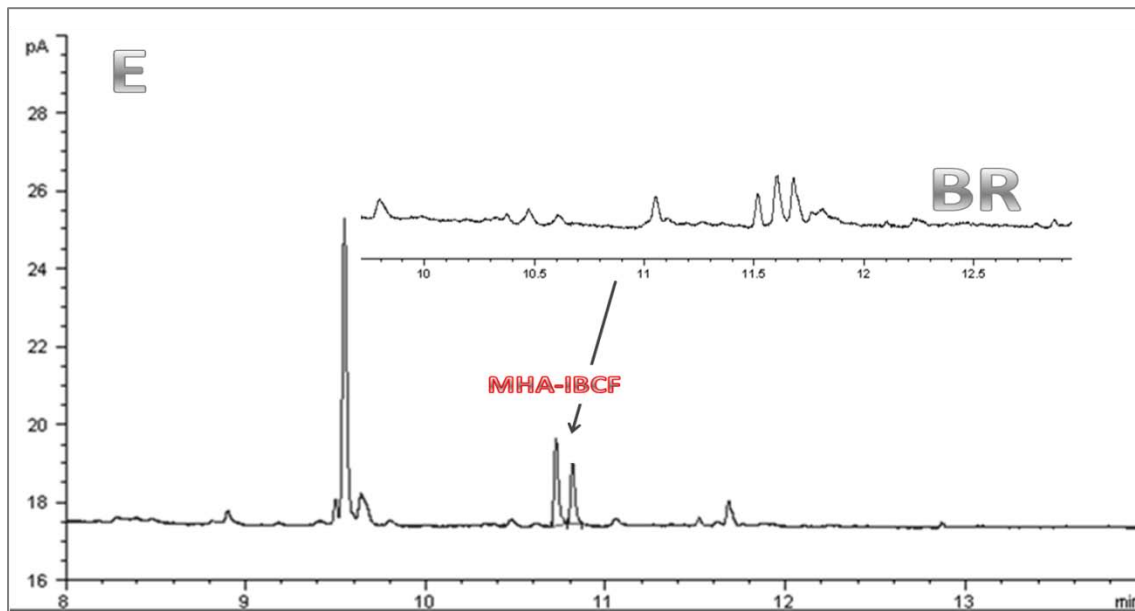


Figura 12 Cromatograma del derivado MHA-IBCF (E)

La confirmación del derivado MHA-IBCF se realizó por CG-EM. La Figura 13 muestra el cromatograma iónico total y el espectro de masas del derivado MHA-IBCF. En el espectro de masas se observaron los fragmentos con $m/z=144$ que es el pico base y corresponde a la ruptura homolítica del enlace β a la amina en la cadena alifática $[M-71]^+$, el fragmento a $m/z=200$ corresponde a la pérdida de un metilo $[M-15]^+$, el fragmento a $m/z=57$ correspondiente al fragmento del grupo isobutilo y el fragmento a $m/z=126$ corresponde a la pérdida de agua a partir del pico base $[M-71-18]^+$. El ión molecular no se observó $[M^+= 215 \text{ uma}]$. El espectro de masas fue idéntico para los picos a tiempos de retención 10.8 min y 10.9 min, que corresponden al par de diastereoisómeros de MHA.

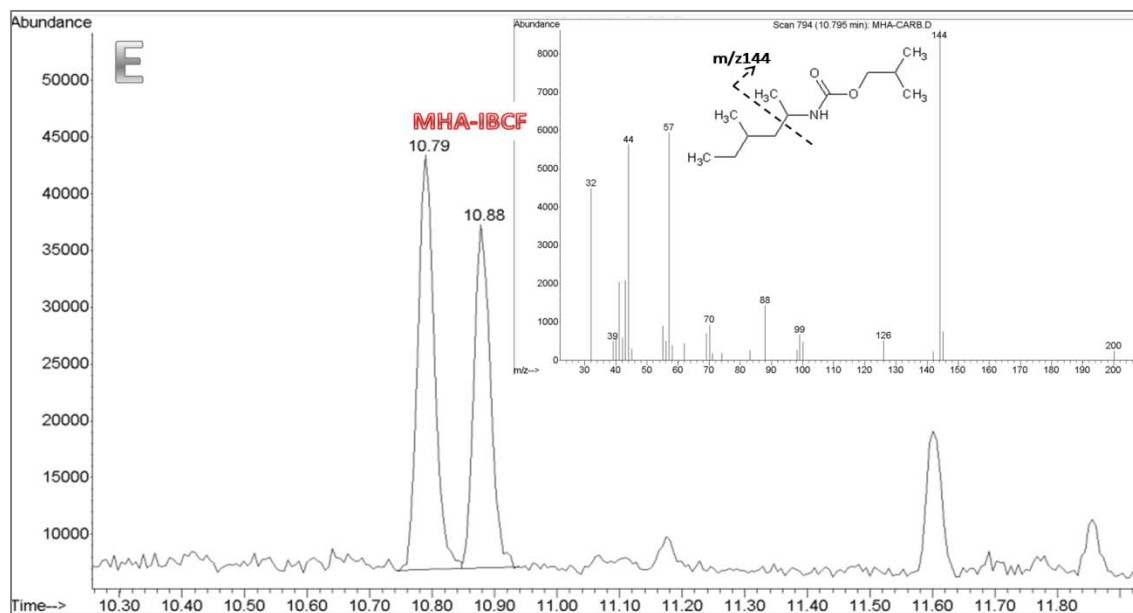


Figura 13. Cromatograma iónico total de la reacción MHA con IBCF (E) y espectro de masas (scan) del derivado MHA-IBCF.

Las reacciones de sililación conllevan varios puntos desfavorables, por ejemplo: tiempo de reacción muy largo, temperatura elevada, formación de más de un producto de reacción, descomposición en presencia de humedad, etc. Por otro lado al utilizar IBCF como reactivo para la formación del isobutilcarbamato de la metilhexanamina, se redujo el tiempo de preparación de muestra, pues la reacción se llevó a cabo en medio acuoso y a bajas temperaturas, además se formó un solo producto de reacción. En base a lo anterior se seleccionó el IBCF como agente derivatizante.

4.2 Optimización SALLE-CG-EM

4.2.1 Selección del pH

Para que la metilhexanamina se encuentre en su forma neutra, es necesario que la disolución tenga un valor de pH igual a su pKa (pKa=10.5) para encontrarla en un 50 % en su especie neutra o superiores a su pKa (pKa+1 y pKa+2) para que

más del 90 % esté en forma neutra. Se eligió el valor de $\text{pH} = \text{pKa}$ y se evaluó la respuesta del derivado de la metilhexanamina a este pH. Se evaluaron dos diferentes buffers, el primero fue de $\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{KHCO}_3$ $\text{pH}=10.5$ (preparado en el laboratorio) y el segundo buffer fue de $\text{H}_3\text{BO}_3 / \text{KOH}$ $\text{pH}=10.00$ (Merck). Los resultados obtenidos del análisis por CG para MHA ($16\mu\text{g}/\text{mL}$) evaluados a ambos valores de pH, mostraron una diferencia relativa en la respuesta del derivado no mayor a 1%. Al observar que no se obtuvo una variación negativa en la respuesta del derivado al disminuir el valor del pH y tomando en cuenta que las disoluciones amortiguadoras fueron diferentes, se seleccionó el buffer $\text{pH}=10.0$ para el desarrollo de esta metodología. Utilizando el pH seleccionado se evaluó la efectividad de la reacción al disminuir la concentración de la metilhexanamina ($15.8, 7.9, 1.6$ y $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$). Se observó que al disminuir la concentración de la solución fortificada, la respuesta para el derivado mantuvo una relación lineal con la concentración ($R^2=0.984$).

4.2.2 Influencia del volumen de IBCF en la derivación

El estudio del volumen del isobutilcloroformiato en la derivación se realizó con un contraste de hipótesis para las medias de los volúmenes: $10\mu\text{L}$ y $20\mu\text{L}$ de IBCF, utilizando el software STATGRAPHICS. Se estableció como hipótesis nula (H_0) que las medias son iguales. Con un nivel de significación del 0.05, H_0 no se rechaza (Anexos, Tabla 12), lo que prueba que la disminución del derivatizante no tiene un impacto significativo sobre la respuesta del derivado MHA-IBCF con un nivel de confianza del 95%.

4.2.3 Tiempo, temperatura y adición de sal

Con las condiciones ya establecidas para la reacción se procedió a evaluar la influencia del tiempo y temperatura de reacción y adición de sal, utilizando un diseño de experimentos factorial 2^3 (MHA/SALLE); se realizó codificando los

niveles de cada factor (alto y bajo) y aleatorizando los experimentos como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Codificación de diseño factorial 2^3 para tiempo, temperatura y adición de sal (MHA/SALLE).

Codificación	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)	#Exp	Tiempo de reacción	Temperatura de reacción °C	NaCl %
			Tiempo de reacción (A)	5 min	10 min	1
Temperatura de reacción (B)	21 °C	30 °C	2	-1	-1	1
Adición de NaCl (C)	0%	90%	3	-1	1	-1
			4	1	-1	-1
			5	-1	1	1
			6	1	-1	1
			7	1	1	1
			8	1	1	-1

Los resultados de los experimentos de MHA/SALLE, se analizaron con el software STATGRAPHICS con base en la respuesta obtenida en el análisis cromatográfico correspondiente al derivado MHA-IBCF. Los factores principales se evaluaron con la gráfica de probabilidad normal para los efectos, que se presenta en la Figura 14. Esta gráfica de probabilidad normal ayudó a separar los efectos reales de aquellos que son simplemente ruido. Esta herramienta es utilizada cuando hay pocos o ningún grado de libertad para estimar el error experimental, en este diseño no se duplicaron los experimentos por lo que solamente se tuvo 1 grado de libertad para la estimación del error experimental. Hay un punto en la gráfica para identificar cada uno de los efectos en el modelo (señalados con asteriscos). La interpretación se basa en que los efectos que no son reales sino simples manifestaciones de ruido, se comportan como si provinieran de una distribución normal centrada en cero, de tal modo que los efectos que no son reales quedarán aproximadamente a lo largo de la línea recta, mientras que las señales reales quedarán fuera de la línea.

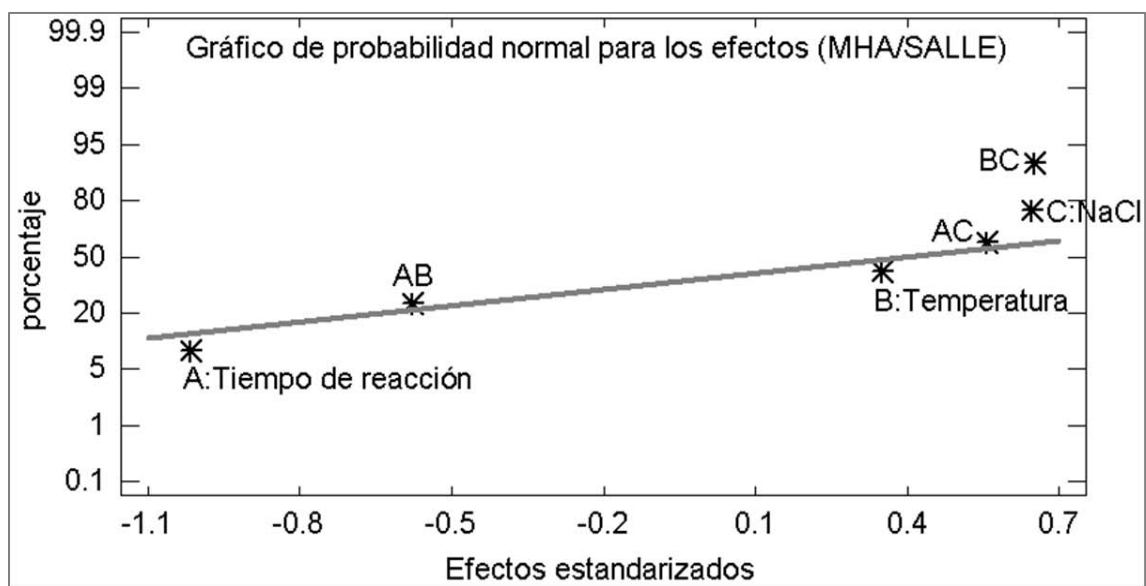


Figura 14. Gráfica de probabilidad normal para los efectos del diseño MHA/IBCF.

En la gráfica de probabilidad normal para los efectos (Figura 14) se estimó que el efecto más fuerte sobre la respuesta del derivado extraído, fue la interacción entre temperatura y adición de NaCl (**BC**). La gráfica de interacciones para el diseño MHA/SALLE (Anexos, Figura 40), muestra cómo interactúan los factores evaluados entre sí, cuando no existe interacción alguna entre un par de factores, las rectas se observan separadas de forma paralela, sin embargo si existe una verdadera interacción entre dos factores las rectas se interceptan. En la gráfica de interacciones se observó que las rectas que pertenecen a los factores temperatura y adición de NaCl (**BC**) se cruzan entre sí, esto confirmó la existencia de una interacción entre estos factores. La Figura 15 corresponde a la gráfica de la respuesta del derivado MHA-IBCF en función de los factores temperatura y adición de NaCl. En el eje de las abscisas se observa la variación del factor adición de NaCl de su nivel bajo a su nivel alto, mientras que en las rectas, el factor temperatura se mantiene en su nivel bajo en una y en la otra se mantiene en su nivel alto. Esta gráfica fue útil para interpretar el efecto de esta interacción. Cuando la temperatura se mantuvo en su nivel bajo (21°C) la respuesta no cambió, sin embargo al incrementar la temperatura a su nivel superior (30°C) se

observó un incremento en la respuesta cuando el factor adición de NaCl también se incrementó a su nivel alto (90%).

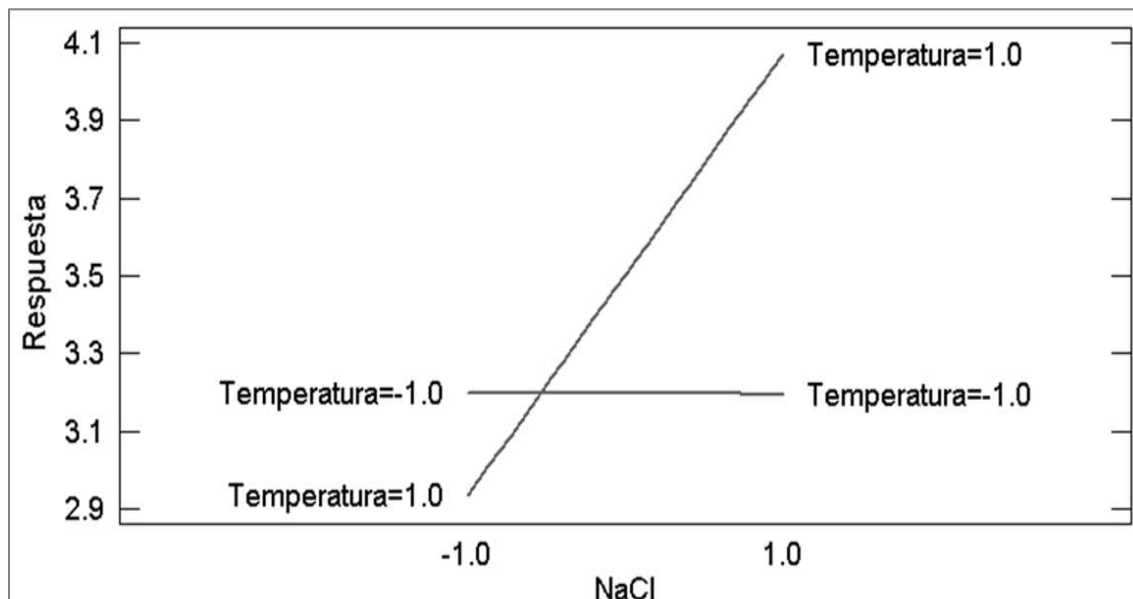


Figura 15. Gráfica de interacciones entre temperatura y adición de NaCl.

La Figura 16 corresponde a la estimación de la respuesta en función de los factores temperatura y adición de NaCl. Manteniendo el factor tiempo constante en su nivel bajo (5 min). La altura de la superficie representa los valores de respuesta. Este gráfico nos sirvió para predecir hacia donde se movería la respuesta en función de la variación de los factores temperatura y NaCl. Se observó que la máxima respuesta se alcanzó al incrementar ambos factores a sus niveles altos (30°C y 90% de NaCl adicionada).

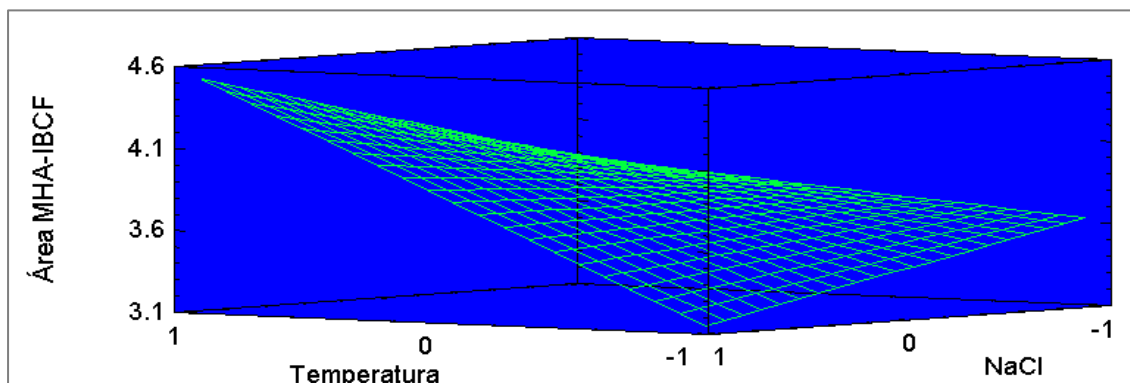


Figura 16. Superficie de respuesta estimada para MHA/SALLE manteniendo tiempo en su nivel bajo.

Con base en los resultados obtenidos en el diseño de experimentos MHA/SALLE, se optimizaron los factores temperatura y la adición de sal. Manteniendo la temperatura a 30°C se modificó la cantidad de NaCl adicionada: 45%, 75%, 90% y 100%. Los resultados se muestran en la Figura 17, observándose que la respuesta del derivado es máxima cuando el porcentaje de NaCl es 100%, en este caso coincide con el efecto del desplazamiento salino facilitando la extracción del analito al incrementar la cantidad de sal.

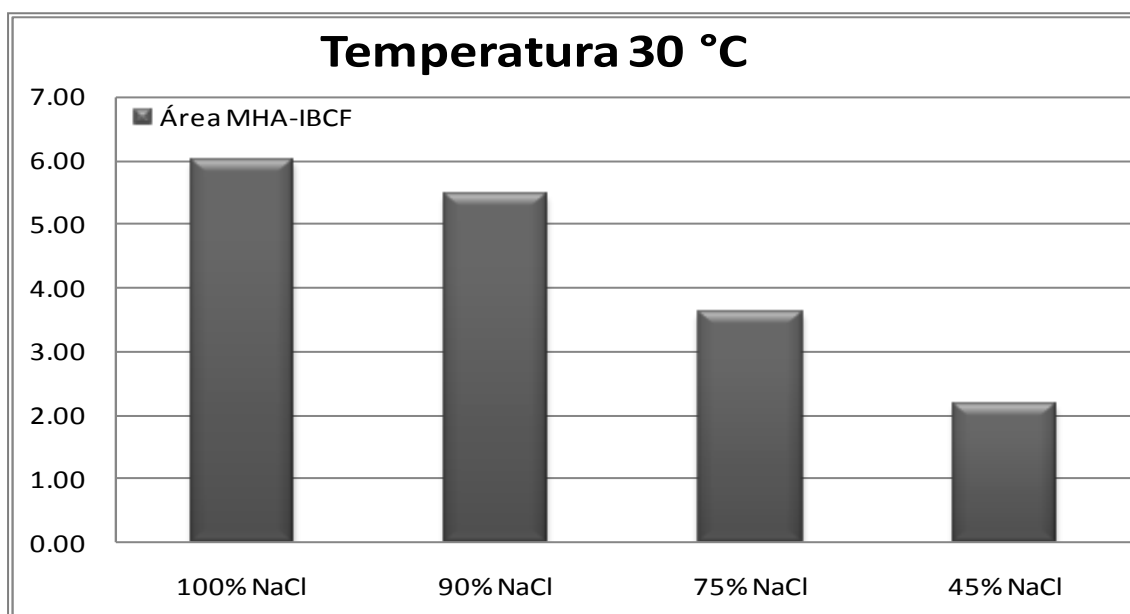


Figura 17. Optimización del porcentaje de NaCl manteniendo temperatura constante.

Las medias de las respuestas del derivado MHA-IBCF obtenidas al variar el %NaCl (Figura 17), se compararon estadísticamente (Anexos, Tabla 13). El ANOVA indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las medias de los 4 porcentajes de NaCl comparados. La prueba de comparación múltiple por el método de la diferencia mínima significativa (LSD por sus siglas en inglés) de Fisher (Anexos, Tabla 14), en donde se muestran las medias correspondientes a cada porcentaje de NaCl, las cuales están clasificadas en 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten

una misma columna de X's. Los grupos que resultaron homogéneos se localizan en la parte derecha de la Tabla 14. El 100% de adición de NaCl era el que presentó mayor respuesta del derivado MHA-IBCF extraído, por esto fue importante saber si la diferencia entre este valor y los otros porcentajes evaluados fue significativa. El 100% fue significativamente diferente al 45% y 75%. 100% y 90% no fueron significativamente diferentes, sin embargo el 90% se agrupó con el 75% por lo cual se decidió que el 100% de adición de NaCl era el valor óptimo para la extracción del MHA-IBCF, con el que se obtuvo la respuesta máxima por el efecto salting-out. De igual forma se evaluó la temperatura óptima, utilizando el porcentaje de NaCl constante al 100%. Se varió la temperatura como sigue: 20°C, 30°C, 40°C y 50°C; los experimentos se realizaron por duplicado. La Figura 17 corresponde a las respuestas obtenidas para la extracción del derivado MHA-IBCF como resultado de la variación de la temperatura. El mayor cambio en el área del derivado se observó al variar la temperatura de 20°C a 30°C.

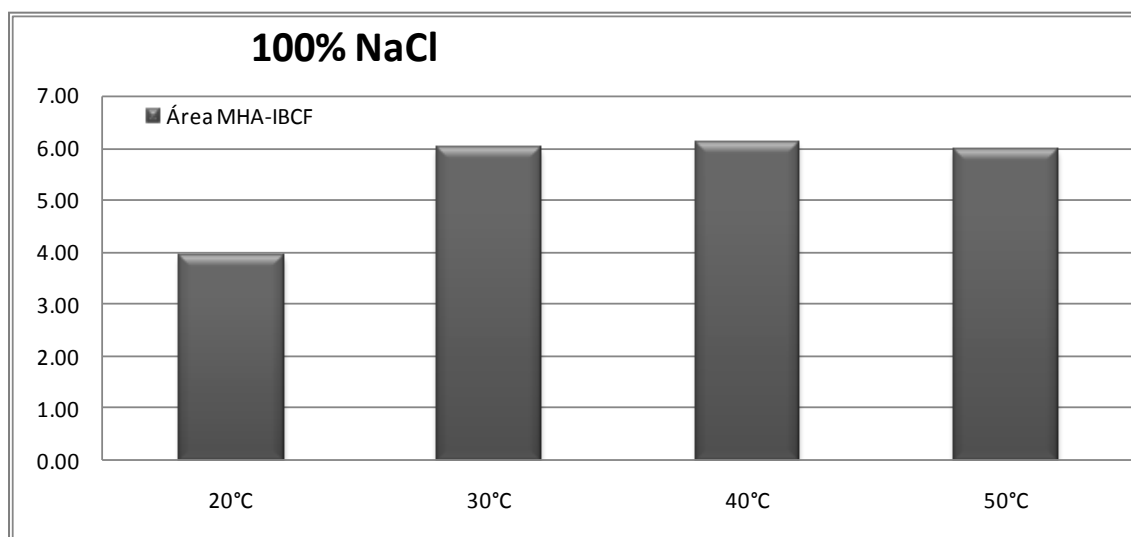


Figura 18. Optimización de la temperatura manteniendo el porcentaje NaCl constante.

La comparación de los resultados del derivado MHA-IBCF obtenidos al variar la temperatura, no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las cuatro temperaturas que se experimentaron, obteniéndose un valor-p > 0.05 (Anexos, Tabla 15). Sin embargo, al realizarse la prueba de comparación múltiple LSD de Fisher para las diferentes temperaturas evaluadas (Anexos, Tabla 16), se observó la clasificación de dos grupos homogéneos, el

primer grupo corresponde a la temperatura 20°C y en el segundo grupo se encuentran las temperaturas 30°C, 40°C y 50°C. Lo anterior indicó que el aumento de 20°C a 30°C tuvo una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) con un nivel de confianza del 95% pero, después de 30°C no se observó diferencia significativa al aumentar la temperatura ($\alpha=0.05$). Por lo anterior se definió 30°C como temperatura óptima.

4.2.4 Agitación

Para evaluar la influencia de la agitación sobre la reacción, se hizo una comparación estadística para las respuestas del derivado MHA-IBCF (a la misma concentración 1.5 $\mu\text{g/mL}$) obtenidas sin agitar la mezcla de reacción, con agitación manual y vortex. La tabla ANOVA mostró diferencias significativas entre las pruebas evaluadas (valor-p < 0.05) con un nivel de confianza del 95%. Se observó que la mayor dispersión se obtuvo cuando la agitación fue manual lo que se reflejó en %CV=19%, mientras que la menor dispersión se logró utilizando agitación con vortex con la que se obtuvo %CV=6% (Anexos, Tabla 17). En la Figura 19 se puede ver de manera gráfica la dispersión para cada experimento, en esta se confirma la variabilidad de los datos para la agitación manual, la cual es mayor que la agitación con vortex, en el gráfico de residuos se pudo observar que la variabilidad de los residuos se comporta de acuerdo a la variabilidad de los datos, lo que indica que el análisis es estadísticamente válido.

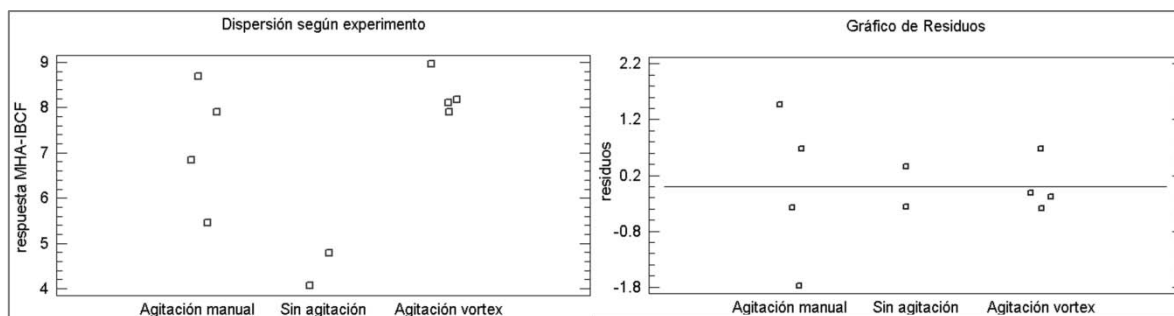


Figura 19. Gráficos de dispersión para la evaluación del derivado MHA-IBCF en función de la agitación.

Se realizó una comparación múltiple LSD de Fisher para las medias de los experimentos evaluados además de la verificación de varianzas por la prueba de Leven (Anexos, Tabla 18), la que mostró que existen diferencias significativas al realizar la reacción sin agitar y con agitación. La agitación manual y agitación con vortex se clasificaron en un grupo homogéneo. El valor-p de la prueba de Leven indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los tres experimentos con un nivel de confianza del 95%, es decir, se verifica la hipótesis de homocedasticidad. La agitación vortex permite mayor homogeneidad de los reactivos en la mezcla de reacción. Al estandarizar la velocidad de agitación con el uso del equipo el efecto de este factor se vuelve constante, con lo que se elimina como fuente de variación. En base a lo anterior se decidió utilizar la agitación vortex para esta metodología. La Figura 20 muestra la respuesta obtenida al variar el tiempo de agitación, al inicio de la reacción (10s y 30s) y al inicio y a la mitad del tiempo de reacción (10s+10s y 30s+30s). La mayor respuesta se obtuvo cuando se agitó con vortex 10 seg al inicio de la reacción y nuevamente 10 seg a la mitad del tiempo de reacción. Una característica importante al utilizar esta técnica de agitación, es que la dispersión del disolvente de extracción dentro de la muestra acuosa obtenida debido a la agitación vortex, forma un proceso de emulsificación suave. Debido a que la distancia de difusión se acorta y aumenta el área superficial específica, las finas gotas formadas pueden extraer el analito más eficientemente⁹⁷.

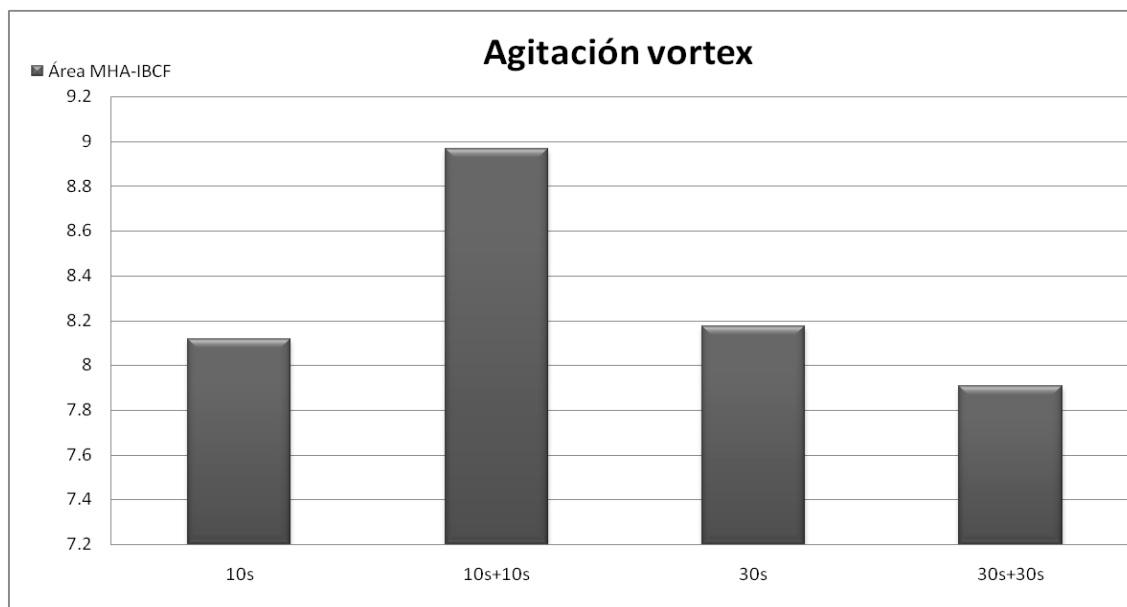


Figura 20. Variación de la respuesta en función del tiempo de agitación con vortex (2500 rpm).

4.2.5 Estándar interno

Con el objetivo de que el compuesto seleccionado exhibiera un comportamiento similar al del derivado de la metilhexanamina en el proceso de extracción y en el análisis cromatográfico, se buscaron compuestos con grupos funcionales análogos al derivado, con la magnitud de la cadena alifática similar, peso molecular cercano al del derivado y que el compuesto seleccionado tuviera estabilidad en el pH (pH=10) y temperatura de trabajo. La Tabla 7 contiene algunos compuestos que se utilizaron para seleccionar el estándar interno, los cuales fueron analizados por CG-FID utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la sección 3.4. Los pesos moleculares de los compuestos estudiados se encuentran en el intervalo de 172 – 228 g/mol, siendo el dodecanoato de metilo el más cercano al peso molecular del derivado MHA-IBCF. La polaridad de los esteres con respecto al derivado se evaluó con base en los logaritmos de sus coeficientes de reparto octanol-agua, en la Tabla 7 se puede observar que se encuentran en un intervalo de Log P_{OW} 3.9 – 6.0, mientras que para el derivado se calculó Log P_{OW} = 4.1.

Tabla 7. Compuestos analizados por CG-FID para seleccionar estándar interno de MHA.

Compuesto	Peso molecular	Punto de ebullición (°C)	Log P_{ow}	Tiempo de retención (min)
Derivado MHA-IBCF	215.33	–	4.12	10.8-10.9
Octanoato de etilo	172.26	209	3.9	7.74
Undecanoato de metilo	200.32	246-248	4.96	10.76
Dodecanoato de metilo	214.34	261-262	5.49	11.96
Dodecanoato de etilo	228.37	269	6.02	12.70

Los tiempos de retención de los ésteres analizados resultaron en el intervalo de 7.74 – 12.70 min, sin embargo el octanoato de etilo fue el menos retenido y era posible que coeluyera con interferencias de la matriz, mientras que el undecanoato de metilo eluyó al mismo tiempo de retención que un diastereoisómero del derivado MHA-IBCF, por lo que ambos ésteres se descartaron como posible estándar interno. Por otro lado tanto el dodecanoato de metilo como el dodecanoato de etilo eluyeron después del MHA-IBCF, siendo el dodecanoato de etilo el más retenido. El dodecanoato de metilo se seleccionó como estándar interno para la extracción del derivado MHA-IBCF por presentar similitud con el derivado de la metilhexanamina en peso molecular así como en el valor del coeficiente de distribución octanol-agua, además al analizarlo por CG bajo las mismas condiciones que el derivado de MHA, el tiempo de retención para este compuesto no interfiere con el tiempo de retención del derivado (ver Figura 21). El estándar interno se sometió al procedimiento de extracción con las condiciones optimizadas y se comparó con una solución preparada directamente en acetato de etilo con la concentración esperada para una extracción al 100%, ambas se analizaron por CG-FID (Anexos, Tabla 19). Se observó que para el estándar interno después del procedimiento de extracción se obtuvo mayor dispersión de las áreas con un coeficiente de variación de 9% mientras que la solución estándar tuvo un coeficiente de variación de 5%. Al comparar la respuesta promedio

obtenida inyectando directamente la solución estándar con la obtenida de la extracción no se hubo diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%. Además al comparar las desviaciones estándar de las dos pruebas no se puede rechazar la hipótesis nula con un nivel de confianza del 95%, lo que indicó que las desviaciones estándar son estadísticamente iguales.

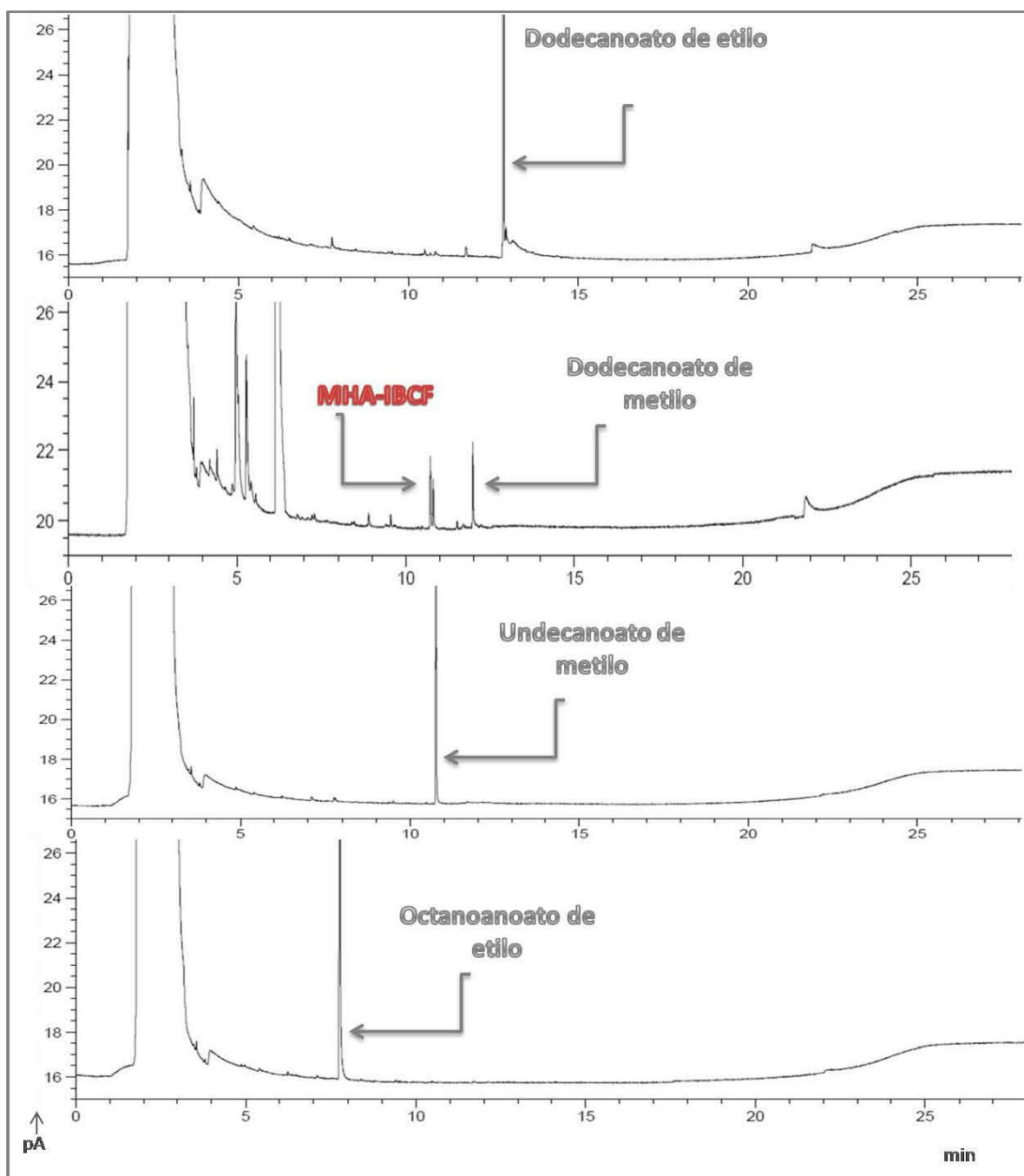


Figura 21. Cromatogramas de los compuestos evaluados como estándar interno para MHA-IBCF.

Utilizando una disolución de 1.5 µg/mL de dodecanoato de metilo en acetato de etilo se estudió el efecto de la disminución de la concentración de MHA desde 1505 ng/mL hasta 100 ng/mL. Se observó que al disminuir la concentración de la metilhexanamina, se obtuvo una respuesta relativa entre el derivado MHA-IBCF y el dodecanoato de metilo que se ajusta a un modelo lineal con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.99$; además estas determinaciones mostraron buena sensibilidad relativa con una pendiente > 1 (ver Anexos, Tabla 20). Con base en lo anterior se seleccionó el dodecanoato de metilo como estándar interno a la concentración de 1.5 µg/mL en acetato de etilo que fue utilizado como solución extractante.

4.2.6 Condiciones EM para la metodología SALLE-CG-EM

Las condiciones SALLE optimizadas para la determinación de metilhexanamina con derivación *in-situ* se aplicaron al análisis por CG-EM de agua y orina fortificada con metilhexanamina. La Figura 22 muestra el cromatograma iónico total y el espectro de masas (modo: scan) del derivado **MHA-IBCF**. En el espectro de masas se observó que los fragmentos más abundantes para el MHA-IBCF son: 144, 57, 44, 88, 126 y 200 m/z con su ion molecular 215 m/z. Sin embargo, al realizar el análisis utilizando orina fortificada, se observó en el cromatograma iónico total impurezas cercanas al tiempo de retención del derivado y del estándar interno (Figura 23), haciendo que la respuesta relativa a la MHA fuera baja. Debido a lo anterior se utilizó el análisis por CG-EM en modo de monitoreo selectivo de iones (SIM), permitiendo que la señal del analito de interés se incrementara y con esto la sensibilidad, siempre y cuando no existan interferentes que tengan los mismos iones que los utilizados para el derivado de MHA.

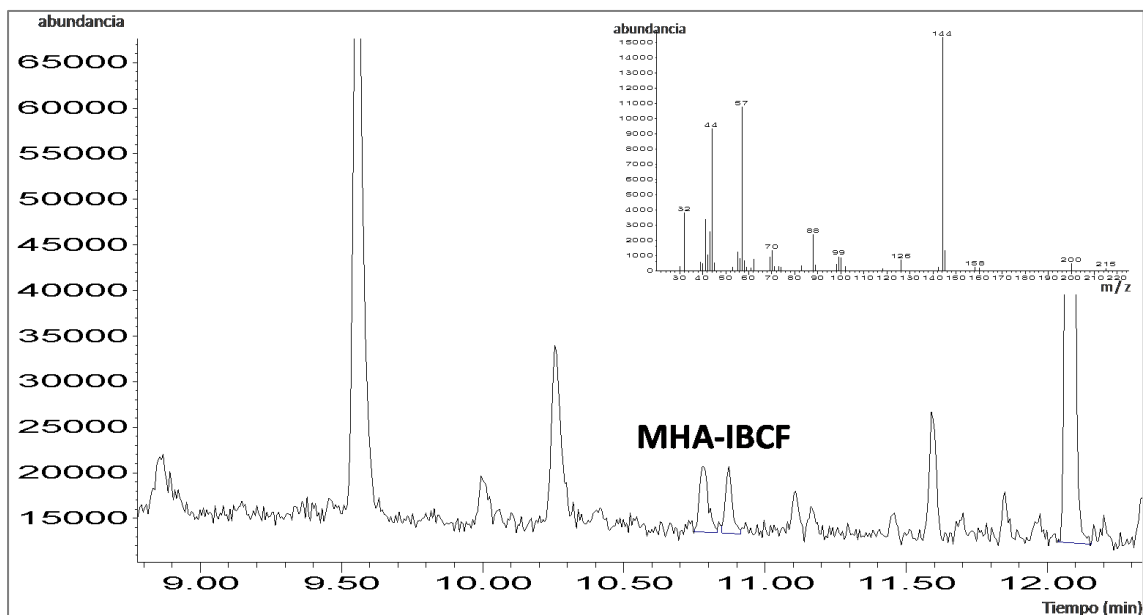


Figura 22. Cromatograma ionico total y espectro de masas (scan) de MHA-IBCF en agua fortificada 100 ng/mL MHA.

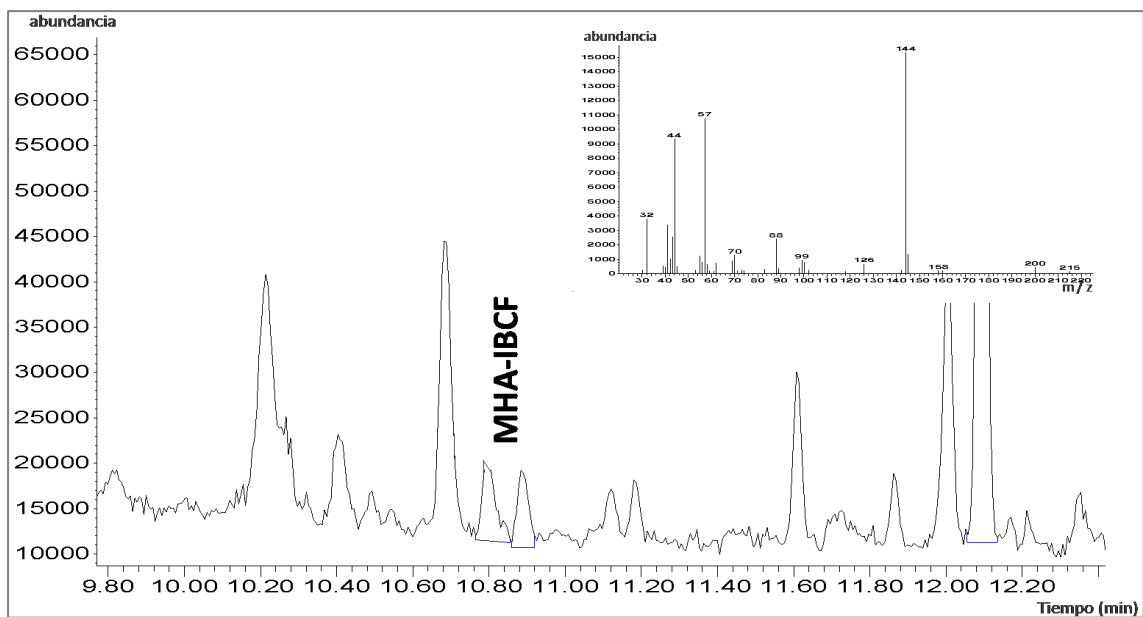


Figura 23. Cromatograma iónico total y espectro de masas (scan) de MHA-IBCF de orina fortificada 100 ng/mL MHA.

De acuerdo a los fragmentos más abundantes para el derivado y el estándar interno, se realizaron cinco combinaciones de algunos de ellos con el fin de obtener la mayor respuesta del derivado y la menor cantidad de interferencias de

la matriz (Anexos, Tabla 22). Las combinaciones de iones estudiadas analizando orina fortificada con metilhexanamina a 100 ng/mL mostró que para los iones fragmento: 87, 126, 144 y 214 m/z se obtuvo una mayor respuesta del derivado MHA-IBCF (Anexos, Figura 41) y una disminución considerable en las impurezas de la orina (Figura 24).

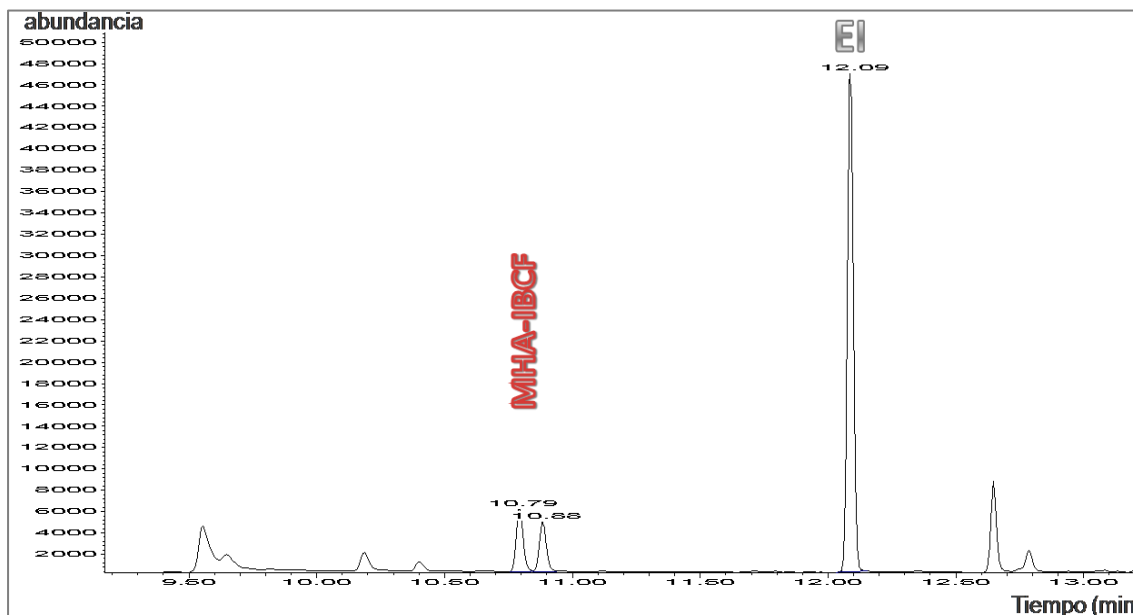


Figura 24. Cromatograma iónico total para MHA-IBCF a 100 ng/mL.

4.2.7 Metodología optimizada SALLE-CG-EM para el análisis de metilhexanamina

La Figura 25 muestra el esquema analítico para el análisis de metilhexanamina en orina por SALLE-CG-EM.

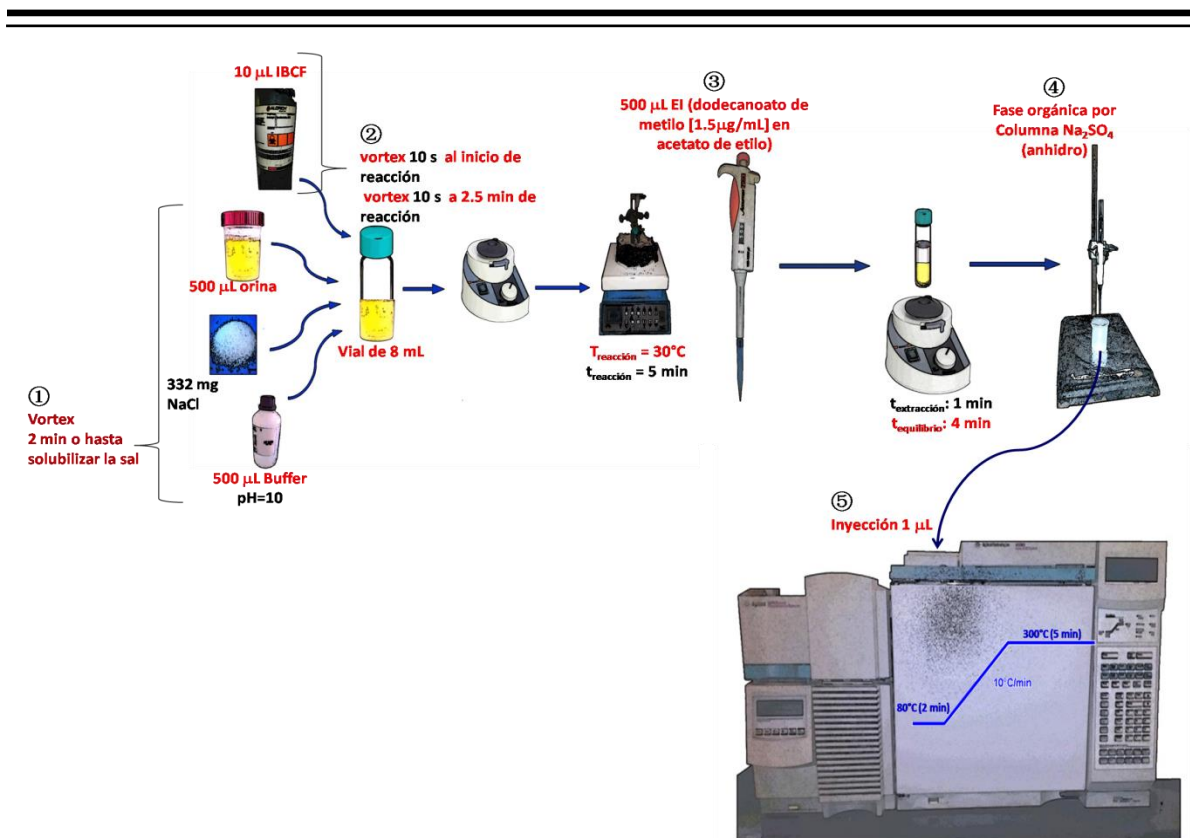


Figura 25. Esquema analítico para el análisis de MHA por SALLE-CG-EM.

Las condiciones cromatográficas para el análisis de metilhexanamina por la metodología SALLE-CG-EM se describen en la Tabla 8:

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para SALLE-CG-EM.

Equipo:	Cromatógrafo de Gases 6890N Agilent acoplado a Detector Selectivo de Masas 5973Network Agilent o equivalente.
Inyector	Splitless
T inyector:	250°C
Flujo de purga:	50 mL/min
Tiempo de purga:	1 min
Gas:	Helio
Flujo de gas ahorrador:	15 mL/min
Tiempo de gas ahorrador:	2 min
Columna:	Zebtron ZB-5 (5% difenil - 95% polidimetilsiloxano) Dimensiones: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m Flujo: 1 mL/min

Programa del horno: T inicial: 80 °C
 Tiempo inicial: 2 min

Rampa:

Gradiente (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tiempo (min)
10	300	5 min

Tiempo total:
29 min

Detector:	Detector Selectivo de Masas	
	Tipo:	Ionización Electrónica 70 eV
	T cámara de ionización:	230°C
	T línea de transferencia:	280 °C
	T cuadrupolo:	150°C
	Modo:	SIM
	Iones (m/z):	87, 126, 144 y 214

4.2.8 Validación SALLE-CG-EM

4.2.8.1 Precisión

La precisión del método se evaluó por triplicado en tres días diferentes para los niveles de concentración bajo (20 ng/mL), medio (100 ng/mL) y alto (201 ng/mL). La estimación de la precisión se realizó calculando los coeficientes de variación para cada nivel evaluado. Los coeficientes de variación para los tres niveles fueron: 2.64%, 1.87% y 2.99% respectivamente. Se puede observar que para los tres niveles evaluados se obtuvo buena precisión.

4.2.8.2 Exactitud

La exactitud del método se evaluó preparando una curva de calibración utilizando orina fortificada a cinco niveles de concentración, con la que se evaluó cada punto de las curva adicionando orina con cantidades conocidas de metilhexanamina y se calcularon los porcentajes de recuperación del analito. En la Tabla 9 se muestran los resultados de la evaluación de la exactitud. Se observó que el porcentaje de

recuperación en todos los puntos evaluados se encuentra entre el 94 % 108 %. Por otro lado el coeficiente de variación

Tabla 9 Resultados de la evaluación de la exactitud del método SALLE-CG-EM.

Curva Estándar					
Niveles (ng/mL)	Pendiente	Ordenada al origen	R ²	Ecuación de la recta	
20, 40, 100, 141 y 201	2.6132	0.0093	0.9980	AR=2.613*CR-0.009	
% Recuperación					
Conc. MHA(ng/mL)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	%CV
20	88	99	96	94.39	5.75
40	98	104	120	107.42	10.54
100	103	107	109	106.11	2.77
141	103	112	112	108.73	4.79
201	98	105	117	106.73	8.75
	MINIMO	94.39 %			
	MAXIMO	108.73 %			

4.2.8.3 Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación

La linealidad se evaluó utilizando cinco niveles de concentración: 20, 40, 100, 141 y 201 ng/mL de metilhexanamina en orina blanco. La curva de calibración se realizó por triplicado. La linealidad se estimó con el coeficiente de determinación de la regresión lineal de la curva de calibración, el valor obtenido fue $r^2 = 0.9995$ lo que indicó que los resultados obtenidos se ajustan a un modelo lineal en el intervalo evaluado. La sensibilidad del método se estimó con la pendiente de la recta, el valor de la pendiente fue $m = 2.8$, indicando buena sensibilidad relativa debido a un valor de $m > 1$. Los límites de detección y cuantificación se estimaron en función de la desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de calibración con $LD = 4.7$ ng/mL y $LC = 14.1$ ng/mL. La Tabla 10 contiene los resultados obtenidos de la curva de calibración así como la ecuación para la recta promedio ajustada a un modelo lineal.

Tabla 10. Resultados de la evaluación de linealidad de SALLE-CG-EM.

Linealidad	Ecuación	Pendiente	Ordenada	LD	LC	MRPL
20, 40, 100, 141 y 201 ng/mL R ² = 0.9995 (n=3)	AR = 2.8244CR + 0.0069	m = 2.8244	b = 0.0069	4.7 ng/mL	14.1 ng/mL	100 ng/mL
	AR: área relativa CR: concentración relativa		Desviación estándar (Sb) = 0.0027	LD=3.3*Sb/M	LD=10*Sb/M	

4.2.9 Aplicación de SALLE-CG-EM a muestras de orina

El método propuesto optimizado y validado fue aplicado en dos muestras de orina proporcionadas por la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE, México). Los resultados obtenidos para cada muestra fueron, muestra I: 41 ng/mL (CV=7.93%, n=3) y muestra II: 156 ng/mL (CV=5.44%, n=3). El nivel mínimo de desempeño exigido a los laboratorios por la WADA (World Anti-Doping Agency) es: 100 ng/mL de metilhexanamina en orina. Por lo que el método desarrollado presenta todas las características necesarias para ser utilizado en el análisis de control del dopaje. La Figura 26 y Figura 28 corresponden a los cromatogramas iónicos totales de dos muestras de orina obtenidas de CONADE analizadas por la metodología optimizada y validada SALLE-CG-EM para la cuantificación de metilhexanamina. Por otro lado, la Figura 27 y Figura 29 muestran los cromatogramas iónicos totales de orina fortificada a 141 ng/mL y 40 ng/mL respectivamente. Se puede observar que las respuestas obtenidas en las muestras de CONADE son similares a las respuestas de orina fortificada de concentración cercana sin embargo, el perfil cromatográfico es diferente, aunque no se observan interferencias en los tiempos de retención de MHA-IBCF o EI. El método utilizado en CONADE es por extracción líquido-líquido seguido de su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Las muestras I y II se identificaron por CONADE como “< 50 ng/mL” y “> 100 ng/mL”

respectivamente, lo que coincide con los resultados obtenidos utilizando la metodología SALLE-CG-EM.

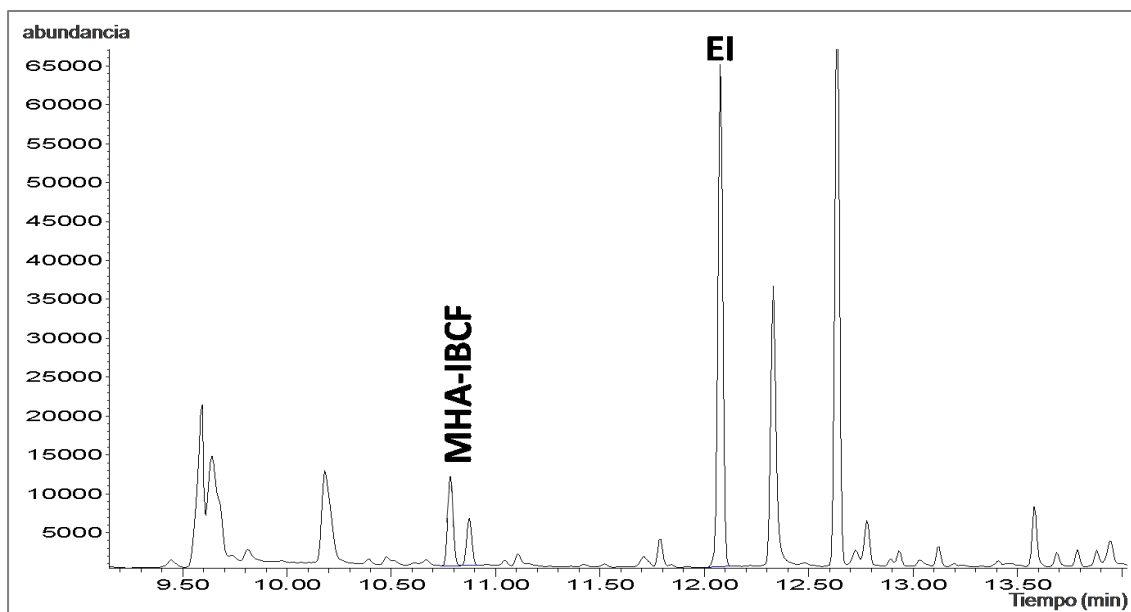


Figura 26. Cromatograma iónico total de una muestra de orina obtenida de CONADE (MHA > 100 ng/mL) analizada por SALLE-CG-EM.

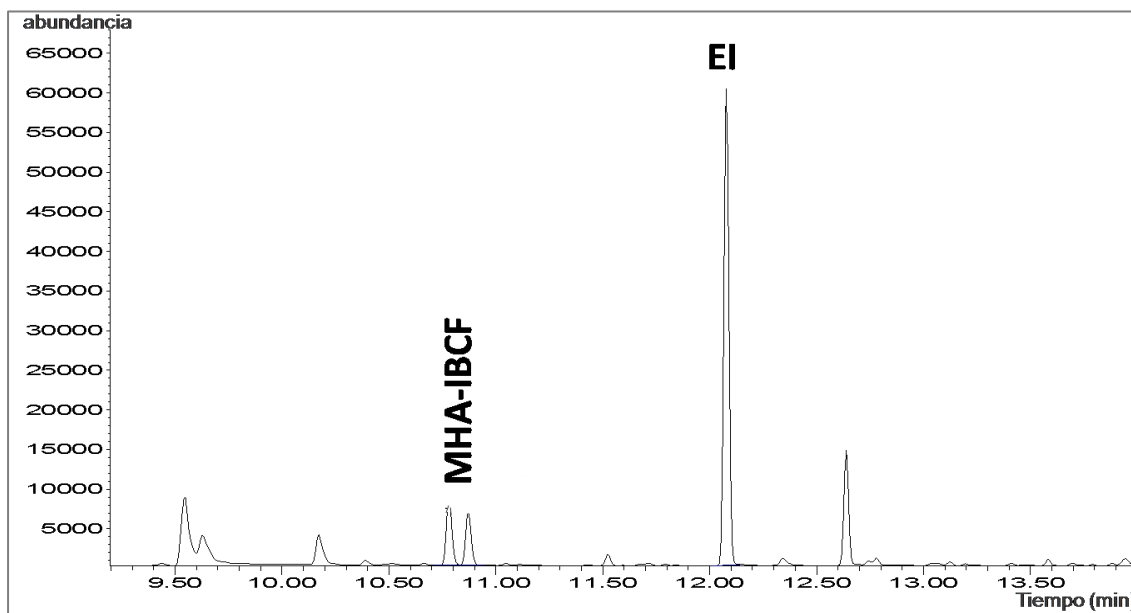


Figura 27. Cromatograma iónico total de una muestra de orina fortificada a 141 ng/mL analizada por SALLE-CG-EM.

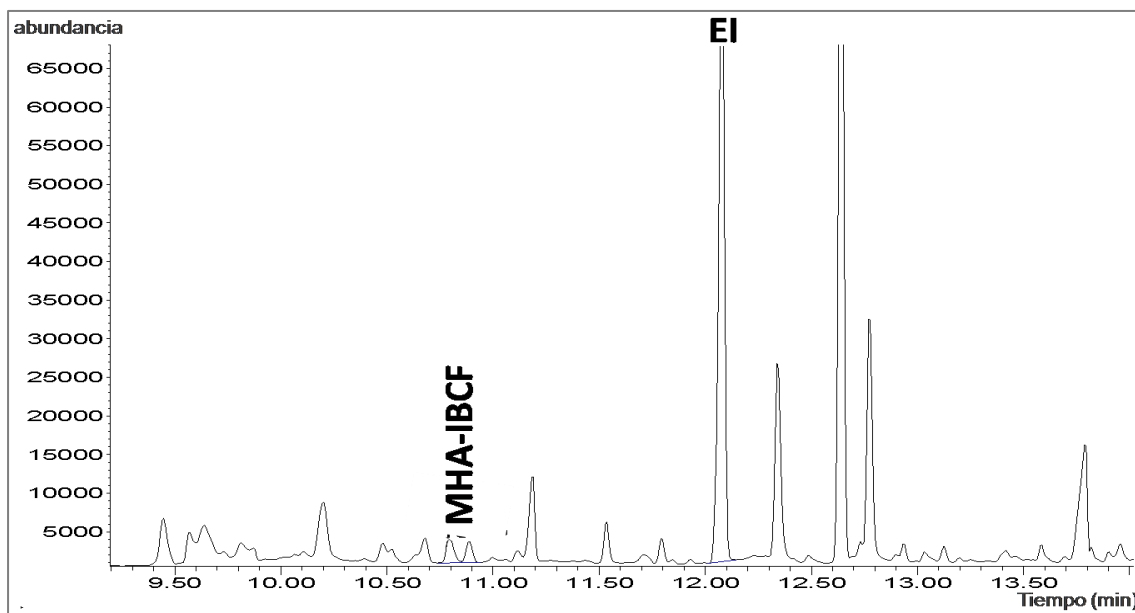


Figura 28. Cromatograma iónico total de una muestra de orina obtenida de CONADE (MHA < 50 ng/mL) analizada por SALLE-CG-EM.

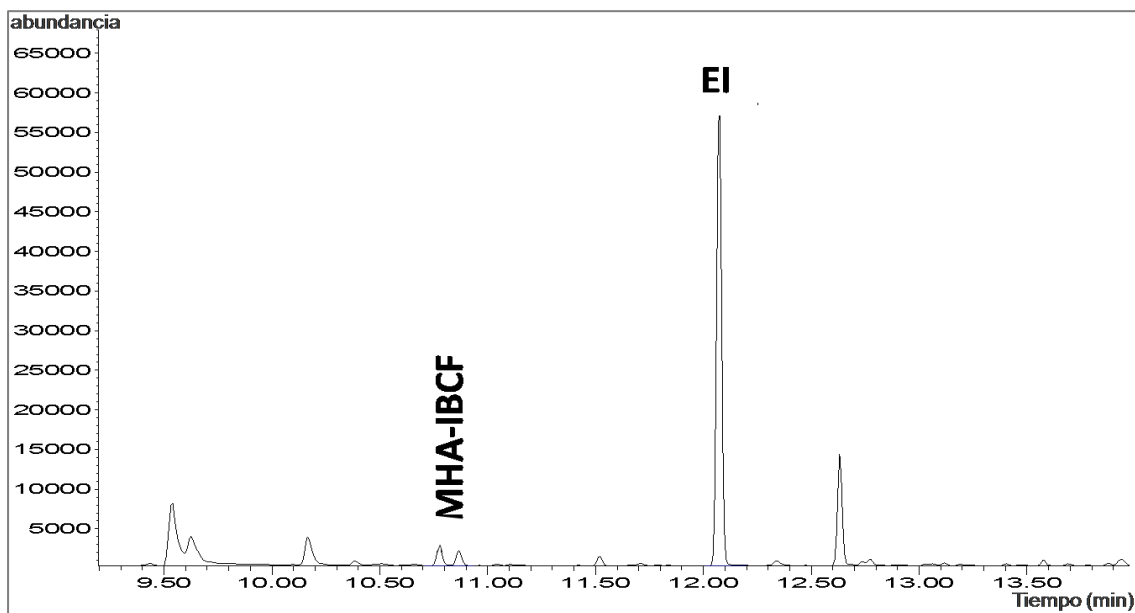


Figura 29. Cromatograma iónico total de una muestra de orina fortificada a 40 ng/mL analizada por SALLE-CG-EM.

4.3 Optimización HS-MEFS-CG

4.3.1 Influencia del volumen de IBCF

La influencia que tiene el volumen del derivante en la extracción HS-MEFS se estudió utilizando muestras de agua fortificada. El volumen inicial de IBCF fue $10\mu\text{L}$. Para extraer el derivado MHA-IBCF de una muestra con concentración de $1\mu\text{g/mL}$ y $10\mu\text{g/mL}$ de MHA, se realizó la extracción en el espacio de cabeza a temperatura ambiente por 15 min. El derivado a $1\mu\text{g/mL}$ no se observó en el cromatograma, pero al aumentar la concentración 10 veces se obtuvieron los picos correspondientes al MHA-IBCF sin embargo, se observó desgaste de la fase polimérica de la fibra con picos que se observan a lo largo del cromatograma correspondientes a metilsiloxanos. La Figura 30 muestra el cromatograma del MHA-IBCF extraído por HS-MEFS en el que se puede observar la contaminación debida al daño en la fibra que interfiere con el derivado.

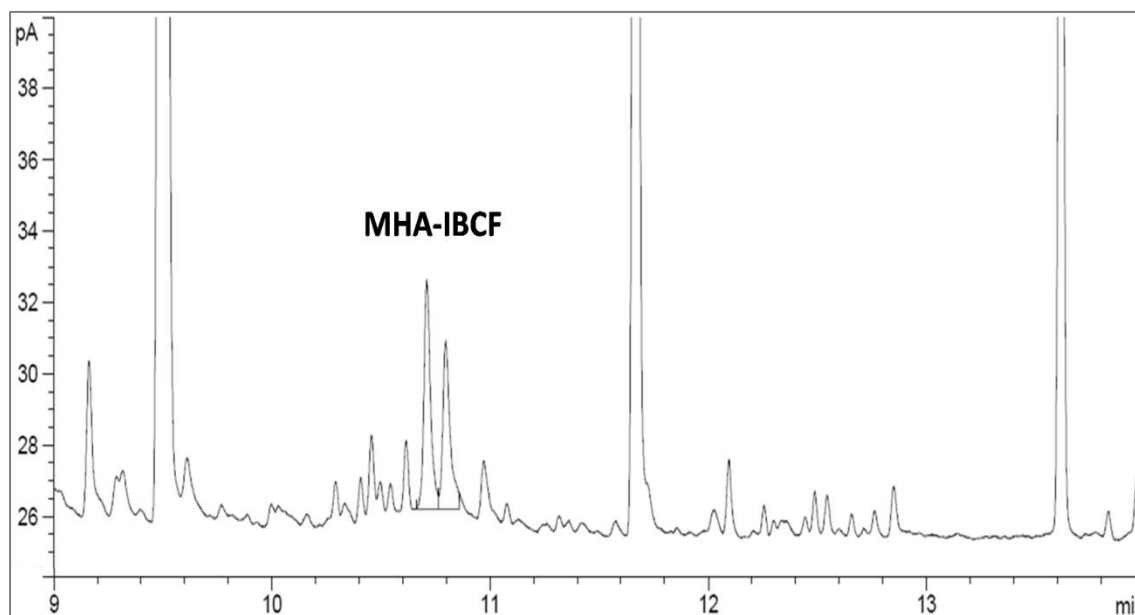


Figura 30. Cromatograma de MHA-IBCF ($10\mu\text{g/mL}$ MHA, $10\mu\text{L}$ IBCF) que muestra daño de la fibra PDMS/DVB.

Se procedió a disminuir el volumen del derivante a $1\mu\text{L}$ manteniendo la concentración en $10\mu\text{g/mL}$. Se observó un aumento en la respuesta del derivado de más de 300 veces y la contaminación de la fibra disminuyó considerablemente.

Se repitió el experimento por triplicado utilizando 1 μ L de IBCF y se obtuvo un %CV=9%. Se disminuyó la concentración de MHA a 1 μ g/mL y se obtuvo el derivado MHA-IBCF que se muestra en la Figura 31, se puede observar que el perfil de interferencias disminuyó considerablemente.

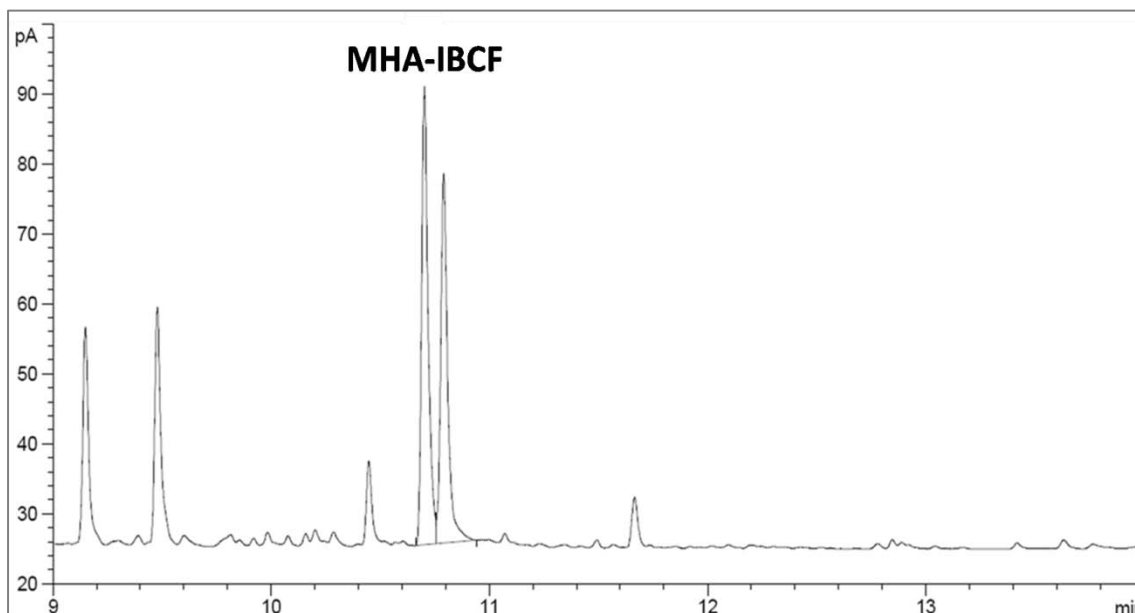


Figura 31. Cromatograma de MHA-IBCF (1 μ g/mL MHA, 1 μ L IBCF) extraído con fibra PDMS/DVB.

Con base en lo anterior se concluye que el derivante utilizado en exceso acelera el deterioro de la fibra además de saturar la fase polimérica y disminuir la eficiencia de extracción del derivado MHA-IBCF, por lo que se considera el volumen de 1 μ L de IBCF como óptimo para la extracción HS-MEFS.

4.3.2 Temperatura y tiempo de extracción

El estudio de la influencia que tiene la temperatura y tiempo de extracción sobre HS-MEFS se realizó en muestras de agua fortificada y orina fortificada a una concentración de 100 ng/mL para todos los experimentos. Para evaluar estos parámetros en agua fortificada se varió la temperatura de la siguiente manera: 25°C, 35°C y 42°C; mientras que el tiempo de extracción se evaluó como sigue: 5 min, 15 min y 25 min. Los resultados de estos experimentos mostraron que al incrementar la temperatura se incrementó la respuesta del derivado debido a que

con la temperatura se favoreció la transferencia de masa del analito, de la matriz al espacio de cabeza y por ende al recubrimiento de la fibra. La máxima respuesta observada en los experimentos se obtiene al realizar la extracción a la temperatura más alta. La Figura 32 muestra el comportamiento observado de la respuesta de MHA-IBCF, evaluada a la máxima temperatura; al incrementar el tiempo de extracción, se obtiene mayor respuesta debido a que la fibra está más tiempo en contacto con el espacio de cabeza incrementando la cantidad del analito extraído por la fibra, como consecuencia de que no se ha llegado al equilibrio. Se observó que a los 25 min de extracción se obtuvo la mayor respuesta para el derivado.

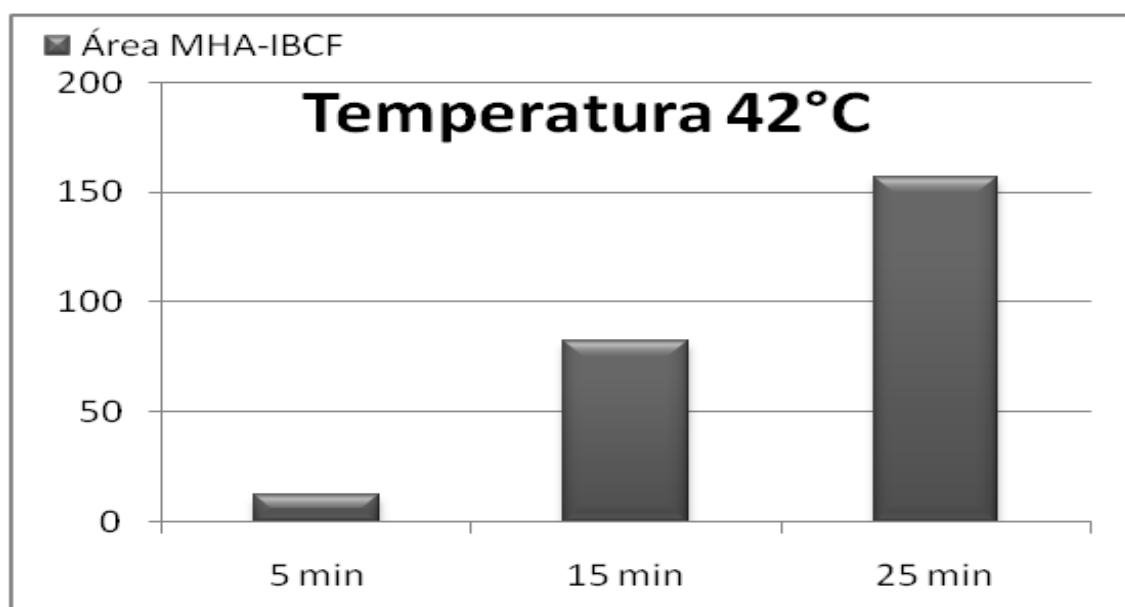


Figura 32. Optimización del tiempo de reacción a temperatura constante (42 °C) para extracción de MHA-IBCF en agua fortificada por HS-MEFS.

Sin embargo, al igual que en la extracción líquido-líquido y líquido-sólido, en la extracción HS-MEFS el efecto matriz puede tener un impacto considerable en la metodología desarrollada, por esto se procedió a evaluar estos parámetros en orina fortificada. La temperatura se varió de la siguiente manera: 25°C, 30°C y 35°C; mientras que el tiempo: 15 min, 25 min y 30 min. Los resultados mostraron un comportamiento similar al observado en agua fortificada, la máxima respuesta del MHA-IBCF se obtuvo con la temperatura y tiempo de reacción en sus valores

más altos; sin embargo, al comparar la respuesta obtenida en orina y agua, a la misma concentración y bajo las mismas condiciones (35°C, 25 min), se obtuvo para agua fortificada un área de 80 pA*min y para orina fortificada un área de 48 pA*min, es decir el efecto matriz impacta en la respuesta del derivado en un 40%. La Figura 33 muestra el comportamiento de la respuesta del derivado en la matriz de orina al incrementar el tiempo de extracción, evaluado a la temperatura de 35°C. Las condiciones 35°C y 30 min se eligieron para la extracción en la metodología HS-MEFS.

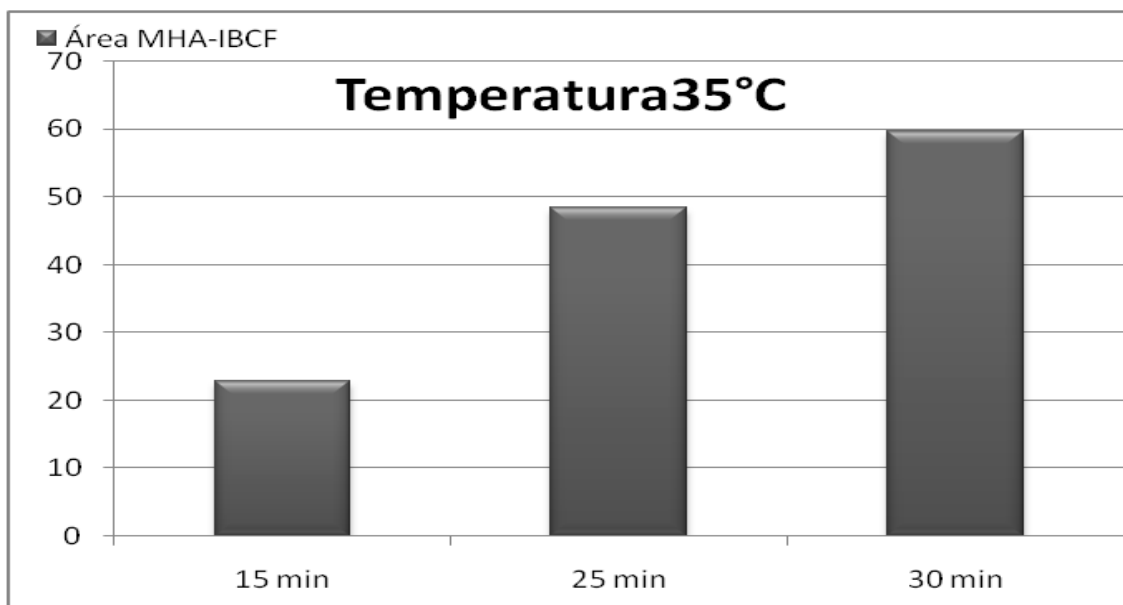


Figura 33. Optimización de temperatura y tiempo de reacción para extracción de MHA-IBCF en orina fortificada por HS-MEFS.

4.3.3 Condiciones HS-MEFS-CG

Las condiciones de pH y fuerza iónica se tomaron de la reacción de derivación de la metilhexanamina; el tiempo de incubación se utilizó el tiempo de reacción para la formación del derivado (pH=10 valor que se encuentra en el intervalo de trabajo de la fibra PDMS/DVB, 332 mg de NaCl y 5 minutos de incubación). El volumen de la muestra se consideró de tal forma que se tuviera una dilución de 1:5 para disminuir la transferencia de los componentes de la matriz hacia el espacio de

cabeza; el volumen de muestra fue 400 μL y se diluyó con 1600 μL de Buffer pH=10. Las condiciones optimizadas fueron: volumen de derivante: 1 μL de IBCF, temperatura de extracción: 35°C y tiempo de extracción: 30 min. La desorción térmica se llevó a cabo directamente en el puerto de inyección del CG, utilizando la temperatura que se empleó en el desarrollo: 250°C, mientras que el tiempo de desorción fue de 10 min, tiempo en el que no se observó acarreo del derivado en los blancos de reactivos y se favoreció el acondicionamiento de la fibra para la siguiente extracción. La Figura 34 muestra el cromatograma del derivado obtenido con las condiciones mencionadas, aplicadas a una muestra de orina fortificada a una concentración de 100 ng/mL, la cual es el MRLP que exige la WADA a los laboratorios de control de dopaje.

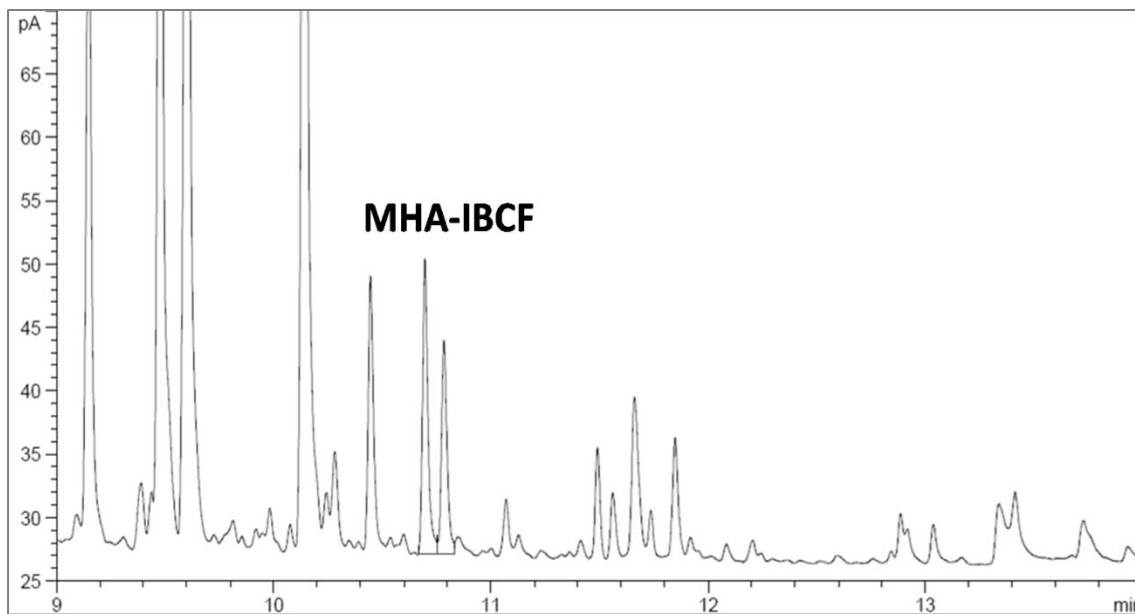


Figura 34. Cromatograma de MHA-IBCF con las condiciones óptimas HS-MEFS-CG.

4.3.4 Metodología optimizada HS-MEFS-CG para el análisis de metilhexanamina

La Figura muestra el esquema analítico para el análisis de metilhexanamina en orina por HS-MEFS-CG.

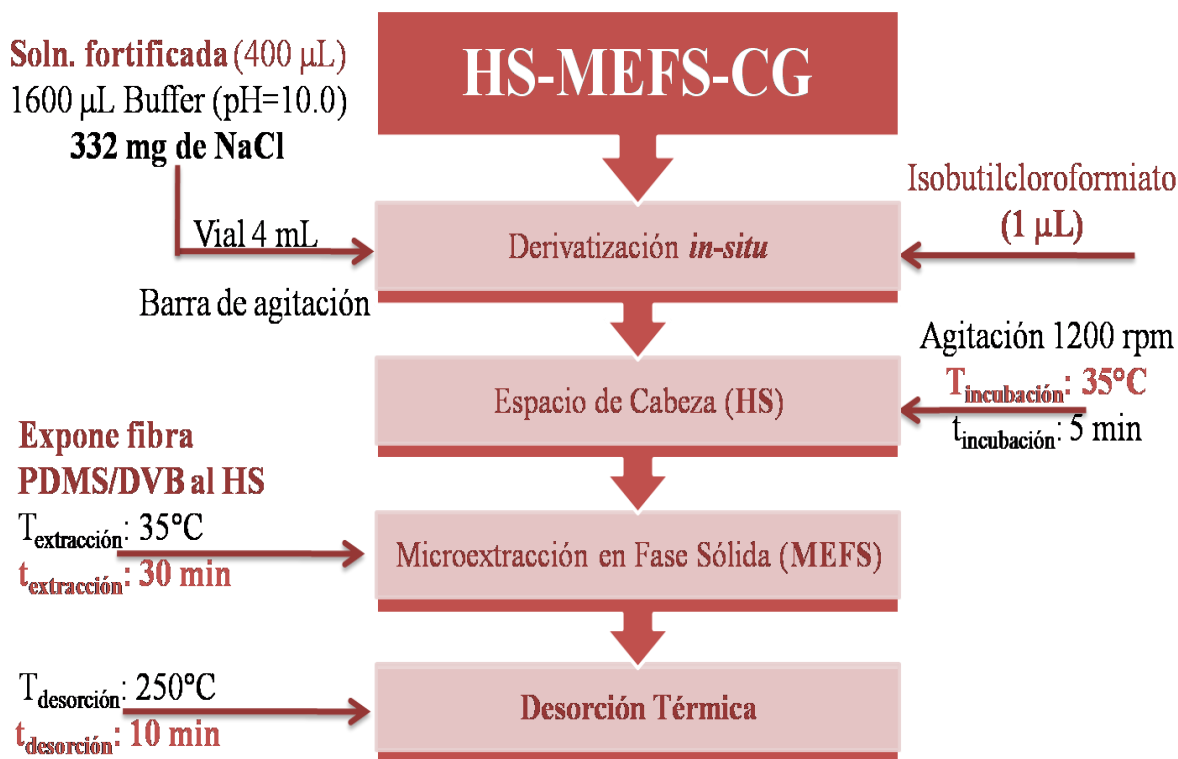


Figura 35. Esquema analítico para el análisis de MHA por HS-MEFS-CG

Las condiciones cromatográficas para el análisis de metilhexanamina por la metodología HS-MEFS-CG se describen en la Tabla 11:

Tabla 11. Condiciones cromatográficas para HS-MEFS-CG.

Equipo:	Cromatógrafo de Gases 6890N Agilent o equivalente.
Inyector:	Splitless
T inyector:	250°C
Flujo de purga:	50 mL/min
Tiempo de purga:	1 min
Gas:	Hidrógeno
Flujo de gas ahorrador:	15 mL/min
Tiempo de gas ahorrador:	2 min
Columna:	Zebtron ZB-5 (5% difenil - 95% polidimetilsiloxano) Dimensiones: 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm Flujo: 1 mL/min

Programa del horno:

T inicial: 80 °C
 Tiempo inicial: 2 min

Rampa:

Gradiente (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tiempo (min)
10	300	5 min

Tiempo total:
 29 min

Detector:	FID
-----------	-----

T detector: 320 °C
 Flujo de H₂: 40 mL/min
 Flujo de aire: 250 mL/min
 Gas auxiliar: Nitrógeno
 Flujo de gas auxiliar: 45 mL/min

4.3.5 Validación de HS-MEFS-CG

4.3.5.1 Precisión

La evaluación de la precisión se realizó por triplicado para dos niveles de concentración: 20 ng/mL (nivel bajo) y 102 ng/mL (nivel medio). La precisión se estimó calculando los coeficientes de variación para los niveles evaluados. Los coeficientes de variación para el nivel bajo fue 3% mientras que para el nivel medio fue 10%, valores que indican buena precisión del método.

4.3.5.2 Exactitud

La exactitud del método se evaluó calculando el porcentaje de recuperación para dos concentraciones, incluidas en el intervalo de concentraciones de la linealidad, 20 ng/mL y 102 ng/mL. Se calcularon las concentraciones utilizando la curva de

calibración promedio obtenida en la linealidad. Los porcentajes de recuperación para las concentraciones evaluadas van de 92% a 110%, lo que nos dice que se tiene un método exacto.

4.3.5.3 Linealidad y límites de detección y cuantificación

La linealidad se evaluó utilizando cinco diferentes concentraciones de MHA adicionada a orina blanco: 20, 41, 102, 143 y 205 ng/mL. La curva de calibración se realizó por duplicado. La linealidad se evaluó con el coeficiente de determinación de la curva de calibración, el valor obtenido fue $r^2 = 0.9979$ lo que indicó que los resultados obtenidos se ajustan a un modelo lineal. Los límites de detección y cuantificación se estimaron en función de la desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de calibración con LD= 10.6 ng/mL y LC= 32.1 ng/mL, este último valor indica que el punto más bajo de la curva de calibración estaría por debajo del límite de cuantificación.

4.3.6 Aplicación de la metodología HS-MEFS-CG

El método HS-MEFS-CG optimizado y validado fue aplicado en dos muestras de orina proporcionadas por la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE, México). Los resultados obtenidos para cada muestra fueron, muestra I: 23 ng/mL (CV=4.58%, n=3) y muestra II: 143 ng/mL (CV=12.89%, n=3). Los valores obtenidos para ambas muestras por HS-MEFS-CG, fueron menores que por SALLE-CG-EM, esto se debe probablemente a que se utilizaron las mismas muestras sin embargo, SALLE-CG-EM se desarrolló primero y se analizaron las muestras enseguida, mientras que las el análisis por HS-MEFS-CG se hizo cuatro meses después. La Figura 36 y Figura 38 corresponden a los cromatogramas de dos muestras de orina obtenidas de CONADE analizadas por la metodología optimizada y validada HS-MEFS-CG. Por otro lado, la Figura 37 y Figura 39 muestran los cromatogramas de orina fortificada a 143 ng/mL y 20 ng/mL

respectivamente. Se puede observar que las respuestas obtenidas en la muestras de CONADE son similares a las respuestas de orina fortificada de concentración cercana sin embargo, se observan más impurezas (picos cromatográficos) en las muestras de CONADE.

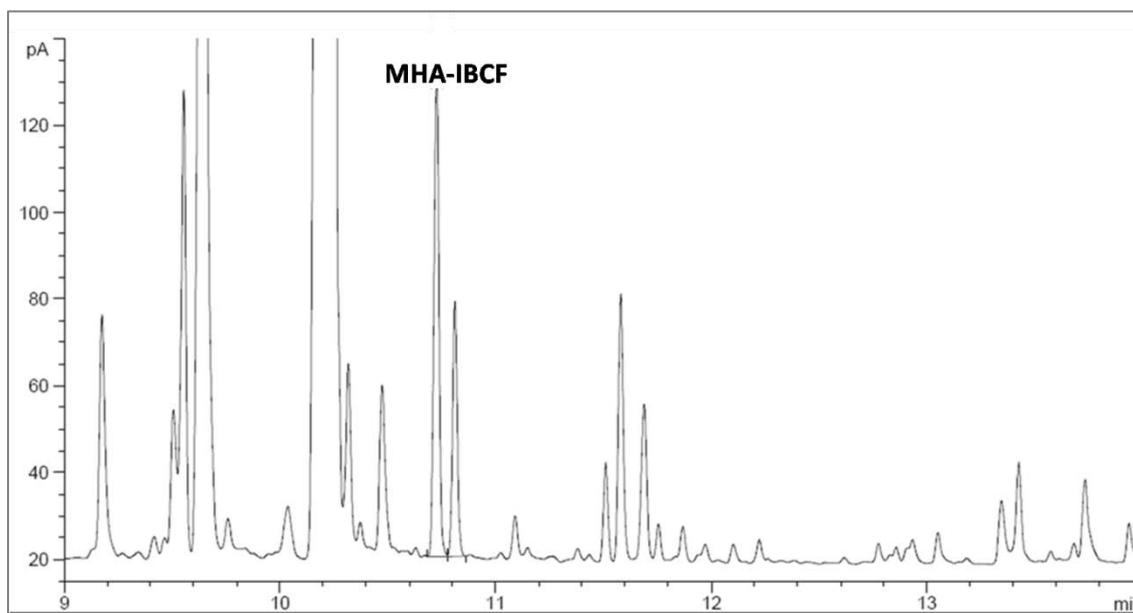


Figura 36. Cromatograma de una muestra de orina obtenida de CONADE (MHA > 100 ng/mL) analizada por HS-MEFS-CG.

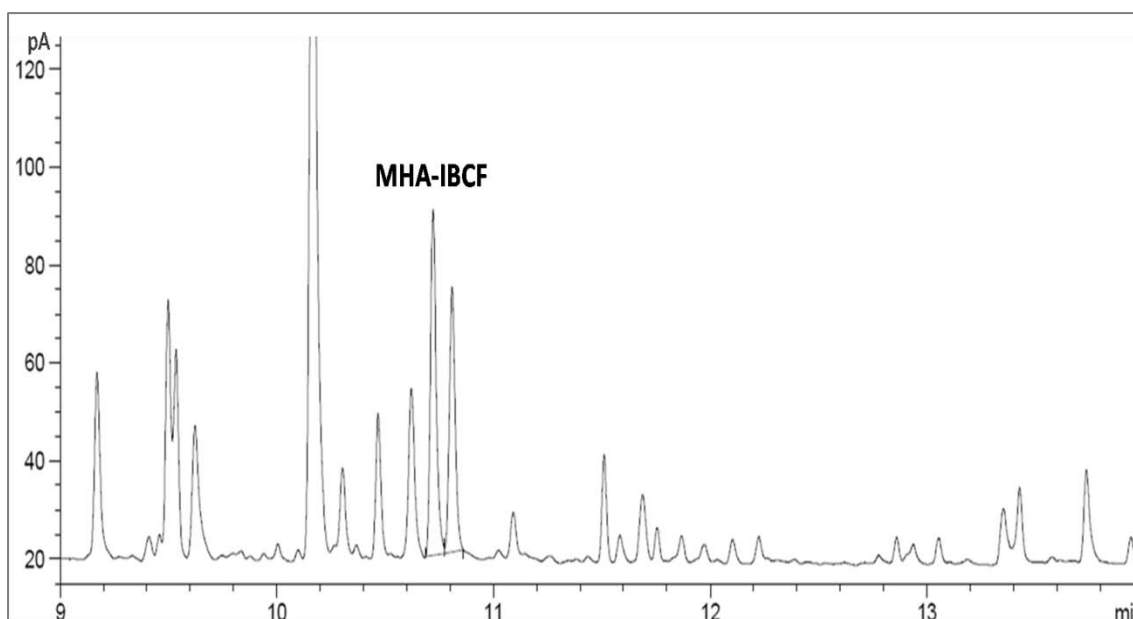


Figura 37. Cromatograma de orina fortificada a 143 ng/mL analizada por HS-MEFS-CG.

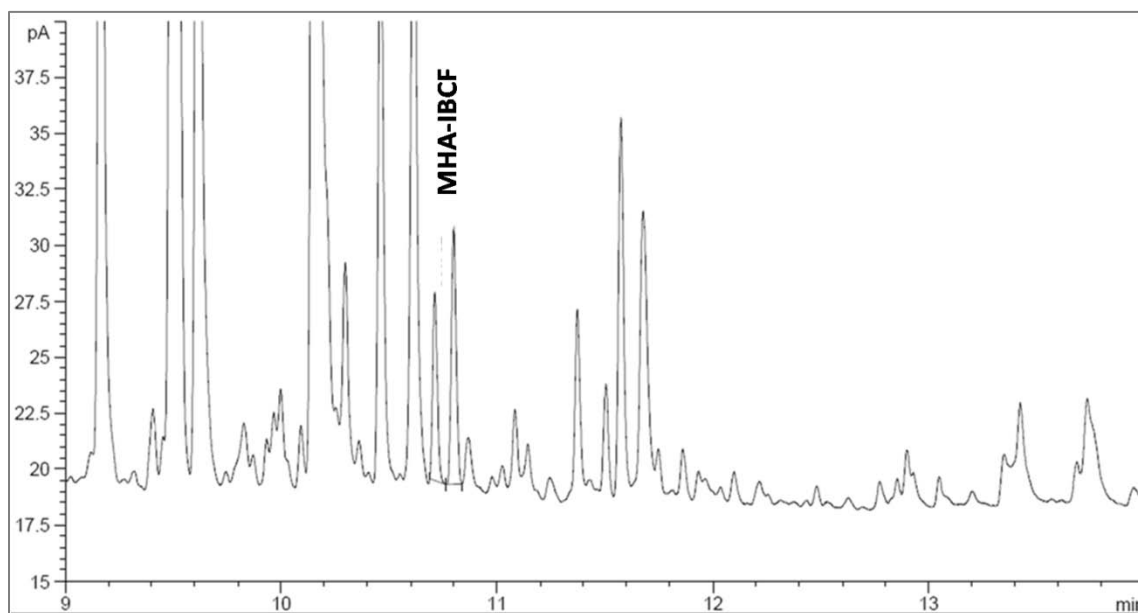


Figura 38. Cromatograma de una muestra de orina obtenida de CONADE (MHA < 50 ng/mL) analizada por HS-MEFS-CG.

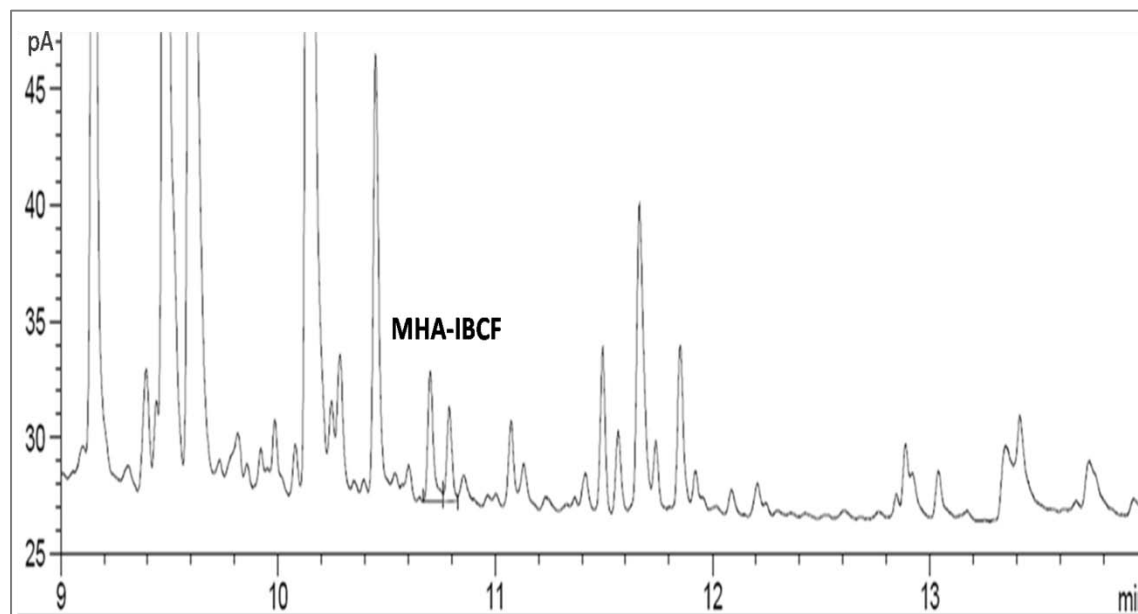


Figura 39. Cromatograma orina fortificada a 20ng/mL analizada por HS-MEFS-CG.

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y optimizó un método para la determinación de metilhexanamina en orina, basado en la derivación *in-situ* y extracción líquido-líquido asistida con adición de sal seguido de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (SALLE-CG-EM).
2. Es posible derivatizar la metilhexanamina directamente en la matriz utilizando isobutilcloroformiato como agente derivatizante.
3. Se desarrolló y optimizó un método para la determinación de metilhexanamina en orina, basado en la derivación *in-situ* y microextracción en fase sólida por espacio de cabeza seguido de cromatografía de gases (HS-MEFS-CG).
4. Los métodos propuestos muestran exactitud, linealidad y buena precisión con $\%CV \leq 10\%$.
5. Las metodologías propuestas pueden ser utilizadas para determinar metilhexanamina (estimulante) en muestras de orina para control de dopaje, en donde el nivel mínimo de desempeño exigido por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) a los laboratorios de control de dopaje es de 100 ng/mL, concentración que se encuentra dentro del intervalo evaluado en ambos métodos.
6. Las muestras de orina obtenidas de CONADE presentaron contenido de metilhexanamina al ser analizadas por SALLE-CG-EM y HS-MEFS-CG.
7. El contenido de metilhexanamina en las muestras de orina obtenidas de CONADE se encontró por debajo del MRPL en una de ellas y por encima del MRPL en la otra, al ser analizadas por ambas metodologías.
8. Las metodologías SALLE-CG-EM y HS-MEFS-CG para la determinación de metilhexanamina no se encuentran reportadas en la literatura.

ANEXOS

A. Pruebas estadísticas

Tabla 12 Contraste de hipótesis para la variación de IBCF en la reacción(STATGRAPHICS; n=2, $\alpha=0.05$).

Volumen de IBCF	20 μL	10 μL
Área MHA-IBCF	4.69406	6.48138
Área MHA-IBCF	4.26049	4.0718
PROMEDIO	4.4773	5.2766
DESV. ESTÁNDAR	0.3066	1.7038
H₀	$\mu_1=\mu_2$	
alfa	0.05	
t calculado	-0.652959	
valor-P	0.580812	

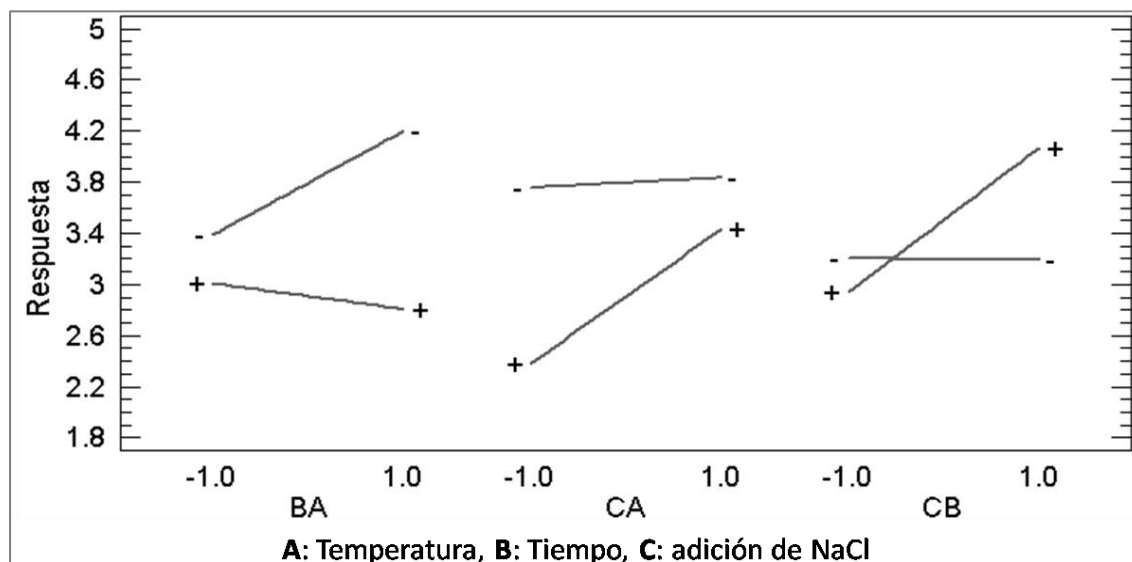


Figura 40 Gráfica de interacciones para el diseño MHA/SALLE.

Tabla 13. Tabla ANOVA para la respuesta de MHA-IBCF variando %NaCl.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18.5699	3	6.18997	10.84	0.0217
Intra grupos	2.28405	4	0.571013		
Total (Corr.)	20.854	7			

Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de medias LSD de Fisher para optimización de %NaCl (n=2).

	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
NaCl 45%	2.15547	X	NaCl 100% - NaCl 90%		0.553175
NaCl 75%	3.61722	X X	NaCl 100% - NaCl 75%	*	2.38536
NaCl 90%	5.44941	X X	NaCl 100% - NaCl 45%	*	3.84711
NaCl 100%	6.00258	X	NaCl 90% - NaCl 75%		1.83219
			NaCl 90% - NaCl 45%	*	3.29394
			NaCl 75% - NaCl 45%		1.46175

* indica una diferencia significativa.

Tabla 15. Tabla ANOVA para la respuesta de MHA-IBCF variando Temperatura.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.58215	3	2.19405	5.93	0.0591
Intra grupos	1.47887	4	0.369717		
Total (Corr.)	8.06102	7			

Tabla 16. Prueba de comparación múltiple de medias LSD de Fisher para optimización de temperatura (n=2).

	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia
Temperatura 20 °C	3.9280	X	Temperatura 20 °C - Temperatura 30°C	*	-2.07458
Temperatura 50°C	5.9567	X	Temperatura 20 °C - Temperatura 40°C	*	-2.17095
Temperatura 30°C	6.0026	X	Temperatura 20 °C - Temperatura 50°C	*	-2.02874
Temperatura 40°C	6.0990	X	Temperatura 30°C - Temperatura 40°C		-0.096365
			Temperatura 30°C - Temperatura 50°C		0.045835
			Temperatura 40°C - Temperatura 50°C		0.1422

* indica una diferencia significativa.

Tabla 17. Comparación estadística para agitación de la mezcla de reacción en la obtención de MHA-IBCF.

	n	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Agitación manual	4	7.22223	1.40254	19.42%
Sin agitación	2	4.43302	0.502095	11.33%
Agitación vortex	4	8.29058	0.465185	5.61%

Tabla ANOVA				
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
Entre grupos	19.9545	2	9.97723	10.27
Intra grupos	6.80261	7	0.971801	Valor-P
Total (Corr.)	26.7571	9		0.0083

Tabla 18. Prueba LSD de Fisher y Prueba de Leven para MHA-IBCF en función de la agitación.

	Media	Grupos Homogéneos
Sin agitación	4.43302	X
Agitación manual	7.22223	X
Agitación vortex	8.29058	X

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	2.81637	0.126649

Tabla 19. Comparación de las respuestas del dodecanoato de metilo en CG-FID por inyección directa y después de extracción SALLE.

	Estándar (1)	Extracción (2)
n	3	3
Promedio	1.84923	1.85461
Desv. Estándar	0.0948692	0.169209
Varianza	0.00900017	0.0286316
%CV	5.13%	9.12%
Prueba t para comparar medias	Prueba F para comparar desviaciones estándar	
Ho: media (1) = media (2)	Ho: sigma (1) = sigma (2)	
H₁: media (1) ≠ media (2)	H₁: sigma (1) ≠ sigma (2)	
t = -0.0480359 valor-P = 0.96399	F = 0.314344 valor-P = 0.478328	
No se rechaza Ho para α = 0.05	No se rechaza Ho para α = 0.05	

Tabla 20. Área relativa obtenida del derivado MHA-IBCF y dodecanoato de metilo al disminuir la concentración de metilhexanamina.

Concentración MHA (ng/mL)	Concentración relativa	Área relativa
1505	1.0300152	1.40280
1004	0.6866768	0.86402
502	0.3433384	0.39082
201	0.13733536	0.13154
100	0.06866768	0.06709
	R² =	0.9972
	Pendiente =	1.3920
	n =	2

Tabla 21. Fragmentos utilizados en CG-EM en modo SIM para MHA-IBCF y EI.

Grupo	Fragmentos (m/z)
Grupo 1	126,144, 214, 215
Grupo 2	126, 144, 74, 87
Grupo 3	126, 144, 214, 87
Grupo 4	126, 144, 215, 87
Grupo 5	144, 87, 214

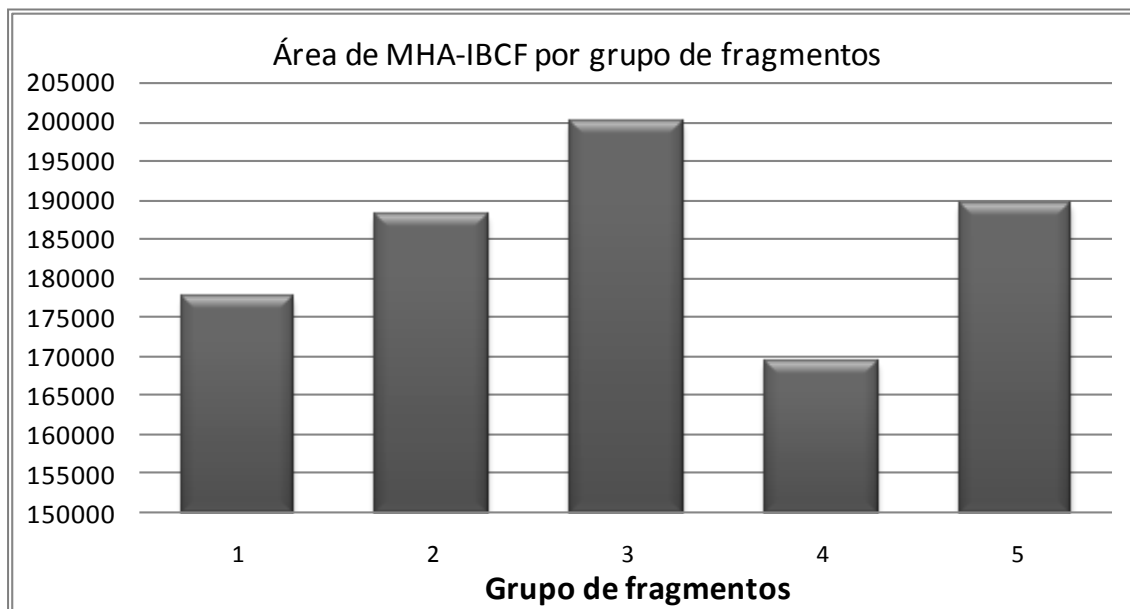


Figura 41. Áreas obtenidas del derivado MHA-IBCF dependiendo de los fragmentos seleccionados en CG-EM (SIM).

B. Cromatogramas y espectros de masas

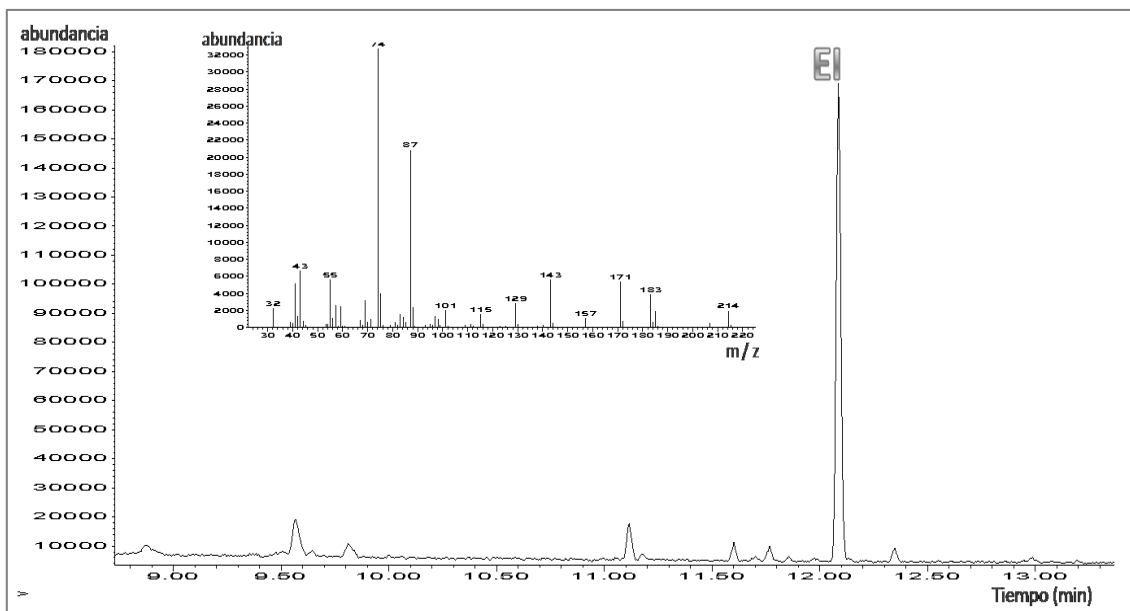


Figura 42. Cromatograma iónico total y espectro de masas (SCAN) de EI en agua fortificada.

REFERENCIAS

- 1 <http://www.conade.gob.mx/portal/?id=1706> (consultada 18 febrero 2013)
- 2 <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/The-Code/> (consultada 03 junio 2014)
- 3 Athlete Handbook. (2013). United States Anti-Doping Agency (USADA). EUA
- 4 Rahul, S. P.; *et al.* (2013). Review Updates on chemical and biological research on botanical ingredients in dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Published online. (consultada 18 enero 2013)
- 5 Müller, R. K.; Grosse, J.; Thieme, D.; Lang, R.; Teske, J.; Trauer, H. (1999). Introduction to the application of capillary gas chromatography of performance-enhancing drugs in doping control. *Journal of Chromatography A*, 843:275-285
- 6 Snow, N. H. (2000). Solid phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 885:445-455.
- 7 García-Campaña, A. M; Lara, F. J. (2014). *Talanta*, 127:51-58.
- 8 Thevis, N.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Schänzer, W. (2010). Stimulants and Doping in Sports. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 39:89-105
- 9 ElSohly, M. A.; *Et al.* (2012). Pelargonium Oil and Methyl Hexaneamine (MHA): Analytical Approaches Supporting the absence of MHA in Aithenticated Pelargonium graveolens Plant Material and Oil. *Journal of Analytical Toxicology*, 36:457:471
- 10 Li, J. S.; Chen, M.; Li, Z. C. (2012). Identification and Quantification of Dimethylamylamine in Geranium by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry Insights*. 7:47-58
- 11 Dargan, P.; Wood, D. (2013). *Novel Psychoactive Substances*. Editorial Academic Press, Elsevier. Londres, Reino Unido.
- 12 Zhang, Y.; Woods, R. M.; Breitbach, Z. S.; Armstrong, D. W. (2012). 1,3-Dimethylamilamine (DMAA) in supplements and geranium products: natural or synthetic. *Drug Testing and Analysis*, 4:12, 986-990
- 13 The merck index. (1989). An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Merck & co., inc. 11 edición. EUA
- 14 Chatten, L. G.; Harris, L. E. (2011). Relationship between $pK_b(H_2O)$ of Organic Compounds and $E_{1/2}$ Values in Several Nonaqueous Solvents. *Analytical Chemistry*, 34: 1495-1501
- 15 Deventer, K.; Roels, K.; Delbeke, F. T.; Van, E. P. (2011). Prevalence of legal and illegal stimulating agents in sports. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401:421-432
- 16 http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Anti-Doping_Laboratories/Lab_Statistics/WADA_2009_LaboratoryStatisticsReport_Final (consultada 18 enero 2013)
- 17 Gee, P.; *et al.* (2012). Use of Recreational Drug 1,3-Dimethylethylamine (DMAA) Associated With Cerebral Hemorrhage. *Annals of Emergency Medicine*, 60:4
- 18 Agencia Mundial Antidopaje. El Código Mundial Antidopaje, Lista de prohibiciones 2013. www.wada-ama.org (consultada 18 de enero 2013)
- 19 http://www.vademecum.es/noticia-alerta-130319-Actualizaci%F3n+de+la+alerta+de+la+retirada+de+suplementos+nutricionales+con+Dimetilamilamina+_5291 (consultada 05 junio 2014)
- 20 Vorce, S. P.; *et al.* (2011). Dimethylamilamine: A Drug Causing Positive Immunoassay Results for Amphetamines. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 35
- 21 Venhuis, B. J.; Kaste, D. (2012). Scientific Opinion on the Regulatory Status of 1,3-Dimethylamylamine (DMAA). *European Journal of Food Research & Review*, 2(4): 93-100
- 22 Schilling, B. K.; Hammond, K. G.; Bloomer, R. J.; Presley, C. S.; Yates, C. R. (2013). Physiological and pharmacokinetic effects of oral 1,3-dimethylamylamine administration in men. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 14:52
- 23 Bloomer, R. J.; Farney, T. M.; Harvey, I. C.; Alleman, R. J. (2013). Safety profile of caffeine and 1,3-dimethylamylamine supplementation in healthy men. *Human & Experimental Toxicology*, 32(11):1126-36
- 24 Díaz, P. J.; Fernández, B. M.; Salido, P. F. (1997). Aspectos básicos de bioquímica clínica. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid, España.
- 25 Armijo, J. A.; Mediavilla, A. (2005). *Farmacología humana*. 4ª edición. Editorial MASSON. Barcelona, España.

-
- 26 Galbis, P. J. (2004). Panorama actual de la química farmacéutica. 2a edición. Editorial U. de Sevilla. Sevilla, España.
- 27 Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011 (http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5249877) (consultada 7 enero 2014)
- 28 Koolman, J.; Röhm, K. H. (2004). Bioquímica: Texto y atlas. 3a edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- 29 Lisi, A.; Hasick, R.; Kazlauskas, C.; Goebel, C. (2011). Studies of methylhexaneamine in supplements and geranium oil. *Drug and Testing Analysis*, 3(11-12):873-876
- 30 Perrenoud, L.; Saugy, M.; Saudan, C. (2009). Detection in urine of 4-methyl-2-hexaneamine, a doping agent. *Journal of chromatography B*, 877:3767-3770
- 31 Sardela, V. F.; Sardela, P. D.; Deventer, K.; Araujo, A. L.; Cavalcante, K. M.; Padilha, M. C.; Pereira, H. M.; Eeno, P. V.; Aquino, N. F. (2013). Identification of sympathomimetic alkylamine agents in urine using liquid chromatography–mass spectrometry and comparison of derivatization methods for confirmation analyses by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1298:76-85
- 32 http://www.conade.gob.mx/Documentos/Sust_prohibidas/2015/Estandar_Internacional_Controles_Investigacion (Consultada octubre 2015)
- 33 Mitra, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. (2003). John Wiley & Sons Ltd. EUA.
- 34 NIST Technical Working Group on Biological Evidence Preservation. (2013). *The Biological Evidence Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers*. NIST, EUA.
- 35 Pawliszyn, J. (2012). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Analytical Techniques for Scientists*. Academic Press, Elsevier. Italia.
- 36 Pawliszyn, J.; Lord, H.; Wu, J. (2001). Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Talanta*, 54:655-672
- 37 Koster, E. M. H.; Niemeijer, I. S.; Jong, G. J. (2002). Multiple Solid-Phase Microextraction of Drugs from Human Urine. *Chromatographia*, 55:69-73
- 38 Zeng, Z.; Zhou, J. (2006). Novel fiber coated with β -cyclodextrin derivatives used for headspace solid-phase microextraction of ephedrine and methamphetamine in human urine. *Analytica Chimica acta*, 556:400-406
- 39 Miki, A.; Katagi, M.; Zaito, K.; Nishioka, H.; Tsuchihashi, H. (2008). Development of a two-step injector for GC–MS with on-column derivatization, and its application to the determination of amphetamine-type stimulants (ATS) in biological specimens. *Journal of Chromatography B*, 865:25-32
- 40 McNair, H. M.; Miller, J. M. (1998). *Basic Gas Chromatography*. John Wiley and Sons. EUA
- 41 Kitson, F. G.; Larsen, B. S.; McEwen, C. N. (1996). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry, A Practical Guide*. Academic Press. EUA.
- 42 Scott, R. P. (2003). *Gas Chromatography. Chrom-Ed Book Series*. Inglaterra.
- 43 Shalliker, R. A. (2012). *Hyphenated and Alternative Methods of Detection in Chromatography*. Taylor & Francis Group. EUA.
- 44 Barquero, Q. M. (2006). *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- 45 Lopez-Avila, V.; Zorio, M. (2013). Identification of methylhexaneamine by GC high-resolution TOFMS and soft ionization. *Forensic Science International*, 231:113–119.
- 46 Hempel, G. (2004). *Drug Monitoring and Clinical Chemistry. Volumen 5*. Editorial Elsevier. Holanda.
- 47 Poole, C. F. (2012). *Gas Chromatography*. Editorial Elsevier. EUA.
- 48 Blau, K.; Halket, J. M. (1993). *Handbook of Derivatives for Chromatography*. John Wiley & Sons Ltd. EUA
- 49 Knapp, D. R. (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. John Wiley & Sons. EUA.
- 50 Molnar-Perl, I. (2005). *Quantitation of amino acids and amines by chromatography, methods and protocols*. Elsevier. Holanda.
- 51 Kataota, H. (1996). Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 733:19-34
- 52 Analytix, *Advances in Analytical Chemistry*.(2002). Sigma-Aldrich. Vol. 3, 2002

- 53 Husek, P. (1998). Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B*, 717:57-91
- 54 Pietsch, J.; *et al.* (1996). Determination of aliphatic and alicyclic amines in water by gas and liquid chromatography after derivatization by chloroformates. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 355:164-173
- 55 Ugland, H. G.; Krogh, M.; Rasmussen, K. E. (1997). Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 701:29-38
- 56 Cunha, S. C.; Faria, M. A.; Fernandes, J. O. (2011). Gas Chromatography-Mass Spectrometry Assessment of amines in Port Wine and Grape Juice after Fast Chloroformate Extraction/Derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:8742-8753
- 57 Fernandes, J. O.; Ferreira, M. A. (1997). Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5) methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate. *Journal of Chromatography A*, 786:299-308
- 58 Akyüz, M.; Ata, S. (2006). Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1129:88-94
- 59 Ali, M. M. *Advanced Gas Chromatography, Progress in Agriculture, Biomedical and Industrial Applications*. InTech, Open Acces Book. (<http://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications>) (consultada 31 mayo 2013)
- 60 Poole, C. F. (2013). Derivatization reactions for use with the electron-capture detector. *Journal of Chromatography A*, 1296:15-24
- 61 El-Haj, B. M.; Al-Amri, A. M.; Hassan, M. H.; Ali, H. S.; Bin, K. R. (2003). The use of cyclohexanone as a "derivatizing" reagent for GC-MS detection of amphetamines and ephedrine in seizures and urine. *Forensic Science International*, 135:16-26
- 62 Moidoveanu, S. C.; David, V. (2002). Sample Preparation In Chromatography, *Journal of Chromatography Library*, 65:1-930
- 63 Mazzarino, M.; Riggi, S.; De la Torre, X.; Botré, F. (2010). Speeding up the process urine simple pre-treatment: Some perspectives on the use of microwave assisted extraction in the anti-doping field. *Talanta*, 81:1264-1272
- 64 Aufartová, J.; Mahugo-Santana, C.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J.; Nováková, L.; Solich, P. (2011). Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta*, 704:33-46
- 65 Namiesnik, J.; Guardia, M.; Marcinkowski, L.; Spietelin, A. (2014). Green aspects, development and perspectives of microextraction techniques. *Talanta*, 119:34-45
- 66 Wu, C. H.; Lo, Y. S.; Jan, L. J.; Wang, C. Y.; Chang, W. Y. (2012). Vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with derivatization for the fluorometric determination of aliphatic amines. *Journal of Chromatography A*, 1248:41:47
- 67 Farajzadeh, M. A.; Nouri, N. (2013). Simultaneous derivatization and air assisted liquid-liquid microextraction of some aliphatic amines in different aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*, 775:50-57
- 68 Farajzadeh, M. A.; Nouri, N. (2012). Simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction of anilines in different samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Talanta*, 99:1004-1010
- 69 Del Nogal, S. M.; Pérez, P. J.; Martín, S. P.; Pérez, S. C.; Moreno, C. B. (2014). Microextraction by packed sorbent and salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the determination of aromatic amines formed from azo dyes in textiles. *Talanta*, 119:375-384
- 70 Saad, B.; Makahleh, A.; Abu-Bakar, N. (2014). Vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruits juices. *Talanta*, 120:47-54

- 71 Zhang, J.; Wu, H.; Norem, K.; El-Shourbagy, T. A. (2008). Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48:1243–1248
- 72 Xie, M.; Liu, J.; Jiang, M.; Li, G.; Xu, L. (2010). Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction of sulfonamides from different matrices. *Analytica Chimica Acta*, 679:74–80
- 73 Yang, Y.; Xia, Q.; Liu, M. (2012). Aluminium sensitized spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in milk samples coupled with salting-out assisted liquid–liquid ultrasonic extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 96:358–364
- 74 Song, S.; Njumbe, E. E.; Wu, A.; De Saeger, S. (2013). Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292:111–120
- 75 Chen, L.; Wen, Y.; Li, J.; Yang, F.; Zhang, W.; Li, W.; Liao, C. (2013). Salting-out assisted liquid–liquid extraction with the aid of experimental design for determination of benzimidazole fungicides in high salinity samples by high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 106:119-126
- 76 Meloon, C. E. (1999). *Chemical Separations. Principles, Techniques and experiments*. John Wiley & Sons. EUA.
- 77 Darshana, J.; Rajani, A.; Amrita, B.; Shruti, S. (2014). Double salting out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) HPLC method for estimation of temozolomide from biological samples. *Journal of Chromatography B*. Vol. 970:86-94.
- 78 Zhang, J.; Wu, H.; Norem, K.; El-Shourbagy, T. (2008). Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48:1243-1248
- 79 IUPAC recommendations. Glossary of terms used in physical organic chemistry. (1994). (<http://goldbook.iupac.org/H02907.html>) (Consulta 28 julio 2014)
- 80 Dean, J. R. (2009). *EXTRACTION TECHNIQUES IN ANALYTICAL SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd. Reino Unido.
- 81 Rice, N.M.; Irving, H. M.; Leonard, M.A. (1993). Nomenclature for liquid-liquid distribution (Solvent extraction). *Pure and Applied Chemistry*, 65(11):2373-2396
- 82 Valente, I. M.; Goncalves, L. M.; Rodrigues, J. A. (2013). *Journal of chromatography A*, 1308:58-62
- 83 Zhang, Z.; Yang, M. J.; Pawliszyn, J. (1994). Solid-phase microextraction (Report). *Analytical Chemistry*, 66:844-853
- 84 Pawliszyn, J.; Lord, H. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885:153-193
- 85 Lord, H.; Pawliszyn, J. (2000). Microextraction of drugs. *Journal of chromatography A*, 902:17-63
- 86 Pawliszyn, J.; Pan, L. (1997). Derivatization/solid phase microextraction: new approach to polar analytes. *Analytical Chemistry*, 69:196-205
- 87 Pavón, P. J.; Casas, F. A.; Fernández, L. M.; Cordero, M. B. (2013). In situ aqueous derivatization as simple preparation technique for gas chromatographic determinations. *Journal of chromatography A*, 1296:70-83
- 88 Shmidt, T. C.; Zimmemann, T.; Ensinger, W. J. (2004). In situ derivatization/solid-phase microextraction: determination of polar aromatic amines. *Analytical Chemistry*, 76:1028-1038
- 89 Verma, K. K.; Jain, A.; Reddy-Noone, K.; Pillai, A. K. (2013). Conversion to isothiocyanates via dithiocarbamates for the determination of aromatic primary amines by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 801:48-58
- 90 Tagarelli, A.; Sindona, G.; Gionfriddo, E.; Naccarato, A. (2014). *Analytica Chimica Acta*, 810:17-24
- 91 Quintana, J. B.; Rodil, R.; Racamonde, I.; Cela, R. (2013). In-sample derivatization-solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine. *Analytica Chimica Acta*, 770:75-84
- 92 Lee, M.; Chou, C. (2005). Solid phase microextraction with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for analysis of amphetamine and methamphetamine in serum. *Analytica Chimica Acta*, 538:49-56
- 93 Pawliszyn, J.; Lord, H. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885:153-193

- 94 Risticvic, S.; Lord, H.; Górecki, T.; Arthur, C.; Pawliszyn, J. (2010). Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols*, 5(1):122-139
- 95 Pawliszyn, J. (1999). *Applications of solid phase microextraction*. RSC chromatography monographs. Primera edición. Reino Unido.
- 96 http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html (consultada 20-noviembre-2015)
- 97 Makahleh, A.; Abu-Bakar, N; Saad, B. (2014). Vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. *Talanta*, 120:47-54.