

DIVISIÓN DE ESTUPEFACIENTES
Viena

**MÉTODOS
RECOMENDADOS
PARA EL ENSAYO DE
ANFETAMINA
Y METANFETAMINA**

**MANUAL PARA USO
DE LABORATORIOS NACIONALES
DE ESTUPEFACIENTES**



NACIONES UNIDAS
Nueva York, 1988

ST/NAR/9

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
I. DESCRIPCION DE LOS COMPUESTOS PUROS	4
II. PRODUCCION Y CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA ANFETAMINA/METANFETAMINA ILICITAS	6
III. ASPECTO FISICO DE LA ANFETAMINA/METANFETAMINA/ILICITAS .	9
IV. ANALISIS DE MATERIALES QUE CONTIENEN ANFETAMINA/METANFETAMINA	10
A. Muestreo	10
1. Polvos	10
a) Toma de muestras de material contenido en un solo embalaje	10
b) Toma de muestras de material contenido en más de un embalaje	11
c) Muestreo de sustancias que contengan agregados gomosos o de gran tamaño	12
2. Tabletas y cápsulas - Preparados comerciales o lícitos	12
a) Envase único	12
b) Envases múltiples	12
3. Tabletas y cápsulas - Origen ilícito	13
a) Envase único	13
b) Envases múltiples	14
4. Soluciones acuosas - Origen ilícito	14
a) Envase único	14
b) Envases múltiples	14
5. Residuos presentes en jeringas u objetos de vidrio de laboratorios clandestinos	14

	<u>Página</u>
B. Ensayos presuntivos	15
1. Ensayos de coloración	15
a) Reactivo de Marquis	15
b) Reactivo de ninhidrina	15
c) Reactivo de Simon	15
C. Cromatografía de capa delgada (CCD)	17
D. Cromatografía gas-líquido	19
1. Técnica de columna de relleno	19
a) Sistema A - sin derivación	19
b) Sistema B - con derivación	20
2. Técnica de columna capilar	21
E. Cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR) ..	22
1. Técnica isocrática	22
a) Fase normal	22
b) Fase inversa	22
F. Espectroscopia infrarroja	24
G. Análisis de isómeros ópticos	29
1. Ensayo microcristalino para distinguir las anfetaminas l-, d-, y dl-	29
2. Ensayo microcristalino para distinguir las metanfetaminas d- y dl-	30
3. Método de espectroscopia infrarroja para distinguir isómeros ópticos de anfetamina	31
4. Otros métodos para distinguir los isómeros ópticos de anfetamina/metanfetamina	33
H. Análisis de impurezas de anfetamina/metanfetamina..	34
1. Extracción/preparación de muestras	34
2. Cromatografía de capa delgada	34
3. Cromatografía gas-líquido	35
4. Cromatografía líquida de gran rendimiento	35

INTRODUCCION

Antecedentes

En los últimos años se ha registrado un considerable aumento del número de sustancias inscritas en las listas de las convenciones y sujetas, desde hace poco, a fiscalización internacional. Este aumento refleja una rápida diversificación de las drogas objeto de uso indebido y, en consecuencia, una intensificación de las medidas reguladoras que hacen que, por una parte, las sustancias sometidas a fiscalización sean más numerosas y, por otra, que las disposiciones legislativas y penales de los distintos países sean mejores pero también más rigurosas. Al mismo tiempo, en ciertas regiones se ha registrado un aumento alarmante y sin precedentes del volumen de drogas aprehendidas ya sujetas a fiscalización, como los opiáceos, la cocaína y la pasta de coca, los productos de cannabis, las anfetaminas y compuestos afines. Esta nueva situación, caracterizada por un incremento de la frecuencia y del volumen de las incautaciones, plantea un problema difícil no sólo a los servicios nacionales de represión, sino también al personal técnico y científico de los laboratorios forenses.

En el mercado ilegal hacen su aparición de forma inopinada nuevas drogas o combinaciones de drogas, fruto de la ingeniosidad de los productores y traficantes ilícitos, lo que obliga a los químicos forenses a actuar rápida y eficazmente y con no menos ingeniosidad. Análogamente, la multiplicación de las sustancias fiscalizadas y de las disposiciones legislativas correspondientes supone un aumento de trabajo para los laboratorios forenses y de estupefacientes nacionales, así como para su personal. Los analistas han de ser capaces de manipular un mayor número de sustancias y de preparados, así como de utilizar métodos de identificación y de análisis más rápidos, más exactos y más específicos. Además, el carácter internacional del tráfico de drogas exige un rápido intercambio de datos analíticos, tanto a nivel nacional como internacional, entre los laboratorios y los servicios de represión. El desarrollo de métodos de ensayo internacionalmente aceptables contribuiría en gran manera al logro de esos objetivos, y es esta una cuestión que se viene estudiando desde hace algún tiempo.

En su octavo período extraordinario de sesiones, celebrado en febrero de 1984, la Comisión de Estupefacientes pidió al Secretario General que "estudie la posibilidad de llegar a un acuerdo en los planos regional e interregional sobre métodos recomendados de análisis de drogas decomisadas del tráfico ilícito". A juicio de la Comisión, un examen más a fondo y una armonización de los numerosos métodos analíticos utilizados en distintos países no sólo facilitaría la labor del personal de instituciones nacionales, sino asimismo el intercambio de información a los niveles regional e interregional.

Finalidad del manual

En respuesta a la petición de la Comisión, la División de Estupefacientes reunió en Kuala Lumpur, en septiembre de 1986, y por invitación del Gobierno de Malasia, a un grupo de 11 expertos y 2 consultores. El presente manual, publicado por la División de Estupefacientes de las Naciones Unidas, expone las conclusiones del grupo de expertos y tiene por finalidad proporcionar asistencia práctica a las autoridades nacionales mediante la descripción de métodos recomendados que los laboratorios forenses deberían utilizar para el análisis y la identificación de productos de anfetamina y metanfetamina. El manual también podrá servir de guía a las autoridades nacionales para evaluar los métodos actualmente aplicados en los laboratorios estatales y en los de las universidades.

Este manual es el cuarto de una serie de publicaciones análogas que tratan de la identificación y del análisis de diversos grupos de drogas sujetas a fiscalización internacional. Le han precedido tres manuales que trataban, respectivamente, del análisis de la heroína (ST/NAR/6), de la cocaína (ST/NAR/7) y del cannabis (ST/NAR/8).

Estos manuales sugieren métodos que pueden facilitar al analista forense la elección de una técnica apropiada para la muestra objeto de examen. El analista podrá entonces optar por alguno de los métodos descritos en el manual, pues, cualquiera que sea el elegido, proporcionará información analítica fiable con respecto a las muestras a que se aplique. Cada método viene siendo utilizado desde hace varios años en reputados laboratorios forenses y se ha dado a conocer en publicaciones científicas. Al seleccionar estos métodos, el grupo de expertos no ignoraba que muchos otros métodos, a la vez útiles y aceptables, podían facilitar al analista forense un análisis y una información válidos, y que en la literatura científica forense podían hallarse otros métodos también satisfactorios.

Empleo del manual

Pocos métodos son perfectos, y menos aún en el caso del análisis forense de drogas, en que las sustancias examinadas pueden variar considerablemente en cuanto a su forma física y composición química. El analista que trabaja en su propio país es la persona más indicada para decidir respecto de la metodología y del enfoque a adoptar. Es él quien ha visto la sustancia sospechosa y quien mejor puede juzgar la manera correcta de abordar el problema. Además, la elección de los métodos difiere necesariamente según los materiales de referencia y los instrumentos existentes.

No es necesario aplicar todos los métodos descritos a todas las muestras sospechosas de contener anfetamina o metanfetamina. Las necesidades podrán variar, pues hay que tener en cuenta, entre otras cosas, la variabilidad de las muestras recogidas en tal o cual lugar, las instalaciones disponibles y las pruebas normalmente admitidas por el sistema judicial en que realice su labor el analista. El empleo de métodos más complejos únicamente será necesario para ciertas necesidades forenses, como, por ejemplo, para comparar muestras o para determinar el origen de las sustancias.

Para identificar una droga sujeta a fiscalización, será preciso disponer al menos de dos parámetros analíticamente independientes. Cada vez, estos parámetros deberán elegirse en función de la droga considerada y de los medios de laboratorio a disposición del analista. Por ejemplo, dos sistemas distintos de CCD (cromatografía de capa delgada) contarían como dos parámetros. En este contexto, sistemas de CCD distintos significa que los sistemas de disolventes o el revestimiento de las placas son por completo diferentes. A ser posible, deberán utilizarse tres técnicas analíticas diferentes; por ejemplo: el ensayo de coloración, la cromatografía de capa delgada (CCD), de gas-líquido (CGL) o la cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR), y la espectroscopia infrarroja (IR) o ultravioleta (UV). En la práctica, la elección de los parámetros se deja a la discreción del químico.

También se destaca la capital importancia de los libros de texto sobre drogas objeto de uso indebido y técnicas analíticas. Además, el analista deberá seguir en todo momento la evolución de las tendencias y estar al corriente de cuanto se publique sobre técnicas analíticas y cuestiones

forenses. A tal fin, conviene tener en cuenta el Diccionario multilingüe de los estupefacientes y de las sustancias sicotrópicas sometidos a fiscalización internacional (ST/NAR/1), que es un instrumento de esencial importancia para los laboratorios forenses, así como el Manual sobre preparación del personal y equipo básico para los laboratorios de estupefacientes (ST/NAR/2), publicados ambos por la División de Estupefacientes. Esta última publicación contiene una lista de obras de consulta y una selección de revistas especializadas bien conocidas. Para una descripción general de las técnicas analíticas a que se refiere el presente manual, los analistas deberán consultar las citadas publicaciones y los manuales de esta serie anteriormente publicados.

Una estrecha relación con los servicios nacionales de represión y con las autoridades judiciales, así como entre los laboratorios nacionales y regionales de estupefacientes, permitirá un mayor conocimiento de las últimas tendencias en cuanto a la presentación de drogas, el tráfico ilícito, las técnicas de contrabando y la preparación de pruebas a presentar ante los tribunales. Será con ello posible una elección más acertada de las técnicas analíticas que hayan de aplicarse a las últimas sustancias presentadas.

Es igualmente importante la rápida difusión de las últimas informaciones sobre los cambios introducidos en las drogas disponibles en el mercado ilícito. A menudo, puede que convenga hacerlo antes de que dicha información aparezca en publicaciones periódicas especializadas en los análisis forenses y en otros análisis químicos, pues cuando tales publicaciones llegan a los medios forenses ya han transcurrido dos o tres años desde que esos cambios fueran observados. Nunca se insistirá demasiado en el interés que reviste la difusión frecuente de informes nacionales sobre el estado actual de la evolución de las drogas, así como sobre los trabajos en curso y los resultados de análisis efectuados en los diversos laboratorios.

La División de Estupefacientes está a disposición de los lectores para cualesquiera observaciones que deseen hacer sobre el contenido y la utilidad del presente manual. Los comentarios y sugerencias deberán enviarse a:

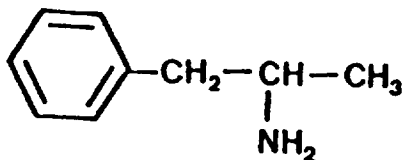
División de Estupefacientes
Oficina de las Naciones Unidas en Viena
Centro Internacional de Viena
P.O. Box 500
A-1400 Viena (Austria)

I. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPUESTOS PUROS

<u>ANFETAMINA</u>	<u>Punto de ebullición (°C)</u>	
2-amino-1-fenilpropano	d	203 - 204
-metilbencenoetanamina	l	----
-metilfenetilamina	dl	200 - 203

Sustancias incluidas en las listas de "Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas, 1971"

ANFETAMINA = (dl), (+) mezcla racémica
 DEXANFETAMINA = (d-), (+), (S) isómero
 LEVANFETAMINA = (l-), (-), (R) isómero



$C_9H_{13}N$
 Peso molec. = 135,2

<u>FOSFATO DE ANFETAMINA</u>	<u>Punto de fusión (°C)</u>	
$C_9H_{13}N \cdot H_3PO_4$	d	300 (descomp.)
Peso molec. = 233,2	l	----
	dl	300 (descomp.)

<u>SULFATO DE ANFETAMINA</u>	<u>Punto de fusión (°C)</u>	
$(C_9H_{13}N)_2 \cdot H_2SO_4$	d	300 (descomp.)
Peso molec. = 368,5	l	----
	dl	280 - 281

SOLUBILIDAD

	<u>Base</u>	<u>Fosfato</u>	<u>Sulfato</u>
Agua	ligeramente soluble	soluble	soluble
Etanol	soluble	ligeramente soluble	ligeramente soluble
Eter dietílico	soluble	insoluble	casi insoluble
Cloroformo	soluble	insoluble	insoluble

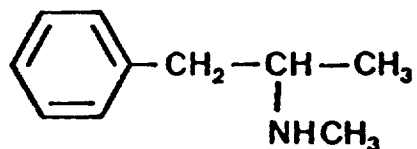
METANFETAMINA

Punto de ebullición (°C)

2-metilamino-1-fenilpropano	d	208 - 210
N, -dimetilbencenoetanamina	l	210
N, -dimetilfenetilamina	dl	209 - 210
N, -metilamfetamina		
Metilamfetamina		
Fenilisopropilmetilamina		

Sustancias incluidas en las listas del "Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas, 1971"

METANFETAMINA = (d-), (+), (S) isómero
 LEVOMETANFETAMINA = (l-), (-), (R) isómero



C₁₀H₁₅N
 Peso molec. = 149,2

CLORHIDRATO DE METANFETAMINA

Punto de fusión (°C)

C ₁₀ H ₁₅ N.HCl	d	170 - 175
Peso molec. = 185,7	l	170 - 171
	dl	131 - 135

SOLUBILIDAD

	<u>Base</u>	<u>Clorhidrato</u>
Agua	ligeramente soluble	soluble
Etanol	soluble	soluble
Eter dietílico	soluble	insoluble
Cloroformo	soluble	soluble

II. PRODUCCION Y CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA ANFETAMINA/METANFETAMINA ILCITAS

Aunque se vienen desviando en cantidad considerable de la fabricación lícita, la mayoría de los productos de anfetamina y de metanfetamina existentes en el mercado ilícito son producidos por laboratorios clandestinos. Las bases libres de anfetamina y metanfetamina son líquidos no muy estables. Por ello, en la actualidad es más frecuente encontrarlos en forma de polvos, como sulfato o fosfato de anfetamina, o bien como clorhidrato de metanfetamina. En algunos países se dispone de soluciones acuosas de clorhidrato de metanfetamina, comúnmente denominadas en inglés "gold fish" (pez de colores), estando también muy extendido el uso de tabletas de fabricación ilícita. En Europa, la anfetamina de fabricación ilícita sigue siendo fácil de obtener, mientras en Norteamérica y el Japón la metanfetamina goza de una mayor aceptación.

La falta de control de calidad y la variabilidad de la actividad son características de las muestras de anfetamina y metanfetamina ilícitas. Es frecuente que contengan subproductos e intermedios resultantes del empleo de materias primas impuras, de reacciones incompletas y de una insuficiente purificación de los intermedios y del producto sintético final. Tales subproductos intermedios pueden proporcionar valiosa información sobre el método de fabricación ilícito. Conocer las impurezas es importante por muchas razones, pues hace posible su evaluación, permite dar a la publicidad su peligro potencial y proporcionar tratamiento en caso necesario. La presencia o ausencia de impurezas específicas resulta útil para determinar el método sintético empleado y para averiguar si las muestras son de un origen común y/o de fabricación lícita o ilícita. Es importante que el analista forense sepa si el material contiene determinadas impurezas, habida cuenta de la posible interferencia de éstas en las técnicas analíticas empleadas para el análisis de la muestra de anfetamina/metanfetamina.

Los tipos y cantidades de impurezas presentes dependen del método de síntesis, de las proporciones y de la fuente de materias primas, del tiempo de reacción y de la temperatura, de las condiciones de hidrólisis de los intermedios y de los procedimientos de purificación, en su caso, empleados. La mayoría de las impurezas son de naturaleza débilmente básica o neutra, y suelen estar presentes en el producto acabado a un nivel inferior al 2 ó 3%.

Muchos son los métodos existentes para la síntesis ilícita de la anfetamina/metanfetamina. La reacción de "Leuckart" viene siendo la más utilizada, pues la síntesis es sencilla, rápida, de buen rendimiento y no entraña un procedimiento especialmente peligroso. Puede considerarse como una reacción en tres etapas: formilación, hidrólisis y purificación. En el caso de la anfetamina, la condensación de fenil-2 propanona (P-2-P, bencilmetilcetona, BMK) con formamida, a veces en presencia de ácido fórmico, o mediante el empleo de formiato amónico, da lugar a varios productos de reacción secundaria. En la fase de hidrólisis se emplea ácido sulfúrico para hidrolizar el intermedio de N-formil-anfetamina. La fase de purificación final comprende la destilación en corriente de vapor de agua o la extracción de anfetamina base con éter y precipitación como sulfato, seguido de lavado con uno o más disolventes orgánicos y/o recristalización del sulfato de anfetamina.

La metanfetamina puede prepararse en forma similar empleando metilamina y ácido fórmico o N-metilformamida en la fase de condensación. La reacción de Leuckart ha sido ampliamente estudiada y la N-formil-anfetamina o la N-formilmetanfetamina y la 4-metil-5-fenilpirimidina han sido identificadas

como las principales impurezas específicas de ese método. Esas impurezas suelen estar presentes a niveles inferiores al 1%. Ultimamente, se viene utilizando ácido fórmico en la reacción, lo que da lugar a la formación de N, N-di(β -fenilisopropil)amina (DPIA) y N-formil DPIA como principales impurezas en la anfetamina y N, N-di(β -fenilisopropil)metilamina (DPIMA) y N-formil-DPIMA en la metanfetamina sintetizada por el método de Leuckart. Estas impurezas se han detectado a niveles de hasta el 3%. Se han determinado muchas otras impurezas, entre ellas piridinas de elevado punto de ebullición. El P-2-P puede obtenerse en el comercio, pero su suministro es objeto de fiscalización en algunos países. Una síntesis clandestina, de ácido fenilacético y de anhídrido acético, da dibencilcetona como subproducto. Las impurezas tales como la dibencilcetona introducen otras impurezas en el producto final. Así, en anfetamina y metanfetamina sintetizadas de P-2-P impuro, se han detectado alfa-benciltilamina y alfa-bencil-N-metilfenetilamina. Ambos subproductos tienen valores LD₅₀ (dosis letal, 50%) menores que la anfetamina, lo que da idea del posible peligro de las drogas impuras que se obtienen en la calle.

Otros métodos para la síntesis de anfetamina y de metanfetamina no dan, desde luego, tantas impurezas.

El método de aminación reductiva, en que el P-2-P y una suspensión de níquel Raney se hace reaccionar con una mezcla de amoníaco gaseoso e hidrógeno, se viene utilizando en algunos países para la preparación de anfetamina. Hasta la fecha, sólo se han comunicado aminaciones a baja presión y a baja temperatura. Otros agente reductores que se sabe han sido utilizados son: platino, polvo de aluminio con HgCl₂, y zinc níquelado. La metanfetamina también puede prepararse por este procedimiento mediante el empleo de metilamina. Las principales impurezas son las bases de Schiff, una de ellas formada, según parece, por la condensación de P-2-P y anfetamina. Así, pues, no son impurezas específicas del método utilizado, sino que podrían producirse en cualquier procedimiento sintético en el que se utilice P-2-P. Las impurezas inorgánicas debidas al empleo de determinados catalizadores pueden servir como marcadores.

Otros dos métodos comunes son el de la "oxima", en el que se hace reaccionar hidroxilamina con P-2-P, dando la oxima que es posteriormente hidrogenada, y el método del "nitroestireno", en el que la condensación de P-2-P con nitroetano da el intermedio nitroestireno. La hidrogenación del doble enlace y la reducción del grupo nitro del intermedio da anfetamina. Ambos métodos dan bencilmetil cetoxima como principal impureza. Su presencia en el caso de la oxima se debe a una reacción incompleta, mientras que en el método del nitroestireno es resultado de una reducción parcial. Las reducciones se han efectuado utilizando reactivos de transferencia de electrones, tales como amalgama de sodio y sodio/etanol, y reactivos de transferencia de hidruro como Li AlH₄ y NaBH₃CN. Se han detectado azinidinas en la síntesis de anfetamina con reactivos de transferencia de hidruro, y pueden ser de alguna utilidad para relacionar muestras de un origen común. El método de la oxima y la posterior reducción electroquímica es un procedimiento ilícito actualmente muy utilizado en algunos países.

Todos los métodos clandestinos anteriormente mencionados emplean la formación de enlace C-N y producen en forma no estereoespecífica una mezcla racémica de dl-anfetamina o dl-metanfetamina. A causa de la fiscalización de que es objeto el movimiento lícito de P-2-P, la efedrina y la pseudoefedrina se han convertido en materias primas muy utilizadas para la síntesis ilícita de

metanfetamina. Su reducción con yoduro de hidrógeno y fósforo rojo, o mediante hidrógeno y Pd/BaSO₄, directamente o utilizando el intermedio clorefedrina (o clor-seudoefedrina) formado con cloruro de tionilo da un buen rendimiento de metanfetamina. En las reacciones efectuadas por esos procedimientos se han detectado impurezas tales como P-2-P, yodo, clorefedrina, efedrina e inorgánicos tales como Pd y Ba. Si se utiliza en la reacción (1R, 2S)-efedrina ópticamente activa (conocida también como l- o (-) efedrina), fácilmente obtenible en algunos países, se obtiene d-metanfetamina. Esto se debe a que la estereoquímica del carbono C-2 no se ve afectada durante la secuencia de reacción de la deshidrohalogenación y conserva en la metanfetamina la actividad óptica de este carbono. La confirmación de la actividad óptica en el producto acabado, junto con la presencia de l-efedrina como impureza, es una prueba convincente de este procedimiento de reacción. En forma análoga, puede formarse anfetamina a partir de fenilpropalonamina.

La pureza de la droga no "cortada" puede variar del 90 al 99%. A efectos de tráfico, suele "cortarse" o reducirse hasta el 40% o menos con un carbohidrato (glucosa, lactosa, sucrosa, manitol), sulfato magnésico, glutamato sódico, cafeína, efedrina, procaína, antipirina o fenazona. En algunos países se dispone de soluciones acuosas de clorhidrato de metanfetamina denominadas "gold fish".

III. ASPECTO FISICO DE LA ANFETAMINA/METANFETAMINA

Los productos de anfetamina procedentes de la fabricación lícita contienen la droga en forma de sal de sulfato o fosfato, y se comercializan en diferentes países en forma de tabletas, cápsulas de spansule, jarabes y elixires.

La metanfetamina, como sal de clorhidrato, está disponible en forma de tableta y como solución estéril para su inyección. Los analistas deberán consultar los diversos compendios farmacéuticos para una descripción ilustrada e información sobre productos específicos legalmente disponibles en sus respectivos países.

El sulfato de anfetamina ilícito varía de color, pudiendo presentarse como polvo blanco, similar a la sustancia procedente de la fabricación lícita, o rosa, amarillo o pardo, según el tipo y la cantidad de impurezas y adulterantes. A menudo se presenta húmedo y con un olor desagradable característico, a causa de la presencia de residuos de disolvente.

El clorhidrato de metanfetamina ilícito suele encontrarse en forma aterronada o gomosa. Puede ser de color blanco, pardo o violeta, lo que dependerá, también en este caso, de la presencia de ciertas impurezas.

IV. ANALISIS DE MATERIALES QUE CONTIENEN ANFETAMINA/METANFETAMINA

A. Muestreo

La principal finalidad de los procedimientos de muestreo es posibilitar un análisis químico correcto y útil. Debido a que la mayoría de los métodos -cualitativos y cuantitativos- utilizados en los laboratorios forenses para el examen de drogas requieren partes alícuotas de material muy pequeñas, es esencial que esas pequeñas partes alícuotas sean enteramente representativas del todo a que correspondan. El muestreo deberá realizarse con arreglo a los principios de la química analítica establecidos, por ejemplo, en las farmacopeas nacionales o por organizaciones tales como la Asociación de Químicos Analistas Oficiales.

Puede haber casos en que, por razones jurídicas, no puedan seguirse las reglas normales de muestreo y homogeneización si, por ejemplo, el analista desea conservar parte de una muestra como prueba visual. Ahora bien, puede que sea necesario efectuar ensayos independientes de dos artículos en polvo, en lugar de combinar los polvos antes de proceder a un solo ensayo de la mezcla, debido a que cada una de las muestras haya sido separadamente presentada por el oficial que haya aprehendido el material, y a que el sistema jurídico en cuyo marco el analista realice su labor exija resultados individuales de toda muestra que haya de presentarse ante los tribunales.

A fin de economizar recursos y tiempo valiosos, los analistas forenses deberán, siempre que sea posible, utilizar un sistema de muestreo aprobado y reducir así el número de determinaciones cuantitativas necesarias. Para facilitar dicho método, el analista forense tal vez necesite discutir cada caso en particular tanto con los oficiales que hayan aprehendido la droga como con el personal jurídico con quien trabaje.

Pueden encontrarse muestras de anfetamina en forma de tabletas y cápsulas, tanto desviadas del mercado lícito como fabricadas ilícitamente, así como en forma de polvos finos o gomosos. La metanfetamina suele presentarse en forma de polvo o sustancia gomosa, pero en algunos países están disponibles en forma de tabletas y cápsulas procedentes de fuentes lícitas e ilícitas. La anfetamina base y la metanfetamina base son líquidos, y éstos, así como soluciones de las formas salinas, se encuentran con frecuencia en el mercado ilícito.

1. Polvos

a) Toma de muestras de material contenido en un solo embalaje

El caso más sencillo de muestreo es aquel en que la sustancia a analizar se encuentra en un solo embalaje; en el caso de la anfetamina o de la metanfetamina, lo más frecuente es que se presenten en forma de polvo. La sustancia deberá retirarse de su envase o envoltorio y colocarse en una bolsa limpia de plástico transparente, tras lo cual se procederá a pesarla para obtener su peso neto. La sustancia deberá homogeneizarse perfectamente antes de someterla a una serie de ensayos químicos, aunque en esta fase pueden efectuarse ya ensayos de identificación presuntiva si se cree que el muestreo o la homogeneización llevará tiempo y si aún existen dudas en cuanto a la identidad de la sustancia. La forma más sencilla de homogeneizar una materia en polvo es agitarla bien dentro de la bolsa de plástico transparente en que se haya colocado. Si el polvo contiene agregados, éstos deberán disgregarse

haciéndolos pasar por tamices cada vez más finos o machacándolos en un mortero con un pistilo, o bien mediante el empleo de una mezcladora o elaboradora de alimentos, de las que se encuentran en el comercio, debidamente adaptada al efecto.

También puede aplicarse la técnica de cuarteo por amontonamiento, para lo cual se mezcla el producto de muestra agitándolo o removiéndolo. Si es necesario, los fragmentos grandes se reducen y el material se vierte a continuación sobre una superficie plana hasta formar un cono. El "cono" se aplasta y el material se divide en ángulos rectos, formando cuatro partes. Las cuartas partes opuestas se toman como muestra, y el resto de la sustancia se devuelve al recipiente de donde se haya sacado. Si se desea efectuar otro cuarteo por amontonamiento para reducir el tamaño de la muestra, se procede a una mayor reducción del tamaño de las partículas, se mezcla perfectamente la sustancia, se vierte sobre una superficie plana y se vuelve a dividir como antes.

b) Toma de muestras de material contenido en más de un embalaje

El analista deberá proceder a un examen visual del contenido de todos los embalajes y, a ser posible, analizarlo mediante un simple ensayo de coloración o mediante cromatografía de capa delgada, a fin de determinar lo siguiente:

1. Si todos los embalajes contienen material sospechoso de ser anfetamina o metanfetamina, y/o
2. Si uno o más embalajes contienen una sustancia diferente de la de la mayoría de los embalajes. El indicador más sencillo es el aspecto físico del polvo. Si uno o más embalajes tienen claramente contenidos distintos, deberán apartarse y someterse a un análisis independiente.

Para la preparación de una muestra compuesta de sustancias obtenida de varios embalajes, se procederá de la siguiente manera:

- a) Si hay menos de 10 embalajes, todos ellos deberán someterse a muestreo.
- b) Si el número de embalajes es de 10 a 100, 10 de ellos serán inspeccionados al azar.
- c) Si el número de embalajes es superior a 100, se seleccionará al azar un número de embalajes igual a la raíz cuadrada del número total de embalajes, redondeando al entero inmediato superior.

Si se comprueba que los polvos son iguales, podrá combinarse entonces el contenido de varios embalajes; la masa obtenida podrá homogeneizarse a continuación en, por ejemplo, una elaboradora de alimentos de las que se encuentran en el comercio, debidamente adaptada al efecto. Otra posible solución es el procedimiento de cuarteo por amontonamiento.

Cuando se hayan identificado diferentes tipos de sustancias en los diversos embalajes, por cada uno de los subgrupos se preparará, en forma idéntica a la anteriormente indicada, una muestra compuesta.

En el caso de los métodos cuantitativos, los errores de muestreo son menores si grandes cantidades alícuotas de sustancia se someten a dilución

secuencial con el disolvente. Este método podrá aplicarse si el tamaño de la muestra total es considerable. Sin embargo, cuando se utilicen grandes cantidades de sustancia para la primera disolución, puede que sea necesario agregar los disolventes mediante una pipeta para evitar errores debidos a materias insolubles. En todos los países, en las muestras de drogas vendidas en la calle es frecuente encontrar adulterantes insolubles.

c) Muestreo de sustancias que contengan agregados gomosos o de gran tamaño

Si las partículas son fáciles de reducir a polvo, convendrá triturarlas y aplicar seguidamente el método de muestreo ya indicado. La reducción a polvo puede efectuarse machacando el material en un mortero con un pistilo, mediante una mezcladora/elaboradora de alimentos de las que se encuentran en el comercio, o bien mediante una trituradora industrial. Si la sustancia no es fácil de disgregar, se tomarán entonces al azar partículas de diversos tamaños de por lo menos tres partes diferentes de la cantidad de sustancia a estudiar. Conviene tomar al menos un gramo de sustancia, hacer una pesada precisa y someterlo a análisis.

2. Tabletas y cápsulas - Preparados comerciales o lícitos

La determinación preliminar del origen comercial es puramente subjetiva. Ejemplos claros de productos de origen comercial serán las unidades de dosaje que se asemejen a las descripciones hechas en forma de representación gráfica en los compendios nacionales de preparados farmacéuticos. Los preparados comerciales suelen ser objeto de control de calidad por parte del fabricante. Por ello, poca será la información útil que se obtenga mediante la selección de un gran número de unidades de cada embalaje. La cantidad de ingrediente por una determinada tableta o cápsula será estadísticamente válida para todo el lote.

a) Envase único

1. 1-50 unidades de dosaje -- seleccionar al azar $1/2$ del número total de unidades hasta un máximo de 20. Determinar el peso medio, hacer pasar el polvo por un tamiz de la malla 20 y mezclarlo muy bien.
2. 51-100 unidades de dosaje -- seleccionar al azar 20 unidades y proceder en la forma anteriormente indicada.
3. 101-1.000 unidades de dosaje -- seleccionar al azar 30 unidades y proceder como se ha indicado.
4. Más de 1.000 unidades de dosaje -- seleccionar al azar un número de unidades igual a la raíz cuadrada del número total presente y redondear al entero inmediato superior; proceder a continuación en la forma antes indicada.

b) Envases múltiples

Agrupar los envases por números de lote y tratar cada grupo en la forma descrita en el punto 1.b) supra. Informar por separado sobre los resultados obtenidos para cada grupo.

Determinar la raíz cuadrada del número total de embalajes de cada grupo. Seleccionar al azar un número de embalajes equivalente a la raíz cuadrada, redondeando al entero inmediato superior.

De cada uno de los embalajes seleccionados, seleccionar al azar un número de unidades de dosage equivalente a la raíz cuadrada del número total de unidades de dosage, dividido por la raíz cuadrada del número de embalajes y redondeando al entero inmediato superior.

Formar un compuesto mediante trituración del material, haciéndolo pasar después por un tamiz de la malla 20 y mezclándolo íntimamente. Efectuar el análisis del compuesto.

3. Tabletas y cápsulas - Origen ilícito

En el caso de los preparados ilícitos, el control de calidad puede considerarse inexistente. Cabe sospechar importantes variaciones cuando la sustancia se presenta en forma de tabletas, aunque, en la mayoría de los casos, parte del constituyente activo estará presente en cada tableta. Es por tanto necesario examinar envases o unidades individuales.

a) Envase único

Determinar el número total de unidades de dosage y el peso medio por unidad de dosage (ud).

Para tamaños de muestras de hasta 10 ud -- Examinar todas las unidades de dosage.

Para tamaños de muestras de 11 ud a 27 ud -- Seleccionar al azar y examinar 3/4 de todas las unidades de dosage, redondeando al entero inmediato superior.

Para tamaños de muestras de 28 ud -- Seleccionar al azar y examinar 1/2 de todas las unidades de dosage redondeando al entero inmediato superior y seleccionando un mínimo de 21 ud y un máximo de 50 ud.

A base de los resultados de los exámenes, procédase de la siguiente manera:

1. Si todas las unidades de dosage resultan idénticas, fórmese un compuesto de las unidades de dosage examinadas en la forma indicada para los preparados lícitos, y analícese.
2. Si la muestra contiene dos formas de dosage, subdivídase la muestra. En caso necesario, examínense unidades de dosage adicionales hasta que ambas submuestras contengan sustancia para el análisis, fórmese después dos compuestos y analícese.
3. Si se hallan presentes más de dos formas de dosage, la estrategia a seguir consistirá en hacer un compuesto de la forma de dosage más abundante y examinar después unidades adicionales hasta obtener una muestra del mismo tamaño que contenga únicamente las formas de dosage menos abundantes. Este procedimiento se repetirá hasta que se obtenga un compuesto por cada forma de dosage o hasta agotar la muestra.

El porcentaje de unidades de dosage que contiene una determinada sustancia u otro constituyente activo objeto de fiscalización puede calcularse utilizando el porcentaje de unidades, del número total de unidades seleccionadas al azar y examinadas, que se haya comprobado contiene esa sustancia.

b) Envases múltiples

Seleccionar al azar varias unidades de dosaje de cada número de envases seleccionados al azar, en la forma antes indicada para los preparados ilícitos. A continuación, examinar cada unidad.

A base de los resultados del ensayo de detección, procédase de la siguiente manera:

1. Si todas las unidades examinadas tienen el mismo aspecto, combinar unidades examinadas de todos los envases y formar un compuesto.
2. Si todas las unidades examinadas no tienen el mismo aspecto, cada envase deberá tratarse como una muestra o entidad independiente. Así, pues, para cada envase deberá procederse con arreglo a las instrucciones dadas anteriormente en el caso del envase único.

4. Soluciones acuosas - Origen ilícito

En algunos países, pueden obtenerse en el mercado ilícito soluciones acuosas de clorhidrato de metanfetamina. Como, por su propia naturaleza, las soluciones son homogéneas, una muestra relativamente pequeña (10 ml) es representativa del volumen total.

a) Envase único

Si el tamaño de la muestra lo permite, pipetear al menos 10 ml para su ensayo.

b) Envases múltiples

Agrupar los envases por números de lote u otras características y tratar cada grupo en la forma indicada en el punto 1.b) supra. Informar sobre los resultados independientemente para cada grupo.

Hallar la raíz cuadrada del número total de envases de cada grupo. Seleccionar al azar un número de envases equivalente a la raíz cuadrada redondeando al entero inmediato superior.

De cada uno de los envases seleccionados, retirar una muestra de 10 ml o más (si el tamaño lo permite) para la obtención de un compuesto.

Si el tamaño lo permite, pipetear al menos 10 ml del compuesto para su ensayo.

5. Residuos presentes en jeringas u objetos de vidrio de laboratorios clandestinos

Debido a las cantidades de trazas de anfetamina/metanfetamina que suelen hallarse presentes en las jeringas hipodérmicas aprehendidas a los usuarios o en los objetos de vidrio y otro equipo hallados en laboratorios clandestinos, el analista no deberá intentar realizar ensayos presuntivos, sino utilizar directamente procedimientos analíticos concluyentes.

Lavar la jeringa o los objetos de vidrio con una cantidad mínima de metanol y concentrarlo a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Efectuar a continuación los ensayos previstos.

B. Ensayos presuntivos

1. Ensayos de coloración

Hay que subrayar que los resultados positivos de los ensayos de coloración sólo son indicios presuntivos de la posible presencia de anfetamina o metanfetamina. Muchas otras sustancias, tanto los sucedáneos de anfetamina como los que son inocuos y no son objeto de fiscalización en virtud de legislaciones nacionales o de tratados internacionales, pueden dar colores similares con los reactivos de ensayo. Algunos agentes reductores también pueden ser causa de que la muestra dé falsos positivos o falsos negativos. Así ocurre en especial con el reactivo de Simon. Los analistas tienen la obligación de confirmar tales resultados mediante el empleo de técnicas alternativas.

a) Reactivo de Marquis

Prepárese agregando 8-10 gotas de una solución de formaldehído al 40% a 10 ml de ácido sulfúrico concentrado. Como el paraformaldehído es más estable que el formaldehído, la mezcla de ácido sulfúrico concentrado y de paraformaldehído (10:1 v/v) puede utilizarse como alternativa.

METODO

Colocar una pequeña cantidad de la muestra (1 a 2 mg de polvo; una o dos gotas si se trata de un líquido) en una depresión de una placa de gotas, y agregar el reactivo gota a gota (no más de tres gotas). Tanto la anfetamina como la metanfetamina, dan inmediatamente un color anaranjado que cambia al pardo. El límite inferior de detección es de aproximadamente 1 µg.

b) Reactivo de ninhidrina

Disolver 0,5 g de ninhidrina en 40 ml de acetona. Preparar esta solución diariamente.

METODO

Disolver una pequeña cantidad de la muestra (1 a 2 mg de polvo) en metanol. Poner una gota de la solución en un papel de filtro y agregar una gota del reactivo. Calentar, a 110°C, sobre una placa calentadora. Con el calor, el color cambia a rosado-naranja. Este ensayo no es especialmente sensible.

c) Reactivo de Simon

Solución 1. Solución acuosa de carbonato sódico al 20%

Solución 2. Solución etanólica de acetaldehído al 50%

Solución 3. Solución acuosa de nitroprusiato sódico al 1%

METODO

Colocar una pequeña cantidad de la muestra sobre una placa de ensayos y mezclarla con una gota de la solución 1. Agregar a continuación una gota de la solución 2. La adición de unas cuantas gotas de la solución 3 produce un color azul para la metanfetamina y otras aminas secundarias. La anfetamina

y otras aminos primarias producen un color rosado que cambia lentamente a rojo cereza. Este ensayo puede utilizarse para distinguir la metanfetamina de la anfetamina. Conviene tener en cuenta, sin embargo, que la presencia de algunos agentes reductores puede dar lugar a un falso negativo.

C. Cromatografía de capa delgada (CCD)

DISOLVENTES DE DESARROLLO

SISTEMA A:	Metanol	100
	Amoniaco concentrado	1,5
SISTEMA B:	Ciclohexano	75
	Tolueno	15
	Dietilamina	10
SISTEMA C:	Metiletilcetona	130
	Dimetilformamida	19
	Amoniaco concentrado	1
	Isopropanol	30

Preparación de las soluciones que han de aplicarse sobre la placa de CCD

Polvo: Preparar una solución a una concentración de 5 mg por ml en metanol.

Cápsulas: Extraer de las cápsulas el contenido de una muestra representativa (véase el procedimiento de muestreo anteriormente expuesto) y preparar una solución en metanol que contenga el equivalente de aproximadamente 5 mg de la droga por ml.

Tabletas: Triturar un número representativo de tabletas hasta obtener un polvo fino y preparar una solución en metanol que contenga el equivalente de aproximadamente 5 mg de anfetamina/metanfetamina por ml.

Soluciones acuosas: Aplicar directamente sobre la placa de CCD 5 mg/ml o su equivalente si se desconoce la concentración de la droga.

Soluciones patrones: Para todas, la concentración es de 5 mg por ml en metanol.

Dada la general insensibilidad de las anfetaminas a la mayoría de los reactivos de visualización, se sugiere que se apliquen 5 μ l de una solución de la droga en metanol de 5 mg por ml, lo que producirá una deposición de aproximadamente 25 μ g de droga en la placa de CCD.

En aquellos casos en que se sospeche que la concentración de la anfetamina/metanfetamina en la muestra es muy baja debido a su adulteración o a otra causa, puede que sea necesario preparar, para el análisis, una solución diez veces más concentrada.

Que las soluciones patrones y las muestras utilizadas sean sales o bases, carece de importancia; ambas serán satisfactorias. Debido al carácter básico de los disolventes de desarrollo, los compuestos se desplazan como las bases libres.

VISUALIZACION

Las placas deben secarse antes del examen visual. El secado puede efectuarse a la temperatura ambiente o, más rápidamente, mediante el empleo de un soplador de aire caliente. En este último caso, deberá procederse con el debido cuidado a causa de la volatilidad de las bases libres de anfetamina/metanfetamina. Para obtener un revelado de los colores satisfactorio, deberá eliminarse de la placa todo vestigio de amoníaco o de otras bases.

Métodos de visualización

1. Luz ultravioleta a 254 nm.
2. Reactivo de ninhidrina.
3. Reactivo de yodoplatinato potásico acidificado.

Obsérvese primero la placa a la luz ultravioleta. Pulverizar a continuación el reactivo de ninhidrina y calentar en un horno a 110°C durante 5 minutos. Las aminas primarias, como la anfetamina, producen manchas violetas o rosadas, mientras que las aminas secundarias, como la metanfetamina, produce manchas de color más claro. La placa puede pulverizarse a continuación con la solución de yodoplatinato acidificado. La anfetamina y la metanfetamina producen manchas de color gris-violeta-pardo sucio sobre un fondo rosado.

Advertencia - Debido a la volatilidad de las bases libres de anfetamina, a la temperatura empleada en los disolventes de evaporación de la placa y al número de anfetaminas estructuralmente similares disponibles en el mercado ilícito, la cromatografía de capa delgada es de utilidad limitada y conviene proceder con cautela al interpretar los resultados.

Preparación de reactivos de pulverización

REACTIVO DE YODOPLATINATO POTASICO ACIDIFICADO

Disolver 0,25 g de cloruro platínico y 5 g de yoduro potásico adicionando agua hasta un volumen total de 100 ml. Agregar 2 ml de ácido clorhídrico concentrado para la versión acidificada.

REACTIVO DE NINHIDRINA

Preparar una solución al 0,1% en isopropanol.

RESULTADOS

Valores de $R_f \times 100$:

<u>COMPUESTO</u>	<u>SISTEMA DE DESARROLLO</u>		
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
Anfetamina	46	34	49
Metanfetamina	28	42	16
Efedrina	30	--	12
Cafeína	68	6	75

D. Cromatografía gas-líquido

1. Técnica de columna de relleno

a) Sistema A - sin derivación

Condiciones de funcionamiento:

Detector	FID (detector de ionización por llama)
Columna:	Columna de cristal de 6 pies (o 2 m) por 2 a 4 mm de diámetro interior.
Relleno:	10% de Apiezon L y 2% de KOH sobre Chromosorb W HP de malla 80-100, ó 3% de S-30 ó OV-1.
Gas portador:	Nitrógeno a razón de 30 ml por minuto.
Temperatura de la columna:	Programada de 130° a 260°C.
Patrones internos:	n-tetradecano u otros n-alkanos con un número impar de átomos de carbono o difenilamina o clorhidrato de propilamfetamina.

METODO

Las soluciones patrones (1 mg base/ml) se preparan disolviendo en agua una porción de sal pesada con precisión. Hacer la solución alcalina mediante la adición de unas gotas de 1,0N NaOH. Agregar un volumen igual de disolvente de extracción (hexano o acetato de etilo), agitar la solución y dejar que las capas se separen. La concentración final deberá ser de aproximadamente 1 mg de base y 1 mg de patrón interno por ml.

Tratar la muestra ilícita de una manera análoga utilizando una cantidad suficiente de la muestra para obtener una concentración de anfetamina/metanfetamina aproximadamente igual a la de la solución patrón.

Inyectar, según proceda, 1 ó 2 µl de la capa orgánica.

A efectos de cuantificación, incluir el patrón interno en la solución acuosa inicial (si se emplea una sal de amina, tal como el clorhidrato de propilamfetamina) o en el disolvente de extracción de acetato de etilo (si se emplean n-alkanos o difenilamina).

El contenido (%) de cualquier componente puede calcularse mediante la siguiente fórmula general:

$$C_x \% = \frac{C_r \text{ std.}}{C_{\text{sam.}}} \times \frac{A_x / A_{\text{int. std. in sam. chrom.}}}{A_{r. \text{st.}} / A_{\text{int. std. in std. chrom.}}} \times 100$$

Donde:

$C_x \%$ = contenido de componente x en la muestra (peso/peso en %).

$C_r \text{ std.}$ = concentración de una sustancia x en la solución patrón de referencia (peso/peso en %).

A_x = área del pico correspondiente a una sustancia x obtenido durante la cromatografía de la muestra.

$A_{int. \text{ std. in sam. chrom.}}$ = área del pico del patrón interno obtenido durante la cromatografía de la muestra.

$A_{int. \text{ std. in std. chrom.}}$ = área del patrón interno obtenido durante la cromatografía de la muestra.

$C_{sam.}$ = concentración de la muestra (peso/volumen %).

b) Sistema B - con derivación

Condiciones de funcionamiento:

- Detector: FID (detector de ionización por llama).
- Columna: columna de cristal de 6 pies (2 m) por 3 mm de diámetro interior.
- Relleno: 3% de OV-17 sobre Chromosorb W HP de malla 80-100 o equivalente.
- Gas portador: Nitrógeno a razón de 30 ml por minuto.
- Temperatura de la columna: 145°C o programada de 130° a 270°C.
- Patrón interno: n-tetradecano u otros n-alcanos con un número impar de átomos de carbono.
- Agente de derivación: Anhídrido trifluoroacético.

METODO

Preparar una solución de acetato de etilo de la base libre como en el método anteriormente descrito y secar una parte de ella sobre sulfato magnésico anhidro. Trasvasar 0,1-0,5 ml de la solución de acetato de etilo y 100 ul de anhídrido trifluoroacético al recipiente de reacción herméticamente cerrado, y calentar a 55°C durante 20 minutos. Evaporar el disolvente en vacío y disolver el residuo en 100 µl de acetato de etilo. Inyectar 1 ul en el cromatógrafo de gas.

PERFILES DE ELUCION DE LAS COLUMNAS SELECCIONADAS

SISTEMA	COLUMNA		
	10% Apiezon L 2% KOH sin derivación	SE-30	3% OV-17 derivados de ATF
<u>Compuesto</u>			
Anfetamina	1.134 <u>a/</u>	1.129	1.536
Metanfetamina	1.200	1.176	1.722
Efedrina	1.386	1.363	1.467
Cafeína	1.862	1.810	2.376

a/ Las cifras significan índices de retención. Estos valores variarán según las condiciones del laboratorio (por ejemplo, según la temperatura, la humedad, las corrientes de aire) y otros parámetros instrumentales.

2. Técnica de columna capilar

Condiciones de funcionamiento:

Detector:	FID (detector de ionización por llama)
Columna:	Sílice fundida, metilsilicona o metilfenilsilicona, químicamente enlazada y entrecruzada, como SE-54, DB-1, DB-5 o equivalente).
Espesor de la película:	0,25 μm
Longitud:	10 a 30 m, por 0,25 mm de diámetro interior.
Gas portador:	Helio, 40 cm/s
Flujo de escape:	40:1
Temperatura de la columna:	Programa: 2 min a 75°C, aumentando a razón de 10°/min hasta alcanzar los 280°C.
Patrón interno:	n-tetradecano u otro n-alcano con un número impar de átomos de carbono o clorhidrato de propilamfetamina.

METODO

Preparar soluciones patrón de droga y soluciones de la muestra desconocida a una concentración de 1 mg de base libre por 1 ml de H₂O. La solución se hace alcalina agregando unas gotas de 1,0 N NaOH y agitando la mezcla con 1 ml de acetato de etilo. Tras el filtrado sobre MgSO₄, se inyecta 1 μl . En una columna SE-54 de 11 m, los tiempos de retención para la anfetamina y la metanfetamina son de 1,6 y 1,9 minutos respectivamente.

Para otros sistemas de cromatografía gaseosa, véanse:

1. J. Forensic Sciences 31 (1986), págs. 1.102-1.107.
2. J. Chromatography 90 (1974), págs. 19-33.
3. J. Chromatography 258 (1983), págs. 65-72.

E. Cromatografía líquida de gran rendimiento (CLGR)

1. Técnica isocrática

a) Fase normal

- Columna: 125 mm por 4,9 mm de diámetro interior.
- Material de relleno: Sílice de calidad CLGR, de 5 μ m de diámetro (Spherisorb S5W o equivalente).
- Fase móvil: Pueden efectuarse separaciones igualmente buenas mediante el empleo de la fase A o de la fase B.
- A: Una solución que contenga 1,17 g (0,01 M) de perclorato amónico en 1.000 ml de metanol. Ajustar el pH a 6,7 agregando hidróxido sódico 0,1 M en metanol (aproximadamente 1 ml).
- B: Metanol: solución acuosa tampón de nitrato amónico (90:10 v/v). Para preparar la solución tampón, agregar 94 ml de amoníaco concentrado y 21,5 ml de ácido nítrico concentrado a 884 ml de agua y ajustar después el pH a 10 con amoníaco.
- Velocidad de flujo: 2,0 ml por minuto.
- Detección: UV a 254 nm.
- Preparación de la muestra: Todas las sustancias se disuelven en metanol para obtener una concentración aproximada de 1 mg de base libre por ml.
- Soluciones patrón: Disolver una cantidad suficiente de sal de metanfetamina o anfetamina para obtener una solución que contenga 1 mg de base libre por 1 ml de metanol.
- Volumen de inyección: 1 a 5 microlitros por jeringa o inyector de bucle.
- Quantificación: Por áreas de pico, método del patrón externo.
- b) Fase inversa
- Columna: 250 mm por 4 mm de diámetro interior.
- Material de relleno: Octadecil-sílice de calidad CLGR, de 5 μ m de diámetro (LiChrosorb RP-18 o equivalente).
- Fase móvil: C: Acetonitrilo: acetato amónico acuoso al 1%: dietilamina acuosa al 2,5% (40:45:15). El pH se ajusta a 8 - 9 mediante la adición de amoníaco o de ácido acético.

Velocidad de flujo 1,5 ml por minuto.
Temperatura: 35°C
Detector: UV a 254 nm.
Preparación de la muestra: Todas las sustancias se disuelven en una mezcla de 2 partes de agua y 1 parte de acetonitrilo para obtener una concentración aproximada de 2 - 6 mg por ml.
Soluciones patrón: Disolver una cantidad suficiente de patrones de anfetamina o metanfetamina en una mezcla de 2 partes de agua y 1 parte de acetonitrilo para obtener una concentración de 2 mg por ml.
Volumen de inyección: 10 - 20 µl por inyector de bucle.
Cuantificación: Por áreas de pico, método del patrón interno, utilizando lidocaína o procaína o el método del patrón externo.

RESULTADOS

Los coeficientes de capacitancia (valores K') o tiempos de retención (en minutos) son los siguientes:

SISTEMA	<u>FASE NORMAL</u>		<u>FASE INVERSA</u>
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
<u>Compuesto</u>			
Anfetamina	0,9	0,98	6,0 min.
Metanfetamina	2,0	2,07	11,0 min.
Efedrina	1,0	1,79	----
Cafeína	0,2	0,26	----

Otros métodos de CLGR para el análisis de anfetamina/metanfetamina:

1. J. Chromatography 218 (1981), págs. 639-646.
2. Microgram XVIII (1985), págs. 134-143.

F. Espectroscopia infrarroja

Preparación de la muestra

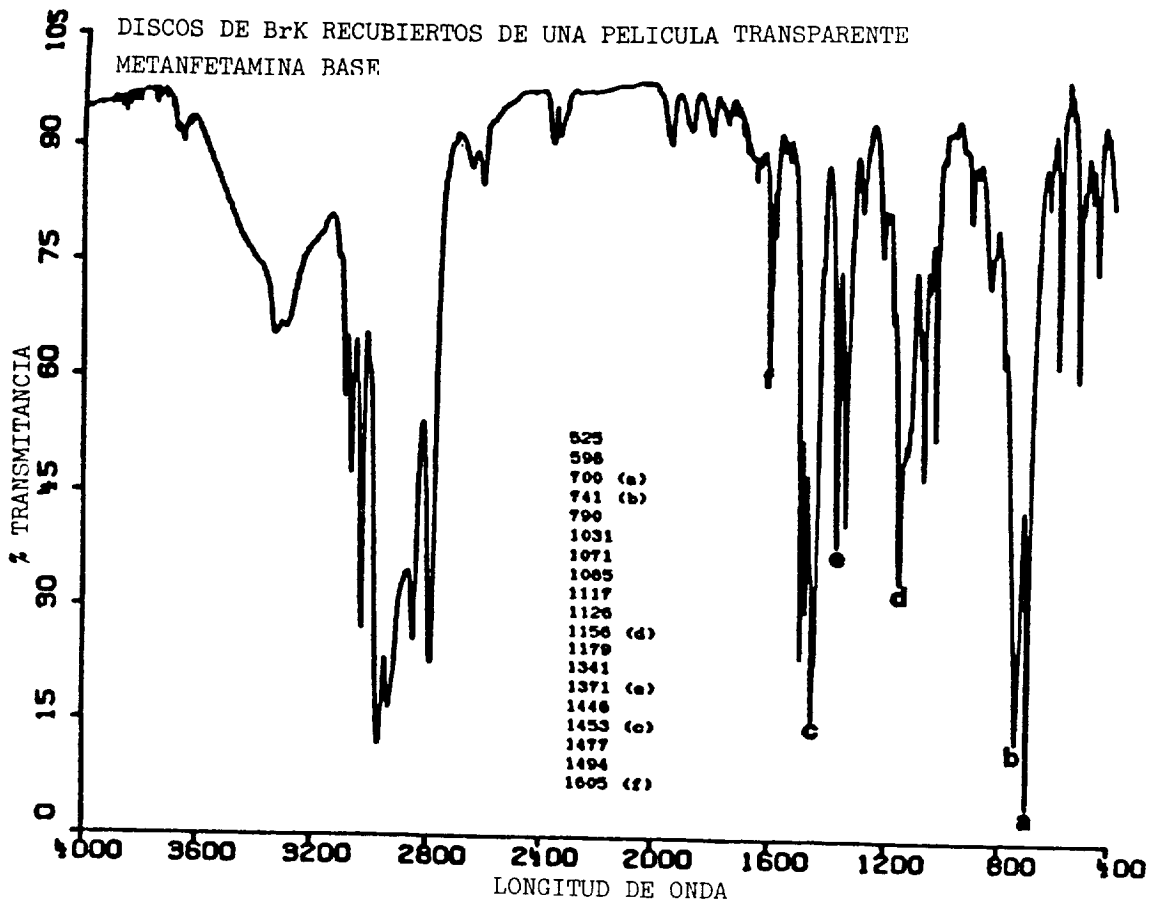
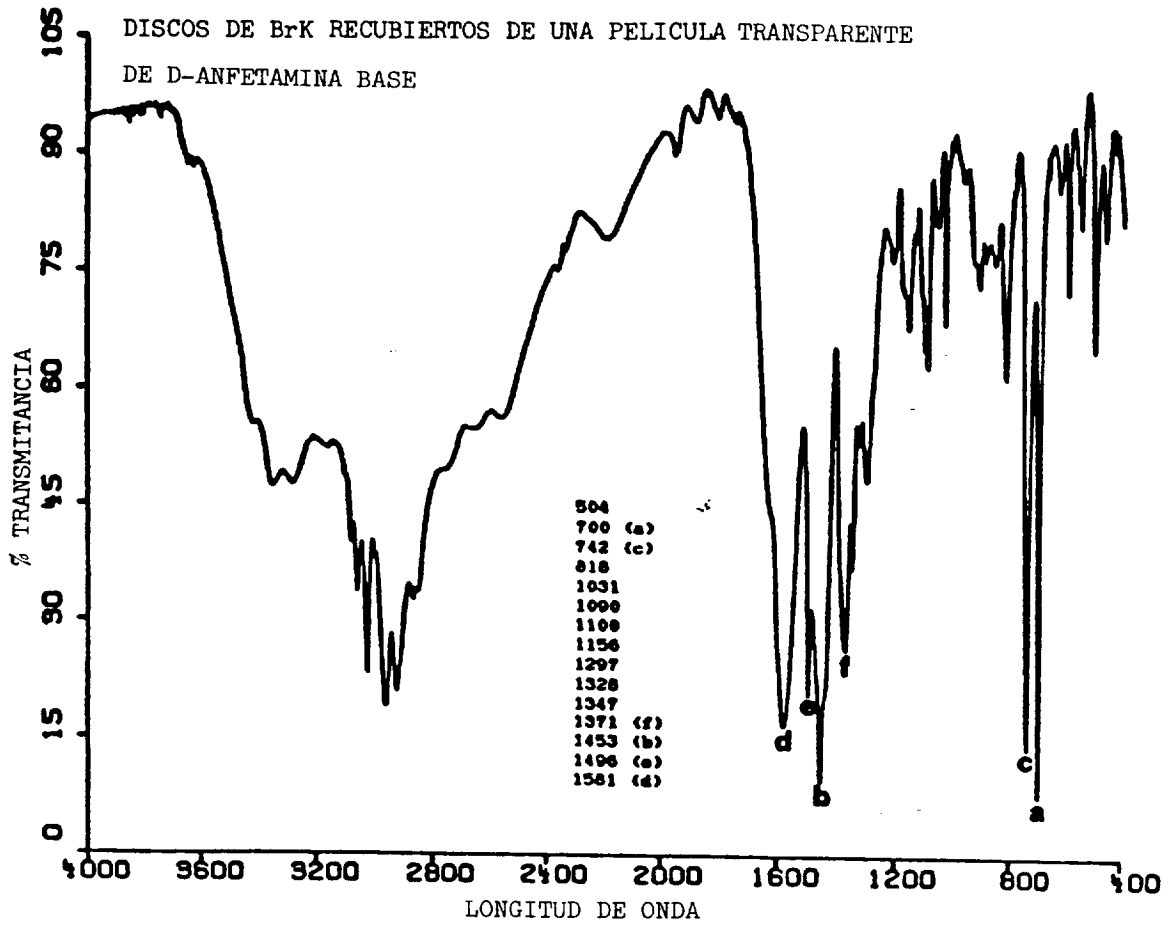
Para una descripción de las técnicas normales (método del disco de haluro, del microdisco de haluro y de la pasta de Nujol), véanse los manuales de esta serie anteriormente publicados.

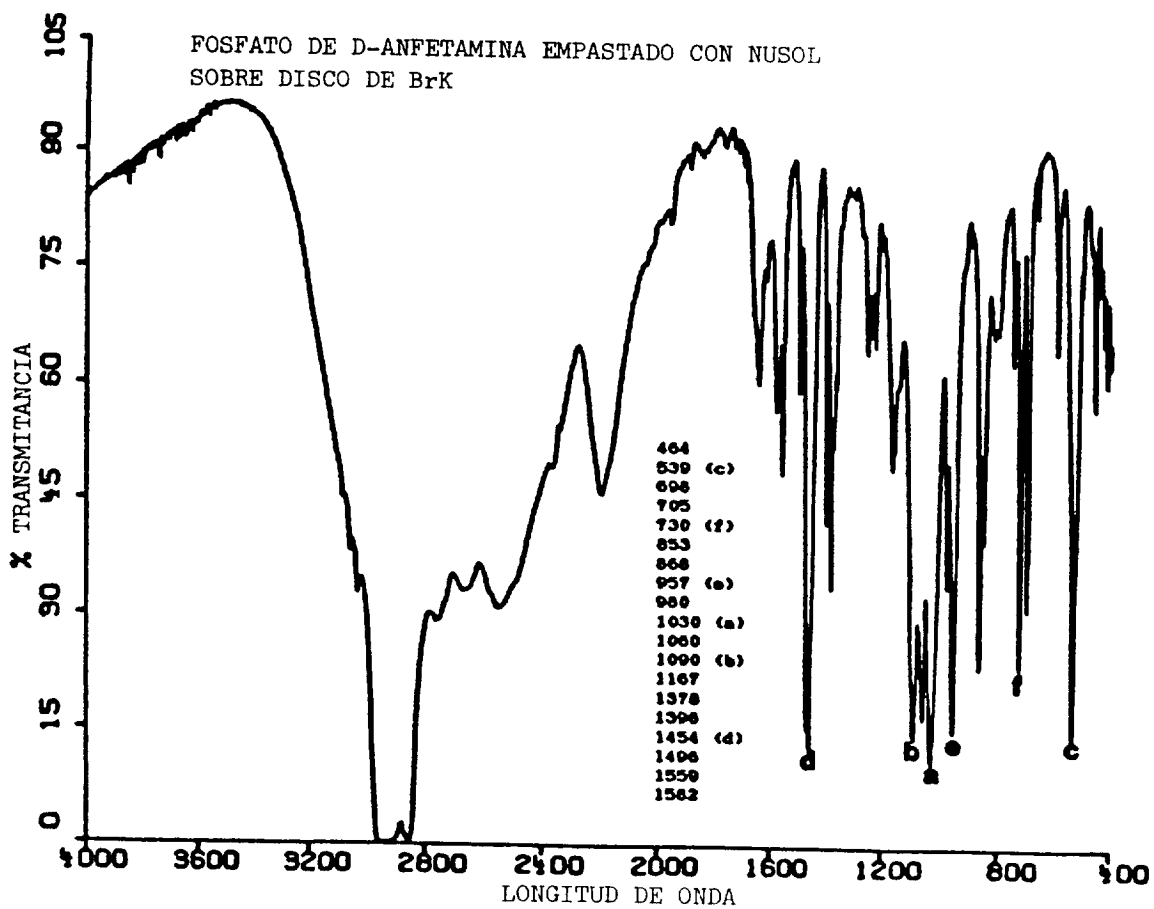
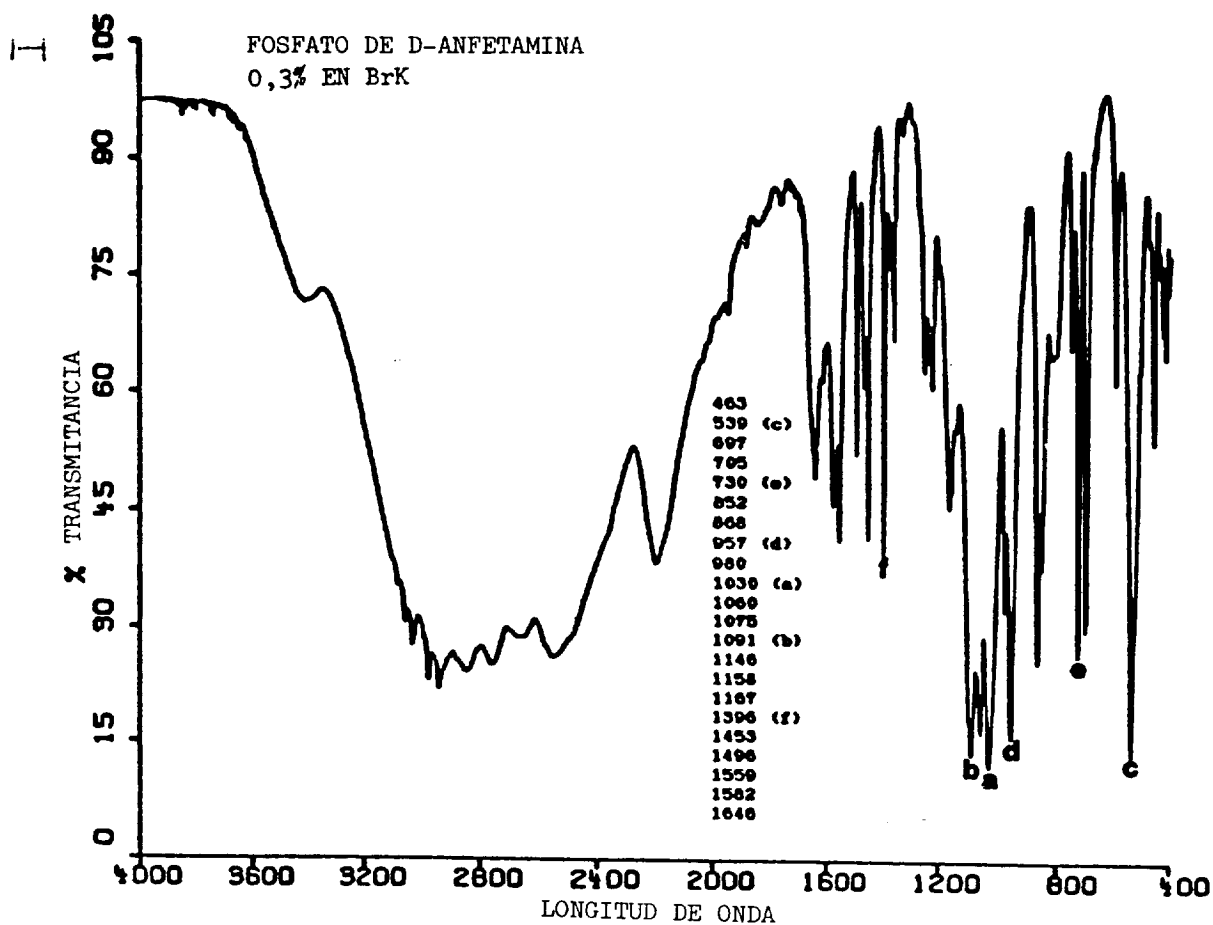
Método de la película

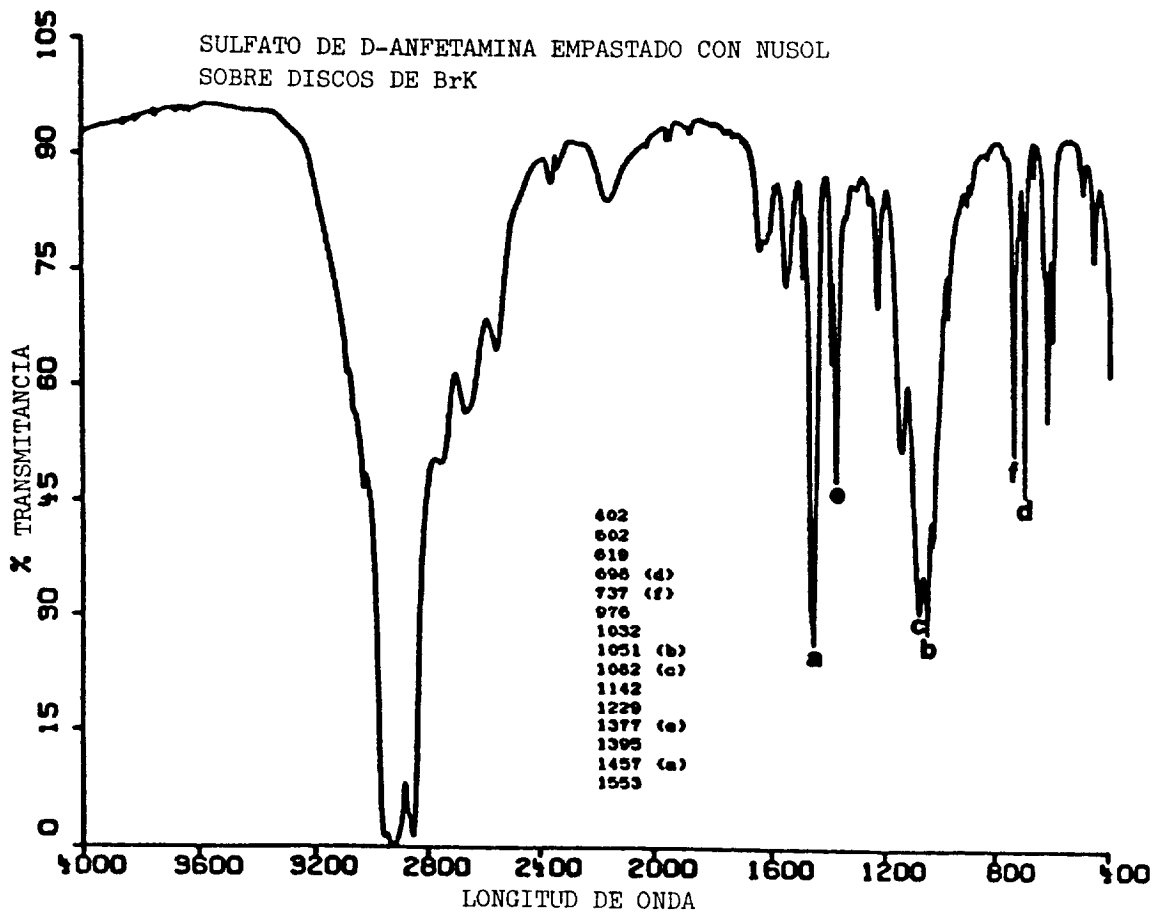
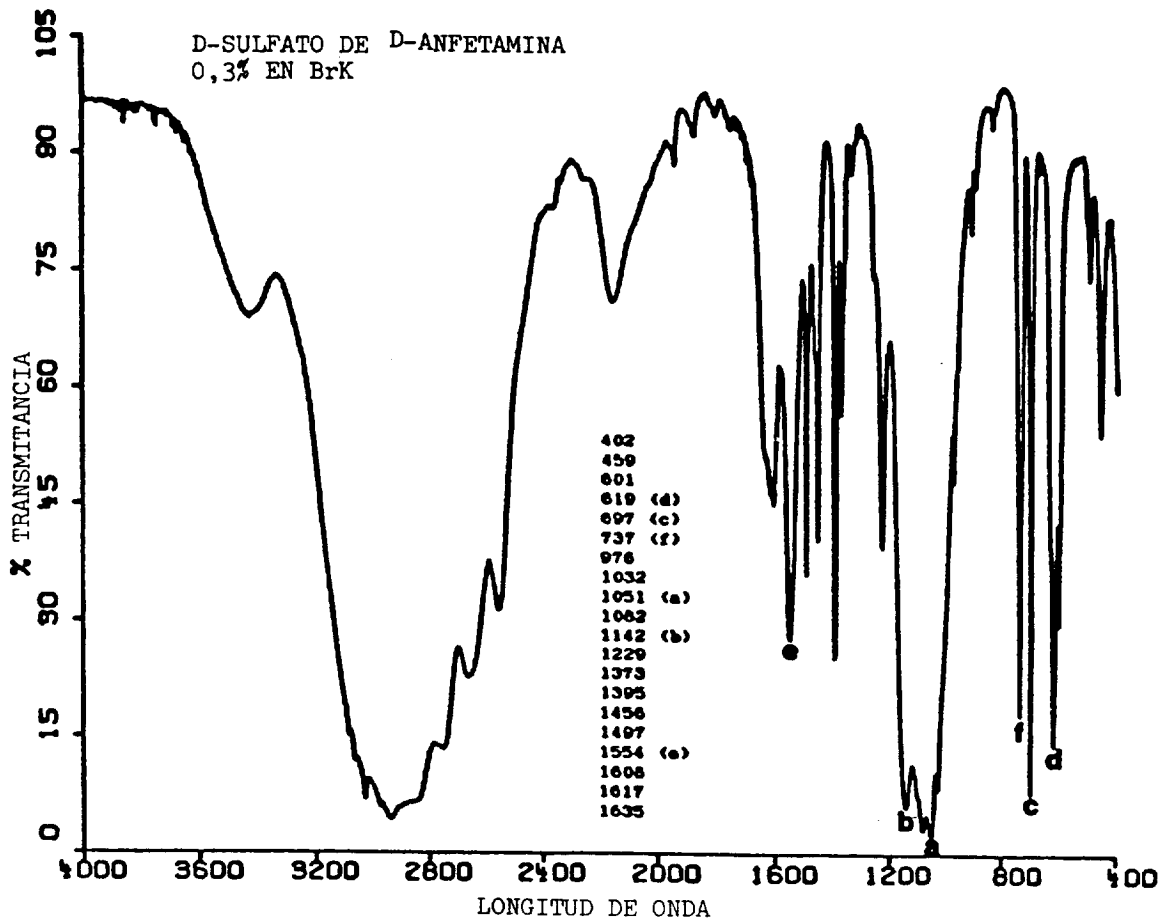
Este método es especialmente útil para obtener espectros de las bases libres de anfetamina/metanfetamina que sean líquidos. Entre dos placas de haluro alcalino, se deposita una gota de la amina, formándose por efecto de la presión una delgada película líquida.

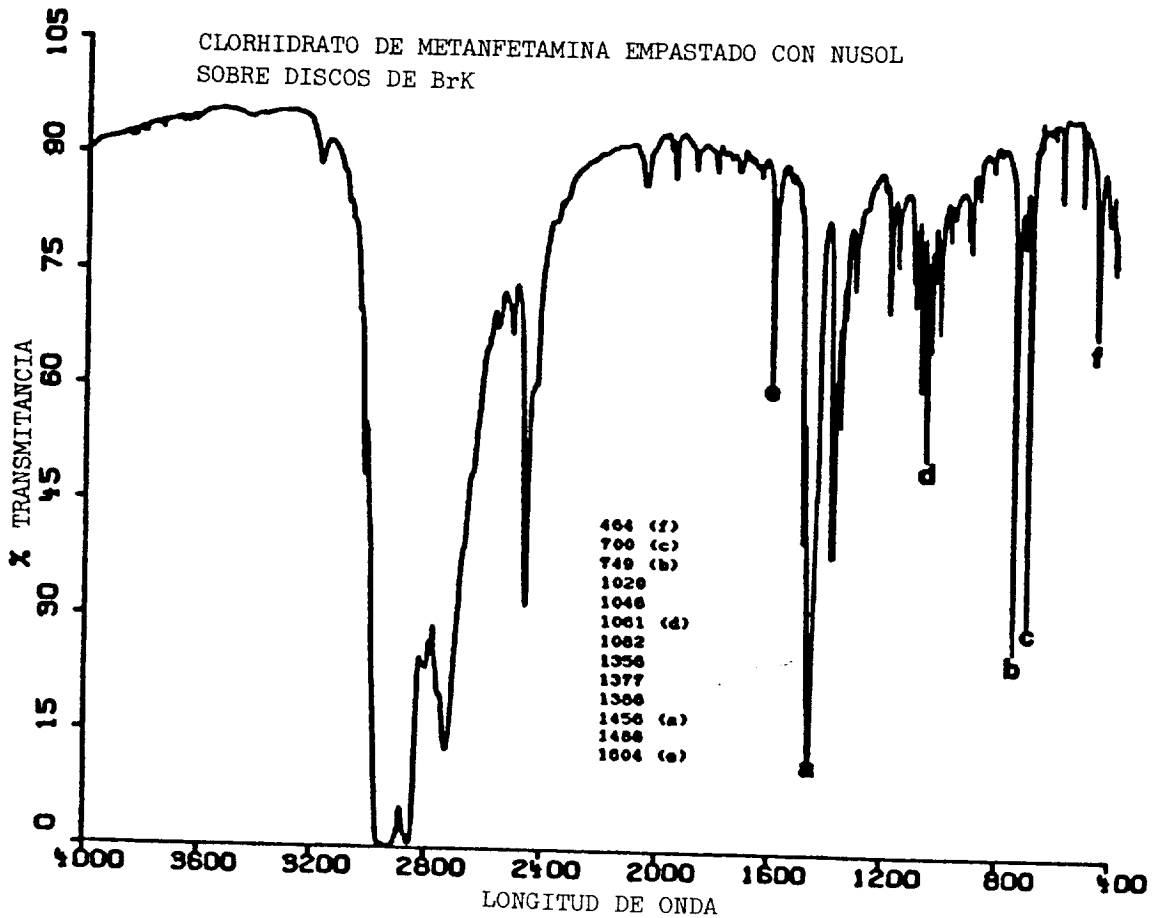
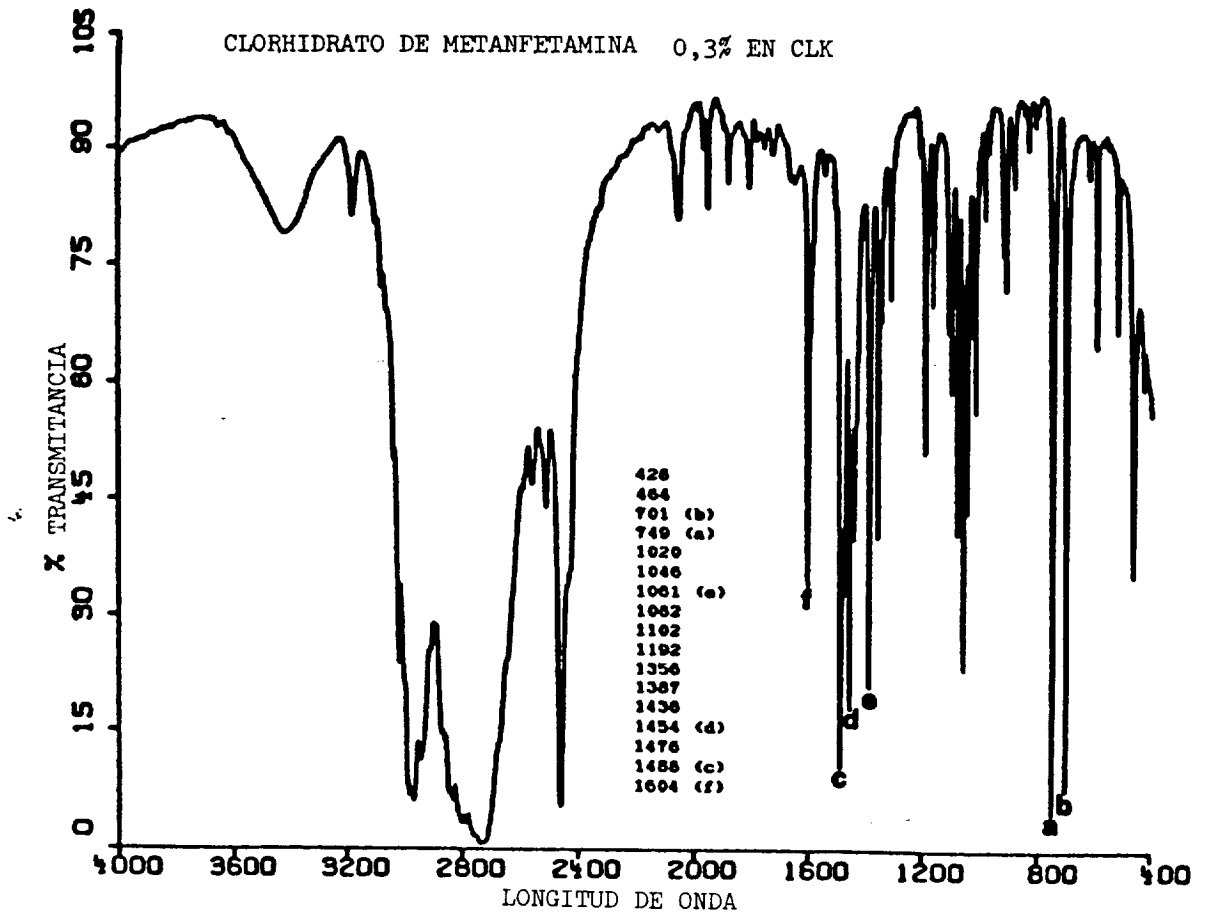
RESULTADOS

En general, los espectros de las sales de anfetamina y metanfetamina se obtienen a base de muestras preparadas por los métodos del disco de haluro o de la pasta de Nujol, y las bases libres en forma de películas delgadas. Los picos máximos principales registrados en los espectros infrarrojos del sulfato de anfetamina, del fosfato de anfetamina, de la anfetamina base, del clorhidrato de metanfetamina y de la metanfetamina base libre se indican en cada figura por orden decreciente de magnitud de absorbencia. La secuencia puede variar, sin embargo, de una muestra a otra.









G. Análisis de isómeros ópticos

La anfetamina y la metanfetamina tienen, ambas, un átomo de carbono asimétrico que da como resultado, en cada caso, un par de enantiómeros. Según que la fuente de la sustancia sea lícita o ilícita, en las muestras sometidas a análisis podrá encontrarse l-, d- y dl- metanfetamina o anfetamina.

Estos isómeros ópticos difieren en cierto grado en cuanto a actividad farmacológica, y en algunos países son objeto de diferentes medidas reguladoras. En virtud del "Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas", cada isómero óptico (d-, o l-), así como la mezcla racémica (dl) de anfetamina, están sometidos a fiscalización internacional. Sin embargo, en el caso de la metanfetamina, únicamente el isómero d-(+)- y el isómero l-(-) son objeto de fiscalización. En aquellos países en donde la legislación nacional exija la identificación del isómero óptico específico presente, podrán emplearse los siguientes procedimientos analíticos.

1. Ensayo microcristalino para distinguir la l-, d-, y dl- anfetamina

Ambas anfetaminas, la d- y la l- anfetamina, dan microcristales idénticos. La manera de distinguirlos consiste en formar el racemato, que produce cristales diferentes.

REACTIVOS

1. Reactivo de ensayo HAuCl_4 in H_3PO_4 al 5%

Prepárese disolviendo 1 g de ácido tetracloro aúrico comercial ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de una solución que contenga un volumen de H_3PO_4 concentrado y dos volúmenes de agua.

2. Reactivo de volatilización

Prepárese una solución acuosa de NaOH al 5%.

METODO

Para la anfetamina y la metanfetamina se emplea la técnica de la "gota en suspensión". Esto requiere una lámina provista de una cavidad, un cubreobjeto, el reactivo de ensayo y un reactivo de volatilización. Depositar una pequeña cantidad de polvo de la muestra en la cavidad de dicha lámina, y agregar a continuación una o dos gotas del reactivo de volatilización. Esto libera la amina libre como base libre que se eleva de la solución en forma de vapor. Depositar inmediatamente una gota del reactivo de ensayo sobre un portaobjeto e invertir éste transversalmente sobre la cavidad que contiene la muestra. El reactivo reacciona entonces con el vapor de la amina presente en la cavidad. Tras un intervalo adecuado, dése la vuelta a la lámina que porta el reactivo y véase si hay cristales en éste o en el borde de la gota de reactivo.

RESULTADOS

La d- y l- anfetamina producen, ambas, largas varillas de color amarillo o gruesas agujas y hojas largas y estrechas. El racemato, dl- anfetamina, produce primero gotas "aceitosas" y luego cristales laminosos coloreados. Estos cristales se forman principalmente después de la inversión.

Distinción de la d- y l- anfetamina

Si del ensayo anterior se desprende que la muestra está constituida por d- o l- anfetamina, deberá determinarse cuál de ellas está presente. A tal fin, agréguese un poco de polvo de la muestra a una pequeña cantidad de sal de d- anfetamina conocida en una cavidad y a una pequeña cantidad de sal de l- anfetamina conocida en la otra cavidad. Repítase el ensayo anterior. La mezcla, es decir, (d+d) o (l+l), producirá las varillas largas de color amarillo, etc. La mezcla que resulte ser (d+l) producirá los cristales laminares del racemato, como se ha indicado.

2. Ensayo microcristalino para distinguir la d- y dl- metanfetamina

REACTIVOS

1. Reactivo de ensayo - H_3BiI_6 en H_2SO_4

Prepárese disolviendo 1,25 g de yoduro potásico en 2,0 ml de agua. Agréguese 2,5 ml de una solución de H_2SO_4 diluido en la proporción de 1:7 con agua, 0,5 ml de una solución de $Bi(NO_3)_3$ concentrada y 0,1 g de hipofosfito sódico. La solución madre de $Bi(NO_3)_3$ concentrada se prepara disolviendo 50 g de subnitrito de bismuto en 70 ml de una solución de HNO_3 (diluido en la proporción de 1:1 con agua) y completando a 100 ml con agua. El reactivo de ensayo puede mantenerse durante varios meses.

2. Reactivo de volatización - solución acuosa de NaOH al 5%

METODO

Prócedase mediante la técnica de la "gota en suspensión" en la forma anteriormente descrita para la anfetamina, pero utilizando H_3BiI_6 en el reactivo de ensayo de H_2SO_4 .

RESULTADOS

La d- metanfetamina produce largas agujas de color naranja. La dl- metanfetamina produce varillas de color rojo naranja característico con extremos en bisel.

Para más información sobre ensayos cristalinos, véanse:

1. Fulton, C.C. (1969) Modern Microcrystal Tests for Drugs, Wiley-Interscience, Nueva York.
2. U.S. Dept. of Justice (1986) Basic Training Program for Forensic Drug Chemists.

3. Método de espectroscopia infrarroja para distinguir isómeros ópticos de anfetamina

Otro método para distinguir isómeros ópticos de anfetamina se basa en el hecho de que pueden producirse tres espectros infrarrojos diferentes para d-, dl- y l- anfetamina como sales de d- mandelato.

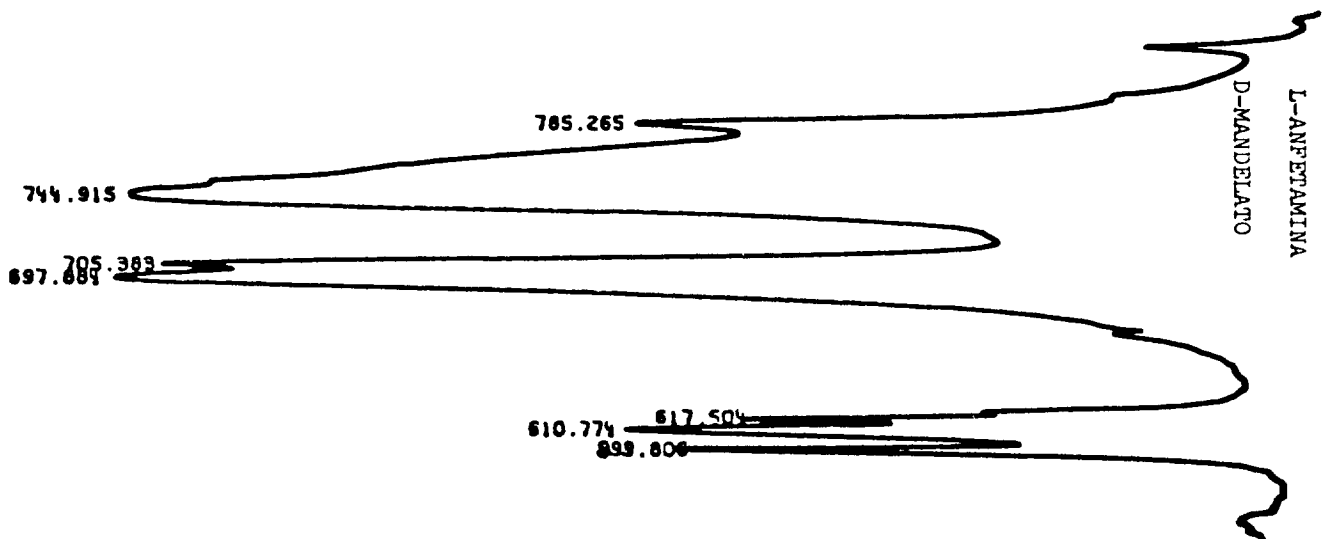
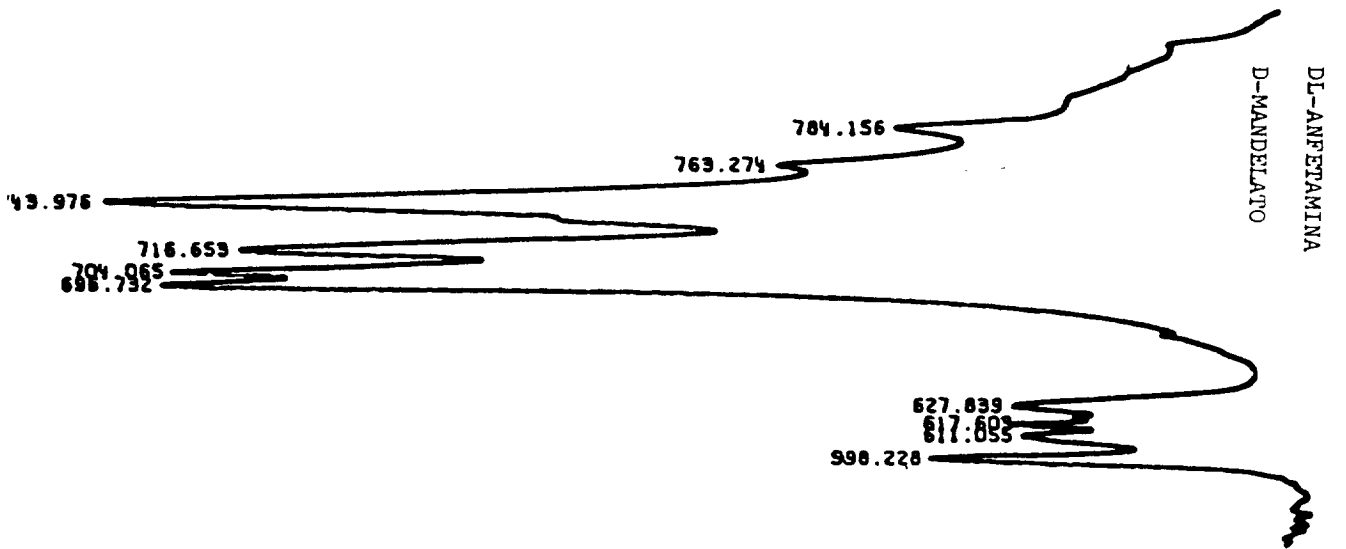
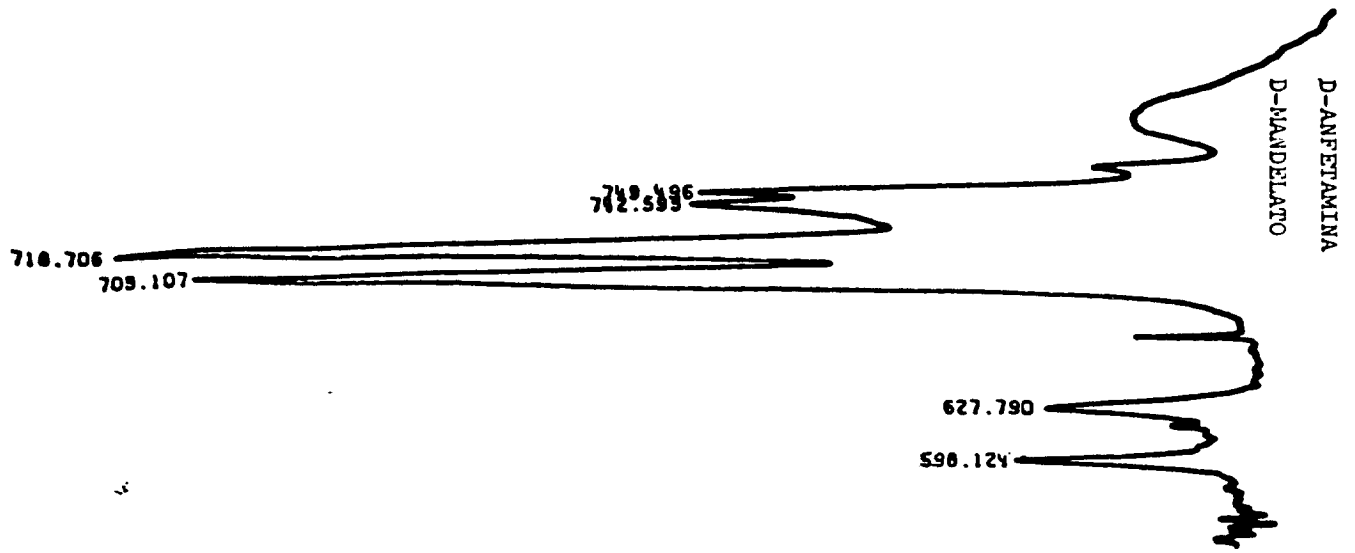
METODO

Se hace básica una solución de sal de cualquier anfetamina (10-50 mg) y se extrae la anfetamina con cloruro de metileno. El cloruro de metileno se seca sobre sulfato sódico anhidro y se concentra a 2 ml aproximadamente. A una solución saturada de ácido d- mandélico en cloruro de metileno se agregan varias gotas de una vez hasta que la anfetamina es neutralizada (papel p^H). La sal de d- mandelato se deja cristalizar, la solución se filtra por succión y los cristales se lavan con una pequeña cantidad de cloruro de metileno. Tras el secado, prepárese un disco de BrK de los cristales y recórrase todo el espectro infrarrojo. Repetir el procedimiento mediante el empleo de isómeros puros de anfetamina ópticamente conocidos y comparar los espectros conocidos con los obtenidos de los patrones puros.

RESULTADOS

Los espectros (véanse las figuras) de los diferentes isómeros son suficientemente diferentes, sobre todo en la región de 800-600 cm⁻¹, como para distinguir las anfetaminas d-, dl- y l-.

Referencia: Analytical Chemistry, 42 (1970) pág. 1459.



4. Otros métodos para distinguir los isómeros ópticos de anfetamina/metanfetamina

1. CCD - J. Chromatography 117 (1976), págs. 442-444.
2. CGL - J. Forensic Sciences 27 (1982), págs. 39-48.
3. CLGR - Analytical Chemistry 58 (1986), págs. 1.643-1.648.
4. RMN - Analyst 107 (1982), págs. 544-549.
- J. Pharm. Belg. 36 (1981), págs. 348-353.
5. CLGR-EM - Analytical Chemistry 58 (1986), págs. 1.349-1.352.

H. Análisis de impurezas de anfetamina/metanfetamina

1. Extracción/preparación de muestras

Como la mayor parte de las impurezas son neutras o débilmente básicas, su separación de una solución acuosa de la sal de anfetamina o metanfetamina suele hacerse por extracción con un disolvente orgánico. Para la determinación cuantitativa de algunas impurezas, tales como la DIPA (diisopropanolamina), es necesaria la extracción de una solución alcalina, pero también se extrae una cantidad importante de la droga. Para la impresión digital de una muestra de anfetamina o de metanfetamina, en que se prefiere separar la impureza de la masa de la muestra, el procedimiento que se indica a continuación resulta muy satisfactorio.

Soluciones de la muestra - Triturar, hasta reducir a un polvo fino, 200 mg de la muestra de anfetamina o metanfetamina aprehendida, y disolver en una solución tampón de fosfato (pH 7) para formar una solución con una concentración de 100 mg/ml.

Extracción líquido-líquido - Extraer 2 ml de una solución de muestra con 0,2 ml de heptano (o n-octano) agitándola enérgicamente durante 2-5 minutos. Después de la fase de separación, pasar la capa orgánica a un tubo de vidrio, pero dejando una pequeña cantidad para evitar la transferencia de alguna fase acuosa. Para el análisis cuantitativo, puede agregarse difenilamina (como patrón interno) a la solución inicial de heptano a una concentración de 35 mg/L.

2. Cromatografía de capa delgada

Disolventes de desarrollo:

SISTEMA A:	Hexano	50
	Eter	50
SISTEMA B:	Ciclohexano	75
	Tolueno	15
	Dietilamina	10
SISTEMA C:	Isopropanol	95
	Amoniaco	
	concentrado	5

Soluciones para la separación cromatográfica - Preparar soluciones de patrones a una concentración de 2 mg por ml de acetonitrilo. Depositar entre 1 y 5 μ l de éstas y de la solución obtenida al emplear el procedimiento de extracción líquido-líquido ya mencionado.

VISUALIZACION

1. Luz UV a 254 nm.
2. Yodoplatinato potásico acidificado.

Referencias:

Boletín de Estupefacientes 39 (1981), págs. 37-54.
J. Forensic Sciences 30 (1981), págs. 427-438.
Eisei Kagaku 29 (1983), págs. 400 - 406.

3. Cromatografía gas-líquido

Condiciones de funcionamiento:

SISTEMA A: Técnica de columna de relleno - igual que el sistema A de la sección IV.D1. (véase supra).

SISTEMA B: Técnica de columna capilar
Igual que el método descrito en la sección IV.D.2 (véase supra).

Procedimiento: Inyéctese de 1 a 5 μ l de la solución de la muestra obtenida en el procedimiento de extracción líquido-líquido anteriormente indicado.

Referencias:

Sistema A - 1. J. Forensic Sciences 23 (1978), págs. 693-700.
2. Eisei Kagaku 29 (1983), págs. 400-406.

Sistema B - 1. J. Chromatography 258 (1983), págs. 65-72.
2. J. Chromatography 234 (1984), págs. 499-502.

4. Cromatografía líquida de gran rendimiento

Sistema de fase inversa para las impurezas de la anfetamina:

Este método permite la extracción y el análisis automatizados necesarios. En él se utiliza una columna de extracción en línea para el enriquecimiento de las impurezas, mientras que la anfetamina y los diluyentes polares se lavan con H₂O. Se acciona entonces una válvula de seis aberturas y las impurezas se eluyen desde la columna de extracción C-8 hasta la columna analítica C-18, donde se separa.

Aparatos: Bomba isocrática para CLGR, sistema de bombeo de gradiente para CLGR, válvula de desviación de seis aberturas.

Columna de extracción: 15 mm por 3,2 mm de diámetro interior, octasilano de 7 μ m de diámetro, de calidad CLGR.

Columna analítica: 100 mm por 4,6 mm de diámetro interior, octadecilsilano de calidad CLGR de 5 μ m de diámetro.

Columna protectora: 30 mm por 3,2 mm de diámetro interior, octadecilsilano de calidad CLGR, de 5 μ m de diámetro.

Fase móvil: Solución de lavado
Agua de calidad CLGR para las operaciones de absorción y separación.
Para desorción y separación
Disolvente A
0,2 M butilamina en agua. El pH se ajusta a 8,0 con ácido ortofosfórico.
Disolvente B
20% (v/v) de disolvente A en acetonitrilo.

El gradiente se programa linealmente del 30 al 100% del disolvente B durante 20 minutos, y luego del 100% del disolvente B isocrático durante cinco minutos. Al término del día, lávese el sistema con un 75% de acetonitrilo en agua durante unos 30 minutos.

Velocidad de flujo: 1,0 ml por minuto.
Detección: UV a 220 y 254 nm.
Volumen de inyección: 100 ul por inyector de bucle.
Cuantificación: Por alturas o áreas de pico, método del patrón externo.

Preparación de la muestra
Tritúrese, hasta reducirla a un polvo fino, una parte de la muestra aprehendida y disuélvase en una solución de acetonitrilo-tampón citrato, pH 3 (2:8), a una concentración de 50 mg/ml. Si es necesario, la solución puede someterse a un baño ultrasónico durante 15 minutos.

METODO

Etapas de funcionamiento de la columna -véase la figura.

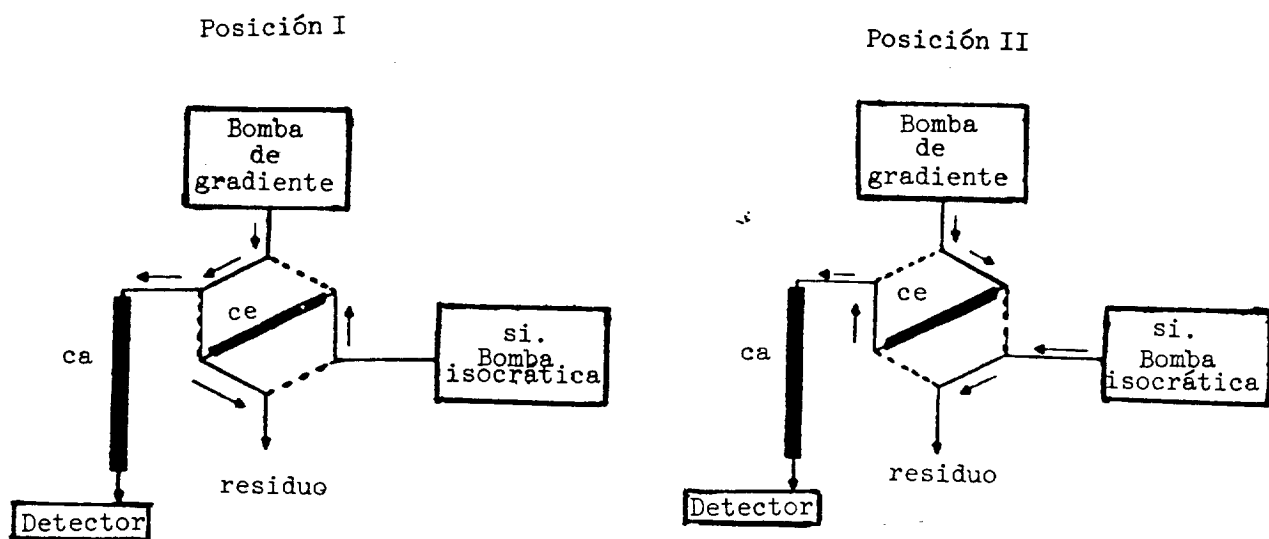
Hora 0: En la columna de extracción (ce) se inyecta una muestra de 100 µl con agua como fase móvil.

Hora 1,5 min: Fin del lavado con agua. La válvula de desviación se cambia de la posición 1 a la posición 2. Arranque de la bomba de gradiente. Puesta en marcha de la impresora. Las impurezas de trazas son deabsorbidas de la columna de extracción (ce) y empieza la separación en la columna analítica (ca).

Hora 16,5 min: Cambiar la válvula de desviación de la posición 2 a la posición 1 y dejar que se reequilibre la columna de extracción con agua antes de la inyección siguiente.

Hora 26,5 min: Termina la elución y separación de la columna analítica (ca).

Hora 30 min: La columna analítica (ca) se reequilibra con el gradiente inicial y queda lista para la inyección siguiente.



Esquema de funcionamiento para preconcentración y limpieza en línea.

ce = columna de extracción

ca = columna analítica

si = sistema de inyección

RESULTADOS

<u>Compuesto</u>	<u>Coefficientes de capacidad K'</u>
Anfetamina	1,7
N-formilamfetamina	4,2
4-metil-5-fenilpirimidina	6,2
N,N-di(-fenilisopropil)formamida	13,3
N,N-di(-fenilisopropil)amina	14,3
N,N-di(-fenilisopropil)metilamina	19,3
Cafeína	0,7
Efedrina	1,5
Fenazona	1,8
Procaína	4,8
Glucosa	nd*
Sucrosa	nd

*nd - no detectado

Referencias

J. Chromatography 369 (1986), pág. 365.

Para otros métodos de CLGR, véanse:

1. Analytical Chemistry 58 (1986), págs. 1643 - 1648.
2. J. Chromatography 295 (1984), págs. 264 - 268.
3. J. Chromatography 331 (1985), págs. 339 - 348.

