

## Separación de fármacos en orina por microextracción líquido-líquido dispersiva

### Separation of drugs in urine by dispersive liquid-liquid microextraction

Isaí Vázquez-Garrido<sup>\*a</sup>, Juan F. Flores-Aguilar<sup>b</sup>, Israel Ibarra<sup>c</sup>, Alfredo Guevara-Lara<sup>d</sup>

#### Abstract:

Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has been one of the most important research topics in recent years since its first application in 2016 due to its importance to concentrate and separate different drugs in biological samples. To perform DLLME correctly and have good recovery percentages, it is necessary to correctly select the dispersing agent and the extraction solvent, as well as the appropriate volume. The DLLME is applicable to many sample types and has wide application for different analytes that are in very small concentrations such as urine samples. For this reason the DLLME has been very useful for forensic and clinical chemistry. Various studies for DLLME are shown in this article where various drugs are extracted as psychotropics, carbamezapine, opium alkaloids and methadone.

#### Keywords:

Dispersive liquid-liquid microextraction, drugs, recovery, separation methods, HPLC.

#### Resumen:

La microextracción líquido-líquido Dispersiva (DLLME) ha sido uno de los más importantes temas de investigación en los últimos años desde su primer aplicación en 2016 debido a su importancia para concentrar y separar distintos fármacos en muestras biológicas. Para realizar DLLME correctamente y tener buenos porcentajes de recuperación es necesario seleccionar correctamente el agente dispersor y el disolvente de extracción así como el volumen adecuado. La DLLME es aplicable a muchos tipos de muestra y tiene una amplia aplicación para diferentes analitos que se encuentran en concentraciones muy pequeñas como muestras de orina. Por este motivo la DLLME ha sido de gran utilidad para la química forense y clínica. Diversos estudios para la DLLME se muestran en este artículo en donde diversos fármacos son extraídos como psicotrópicos, carbamezapina, alcaloides del opio y metadona.

#### Palabras Clave:

Microextracción líquido-líquido dispersiva, fármacos, recuperación, métodos de separación, HPLC.

### Introducción

Los métodos comunes para preconcentración de fármacos en orina como extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida presentan desventajas como consumo de tiempo, uso de cantidades elevadas de solventes orgánicos y dificultad para automatizar el sistema. Por lo tanto se han investigado diversos métodos de separación que evite tener dichas desventajas, además de ser más efectivos [1].

Para esto se desarrolló en 2006 un método nombrado microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) por Assadi y colaboradores [2]. Este método está basado en un sistema compuesto por 3 solventes en el cual el solvente de extracción y el dispersante son rápidamente inyectados en la muestra acuosa con una jeringa. La

muestra se agita y se forma una solución turbia. Después de centrifugar, las partículas del solvente de extracción son sedimentadas. El sedimento es tomado con una microjeringa para ser analizado. La DLLME presenta ventajas frente a otras técnicas como un manejo más simple, mayor rapidez, bajo costo, un alto porcentaje de recuperación del analito, un alto factor de enriquecimiento y menor impacto ambiental.

### Procedimiento de la DLLME

En la DLLME se utiliza una pequeña cantidad del solvente de extracción, generalmente en el orden de  $\mu\text{l}$ , mezclado con un agente dispersante. Sólo se aplica para analitos con alta o moderada hidrofobicidad ( $K > 500$ ). Los

<sup>\*a</sup> Autor de Correspondencia, Universidad Xicotepetl A.C., <https://orcid.org/-0000-0003-0175-0260>, Email: [ivazquez@uxac.edu.mx](mailto:ivazquez@uxac.edu.mx)

<sup>b</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <https://orcid.org/0000-0002-4515-8093>, Email: [juan\\_flores@uaeh.edu.mx](mailto:juan_flores@uaeh.edu.mx)

<sup>c</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <http://orcid.org/0000-0001-8449-9774>, Email: [israel\\_ibarra@uaeh.edu.mx](mailto:israel_ibarra@uaeh.edu.mx)

<sup>d</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <https://orcid.org/-0000-0002-5658-9884>, Email: [guevaraa@uaeh.edu.mx](mailto:guevaraa@uaeh.edu.mx)

analitos ácidos y bases pueden ser extraídos si se controla el valor del pH de la solución para generar las especies en su estado no iónico. El proceso de extracción se muestra en la figura 1.

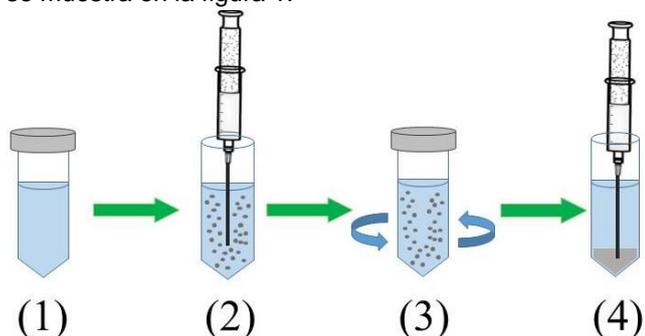


Figura 1. Proceso de extracción por DLLME 1) muestra, 2) dispersión 3) centrifugación 4) recuperación de la solución de extracción

Como se observa en la figura, 1 a un cierto volumen de muestra en un tubo con fondo cónico (1) se le inyecta con una jeringa el solvente de extracción que contiene un agente dispersante. Entonces por efecto de la inyección la solución dispersante forma una solución turbia con la muestra (2). Después de esto, el área superficial entre el solvente de extracción y la fase acuosa es extremadamente elevada, por lo tanto, la difusión del analito a la muestra ocurre rápidamente. El equilibrio es alcanzado rápidamente, resultando en un corto tiempo de extracción, que marca la ventaja principal del DLLME comparado con otras técnicas. Posteriormente las partículas de la fase de extracción son sedimentadas por centrifugación (3). El volumen del sedimento es extraído con una jeringa para posteriormente ser analizado (4).

### Factores que afectan la extracción

La eficiencia para la extracción de un analito por DLLME es influenciada por diversos factores como son:

a) *Solvente de extracción*: La selección de un solvente es el parámetro más importante para considerar. Este debe satisfacer dos condiciones: uno es tener una mayor densidad que el agua, lo cual hará posible separar el solvente de extracción de la fase acuosa durante la centrifugación; la otra es tener la capacidad de extracción del compuesto de interés, y poca solubilidad del solvente de extracción en agua. Hidrocarburos halogenados como clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno, son usualmente seleccionados por su alta densidad.

b) *Agente dispersante*: El solvente dispersante es soluble en el solvente de extracción y miscible en agua, permitiendo así que el solvente de extracción se disperse como partículas finas en la fase acuosa. En este caso, el área superficial entre el solvente de extracción y la muestra es infinitamente mayor e incrementa la eficiencia de la extracción. Los solventes comúnmente usados son metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y tetrahidrofurano.

c) *Volumen de la solución de extracción*: El volumen de este solvente tiene grandes efectos en el factor de recuperación del analito. Con el incremento del solvente de extracción la fase orgánica final obtenida por centrifugación es mayor, resultando en un decremento de la concentración del analito de interés en la fase orgánica. Por lo general, 5-1000  $\mu\text{L}$  es lo ideal.

d) *Volumen del agente dispersante*: El volumen del agente dispersante tiene efecto directo en la formación de la turbidez y la formación de una mayor área de contacto, y por lo tanto en la eficiencia de la extracción. Usualmente se utiliza de 0.5 a 1.5 ml del solvente dispersante.

e) *Efecto de la matriz de la muestra*: La solubilidad del analito de interés y el solvente de extracción en la fase acuosa decrece con la presencia de sales en las muestras biológicas debido al incremento de la fuerza iónica, por tanto se debería favorecer la separación del analito. Sin embargo, puede haber interferentes como el ácido cítrico, la glucosa, el ácido úrico o algunos iones inorgánicos, que reduzcan los porcentajes de recuperación.

### Aplicación de la DLLME en orina

Existen diversas investigaciones que se dedican a cuantificar o determinar la presencia de fármacos en orina debido a que en ella pueden presentarse tal como fueron administrados o los productos del metabolismo. Esto tiene una alta importancia en la química forense. Algunos fármacos se estudian y se enlistan en esta revisión.

a) **Fármacos psicotrópicos**. Los medicamentos psicotrópicos son usados para el tratamiento de desórdenes psiquiátricos en terapia clínica. Estas incluyen antipsicóticos, antidepresivos, estabilizadores de humor y psicoestimulantes. A continuación se muestran una revisión de DLLME para compuestos psicotrópicos [3]:

I) *Flunitrazepam*. Es una droga utilizada para anestesiarse, además de producir amnesia derivado de 1,4-benzodiazepina. Los criminales la utilizan para poder abusar sexualmente de las personas. Melwanki et al (2009) realizaron un estudio para extraer un metabolito en la orina (7-aminoflunitrazepam) mediante DLLME y cuantificar por cromatografía de Líquidos acoplado a espectroscopía de masas. Para realizar la extracción una muestra de orina fue basificada usando amoníaco (0.2 M) y adicionando NaCl (5%). El precipitado se separó por centrifugación. En un tubo con 5 ml de orina se añadió 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol y 250  $\mu\text{l}$  de diclorometano y se realizó la DLLE separando finalmente la fase orgánica y evaporándola y redisolviendo en una fase móvil. Modificando los volúmenes se obtuvieron factores de enriquecimiento de hasta  $154.3 \pm 5.5$  por ciento [4].

II) *Antidepresivos tricíclicos*: Las personas que utilizan antidepresivos tricíclicos (TCAs) tienen efectos secundarios graves como hipertensión, arritmia y algunos casos la muerte. Ito y colaboradores (2011) realizaron

DLLME y derivatización para los TCAs en orina para cuantificar por cromatografía de gases. Los porcentajes de recuperación de TCAs son de 88.2-104.3 % debido a la concentración de los TCAs (0.5-5 ng/mL). El método de extracción consistió en añadir 600 µl de acetonitrilo a una muestra de orina con una concentración definida de prometazina y se centrifugó. El sobrenadante (300 µl) fue puesto en un vial de 1 ml con fondo cónico y diluido con 600 µl de agua. Una cantidad de carbonato de sodio (pH=12.2) fue añadido para ajustar el pH. La mezcla de metanol (150 µl) tetracloruro de carbono (10 µl) y ácido acético anhidro fue inyectada rápidamente a la solución de orina con una jeringa y se mezcló hasta formar una solución turbia [5]. Otro estudio realizado por Xiong y colaboradores (2009) utiliza DLLME para extraer amitriptileno y clomipramina (TCAs) utilizando acetonitrilo como dispersante y tetracloruro de carbono como solvente de extracción. La determinación la realizaron por HPLC. Los porcentajes de extracción para ambos antidepresivos son 96 y 97% [6].

III) *Clozapina y clorpromazina*: Chen et al (2011) desarrollaron un método para determinar clozapina y clorpromazina en orina humana mediante HPLC-UV utilizando DLLME. Estos fármacos son utilizados para el tratamiento de esquizofrenia pero si no se utiliza en dosis adecuadas tiene efectos secundarios graves. Ellos utilizaron diversos solventes de extracción (CCl<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CHCl<sub>3</sub>) y como solventes dispersantes utilizaron acetonitrilo, acetona, etanol metanol e isopropanol. Llegaron a la conclusión de que la mejor combinación fue el CCl<sub>4</sub> y el metanol. Con estos solventes obtuvieron un valor de extracción para la clozapina de 93.3-97.9 % y de clorpromazina de 96.2 a 105 % [7].



Figura 2. Fórmula química de los principales fármacos analizados por DLLME en orina.

**b) Carbamazepina.** Mashayekhi et al (2010) desarrollaron un método de DLLME para determinar carbamazepina que es un fármaco anti epiléptico. La extracción la realizaron añadiendo 5 ml de muestra en un tubo con fondo cónico con una concentración de 100 µg/L de carbamazepina. Una mezcla de etanol (1 mL) y cloroformo (78 µL) fue inyectada rápidamente a la solución de la muestra con una jeringa. La solución turbia se centrifugó y el sedimento fue transferido con una jeringa para determinarla por RP-LC. Los porcentajes de extracción obtenidos variaron desde 78.6 hasta 98.5% [8].

### c) Fármacos de origen vegetal.

I) *Celastrol*: Un método para hacer la DLLME empleando ultrasonido y un líquido iónico como extractante es descrito por Sun (2011) para determinar celastrol. El celastrol es un compuesto presente en una hierba perteneciente a la familia *celastrácea*. 5 mL de muestra se añadieron a un tubo de 10 ml con fondo cónico y se adicionó HCl hasta un pH de 2. Después 1 mL de metanol con 45 µL de [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] fue inyectado rápidamente hasta formar la solución turbia. El tubo fue inmerso en un baño de agua ultrasónico a 200W por un minuto a temperatura ambiente y después a un baño de hielo de 10 min. Después se centrifugó y se tomó la muestra para analizarlo en HPLC. El método obtiene elevados porcentajes de recuperación (93.2- 109.3%) [9].

II) *Efedrinas*. Alshana et al (2012) realizaron una DLLME para efedrina, norefedrina y pseudoefedrina en orina humana y analizándola después por electroforesis capilar. En esta investigación, formaron microemulsiones con el extractante orgánico a un pH de 3.2, además de asistir la dispersión con ultrasonido. El factor de enriquecimiento subió de 140 a 1750. El líquido dispersante fue acetonitrilo y el solvente de extracción fue cloroformo [10].

III) *Alcaloides del opio*. La extracción de morfina, codeína y tebaína ha sido estudiada por Shamsipur et al (2011). Una alícuota de 5 ml de orina diluida que contiene 200 µg/L de morfina, codeína y tebaína fue colocada en un tubo con fondo cónico. Entonces se le inyectaron 1000 µL de acetona con 88 µL de cloroformo a la muestra rápidamente hasta obtener el líquido disperso con una jeringa. Después de centrifugar se tomó una muestra del sedimento y se analizó por HPLC. El proceso se optimizó para obtener un factor de enriquecimiento elevado. El porcentaje de recuperación de los alcaloides varía entre 84.3 y 106 % [11].

**d) Metadona.** Para reducir la dependencia a los alcaloides del opio se utiliza un tratamiento con Metadona. La metadona es un analgésico sintético. Ranjbari y colaboradores (2012) estudiaron un método de preconcentración con DLLME. Para la extracción, una alícuota de muestra que contiene 100 ng/L de metadona fue puesta en un tubo de 15 ml con fondo cónico. La solución fue inyectada con una mezcla de metanol (2.5 ml) y cloroformo (250 µL) utilizando una jeringa hasta formar una solución turbia. El porcentaje de extracción obtenido para orina es de 97 % y un factor de enriquecimiento de 10.03 comparado con la muestra en agua que es de 196.52 [12].

## Conclusiones

La DLLME es un método de extracción reciente, que nos permite extraer compuestos que se encuentran en concentraciones bajas desde µg/L hasta ng/L y que tiene un amplio uso en la química forense y clínica con una posible aplicación a fármacos y drogas desarrollados recientemente. Además de esta ventaja, la DLLME es más simple de trabajar, más rápida, de menor costo, alta

recuperación, elevados factores de enriquecimiento y beneficios ambientales respecto a otros métodos.

## Referencias

- [1] Xiao-Huan, Z., Qiu-Hua, W. U., Zhang, M. Y., Guo-Hong, X. I., & Zhi, W. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chinese J. Anal. Chem.* 2009; 37(2): 161-168.
- [2] Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. R. M., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A.* 2006; 1116(1-2): 1-9.
- [3] Xiong, C., Ruan, J., Cai, Y., & Tang, Y. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 49(2): 572-578.
- [4] Melwanki, M. B., Chen, W. S., Bai, H. Y., Lin, T. Y., & Fuh, M. R. Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta.* (2009; 78(2): 618-622.
- [5] Ito, R., Ushiro, M., Takahashi, Y., Saito, K., Ookubo, T., Iwasaki, Y., & Nakazawa, H. Improvement and validation of the method using dispersive liquid-liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879(31): 3714-3720.
- [6] Xiong, C., Ruan, J., Cai, Y., & Tang, Y. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed.* 2009 ; 49(2): 572-578.
- [7] Chen, J., Xiong, C., Ruan, J., & Su, Z. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of clozapine and chlorpromazine in urine. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 2011; 31: 277-284.
- [8] Mashayekhi, H. A., Abroomand-Azar, P., Saber-Tehrani, M., & Husain, S. W. Rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP-LC. *Chromatographia.* 2010; 71(5-6): 517-521.
- [9] Sun, J. N., Shi, Y. P., & Chen, J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of trace celastrol in urine. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879(30): 3429-3433.
- [10] Alshana, U., Göğür, N. G., & Ertaş, N. Ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of ephedrine in human urine by capillary electrophoresis with direct injection. Comparison with dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Sep. Sci.* 2012; 35(16): 2114-2121.
- [11] Shamsipur, M., & Fattahi, N. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879(28): 2978-2983.
- [12] Ranjbari, E., Golbabanezhad-Azizi, A. A., & Hadjmohammadi, M. R. Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. *Talanta.* 2012; 94: 116-122.