

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

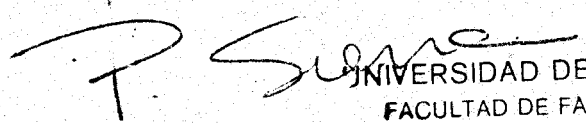
FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE FISIOPATOLOGIA

ESTUDIO DE APLICACION DE LA RESINA AMBERLITA XAD-2 A LA
SEPARACION DE METABOLITOS CANNABICOS EN ORINA

Trabajo presentado por
Pilar Sierra Rosa, para
optar al grado de Licen
ciada en Farmacia

1979



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

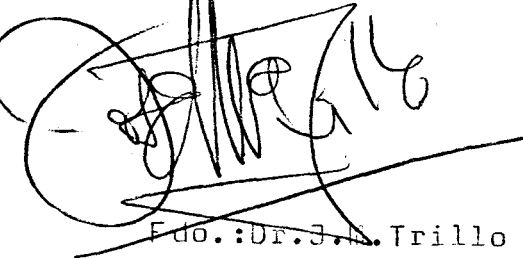
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE FISIOLOGIA

VºBº

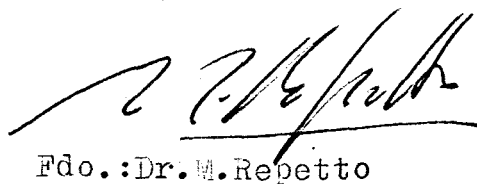
EL CATEDRATICO



Fdo.: Dr. J. L. Trillo

VºBº

EL DIRECTOR



Fdo.: Dr. M. Repetto

Mi agradecimiento al Dr.D.Manuel Repetto, profesor de Fisiopatología y director del Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla, que hizo posible la realización de este trabajo.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Dr.D.Domingo Martínez, co-director de esta tesina, por su constante ayuda y orientación.

Agradezco también a todos los componentes del Instituto Nacional de Toxicología, que facilitaron e hicieron mas -/ agradable mi labor, así como a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

I. INTRODUCCION

INTRODUCCION

Desde la antigüedad se han usado las preparaciones psicoactivas del cannabis en algunas partes del mundo. Sus propiedades tóxicas se descubrieron en la India, probablemente antes de la era cristiana. Estas preparaciones se introdujeron en Europa desde el Norte de Africa, sobre el 1800 (OMS, 1971).

El abuso de la droga y sus consecuencias sociales / hacen que el 8 de Octubre de 1800, Napoleón Bonaparte prohibiera en Egipto su cultivo y consumo (TENA y REPETTO, 1963).

Actualmente ha tenido lugar un rápido incremento del número de personas consumidoras de cannabis, este aumento se da preferentemente en jóvenes, de todos los grupos socioeconómicos. El consumo del cannabis ha llegado a ser, junto con el alcohol una de las toxicomanías más importantes de nuestro tiempo (REPETTO, 1972).

En la lista de sustancias que la legislación (Convenio Internacional sobre drogas heroicas, firmado en Ginebra el 19 de Febrero de 1925) considera como estupefacientes y por tanto su posesión como delito, así como su uso y comercio, se encuentran incluidas las hojas y semillas de la planta Cannabis sativa indica (TENA y REPETTO, 1963)

La identificación de productos cannabicos en mues--

tras biológicas, tanto con fines clínicos como forenses, es uno / de los principales problemas con que se encuentran los investi- gadores, pues aunque se han realizado grandes progresos en el co- nocimiento de la naturaleza química de los cannabionoides, ha- biéndose llegado incluso a la síntesis de alguno de ellos, siem- pre se han tropezado con grandes dificultades a la hora de apli- car a muestras animales o humanas las técnicas útiles para el / estudio de cannabionoides extraídos de plantas (REPETTO, 1972).

El objeto de este trabajo es aplicar la columna de / resina no iónica, Amberlita XAD-2, al estudio de los metabolitos de cannabis excretados en orina. En un intento de mejorar la téc- nica tradicional de extracción directa con solventes orgánicos, realizada por REPETTO y MENENDEZ en 1970, evitando así los pro- blemas que acarrea la formación de emulsión y el manejo de gran- des cantidades de disolvente.

Esta resina se introdujo al análisis toxicológico /- por Fujimoto y Wang en 1970, y fue usada inicialmente para de- tectar el abuso de drogas en orina humana (BASTOS y col., 1972; - MULE, S. y col., 1971; BASTOS y col., 1973; DELBEKE, F. y DEBECKERE , M., 1977) y después en sangre (VYUDILIK, 1975). IBRAHIM y colabo- radores en 1975 y PRANITIS y colaboradores en 1975, desarrolla- ron métodos para aislar drogas de los tejidos. Este método se ha usado también para el análisis de pesticidas .

Estos autores indican que el aislamiento de drogas / de material biológico usando la resina Amberlita XAD-2 es muy /

eficiente, fácil y cuantitativo. El grado de rendimiento en la extracción depende del pH y de la naturaleza del eluyente.

Según BOGUSZ, 1978, los resultados obtenidos, tanto ~~en~~ con el material de experimentación como en casos de envenenamiento, muestran que la extracción con esta resina es un método rápido, simple y eficaz para aislar drogas de la sangre y de los tejidos. Las principales ventajas de la extracción con columnas de Amberlita XAD-2, comparada con la extracción con solventes órgánicos es la similar o mejor recuperación, la limpieza de los / extractos, evitar los problemas de emulsión y utilizar pequeñas cantidades de solventes.

II. PARTE TEORICA

II.1. PRODUCTOS CANNABICOS Y SU METABOLISMO

El grupo de sustancias productoras de la toxicomanía por cannabis se encuentra en la resina de la planta Cannabis sativa L. variedad índica.

Esta es una planta anual, que tiene forma masculina y femenina, alcanzando una altura de 1-2 metros, aunque en óptimas condiciones alcanza hasta los 6 metros. Es, probablemente, indígena de Asia Central (BOUQUET, 1950), pero crece salvaje en otras zonas tropicales, se cultiva con fines comerciales en muchos lugares, antiguamente se cultivaba a menudo por sus fibras, con aparente desconocimiento local de sus propiedades psicoactivas.

Botánicamente se reconoce una sola especie de cannabis (C. sativa L.) pero en el pasado se han aplicado otras denominaciones a la planta encontrada en diferentes partes del mundo, así se le ha llamado C. indica y C. americana (OMS, 1971)

Hay, sin embargo, diferencias significativas entre las cantidades de componentes psicoactivos contenidos entre las distintas variedades de C. sativa L. El contenido está influenciado por las variaciones en el clima, el tiempo, el sol, tiempo de cosecha y condiciones y duración del almacenamiento (DAVIS y col., 1963; LERNER y ZEFFER, 1968; REPETTO, 1972 y VALLE, 1978).

C. sativa L. produce una sustancia resinosa que contiene la mayor parte de los compuestos psicoactivos e intoxicantes. Esta resina se encuentra en las hojas superiores y en las sumidades floridas, es segregada por pelos glandulares que se encuentran en el extremo floral, su función es la de proteger la maduración de las semillas. La resina existe tanto en la planta masculina como en la femenina, la diferencia es que la planta masculina tiene menos hojas y por tanto proporciona menor cantidad de resina. El tallo y las semillas contienen cantidades insignificantes de sustancias psicoactivas (REPETTO, 1972).

Existen numerosas preparaciones del cannabis para el consumo humano, que se conocen con distintos nombres, según el país y la parte de la planta que contenga.

La mezcla de hojas y sumidades floridas se conoce como grifa en Marruecos y en España, bhang en la India, dagga en Sudafrica. A las preparaciones que contienen sumidades floridas pero no hojas se las conoce como ganja en la India y a las preparaciones que contienen solo la resina como hashish, haschish y en la India como charas.

Son frecuentes las adulteraciones con todo tipo de sustancias: serrin, tabaco, especias y diversos tipos de fibras vegetales, etc.. Suele consumirse de forma oral, como infusiones, solo o con mezclas, y en alimentos, también se consume frecuentemente en forma de cigarrillo mezclado con tabaco y solo en pipas.

Se admite que la composición química de la resina, extraída de muestras de planta en distintos grados de desarrollo fitoquímico, sufre una transformación gradual, que va desde ácido cannabidiólico a cannabinol, tetrahidrocannabinoles y finalmente cannabinol.

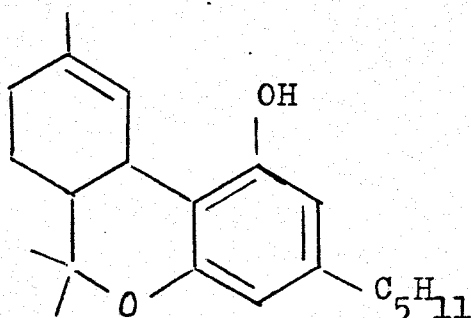
De forma general puede decirse que la estructura química de estos compuestos está constituida por un esquema tricíclico de dibenzopirano. Para su designación y de entre los diferentes sistemas de nomenclatura propuestos por diferentes autores, solamente los sugeridos por Adams y Mechoulam se emplean actualmente en la literatura especializada. En el primero de ellos se sigue la numeración normal usada para los derivados del pirano, mientras que la segunda escoge sobre una base biogenética, la nomenclatura propia de los derivados terpénicos (REPETTO, 1972). Como en algunos compuestos canábicos no existe el anillo del pirano, la nomenclatura propuesta por Adams presenta ciertas limitaciones, por lo que emplearemos la nomenclatura terpénica.

Los constituyentes químicos de C. sativa L. son muy complejos, se han aislado 37 cannabionoides de la planta o de sus preparaciones, en este número no están incluidos los metabolitos ni los productos formados por pirólisis durante la combustión del cigarrillo, por otro lado se conoce la existencia de dímeros, trímeros y polímeros en la fracción polimérica que queda como residuo después de la extracción de hashish o de marihuana con varios solventes. Por analogía con otros productos naturales

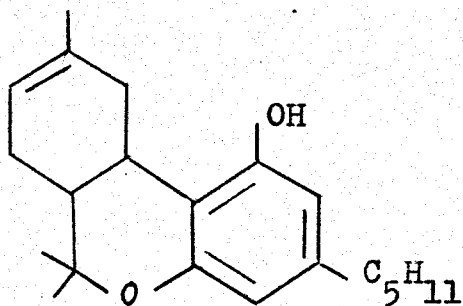
relacionados, como taninos, los cannabinoides que poseen grupos / fenólicos y carboxílicos, se piensa que forman estructuras polí-
méricas.

La planta contiene además ciertos constituyentes se
cundarios: triterpenos y esteróides, carbohidratos, fenóles, ácidos
carboxílicos, alcanos, monoterpenos, alcaloides, aminas y otras sus
tancias que no se han identificado. Aunque es dudoso que estos /
compuestos tengan influencia en la actividad de los cannabinoi-
des, sin embargo algunas de las actividades farmacológicas del Δ^1
cannabis no pueden explicarse por la actividad de los cannabi-
noides (solos o juntos), por lo que habría que considerar la ac-
tividad de estas sustancias adicionales (MECHOULAN y col. 1976).

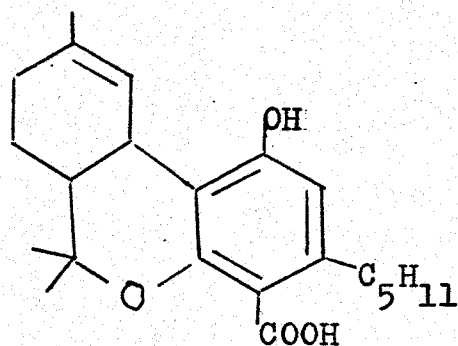
Los cinco cannabinoides más importantes a los que /
corresponde en gran parte la potencia biológica del cannabis --
son Δ^1 -THC, $\Delta^{1(6)}$ -THC, Δ^1 -ATHC, CBD y CBN.



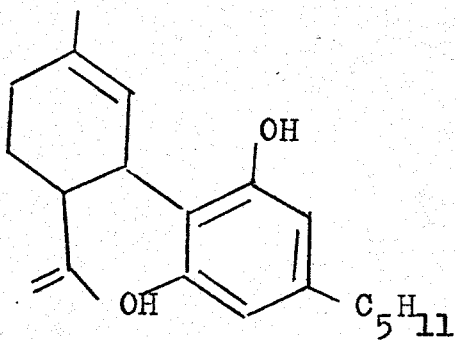
Δ^1 -tetrahidrocannabinol



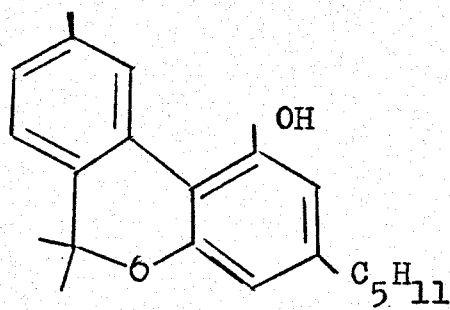
$\Delta^{1(6)}$ -tetrahydrocannabinol



ácido Δ^1 -tetrahydrocannabinólico



Cannabidiol



Cannabinol

El Δ^1 -THC y el $\Delta^{1(6)}$ -THC son psicoactivos cuando se ingieren de forma oral o cuando se fuman, el ácido tetrahidro cannabínico no es activo por vía oral, pero cuando se fuma se convierte parcialmente en Δ^1 o $\Delta^{1(6)}$ -THC (MECHOULAN, 1976). / El cannabinol y el cannabidiol tienen una actividad síquica muy pequeña, pero están presentes en gran cantidad, parece que esta / cantidad está en relación inversa con la actividad de Δ^1 y / $\Delta^{1(6)}$ -THC. El Δ^1 -THC es el responsable de la mayoría de los efectos, tanto en el hombre como en los animales. (MECHOULAN y GAONI, 1966; REPETTO, 1972; SCHOOLAR, 1976).

Ensayando con cannabinoides sintéticos se ha comprobado que la actividad del Δ^1 -THC está ligada a la presencia y naturaleza de una cadena lateral en posición 5', que en estos / cannabinoides naturales es una agrupación n-pentilo. Cuando se / prepara un Δ^1 -THC en el que la cadena lateral es una agrupa / ción dimetilheptil, la actividad farmacológica es cinco veces ma / yor y mas prolongada, pues en lugar de unas horas, persiste duran / te varios días.

La sustitución en el Δ^1 -THC de un hidrógeno aromáti / co por un grupo metilo disminuye la actividad, en tanto que gru / pos hidroxilos o carbometoxilos la eliminan.

El hecho de que la acetilación del hidroxilo libre / reduzca aparentemente la actividad del Δ^1 -THC parece indicar / que esta se halla también relacionada con la presencia del radi / cal fenólico libre. Aún más cuando Pars y colaboradores lo este / rificaron con el ácido 4-dimetil-amino-butírico obtuvieron un /

depresor del sistema nervioso central.

Para el estudio de las rutas metabólicas de estas / sustancias ha resultado de gran utilidad el empleo de sustan- / cias marcadas (cannabinoides marcados), preparados por técnicas / biogénicas tal como el cultivo de plantas en atmosfera de CO₂- / con carbono 14 o mediante la síntesis química.

Tras la administración intravenosa de $\Delta^{1(6)}$ -THC / específicamente tritiado en posición C-2, se encontró en la ori- / na una sustancia marcada, parcialmente extraible en eter, que ha- / resultado ser el 7-hidroxi- $\Delta^{1(6)}$ -THC. Un metabolito similar - / el 7-hidroxi- Δ^1 -THC, junto con otro inactivo el 6,7-dihidroxi- / - Δ^1 -THC se obtuvo incubando Δ^1 -THC con homogenizado hepáti- / co de conejo. Esto indica que la actividad farmacológica del Δ^1 - / -THC requiere su transformación previa en 7-hidroxi derivado, lo / posee un extraordinario interés, tanto desde el punto de vista / bioquímico como clínico (REPETTO, 1972).

Muchos de los problemas que han presentado los can- / nabinoides para su detección en fluidos orgánicos, se deben a 1/ / las propiedades fisicoquímicas de estos, son muy solubles en lí- / pidos, por lo que se distribuyen facilmente por todos los teji- / dos, como lo demostraron Agurrell y colaboradores.

Después de la admistaación intravenosa de Δ^1 -THC, / se distribuye rapidamente a los tejidos, donde queda retenido / temporalmente, debido a esto tiene lugar un fuerte descenso de /

los niveles de Δ^1 -THC en sangre en un breve periodo de tiempo .Efectos similares se han observado después de la inhalación de Δ^1 -THC.

Cuando el Δ^1 -THC se administra por via oral, la / concentración en sangre alcanza un máximo y luego desciende rápidamente, los niveles de Δ^1 -THC se vuelven muy bajos en relación con los niveles de metabolitos, probablemente secundarios./ como resultado de su alta concentración en los tejidos y de su liposolubilidad, el Δ^1 -THC tiene un gran volumen de distribución.

La gran combinación dentro de los tejidos y su gran volumen de distribución, son los responsables de los bajos niveles en sangre de Δ^1 -THC y sus metabolitos, lo que ha ocasionado grandes dificultades para desarrollar un método de rutina para la detección de cannabinoides en sangre.

El Δ^1 -THC marcado persiste en el plasma durante / unas 72 horas, pero en tan bajas concentraciones que usando la / técnica de cromatografía de gas-espectroscopia de masas, el Δ^1 -THC y sus metabolitos solo pueden detectarse a las 4-6 horas de su administración.

Desde que se identificaron los principios activos de la marihuana, los investigadores dedicaron sus esfuerzos a determinar de forma cualitativa y cuantitativa los metabolitos del / Δ^1 -THC y su grado de excrección urinaria. Un impedimento para el desarrollo de un método de detección de cannabinoides en /

fluidos orgánicos, es que el Δ^1 -THC no se excreta en orina sin metabolizar. Además solo una pequeña parte del Δ^1 -THC administrado se excreta en orina, la mayor parte se excreta en heces, en el hombre solo el 15-25% del administrado se excreta en orina, el resto se excreta en heces, con lo que el desarrollo de un método para la detección rutinaria de cannabinoides se encuentra con el problema que supone la recogida de muestras de heces. (LEMBERGER, 1976; OMS, 1974)

El metabolismo de los cannabinoides es bastante complejo, tanto en el hombre como en los animales. Este metabolismo tiene lugar principalmente en el hígado, pero se han encontrado otros lugares que son metabólicamente activos, como son pulmón, cerebro y bazo.

La cadena lateral del cannabinoide puede ser oxidada a un alcohol alílico y posteriormente esta oxidación conduce a la formación de ácidos. También pueden introducirse grupos -OH adicionales en varias posiciones de la molécula. Así se producen fundamentalmente 7-hidroxi derivados, además de 6-hidroxi; 11-hidroxi; 1,2-epoxi; 6-ceto y 7-carboxi derivados.

La formación de estos y otros metabolitos ha sido probada por experimentación in vitro con homogenizado hepático, pero se ha observado que al trabajar con tejido pulmonar, además de los citados, se producen dos metabolitos que no se forman en el hígado.

El metabolito monohidroxilado es tan activo como el

Δ^1 -THC en su comportamiento y farmacológicamente, sin embargo los compuestos dihidroxilados son inactivos.

Los metabolitos son mas polares que los cannabinoides originales, Δ^1 -THC se transforma en un compuesto ácido muy polar, el 7-carboxi-2"-hidroxi- Δ^1 -THC.

Los metabolitos no se excretan en su forma hidroxilada libres por la orina, sino en forma conjugada, como glucuronidos y sulfatos, pudiendose formar también amidas de aminoácidos. (AGURRELL, 1976; LEMBERGER, 1976; MECHOULAN, 1976; REPEPPO, 1974; SCHOLLAR, 1976).

Los compuestos de conjugación formados pueden eliminarse por la orina, por la bilis o por ambas vias (OMS, 1970). La mayor parte de los metabolitos se excretan por la bilis y llegan al tracto intestinal donde se reabsorben, estableciendose una circulación enterohepática que retrasa su eliminación, este hecho puede explicar el largo tiempo de permanencia de los metabolitos en el organismo. Según NAHAS, 1977, los productos extraídos de la marihuana tienen un periodo de acumulación de 7 dias, dicho de otra forma, después de una semana, solo el 50% de la sustancia se ha eliminado. El organismo de un individuo que consume marihuana más de una vez por semana, no logra estar libre de la droga. Esta acumulación seria debida en gran parte a su gran solubilidad en lípidos, que le permite penetrar en todas las partes del cuerpo y acumularse en los tejidos, y, por otra parte, a la lentitud de su eliminación.

El análisis de los metabolitos del cannabis, tanto en orina como en materiales biológicos, ha presentado hasta fechas recientes bastantes dificultades, estas dificultades, según LEMBERGER, 1976, serian debidas a:

- 1) La baja dosis de droga necesaria para producir los efectos en el hombre.
- 2) Los bajos niveles de droga en plasma después de la administración.
- 3) El gran volumen de distribución aparente de esta droga, debido a su alto grado de retención en los tejidos.
- 4) Su excrección predominante en las heces, generalmente inaccesibles para el ensayo.
- 5) El hecho de que un metabolito ácido del Δ^1 -THC se encuentre en la orina a mayor concentración durante las primeras horas / después de su administración.
- 6) Finalmente y de gran importancia es la gran variedad en los / constituyentes químicos de las diferentes especies de cannabis, lo que hace que el método a desarrollar deba ser específico para el THC y/o sus metabolitos in vivo.

Durante muchos años se ha venido afirmando la imposibilidad de conseguir la identificación de los cannabinoides / en sangre y visceras. Sin embargo en 1967, el brasileño da Silva logró detectar algunos cannabinoides por medio de la cromatografía en capa fina, en saliva (veinte minutos después de haber fumado), en sangre (a las 3 horas el máximo y solo trazas a las 4 horas) y en orina (a las 6 horas). Por su parte Heyndrickx consiguió identificar, también por cromatografía en capa fina, cannabinoles en la orina de un muerto por intoxicación a consecuencia de

haber fumado la planta, sin embargo no logró identificar cannabinoides en vísceras. También Andersen demostró la presencia de c/compuestos cannábicos en orina, por cromatografía en capa fina, la misma técnica fue utilizada por Fish y Wilson para el estu--dio de constituyentes cannábicos presentes en la materia parti--culada del humo. También en capa fina detectaron Stone y Stevens y Robinson, compuestos cannábicos en boca y dedos de fumadores, pero no lograron resultados al tratar de identificar los produetos por cromatografía gaseosa.

En 1970. REPETTO y colaboradores consiguieron la i--dentificación por cromatografía gaseosa de los constituyentes / del humo de cigarrillos de cannabis, y de los residuos de orina, y en 1972 la identificación de los productos condensados en los dedos de fumadores y en la sangre de un fumador, extraída duran--te una intoxicación aguda. Y en 1973 la identificación de canna--binoides en víscera. El procedimiento seguido fue, el fracciona--miento de la muestra, por extracción directa con disolventes or--gánicos, en primer lugar se extrajo con hexano, obteniéndose una--fracción en la que se encontraban los compuestos liposolubles, --es decir los cannabinoides naturales, no transformados, posterior--mente se acidificó la muestra y se extrajo con eter etílico, con lo que se consiguieron extrae los metabolitos polares con caracter ácido. La identificación se realizó por cromatografía gaseo--sa .

La cuantificación de los metabolitos se ha venido haciendo por variaciones en la técnica de cromatografía de liqui--do-gas. TEABE y colaboradores en 1977 desarrollaron una técnica

para la detección de cannabinoides en orina mediante el radio--
inmunoensayo.

Agurell y colaboradores ,han determinado por fragmen-
tografía de masas, las concentraciones plasmáticas de THC. El ele-
vado coste del análisis de cada muestra impide aplicar sistema-
ticamente este método.

Friedrich-Fiechtl y colaboradores, afirman haber ene-
contrado THC en la saliva al menos durante las dos horas sigui-
entes al momento de fumar cannabis, basandose en la fluorescenci-
a de su derivado dansílico (OMS, 1974).

La detección y cuantificación de los metabolitos, /
también se ha hecho mediante la obtención del derivado trimetil-
sililado y espectrometro de masas (Cooperación entre Japón y l/
los Estados Unidos, 1973).

II.2. RESINA AMBERLITA XAD-2

La resina no iónica Amberlita XAD-2, es un copolímero del estireno, con partículas de un tamaño de malla de 20-50./ Debido a la gran superficie que presenta y a su carácter no iónico, tiene la propiedad de adsorber algunos compuestos solubles en agua, principalmente por fuerzas de Van der Waals, enlaces hidrofóbicos e interacciones dipolo-dipolo. Durante el proceso de adsorción, la porción hidrofóbica de la molécula se encuentra en contacto con la superficie de la resina, mientras que la porción hidrofílica se encuentra orientada en la fase acuosa (STOLMAN y PRANITIS, 1977; BREITER, 1976; PRANITIS y col., 1974)

La recuperación de la sustancia adsorbida se realiza sin dificultad por elución con solventes orgánicos selectivos. La resina puede regenerarse mediante una adecuada rehidratación y se puede utilizar repetidamente.

Esta resina se usó inicialmente para detectar los abusos de drogas en orina, Fujimoto y Wang fueron uno de los primeros investigadores que descubrieron un método sencillo para la extracción de analgésicos narcóticos en orina, con Amberlita XAD-2.

El método consistía en pasar las muestras de orina por la columna de resina, en la cual tendrá lugar la adsorción de la droga y posteriormente la elución de la droga de la resina con metanol. El solvente orgánico se evapora y el residuo se analiza mediante cromatografía en capa fina.

Sus primeros trabajos mostraron que los pigmentos / de la orina se adsorben también sobre la resina y se eluyen en la misma fracción que la droga y sus metabolitos. De este modo / el pico en la intensidad de color corresponde a la fracción que contenga la mayor parte de la droga y sus metabolitos.

Wislacki y colaboradores, utilizaron la resina Amberlita XAD-2 para la selección de drogas de la orina, con un paso adicional , para la eliminación de pigmentos de la orina del extracto. Este paso consistía en un lavado de la resina en la que está adsorbida la orina con una solución de etanol al 15%. Según ellos este lavado eliminaría la mayor parte de los pigmentos de la orina, que ocasionalmente podrían identificarse en la cromatografía en capa fina como droga. Si bien este lavado con etanol / reduce la cantidad de droga recuperada, estos investigadores piensan que la mejora de la sensibilidad y selectividad de la / cromatografía en capa fina lo compensa (STOLMAN, 1977).

En los métodos anteriores se eluyen todos los tipos de droga (ácida, alcalina y neutra) en la misma fracción, BASTOS y colaboradores en 1972 modificaron la técnica, haciendo una elución diferencial de la columna, en ella la droga neutra, ácida y alcalina se eluyen en distintas fracciones (PRANITIS, 1975).

Esta resina se ha usado también para aislar drogas de la sangre (VYUDILIK, 1975) y de los tejidos (PRANITIS y col., 1974), así como de todo tipo de fluido biológico (BREITER y col., 1976).

También se ha usado para la determinación de trazas de herbicidas en agua(DECLÉIRE,1977), así como para la adsorción de pesticidas clorados de agua de río(RICHARD y col.,1974).

PARTE EXPERIMENTAL

III.1.METODOS GENERALES

III.1.1.Preparación de la columna

Una porción de resina Amberlita XAD-2, se suspendió en agua destilada. Se utilizó una columna de vidrio con tapón de lana de vidrio en el fondo y se vertió en ella unos 12 gramos / de resina escurrida, ocupando una altura de 10cm, la columna se / mantiene con agua destilada.

Antes de su uso, la columna se lavó con 100 cc de metanol, conteniendo un 1% de ClH 1N, y a continuación se pasó agua destilada, hasta que los lavados fueron neutros. Este lavado se / repitió después de cada utilización de la columna.

III.1.2.Procedimiento de extracción

Se utilizaron de 20 a 50 cc de orina, según la determinación a realizar, se se pasaron a través de la columna, la / muestra se introduce en la columna poco a poco y goteando, hasta que el total de la muestra queda adsorbida en la columna.

Se eluye a continuación con 100 cc de hexano, en 4 / fracciones de 25 cc cada una, los eluatos reunidos se desecan / con sulfato sódico anhidro y se evaporan en rotavapor, obtenien-

se el residuo del extracto hexánico, que debe contener los productos liposolubles (cannabinoides naturales).

Se acidifica la columna con 50 cc de ClH 0,1N y se eluye con 100 cc de eter etílico, en 4 fracciones de 25 cc cada una, se deseca con sulfato sódico anhidro y se evapora en rotavapor, obteniéndose el residuo del extracto etéreo ácido, que debe contener los metabolitos polares con caracter ácido.

A continuación se hace pasar por la columna, corriente de anoniaco, hasta coloración rosa de una solución de fenoltaleina. Se eluye con 100 cc de eter etílico, en 4 fracciones, se deseca con sulfato sodico anhidro y se evapora en rotavapor, obteniéndose el residuo de extracto etéreo básico, que debe contener los metabolitos polares con caracter básico.

III.1.3. Hidrólisis de las muestras

La hidrólisis de las muestras se realiza para incrementar el rendimiento de la recuperación, mediante la hidrólisis de los conjugados .

III.1.3.1. Hidrólisis enzimática

40 cc de orina cannabica, se llevan a pH 4,8 con 5cc de buffer de acetato. Se añaden 0,1 cc del enzima beta-glucuronidasa/aryl sulfatasa y se incuba a 37°C durante una noche.

Se concentra la muestra en rotavapor a presión reducida y a 37°C de temperatura. Seguidamente se obtienen los extractos según el procedimiento general.

III.1.3.2. Hidrólisis ácida

40 cc de orina cannabica se someten a hidrólisis ácida con ClH 0,1N, manteniendola a 40°C durante 30 minutos. Se obtienen los extractos según el procedimiento general.

III.1.4. Análisis de los extractos

El análisis de los extractos se realizó por los métodos siguientes:

- Cromatografía en capa fina
- Cromatografía en papel
- Cromatografía gaseosa
- Espectrofotometria ultravioleta

Todos ellos se utilizaron como métodos de identificación, para la detección cualitativa de los metabolitos cannabinoides en los extractos.

III.1.4.1. Cromatografía en capa fina

Se realizó en placas de Silicagel G, las placas empleadas fueron de 20x5 cm y 20x10 cm y 0,25 mm de espesor.

Como líquidos de desarrollo eluyentes y para obtener una mejor separación de las manchas, se emplearon:

Benceno:hexano:dietilamina (75:15:1,5)

Etanol absoluto

Benceno:etanol (95:5)

Ciclohexano

Benceno:cloroformo (4:1)

Benceno:cloroformo (2:1)

Benceno:cloroformo (1:1)

Benceno:cloroformo (3:7)

Benceno:etanol (4:1)

Ciclohexano:n-propanol:acetato de etilo:amoníaco

Como reveladores se utilizaron:

-Sal de azul sólido B:Clorato de 3,3'dimetoxi difenil 4,4'di-diazonio, según la bibliografía es el reactivo de elección para los cannabinoides. Se disuelven 15 mg de este reactivo en 20 cc de NaOH 0,1N, debe prepararse inmediatamente antes de ser usado.

-Reactivo de Duquenois: 1 g de vainillina en 50 cc de etanol (95 %) y 10 gotas de acetaldehído. Se pulveriza la placa y una vez seca se pulveriza con ClH concentrado.

-p-nitroanilina diazotada: Se prepara la solución de a) p-nitroanilina 0,3% en ClH 8% y b) nitrito de sodio al 5% en agua. Se mezclan ambas soluciones.

-Reacción de Gibbs:

1) Solución acuosa de acetato de sodio al 5%

2) N 2,6, triclora-p-benzoquimeimina en solución etanólica saturada.

Se vaporiza con 1, se deja secar y se vaporiza con 2.

Estos reveladores son todos reactivos típicos de fenoles, todos dieron las mismas reacciones, con mayor o menor intensidad.

III.1.4.2. Cromatografía en papel

Se realizó la cromatografía en papel con desarrollo horizontal. Como líquido de desarrollo se utilizó butanol:acético:agua (4:1:5) y butanol:piridina:agua (4:1:5).

Como reveladores se utilizaron los mismos que en la cromatografía en capa fina.

III.1.4.3. Cromatografía gaseosa

Se empleó como método de identificación y se preveía su empleo para la cuantificación si se lograba una separación.

El aparato utilizado fue PERKIN-ELMER F-17.

Se utilizó una columna de vidrio rellena de FS 3% sobre Chromosorb GAW-DMCS 80/100.

Las temperaturas fueron: del horno 200°C, del bloque de inyección 230°C y del detector F.I. 230°C.

El gas portador fue N_2 ,3 Kp/cm² y el volumen de inyección de 5 microlitros.

III.I.4.4. Espectrofotometria ultravioleta

Los espectros de absorción en la región de 230-340 $m\mu$ se obtuvieron con un espectrofotometro ultravioleta-visible HITACHI PERKIN ELMER 124.

El residuo del extracto etéreo y hexánico se disolvió en etanol al 90% y se filtró. Esta solución se diluye en el mismo disolvente.

III.2. PRODUCTOS COMERCIALES

- Hexano (MERCK)
- Hexano nanogrado (MALLINCKRODT)
- Eter etílico(MERCK, PANREAC)
- Sulfato sódico (PANREAC)
- Benceno(CARLO ERBA)
- Cloroformo (PANREAC)
- Etanol(PANREAC)
- Metanol(PANREAC)
- Hidróxido sódico(PANREAC)
- Acido clorhídrico (PANREAC)
- Ciclohexano(PANREAC)
- Dietilamina(MERCK)
- Sal de azul sólido B (MERCK)
- Vainillina(MERCK)
- Acetaldehido (MERCK)
- N,2,6-tricloro-p-benzoquineimina (EASTMAN)
- Amberlita KAD-2 (MALLINCKRODT)
- Florisil (FISCHER)
- β glucuronidasa/aryl sulfatasa (MERCK)

III.3. MUESTRAS

La muestra empleada para la obtención del extracto de la planta es polvo prensado, no es hashish, puesto que deja un gran porcentaje de residuo vegetal al disolverlo en eter de petroleo o en cualquier otro disolvente orgánico, tampoco es grifa, puesto que no es la picadura de la planta. Es un polvo prensado, quizás, en algunos casos, enriquecido con resina.

La muestra problema, que la llamaremos orina cannabica, es orina suministrada por fumador de cannabis, obtenida en un periodo de tiempo comprendido en las 6 horas siguientes después de haber fumado o bien la orina de animal inyectado con extracto de planta.

La orina blanco es orina de no consumidor de cannabis.

El patrón utilizado es un extracto de polvo prensado en hexano, hay que hacer constar la no uniformidad de estos patrones, debido a la diversidad de procedencia de las muestras de polvo prensado.

III.4. DETERMINACIONES CON EXTRACTO DE PLANTA

Se ha utilizado la resina Amberlita XAD-2 para fraccionar un extracto de planta y observar la separación de los / cannabinoides.

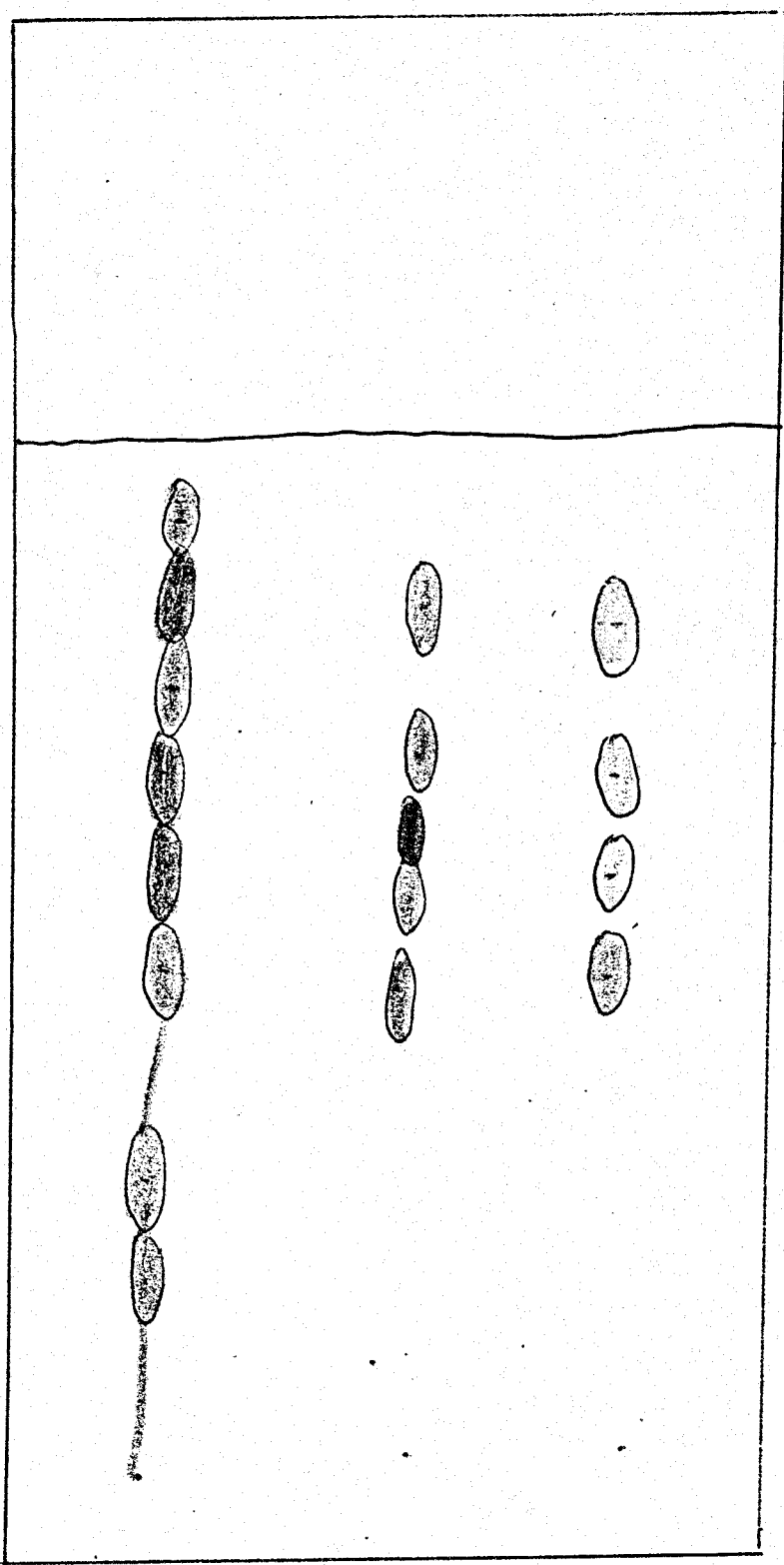
Unos mg de polvo prensado se disuelven en etanol absoluto, la disolución se filtra y se pasa a través de la columna, preparada con agua destilada.

Se eluye la columna con 100 cc de eter de petroleo, para separar los cannabinoides no polares, esta fracción se deseca y se evapora; obtenemos el extracto en eter de petroleo.

Seguidamente se acidifica la columna, para facilitar la extracción de cannabinoides algo mas polares con eter etílico, se eluye la columna con 100 cc de eter etílico, se deseca y / se evapora, obteniendose el extracto etéreo.

Ambos extractos se analizan por cromatografia en capa fina, frente a patrón; el desarrollo se hace en benceno:hexana:dietilamina, y el revelado con solución de sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 1)

Figure 1



Rf patròn:

- 0,46
- 0,58
- 0,63
- 0,69
- 0,84

Rf eter de pe-

troleo: 0,15

- 0,26
- 0,56
- 0,65
- 0,75
- 0,83
- 0,89

Rf eter etílico

- 0,47
- 0,6
- 0,66
- 0,84

eter de petroleo patròn eter etílico

III.5. DETERMINACIONES CON ORINA

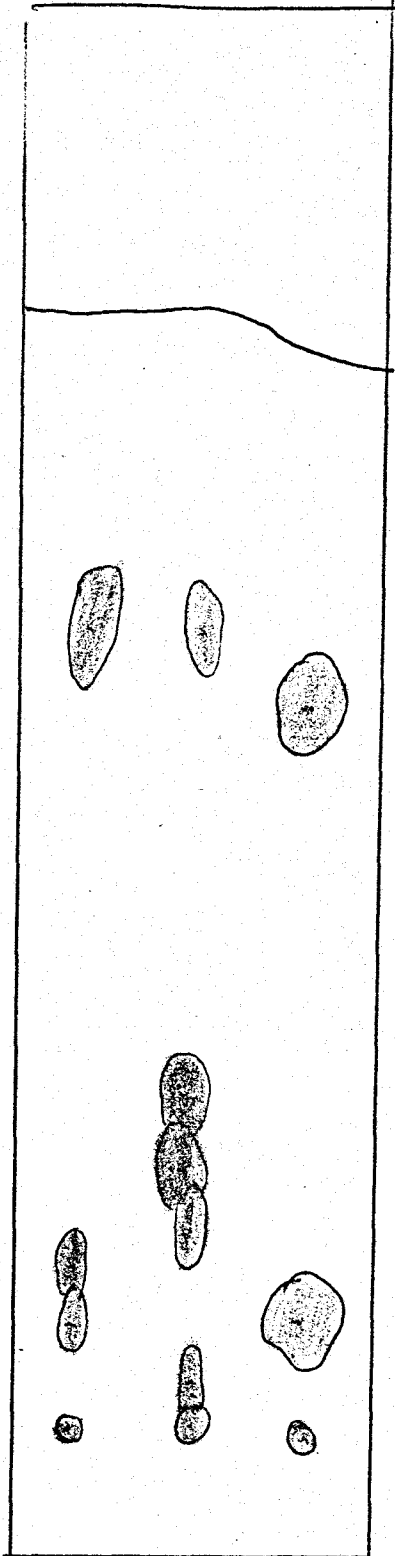
1ª DETERMINACION

50 cc de orina cannabica 1ª, se hacen pasar por la columna de Amberlita XAD-2 y se eluye con hexano, se deseca y se evapora, obteniendose el residuo del extracto hexánico:H(1,1).

Se acidifica la columna y se eluye con 100 cc de eter etílico, se deseca y se evapora, obteniendose el residuo del extracto etéreo ácido:EE(1,1).

Se analizan los extractos por cromatografia en capa fina, con dos desarrollos en benceno:hexano:dietilamina; se revela con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 2)

Figure 2



Rf H(1,1)=0,724

0,165

0,096

Rf EE(1,1)=0,107

0,685

Rf patrδn=0,069

0,194

0,263

0,319

0,743

H(1,1) patrδn EE(1,1)

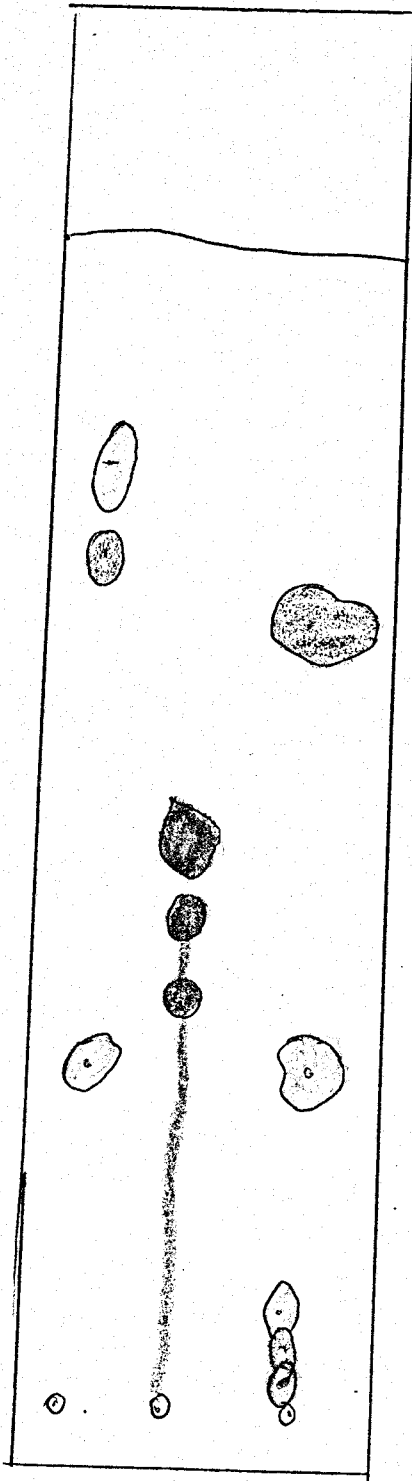
8ª DETERMINACION

40 cc de orina blanco se hacen pasar a través de la columna de Amberlita XAD-2, se eluye con hexano, 100 cc, se deseca y se evapora, obteniéndose el residuo del extracto hexánico: Hb.

Se acidifica la columna, con 50 cc de ClH 0,1N, y se eluye con 100 cc de eter etílico, se deseca el extracto y se evapora, obteniéndose el residuo del extracto etéreo ácido: EE B.

Se analizan los extractos por cromatografía en capa fina con desarrollo en benceno:hexano:dietilamina y revelado / con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N, (Figura 3)

Figura 3



Rf Hb: 0,29

0,67

0,74

Rf EE b: 0,03

0,06

0,1

0,64

0,30

Rf patrón: 0,48

0,42

0,35

Hb patrón EE b

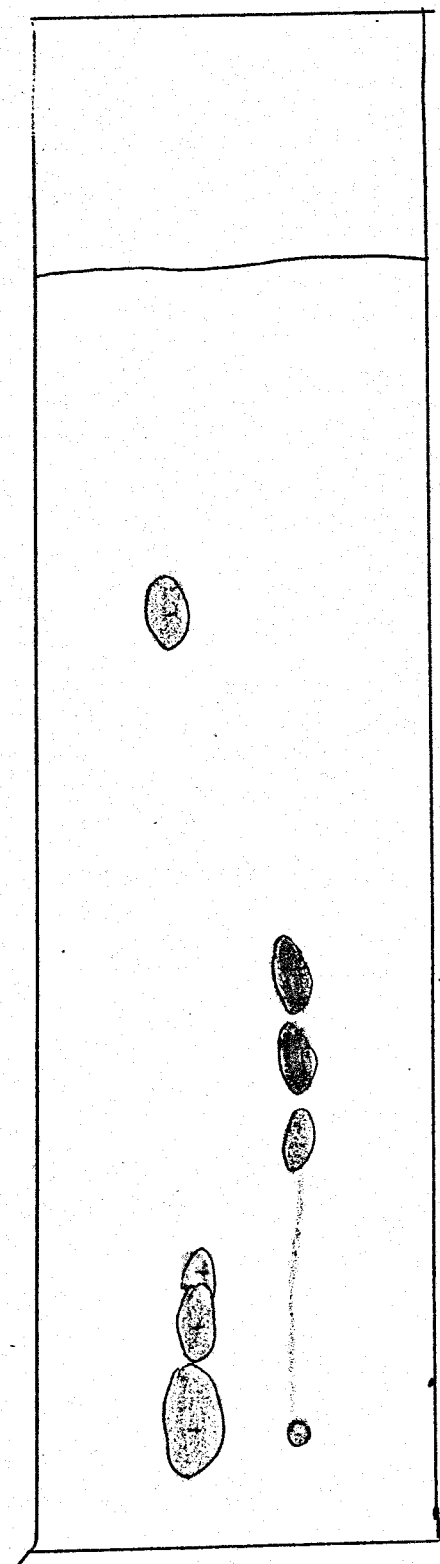
11ª DETERMINACION

Una muestra de orina cannabica 4ª se somete a hidrólisis enzimática: 40 cc de orina se le añaden 5 cc de buffer de acetato a pH 4,8 y 0,1 cc de betaglucuronidasa/amil sulfatasa, incubando a 37°C durante una noche. Se concentra a rotavapor a presión reducida y a 37°C .

Este concentrado se acidula, pasando a continuación por la columna de Amberlita XAD-2. Se eluye con 100 cc de eter etílico, el eluato se deseca con sulfato sódico anhidro y se evapora en rotavapor, obteniéndose el residuo del extracto etére o ácido: EE₄.

El extracto se cromatografía en capa fina, frente a patrón, con desarrollo en benceno:hexano:dietilamina y revelado con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 4)

Figura 4



Rf EE₄ = 0,70
0,13
0,08

Rf patrón = 0,39
0,32
0,24

EE₄

patrón

13ª DETERMINACION

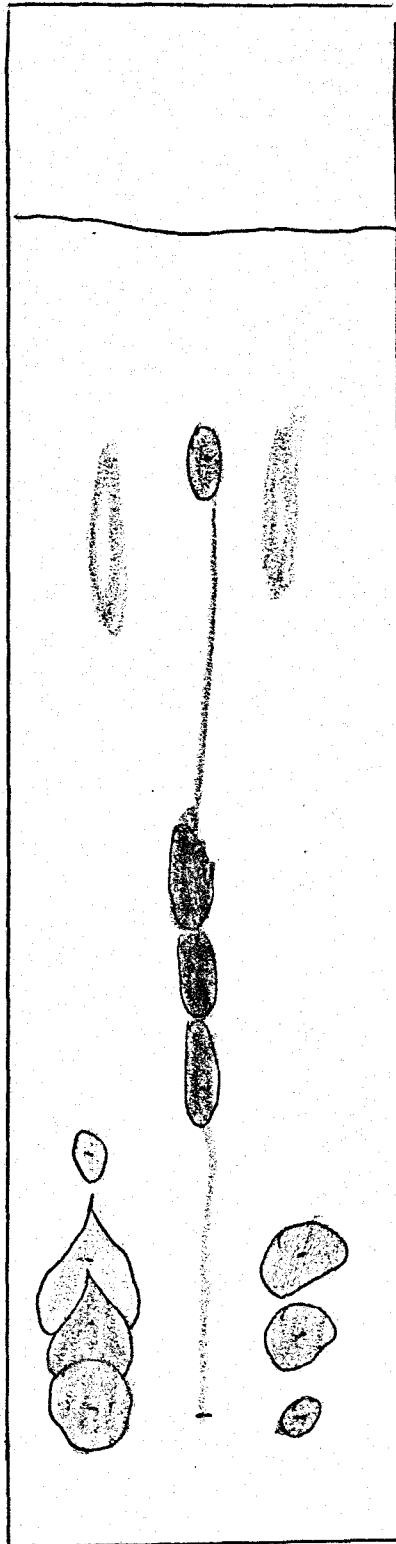
Una muestra de orina cannabica 5ª se somete a hidrólisis enzimática: 40 cc de orina se someten a hidrólisis enzimática, seguidamente se concentra a presión reducida en rotavapor hasta 10 cc aproximadamente y se acidula con ClH 1N.

Se hace pasar por la columna de Amberlita XAD-2, y / se eluye con 100 cc de eter etílico, se deseca y se evapora el / extracto, obteniendose el residuo del extracto etéreo ácido: EE-(2,5)

Se alcaliniza la columna, haciendo pasar corriente / de amoníaco hasta coloración de una solución de fenolftaleina y se eluye con eter etílico, se deseca y se evapora, obteniendose / el residuo del extracto etéreo básico : EE(3,5).

Ambos extractos se analizan por cromatografía en ca pa fina, frente a patrón de cannabis, el desarrollo se hace en / benceno:hexano:dietilamina y el revelado con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 5)

Figura 5



Rf EE(2,5) = 0,07
0,12
0,21

Rf patrón = 0,29
0,36
0,44
0,80

Rf EE(3,5) = 0,06
0,12

EE(2,5) patrón EE(3,5)

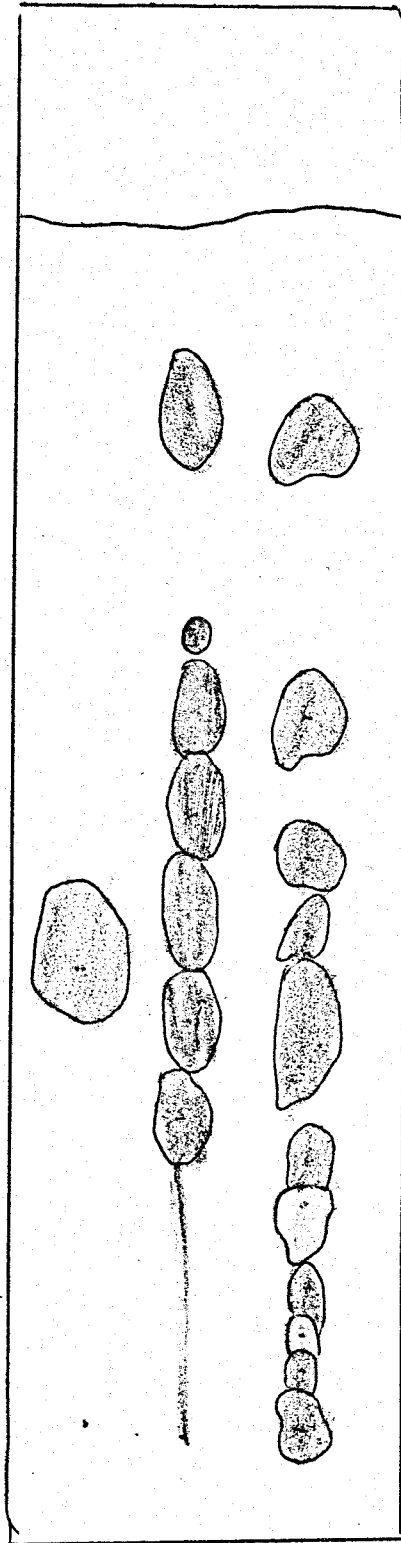
14ª DETERMINACION

40 cc de orina cannabica 5ª, se pasan por la columna de Amberlita XAD-2, se eluyen con 100 cc de hexano, el extracto / obtenido se deseca y se evapora, obteniéndose el residuo del extracto hexánico: H(2,5).

Se acidifica la columna con 50 cc de ClH 0,1N y se eluye con eter etílico, se deseca y se evapora, obteniéndose el residuo del extracto etéreo ácido: EE(4,5).

Se realiza con ambos extractos una cromatografía en-capa fina, frente a patrón de cannabis, con doble desarrollo en / benceno:hexano:dietilamina, revelándose con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 6).

Figura 6



$$Rf H_{(2,5)} = 0,35$$

$$Rf patrón = 0,25$$

$$0,33$$

$$0,43$$

$$0,51$$

$$0,59$$

$$0,64$$

$$0,84$$

$$Rf EE_{(4,5)} = 0,04$$

$$0,05$$

$$0,09$$

$$0,16$$

$$0,21$$

$$0,33$$

$$0,39$$

$$0,44$$

$$0,59$$

$$0,77$$

$H_{(2,5)}$ patrón $EE_{(4,5)}$

15ª DETERMINACION

Una muestra de orina cannabica 5ª y otra de orina / blanco se someten a hidrólisis enzimática y se concentran hasta unos 10 cc.

Se hace pasar por la columna de Amberlita XAD-2, el / hidrolizado procedente de la muestra de orina cannabica 5ª, previamente acidificado, se eluye con 100 cc de eter etílico, se deseca el extracto y se evapora, obteniendose el residuo del extracto etéreo ácido: EE Ac.

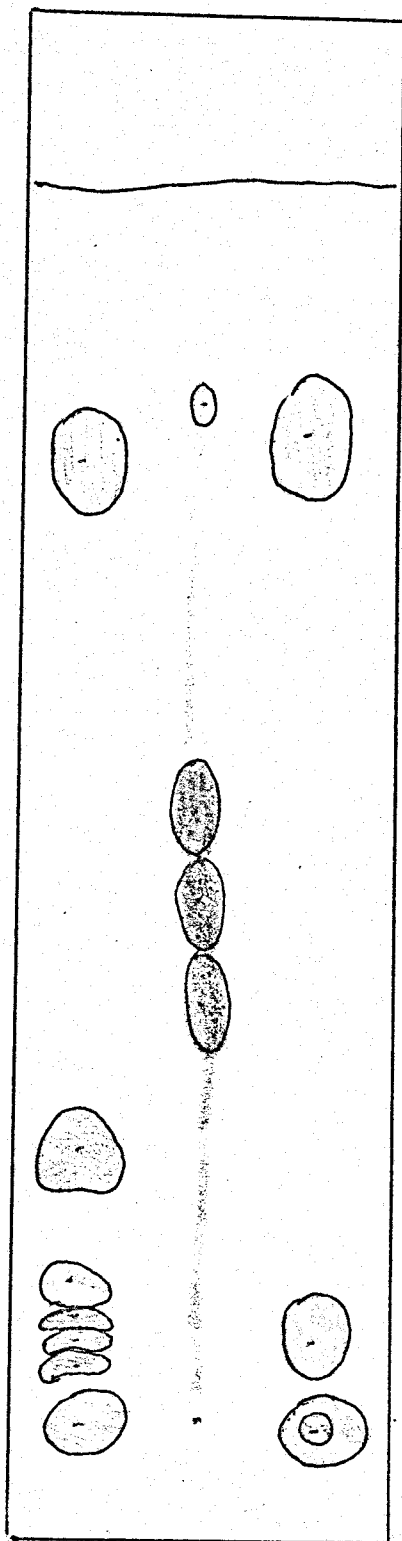
Se alcaliniza la columna, haciendo pasar corriente de amoníaco y se eluye con 100 cc de eter etílico, se deseca y se evapora el extracto, obteniendose el residuo del extracto etéreo-básico: EE Bc.

Con el hidrolizado procedente de la muestra de orina blanco, se procede de la misma forma, obteniendose los residuos / de los extractos ácido y básico: EE Ab y EE Bb.

Con los extractos obtenidos se realiza una cromato--grafia en capa fina, preparandose dos placas por cada muestra, / una se desarrolla en benceno:hexano:dietilamina y la otra en e--tanol, se hacen dos desarrollos y se revelan todas las placas / con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figuras 7,8,9,10)

Figura 7

Desarrollo en benceno:hexano:dietilamina,muestra 5ª.



Rf EE Ac=0,05

0,06

0,07

0,10

0,21

0,77

Rf patrón=0,35

0,43

0,49

0,82

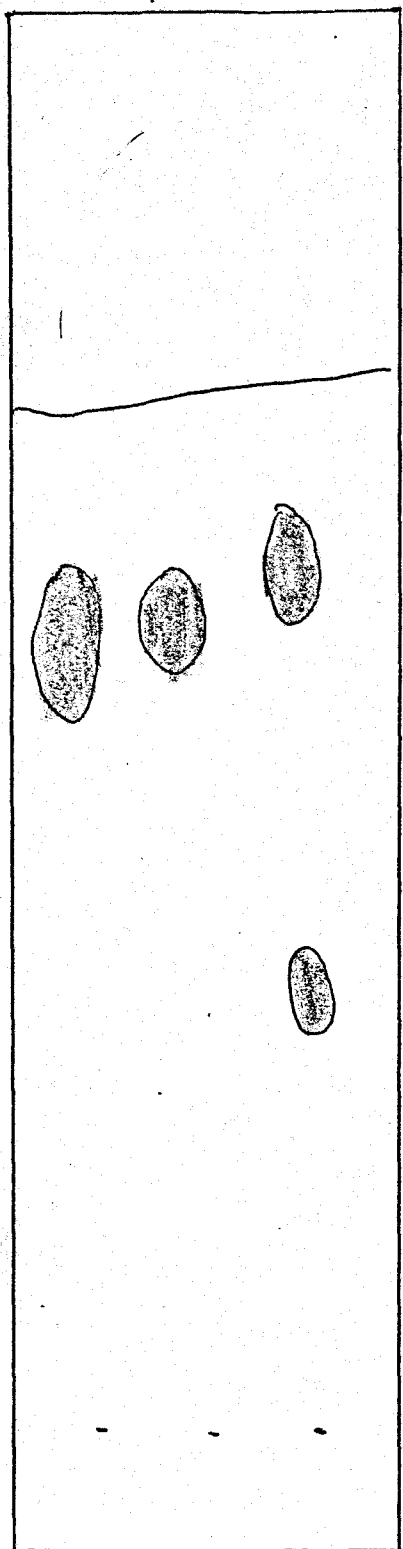
Rf EE Bc= 0,06

0,8

EE Ac patrón EE Bc

Figura 8

Desarrollo en etanol. Muestra 5ª



Rf EE Ac = 0,74

Rf patrón = 0,77

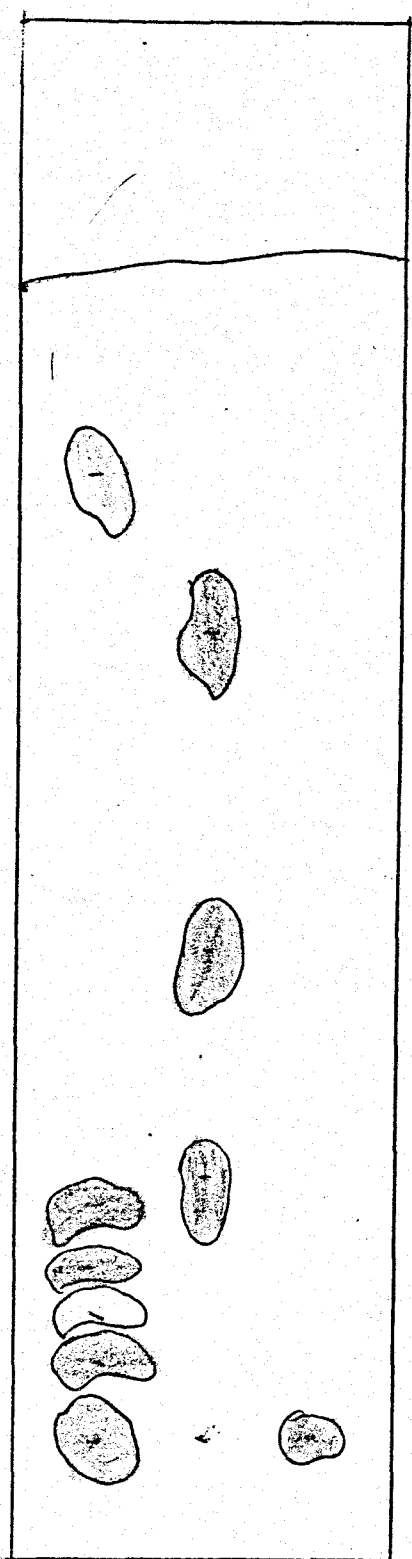
Rf EE Bc = 0,42

0,83

EE Ac patrón EE Bc

Figura 9

Muestra Blanco, desarrollo en benceno : hexano : dietilamina



EE Ab patrón EE Bb

Rf EE Ab = 0,07

0,10

0,14

0,17

0,81

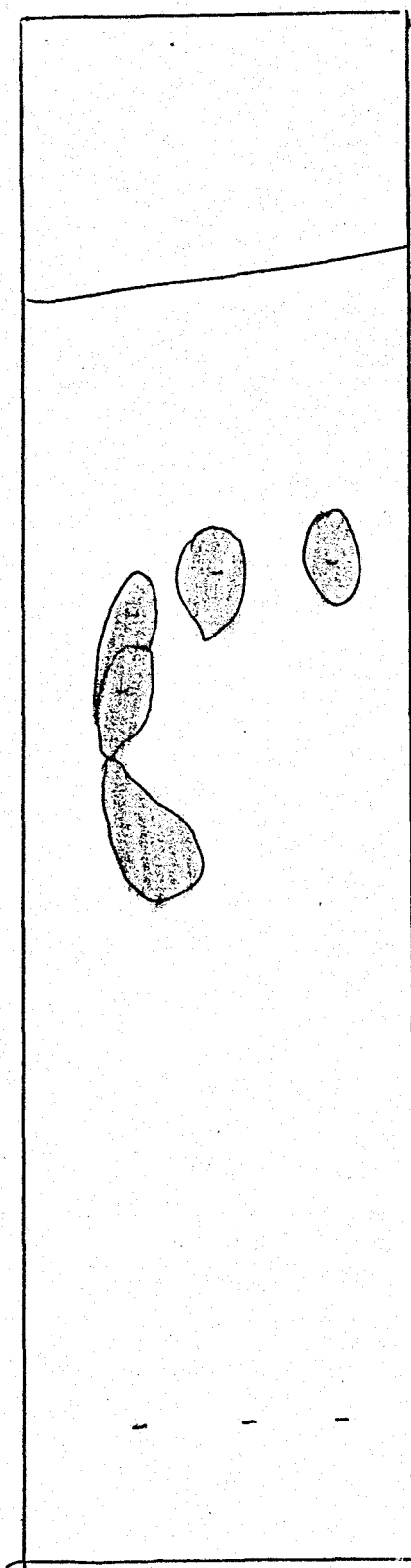
Rf patrón = 0,20

0,41

0,70

Figura 10

Muestra blanco, desarrollo en etanol



Rf EE Ab = 0,53

0,63

0,75

Rf patrón = 0,79

Rf EE Bb = 0,79

EE Ab patrón EE Bb

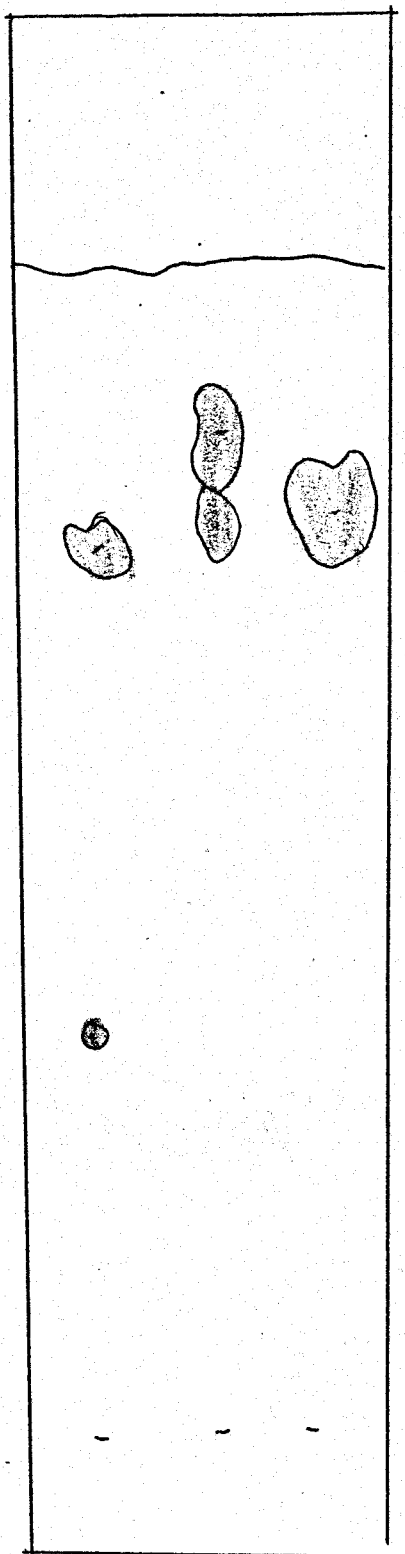
16ª DETERMINACION

Una muestra de orina cannabica 6ª se hace pasar a / través de la columna de Amberlita XAD-2, se eluye con hexano y se obtiene el residuo del extracto hexánico:H(1,6).

Se acidifica la columna y se eluye con eter etílico ,se obtiene el residuo del extracto etéreo ácido:EE A6.A continuación se hace pasar por la columna corriente de amoniaco y se eluye con eter etílico,se obtiene el residuo del extracto etéreo básico:EE B6.

Se realiza una cromatografia en capa fina, con desarrollo en benceno:etanol (95:5). Se revela con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N.(Figuras 11 y 12)

Figura 11



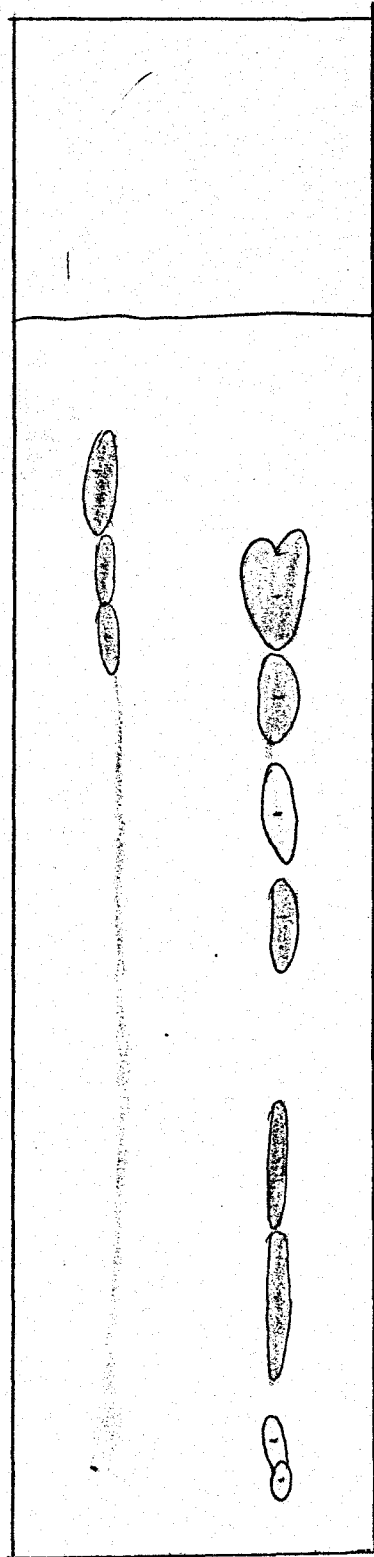
Rf H(1,6) = 0,34
0,75

Rf EE A 6 = 0,79

Rf patrón = 0,78
0,85

H(1,6) patrón EE A6

Figura 12



Rf patrón = 0,71

0,72

0,82

Rf EE_{B6} = 0,03

0,12

0,25

0,48

0,54

0,67

0,76

patrón

EE_{B6}

17ª DETERMINACION

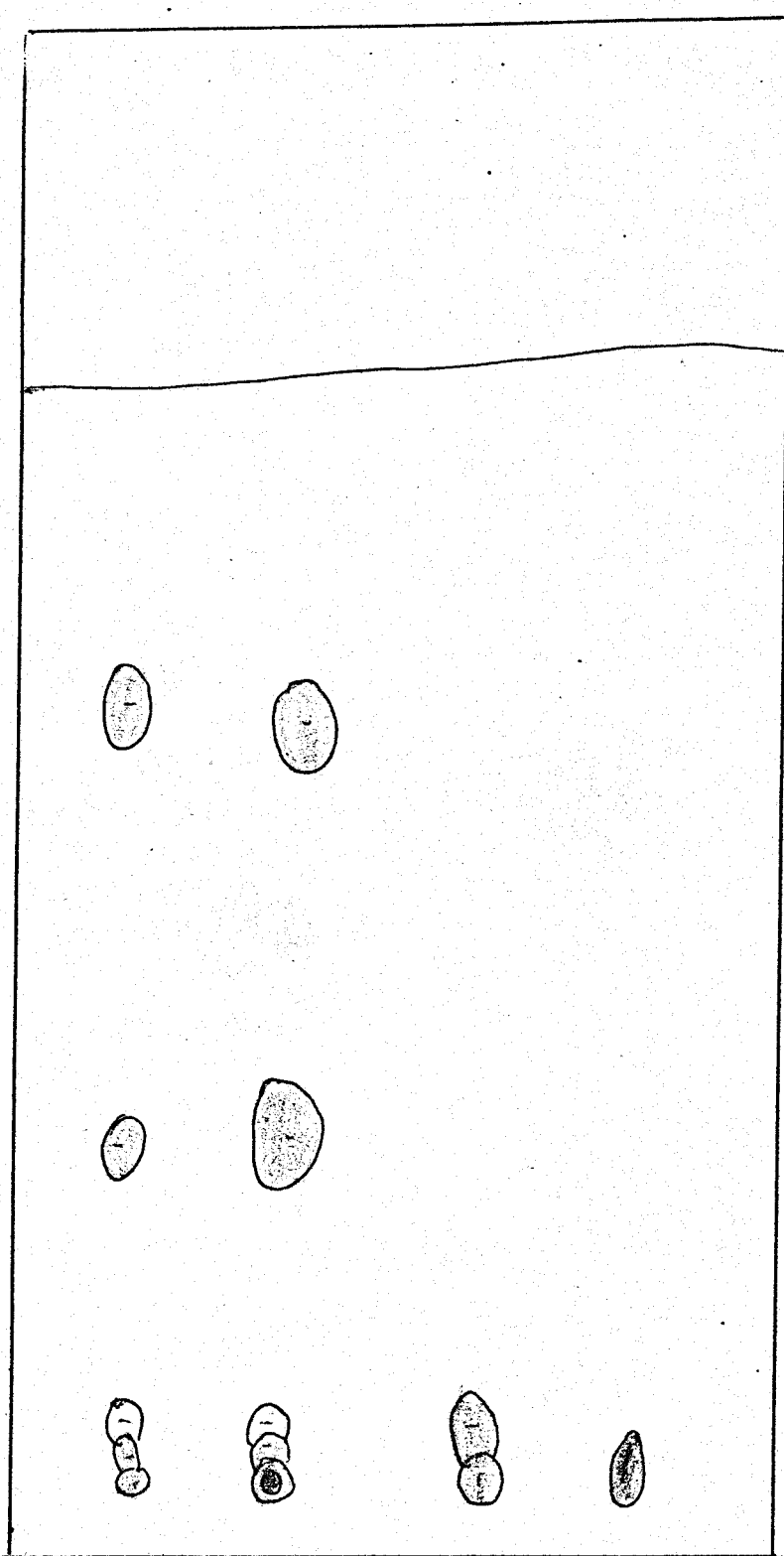
Muestras de orina cannabica 6ª y orina blanco, se sometieron a hidrólisis enzimática.

A partir del hidrolizado procedente de la muestra / de orina cannabica 6ª, se obtuvieron los residuos del extracto / hexánico: H(2,6); del extracto etéreo ácido: EA(2,6) y del extracto etéreo básico: EB(2,6).

A partir del hidrolizado procedente de la muestra / de orina blanco, se obtuvieron los residuos del extracto hexánico: Hb, del extracto etéreo ácido: EAb y del extracto etéreo básico: EBb.

Con ellos se realizó cromatografía en capa fina, utilizando como líquido de desarrollo ciclohexano, el revelado se / realizó con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figuras 13 y 14)

Figura 13



Rf $H(2,6) =$

0,02

0,05

0,30

0,71

Rf $E A(2,6) =$

0,02

0,05

0,32

0,7

Rf $E B(2,6) =$

0,04

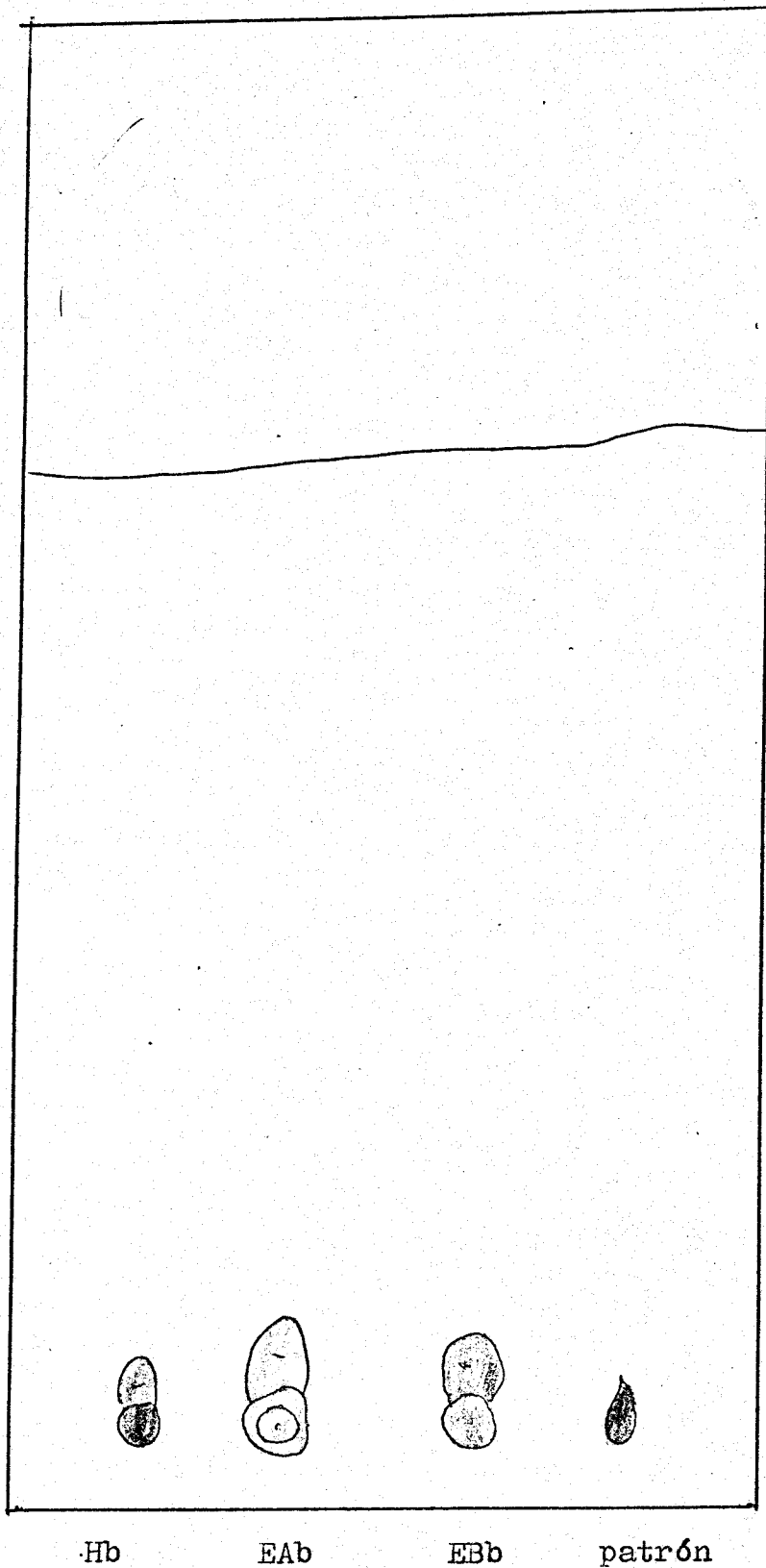
$H(2,6)$

$E A(2,6)$

$E B(2,6)$

patrón

Figura 14



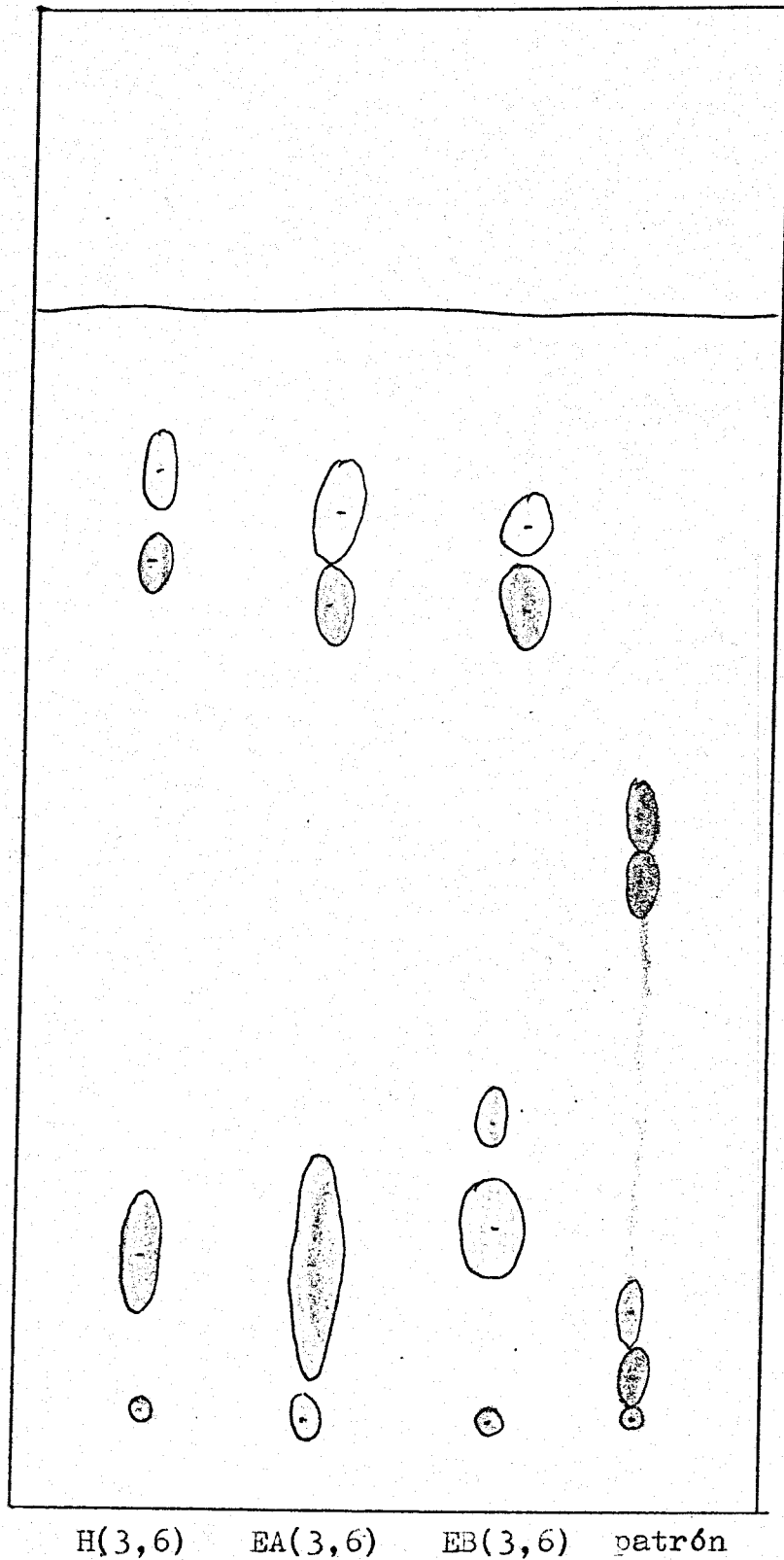
Rf Hb = 0,04

Rf E Ab=0,06

Rf E Bb=0,05

Figura 15

Desarrollo en benceno



Rf H(3,6)=
0,14
0,78
0,85

Rf EA(3,6)=
0,14
0,73
0,82

Rf EB(3,6)=
0,16
0,27
0,74
0,82

Rf patrón=
0,02
0,08
0,48
0,54

18ª DETERMINACION

A partir de una muestra de orina cannabica 6ª, obtenemos los residuos de los extractos: hexánico: H(3,6); etéreo ácido: EA(3,6); etéreo básico: EB(3,6).

Con estos extractos se realizó cromatografía en capa fina, una placa con desarrollo en benceno y otra con desarrollo en benceno:cloroformo 4:1.

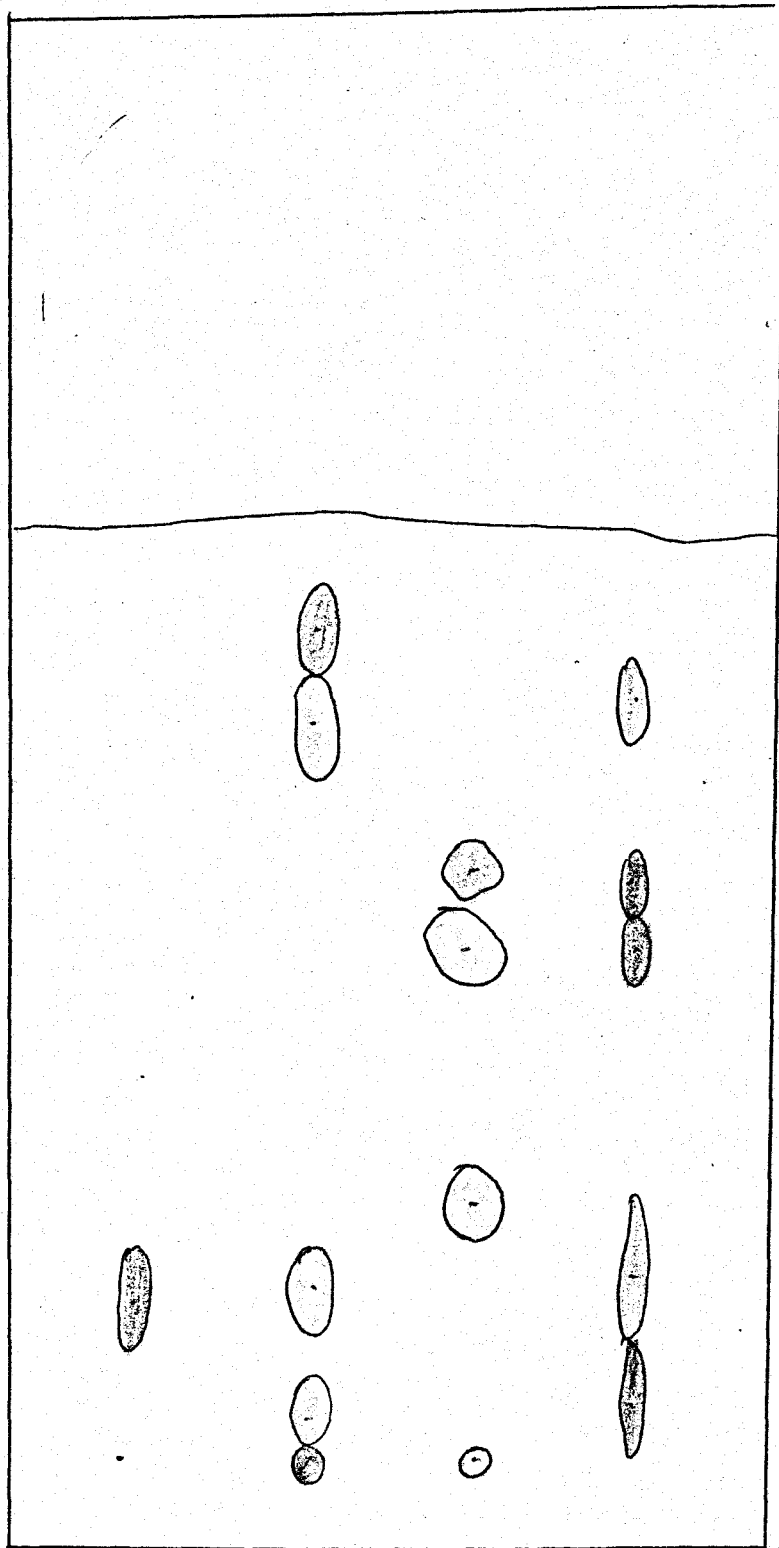
Con los extractos H(2,6), EA(2,6) y EB(2,6), así como con Hb, EAb y Ebb procedentes de la determinación 17ª, se realiza cromatografía en capa fina con desarrollo en benceno:cloroformo 2:1.

Con los extractos EA(2,6) y EB(2,6) se realiza cromatografía en capa fina con desarrollo en benceno:etanol 4:1.

El revelado se hace en todas, con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figuras 15,16,17,18,19,20).

Figura 16

Desarrollo en benceno: cloroformo 4:1



$$Rf H(3,6) = 0,18$$

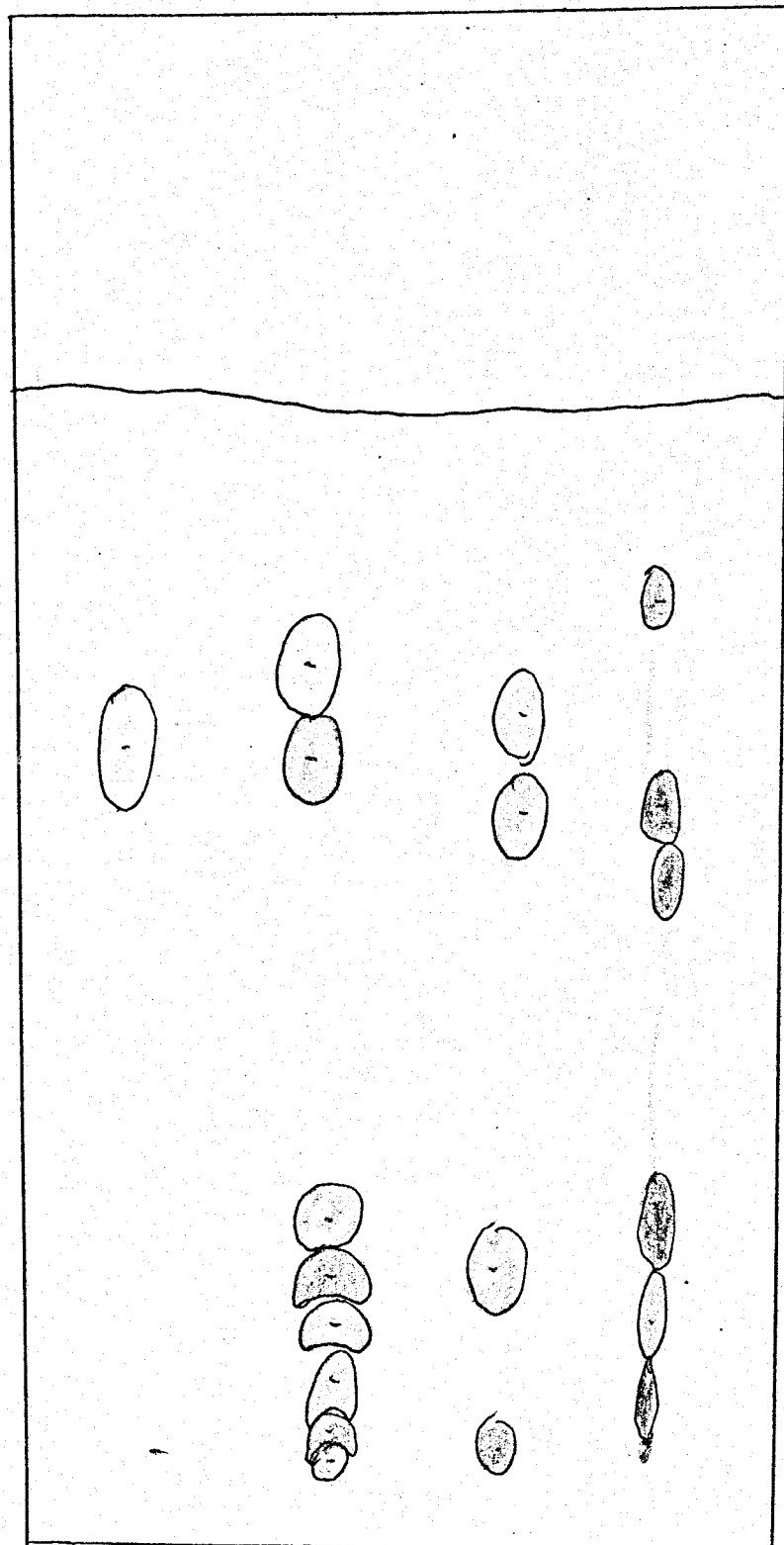
$$Rf E A(3,6) = 0,05$$
$$0,18$$
$$0,83$$
$$0,91$$

$$Rf E B(3,6) = 0,33$$
$$0,65$$
$$0,76$$

H(3,6) E A(3,6) E B(3,6) patrón

Figura 17

Desarrollo en benceno: cloroformo 2:1



Rf H(1,6) =
0,66

Rf EE A6 =
0,73
0,65
0,22
0,15
0,12
0,07
0,04

Rf EE B6 =
0,18
0,63
0,73

Rf patrón =
0,03
0,10
0,19
0,52
0,57
0,77

H(1,6)

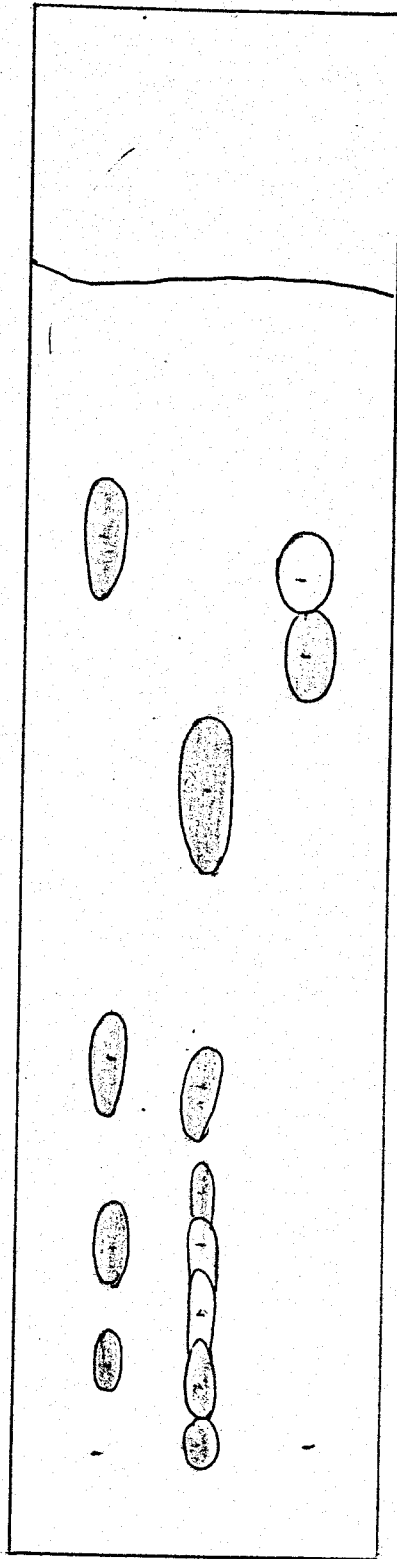
EE A6

EE B6

patrón

Figura 18

Desarrollo en benceno: cloroformo 2:1



Rf H (2,6) = 0,07
0,16
0,33
0,75

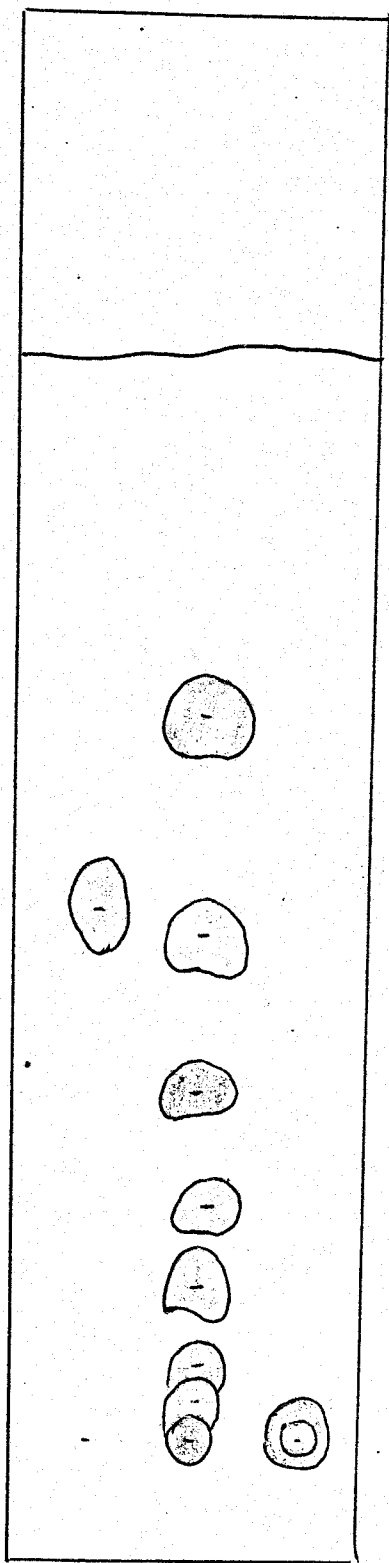
Rf EA (2,6) = 0,04
0,11
0,15
0,20
0,3
0,56

Rf EB (2,6) = 0,68
0,74

H(2,6) EA(2,6) EB(2,6)

Figura 19

Desarrollo en benceno: cloroformo 2:1



Rf Hb = 0,48

Rf E Ab=0,03

0,06

0,14

0,20

0,32

0,35

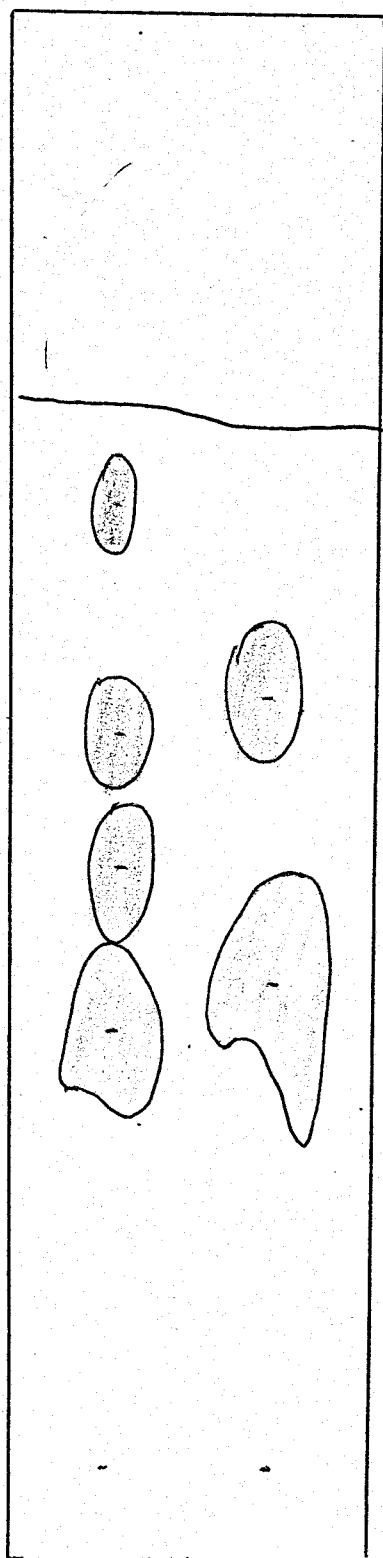
0,46

0,65

Hb E Ab E Bb

Figura 20

Desarrollo en benceno: etanol 4:1



$R_f E A_{(2,6)} = 0,40$
 $0,55$
 $0,73$
 $0,91$

$R_f E B_{(2,6)} = 0,45$
 $0,76$

E A(2.6) E B(2,6)

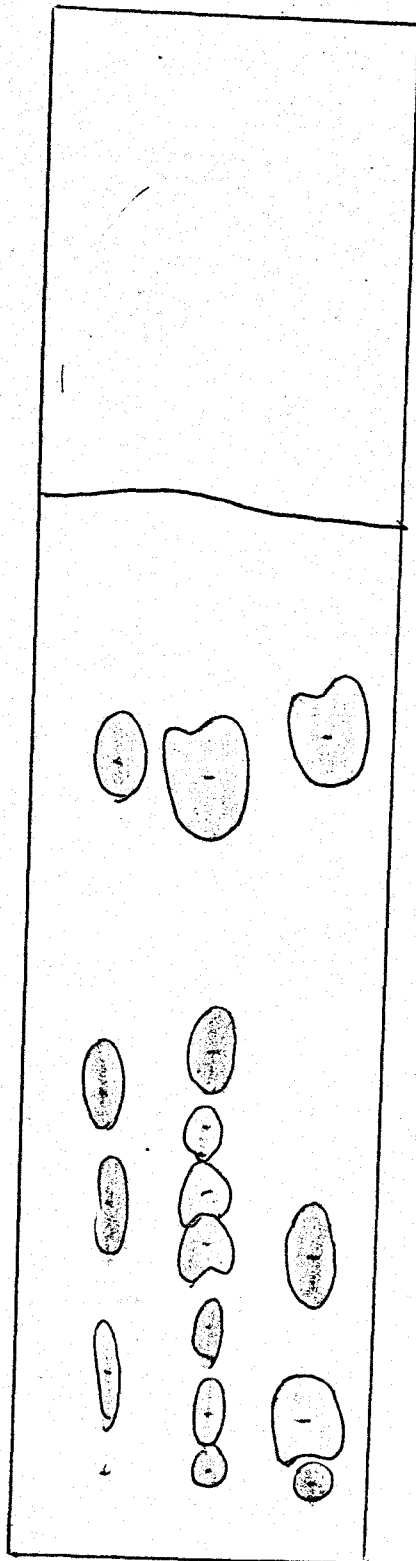
19ª DETERMINACION

Una muestra de orina blanco se sometió a hidrólisis-enzimática y posteriormente se obtuvieron los residuos de los / extractos hexánico:Hb, etéreo ácido:EAb y etéreo básico:EBb.

Con estos extractos se realizó la cromatografía en / capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 2:1 y revelado / con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N.

Posteriormente el residuo del extracto etéreo ácido , se disolvió en eter etílico y se lavó con solución saturada de ClNa, se obtuvo nuevamente el residuo y se cromatografió con desarrollo en benceno:cloroformo 2:1 y revelado con sal de azul / sólido B en NaOH 0,1N. (Figuras 21 y 22).

Figura 21



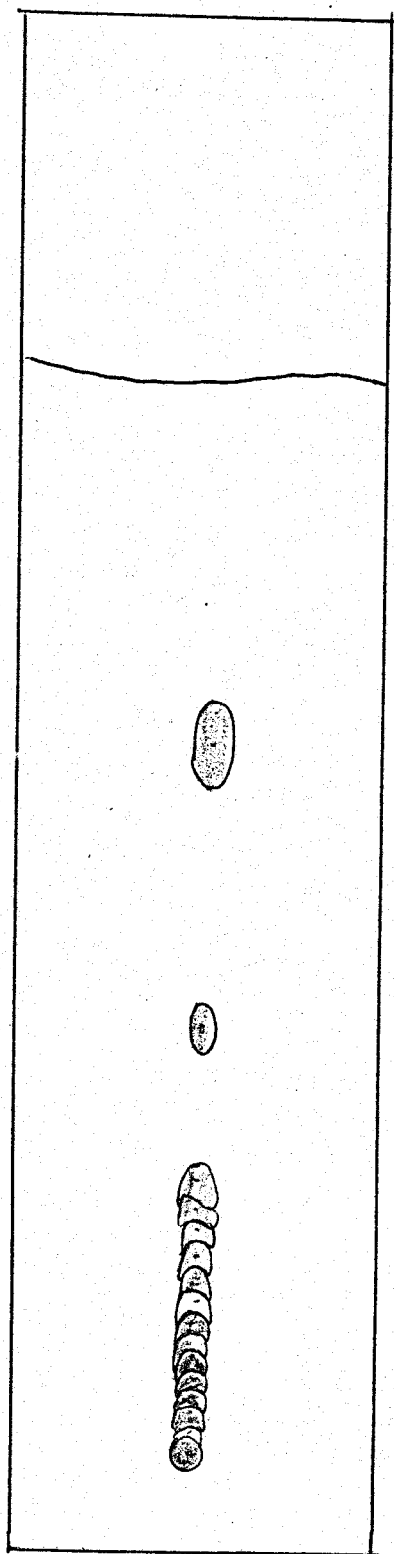
Hb E Ab E Bb

Rf Hb = 0,09
0,23
0,36
0,7

Rf E Ab=0,06
0,13
0,23
0,26
0,32
0,41
0,7

Rf E Bb=0,06
0,22
0,73

Figura 22



Rf E Ab lavado con solución saturada de ClNa =

0,02

0,04

0,05

0,07

0,08

0;10

0,12

0,13

0,15

0,21

0,25

0,40

0,66

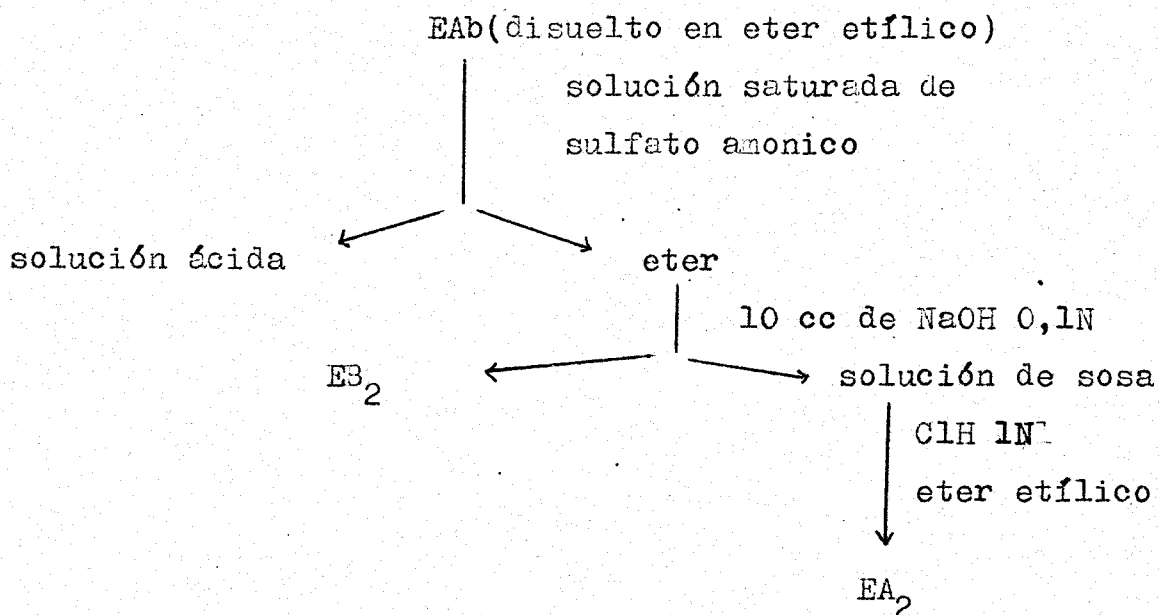
EAb

20ª DETERMINACION

A partir de una muestra de orina blanco, de persona no fumadora de tabaco, se obtuvieron los residuos de los extractos hexánico:Hb;etéreo ácido EAb y etéreo básico Ebb.

Con estos extractos se realizó una cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 2:1, una placa y otra en benceno:hexano:dietilamina, revelado con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figuras 23 y 24)

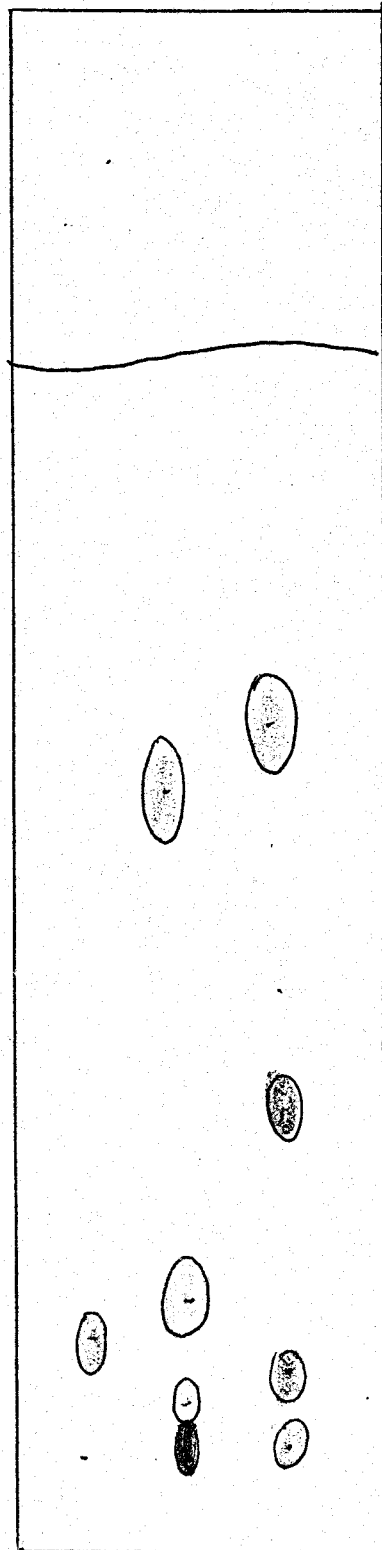
Posteriormente el extracto etéreo ácido se lavó con solución saturada de sulfato amónico y a continuación con 10 cc de NaOH 0,1N, obteniéndose EB₂, la sosa procedente del lavado anterior se acidificó y se lavó con eter etílico, obteniéndose el EA₂.



Con estos extractos se realizaron las correspondientes cromatografía en capa fina. (Figuras 25 y 26).

Figura 23

Desarrollo en benceno :hexano: dietilamina



Rf Hb = 0,1

Rf E Ab= 0,04

0,13

0,60

Rf E Bb= 0,07

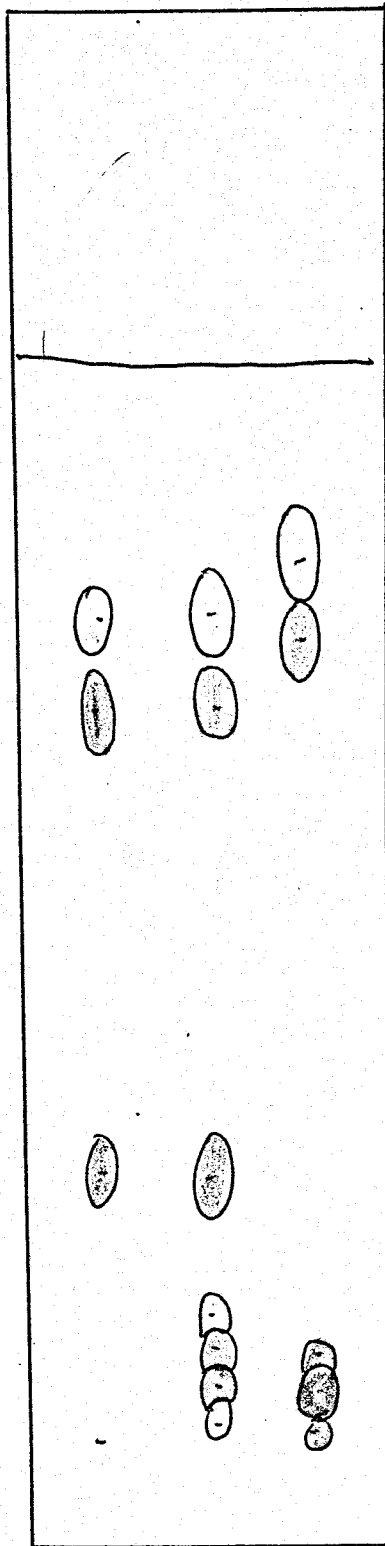
0,31

0,66

Hb E Ab E Bb

Figura 24

Desarrollo en benceno:cloroformo 2:1



Rf Hb = 0,24

0,67

0,75

Rf E Ab=0,03

0,06

0,1

0,12

0,25

0,69

0,75

Rf E Bb=0,03

0,05

0,72

0,79

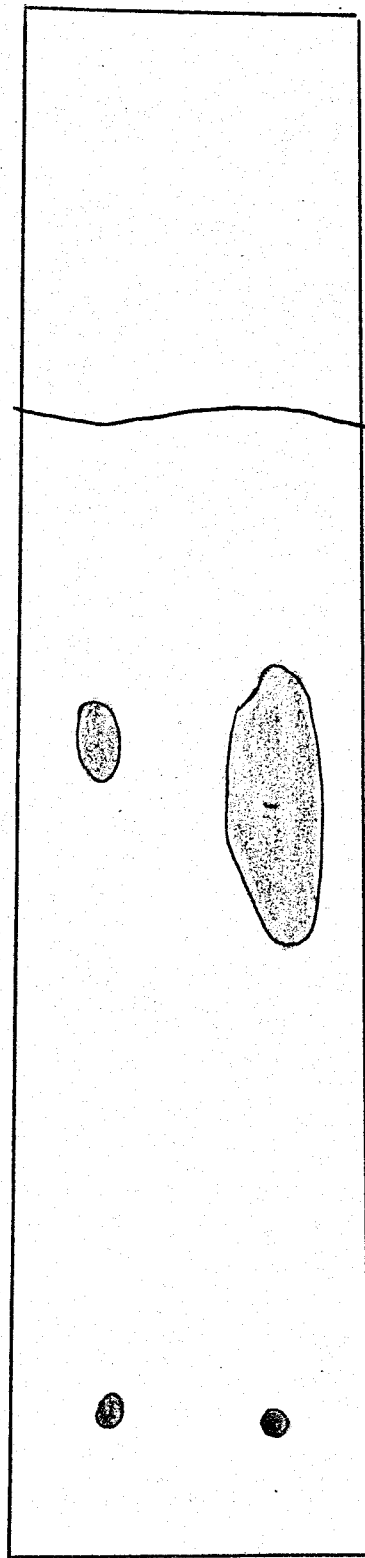
Hb

E Ab

E Bb

Figura 25

Desarrollo en benceno: hexano: dietilamina



$$Rf \text{ E A}_2 \neq 0,67$$

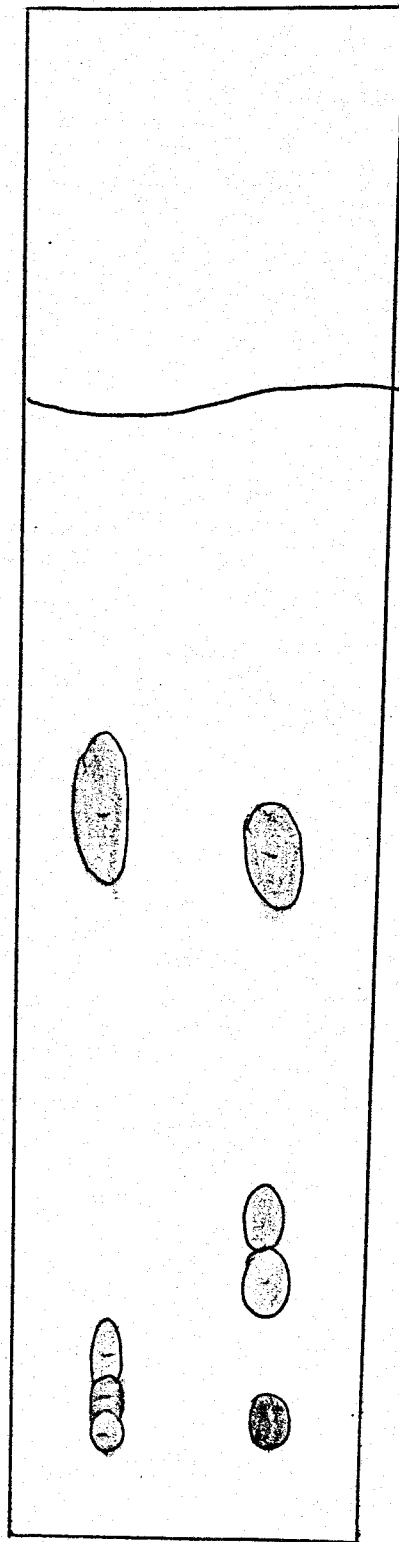
$$Rf \text{ E B}_2 = 0,61$$

E A₂

E B₂

Figura 26

Desarrollo en benceno: cloroformo 2:1



Rf EA₂ = 0,03
0,06
0,60

Rf EB₂ = 0,14
0,18
0,56

EA₂

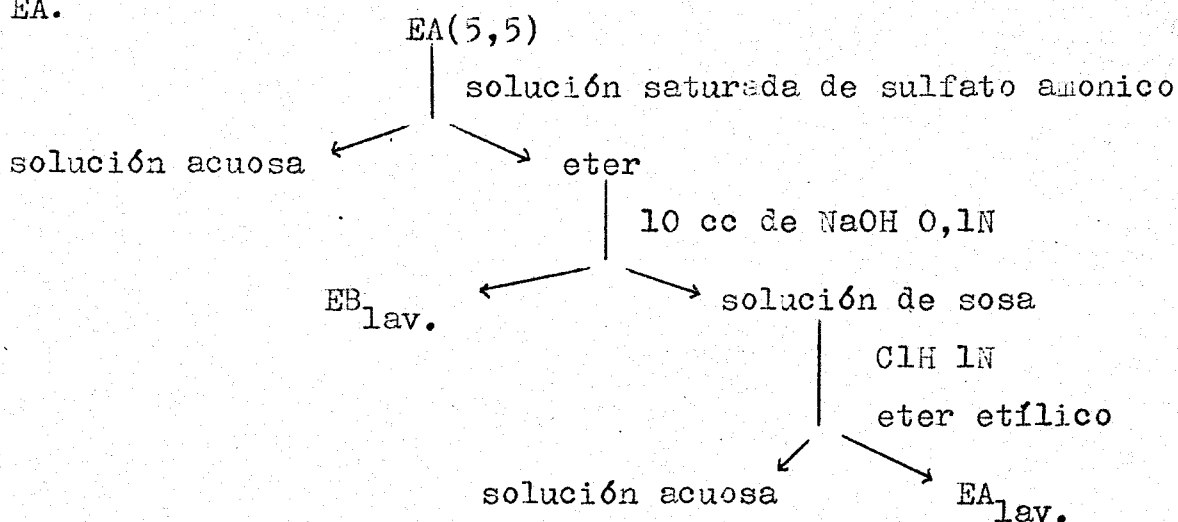
EB₂

21ª DETERMINACION

Partiendo de una muestra de orina cannabica 5ª, se / obtuvieron los residuos de los extractos hexánico:H(5,5), etéreo ácido:EA(5,5) y etéreo básico:EB(5,5).

Los residuos del extracto hexánico y del etéreo básico se cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 2:1 y en benceno:hexano:dietilamina. Se revelan con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figuras 27 y 28)

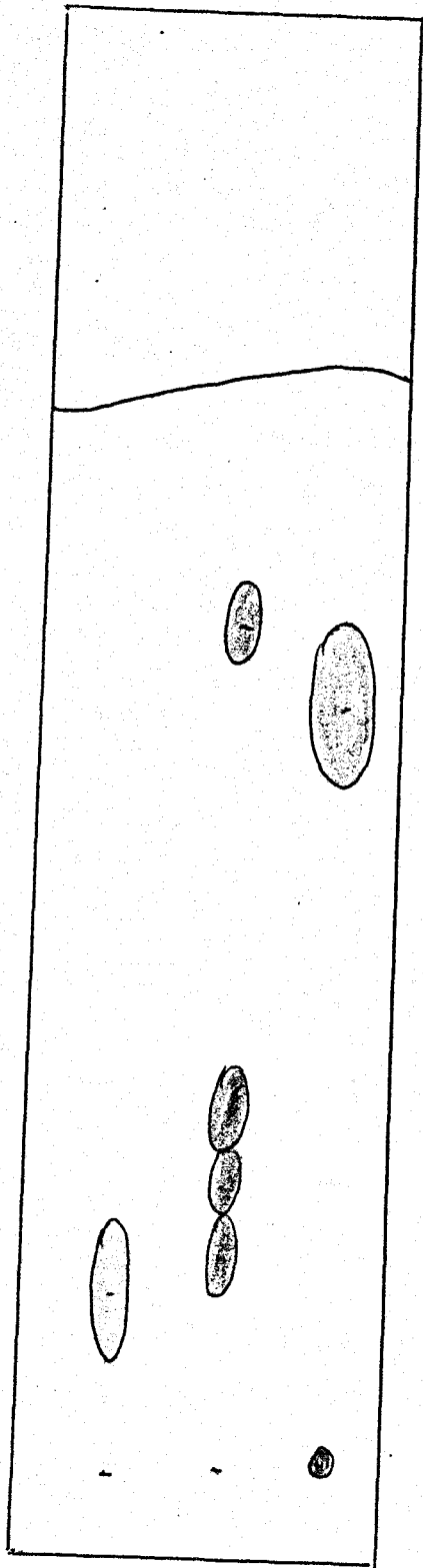
El extracto etéreo ácido, se lava con solución saturada de sulfato amónico. el eter resultante se extrae con NaOH / 0,1N, luego esta sosa se acidifica y se extrae con eter etílico: EA.



Los extractos así obtenidos se cromatografían en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 2:1 y en benceno:hexano:dietilamina y revelado con sal de azul sólido B. (Figuras :29 y 30)

Figura 27

Desarrollo en benceno: hexano: dietilamina



$$Rf H_{(5,5)} = 0,14$$

$$Rf patrón = 0,17$$

$$0,25$$

$$0,32$$

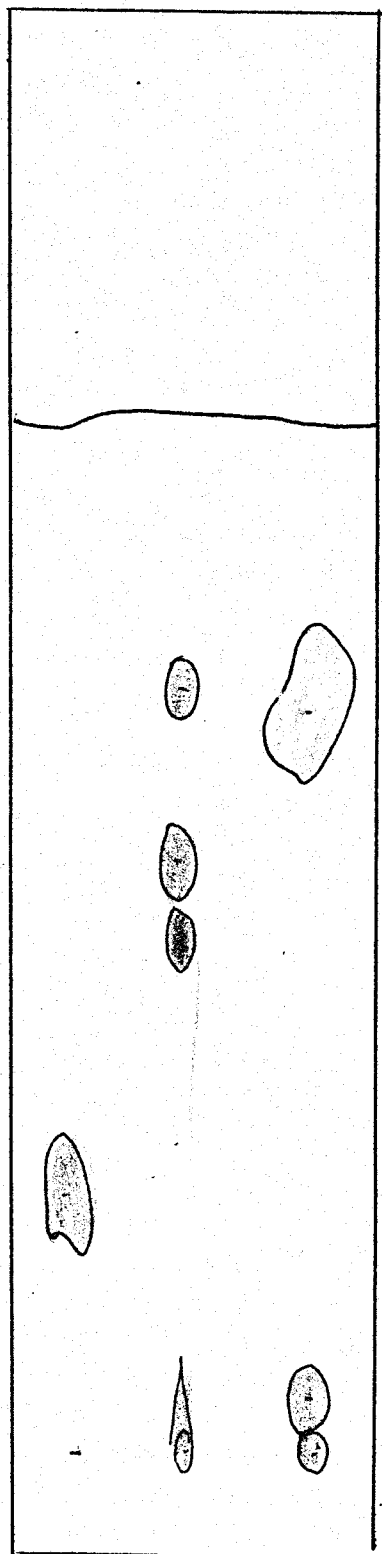
$$0,77$$

$$Rf E B_{(5,5)} = 0,71$$

$H_{(5,5)}$ patrón $E B_{(5,5)}$

Figura 28

Desarrollo en benceno: cloroformo 2:1



Rf H_(5,5) = 0,24

Rf patrón = 0,5

0,57

0,76

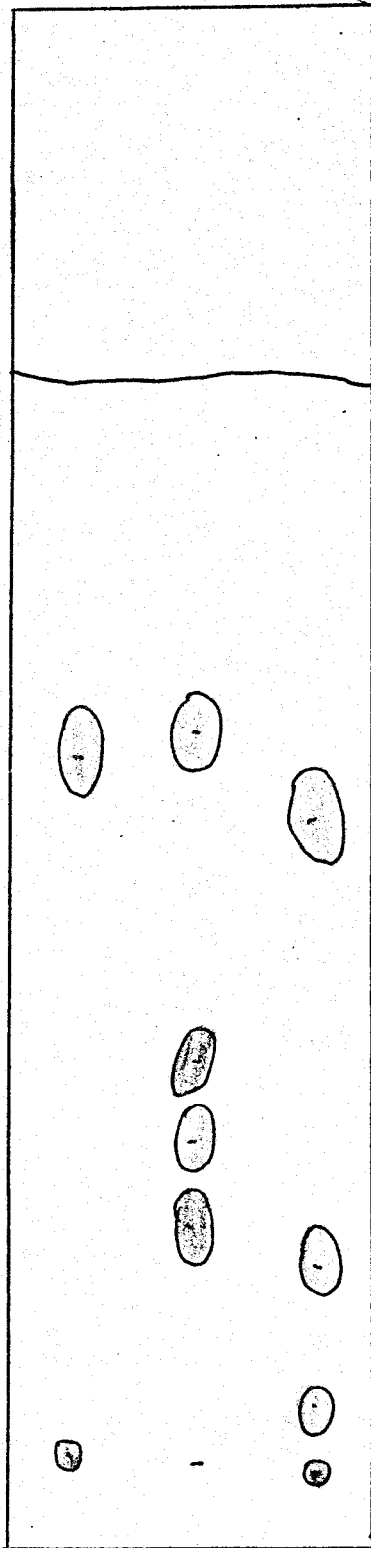
Rf E B_(5,5) = 0,06

0,73

H_(5,5) patrón E B_(5,5)

Figura 29

Desarrollo en benceno: hexano: dietilamina



$$R_f E A_{Lav.} = 0,6$$

$$R_f patrón = 0,02$$

$$0,3$$

$$0,37$$

$$0,67$$

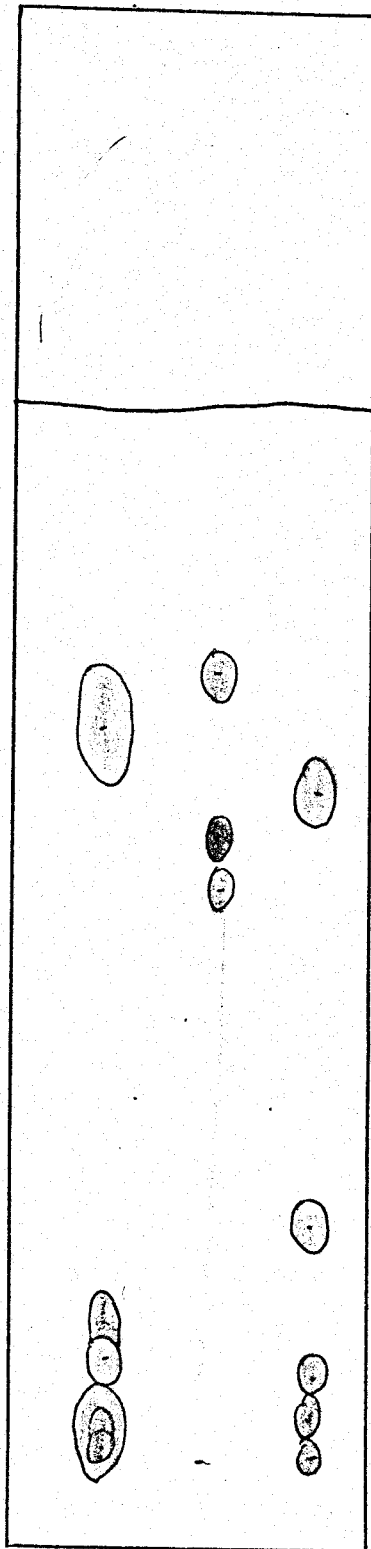
$$R_f E B_{Lav.} = 0,05$$

$$0,2$$

$$0,63$$

$E A_{Lav.}$ patrón $E B_{Lav.}$

Desarrollo en benceno: cloroformo 2:1



Rf E A_{lav.} = 0,02

0,04

0,07

0,11

0,67

Rf patrón = 0,52

0,57

0,72

Rf E B_{lav.} = 0,03

0,07

0,21

0,62

E A_{lav.} patrón E B_{lav.}

22ª DETERMINACION

Partiendo de una orina blanco, se obtuvieron los extractos y los residuos: hexánico Hb, etéreo ácido EAb y etéreo básico: Ebb.

Con estos residuos se realiza una cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado con sal de azul sólido B.

El extracto etéreo ácido se pasa por una columna de Florisil y a continuación se extrae con NaOH 0,1N, obteniéndose el extracto E alc.; la solución de sosa se acidifica y se extrae con eter etílico, obteniéndose el extracto E ac.. Con estos extractos se realiza una cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado con sal de azul sólido B (Figuras 31 y 32).

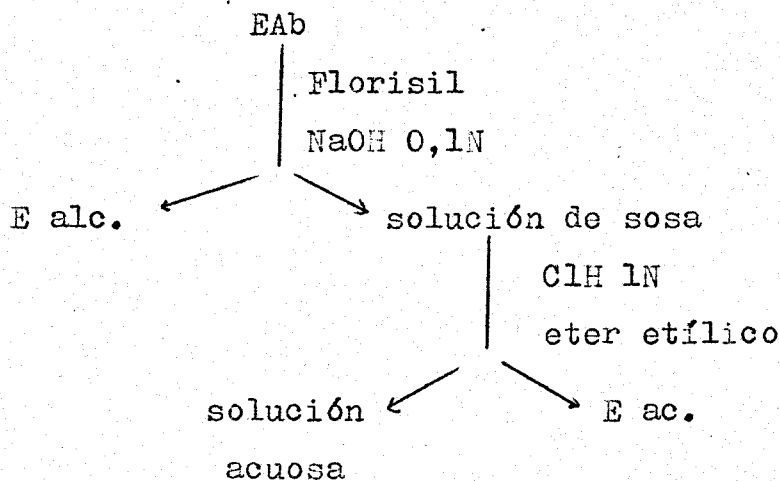
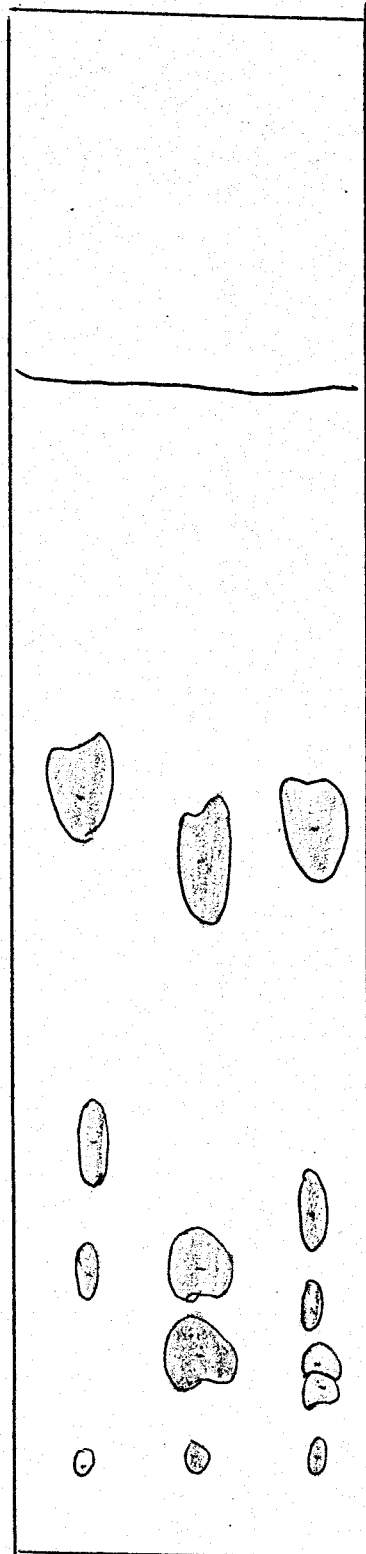


Figura 31



Rf Hb=0,17

0,28

0,61

Rf EAb=0,09

0,17

0,54

Rf Ebb=0,07

0,08

0,13

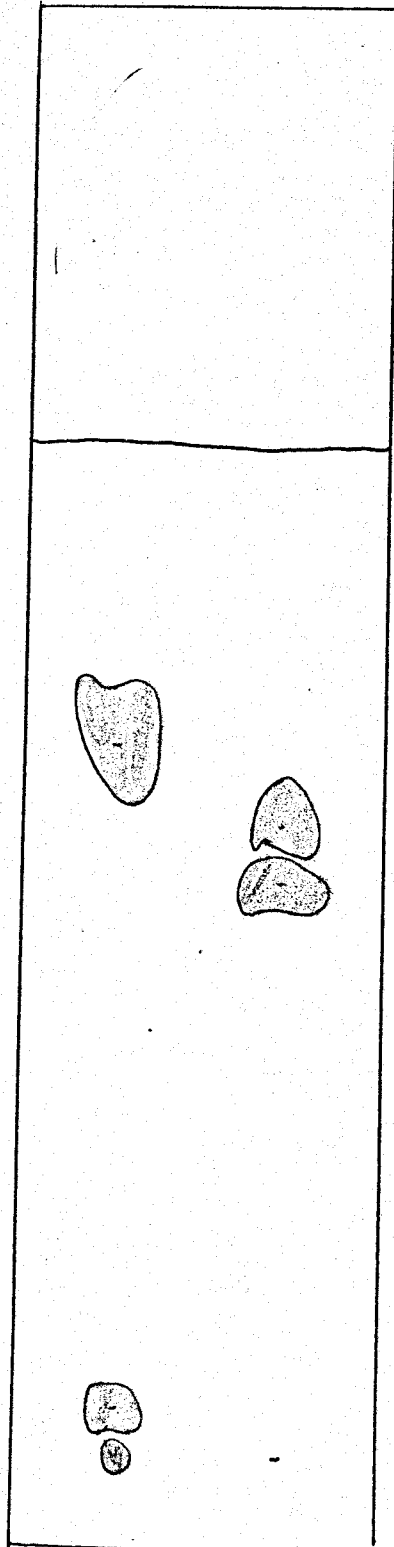
0,59

Hb

EAb

Ebb

Figure 32



Rf E ac.=0,04

0,7

Rf E alc.=0,56

0,63

E ac.

E alc.

23ª DETERMINACION

A partir de una orina cannabica, se obtuvieron los residuos de los extractos hexánico:H, etéreo ácido:EA y etéreo bá-sico:EB.

El extracto etéreo ácido se pasa por columna de Flo-risil y luego se extrae con NaOH 0,1N, obteniendose el extracto-E ác., la sosa se acidifica con ClH 1N y se extrae con eter etí-lico, obteniendose el residuo del extracto E ac.

Con los residuos así obtenidos se realizan cromato-grafia en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado con sal de azul sólido B. (Figuras 33 y 34)

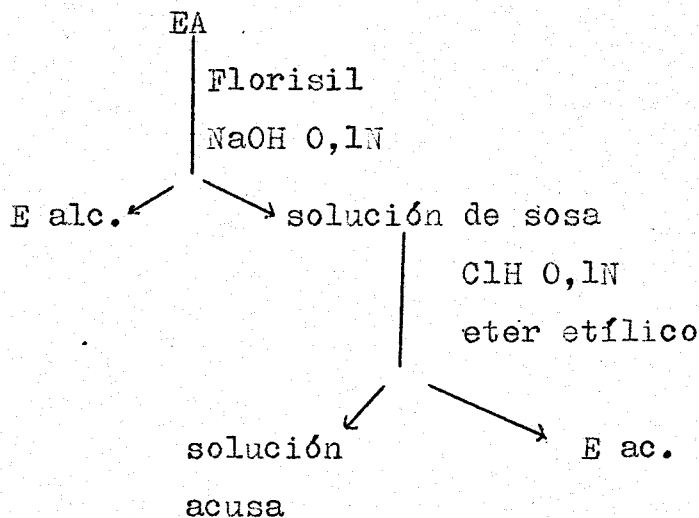
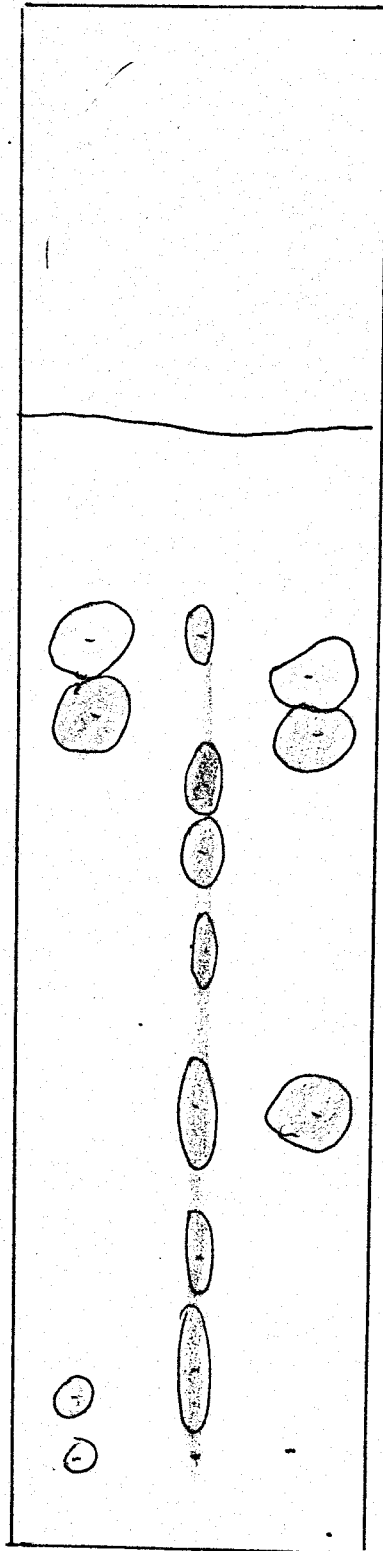


Figura 33



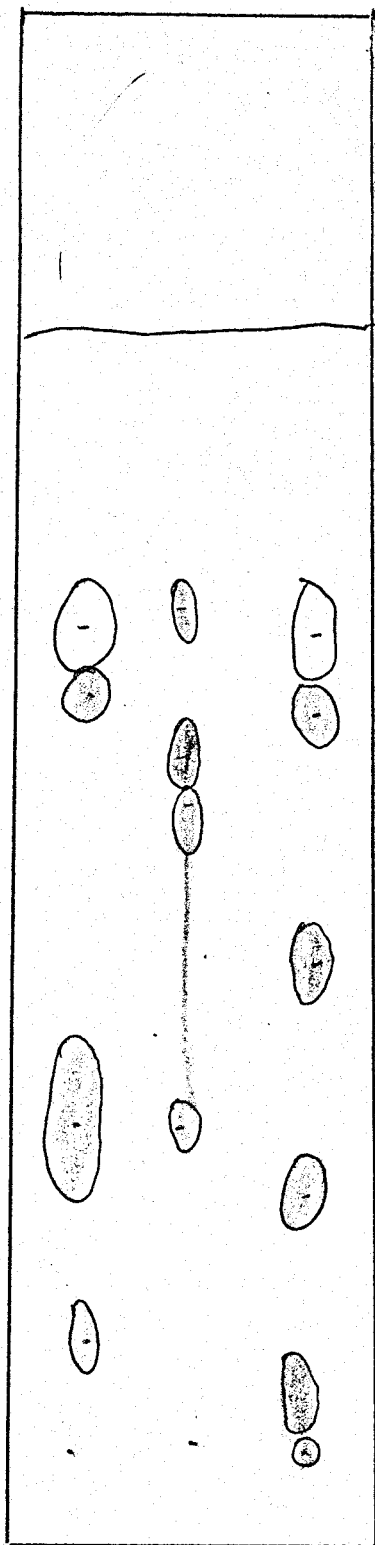
Rf E ac. = 0,05
0,68
0,75

Rf patrón = 0,08
0,2
0,33
0,47
0,57
0,68
0,77

Rf E alc. = 0,32
0,67
0,72

E ac. patrón E alc.

Figura 34



Rf H=0,10

0,28

0,68

0,72

Rf patrón =0,31

0,58

0,64

0,77

Rf EB = 0,05

0,23

0,44

0,66

0,74

H patrón EB

24ª DETERMINACION

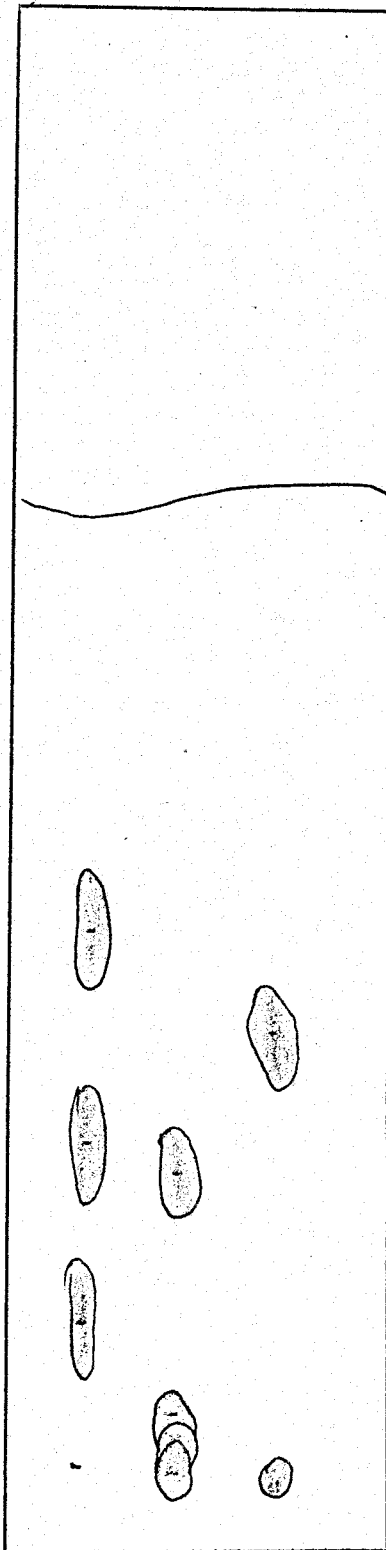
A partir de una orina blanco, se obtuvieron los residuos de los extractos hexánico:Hb, etéreo ácido:EAb y etéreo básico EAb.

Con estos extractos se realiza cromatografía en papel, con desarrollo horizontal, usando como eluyente butanol:acético:agua y revelando con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N; con reactivo de Duquenois y p-nitroanilina.

También se realizó una cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 35)

Los resultados de la cromatografía en papel, no fueron significativos.

Figura 35



Rf Hb=0,14

0,32

0,54

Rf EAb= 0,04

0,05

0,32

Rf EBb=0,46

Hb

EAb

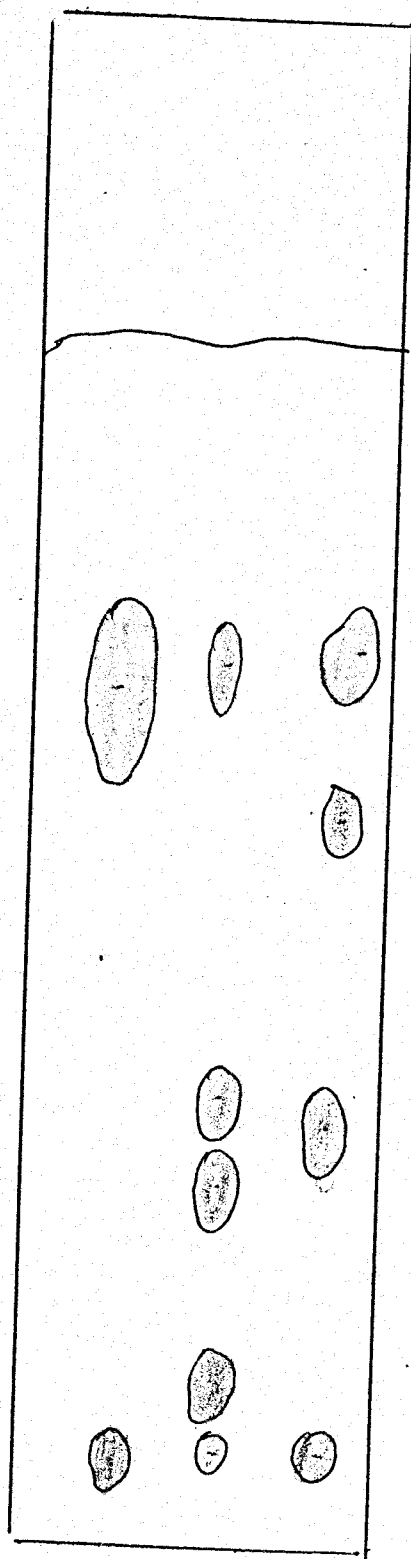
EBb

25ª DETERMINACION

Partiendo de una orina blanco, se obtuvieron los residuos de los extractos hexánico:Hb, etéreo ácido EAb y etéreo básico:EBb.

Con estos se realizó una cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado con p-nitroanilina y a continuación con sal de azul sólido B en NaOH /, 0,1N. (Figura 36)

Figura 36



Rf Hb=0,7

Rf EAb=0,07

0,25

0,32

0,72

Rf EBb=0,29

0,57

0,73

Hb

EAb

EBb

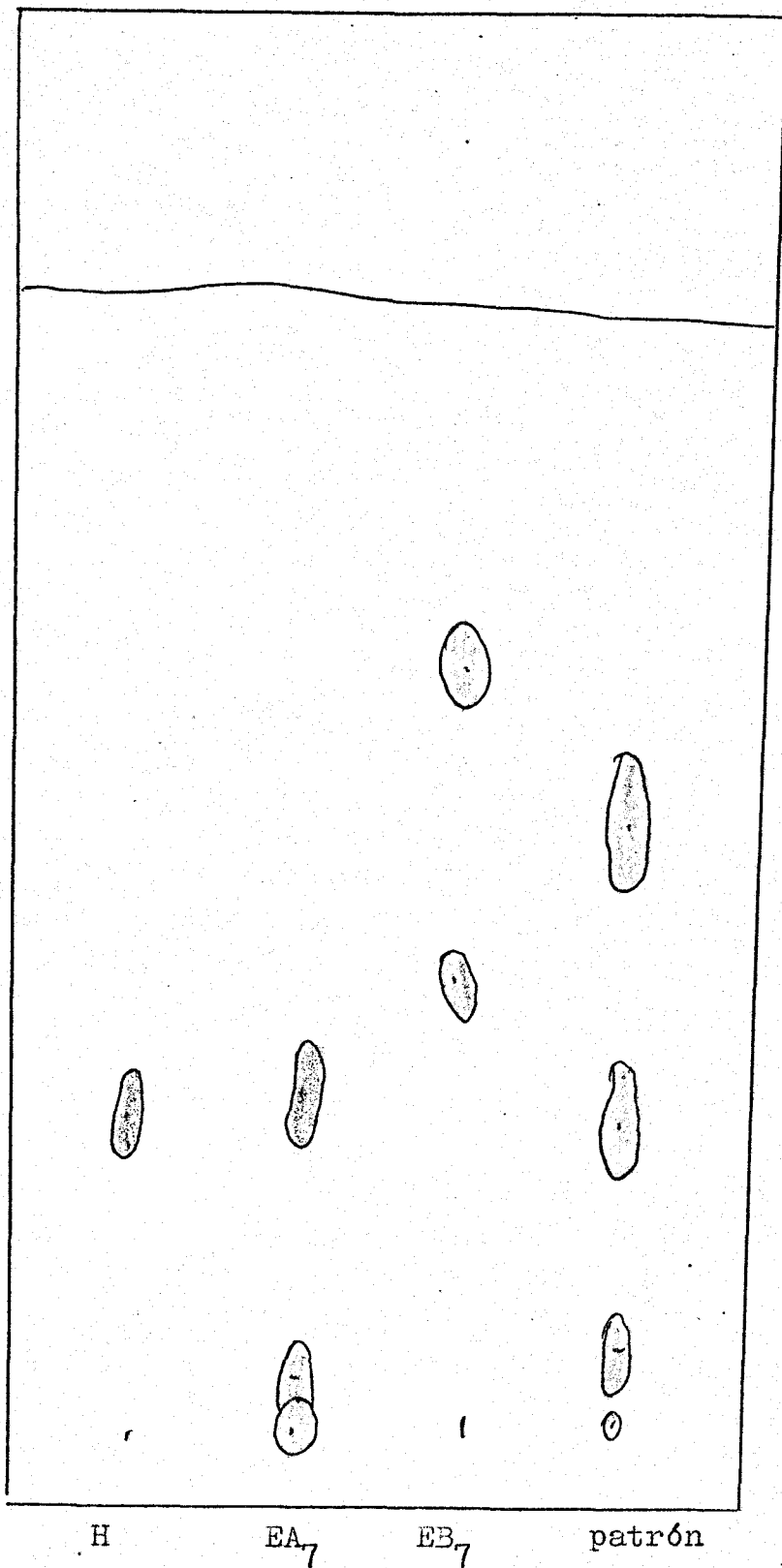
26ª DETERMINACION

A partir de una muestra de orina cannabica 7ª, se obtuvieron los residuos de los extractos, hexánico:H, etéreo ácido: EA₇ y etéreo básico: EB₇.

Con ellos se realizó una cromatografía en capa fina, utilizando como eluyente benceno:cloroformo 3:7 y como revelador p-nitroanilina. (Figura 37)

También se realizó una cromatografía en papel, que se reveló con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N y con p-nitroanilina y a continuación con azul B. Los resultados no fueron ~~ni~~ significativos.

Figura 37



Rf H=0,28

Rf EA₇=0,05
0,3

Rf EA₇=0,37
0,66

Rf patrón=0,05
0,26
0,53

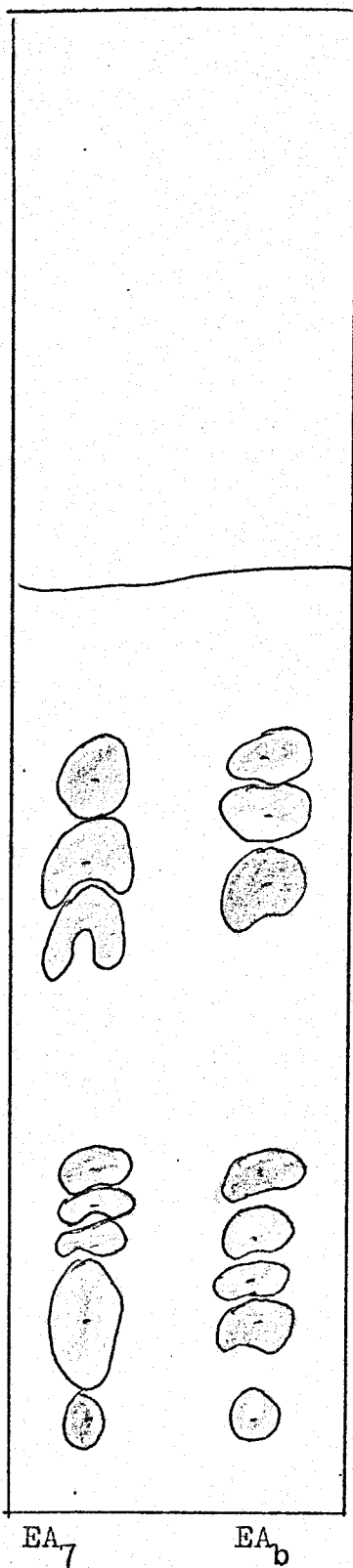
28ª DETERMINACION

Muestras de orina cannabica 7ª y de orina blanco, se sometieron a hidrólisis enzimática y posteriormente se obtuvo / el extracto etéreo ácido de cada una de ellas: EA₇ y EA_b.

Con estos extractos se realizó una cromatografía en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado / con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N (Figura 38).

También se realizó una cromatografía en papel, con / resultados no significativos.

Figura 38



Rf $EA_7=0,12$

0,20

0,24

0,29

0,57

0,66

0,74

Rf $EAb=0,10$

0,16

0,22

0,29

0,64

0,72

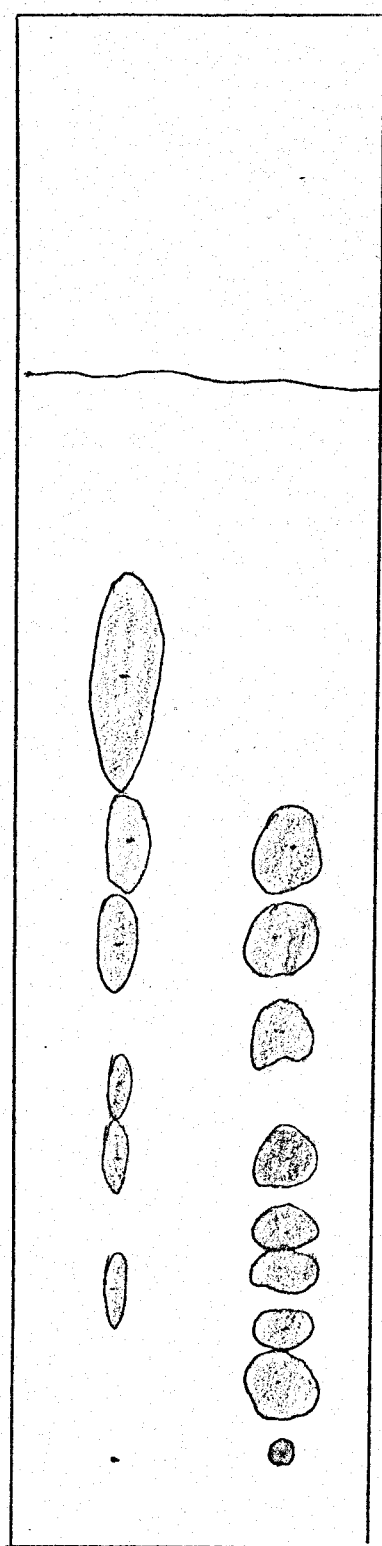
0,79

29ª DETERMINACION

Una muestra de orina cannabica 7ª se pasa por la columna de Amberlita XAD-2 y a continuación se eluye con 500cc de etanol al 15%, que según la bibliografía eliminaria los pigmentos de la orina. A continuación se eluye con 100 cc de hexano, se acidifica la columna y se eluye con 100 cc de eter etílico, obteniéndose el residuo del extracto EA₇etOH.

Con este extracto se hace una cromatografia en capa fina, con desarrollo en ciclohexano:n-propanol:acetato de etilo:amoniac y se revela con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 39)

Figura 39



Rf patrón=0,15

0,27

0,34

0,47

0,56

0,72

Rf EA₇etOH=0,07

0,11

0,16

0,20

0,27

0,39

0,48

0,56

patrón

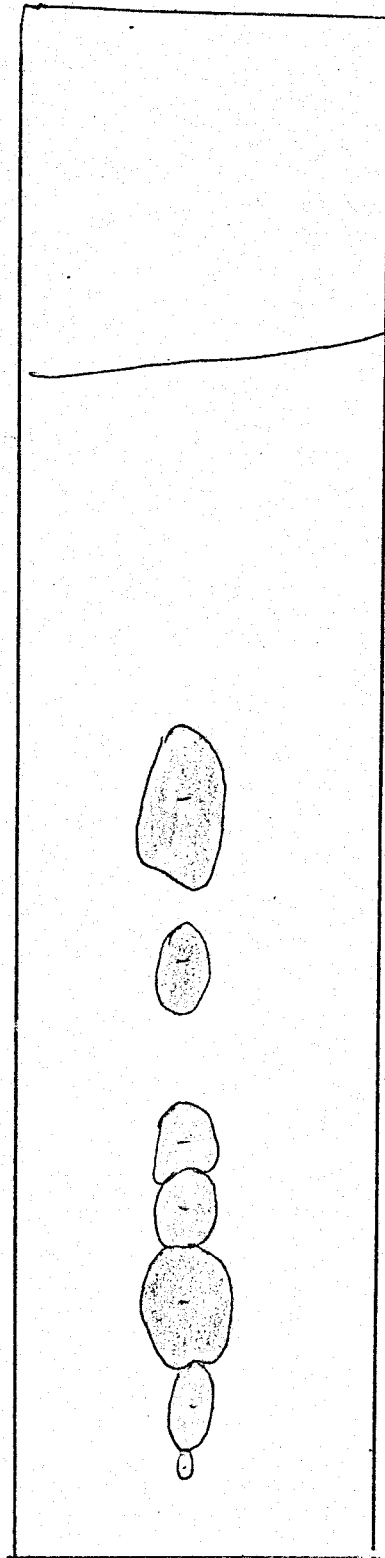
EA₇etOH

30ª DETERMINACION

Una muestra de orina blanco, se pasa a través de la / columna de Amberlita XAD-2 y a continuación se lava con 50cc de etanol al 15%. Se eluye con hexano, se acidifica y se eluye con éter etílico, obteniéndose el residuo del extracto : EA₀ etOH.

Con este extracto se realiza una cromatografía en capa fina, con desarrollo en ciclohexano:n-propanol:acetato de etilo:amoníaco y revelado con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 40)

Figura 40



Rf=0,03

0,12

0,22

0,27

0,44

0,58

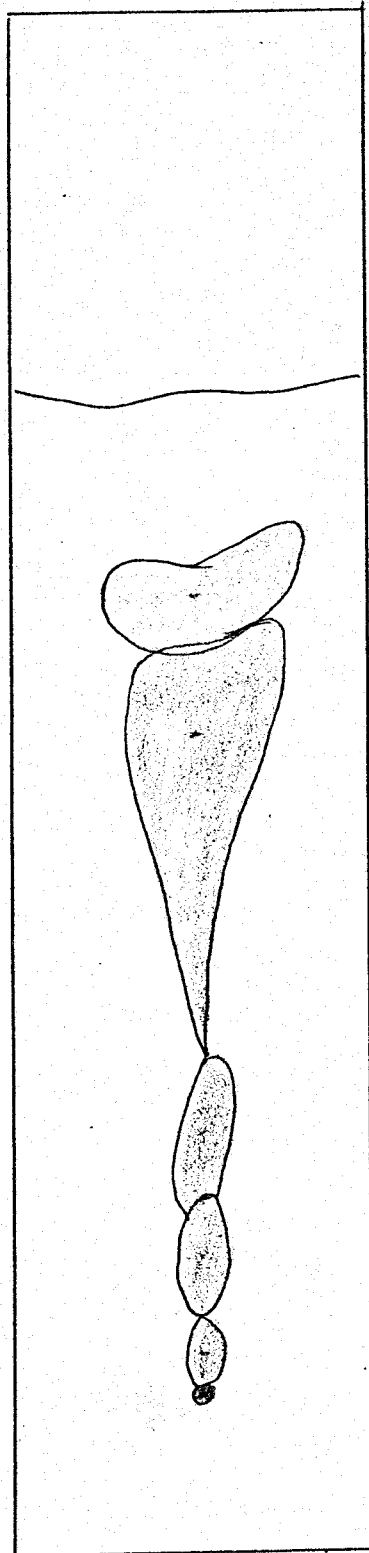
EA_b etOH

31ª DETERMINACION

Con la columna de Amberlita XAD-2 lavada y acondicionada, como se habia hecho en todos los ensayos anteriores, con / 100 cc de metanol al 1% en ClH y varios lavados con agua destilada hasta la pérdida de la acidez, se realizó el siguiente ensayo: 40 cc de agua destilada se hacen pasar a través de la columna, a continuación se eluye con 100 cc de hexano, se acidifica y se eluye con 100 cc de eter etílico, a continuación se deseca y se evapora el extracto, obteniendose el residuo del extracto etéreo del agua destilada: EA agua.

Se realizó una cromatografia en capa fina, con desarrollo en benceno:cloroformo 3:7 y revelado con sal de azul sólido B en NaOH 0,1N. (Figura 41)

Figura 41



Rf=0,04

0,13

0,28

0,66

0,77

EA agua

III.6. ENSAYO CON MUESTRA ANIMAL

Inyección de extracto de cannabis en conejo, obtención de orina y análisis de las muestras recogidas.

Preparación del extracto de grifa:

Partimos de 30 g de un polvo prensado, que se hizo hervir a reflujo durante 20 minutos, con 100 cc de hexano, se dejó enfriar y se filtró. El residuo se volvió a extraer con otros 100 cc de hexano a reflujo durante 20 minutos.

Se recogieron ambos extractos y se evaporaron hasta la obtención de un residuo siruposo, el peso de este residuo fue de 5,32 g .

El residuo siruposo se pasó a través de una columna de Silicagel, usando como eluyente hexano:eter etílico (240:60), el eluato se desecó y el residuo siruposo obtenido se pasó por columna de Alumina, usando como eluyentes:

1ª) Benceno:cloroformo 4:1

2ª) Benceno:cloroformo 2:1

3ª) Benceno:cloroformo 1:1

Se eluyó varias veces con benceno:cloroformo 1:1, / hasta lavado completo de la columna.

Las porciones obtenidas se reunieron y se evaporaron hasta sirupo. Previamente los eluatos se cromatografiaron para comprobar su contenido en cannabinoides.

La cantidad de residuo siruposo final, para inyectar al conejo fue de 1,32 g, se inyectó disuelto en aceite de oliva. Se le inyectó en una sola administración, a un conejo de 3,500Kg y se recogió la orina de las 24 y 48 horas.

Análisis de las muestras:

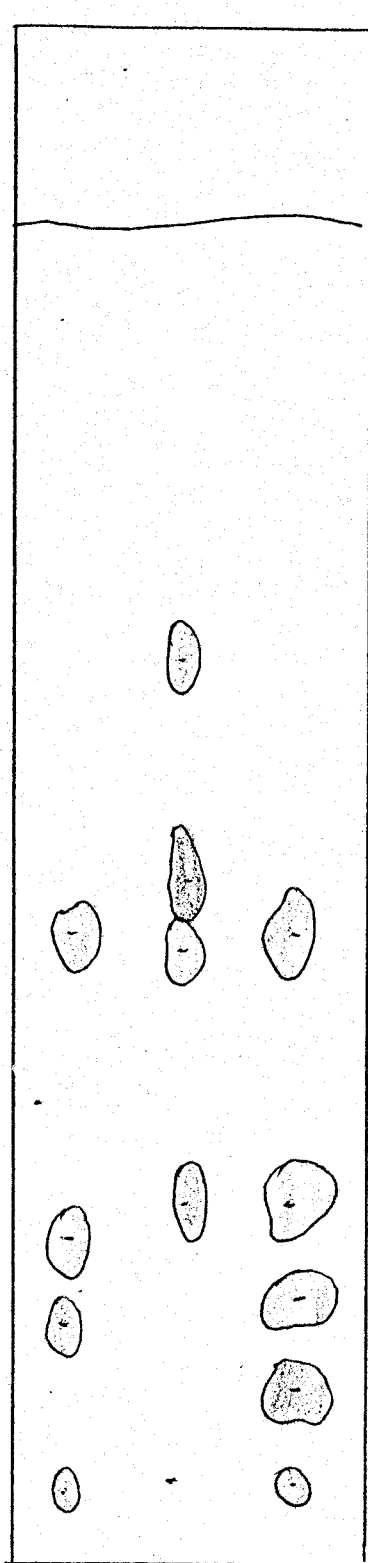
Con la orina de las 24 horas se hizo una extracción en columna de Amberlita XAD-2 y se obtuvieron los extractos hexánico y etéreo ácido, que se desecaron y evaporaron, obteniéndose los residuos: H_1 y EA_1 .

Con la orina de las 48 horas se efectuaron las mismas operaciones, obteniéndose los residuos de los extractos: H_2 y EA_2 .

Con los extracto obtenidos se realizó cromatografía en capa fina. (Figuras 43 y 44), cromatografía gaseosa y espectro_fotometria ultravioleta, dando resultados no significativos.

La determinación se completó con el análisis de muestras de orina blanco de conejo, que se sometieron a los mismos / procedimientos (Figura 45).

Figura 42



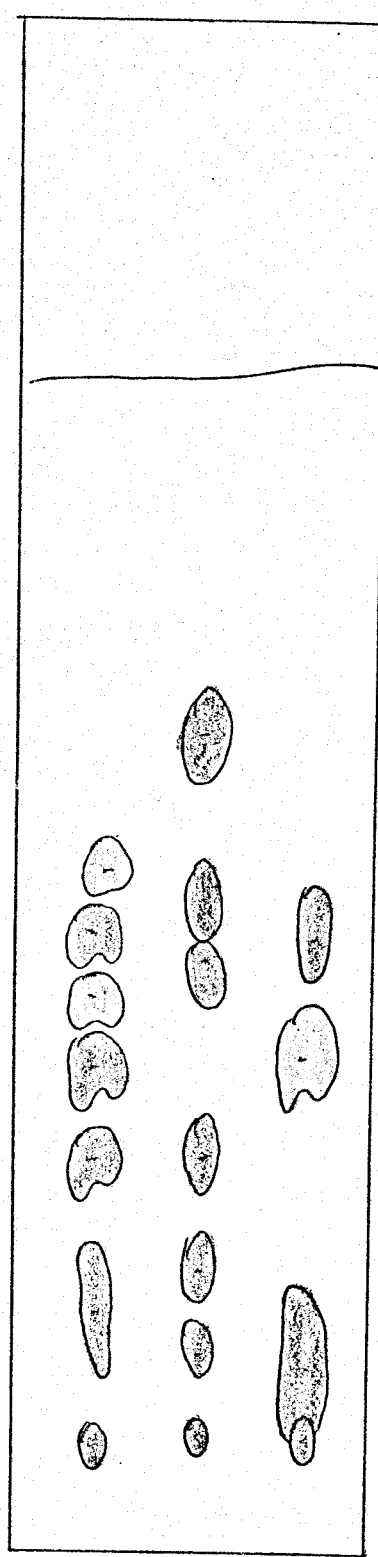
Rf $H_1=0,13$
0,20
0,44

Rf $EA_1=0,06$
0,15
0,21
0,43

Rf patrón=0,23
0,42
0,47
0,65

H_1 patrón EA_1

Figura 43



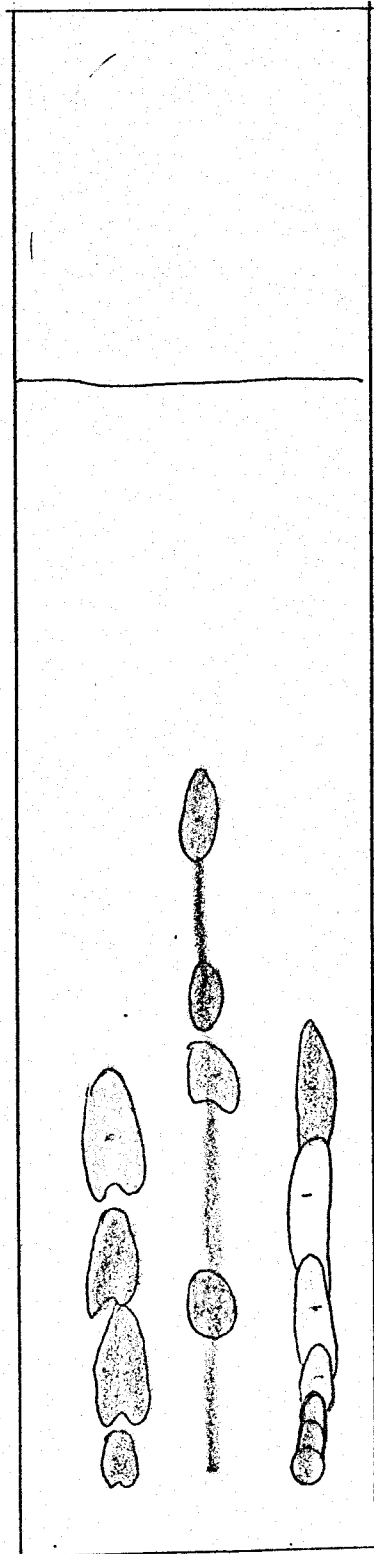
Rf H₂=0,13
0,26
0,36
0,42
0,48
0,54

Rf EA₂=0,11
0,37
0,48

Rf patrón=0,09
0,16
0,27
0,45
0,51
0,67

H₂ patrón EA₂

Figura 44



Rf H_{blanco} = 0,1
 0,20
 0,30

Rf EA_{blanco} = 0,15
 0,35
 0,49
 0,59

Rf patrón = 0,15
 0,35
 0,49
 0,59

H_{blanco} patrón EA_{blanco}

CONCLUSION

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

CONCLUSION

A pesar de los esfuerzos realizados y las numerosas condiciones ensayadas, no hemos logrado la separación de los metabolitos cannabicos, a partir de la orina, utilizando la columna de Amberlita XAD-2, ya que aunque el referido material retiene / los cannabinoides, no se consigue eluirlos por separado, ni privarles de compuestos fenólicos contaminantes o residuales que / interfieren la identificación cromatografica.

BIBLIOGRAFIA

AUGURELL, S.; BRINDER, M. y col. (1976)

"Cannabinoids: Metabolites Hidroxilated in the Pentil Chain"

Marihuana. Ed. G. G. Springer-Verlag, New York

BASTOS, M. y col (1972)

"Modifications of the XAD-2 resin colum method for the extrac-
tion of drugs of abuse from human urine"

J. Chromatogr. 71, 549-553

BASTOS, M. y col. (1973)

"Routine identification of drug abuse in human urine. III. Diffe-
rential elution of the XAD-2 resin"

J. Chromatogr. 81, 93

BOGUSZ, M.; GIERZ, J.; BIALKA (1978)

"Isolation of drugs from blood and tissues with XAD-2"

For. Sc. Int., 12, 73-82

BOUQUET, J.; (1950)

"Cannabis"

Bull. Narcot., 2, nº 4, 14-30

BREITER, J.; HELGER, R. y LANG, H. (1976)

"Evaluation of columna extraction: a new procedure for the analy-
sis of drugs in body fluids"

For. Sc., 7, nº 2, 131

Cooperación entre el Jaón y los Estados Unidos en la búsqueda /
del abuso de drogas (1973)

"Recherche sur le cannabis"

Bull.Stup. XXV nº 3

DAVIS, T.; FARMILO, G. y OSADCHUK (1963)

"Identification an origin determinations of cannabis by gas and
paper chromatography"

Anal.Chem., 35, 751-755

DECLÉIRE, M.; De CAT, W. (1977)

"Trace detection of herbicides in water by biotest. Study of va
rious procedure of extraction"

Rev.Agric.(Brussels), 90, (3), 589-94. Del C.A. 86, 1359

DELBEKE, F. y DEBECKER, M. (1977)

"Detection of sympathicomimetic central nervous stimulants with
special reference to doping"

J.Chromatogr., 133, 214-217

IBRAHIM y col. (1975)

"Aplication of Amberlite XAD-2 resin for general toxicological
analysis"

J.Chromatogr., 108, 107-116

LEMBERGER, L. (1976)

"Pharmacokinetics of ⁹-tetrahydrocannabinol and its metaboli
tes"

Marihuana. Ed. G.G.Nahas, Springer-Verlag, New York

LERNER, M. y ZEFFER, J. (1968)

"Determination of THC isomers in marihuana and hashish"

Bull. Narcot., 20, nº 2, 53-54

MECHOULAN, R. y GAONI, Y. (1966)

"Cannabichromene, a new active principle in hashish"

Chem. Commun., 1, 20-21

MECHOULAN, R.; MACCALLUN, N.; LEVY, S.; LANDER, N. (1976)

"Cannabinoids, Chemistry An Overview"

Marihuana. Ed. G. G. Nahas, Springer -Verlag, New York

MULE, S y col. (1971)

"Routine identification of drugs of abuse in human urine"

J. Chromatogr., 63, 298-301

NAHAS, M. (1977)

"Aspects biomédicaux de l'usage de cannabis"

Bull. Stup., XXIX, (2), 13-29

OMS (1971)

"The use of cannabis"

OMS, 1971, 478

OMS (1974)

"Investigación de fármacos causantes de dependencia en los humores orgánicos"

OMS, 1974, 556

PRANITIS, P.; MILZOFF, J. y STOLMAN, A. (1974)

"Extraction of Drugs from Biofluids and Tissues with XAD-2 Resin"

J. For. Sc., 19, 4, 917-926

PRANITIS, P. y STOLMAN, A. (1975)

"The differential elution of drugs from XAD-2 resin"

J. For. Sc., 20, 726-730

REPETTO, M. y MENENDEZ, M. (1970)

"Etude du cannabis. Recherche a partir de la plante, de la fumée et des urines"

J. Eur. Toxicol., 3, (6), 392

REPETTO, M. y MENENDEZ, M. (1972)

"Contribucion al estudio de la toxicomania por cannabis"

Rev. San. Hig. Pub., 46, 155-167

REPETTO, M. y LOPEZ-ARTIGUEZ, M. (1973)

"Identification of cannabinoids in viscera"

J. Eur. Toxicol., nº (4-5), 218-223

REPETTO, M. (1974)

"Interes de los metabolitos del cannabis"

2ª Jornadas Toxicológicas Españolas" 37-40

RICHARD, J. y FRITZ, J. (1974)

"Adsorption of chlorinated pesticides from river water with XAD-2 resin"

Talanta, 21, 91-3 .Del C.A. 81, 34335

SCHOOLAR, J.; HO, B. y ESTEVEZ, V. (1976)

"Comparaison of various solvent extractions for the chromatographic analysis of ⁹-THC and its metabolites"

Marihuana. Ed. G. G. Nahas, Springer-Verlag, New York

STOLMAN, A. y PRANITIS, P. (1977)

"XAD-2 resin drugs extraction methods for biological samples"

Clin. Toxicol., 10, 49-60

TEALE, J. y col. (1977)

"The use of radioimmunoassay in the detection of urinary cannabinoids"

Proceeding of the Europea Society of Toxicology, XVIII, 252-3

TENA, G y REPETTO, M. (1963)

"Aportación al estudio del cañamo español en su aspecto toxicológico"

Anal. Med. For., 173-180

VALLE, J. y col (1978)

"Influence du photoperiodisme sur le teneur en cannabinoïdes de Cannabis sativa L."

Bull. Stup., XXX, n°1, 69-70

VYUDILIK, W. (1975)

"Isolation of drugs with macro-reticular resin. Determination of phentemine in blood"

J, Chromatogr., 111, 439-442

INDICE

INDICE

I	INTRODUCCION	5
II	PARTE TEORICA	8
II.1.	Productos cannabicos y su metabolismo	9
II.2.	Resina Amberlita XAD-2	22
III	PARTE EXPERIMENTAL	25
III.1.	Métodos generales	26
III.1.1.	Preparación de la columna	26
III.1.2.	Procedimiento de extracción ..	26
III.1.3.	Hidrólisis de las muestras ...	27
Hidrólisis enzimática	27	
Hidrólisis ácida	28	
III.1.4.	Análisis de los extractos	28
III.1.4.1.	Cromatografía en capa fina .	28
III,1.4.2.	Cromatografía en papel	30
III.1.4.3.	Cromatografía gaseosa	30
III.1.4.4.	Espectrofotometria ultra- violeta.....	31

III.2. Productos comerciales	32
III.3. Muestras	33
III.4. Determinaciones en extracto de la planta ...	34
III.5. Determinaciones con orina	35
III.6. Ensayo con muestra animal	96

CONCLUSION

BIBLIOGRAFIA

INDICE