

**Verificación de un método analítico para detectar simultáneamente cocaína,  
sus metabolitos y 17 drogas de abuso en orina por cromatografía de gases  
acoplada a espectrometría de masas**



**Daniel Rovira Velásquez**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
Santiago de Cali  
2016**

**Verificación de un método analítico para detectar simultáneamente cocaína,  
sus metabolitos y 17 drogas de abuso en orina por cromatografía de gases  
acoplada a espectrometría de masas**



**Daniel Rovira Velásquez**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**


**DIRECTOR  
Frankly Javier Urbano Cerón, M.Sc.**

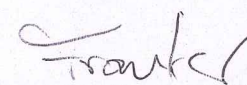
**CO-DIRECTOR  
Guillermo León Montoya, Ph.D.**

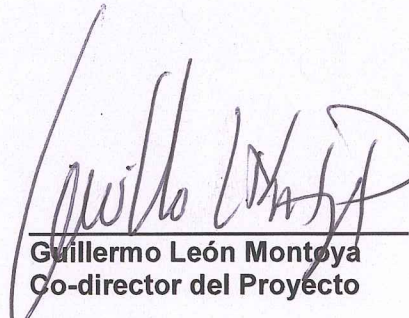
**INVESTIGADORA  
Caterin Quevedo Castro, MBA**

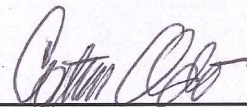
**Santiago de Cali  
2016**

**APROBADO POR:**

  
\_\_\_\_\_  
**Julián Arbey González Ospina**  
Evaluador

  
\_\_\_\_\_  
**Frankly Javier Urbano Cerón**  
Director del Proyecto

  
\_\_\_\_\_  
**Guillermo León Montoya**  
Co-director del Proyecto

  
\_\_\_\_\_  
**Caterin Quevedo Castro**  
Investigadora del Proyecto

**Santiago de Cali, 12 de septiembre de 2016**

## CONTENIDO

Lista de Tablas.....	1
Lista de Figuras .....	2
Resumen .....	3
Abstract.....	4
1. Introducción .....	5
2. Descripción del trabajo .....	7
2.1. Planteamiento del problema de investigación y justificación .....	7
2.2. Marco teórico y estado del arte.....	8
2.3. Objetivos.....	16
2.3.1. Objetivo general .....	16
2.3.2. Objetivos específicos .....	16
2.4. Metodología .....	17
2.4.1. Instrumentos, materiales y reactivos .....	17
2.4.2. Preparación de reactivos.....	18
2.4.3. Preparación de soluciones estándar .....	19
2.4.4. Recolección y enriquecimiento de muestras biológicas .....	21
2.4.5. Análisis del Sistema .....	22
2.4.6. Descripción del Método.....	22
2.4.7. Análisis cromatográfico .....	23
2.4.8. Evaluación de la eficacia de la columna .....	24
2.4.9. Verificación del método analítico .....	25
2.4.9.1. Selectividad.....	25
2.4.9.2. Linealidad.....	25
2.4.9.3. Límite de detección .....	26
2.4.9.4. Precisión (repetibilidad y reproducibilidad).....	26
2.4.9.5. Recuperación.....	27
2.4.9.6. Análisis de muestras de orina de casos forenses reales .....	27
2.4.9.7. Plan de trabajo.....	28
2.4.10. Matriz de marco lógico.....	29

2.5.	Resultados.....	30
2.6.	Discusión .....	41
2.7.	Conclusiones .....	50
2.8.	Recomendaciones .....	51
3.	Bibliografía.....	52

## AGRADECIMIENTOS

*A mis compañeros, profesores y amigos que contribuyeron en la materialización de este proyecto. Agradezco sinceramente haber compartido esta experiencia inolvidable con personas excepcionales.*

*Al profesor Guillermo Montoya por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles.*

*A la Dra. Caterin Quevedo por su valiosa enseñanza y empeño en el día a día.*

*Al profesor Frankly Urbano por instruirme y guiarme incondicionalmente de principio a fin.*

*Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses por concederme la maravillosa oportunidad de trabajar en sus instalaciones.*

*A la Universidad Icesi por darme las herramientas para convertirme en un excelente profesional.*

*A mi familia por el apoyo y el cariño inmenso que siempre me brindan.*

*A mi novia Isabel Muriel por estar siempre a mi lado y acompañarme en mis triunfos y en mis derrotas.*

*A mi hermano menor Andrés Rovira por su energía y coraje que siempre me motivan.*

*A mi padre Pablo Rovira por su estímulo y por estar siempre pendiente de mí.*

*Y en especial, a mi madre María Luz Velásquez por criarme con ternura, educarme con firmeza y enseñarme a compartir con generosidad.*

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Propiedades químicas de las sustancias analizadas.....	10
<b>Tabla 2.</b> Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los analitos.....	14
<b>Tabla 3.</b> Propiedades del diclorometano.....	15
<b>Tabla 4.</b> Equipos y accesorios.....	17
<b>Tabla 5.</b> Material de laboratorio.....	17
<b>Tabla 6.</b> Elementos de bioseguridad.....	18
<b>Tabla 7.</b> Reactivos.....	18
<b>Tabla 8.</b> Material de Referencia Certificado (MRC).....	19
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones de las soluciones de trabajo.....	21
<b>Tabla 10.</b> Descripción de la preparación de patrones externos (Sistema).....	22
<b>Tabla 11.</b> Descripción del procedimiento de extracción (Método).....	22
<b>Tabla 12.</b> Parámetros cromatográficos.....	23
<b>Tabla 13.</b> Relación de concentraciones para cada nivel de calibración.....	26
<b>Tabla 14.</b> Cuadro resumen del plan de trabajo que se llevó a cabo.....	28
<b>Tabla 15.</b> Matriz de marco lógico.....	29
<b>Tabla 16.</b> Tiempos de retención y principales iones de los compuestos analizados.....	31
<b>Tabla 17.</b> Número de platos teóricos ( $N$ ) y alturas equivalentes ( $H$ ).....	32
<b>Tabla 18.</b> Interferencias del Método en los tiempos de retención de los analitos.....	33
<b>Tabla 19.</b> Resultados en Excel de la regresión lineal para cocaína en el Sistema.....	34
<b>Tabla 20.</b> Análisis estadístico de la regresión lineal de cocaína en el Sistema.....	35
<b>Tabla 21.</b> Resultados de los modelos lineales de los analitos en el Sistema.....	36
<b>Tabla 22.</b> Resultados de los modelos lineales de los analitos en el Método.....	36
<b>Tabla 23.</b> Límites de detección en el Sistema y en el Método.....	37
<b>Tabla 24.</b> Precisión de los tiempos de retención en el Método.....	38
<b>Tabla 25.</b> Porcentajes de recuperación del Método.....	39
<b>Tabla 26.</b> Resultados del análisis de casos forenses reales.....	41

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Cromatógrafo GC-MS Agilent 6890N-5973.....	24
<b>Figura 2.</b> Muestras de orina en tubos de 15 mL.....	28
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas típicos del Método (arriba) y del Sistema (abajo).....	30
<b>Figura 4.</b> Espectro de masas de la cocaína.....	30
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración (a) y gráfico de residuos (b) de cocaína en el Sistema.....	33
<b>Figura 6.</b> Curva de calibración (a) y gráfico de residuos (b) de cocaína en el Método.....	34
<b>Figura 7.</b> Histograma de recuperación de los compuestos analizados.....	40
<b>Figura 8.</b> Solapamiento de los picos de ketamina y fluoxetina (a) y su diferenciación por <i>extracción de iones</i> (b).....	43
<b>Figura 9.</b> Solapamiento de los picos de diazepam y codeína (a) y su diferenciación por <i>extracción de iones</i> (b).....	43
<b>Figura 10.</b> Solapamiento de los picos de morfina y clorpromazina (a) y su diferenciación por <i>extracción de iones</i> (b).....	43
<b>Figura 11.</b> Cromatograma del Método en columna de 30 metros.....	44
<b>Figura 12.</b> Cromatograma del Método en columna de 60 metros.....	44
<b>Figura 13.</b> Espectro de masas de la fluoxetina obtenido (arriba) y espectro de referencia de la fluoxetina en la librería <i>NIST</i> (abajo).....	48
<b>Figura 14.</b> Espectro de masas de la nortriptilina obtenido (arriba) y espectro de referencia de la nortriptilina en la librería <i>NIST</i> (abajo).....	48
<b>Figura 15.</b> Espectro de masas de meperidina obtenido (arriba) y espectro de referencia de meperidina en la librería <i>NIST</i> (abajo).....	48
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas de flunitrazepam obtenido (arriba) y espectro de referencia de flunitrazepam en la librería <i>NIST</i> (abajo).....	48
<b>Figura 17.</b> Pico de la nortriptilina obtenido por <i>extracción de iones</i> .....	49



## Resumen

El objetivo principal de este trabajo fue verificar un método analítico cualitativo usando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para la determinación simultánea de cocaína, 4 de sus metabolitos y 17 drogas de abuso en orina. El tratamiento de las muestras se realizó mediante un procedimiento de extracción líquido-líquido usando diclorometano como solvente de extracción y estazolam como estándar interno. Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología de la Regional Suroccidente (Cali) del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. El método fue validado en el Laboratorio de Toxicología con sede en la ciudad de Bucaramanga, por lo que se verificaron parámetros metodológicos que garanticen su desempeño en el nuevo laboratorio. Los parámetros que se evaluaron fueron eficacia, selectividad, linealidad, límite de detección, precisión y recuperación. Se encontró que el método es apto para la detección en orina de 21 de los 22 candidatos. La eficiencia cromatográfica estuvo entre 139 090 y 2 471 543 platos teóricos para todas las sustancias, con 0,431 y 0,024 mm de alturas equivalentes, respectivamente. La duración de la corrida cromatográfica es de 40 minutos. Hubo uno de los compuestos (ecgonina) que presentó un inconveniente en la etapa de extracción, debido a su alta solubilidad en medio acuoso, por lo que se determinó que el método no es apto para confirmar la presencia de este metabolito en orina. Para las otras sustancias estudiadas, se encontró que el método fue selectivo con interferencias inferiores al 20%, excepto para fluoxetina (> 20%). Asimismo, el método demostró ser lineal en un rango de concentraciones de 200 a 1600 ng/mL para todos los analitos. Los límites de detección variaron de 43 a 264 ng/mL. La precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad arrojó porcentajes de coeficiente de variación entre 0,01 y 1,4%. Se halló que la recuperación varió entre 0,8 y 121,9%. Por último, el método fue evaluado durante la investigación de casos forenses relacionados con drogas de abuso, en donde se obtuvieron resultados satisfactorios. Con los resultados de estas pruebas experimentales se verificó que el método cumple con el objetivo previsto, para la confirmación de 21 sustancias de interés forense en el análisis de muestras biológicas de orina.

**Palabras clave:** Toxicología forense, drogas de abuso, validación/verificación de métodos analíticos, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## Abstract

The main objective of this research was to verify a qualitative method using gas chromatography-mass spectrometry technique, for simultaneous determination of cocaine, 4 of its metabolites and 17 drugs of abuse in urine. Preparation of the specimen was performed by liquid-liquid extraction using dichloromethane as extraction solvent and estazolam as internal standard. This research was conducted in the forensic laboratory of the *Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses* in Cali, Colombia. The method was validated in the Toxicology Laboratory based in the city of Bucaramanga, so methodological parameters were checked to ensure its performance in the new laboratory. The parameters evaluated were efficiency, selectivity, linearity, limit of detection, accuracy and recovery. It was found that the method is suitable for detection in urine for 21 of 22 candidates. Chromatographic efficiency was between 139 090 and 2 471 543 theoretical plates for all substances, with 0.431 and 0.024 mm equivalent heights, respectively. Chromatographic analysis takes 40 minutes. There was one of the compounds (ecgonine), which presented a drawback in the extraction stage, because of its high solubility in aqueous media, so it was determined that the method is not suitable to confirm the presence of this metabolite in urine. For the other substances studied, it was found that the method was selective with lower interference than 20%, except for fluoxetine (>20%). Also, the method was proved to be linear within the concentration range of 200-1600 ng/mL. Limits of detection ranged from 43-264 ng/mL. Intra-day and inter-day precision values were between 0.01 and 1.4 % in terms of CV%. It was found that the recovery ranged from 0.8 to 121.9%. Finally, the verified method was successfully used during the investigation of forensic cases involving drugs of abuse. With results of these experimental tests, the method was verified to meet the objective, for the confirmation of 21 substances of forensic interest in the analysis of biological samples of urine.

**Keywords:** Forensic toxicology, drugs of abuse, validation/verification of analytical methods, gas chromatography-mass spectrometry.

## 1. Introducción

En un estudio realizado en la ciudad de Medellín, Colombia, se exploró el consumo de drogas en 510 drogodependientes que, en el año 2011, asistieron a centros de tratamiento (Castaño, 2013). Este estudio reveló que las drogas de mayor prevalencia eran las benzodiazepinas; flunitrazepam y clonazepam, seguidas de las drogas de síntesis, donde se incluía ketamina. Luego aparecía la cocaína, seguida de los opiáceos, como morfina, codeína y meperidina. Los resultados del estudio alertaron sobre la necesidad de hacer seguimiento a las drogas de abuso por los riesgos que pueden implicar en la salud pública.

La relevancia y el continuo interés hacia los análisis cromatográficos de drogas de abuso, pueden explicarse por las diversas actividades y eventos relacionados con el consumo de estas drogas, lo cual genera un gran impacto en la sociedad y la salud de la población mundial. Estos análisis requieren de métodos fiables y adecuados para la identificación de distintas sustancias en matrices biológicas. En una revisión general de la literatura publicada en las dos últimas décadas, se revelaron importantes contribuciones de la cromatografía de gases en este campo (Molnár, 2015).

En las publicaciones científicas se encuentra una gran variedad de estudios, similares a los del presente trabajo, referentes a la identificación de drogas de abuso en matrices biológicas. Algunos se basan en un solo tipo de droga, como en la investigación de *Johansen et al.*, donde se describe un método cuantitativo para la determinación de cocaína y sus principales metabolitos en sangre y orina, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Johansen, 2007). También, está el trabajo de *Moreno et al.*, donde se desarrolló un método de análisis utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), para la identificación de ketamina y su principal metabolito, en orina y plasma (Moreno, 2015).

Otras investigaciones abarcan diferentes familias farmacológicas, como el estudio de *Dams et al.*, en el cual se desarrolló y se validó un método de análisis por LC-MS/MS, para cuantificar simultáneamente opiáceos, cocaína y metabolitos en orina (Dams, 2003). Asimismo, hay otros trabajos como el de *Truta et al.*, que presentó un método GC-MS/MS basado en la determinación simultánea de 14 antidepresivos comunes, en sangre, con extracción en fase sólida (Truta, 2016). Igualmente, se encuentra la investigación de *Lee et al.*, en donde se desarrolló y se validó un método LC-MS/MS para la identificación simultánea de múltiples drogas de abuso, benzodiazepinas y nuevas sustancias psicoactivas en orina (Lee, 2016).

Algunos estudios son aún más ambiciosos, como el de *Cheong et al.*, en Corea, que desarrolló un método GC-MS para la detección de 60 drogas ilícitas en orina, utilizando extracción en fase sólida (Cheong, 2010). Otro caso, es el de *Sempio et al.*, que desarrolló y validó un método para detectar 88 sustancias psicoactivas en sangre por LC-MS/MS y se comparó con un método GC-MS (Sempio, 2014). También hay trabajos inimaginables, como el de *Dresen et al.*, donde se describe un método que permite la detección simultánea de 700 fármacos y metabolitos en fluidos biológicos, empleando un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal de triple cuadrupolo híbrido, en una sola serie de análisis (Dresen, 2010).

El proyecto inicial de esta investigación, consistía en la detección de cocaína y sus metabolitos, únicamente. Al iniciar el proyecto, se descubrió que había un estudio similar al que estaba previsto (Monsalve, 2015), pero que abarcaba una mayor cantidad de sustancias. Fue por esto, que finalmente se le sumaron otras 17 sustancias a la investigación, con el fin de explotar al máximo el alcance del proyecto. El objetivo del presente trabajo fue verificar el método analítico utilizado para detectar simultáneamente 23 drogas de abuso en orina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, *Gas chromatography-Mass spectrometry*). La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología de la Regional Suroccidente (Cali) del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF). Este método fue validado previamente en la sede de Bucaramanga y se requirió de verificación para implementarlo en la sede de Cali. De acuerdo a esto, se evaluaron varios parámetros con la intención de garantizar su correcto desempeño; eficacia, selectividad, linealidad, límite de detección, precisión y recuperación. Con las pruebas documentadas obtenidas se evaluó que el método fuera adecuado para el análisis previsto y cumpliera con las condiciones de calidad establecidas en el Laboratorio de Cali.

El análisis toxicológico cualitativo tiene como finalidad, determinar mediante una serie de procesos (pretratamiento de muestras, extracción-purificación y análisis instrumental), la presencia o ausencia de sustancias tóxicas en una muestra biológica (Martínez, 2012). La complejidad de los procesos y las numerosas variables que pueden influir en los resultados, hacen que la determinación cromatográfica de drogas de abuso en orina represente un importante desafío. El método evaluado incluye una primera etapa de extracción líquido-líquido a partir de muestras de orina, donde se realizan varios procesos, que incluyen hidrólisis enzimática, ajuste de pH y derivatización química, entre otros. Luego, se realiza el análisis cromatográfico en un equipo GC-MS, en donde se deben configurar varios parámetros, como la temperatura del horno, velocidad de flujo de la fase móvil y parámetros de adquisición del detector, entre otros. En la manera en que se conozcan y se respeten las especificaciones en cada uno de estos procesos, se verá favorecida la calidad de los resultados. Por esto, resulta importante prestar cuidadosa atención a cada detalle del método, con el fin de reducir al máximo los posibles errores en el análisis.

## **2. Descripción del trabajo**

### **2.1. Planteamiento del problema de investigación y justificación**

El consumo de sustancias psicoactivas es uno de los problemas más graves en la sociedad actual, ya que se asocia a daños en la salud del consumidor y a numerosos fenómenos delictivos. La magnitud y las diversas formas del uso indebido de estas drogas, han obligado a las distintas naciones en el mundo a intensificar sus actividades de reglamentación, mediante la adopción de leyes estrictas que implican graves consecuencias para las personas acusadas de delitos relacionados con las drogas. En última instancia, el resultado de esas disposiciones legislativas depende de los resultados de las pruebas de laboratorio. Por este motivo, también han aumentado las exigencias a las que se ven sometidos los laboratorios nacionales (PNUFID, 1995).

En Colombia, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, es el organismo nacional encargado de prestar los servicios forenses a la comunidad y a la administración de justicia, sustentados en la investigación científica en un marco de calidad, imparcialidad y respeto por la dignidad humana (Medicinalegal.gov.co, 2016). Entre las condiciones de calidad que un laboratorio de toxicología debe cumplir, se encuentra el manejo de métodos validados que garanticen la fiabilidad de sus resultados.

Dentro de este contexto, se verificó el método del presente estudio y se demostró que es apto para detectar 21 sustancias de interés forense en orina, por GC-MS. Este método le aporta un gran beneficio al Laboratorio de Toxicología en Cali, ya que le permite cumplir con los requerimientos en el marco de programas internos de garantía de calidad del Instituto. Además, es un método altamente sensible, selectivo y rápido que se presta como una valiosa herramienta de trabajo para el análisis forense permitiendo detectar un gran número de sustancias psicoactivas.

La verificación realizada proporciona confianza y seguridad en los resultados obtenidos a partir del método. Asimismo, el hecho de trabajar con un método verificado minimiza el número de errores y repeticiones, lo que podría verse traducido en un ahorro de tiempo y costes. Finalmente, el presente estudio también puede ser de gran utilidad para los laboratorios forenses y la comunidad científica, nacional e internacional, que se encuentren en procesos similares de validación, verificación o desarrollo de métodos analíticos, confirmatorios de drogas de abuso en matrices biológicas.

## 2.2. Marco teórico y estado del arte

El *Informe Mundial sobre las Drogas 2016* publicó que 1 de cada 20 adultos, es decir, alrededor de 250 millones de personas en el mundo de entre 15 y 64 años, consumieron por lo menos una droga en 2014. De estas personas que consumieron drogas, se calcula que más de 29 millones sufren trastornos relacionados con ellas. A su vez, el número de muertes relacionadas con drogas en 2014, se calculó en alrededor de 207 400, es decir, 43,5 muertes por millón de personas en el mundo de entre 15 y 64 años (UNODC, 2016).

Por otro lado, el uso de drogas con intencionalidad delictiva es un fenómeno escasamente documentado en la literatura científica. No obstante, en un estudio demográfico realizado en Bogotá (Espinosa, 2014) donde se analizaron las intoxicaciones con intencionalidad delictiva entre los años 2008 y 2012, se encontró que de los 6276 casos de intoxicaciones delictivas evaluados, las sustancias químicas más utilizadas fueron sustancias desconocidas con un 31% de incidencia, seguido de las benzodiazepinas con un 27%. También se encontró que el 87,71% de los casos fueron confirmados por clínica y solo el 12,22% por laboratorio. Por último, se presentaron 9 casos con muerte, representando una letalidad del 0,14%.

Las drogas de abuso son sustancias psicotrópicas que se utilizan con el propósito de alterar deliberadamente el estado de la mente, generando cambios en la conducta, la percepción y la conciencia de las personas. Estas drogas psicotrópicas actúan a nivel del sistema nervioso central (SNC) al aumentar o disminuir la actividad de varios neurotransmisores. Estas sustancias han sido empleadas con diversos fines a lo largo de la historia. En medicina se usan como tratamiento eficaz contra el dolor, también en psiquiatría, entre otros. Sin embargo, debido a sus características propiamente psicotrópicas, estas sustancias suelen emplearse de forma recreacional, con el objeto de buscar sensaciones placenteras. Asimismo, suelen estar relacionadas con casos delictivos como; suicidio, homicidio, robo, abuso sexual, entre otros. Existen diferentes tipos de drogas de abuso. A continuación, se presentan algunas generalidades de las sustancias que fueron objeto de estudio en este trabajo.

La cocaína es un estimulante poderosamente adictivo que afecta directamente al cerebro. Se ha catalogado como la droga de los años 80's y 90's debido a su extensa popularidad y uso durante este periodo. Se puede consumir por vía oral, intranasal e intravenosa. Sus principales metabolitos son benzoilecgonina, ecgonina y metilecgonina, los cuales son todos inactivos (Moffat & al., 2011). Cuando se consume simultáneamente alcohol y cocaína, se forma el cocaetileno, el cual es más euforizante que la cocaína y es responsable de que el efecto de esta se intensifique y se prolongue (Carson R, 2008).

Los opiáceos son potentes analgésicos y son altamente adictivos. Estas drogas fueron desarrolladas y comercializadas con fines médicos. Sin embargo, después de innumerables casos de adicción y muerte, estas sustancias se someten actualmente a severos controles legales y de distribución (Narconon International, 2016). En este grupo, se analizaron dos alcaloides del opio que se producen de forma natural (morfina y codeína) y un opioide sintético (meperidina).

La ketamina es principalmente usada como anestésico veterinario. Previamente fue usada como anestésico humano pero su uso fue discontinuado debido a varios efectos adversos, incluyendo delirio, conducta irracional, alucinaciones y confusión. Es una droga disociativa, lo que significa que la persona que abusa de ella pierde contacto con sus pensamientos e identidad. La ketamina es usualmente consumida por jóvenes que llevan una vida nocturna de muchos riesgos, consumen otras clases de drogas y conducen prácticas sexuales poco saludables. Su uso es altamente restringido e ilegal (Narconon International, 2016).

La escopolamina, también conocida como “burundanga”, es un alcaloide anticolinérgico de la belladona. Produce pérdida de la voluntad, sugestionabilidad y amnesia (Medscape.com, 2016). Son muchos los casos que se conocen del uso de esta peligrosa droga con fines delictivos, sobre todo de índole sexual.

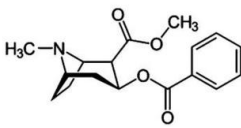
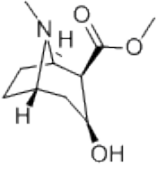
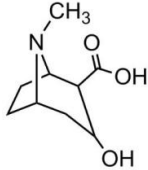
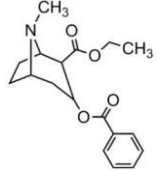
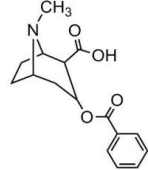
Los antidepresivos son medicamentos que se prescriben como tratamiento eficaz frente a la depresión y los trastornos de ansiedad. Por este motivo, se considera que son de fácil acceso para pacientes en riesgo de suicidio (Carson R, 2008). Entre los tipos de antidepresivos se incluyen los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los antidepresivos tricíclicos (ATC). En este trabajo se analizó un ISRS (fluoxetina), un ATC (nortriptilina) y la trazodona, un antidepresivo que estructuralmente no está relacionado con ninguna categoría de esta familia, pero también inhibe la recaptación de serotonina.

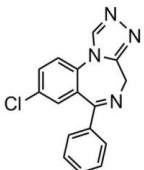
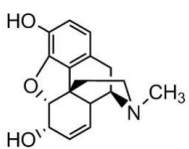
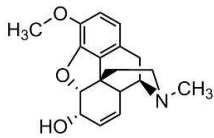
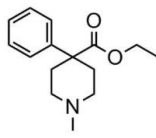
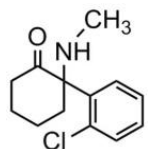
Las benzodiacepinas son la clase de sedantes, ansiolíticos e hipnóticos, más ampliamente prescrita en la práctica médica. Son depresoras del SNC y generan dependencia después de un uso prolongado. Son medicamentos que se encuentran bajo vigilancia pública debido a sus propiedades altamente adictivas y su vinculación con muertes y abusos sexuales (Narconon International, 2016). Se pueden clasificar de acuerdo a su tiempo de acción en: benzodiacepinas de acción corta, intermedia y prolongada. En esta investigación se analizaron dos de acción corta (flunitrazepam y alprazolam), tres de acción intermedia (oxazepam, bromazepam y lorazepam) y dos de acción prolongada (diazepam y clonazepam).

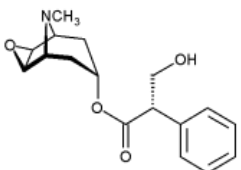
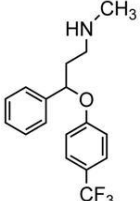
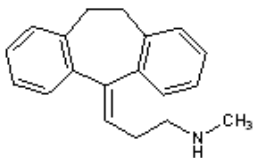
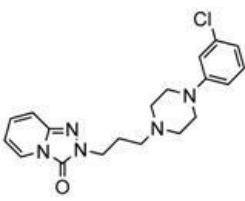
Los antipsicóticos, también denominados neurolepticos o tranquilizantes mayores, están indicados en el tratamiento de la esquizofrenia, del trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), de la psicosis refractaria y de los trastornos del estado de ánimo (Diamond, 2003). Actúan reduciendo la confusión, delirios, alucinaciones y agitación psicomotora en pacientes psicóticos. En este trabajo se analizó la

clorpromazina, que es un antipsicótico tradicional y la clozapina, un antipsicótico atípico (segunda generación). Los casos de sobredosis con estos medicamentos, se reportan con frecuencia en ingestas de múltiples sustancias. La elevación de la toxicidad se puede presentar por combinación con otros fármacos cuyo metabolismo se produce a través del sistema CYP450. La clozapina se ha asociado a depresión respiratoria cuando existe una ingesta simultánea de benzodiacepinas (Carson R, 2008).

**Tabla 1.** Propiedades químicas de las sustancias analizadas

Grupo	Estimulante del SNC	Metabolitos de la cocaína			
Compuesto	Cocaína	Metil-ecgonina	Ecgonina	Cocaetileno	Benzoil-ecgonina
Fórmula química	$C_{17}H_{21}NO_4$	$C_{10}H_{17}NO_3$	$C_9H_{15}NO_3$	$C_{18}H_{23}NO_4$	$C_{16}H_{19}NO_4$
PM	303,4	199,2	185,2	317,3	289,3
Estructura molecular					

Grupo	ISTD	Opiáceos			Alucinógeno
Compuesto	Estazolam	Morfina	Codeína	Meperidina	Ketamina
Fórmula química	$C_{16}H_{11}N_4Cl$	$C_{17}H_{19}NO_3$	$C_{18}H_{21}NO_3$	$C_{15}H_{21}NO_2$	$C_{13}H_{16}ClNO$
PM	294,7	303,4	299,3	247,3	237,7
Estructura molecular					

Grupo	Anticolinérgico	Antidepresivos		
Compuesto	Escopolamina	Fluoxetina	Nortriptilina	Trazodona
Fórmula química	$C_{17}H_{21}NO_4$	$C_{17}H_{18}F_3NO$	$C_{19}H_{21}N$	$C_{19}H_{22}ClN_5O$
PM	303,3	309,3	263,4	371,9
Estructura molecular				



Grupo	Benzodiazepinas				
Compuesto	Flunitrazepam	Alprazolam	Oxazepam	Bromazepam	Lorazepam
Fórmula química	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> O	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PM	313,2	308,7	286,7	316,1	321,1
Estructura molecular					

Grupo	Benzodiazepinas		Antipsicóticos	
Compuesto	Diazepam	Clonazepam	Clorpromazina	Clozapina
Fórmula química	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> S	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> Cl
PM	284,7	315,7	319,9	326,8
Estructura molecular				

Uno de los principales objetivos de la toxicología forense, consiste en detectar sustancias en matrices biológicas obtenidas de pacientes vivos o de cadáveres, para ayudar a establecer el diagnóstico de envenenamiento, la causa de muerte o la dilucidación de las circunstancias de muerte (Acosta Guzmán, 1961). No obstante, los métodos utilizados en los laboratorios de toxicología forense deben ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, deben de ser validados (UNODC, 2010).

La validación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su funcionalidad en términos de selectividad, precisión, entre otras. Si un laboratorio está utilizando un método validado, es necesario verificar parámetros críticos que afecten la calidad del análisis. La verificación supone determinar el cumplimiento de menos parámetros. Los resultados de la verificación pueden diferir levemente de los obtenidos en la validación, pero debe determinarse si son aceptables teniendo en cuenta el objetivo que se persigue al utilizar el método (UNODC, 2010). En este trabajo se verificó un método analítico (Monsalve, 2015) que permite la detección simultánea de 22 sustancias en muestras de orina, empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La cromatografía es un procedimiento de separación de los constituyentes de una mezcla. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles, una estacionaria y otra móvil. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes en la fase móvil conduce a su separación (Rouessac, 2003). En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte transportador. La separación se basa en la distribución del analito entre la fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (columna capilar). Esta técnica es un medio excelente para confirmar la presencia o ausencia de un supuesto componente en una mezcla, siempre que se disponga de un patrón (Skoog, 2001).

En el análisis cualitativo debe haber una identificación inequívoca de las sustancias detectadas. En consecuencia, una tendencia importante en este campo ha consistido en la combinación de las notables cualidades para el fraccionamiento que tiene la GC, con las propiedades superiores para la identificación que proporciona la espectrometría de masas (MS). El método que resulta se denomina método acoplado, y proporciona una potente herramienta para la identificación de los componentes de mezclas complejas (Skoog, 2001). La MS combina sensibilidad y especificidad en un grado hasta ahora no alcanzado por otras técnicas analíticas. Por ello, la MS es universalmente reconocida como la técnica idónea para la identificación inequívoca de compuestos (Martínez, 2012). Esta técnica se basa en la determinación de masas de especies atómicas o moleculares individuales, de los componentes de una muestra analizada, lo que permite recabar información sobre su naturaleza, su composición y su estructura. En el método acoplado, los componentes salen del flujo de la columna cromatográfica y entran a una fuente de iones, donde se ionizan y se fragmentan. El estudio de las trayectorias seguidas, en un recipiente sometido al vacío, permite determinar la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones. Para un determinado compuesto, operando en idénticas condiciones, la fragmentación es reproducible y por lo tanto característica (Agilent, 2003).

El resultado del análisis se representa por un cromatograma y un espectro de masas. El cromatograma es la representación gráfica de las señales que da el detector al paso de los distintos compuestos en función del tiempo. En él se observan una serie de picos que corresponden con los analitos detectados. Cada pico sale a un tiempo de retención ( $t_R$ ) determinado y tiene una altura y área determinadas. El espectro de masas muestra la abundancia estadística de cada ión formado indicando su relación masa/carga. Para la identificación cualitativa, se emplean los tiempos de retención y los iones característicos en los espectros de masas, mientras que las alturas de los picos y sus áreas dan información cuantitativa (Rouessac, 2003). La GC-MS corresponde a uno de los métodos más sensibles y específicos que existen para confirmar la presencia de drogas en un espécimen biológico (PNUFID, 1995).

Para el análisis se utilizó estazolam como estándar interno (ISTD, *Internal Standard*). El ISTD se usa como factor de normalización en los procedimientos de calibración, para compensar las variaciones de la respuesta del detector. Este se añade a los patrones de calibración y a las muestras con una concentración conocida y constante para facilitar la cuantificación de los analitos buscados. Las características fisicoquímicas del ISTD deben aproximarse lo más posible a las de los analitos (UNODC, 2010).

La matriz estudiada fue la orina. Esta es una de las muestras biológicas más comúnmente analizadas debido a varias ventajas que presenta con respecto a otro tipo de matrices. Es un desecho metabólico, su obtención no es invasiva, el peligro de contaminación microbiana para el analista es menor que cuando se trabaja con sangre y además, es un líquido con pocas interferencias presentes (proteínas, grasa) y con relativamente alta concentración de las drogas o sus metabolitos (Stashenko, 2012). Como lo recomienda el *Manual para uso de Laboratorios Nacionales* (PNUFID, 1995), la orina es la muestra preferida para la detección de drogas de abuso. Prácticamente todas las drogas y sus metabolitos se excretan en la orina y pueden detectarse en ella durante un período más largo que en la sangre. En los procedimientos de cromatografía, la adecuada preparación de la muestra es de suma importancia. Este tratamiento suele consistir en un proceso de varias etapas que incluyen, hidrólisis enzimática, extracción y purificación de los analitos. El procedimiento debe ser eficiente, pues la recuperación debe ser satisfactoria para poder extraer las pequeñas cantidades presentes, y selectivo, para asegurar que se retiren de la muestra las sustancias que pudieran interferir en el análisis.

El tratamiento de las muestras de orina se realizó por extracción líquido-líquido. Este procedimiento es el método más frecuentemente utilizado con el fin de aislar y concentrar solutos para el análisis por GC-MS. Es una técnica muy práctica cuando se trata de extraer muestras biológicas libres de proteínas, como lo es la orina, ya que es rápida, económica y eficiente. En esta técnica se debe tener en cuenta el coeficiente de partición y el pKa de la sustancia a extraer, así como la densidad y la polaridad del solvente de extracción y el pH del medio. Cuando una sustancia se encuentra disuelta a bajas concentraciones en un medio acuoso, su extracción hacia un solvente orgánico, se basa en la distribución de la forma no ionizada de la sustancia entre la fase acuosa y el solvente. Cuando se alcanza el equilibrio, la proporción de las concentraciones en las dos fases es constante. A partir de esto, se puede determinar el coeficiente de partición ( $K_p$ ) según la fórmula (1), donde  $C_o$  = Concentración en la fase orgánica y  $C_w$  = Concentración en la fase acuosa. A partir de  $K_p$  se determina su logaritmo decimal;  $\log P$ . Sobre esta base, el valor  $\log P$  en octanol/agua de un analito, es un buen indicador de la probabilidad de éxito de extracción desde un medio acuoso hacia un solvente orgánico. Entre mayor sea el valor de  $\log P$ , mayor será la probabilidad de que el soluto sea extraído en el solvente orgánico (Moffat & al., 2011).

$$K_p = C_o / C_w \quad (1)$$

Por otro lado, para los compuestos que no son neutros, es decir, ácidos, básicos o anfóteros, el comportamiento de la distribución, también se ve controlado por la disociación electrolítica dependiente del pH. A un pH determinado, el equilibrio de la disociación electrolítica puede describirse a partir del pKa. De acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch, una sustancia ácida o básica se ioniza en un 50% a un pH igual a su pKa. Todos los analitos que se analizaron en este estudio son de carácter básico. Para sustancias básicas, el 99% de la ionización se alcanza a dos unidades o más de pH, por debajo de su pKa. De la misma forma, el 1% de la ionización se observa a dos unidades o más, por encima de su pKa. En este sentido se concluye que el mayor rendimiento de extracción de sustancias básicas, se observa a un pH de dos unidades o más por encima de su pKa (Moffat & al., 2011). En la tabla 2 se presentan los valores de pKa de las sustancias analizadas, así como el log P, el porcentaje de excreción por orina y el tiempo aproximado en que estas sustancias pueden ser detectadas en orina después de su consumo.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los analitos

Compuesto	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	log P <sup>a</sup>	Excreción por orina <sup>b</sup>	Detección en orina <sup>c</sup>
Estazolam (ISTD)	4,9	-	2,09	-	-
Cocaína	8,6	-	2,3	1 – 9 %	6 – 12 horas
Metilecgonina-TMS	9,0	14,6	0,6	33 – 60 %	2 – 3 días
Ecgonina-TMS2	2,8	11,1	-3,8	10 %	2 – 3 días
Cocaetileno	8,7	-	2,7	10 %	2 – 3 días
Benzoilecgonina-TMS	3,1	9,5	-1,3	35 – 55 %	2 – 3 días
Meperidina	8,7	-	2,7	10 %	2 – 3 días
Fluoxetina	9,8	-	4,17	10 %	2 – 4 días
Ketamina	7,5	-	3,1	2 %	3 días
Nortriptilina	10,1	-	4,51	5 %	2 – 10 días
Escopolamina	7,6	-	1,2	5 %	6 – 12 horas
Oxazepam-TMS2	1,7	11,6	2,24	70 – 80 %	40 – 80 horas
Bromazepam-TMS	2,9	11,0	2,05	2 %	40 – 80 horas
Codeína-TMS	8,2	-	0,6	40 – 70 %	2 – 4 días
Diazepam	3,5	-	2,8	70 %	7 días o más
Lorazepam-TMS2	1,3	11,5	2,4	75 %	40 – 80 horas
Morfina-TMS2	8,0	9,9	-0,1	65 – 70 %	2 – 4 días
Clorpromazina	9,3	-	3,4	1 %	2 – 3 días
Flunitrazepam	1,8	-	2,1	1 %	24 horas
Clonazepam-TMS	1,5	10,5	2,41	1 %	7 días o más
Clozapina	3,7	7,6	3,23	1 %	2 – 3 días
Alprazolam	2,4	-	2,12	11 %	24 horas
Trazodona	7,09	-	3,2	1 %	2 – 3 días

<sup>a</sup> log P (octanol/agua pH 7,4), <sup>b</sup> (Moffat & al., 2011), <sup>c</sup> (Wolff, 2001)

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la extracción líquido-líquido, es la glucuronidación. En el proceso metabólico humano, muchas de las drogas se conjugan con el ácido glucurónico, mediante la acción de las enzimas UDP-glucuronosiltransferasas (UGT). Los compuestos que forman conjugados glucurónicos deben hidrolizarse antes de la extracción, ya que la forma conjugada es altamente soluble en la fase acuosa (orina) y no se extrae en el solvente orgánico. En el presente trabajo se utilizó una solución de  $\beta$ -Glucuronidasa Tipo HP-2 de *Helix pomatia*, para la hidrólisis enzimática de los glucurónicos en orina. Esta enzima tiene un rango de pH óptimo de 4,5 a 5,0 para su actividad (Sigma-Aldrich, 2016).

Por otra parte, el solvente de extracción debe tener una polaridad apropiada para que atraiga los compuestos de interés sin co-extraer una cantidad excesiva de contaminantes polares. Las propiedades del solvente de extracción utilizado en este método se presentan en la siguiente tabla (Moffat & al., 2011).

**Tabla 3.** Propiedades del diclorometano

Solvente de extracción	Densidad (g/mL)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad (g/100 mL de agua a 20°C)	Índice de polaridad (agua = 10,2)
Diclorometano	1,34	40	2	3,1

Además, se debe tener en cuenta que en GC-MS es necesario derivatizar algunos compuestos, principalmente los que tienen grupos funcionales polares (hidrógenos activos) con el fin de mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y en algunos casos la sensibilidad en la detección. Dentro de los grupos funcionales presentes en una molécula susceptibles de ser derivatizados se encuentran; -COOH, -OH, -NH y -NH<sub>2</sub>, generándose reacciones de derivatización química como acilaciones, alquilaciones, esterificaciones, silanizaciones o procesos análogos (Sicachá, 2015). Para reconocer los compuestos que sufren la derivatización, se marcaron con -TMS y -TMS<sub>2</sub>, para indicar que se derivatizan en uno o en dos grupos funcionales, respectivamente (tabla 2). En este trabajo se utilizó como derivatizante una solución de BSTFA – TMCS (1%) [N,O-Bis (Trimetilsilil) Trifluoroacetamida – Clorotrimetilsilano (1%)], la cual produce reacciones de silanización.

Según lo que se establece en el manual de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC, 2010), los métodos cualitativos de análisis de drogas requieren, para su verificación, que se determine la siguiente serie de parámetros:

- Selectividad
- Límite de detección
- Precisión (en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad)

Para la verificación de este método, se evaluó la selectividad, el límite de detección y la precisión, como lo establecen las Naciones Unidas, y adicionalmente se evaluaron parámetros de linealidad y recuperación. Igualmente, se evaluó la eficiencia de la columna cromatográfica utilizada en el método.

El método que se evaluó había sido previamente validado en el Laboratorio de Toxicología de la Regional Nororiental (Bucaramanga) del INMLCF (Monsalve, 2015). Con las pruebas documentadas obtenidas en el presente trabajo, se busca que el Laboratorio de Toxicología de la Regional Suroccidental (Cali) del INMLCF, cumpla con la verificación del método analítico en el marco de programas internos de garantía de calidad actuales, para que pueda ser usado de manera rutinaria en el análisis forense.

## **2.3. Objetivos**

### **2.3.1. Objetivo general**

Verificar el desempeño de un método GC-MS, empleado para la determinación simultánea de 23 drogas de abuso en orina, en el Laboratorio de Toxicología del INMLCF en Cali.

### **2.3.2. Objetivos específicos**

Para cada una de las drogas estudiadas:

- Evaluar la eficacia de la columna cromatográfica.
- Evaluar la selectividad del método.
- Evaluar la linealidad y el límite de detección del método.
- Evaluar la precisión del método en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.
- Evaluar el porcentaje de recuperación del método.

## 2.4. Metodología

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología Forense del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF) de Cali. A continuación se muestra el enfoque metodológico con el cual se abordó la investigación. Primero se presentan los instrumentos, materiales y reactivos utilizados. Luego se describe la preparación de reactivos y de estándares y la recolección de las muestras de orina. Se detalla el método estudiado, que comprende una primera etapa de extracción líquido-líquido y a una etapa final de análisis cromatográfico. Finalmente, se describen los parámetros evaluados para la verificación del método analítico.

### 2.4.1. Instrumentos, materiales y reactivos

**Tabla 4.** Equipos y accesorios

<b>Equipo cromatográfico</b>	Cromatógrafo de gases	<i>Agilent 6890 Network GC System</i>				
	Automuestrador	<i>Agilent 7683 Series Autosampler</i>				
	Inyector	<i>Agilent 7683B Series Injector</i>				
	Detector selectivo de masas	<i>Agilent 5973 Network Mass Selective Detector</i>				
<b>Columna</b>	Columna GC capilar Agilent HP - 5MS					
	Longitud	60m	Diámetro	0.320 mm	Fase estacionaria	0.25 $\mu$ m
<b>Software</b>	MSD ChemStation, Bases de datos: <i>NIST, Wiley.</i>					
<b>RapidVap</b>	LABCONCO					
<b>Balanza analítica</b>	Mettler AE200					
<b>Agitadores</b>	Vortex, Titer Plate Shaker					
<b>Centrífuga</b>	Fischer Scientific					
<b>Ultrasonido</b>	ELMA E30H Elmasonic					

**Tabla 5.** Material de laboratorio

<b>Material de laboratorio</b>	Tubos de ensayo de 10 y 15 mL tapa rosca
	Balones aforados de 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 1000 mL
	Vasos de precipitados de 50 y 1000 mL
	Viales de vidrio transparente tapa rosca de 2 mL
	Viales de vidrio transparente de 10 mL con tapón de teflón y agrafe
	Insertos para viales de 100 $\mu$ L con pie de polímero
	Grafador de viales
	Desgrafador de viales
	Pipetas pasteur de vidrio
	Micropipetas de 10-100 y 200-1000 $\mu$ L calibradas
	Puntas para micropipeta de embolo no automática de 200 y 1000 $\mu$ L
	Papel indicador de pH 1-14
	Campana de extracción para solventes

**Tabla 6.** Elementos de bioseguridad

<b>Elementos de bioseguridad</b>	Bata de laboratorio y bata para cirugía con protección frontal
	Gorro desechable para laboratorio
	Gafas de protección
	Tapabocas y respiradores con filtros para solventes
	Guantes de nitrilo desechables

**Tabla 7.** Reactivos

Nombre	Función
Metanol	Solvente para soluciones madre
$\beta$ -Glucuronidasa Tipo HP-2 de <i>Helix pomatia</i>	Enzimas para hidrólisis de glucurónidos
Ácido acético glacial	Buffer de $\beta$ -glucuronidasa
Tetraborato de sodio decahidratado	Buffer de extracción
Amoniaco	Modulador de pH de extracción
Diclorometano	Solvente orgánico para extracción
BSTFA – TMCS (1%)	Derivatizante
Acetato de etilo	Solvente de reacción para derivatización
Sulfato de sodio anhidro	Desecante

### 2.4.2. Preparación de reactivos

En la etapa del tratamiento de las muestras (2.4.6.), previa al análisis cromatográfico, se utilizaron varios reactivos que requirieron a su vez de una preparación previa.

Buffer pH 4,5: Esta solución se utilizó para ajustar el pH del medio al valor requerido (4,5 - 5), para que la actividad de la glucuronidasa fuera óptima. Para su preparación, se tomaron 10 mL de ácido acético glacial y se diluyeron en 110 mL de agua destilada. Se dejó reposar y se verificó que el pH fuera de 4,5.

Buffer pH 10: La adición de un buffer alcalino débil favorece la extracción de bases débiles manteniéndolas en su forma no ionizada. Se preparó pesando 40 g de tetraborato de sodio decahidratado y se llevó a 1 L con agua destilada. Se dejó reposar y se verificó que el pH fuera de 10.

Solución derivatizante: La derivatización permite analizar algunos compuestos lábiles que de otra forma no serían detectados por GC-MS. Se preparó mezclando una solución de BSTFA – TMCS (1%) con una solución de acetato de etilo en una relación de 1:1. La solución de acetato de etilo fue desecada previamente con la adición de sulfato de sodio anhidro.



### 2.4.3. Preparación de soluciones estándar

Estándar interno (ISTD, *Internal Standard*): El ISTD se utiliza como factor de normalización en los procedimientos de calibración, para compensar las variaciones de la respuesta del detector. Se preparó una solución madre de estazolam (ISTD), pesando 10 mg de material de referencia certificado (MRC) de estazolam, en vial de vidrio de 10 mL, y disolviendo con 10 mL de metanol. El vial se tapó con tapón de teflón, se selló con agrafe, se rotuló y se almacenó protegido de la luz en refrigeración (2-8°C).

**Tabla 8.** Material de Referencia Certificado (MRC)

Nombre	Proveedor	Lote	Catálogo	Forma	Pureza (%)
Estazolam	Sigma	089K4089	E3638-50MG	Polvo	99,5
Cocaine hydrochloride	Sigma	036K1662	C5776	Polvo	99,0
Ecgonine methylester.HCl	Lipomed	205.1B13.1	COC-205-HC-10	Polvo	98,8
Ecgonine.HCl	Lipomed	206.1B11.2L1	COC-206-HC-1LM	Solución	98,1
Cocaethylene	Lipomed	207.1B9.1	COC-207-FB-10	Polvo	99,9
Benzoyllecgonine	Lipomed	204.1B14.1L1	COC-204-FB-1LM	Solución	99,5
Meperidine.HCl	Lipomed	699.1B0.2	MEP-699-HC-50	Polvo	99,7
Fluoxetine hydrochloride	Sigma	120M1241V	F132-50MG	Polvo	99,0
S-(+)-Ketamine hydrochloride	Sigma	021K1293	K1884	Polvo	99,0
Nortriptyline hydrochloride	Sigma	BCBN0630V	N7261	Polvo	98,0
(-)-Scopolamine hydrobromide trihydrate	Sigma	SLBP0022V	S1875	Polvo	98,0
Oxazepam	Sigma	029K4073	O5254	Polvo	99,5
Bromazepam	Sigma	56F0686	B4144	Polvo	100,0
Diazepam	Sigma	105F0451V	D0899	Polvo	99,0
Codeine.monohydrate	Lipomed	69.1B0.1	C-69-FB-100	Polvo	99,7
(±)-Lorazepam	Sigma	035F0115V	L1764-50MG	Polvo	99,0
Morphine.sulfate. Pentahydrate	Lipomed	35.1B8.1	M-35-SU-50	Polvo	99,7
Chlorpromazine Hydrochloride	Sigma	SZBF118XV	31679	Polvo	99,3
Flunitrazepam	Lipomed	72.1B0.3	FLU-72-50	Polvo	99,9
Clonazepam	Sigma	028K1450V	C1277	Polvo	99,0
Clozapine	Sigma	010K1204	C6305	Polvo	99,0
Alprazolam	Lipomed	118.1B0.1	ALP-118-FB-10	Polvo	99,9
Trazodone hydrochloride	Sigma	071M1634V	T6154-1G	Polvo	100,0

Soluciones madre: Se prepararon 22 soluciones madre (una para cada analito) pesando 10 mg de MRC en vial de vidrio de 10 mL, y disolviendo con 10 mL de metanol. Los viales se taparon con tapón de teflón, se sellaron con agrafe, se rotularon y se almacenaron protegidos de la luz en refrigeración (2-8°C). Los estándares que vienen en solución no requirieron de esta preparación.

Soluciones de trabajo: A partir de las soluciones madre, se prepararon 6 soluciones mezcla (con todos los analitos menos el ISTD) a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ng/mL). Para ello se calculó la concentración de la forma básica de cada analito en su solución madre y se determinó el volumen a tomar para obtener concentraciones finales de 800 y 1600 ng/mL en 200 mL. A partir de estas últimas, se prepararon el resto de soluciones mezcla por diluciones sucesivas. A continuación se muestra un ejemplo de cálculo con la cocaína:

MRC: Clorhidrato de cocaína

PM Base (cocaína): 303,35 g/mol

PM Sal (clorhidrato de cocaína): 339,80 g/mol

Cantidad (mg) de cocaína base en solución madre:

$$m_{\text{cocaína base}} = m_{\text{MRC pesado}} \times \frac{\text{PM Base}}{\text{PM Sal}} \times \frac{\text{Pureza}}{100} \quad (2)$$

$$m_{\text{cocaína base}} = 10 \text{ mg} \times \frac{303,35 \text{ g/mol}}{339,80 \text{ g/mol}} \times \frac{99,0\%}{100\%} = 8,8 \text{ mg de cocaína base}$$

Concentración de la solución madre:

$$C_{\text{madre}} = \frac{m_{\text{cocaína base}}}{V_{\text{metanol}}} \quad (3)$$

$$C_{\text{madre}} = \frac{8,8 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 0,880 \text{ mg/mL} = 880 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Volúmenes de solución madre ( $V_{\text{madre}}$ ) a tomar para preparar soluciones de trabajo a 800 y 1600 ng/mL en volumen final de 200 mL:

Para 800 ng/mL:

$$V_{\text{madre}} = \frac{C_{\text{trabajo}}}{C_{\text{madre}}} \times V_{\text{final}} \quad (4)$$

$$V_{\text{madre}800} = \frac{0,8 \text{ } \mu\text{g/mL}}{880 \text{ } \mu\text{g/mL}} \times 200 \text{ mL} = 0,182 \text{ mL} = 182 \text{ } \mu\text{L}$$

Para 1600 ng/mL:

$$V_{\text{madre}1600} = \frac{C_{1600}}{C_{\text{madre}}} \times V_{\text{final}}$$

$$V_{madre1600} = \frac{1,6 \mu g/mL}{880 \mu g/mL} \times 200 mL = 0,364 mL = 364 \mu L$$

De igual manera se determinaron los volúmenes para los otros analitos. Las soluciones de 200 y 400 ng/mL se prepararon tomando 50 mL de las soluciones de 800 y 1600 ng/mL, respectivamente, y llevando a 200 mL con metanol. De la misma forma, las soluciones de 50 y 100 ng/mL se prepararon tomando 50 mL de las soluciones de 200 y 400 ng/mL, respectivamente, y llevando a 200 mL con metanol. Asimismo, se prepararon 200 mL de solución de trabajo de ISTD (estazolam) a una concentración de 6 µg/mL.

Las concentraciones empleadas se basan en los puntos de corte en orina establecidos a nivel internacional para la determinación de drogas de abuso, siendo 300 ng/mL para cocaína (Pérez de los Cobos Peris, 2006).

**Tabla 9.** Concentraciones de las soluciones de trabajo

Nivel	Concentración (ng/mL)
ISTD	6000
1	50
2	100
3	200
4	400
5	800
6	1600

#### 2.4.4. Recolección y enriquecimiento de muestras biológicas

Las muestras de orina fueron recolectadas de personas de quienes se tenía conocimiento de no estar ingiriendo ningún tipo de medicamento. Las muestras fueron recogidas en frascos plásticos y preservadas bajo refrigeración (2-8°C).

El enriquecimiento de las muestras de orina con los analitos de interés se llevó a cabo de la siguiente manera: En tubo de 15 mL se adicionaron 3 mL de solución de trabajo y se evaporaron en rapidvap a 60°C, hasta que quedaron 100 µL aproximadamente. Luego se diluyeron en 3 mL de orina recolectada y se agitó. De esta forma se obtuvieron controles positivos de orina que contenían todos los analitos estudiados a concentraciones conocidas.

A partir de las soluciones de estándares y de las muestras de orina recolectadas y enriquecidas, se hicieron dos tipos de análisis. Uno que se denominó Sistema (con S mayúscula) para referirse al análisis directo de las soluciones de estándares y en el cual no se utilizó orina, por lo que no fue necesario el procedimiento de extracción. El otro se denominó Método (con M mayúscula), correspondiente al análisis completo de muestras de orina, incluyendo la extracción. A continuación se detallan estos aspectos.

### 2.4.5. Análisis del Sistema

El análisis del Sistema consiste en el estudio de patrones externos con concentraciones conocidas de analitos. Estos patrones se prepararon a partir de muestras de soluciones de trabajo en cantidades idénticas a las que establece el Método (3 mL), a las cuales se les añadió el ISTD y el derivatizante, como se describe en la tabla 10. El Sistema se utilizó para realizar curvas de calibración (2.4.8.2.) y determinar el porcentaje de recuperación del Método (2.4.8.5.).

**Tabla 10.** Descripción de la preparación de patrones externos (Sistema)

Etapa	Descripción
Adición de estándar interno	En tubo de 10 mL se tomaron 3 mL de solución de trabajo y se adicionó el ISTD: 200 µL de estazolam (6 µg/mL).
Secado y derivatización	Se evaporó a sequedad a 60°C en rapidvap. Se reconstituyó con 100 µL de solución derivatizante, se tapó y se calentó por 30 min. a 60°C en rapidvap.
Análisis cromatográfico	Se transfirió el reconstituido a un vial con inserto para ser inyectado en el cromatógrafo de gases con el método propuesto.

### 2.4.6. Descripción del Método

El proceso de extracción a partir de las muestras de orina corresponde al Método. Este se llevó a cabo por extracción líquido-líquido.

**Tabla 11.** Descripción del procedimiento de extracción (Método)

Etapa	Descripción
1	Adición de estándar interno En tubo de 15 mL se tomaron 3 mL de muestra de orina enriquecida y se adicionó el ISTD: 200 µL de estazolam (6 µg/mL).
2	Hidrólisis enzimática de glucurónidos Se adicionaron 500 µL de buffer pH 4,5, se agitó y se confirmó pH (4,5 - 5). Se adicionaron 100 µL de β-glucuronidasa, se tapó y se calentó a 56°C por 2 horas en rapidvap.
3	Extracción alcalina Se adicionaron 4 mL de buffer pH 10, se agitó y se confirmó pH (9 - 10). Se ajustó pH con 1 a 2 gotas de amoniaco cuando fue requerido. Se adicionaron 8 mL de diclorometano, se tapó, se agitó por 2 horas en tittle plate shaker y se centrifugó a 1500 rpm por 30 min.
4	Separación de fases Se separó la fase orgánica y se transfirió a un tubo de ensayo de 10 mL.
5	Secado y derivatización Se evaporó a sequedad la fase orgánica, a 60°C en rapidvap. Se reconstituyó con 100 µL de solución derivatizante, se tapó y se calentó por 30 min. a 60°C en rapidvap.
6	Análisis cromatográfico Se transfirió el reconstituido a un vial con inserto para ser inyectado en el cromatógrafo de gases con el método propuesto.

**Muestras blanco:** Los procesos de extracción se realizaron también en tres tipos de blanco (controles negativos); uno de reactivos, uno de orina y otro de estándar interno, para evaluar las interferencias (2.4.8.1.).

En el Método, primero se ajusta el pH del medio a un valor ácido (4,5) para optimizar la acción de la  $\beta$ -glucuronidasa y luego a un pH básico (10) para asegurar que los compuestos que van a ser extraídos no se encuentren ionizados. En la fase de derivatización se usa una cantidad baja de solución derivatizante (100  $\mu$ L), lo que permite concentrar la muestra antes del análisis cromatográfico.

### 2.4.7. Análisis cromatográfico

El análisis se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo de marca Agilent modelo 6890N-5973 (figura 1). Las condiciones cromatográficas del método se describen en la tabla 12.

**Tabla 12.** Parámetros cromatográficos

<b>INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: 6890N-5973</b>			
<b>OVEN</b>			
Maximum temp	315 °C	Ramps	
Equilibration time	0,50 min		
Initial temp	80 °C	#	Rate
Initial time	3,00 min	1	15,00
Post temp	0 °C	2	10,00
Post time	0,00 min	3	0,0 (Off)
Run time	39,18 min		
<b>FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)</b>			
Liner	splitless, single taper, deactivated (Model Agilent 5190-2270)		
Mode	Pulsed Splitless	Total flow	34,8 mL/min
Initial temp	250 °C (On)	Gas saver	On
Pressure	12,36 psi (On)	Saver flow	20,0 mL/min
Pulse pressure	30,0 psi	Saver time	2,00 min
Pulse time	1,00 min	Gas type	Helium
Purge flow	30,0 mL/min	Injection Volume	2,00 microliters
Purge time	1,50 min		
<b>COLUMN</b>			
Capillary Column		Average velocity	34 cm/sec
Model Number	Agilent 19091S-416 HP-5MS	Inlet	Front Inlet
Mode	Constant flow	Outlet	MSD
Initial flow	1.7 mL/min	Outlet pressure	vacuum
Nominal init pressure	12,37 psi		
<b>MS ACQUISITION PARAMETERS</b>			
Tune File	atune.u	Low mass	50,0
Acquisition Mode	Scan	High mass	550,0
Solvent Delay	6,20 min	MS Quad	150 °C
		MS Source	230 °C



Figura 1. Cromatógrafo GC-MS Agilent 6890N-5973

#### 2.4.8. Evaluación de la eficacia de la columna

El objetivo principal de la cromatografía es separar los componentes de una mezcla. La separación depende del ancho de los picos y del espacio de tiempo entre los picos. La eficacia cromatográfica es el parámetro que cuantifica la preferencia por los picos estrechos. Esta propiedad puede obtenerse de las características de un pico individual, pero no todos los picos poseen el mismo valor. La ecuación que define este parámetro es:

$$N = 16 x \left( \frac{t_{R_i}}{W_i} \right)^2 \quad (5)$$

Donde  $N$  es el *número de platos teóricos*,  $t_{R_i}$  el tiempo de retención del analito y  $W_i$  el ancho de pico. Esta relación compara el ancho del pico con el tiempo transcurrido entre la inyección y la detección.  $N$  es una medida de la retención relativa de soluto comparada con el ancho de su pico. Otra medida útil es el número de platos teóricos por unidad de longitud de la fase estacionaria. Esta medida se denomina *altura equivalente del plato teórico* ( $H$ ) y su fórmula es:

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

Donde  $L$  es la longitud de la fase estacionaria (columna). Un sistema cromatográfico presenta mayor eficacia entre más alto sea el valor de  $N$  y menor el de  $H$  (Rubinson, 2001).

De acuerdo a lo anterior, se determinó la eficacia del sistema cromatográfico mediante el cálculo de los platos teóricos y sus alturas equivalentes para cada analito, en una columna Agilent HP-5MS de 60 metros de longitud. Para ello se analizaron 5 réplicas del nivel 5 (800 ng/mL) en el Sistema y se obtuvieron los promedios de  $N$  y  $H$  para cada analito.

#### **2.4.9. Verificación del método analítico**

La verificación se realizó siguiendo las *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos* de las Naciones Unidas (UNODC, 2010). Los parámetros estudiados fueron selectividad, linealidad, límite de detección, precisión y recuperación.

##### **2.4.9.1. Selectividad**

La selectividad del Método se evaluó mediante el análisis de 5 blancos de orina y 5 muestras de orina enriquecidas a 200 ng/mL (Nivel bajo) en dos días diferentes. Todas las muestras se extrajeron según el procedimiento descrito en el punto 2.4.6. Se verificó la ausencia de interferencias significativas en los tiempos de retención de los analitos y del estándar interno, y se examinó la existencia de picos solapados.

Criterios para la aprobación: Las respuestas de los picos interferentes en el tiempo de retención ( $t_R$ ) de los analitos, en el blanco, deben ser menores al 20% de las respuestas de los picos en las muestras enriquecidas. Asimismo, la respuesta de los picos interferentes en el tiempo de retención del ISTD, en el blanco, debe ser menor al 5% de la respuesta de dicho estándar a la concentración de trabajo (A.E.F.I., 2001).

##### **2.4.9.2. Linealidad**

La linealidad de cada compuesto se evaluó mediante curvas de calibración, donde se graficó la relación de respuesta del analito y del estándar interno ( $R_{\text{analito}}/R_{\text{ISTD}}$ ) contra la relación de concentración de los mismos ( $C_{\text{analito}}/C_{\text{ISTD}}$ ). La respuesta ( $R$ ) corresponde al área del pico del analito. Las curvas de calibración se realizaron con 6 y 4 niveles en el Sistema y en el Método, respectivamente, y se hicieron 5 réplicas para cada nivel. En el Sistema se utilizaron los niveles 1-6 y en el Método los niveles 3-6.

**Tabla 13.** Relación de concentraciones para cada nivel de calibración

Nivel	Concentración (ng/mL)	$C_{\text{analito}}/C_{\text{ISTD}}$
ISTD	6000	
1	50	0,0083
2	100	0,0167
3	200	0,0333
4	400	0,0667
5	800	0,1333
6	1600	0,2667

Las curvas de calibración se obtuvieron mediante un análisis de regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados y se determinaron los rangos lineales para cada analito. Se verificó la validez del modelo lineal con la inspección visual, la evaluación de los coeficientes de correlación y de determinación, la investigación del gráfico de residuos, el análisis de varianza de la regresión y la prueba t de student. Los datos se analizaron utilizando Microsoft Excel 2007 (Jurado, 2016). La pendiente de la regresión lineal corresponde a la sensibilidad del método, entre mayor sea su valor, mayor será la sensibilidad del método para el analito.

#### 2.4.9.3. Límite de detección

Los límites de detección (LOD, *Limits Of Detection*) para cada analito fueron determinados a partir de las curvas de calibración obtenidas en el estudio de la linealidad. El límite de detección se calculó con la fórmula (7), donde SD corresponde a la desviación estándar del intercepto y S a la pendiente obtenida de la curva.

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{S} \quad (7)$$

#### 2.4.9.4. Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

La repetibilidad del método se evaluó con el coeficiente de variación (CV) de los tiempos de retención de cada analito. Se analizaron 20 muestras de orina enriquecidas a 4 niveles distintos (200, 400, 800 y 1600 ng/mL, 5 réplicas cada uno). Las muestras fueron preparadas y analizadas por un mismo analista en un mismo día.

La reproducibilidad se evaluó de manera similar a la precisión, pero comparando los resultados de dos días distintos, con dos analistas y dos columnas cromatográficas (de 60 metros de longitud).



El porcentaje del coeficiente de variación (CV%) de los  $t_R$  se calculó con la fórmula (8), donde  $s$  corresponde a la desviación estándar y  $X$  a la media.

$$CV\% = \frac{s}{X} \times 100\% \quad (8)$$

Criterio para la aprobación: El porcentaje del coeficiente de variación de los tiempos de retención para cada analito debe ser inferior al 2%.

#### **2.4.9.5. Recuperación**

La recuperación se determinó calculando la relación  $C_{\text{analito}}/C_{\text{ISTD}}$ , a partir de la relación  $R_{\text{analito}}/R_{\text{ISTD}}$  obtenida en el Método, utilizando la ecuación de ajuste de curva obtenida del Sistema de calibración. Con esta relación se determinó, posteriormente, la concentración de analito ( $C_{\text{analito}}$ ) recuperada en cada nivel del Método y se comparó con la concentración correspondiente del Sistema. Para obtener una comparación válida se deben adquirir y procesar los datos, del Método y del Sistema, en condiciones idénticas. Se analizaron 20 muestras de orina enriquecidas a 3 niveles (bajo, medio y alto, 5 réplicas cada uno) en dos días distintos. Cada análisis se acompañó de un Sistema de calibración con 6 niveles y 5 réplicas.

Criterio de aprobación: Es deseable que el Método tenga una recuperación alta, próxima al 100%, pero recuperaciones inferiores al 50% pueden aceptarse siempre que sean estables (con cualquier tipo de concentración analizada), precisas y reproducibles ( $CV\% < 20\%$ ).

#### **2.4.9.6. Análisis de muestras de orina de casos forenses reales**

Se analizaron 20 casos, recibidos entre el 2015 y el 2016 en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Suroccidente, cuya casuística estaba relacionada con drogas de abuso. Este procedimiento se realizó garantizando, en todo momento, la normatividad establecida por el Instituto con respecto a la cadena de custodia de los elementos de materia de prueba. Este análisis se hizo con una finalidad confirmatoria, ya que las muestras que se seleccionaron, ya habían sido analizadas por inmunoensayo y habían salido positivas para cocaína.



Figura 2. Muestras de orina en tubos de 15 mL

#### 2.4.9.7. Plan de trabajo

Tabla 14. Cuadro resumen del plan de trabajo que se llevó a cabo

Parámetro estudiado	Muestras analizadas	Réplicas	Días	Total
Eficacia de la columna	1 patrón externo a una concentración de 800 ng/mL	5	1	5
Selectividad del Método	1 blanco de orina	5	2	10
	1 muestra de orina enriquecida (200 ng/mL)	5	2	10
Linealidad y límite de detección del Sistema y del Método	6 patrones externos (50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ng/mL)	5	1	30
	4 muestras de orina enriquecidas (200, 400, 800 y 1600 ng/mL)	5	1	20
Precisión del Método	4 muestras de orina enriquecidas (200, 400, 800 y 1600 ng/mL)	5	2	40
Recuperación del Método	6 patrones externos (50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ng/mL)	5	2	60
	3 muestras de orina enriquecidas (200, 400 y 800 ng/mL)	5	2	30
Evaluación del método con casos forenses reales	20 muestras de orina de casos forenses reales	1	1	20
<b>Total de muestras analizadas</b>				<b>225</b>

## 2.4.10. Matriz de marco lógico

**Tabla 15.** Matriz de marco lógico

Objetivo General				
Verificar el desempeño de un método GC-MS, empleado para la determinación simultánea de 23 drogas de abuso en orina, en el Laboratorio de Toxicología del INMLCF en Cali.				
	Actividades	Indicadores	Supuestos	
Objetivos específicos	Evaluar la eficacia de la columna cromatográfica	Analizar 5 réplicas de un patrón externo a 800 ng/mL.	Platos teóricos ( $N$ ) y alturas equivalentes ( $H$ ).	
	Evaluar la selectividad del método.	Analizar 5 blancos de orina.	Cromatograma con picos característicos de cada analito.  % de interferencias en los tiempos de retención de cada analito.  Espectro de masas de cada analito.	$N$ del orden de 200000 o más y $H$ próximo a cero.  Cromatograma con buena resolución (picos bien resueltos).  %Inter < 20% y 5%, para los analitos y el ISTD, respectivamente.  Espectros de masas con los iones característicos de cada analito.
		Analizar 5 muestras de orina enriquecida (nivel bajo).		
		Comparar los tiempos de retención de los analitos.  Comparar las respuestas de los blancos con las de las muestras.		
	Evaluar el límite de detección a partir de la linealidad del método.	Analizar 6 patrones externos a diferentes niveles de concentración.	Curva de calibración.  Curva de residuos.	Cumplimiento de los criterios de aceptación de la regresión lineal.  Límite de detección por debajo de 300 ng/mL para cocaína.  Rango lineal que abarque un amplio intervalo de concentraciones.
		Analizar 4 muestras de orina enriquecidas a diferentes niveles de concentración.	Parámetros de las regresiones lineales.  Límite de detección.	
Evaluar la regresión lineal de los análisis.		Rango lineal.		
Evaluar la precisión del método en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.	Analizar 4 muestras de orina enriquecidas a concentraciones diferentes.  Realizar nuevamente el análisis pero en un día distinto.	Tiempos de retención de los analitos.  CV% de los tiempos de retención.	CV% < 2%	
Evaluar el porcentaje de recuperación del método.	Analizar 6 patrones externos.	%Recuperación	%Rec > 50%	
	Analizar 3 muestras de orina enriquecidas.	CV% de la recuperación en dos días distintos.	Si %Rec < 50%, CV% < 20%	

## 2.5. Resultados

Se realizó el análisis simultáneo de cocaína, 4 de sus metabolitos y 17 drogas de abuso por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en muestras de orina. El equipo utilizado fue un Agilent 6890N-5973. En la figura 3 se presentan los perfiles cromatográficos típicos de una mezcla de estándares certificados de los analitos de estudio, a una concentración de 800 ng/mL, en el Método y en el Sistema, analizados en una columna Agilent HP-5MS de 60 metros.

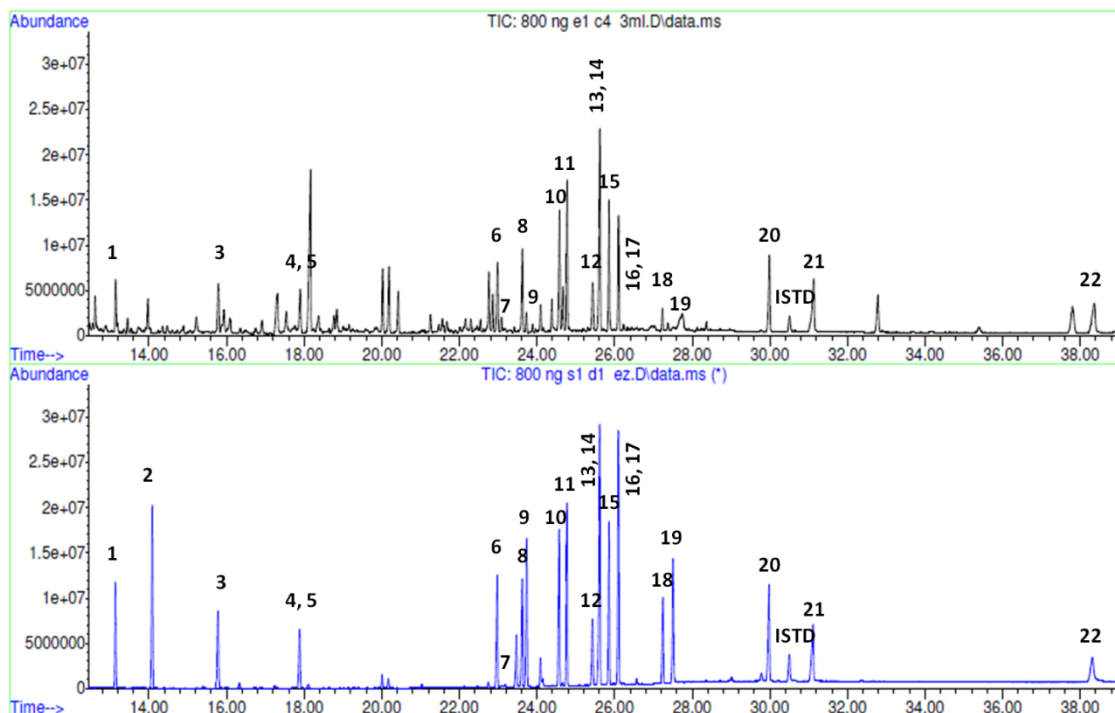


Figura 3. Cromatogramas típicos del Método (arriba) y del Sistema (abajo)

Cada pico identificado con un número corresponde a un analito específico. Algunos analitos se solaparon y tienen sus números en el mismo pico (4,5; 13,14; 16,17). El cromatograma de iones totales (TIC, *Total ion current*) también permite obtener el espectro de masas de cada compuesto tal como puede observarse en la figura 4 para la cocaína.

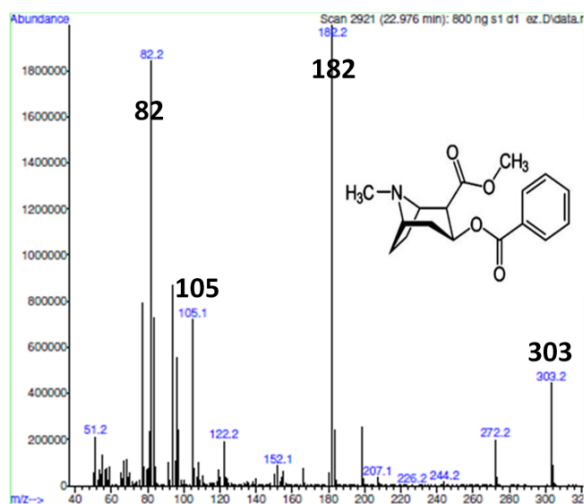


Figura 4. Espectro de masas de la cocaína

En la tabla 16 se muestran los compuestos analizados con los números de pico, los tiempos de retención ( $t_R$ ) y los principales iones característicos.

**Tabla 16.** Tiempos de retención y principales iones de los compuestos analizados

Columna Agilent HP-5MS (60 m)						
N° Pico	Compuestos	$t_R$ (min)	Ion molecular	Principales iones (m/z)		
ISTD	Estazolam	30,506	259	294	239	205
6	Cocaína	22,981	182	82	303	105
1	Metilecgonina-TMS	13,140	82	96	182	240
2	Ecgonina-TMS2	13,986	82	96	314	329
8	Cocaetileno	23,617	196	82	317	272
9	Benzoilecgonina-TMS	23,727	82	240	105	361
3	Meperidina	15,786	71	247	172	44
4	Fluoxetina	17,891	44	104	309	91
5	Ketamina	17,893	180	209	152	138
7	Nortriptilina	23,085	44	202	215	91
10	Escopolamina	24,575	138	94	42	108
11	Oxazepam-TMS2	24,776	429	313	401	430
12	Bromazepam-TMS	25,433	388	386	387	389
13	Codeína-TMS	25,598	371	178	196	234
14	Diazepam	25,620	256	283	284	285
15	Lorazepam-TMS2	25,855	429	347	431	449
16	Morfina-TMS2	26,092	236	429	196	414
17	Clorpromazina	26,103	58	86	318	272
18	Flunitrazepam	27,233	312	285	266	238
19	Clonazepam-TMS	27,546	387	352	306	372
20	Clozapina	29,980	243	192	227	70
21	Alprazolam	31,103	279	204	308	77
22	Trazodona	38,330	205	70	231	78

Eficacia: La eficacia de la columna se evaluó mediante la determinación de los platos teóricos ( $N$ ) y sus alturas equivalentes ( $H$ ) para todos los analitos, en el Sistema al nivel 5 (800 ng/ml), con las fórmulas (5) y (6). Los resultados se muestran en la tabla 17.

$$N = 16 \times \left( \frac{t_{R_i}}{W_i} \right)^2 \quad (5)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

Entre mayor sea el valor de  $N$  y más cercano a cero el de  $H$ , mayor eficiencia cromatográfica para el analito, por parte de la columna.

**Tabla 17.** Número de platos teóricos ( $N$ ) y alturas equivalentes ( $H$ )

Columna Agilent HP-5MS (60 m)				
Compuestos	$t_R$ (min)	$W$ (min)	$N$	$H$ (mm)
Estazolam	30,508	0,17	515 288	0,116
Cocaína	22,978	0,12	586 654	0,102
Metilecgonina-TMS	13,136	0,10	276 087	0,217
Ecgonina-TMS2	14,088	0,13	187 902	0,319
Cocaetileno	23,621	0,12	619 946	0,097
Benzoilecgonina-TMS	23,735	0,10	901 360	0,067
Meperidina	15,781	0,15	177 095	0,339
Fluoxetina	17,715	0,19	139 090	0,431
Ketamina	17,883	0,14	261 063	0,230
Nortriptilina	23,078	0,18	263 009	0,228
Escopolamina	24,573	0,10	966 132	0,062
Oxazepam-TMS2	24,776	0,10	982 160	0,061
Bromazepam-TMS	25,432	0,11	855 255	0,070
Codeína-TMS	25,608	0,08	1 639 424	0,037
Diazepam	25,626	0,12	729 658	0,082
Lorazepam-TMS2	25,861	0,12	743 101	0,081
Morfina-TMS2	26,098	0,08	1 702 764	0,035
Clorpromazina	26,109	0,10	1 090 688	0,055
Flunitrazepam	27,247	0,11	981 685	0,061
Clonazepam-TMS	27,512	0,07	2 471 543	0,024
Clozapina	29,982	0,15	639 232	0,094
Alprazolam	31,115	0,22	320 047	0,187
Trazodona	38,314	0,40	146 796	0,409

Selectividad: En el *software* empleado (*ChemStation*), el procesamiento de datos en modo barrido de iones (Scan, 2.4.7.), permitió utilizar el espectro de masas junto con el tiempo de retención, para identificar y confirmar la presencia de los analitos. Cada analito se monitorizó con el  $t_R$ , la masa del ion molecular y la de los iones principales. Adicionalmente, se observó la respuesta (área de pico) en los  $t_R$  de cada analito, para cuantificar las posibles interferencias. De acuerdo con esto se evaluaron y se compararon los resultados entre 5 muestras de orina enriquecidas a 200 ng/mL y 5 blancos de orina, en 2 días distintos.

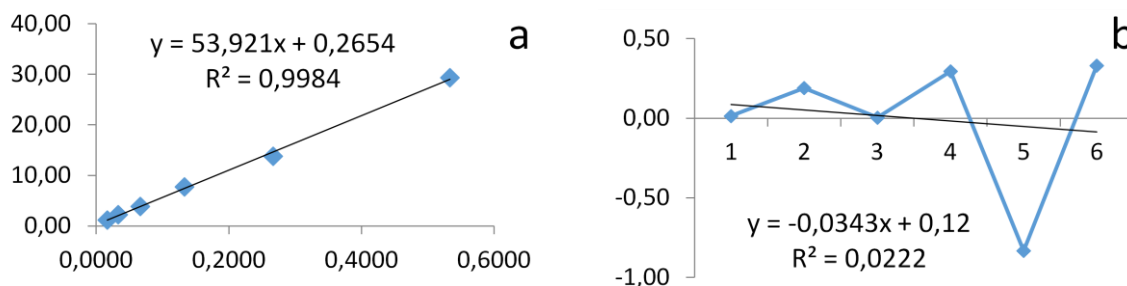
Los resultados se muestran en la tabla 18. Las respuestas de los picos interferentes en el  $t_R$  de los analitos, en el blanco, deben ser menores del 20% de las respuestas en las muestras enriquecidas. Asimismo, la respuesta de los picos interferentes en el tiempo de retención del estándar interno, en el blanco, deben ser menores al 5% de la respuesta de dicho estándar en las muestras enriquecidas.

**Tabla 18.** Interferencias del Método en los tiempos de retención de los analitos  
Método (5 muestras (200 ng/mL) y 5 blancos para cada día)

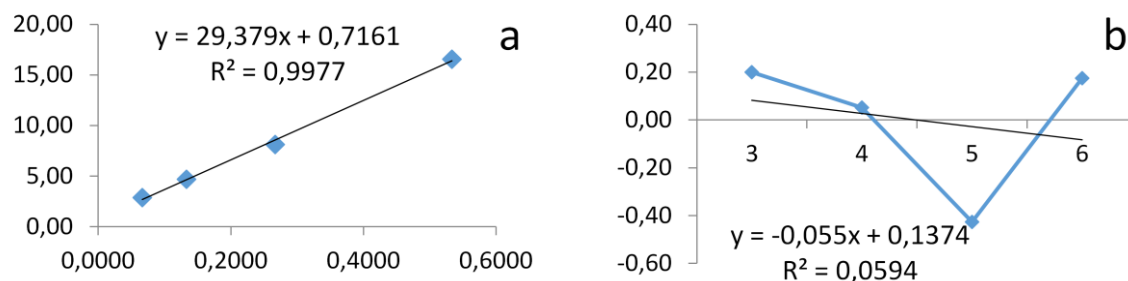
Compuesto	Ion M (m/z)	Día 1			Día 2		
		Analista 1 (D. Rovira)			Analista 2 (C. Quevedo)		
		Columna 1			Columna 2		
		t <sub>R</sub> (min)	CV%	%Inter	t <sub>R</sub> (min)	CV%	%Inter
Estazolam	259	30,506	0,02	4,5	30,883	0,02	5,6
Cocaína	182	22,981	0,03	2,2	23,245	0,02	4,3
Metilecgonina-TMS	82	13,140	0,01	1,2	13,355	0,01	2,0
Ecgonina-TMS2	82	-	-	-	-	-	-
Cocaetileno	196	23,617	0,02	3,7	23,872	0,02	8,0
Benzoilecgonina-TMS	82	23,727	0,01	11,1	23,983	0,01	19,0
Meperidina	71	15,786	0,03	5,5	16,116	0,02	9,5
Fluoxetina	104	17,891	0,03	20,5	18,006	0,95	39,5
Ketamina	180	17,893	0,03	8,0	18,219	0,03	15,6
Nortriptilina	202	23,085	0,01	4,1	23,362	0,02	11,2
Escopolamina	138	24,575	0,03	4,0	24,824	0,03	7,4
Oxazepam-TMS2	429	24,776	0,02	5,8	25,019	0,02	8,9
Bromazepam-TMS2	388	25,433	0,02	2,1	25,681	0,03	2,5
Diazepam	256	25,598	0,04	0,0	25,846	0,05	0,0
Codeína-TMS	371	25,620	0,03	5,3	25,869	0,03	10,6
Lorazepam-TMS2	429	25,855	0,02	0,3	26,092	0,02	0,4
Morfina-TMS2	236	26,092	0,01	2,7	26,336	0,02	4,4
Clorpromazina	58	26,103	0,03	1,0	26,350	0,03	2,0
Flunitrazepam	312	27,233	0,01	11,5	27,495	0,03	18,0
Clonazepam-TMS	387	27,546	0,22	0,0	27,789	0,03	0,0
Clozapina	243	29,980	0,04	3,7	30,339	0,04	8,3
Alprazolam	279	31,103	0,07	4,4	31,510	0,08	10,8
Trazodona	205	38,330	0,06	0,0	39,055	0,08	0,0

En la tabla 18 se resaltaron en gris las interferencias que no cumplieron con el criterio de aceptación. Las casillas enmarcadas corresponden a picos solapados que se diferenciaron por *extracción de iones* como se explica en la discusión.

Linealidad: Las curvas de calibración y los gráficos de residuos de la cocaína en el Sistema y en el Método se muestran en las figuras 5 y 6. En las curvas de calibración las abscisas corresponden a  $C_{\text{analito}}/C_{\text{ISTD}}$  para cada nivel y las ordenadas corresponden a  $R_{\text{analito}}/R_{\text{ISTD}}$ . En los gráficos de residuos las abscisas son los niveles de concentración (2.4.8.2.) y las ordenadas los residuales.



**Figura 5.** Curva de calibración (a) y gráfico de residuos (b) de cocaína en el Sistema



**Figura 6. Curva de calibración (a) y gráfico de residuos (b) de cocaína en el Método**

También se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal con el conjunto de datos primarios. Se determinó el test de proporcionalidad (t de student para el intercepto) y el test de linealidad (t de student para la pendiente). Los cálculos se realizaron y analizaron utilizando Microsoft Excel 2007. Los resultados obtenidos para cocaína en el Sistema se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 19. Resultados en Excel de la regresión lineal para cocaína en el Sistema**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,996576873
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,993165464
R <sup>2</sup> ajustado	0,99286831
Error típico	0,863740627
Observaciones	25

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2493,486882	2493,486882	3342,26124	2,07434E-26
Residuos	23	17,15910103	0,746047871		
Total	24	2510,645983			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0,232198433	0,256744741	0,904394116	0,37516253	-0,298918526	0,76331539
Variable X 1	54,00332329	0,93411488	57,81229317	2,0743E-26	52,07095945	55,9356871

Para evaluar los criterios establecidos, se extrajeron y se analizaron los datos como se muestra en la tabla 20.



**Tabla 20.** Análisis estadístico de la regresión lineal de cocaína en el Sistema

Prueba	Criterio de aceptación	Resultado
Los coeficientes de correlación (r) y de determinación ( $r^2$ ) sirven para verificar la validez del modelo lineal.	$r > 0,98$	$r = 0,99$
	$r^2 > 0,95$	$r^2 = 0,99$
El análisis de varianza permite determinar si el modelo lineal se ajusta para la relación entre $R_{\text{analito}}/R_{\text{ISTD}}$ y $C_{\text{analito}}/C_{\text{ISTD}}$ con un nivel de significancia del 5%.	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	$F_{\text{calc}} = 3342,2$
		$F_{\text{tab}} = 4,261$
El test de proporcionalidad determina si el intercepto es cercano a cero.	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$	$t_{\text{exp}} = 0,90$
		$t_{\text{tab}} = 2,064$
El test de linealidad determina si la pendiente es distinta de cero.	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$	$t_{\text{exp}} = 57,81$
		$t_{\text{tab}} = 2,064$

En los resultados del análisis estadístico de la cocaína en el Sistema, se observa que se cumplen todos los criterios de aceptación. Lo cual indica que el modelo lineal en el rango de 50-1600 ng/mL explica la relación de respuestas ( $R_{\text{analito}}/R_{\text{ISTD}}$ ) a partir del uso de la variable, relación de concentraciones ( $C_{\text{analito}}/C_{\text{ISTD}}$ ). De esta forma, el valor de la pendiente, 54,0 corresponde a la sensibilidad. En el análisis del Método para cocaína, también se obtuvo la aceptación del modelo lineal en el rango de 200-1600 ng/mL con una sensibilidad de 29,4.

De la misma forma, se evaluó la linealidad para cada uno de los analitos. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 21 y 22 para el Sistema y el Método, respectivamente, donde se presentan los grados de libertad (g.l.), la pendiente (m), el intercepto (b) y los parámetros estadísticos mencionados anteriormente.

En las tablas, los valores resaltados en gris indican los coeficientes r y  $r^2$  que estuvieron ligeramente por debajo del valor de aceptación y los que están subrayados muestran los resultados que no cumplieron con la proporcionalidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los modelos lineales de cada analito, se determinaron los rangos lineales siguientes; en el Sistema fueron de 200-1600 ng/mL para fluoxetina y nortriptilina, de 100-1600 ng/mL para trazodona y de 50-1600 ng/mL para todos los otros analitos. En el Método, los rangos lineales fueron de 200-1600 ng/mL para todos los analitos, excepto para ecgonina que no se pudo determinar.

**Tabla 21.** Resultados de los modelos lineales de los analitos en el Sistema

Sistema										
Compuesto	g.l. (n-1)	m	t <sub>exp</sub>	b	t <sub>exp</sub>	t <sub>tab</sub>	r	r <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	F <sub>tab</sub>
Cocaína	24	54,00	57,81	0,23	0,90	2,064	0,99	0,99	3342,2	4,261
Metilecgonina-TMS	24	45,23	29,77	-0,27	-0,66	2,064	0,98	0,97	886,8	4,261
Ecgonina-TMS2	25	115,13	55,57	1,42	<u>2,55</u>	2,060	0,99	0,99	3088,8	4,261
Cocaetileno	24	49,23	58,97	0,23	1,04	2,064	0,99	0,99	3477,7	4,261
Benzoilecgonina-TMS	25	86,67	56,16	0,83	2,00	2,060	0,99	0,99	3154,9	4,261
Meperidina	24	27,27	51,37	0,66	<u>4,58</u>	2,064	0,99	0,99	2639,6	4,261
Fluoxetina	15	0,53	9,92	0,07	<u>4,28</u>	2,131	<u>0,93</u>	<u>0,87</u>	98,56	4,658
Ketamina	22	52,70	34,74	-0,53	-1,23	2,074	0,99	0,98	1207,4	4,261
Nortriptilina	15	1,81	23,32	0,07	<u>3,26</u>	2,131	0,98	0,97	544,1	4,658
Escopolamina	25	83,32	63,52	0,40	1,13	2,060	0,99	0,99	4035,3	4,261
Oxazepam-TMS2	27	90,72	47,42	-0,86	-1,73	2,052	0,99	0,98	2248,7	4,261
Bromazepam-TMS2	23	36,43	33,26	-1,07	<u>-3,52</u>	2,069	0,99	0,98	1106,7	4,261
Diazepam	27	50,76	49,27	0,04	0,17	2,052	0,99	0,98	2428,2	4,261
Codeína-TMS	27	50,07	51,30	-0,25	-1,02	2,052	0,99	0,99	2632,6	4,261
Lorazepam-TMS2	28	131,59	52,14	-1,21	-1,87	2,048	0,99	0,99	2719,3	4,261
Morfina-TMS2	25	48,64	47,03	-0,21	-0,76	2,060	0,99	0,98	2212,0	4,261
Clorpromazina	24	78,57	36,44	2,47	<u>4,17</u>	2,064	0,99	0,98	1328,2	4,261
Flunitrazepam	25	29,68	51,74	-0,37	<u>-2,44</u>	2,060	0,99	0,99	2677,6	4,261
Clonazepam-TMS	22	28,98	37,41	-0,96	<u>-4,84</u>	2,074	0,99	0,98	1400,0	4,261
Clozapina	27	67,22	56,41	0,02	0,08	2,052	0,99	0,99	3182,3	4,261
Alprazolam	29	25,07	59,82	-0,41	<u>-3,94</u>	2,045	0,99	0,99	3578,6	4,261
Trazodona	21	27,43	64,99	-0,84	<u>-6,81</u>	2,080	0,99	0,99	4223,7	4,261

**Tabla 22.** Resultados de los modelos lineales de los analitos en el Método

Método										
Compuesto	g.l. (n-1)	m	t <sub>exp</sub>	b	t <sub>exp</sub>	t <sub>tab</sub>	r	r <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	F <sub>tab</sub>
Cocaína	18	29,44	38,00	0,68	<u>2,82</u>	2,101	0,99	0,98	1444,6	4,658
Metilecgonina-TMS	16	14,41	19,98	0,76	<u>3,46</u>	2,120	0,98	0,96	399,2	4,658
Ecgonina-TMS2	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocaetileno	19	27,65	41,32	0,64	<u>3,15</u>	2,093	0,99	0,98	1707,8	4,658
Benzoilecgonina-TMS	17	7,49	27,38	0,36	<u>4,07</u>	2,110	0,98	0,97	749,8	4,658
Meperidina	19	15,47	19,23	1,02	<u>4,16</u>	2,093	<u>0,97</u>	0,95	369,9	4,658
Fluoxetina	19	0,58	26,33	0,01	2,00	2,093	0,98	0,97	693,4	4,658
Ketamina	19	29,45	27,46	0,44	1,34	2,093	0,98	0,97	754,2	4,658
Nortriptilina	19	3,83	15,29	-0,17	<u>-2,32</u>	2,093	<u>0,96</u>	<u>0,92</u>	233,8	4,658
Escopolamina	19	43,03	38,60	1,61	<u>4,70</u>	2,093	0,99	0,98	1489,9	4,658
Oxazepam-TMS2	19	28,24	19,52	2,11	<u>4,76</u>	2,093	<u>0,97</u>	0,95	381,3	4,658
Bromazepam-TMS2	19	22,31	28,93	-0,87	<u>-3,68</u>	2,093	0,98	0,97	837,3	4,658
Diazepam	19	23,00	35,00	1,00	<u>4,97</u>	2,093	0,99	0,98	1225,2	4,658
Codeína-TMS	19	15,30	18,87	1,40	<u>5,62</u>	2,093	<u>0,97</u>	0,95	356,3	4,658
Lorazepam-TMS2	19	38,52	17,87	2,96	<u>4,47</u>	2,093	<u>0,97</u>	<u>0,94</u>	319,3	4,658
Morfina-TMS2	19	5,94	34,78	0,05	0,98	2,093	0,99	0,98	1209,9	4,658
Clorpromazina	19	42,28	22,64	2,90	<u>5,06</u>	2,093	0,98	0,96	512,8	4,658
Flunitrazepam	19	4,99	28,02	-0,26	<u>-4,88</u>	2,093	0,98	0,97	785,3	4,658
Clonazepam-TMS	15	3,19	11,33	-0,17	-2,01	2,131	<u>0,94</u>	<u>0,90</u>	128,5	4,658
Clozapina	19	38,89	37,89	0,17	0,56	2,093	0,99	0,98	1436,2	4,658
Alprazolam	19	19,64	70,01	-0,13	-1,54	2,093	0,99	0,99	4902,3	4,658
Trazodona	19	23,48	65,57	-0,20	-1,89	2,093	0,99	0,99	4300,3	4,658

Límite de detección: Los límites de detección (LOD) se calcularon con la fórmula (7). Donde SD corresponde a la desviación estándar del intercepto (Excel la denomina *Error típico*, tabla19) y S a la pendiente obtenida de la curva.

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{S} \quad (7)$$

Los parámetros de las curvas de calibración fueron determinados en Microsoft Excel 2007, con el análisis de regresión lineal. Los LOD en el Sistema y en el Método, para cada analito, se presentan en la tabla 23. Los resultados de la ecgonina no aparecen en el Método ya que no se detectó cuando se aplicó el proceso de extracción. Para todos los otros casos, el LOD se determinó de manera satisfactoria.

**Tabla 23.** Límites de detección en el Sistema y en el Método

Compuesto	Sistema			Método		
	S	SD	LOD (ng/mL)	S	SD	LOD (ng/mL)
Cocaína	54,00	0,257	47	29,44	0,244	82
Metilecgonina-TMS	45,23	0,416	91	14,42	0,220	151
Ecgonina-TMS2	115,14	0,558	48	-	-	-
Cocaetileno	49,24	0,229	46	27,66	0,206	74
Benzoilecgonina-TMS	86,67	0,416	48	7,50	0,088	117
Meperidina	27,27	0,146	53	15,47	0,247	158
Fluoxetina	0,54	0,017	313	0,59	0,007	116
Ketamina	52,71	0,434	82	29,46	0,330	111
Nortriptilina	1,82	0,022	121	3,83	0,077	199
Escopolamina	83,33	0,354	42	43,04	0,343	79
Oxazepam-TMS2	90,72	0,498	54	28,24	0,444	156
Bromazepam-TMS2	36,43	0,305	83	22,31	0,237	105
Diazepam	50,77	0,268	52	23,00	0,202	87
Codeína-TMS	50,08	0,254	50	15,30	0,249	161
Lorazepam-TMS2	131,59	0,645	49	38,53	0,663	170
Morfina-TMS2	48,65	0,279	57	5,94	0,053	87
Clorpromazina	78,58	0,593	75	42,28	0,574	134
Flunitrazepam	29,68	0,155	52	4,99	0,055	109
Clonazepam-TMS	28,98	0,199	68	3,20	0,085	264
Clozapina	67,23	0,310	46	38,89	0,315	80
Alprazolam	25,08	0,105	42	19,65	0,086	43
Trazodona	27,43	0,124	45	23,49	0,110	46

Precisión: La precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, se calculó a partir del coeficiente de variación de los tiempos de retención obtenidos de muestras de orina enriquecidas, y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 24. El CV% de los tiempos de retención para cada analito debe ser inferior al 2%. En este análisis, todos los resultados dieron conforme, excepto para la ecgonina.

**Tabla 24.** Precisión de los tiempos de retención en el Método

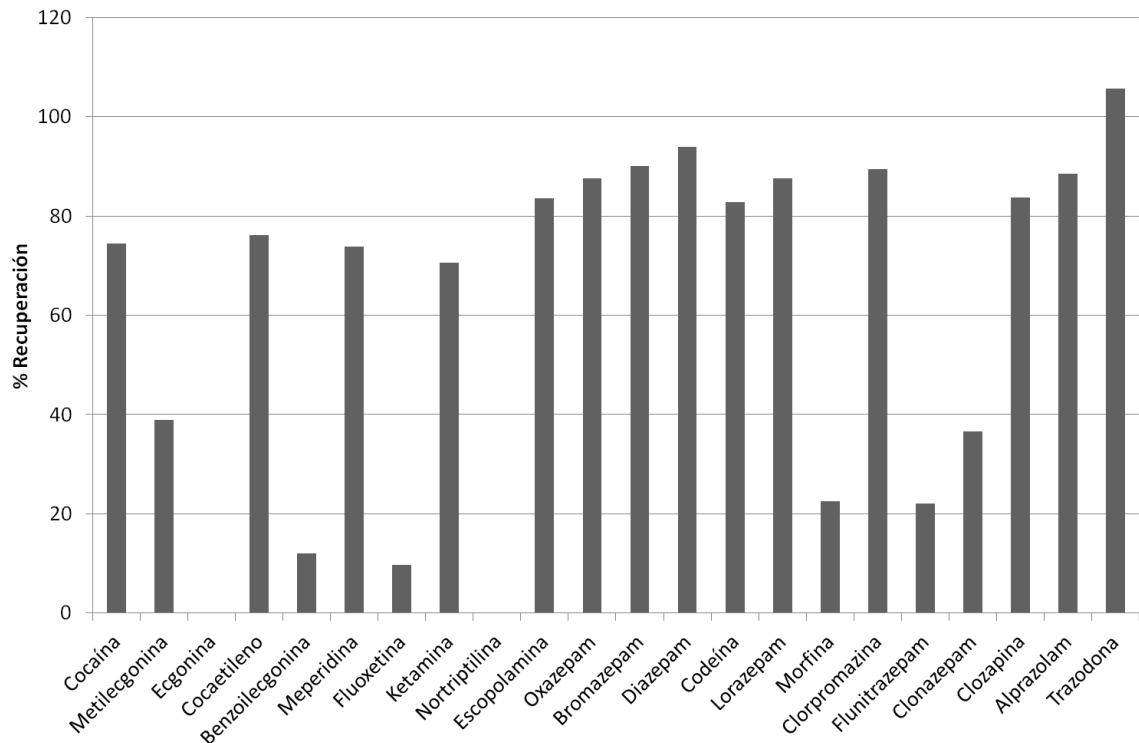
Método (20 muestras cada día)							
Compuesto	Ion M (m/z)	Repetibilidad				Reproducibilidad	
		Día 1		Día 2		Días 1 y 2	
		Analista 1		Analista 2		Analistas 1 y 2	
		Columna 1		Columna 2		Columnas 1 y 2	
		t <sub>R</sub> (min)	CV%	t <sub>R</sub> (min)	CV%	t <sub>R</sub> (min)	CV%
Estazolam	259	30,506	0,02	30,883	0,02	30,695	0,868
Cocaína	182	22,981	0,03	23,245	0,02	23,113	0,808
Metilecgonina-TMS	82	13,140	0,01	13,355	0,01	13,248	1,148
Ecgonina-TMS2	82	-	-	-	-	-	-
Cocaetileno	196	23,617	0,02	23,872	0,02	23,745	0,759
Benzoilecgonina-TMS	82	23,727	0,01	23,983	0,01	23,855	0,759
Meperidina	71	15,786	0,03	16,116	0,02	15,951	1,463
Fluoxetina	104	17,891	0,03	18,006	0,95	17,949	0,453
Ketamina	180	17,893	0,03	18,219	0,03	18,056	1,277
Nortriptilina	202	23,085	0,01	23,362	0,02	23,224	0,843
Escopolamina	138	24,575	0,03	24,824	0,03	24,700	0,713
Oxazepam-TMS2	429	24,776	0,02	25,019	0,02	24,898	0,690
Bromazepam-TMS2	388	25,433	0,02	25,681	0,03	25,557	0,686
Diazepam	256	25,598	0,04	25,846	0,05	25,722	0,682
Codeína-TMS	371	25,620	0,03	25,869	0,03	25,745	0,684
Lorazepam-TMS2	429	25,855	0,02	26,092	0,02	25,974	0,645
Morfina-TMS2	236	26,092	0,01	26,336	0,02	26,214	0,658
Clorpromazina	58	26,103	0,03	26,350	0,03	26,227	0,666
Flunitrazepam	312	27,233	0,01	27,495	0,03	27,364	0,677
Clonazepam-TMS	387	27,546	0,22	27,789	0,03	27,668	0,621
Clozapina	243	29,980	0,04	30,339	0,04	30,160	0,842
Alprazolam	279	31,103	0,07	31,510	0,08	31,307	0,919
Trazodona	205	38,330	0,06	39,055	0,08	38,693	1,325

Recuperación: Se obtuvo comparando la concentración de analito extraída de muestras de orina enriquecidas y la concentración de analito sin extraer (100%). Los niveles bajo, medio y alto corresponden a concentraciones de 200, 400 y 800 ng/mL, respectivamente. Los % de recuperación no conformes están resaltados en gris y los CV% que dieron por encima del 20%, están subrayados.

**Tabla 25.** Porcentajes de recuperación del Método

Compuesto	Nivel	% Recuperación		CV%	Compuesto	Nivel	% Recuperación		CV%
		Día 1	Día 2				Día 1	Día 2	
Cocaína	Bajo	85,85	74,2	10,3	Bromazepam	Bajo	71,20	84,0	11,7
	Medio	74,49	96,3	18,1		Medio	90,01	104,8	10,7
	Alto	62,14	75,4	13,6		Alto	76,35	102,9	<u>20,9</u>
Metilecgonina	Bajo	54,26	45,3	12,7	Diazepam	Bajo	100,34	61,5	<u>33,9</u>
	Medio	38,97	44,6	9,5		Medio	93,86	90,8	2,3
	Alto	37,18	29,3	16,8		Alto	84,67	86,6	1,6
Ecgonina	Bajo	-	-	-	Codeína	Bajo	88,73	69,2	17,5
	Medio	-	-	-		Medio	82,78	81,6	1,0
	Alto	-	-	-		Alto	70,25	76,5	6,0
Cocaetileno	Bajo	88,09	67,0	19,2	Lorazepam	Bajo	79,00	71,5	7,0
	Medio	76,13	86,3	8,9		Medio	87,51	79,0	7,2
	Alto	65,94	74,6	8,7		Alto	70,00	73,3	3,3
Benzoilecgonina	Bajo	11,81	<u>-21,1</u>	<u>-501,0</u>	Morfina	Bajo	26,70	21,2	16,2
	Medio	11,98	0,8	<u>123,7</u>		Medio	22,50	24,3	5,4
	Alto	12,01	5,3	<u>54,8</u>		Alto	23,13	22,5	2,0
Meperidina	Bajo	95,78	79,8	12,9	Clorpromazina	Bajo	112,24	67,0	<u>35,7</u>
	Medio	73,87	92,3	15,7		Medio	89,48	81,7	6,4
	Alto	61,18	74,9	14,3		Alto	73,28	66,0	7,4
Fluoxetina	Bajo	<u>-70,25</u>	<u>-265,1</u>	<u>-82,2</u>	Flunitrazepam	Bajo	24,93	25,3	1,0
	Medio	9,77	<u>-84,4</u>	<u>-178,4</u>		Medio	22,08	35,2	<u>32,4</u>
	Alto	35,99	1,2	<u>132,3</u>		Alto	21,00	42,3	<u>47,6</u>
Ketamina	Bajo	82,51	69,4	12,2	Clonazepam	Bajo	23,84	55,7	<u>56,6</u>
	Medio	70,54	97,1	22,4		Medio	36,66	61,5	<u>35,8</u>
	Alto	65,20	90,2	22,8		Alto	20,80	73,7	<u>79,2</u>
Nortriptilina	Bajo	<u>162,2</u>	<u>221,4</u>	<u>21,8</u>	Clozapina	Bajo	89,85	78,0	10,0
	Medio	<u>121,9</u>	<u>251,0</u>	<u>48,9</u>		Medio	83,77	85,3	1,3
	Alto	<u>149,8</u>	<u>194,3</u>	<u>18,3</u>		Alto	68,29	79,2	10,5
Escopolamina	Bajo	94,51	73,0	18,2	Alprazolam	Bajo	89,86	86,5	2,7
	Medio	83,59	101,5	13,7		Medio	88,57	88,2	0,3
	Alto	72,77	84,8	10,8		Alto	81,84	89,5	6,3
Oxazepam	Bajo	79,51	72,0	7,0	Trazodona	Bajo	121,96	113,0	5,4
	Medio	87,57	81,8	4,8		Medio	105,59	117,0	7,2
	Alto	71,83	71,0	0,8		Alto	92,42	98,0	4,1

Para visualizar mejor la recuperación de cada analito, se elaboró un histograma de recuperación con los datos de los niveles medios del día 1.



**Figura 7. Histograma de recuperación de los compuestos analizados**

Los resultados de la recuperación muestran valores conformes (> 50%) para la mayoría de los analitos (14). Hubo valores bajos (20-50%) para metilecgonina, morfina, flunitrazepam y clonazepam. Algunos fueron muy bajos (< 20%); benzoilecgonina y fluoxetina, y otros indeterminados; ecgonina y nortriptilina.

Finalmente, se analizaron 20 muestras de orina de casos forenses recibidos en el Laboratorio de Toxicología del INMLCF, cuya casuística se relacionaba con el consumo de drogas de abuso. Estas muestras fueron seleccionadas por haber arrojado resultados positivos para cocaína, en un barrido (*screening*) por inmunoensayo. Los resultados del análisis confirmatorio utilizando el método GC-MS del presente trabajo, se muestran en la tabla 26.

**Tabla 26.** Resultados del análisis de casos forenses reales

No. Caso	Sustancias identificadas	No. Caso	Sustancias identificadas
1	Benzoilecgonina	11	Benzoilecgonina
2	Benzoilecgonina	12	Benzoilecgonina
3	Benzoilecgonina	13	-
4	-	14	-
5	Benzoilecgonina	15	Benzoilecgonina
6	Benzoilecgonina	16	Benzoilecgonina
7	Cocaína, Benzoilecgonina, Cinamilcocaína	17	Benzoilecgonina, Metilecgonina, Cinamilcocaína
8	Benzoilecgonina, Cocaetileno	18	Cocaína, Benzoilecgonina, Cocaetileno
9	Cocaína, Benzoilecgonina, Cocaetileno	19	Benzoilecgonina
10	Benzoilecgonina	20	Benzoilecgonina

## 2.6. Discusión

Los resultados obtenidos a partir de los parámetros evaluados, permitieron confirmar que el Método funciona para el análisis cualitativo de 21 de los 22 compuestos estudiados. El analito que no se aceptó para ser identificado por el Método fue ecgonina. A continuación se detalla el análisis de los resultados. Primero se realiza una revisión general y al final se profundiza en los casos particulares de cada analito.

Actualmente, los métodos utilizados en los laboratorios de análisis químico deben ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto. Cuando un laboratorio adopta un método que ya ha sido validado en otro laboratorio, se debe verificar para garantizar el funcionamiento adecuado en el nuevo entorno. Las verificaciones suelen estar acompañadas de pequeñas modificaciones, de acuerdo a las necesidades y las condiciones específicas de cada laboratorio (UNODC, 2010). En este trabajo se verificó un método analítico empleado para detectar simultáneamente 23 drogas de abuso en muestras de orina por GC-MS, con el fin de utilizarlo en el Laboratorio de Toxicología Forense del INMLCF en Cali. El método ya había sido validado en la sede de Bucaramanga del INMLCF (Monsalve, 2015).

Cabe advertir que el método se verificó con 22 de las 23 drogas debido a que no se contó con el estándar de una de ellas (zopiclona) para el análisis. Asimismo, se realizaron pequeños cambios, con respecto al método original, con la intención de

adaptarlo a las condiciones específicas del nuevo laboratorio. Las modificaciones se hicieron en la columna cromatográfica utilizada, la cantidad de muestra analizada, la concentración de trabajo del estándar interno (ISTD) y el tipo de agitación en la extracción líquido-líquido. Estas modificaciones consistieron, respectivamente, en el remplazo de una columna de 30 metros de longitud por una de 60 metros, el aumento de la cantidad de muestra analizada de 2 mL a 3 mL, así como la concentración de trabajo del ISTD de 2 µg/mL a 6 µg/mL y finalmente, el remplazo de la sonicación por agitación en *Title plate shaker*, en la etapa de agitación de la extracción. Estos cambios se hicieron, respectivamente, con el fin de mejorar la resolución de los cromatogramas, aumentar la recuperación, tanto de los analitos como del ISTD, debido a que se trabajó con un equipo cromatográfico menos sensible que el del método original, y favorecer la extracción líquido-líquido, ya que con la agitación en *Title plate shaker* se lograron mejores resultados que con sonicación.

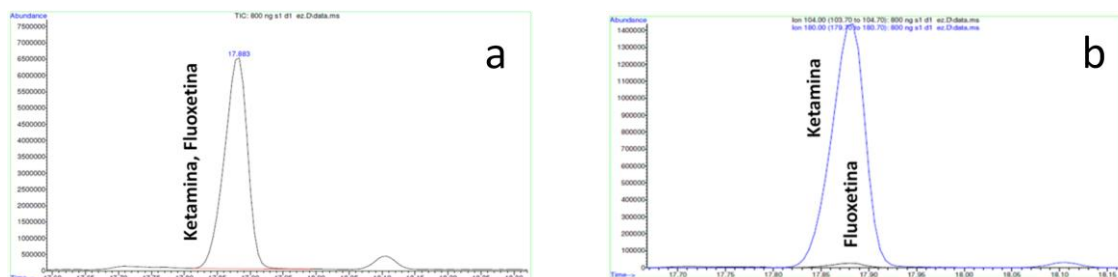
La columna utilizada en este estudio corresponde a una columna capilar Agilent HP-5MS de 60 metros de longitud (tabla 4). Cabe destacar que las columnas capilares han sustituido a las columnas empaquetadas, debido a su gran eficiencia cromatográfica que llega fácilmente a 200 000 platos teóricos y más, comparado con los 10 000 o menos de las columnas empaquetadas (Rubinson, 2001). En los resultados de eficacia de la columna (tabla 17) se observó, efectivamente, valores muy altos de platos teóricos y muy bajos de alturas equivalentes, lo que confirmó el buen rendimiento de la columna.

La selectividad del Método designa el grado en que se puede determinar la presencia de los analitos en orina sin interferencia significativa de los demás componentes de la mezcla. Se observó que para la cocaína y tres de sus metabolitos, el Método presentó buena selectividad. La selectividad de uno de sus metabolitos (ecgonina), no pudo ser determinada. Asimismo, se observó que para las otras drogas, la selectividad del Método cumplió, a excepción de fluoxetina que demostró tener interferencias un poco elevadas con respecto al criterio de aceptación. Igualmente, la interferencia del ISTD estuvo ligeramente por encima del 5% (5,6%) en uno de los dos días analizados. Estos desfases son aceptables ya que son mínimos y al trabajar con matrices biológicas complejas, como lo es la orina, se permite suavizar los criterios de aceptación.

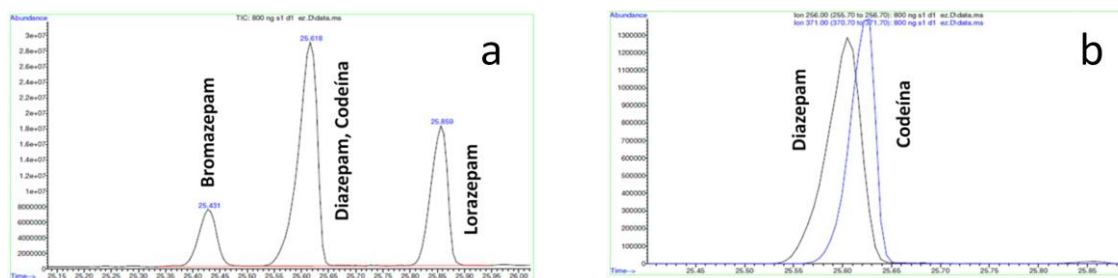
En la selectividad también se evaluó la resolución de los picos. Cuando el cromatograma presenta picos cercanos, pueden confundirse compuestos. En este sentido se observó que tres pares de drogas presentaron picos solapados; fluoxetina y ketamina, diazepam y codeína, morfina y clorpromazina. No obstante, la asociación del detector selectivo de masas permite tener información espectral, relativa a la composición elemental de los analitos. Por lo tanto, se dispone a la vez del tiempo de retención y de las características propias de cada compuesto, definidas por su ion molecular y sus iones principales. De esta forma, al procesar los datos en el *software (ChemStation)* del equipo se pudo realizar una *extracción de iones*, seleccionando el ion molecular de cada analito, y con ello se lograron



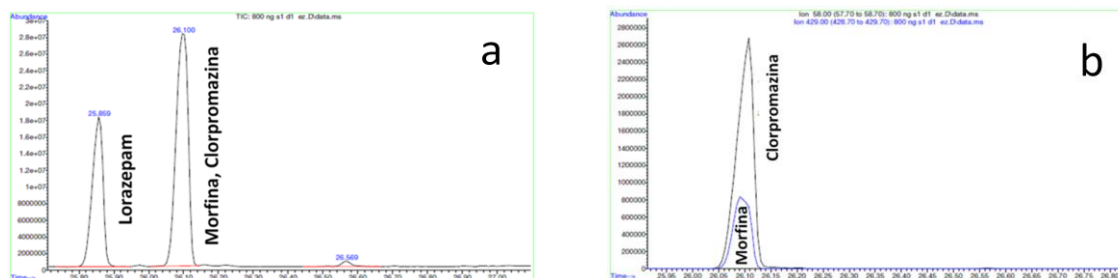
distinguir los picos de cada compuesto, aún cuando se encontraban solapados. En las figuras 8, 9 y 10 se observa, en los cromatogramas de la izquierda, un acercamiento de los picos solapados sin haber realizado la *extracción de iones*. En cambio, a la derecha se observa la diferenciación de los picos de cada compuesto al haber realizado la *extracción de iones*.



**Figura 8. Solapamiento de los picos de ketamina y fluoxetina (a) y su diferenciación por extracción de iones (b)**



**Figura 9. Solapamiento de los picos de diazepam y codeína (a) y su diferenciación por extracción de iones (b)**



**Figura 10. Solapamiento de los picos de morfina y clorpromazina (a) y su diferenciación por extracción de iones (b)**

Es importante tener en cuenta que la *extracción de iones* solo se puede realizar cuando los analitos que se encuentran solapados poseen iones moleculares y principales distintos, lo que permite diferenciarlos. Los compuestos que poseen el mismo ion molecular o iones similares deben estar perfectamente resueltos. Fue por este motivo que se decidió reemplazar la columna cromatográfica de 30 metros por una de 60 metros. Esto con el fin de mejorar la resolución de algunos picos que no se lograban resolver totalmente en la columna de 30 metros, como se observa en la figura 11. En la figura 12 se observa que con la columna de 60 metros se lograron resolver totalmente los picos. De esta manera se obtuvo mayor

resolución, mayor selectividad y por ende resultados de mejor calidad para el análisis cualitativo de los analitos.

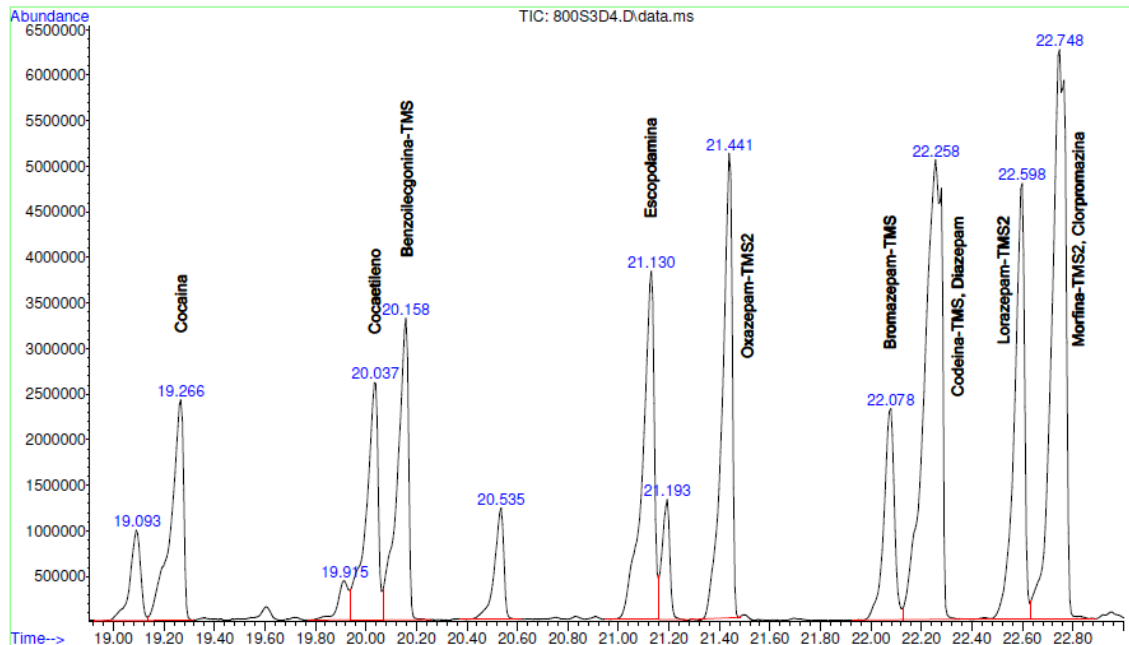


Figura 11. Cromatograma del Método en columna de 30 metros

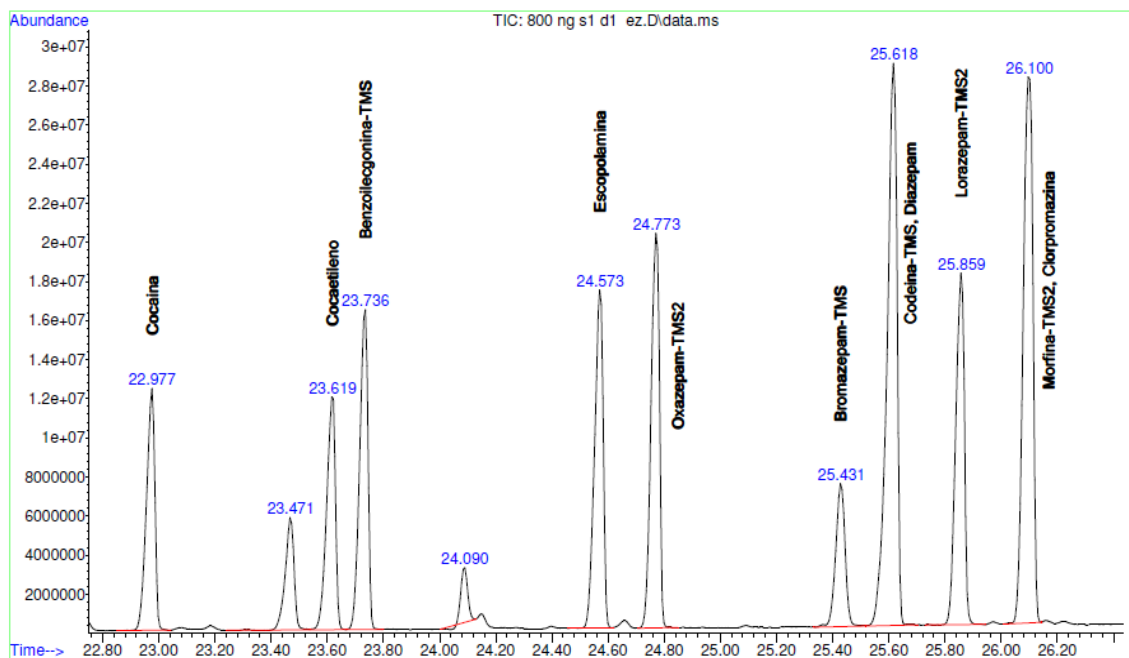


Figura 12. Cromatograma del Método en columna de 60 metros

El análisis de regresión lineal permitió evaluar la relación de la respuesta del detector con la concentración de las sustancias. De esta forma se determinaron los rangos lineales de cada analito en el Sistema y en el Método, lo que a su vez

proporcionó los datos para estimar los límites de detección (LOD). En el Sistema se obtuvieron modelos lineales muy satisfactorios para todos los analitos, a excepción nuevamente de fluoxetina, la cual presentó coeficientes  $r$  y  $r^2$  ligeramente por debajo de la aceptación. En varios analitos se observó que el test de proporcionalidad no cumplió. Esto no implica que el modelo lineal sea inválido, simplemente establece que hay diferencias estadísticamente significativas entre el intercepto y el cero, lo cual es muy común en este tipo de análisis donde la referencia del cero en las respuestas varía con la calibración.

La linealidad del Método se evaluó con un nivel bajo, el cual es más alto que el nivel bajo del Sistema, ya que en el Método se presentan más interferencias debido a la propia matriz biológica y al tratamiento de la muestra con múltiples reactivos. En este caso se observaron resultados satisfactorios para todos los analitos, excepto para la ecgonina. Algunos compuestos presentaron unos coeficientes  $r$  y  $r^2$  un poco bajos, sobre todo nortriptilina y clonazepam. Los LOD en el Sistema estuvieron satisfactorios, en su mayoría, por debajo de 100 ng/mL, a excepción de fluoxetina y nortriptilina, que fueron de 313 y 121 ng/mL, respectivamente. En el Método, los LOD aumentaron un poco pero se mantuvieron todos por debajo de 200 ng/mL, a excepción de clonazepam (264 ng/mL) y de ecgonina (indeterminado). La diferencia entre los LOD del Sistema y del Método se explica por las interferencias generadas por la matriz biológica y el proceso de extracción, además de las pérdidas en la recuperación como se explica más adelante.

La precisión del Método en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad cumplió con el criterio de aceptación para todos los analitos, excepto ecgonina. La precisión se evaluó con los tiempos de retención ya que es un método cualitativo. Si el método fuera cuantitativo se debería evaluar también el CV% de la respuesta (área bajo los picos), el cual es el parámetro que sirve para cuantificar. Esto demuestra que el Método presenta una buena concordancia cualitativa entre los resultados independientes del análisis que se realizan no solo por un mismo analista, en un mismo día y con una misma columna, sino también por diferentes analistas en días diferentes y con columnas distintas. Cabe resaltar que fueron dos columnas de 60 metros distintas, es decir con las mismas características.

En el último parámetro evaluado, correspondiente a la recuperación, se determinó la cantidad de analito que se logró extraer con el Método en comparación con el Sistema, el cual se utilizó como patrón externo. En la mayoría de compuestos se obtuvo un porcentaje de recuperación por encima del 50%, lo cual corresponde a lo aceptado. Sin embargo, recuperaciones inferiores al 50% pueden aceptarse siempre que sean estables, precisas y reproducibles (UNODC, 2010). Este fue el caso de metilecgonina, morfina, flunitrazepam y clonazepam. La metilecgonina y la morfina presentaron CV% de los valores de recuperación por debajo del 20% en los análisis de dos días distintos, lo cual hace que cumplan con las condiciones al estar por debajo del 50% de recuperación. En cambio el flunitrazepam y el clonazepam presentaron CV% por encima de lo establecido, lo cual demuestra

que la recuperación de estos analitos no es muy reproducible. Por otro lado, se encontró que la recuperación de benzoilecgonina y fluoxetina estuvieron por debajo del 20% y además no presentaron buenos CV%. Finalmente, hubo dos analitos para los cuales no se pudo determinar el porcentaje de recuperación; ecgonina y nortriptilina. La ecgonina no se extrajo y los resultados de nortriptilina no se tuvieron en cuenta ya que al tener respuestas tan bajas, hubo mucha variación en la respuesta entre cada análisis. Más adelante se explican estos casos particulares.

En los resultados del análisis de casos forenses reales (tabla 26), se encontró que el 75% fueron resultados confirmatorios positivos para el consumo de cocaína. La no concordancia entre el análisis por inmunoensayo y GC-MS, de los tres resultados (Casos 4, 13 y 14) que dieron negativo, puede deberse a que el análisis por inmunoensayo es poco específico y por ese mismo motivo, es que se requiere una confirmación con un método más selectivo y sensible, como lo es el GC-MS (Martínez, 2012). Se encontró que en todos los resultados positivos se confirmó la presencia de benzoilecgonina. Esto indica que este metabolito de cocaína es un fuerte indicador de su consumo. Además parece ser que es muy estable y se logra detectar durante mayor tiempo, con respecto a la propia cocaína y sus otros metabolitos, ya que fue el único que se detectó en todos los casos positivos. También se detectó cocaína, cocaetileno, metilecgonina y cinamilcocaína. Este último es un compuesto que no estaba incluido en este trabajo. Corresponde a otro de los alcaloides encontrados en la hoja de coca, similar a la cocaína (Téllez, 2005). Esto demuestra que el método es capaz de detectar más sustancias, aparte de las analizadas.

Ahora, pasando a un análisis más individualizado para cada analito, se empieza por el caso de la ecgonina. El hecho de no haber podido determinar los parámetros relacionados con el Método, se debió a que no se logró extraer el analito en la extracción líquido-líquido. Como se observa en la figura 3, el pico 2 correspondiente a la ecgonina se detecta en el cromatograma del Sistema, pero no en el del Método. Esto demuestra que el equipo si es capaz de detectar el analito, pero cuando se hizo la extracción a partir de orina enriquecida, este no pasó de la orina al solvente, sino que se quedó en la orina. Esto podría explicarse con el hecho de que la ecgonina presenta dos pKa (tabla 2), uno ácido (2,8) y uno básico (11,1), correspondientes a los grupos -COOH y -NCH<sub>3</sub>, respectivamente, de su estructura molecular. Por lo tanto, es un compuesto anfótero. Para este tipo de compuestos, el pH que mejor favorece su extracción, es decir, que los mantiene en su forma no ionizada, corresponde a su punto isoeléctrico. De esta manera, habría que determinar el punto isoeléctrico de la ecgonina y ensayar la extracción a un nuevo pH para rectificar si se logra extraer. Otro aspecto que podría explicar lo sucedido se deduce a partir del log P (tabla 2). El log P de la ecgonina es un valor negativo (-3,8), lo que significa que en el equilibrio, la concentración en la fase acuosa es mayor que en la fase orgánica. Esto demuestra que esta molécula tiene mayor afinidad por los solventes polares que apolares. En este sentido se podría ensayar la extracción con otro solvente para

ver qué ocurre. Asimismo, se podría pensar que acontece algo similar con la benzoilecgonina, ya que son muy similares química y fisicoquímicamente. Esto podría estar explicando el bajo porcentaje de recuperación de la benzoilecgonina.

Por otra parte, los resultados de la fluoxetina y la nortriptilina también se vieron afectados. Esto se evidencia en la figura 8 para la fluoxetina con un pico insignificante, y para la nortriptilina en la figura 3 donde no se alcanza ni siquiera a ver su pico correspondiente. Esta situación también se ve evidenciada en los bajos valores de sensibilidad (pendiente) que se obtuvieron para estas drogas en el análisis de regresión lineal (tablas 21 y 22). Para estas moléculas se encontró que la configuración del detector (tabla 12, MS ACQUISITION PARAMETERS) no fue la correcta para poder detectar de manera adecuada estos analitos. El error ocurrió en la configuración del rango de masas del detector. Este rango define los límites de las masas de los iones ( $m/z$ ) dentro de los cuales opera el detector, o dicho de otro modo, las masas que quedan por fuera de este rango no son identificadas. Inicialmente, se decidió configurar el límite inferior (*Low mass*) a 50,0  $m/z$  con el fin de evitar las interferencias generadas por el vapor de agua y de oxígeno, las cuales producen masas entre 30 y 50  $m/z$ .

Lastimosamente, no se advirtió a tiempo que los iones moleculares de la fluoxetina y la nortriptilina tenían masas por debajo de 50,0 (tabla 16), correspondientes a 44  $m/z$  para las dos. Esto ocasionó que el análisis de estas moléculas se realizara únicamente a partir de los iones principales, pero no del molecular. Fue por esto que los picos de estos analitos siempre fueron tan bajos y presentaron problemas en varios de los parámetros evaluados. Sin embargo, a partir de los iones principales que se evaluaron, se lograron verificar satisfactoriamente los parámetros suficientes para validar el método, correspondientes a selectividad, límite de detección y precisión del Método. Como se observa en las figuras 13 y 14, las masas de los iones principales de estas drogas son insignificantes con respecto a las masas de los iones moleculares, lo cual explica la obtención de picos tan bajos a partir del análisis de los iones principales únicamente.

Normalmente, se debe lograr una alta correspondencia entre los espectros que se obtienen de los analitos identificados con los espectros de referencia. A modo de ejemplo, en las figuras 15 y 16 se muestran las correspondencias de los espectros de meperidina y de flunitrazepam, respectivamente. Para que el resultado de la búsqueda sea más eficiente, es importante que tanto, el ion molecular como los iones principales, aparezcan en el espectro de masas obtenido.

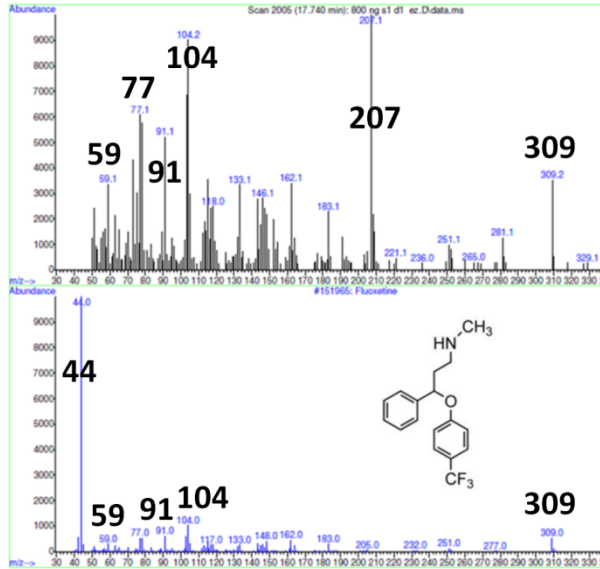


Figura 13. Espectro de masas de la fluoxetina obtenido (arriba) y espectro de referencia de la fluoxetina en la librería *NIST* (abajo)

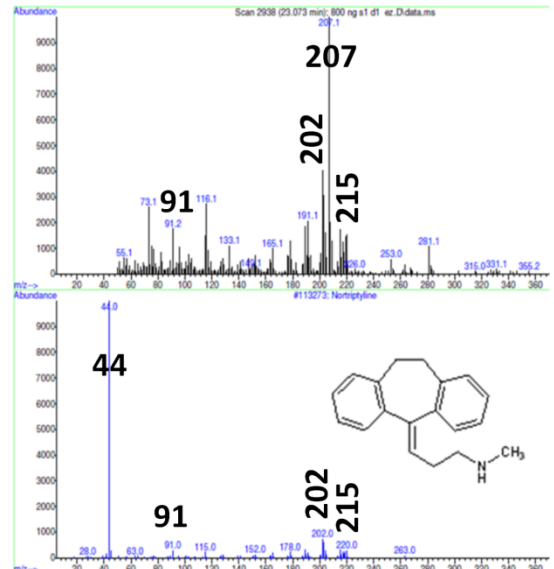


Figura 14. Espectro de masas de la nortriptilina obtenido (arriba) y espectro de referencia de la nortriptilina en la librería *NIST* (abajo)

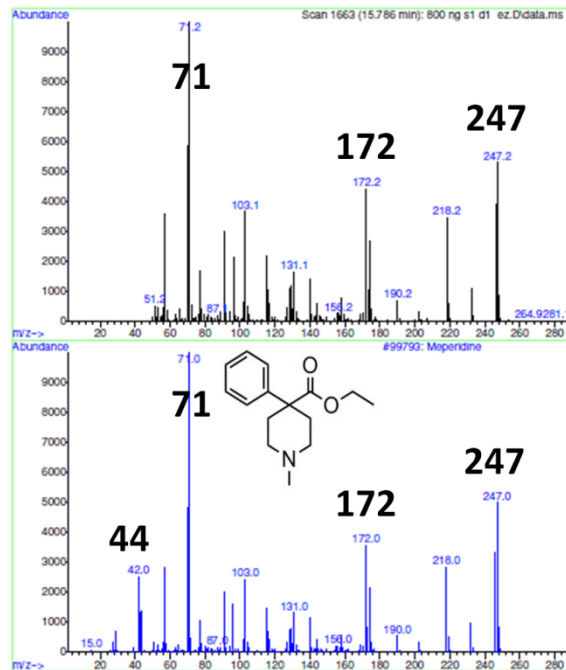


Figura 15. Espectro de masas de meperidina obtenido (arriba) y espectro de referencia de meperidina en la librería *NIST* (abajo)

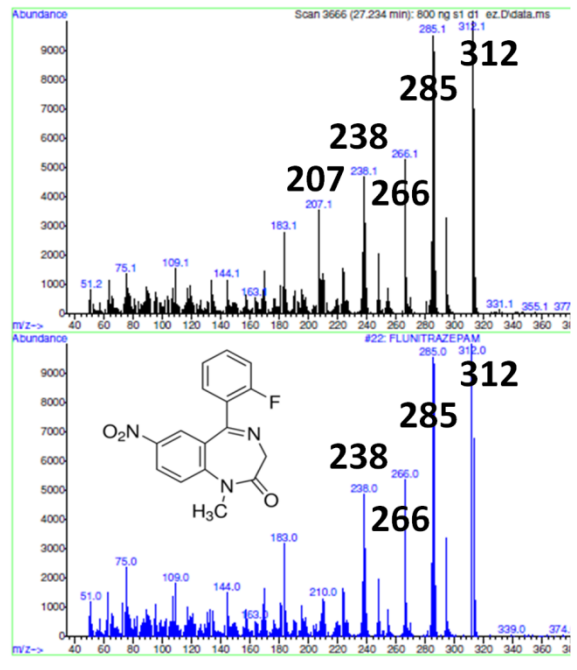
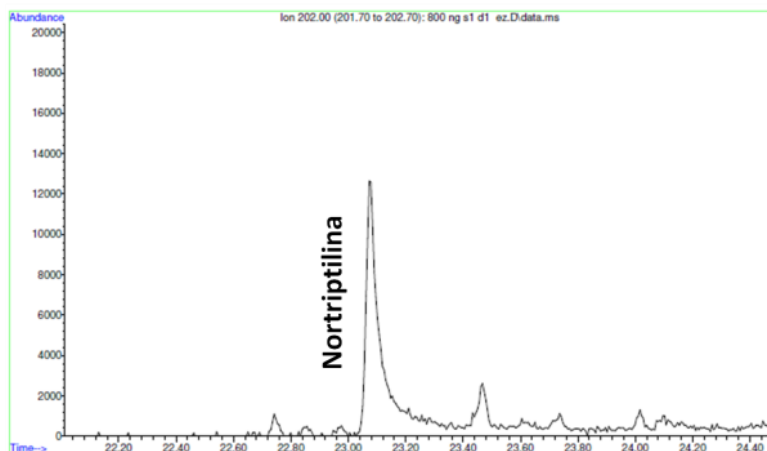


Figura 16. Espectro de masas de flunitrazepam obtenido (arriba) y espectro de referencia de flunitrazepam en la librería *NIST* (abajo)

Si en el espectro obtenido hay otros iones con abundancia relativa importante, se debe investigar si son debidos a una sustancia que haya coeluido o al ruido de fondo originado por el sangrado de la columna (Martínez, 2012). A menudo, una pequeña porción de la fase estacionaria se desprende de la columna y es transportada por el gas portador. Esto se denomina “sangrado de columna”. Este sangrado puede interferir con los resultados generando iones que no pertenecen a los analitos. Algunos iones característicos del sangrado son 77 y 207 m/z (Agilent, 1999). Este fenómeno se puede observar en los espectros de fluoxetina, nortriptilina y flunitrazepam, entre otros. En los de fluoxetina y nortriptilina aparecen mucho más acentuados, debido a que, como ya se explicó, hace falta incluir el ion molecular que tiene más abundancia relativa. Este tipo de situaciones exige que se deban conocer muy bien los iones característicos, tanto de los analitos, como de los contaminantes típicos, como el sangrado, para poder interpretar de manera correcta los resultados.

Para poder observar el pico de la nortriptilina, que no se logra ver en el cromatograma general (figura 3), también hubo que recurrir a la herramienta de *extracción de iones* del *ChemStation*. En la figura 17 se observa el pico de la nortriptilina obtenido por *extracción de iones*.



**Figura 17. Pico de la nortriptilina obtenido por *extracción de iones***

Otro caso particular fue el de flunitrazepam y clonazepam. La utilización del Método para el análisis cualitativo de flunitrazepam y clonazepam demostró tener buena selectividad, linealidad y precisión. Sin embargo, la recuperación fue muy baja y poco reproducible. Esto puede estar indicando que los compuestos no se logran extraer correctamente con el Método. Sin embargo, al verificar sus log P, se observa que tienen unos valores altos (2,1 y 2,4, respectivamente), lo que señala que tienen gran afinidad por solventes orgánicos. Por otro lado, al visualizar sus estructuras moleculares se observa que poseen un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>), por lo que se podría pensar que al someter estas moléculas al proceso de extracción, posiblemente se está generando una degradación por reducción del grupo nitro.

En este sentido habría que realizar un estudio de estabilidad de estos compuestos y evaluar si se degradan en alguna etapa de la extracción.

Finalmente, se puede concluir esta discusión resaltando que aunque hubo algunos compuestos que no cumplieron en su totalidad con los parámetros evaluados, se lograron identificar errores claves y posibles razones que ocasionaron el incumplimiento de estos parámetros. No obstante, el Método se logró verificar satisfactoriamente para el análisis cualitativo de 21 analitos, de los cuales hubo 16 que también mostraron buenas aptitudes para el análisis cuantitativo al haber arrojado resultados satisfactorios en la recuperación. Estos 16 compuestos fueron: cocaína, metilecgonina, cocaetileno, meperidina, ketamina, escopolamina, oxazepam, bromazepam, diazepam, codeína, lorazepam, morfina, clorpromazina, clozapina, alprazolam y trazodona.

## **2.7. Conclusiones**

Se verificó que el método analítico por GC-MS objeto del presente estudio, cumple con el objetivo previsto de confirmar la presencia simultánea de 21 sustancias diana en orina, que incluyen cocaína, metabolitos de cocaína y 17 drogas psicotrópicas. Los parámetros evaluados demostraron que el método es selectivo, preciso y lineal en rangos de concentraciones aceptados. De igual forma, se obtuvieron resultados conformes para la eficacia de la columna cromatográfica y los límites de detección. Con ello, se cumplen los niveles de aceptación establecidos por las normas nacionales e internacionales, relacionadas con la calidad en los laboratorios. De esta se forma, se verificó que el método puede ser usado en el Laboratorio de Toxicología del INMLCF de Cali, con la garantía de obtener resultados confiables.

La técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una herramienta muy poderosa en los análisis toxicológicos, ya que permite determinar la presencia de sustancias de interés forense, en matrices biológicas a concentraciones muy bajas, del orden de ng/mL. Por un lado, la cromatografía de gases permite obtener una separación muy eficiente de los diferentes componentes de la mezcla. Por el otro, la espectrometría de masas es la base en las pruebas de identificación, ya que cada sustancia tiene un espectro de masas único y característico.

También se concluye que el análisis de muestras biológicas para determinar la presencia de drogas, es un gran desafío a nivel científico ya que, como se pudo observar en este estudio, cada sustancia posee propiedades químicas y fisicoquímicas distintas, por lo que cada una se comporta de manera diferente en condiciones determinadas. Esto hace que la labor del químico forense, sea ardua ya que se deben manejar muchos parámetros e intentar lograr un equilibrio para que los métodos analíticos puedan detectar el mayor número de sustancias. La



verificación de métodos que abarquen varios compuestos, ayuda a mejorar la capacidad y la eficacia del trabajo en el laboratorio. Con esto se reduce el tiempo, los costes y el desgaste del analista y se obtienen resultados más concluyentes.

Finalmente, cabe resaltar que un método, así se encuentre verificado, siempre podrá mejorarse. Es decir, que se pueden ensayar cambios en los diferentes procesos analíticos para intentar mejorar los parámetros de desempeño del método. Por ello es importante mantenerse actualizado con las nuevas técnicas y descubrimientos, en busca de la obtención de resultados cada vez mejores. De esta forma, se pueden ir adaptando cambios al método, realizando nuevas verificaciones.

## 2.8. Recomendaciones

Al haber verificado que el método puede detectar diferentes tipos de moléculas, es muy probable que se puedan identificar más drogas, además de las analizadas, así como sus metabolitos. Esto se pudo observar en el análisis de los casos forenses reales donde se identificó cinamilcocaína. Una forma de obtener más información acerca del método, es analizar más sustancias y evaluar cuáles se detectan y cuáles no.

Es muy importante tener en cuenta los errores y las dificultades que se encuentran en las investigaciones, ya que de esto se derivan nuevos cambios. En este estudio, se encontró un error en la configuración de la adquisición de datos del detector, específicamente el límite inferior de masas (*Low mass*). Este parámetro se configuró en 50 m/z, pero hay que cambiarlo a 40 m/z para que pueda detectar los iones de los compuestos que producen fragmentos con masas inferiores a 50 m/z (fluoxetina y nortriptilina).

La calidad de un análisis depende en gran manera de la forma en la que se haya realizado el tratamiento de la muestra. Su influencia sobre el resultado podría ser incluso más importante que la medida en sí misma o la precisión del instrumento utilizado. Por ello, se podría investigar sobre los distintos métodos de extracción, con el fin de implementar algún cambio que pueda mejorar las propiedades de recuperación de los analitos.

En el momento de usar el método, hay que procurar cumplir con cada detalle para reducir los posibles errores. Por ejemplo, en los parámetros cromatográficos se especifica el tipo de *liner*. Este accesorio es crucial en la inyección de la muestra en la columna. Asimismo, existen varios modelos, cada uno con sus características específicas, lo cual puede generar variaciones significativas en los resultados, cuando se utiliza uno u otro tipo de *liner*.

### 3. Bibliografía

- A.E.F.I. (2001). *Validación de Métodos Analíticos*. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.
- Acosta Guzmán, A. (1961). *Medicina legal y toxicología*. Ciudad Universitaria.
- Agilent. (1999). *5973 Network Mass Selective Detector Hardware Manual*. USA: Agilent Technologies.
- Agilent. (2003). *5973 inert Mass Selective Detector Hardware Manual*. USA: Agilent Technologies.
- Carson R, H. (2008). *Manual de Toxicología para Médicos*. Barcelona: Elsevier Masson.
- Castaño, G. (2013). Consumo de drogas emergentes en Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Psiquiatría* 42(3), 248-256.
- Cheong, J. C. (2010). Gas chromatography-mass spectrometric method for the screening and quantification of illicit drugs and their metabolites in human urine using solid-phase extraction and trimethylsilyl derivatization. *Journal of Separation Science Vol 33 Issue 12*, 1767-1778.
- Dams, R. (2003). Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17(14), 1665-70.
- Diamond, R. J. (2003). *Psicofarmacología para todos*. Santiago de Chile: Cuatro Vientos.
- Dresen, S. (2010). Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP® LC-MS/MS system and library searching. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Vol 396 Issue 7*, 2425-2434.
- Espinosa, I. I. (2014). *Intoxicaciones con intencionalidad delictiva en Bogotá D.C. notificadas al sistema de información de vigilancia en salud pública SIVIGILA durante los años 2008 a 2012*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Johansen, S. S. (2007). Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Vol 852 Issues 1-2*, 338-344.
- Jurado, J. M. (2016). Ajustando datos químicos con Excel: un tutorial práctico. *Educación Química* 27, 21-29.

- Lee, H. H. (2016). Simultaneous identification of abused drugs, benzodiazepines, and new psychoactive substances in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 1-10.
- Martínez, M. A. (2012). Criterios cualitativos en toxicología forense. *Revista Española de Medicina Legal* 38(2), 68-75.
- Medicinalegal.gov.co. (2016). *El Instituto - Instituto Nacional de Medicina Legal*. [Sitio web] Disponible en: <http://www.medicinalegal.gov.co/el-instituto> [Visitado 12-Jul-2016].
- Medscape.com. (2016). *Pharmacists - Medscape*. [Sitio web] Disponible en: <http://www.medscape.com/pharmacists> [Visitado 18-Jul-2016].
- Moffat, A. C., & al. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons Fourth edition*. London: Pharmaceutical Press.
- Molnár, B. (2015). The role of alkylsilyl derivatization techniques in the analysis of illicit drugs by gas chromatography. *Microchemical Journal* 118, 101-109.
- Monsalve, L. A. (2015). *Estudio comparativo y análisis simultáneo por GC-MS. GC-MS/MS y LC-MS/MS de drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos en muestras biológicas de interés forense*. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Moreno, I. (2015). Determination of ketamine and its major metabolite, norketamine, in urine and plasma samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Vol 1004*, 67-78.
- Narconon International. (2016). *Narconon | Rehabilitación de Drogas | Educación sobre las drogas*. [Sitio web] Disponible en: <http://www.narconon.org/es/> [Visitado 7-Jul-2016].
- Pérez de los Cobos Peris, J. (2006). *Tratado SET de trastornos adictivos*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- PNUFID. (1995). *Métodos recomendados para la detección y el análisis de heroína, cannabinoides, cocaína, anfetamina, metanfetamina y derivados anfetamínicos con anillo sustituido en especímenes biológicos*. Nueva York: Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas.
- Rouessac, F. (2003). *ANÁLISIS QUÍMICO. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. Madrid: McGrawHill.
- Rubinson, K. A. (2001). *ANÁLISIS INSTRUMENTAL*. Madrid: Pearson Educación, S.A.

- Sempio, C. (2014). Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC–MS/MS: Application on postmortem samples. *Journal of Chromatography B*, 1-7.
- Sicachá, L. (2015). *Confirmación de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno y cannabinoides en muestras de orina y sangre por GC/MSD*. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses: Procedimiento Estandarizado de Trabajo, Código: DG-M-PET-62, Versión: 3.
- Sigma-Aldrich. (2016). *US Export*. [Sitio web] Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/us-export.html> [Visitado 4-Jul-2016].
- Skoog. (2001). *Principios de Análisis Instrumental - Quinta edición*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Stashenko, E. (2012). GC-MS: herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito. *Scientia Chomatographica*, 21-33.
- Téllez, J. (2005). Efectos toxicológicos y neuropsiquiátricos producidos por consumo de cocaína. *Revista de la Facultad de Medicina Vol 53*, Universidad Nacional de Colombia.
- Truta, L. (2016). Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol 128*, 496-503.
- UNODC. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Nueva York: Naciones Unidas.
- UNODC. (2016). *Informe Mundial sobre las Drogas 2016*. Nueva York: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.
- Wolff, K. (2001). Revisión de los indicadores biológicos de uso ilegal de drogas, consideraciones prácticas y unidad clínica. *Revista de Toxicomanías*, 5-27.