



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**DETERMINACIÓN  
DE CANNABINOIDES POR HPLC  
ACOPLADO A ESPECTROMETRO DE  
MASAS EN CABELLO Y ORINA.**

**T E S I S**

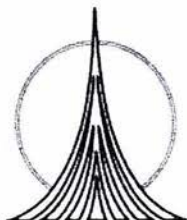
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**LUCIA PÉREZ ISLAS**

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*A mis Padres.*

*Por la oportunidad y el apoyo  
Para llegar a la realización de  
Esta etapa de mi vida..*

*Amelia y Rodrigo.*

*Por la ayuda moral recibida  
durante este tiempo.*

*Karina y Rosendo.*

*Por creer en mí,  
apoyándome en todo momento.*

*A las familia; Islas Solís, Pérez López y Quiterio García.*

*Por la confianza que depositaron en mí,  
de lograr este momento.*

# ÍNDICE.

1. RESUMEN .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
3. ANTECEDENTES TEÓRICOS .....	3
3.1. HISTORIA .....	3
3.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS .....	5
3.3. FARMACOLOGÍA .....	8
3.3.1. Farmacocinética .....	8
3.3.2. Farmacodinamia .....	10
3.3.3. Sistema Nervioso Central .....	11
3.3.4. Sistema Endocrino .....	11
3.3.5. Sistema Respiratorio .....	11
3.3.6. Efectos Psicotóxicos .....	12
3.3.7. Tolerancia y Dependencia Física .....	12
3.3.8. Usos Terapéuticos .....	12
3.4. MARCO LEGAL .....	13
3.5 ASPECTOS LEGALES RELACIONADOS CON LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE DROGAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS ....	17
3.5.1. En personas vivas .....	17
3.5.2. En cadáveres .....	19
3.6. AMPLITUD Y PROFUNDIDAD EN EL ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO .	20
3.7. CROMATOGRAFÍA .....	21
3.7.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución .....	22
3.7.2. Constituyentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución .	24
3.7.3. Análisis Cualitativo por HPLC .....	26
3.7.4. Análisis Cuantitativo por HPLC .....	26
3.8. ESPECTRÓMETRO DE MASAS . .....	27
3.9. VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO .....	32

4. PROYECTO EXPERIMENTAL .....	35
4.1. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS DE CANNABINOIDES .....	35
4.2. TIPOS DE MUESTRAS .....	36
4.2.1. Matrices Biológicas .....	36
4.2.2. Matrices no Biológicas .....	38
4.3. PRETRATAMIENTO .....	38
4.3.1. Extracción a partir de orina .....	39
4.3.2. Extracción a partir de cabello .....	40
4.4. PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA CANNABINOIDES .....	41
4.5. CONDICIONES DE TRABAJO .....	41
4.6. CONTROLES DE CALIDAD .....	45
4.7. INTERPRETACIÓN .....	45
4.8. CONCLUSIONES .....	46
5. BIBLIOGRAFÍA .....	48

## 1. RESUMEN

La marihuana (*Cannabis sativa*), es una droga muy antigua e ilegal; Se trata de una planta que sintetiza no menos de 400 compuestos químicos, de los cuales más de 60 son cannabinoides. Los tres más abundantes incluyen cannabino (CBN), cannabidiol (CBD) y varios isómeros del tetrahidrocannabinol (THC). Es una droga de fácil adquisición y bajo costo, ya que en algunas regiones de nuestro país, como en los estados de Guerrero y Michoacán se siembra. Lo preocupante es que el consumo de esta droga se encuentra desde los jóvenes de secundaria hasta personas de edad adulta.

Es de importancia la descripción de las características químicas, físicas y farmacológicas de los cannabinoides contenidos en la marihuana, debido a que se requiere saber su estructura, pKa, estabilidad, etc., en el uso de algunos métodos analíticos usados para su identificación y cuantificación.

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica y hemerográfica sobre las propiedades de los cannabinoides y los fundamentos de las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrometría de masas, proponiendo así un método analítico que permita la identificación y cuantificación de cannabinoides en fluidos y tejidos biológicos para que sea útil en procesos legales, porque como ya se sabe la Marihuana es una droga de abuso.

## **2. OBJETIVOS**

1. Realizar una revisión bibliográfica y hemerográfica de métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación en cabello y orina de los principales cannabinoides contenidos en la marihuana.
2. Establecer las diferencias entre los métodos presuntivos y los confirmativos, proporcionando una herramienta analítica en los procesos legales.
3. Aplicar los conocimientos adquiridos en el diplomado de Química Legal para la elaboración de una propuesta de análisis químico.
4. Presentar una propuesta cualitativa y cuantitativa para cannabinoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas.



### **3. ANTECEDENTES TEÓRICOS.**

#### **3.1. HISTORIA.**

La marihuana fue conocida desde el siglo XV a.c., encontrándose mencionada en un tratado de Botánica chino llamado "Rhy-ya" el cual hace notar el hecho de que existen dos variedades de marihuana, una productora de granos y otra únicamente de flores. Otros autores remontan su origen a 900 a.c., diciendo que el Nephestes de quien habla Homero, tenía como base dicha planta y por último que su antigüedad se remonta a la India donde se cultivó desde 800 ó 900 a.c., posteriormente se menciona como medicamento en los escritos de "Susmuta", sobre la medicina Hindú. En los tratados hindúes se le atribuye origen divino. En Grecia, Galeno la citó como carminativa afrodisíaca; pero no como embriagante.

Parece ser que no fue sino hasta la edad media, cuando se difundió su empleo, siendo los árabes los encargados de ello, que la conocían de la India. Se considera que fue en el año 658, cuando un jefe Cheich llamado Haider la popularizó en los árabes que la denominaron "Haschisch".

La campaña de Napoleón en Egipto dió múltiples enseñanzas respecto a los efectos de la planta, no obstante lo cual, sus propiedades terapéuticas fueron empleadas hasta el siglo pasado.

Se presume que fue introducida en Europa por el naturista Sonnerat, siendo utilizada terapéuticamente por vez primera en Francia, como auxiliar en algunos casos de alteraciones mentales por el profesor Moreau.

El clima de las colonias Americanas fue considerado ideal para el cultivo del Cábamo.

En México la primera evidencia que tenemos del uso de la planta como inhalante, es en la Revolución con la canción ferrocarrilera conocida como la Cucaracha.<sup>(1)</sup>

Bajo una gran variedad de nombres, como hachís, bahang, cábamo, marihuana, etcétera, Cannabis se usa en todo el mundo, ya sea fumada o por vía bucal.



Nunca causa la muerte y su peligro es negado por muchos, aunque los usuarios de tiempo prolongado desarrollan estados psicóticos y hay alguna evidencia de defectos genéticos en hijos de usuarios.<sup>(2)</sup>

Los derivados de la planta *Cannabis sativa* forma un grupo de sustancias que, por sus efectos farmacológicos, se han incluido dentro de los alucinógenos. A éstos pertenece la marihuana, popular en México, donde crece espontáneamente en solares baldíos y jardines; es el alucinógeno más consumido en todo el mundo y sus adictos suman más de 400 millones.

La marihuana fue introducida en Estados Unidos de América hacia 1920. En la actualidad su consumo es grande en todas las clases sociales. México aporta el 60% de la Cannabis que pasa de contrabando a ese país.

Los cannabinoles (principios activos) se encuentra en todas las partes de la planta, pero principalmente en la flor y en las hojas jóvenes y pequeñas.<sup>(3)</sup>

El cáñamo de la india, obtenido de los extremos florecidos de las plantas del cáñamo, es una droga muy antigua. Otros nombres para esta droga o sus productos incluyen hashish, charas, bhang, ganja, dagga y marihuana. El cáñamo común es un planta herbácea anual cuya única especie es la *Cannabis sativa*. Aunque todas las partes de la planta femenina y masculina, contienen sustancias psicoactivas (cannabinoides), sus mayores concentraciones se encuentran en los extremos florecidos.

En el Medio Oriente y en el norte de África, el exudado resinoso seco de los extremos se llaman hashish; en el lejano Oriente se denomina charas. Las hojas secas y los brotes en flor de la planta, que contienen cantidades más pequeñas de sustancia activa, se llama bahang y la masa resinosa de las hojas más chicas se denominan ganja.

Se utiliza el termino de marihuana para referirse a cualquier parte de la planta o extracto de ella que induzca cambios somáticos y psíquicos en el hombre.<sup>(4)</sup>

Se reconocieron propiedades medicinales de la planta hace 2,700 años en China para el alivio de dolor, espasmo del músculo, convulsiones, epilepsia, asma, y reuma. O'Shaughnessy, un cirujano irlandés, introdujo la planta a Europa en 1842.

En 1845, el psiquiatra francés Gira Moreau describió los efectos del cáñamo como "un debilitar gradual del poder dirigir los pensamientos con voluntad"<sup>(5)</sup>

### 3.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.

La Cannabis es una planta herbácea anual que pertenece a la familia de las Urticáceas. Existe una sola especie que es la Cannabis sativa; L. Cannabis indica y Cannabis americana, no son más que variedades agronómicas de la anterior.

La hierba consiste en las flores hembras, las semillas y las hojas superiores. Las hojas tienen peciolo largos, que sostienen entre cinco y siete hojillas lanceoladas, puntiagudas y serradas.

Las semillas son globulares, miden aproximadamente 2mm de diámetro; la hierba puede estar cubierta completamente de resina. La resina puede encontrarse separada del resto en masas verdosas, amarillentas, color marrón o negras; usualmente es muy dura y quebradiza. Tanto su sabor como su aroma son característicos. Las flores se distinguen en masculinas y femeninas. Las flores masculinas son pedunculadas y de tono verde amarillento. Los estambres tienen filamentos cortos. El polen es pulverulento y abundante.

Las flores femeninas son sésiles, apétaladas y están protegidas por una bráctea que cubre completamente el ovario y se extiende a los estigmas. En la figura 1 se puede observar los dos tipos de flores.<sup>(6,7)</sup>



**Figura 1.** Muestra de flores hembra y macho de la Cannabis sativa.

Si no se cosecha puede llegar hasta 4 metros de altura. Sus hojas lanceoladas y dentadas, que pueden llegar a medir 15 cm de largo, la distinguen singularmente. Tienen digitaciones de entre 3 y 15 segmentos, aunque por lo general son de 7 a 9 fragmentos. En la figura 2 se muestra algunos ejemplos de hoja de marihuana.



Figura 2. Hojas de marihuana.

## QUÍMICA

La planta del cáñamo de la india sintetiza no menos de 400 compuestos químicos, de los cuales más de 60 son cannabinoides. Los tres más abundantes incluyen cannabinal (CBN), cannabidiol (CBD) y varios isómeros del tetrahidrocannabinol (THC). El  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol es el isómero responsable de la mayoría de los efectos psicológicos característicos de la marihuana.<sup>(4)</sup>



### Cannabidiol (CBD)

Fórmula condensada:  $C_{21}H_{30}O_2$

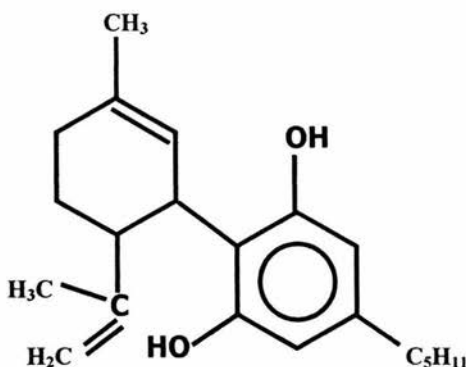
Peso Molecular: 314.5

Composición: C = 80.21%, H = 9.62%, O = 10.18%

Punto de fusión: 66° a 67°C

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, relativamente soluble en cloroformo, soluble en etanol, metanol, éter, benceno, hexano y soluciones alcalinas.

Tiempo de retención: 7.47 min.



### Cannabinol (CBN)

Fórmula condensada:  $C_{21}H_{26}O_2$

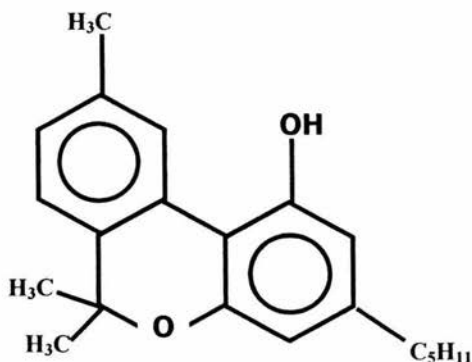
Peso Molecular: 310.4

Composición: C = 81.25%, H = 8.44%, O = 10.31%

Punto de fusión: 76 a 77°C

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, relativamente soluble en cloroformo, soluble en metanol, etanol y en soluciones alcalinas.

Tiempo de retención: 11.77 min.



### $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC)

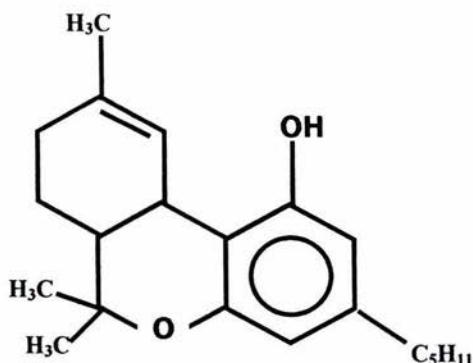
Formula condensada:  $C_{21}H_{30}O_2$

Peso Molecular: 314.5

Composición: C = 80.21%, H = 9.62%, O = 10.18%

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, relativamente soluble en cloroformo, soluble en metanol, etanol, hexano, éter y benceno.

Tiempo de retención: 13.35 min. <sup>(5,8,9,10)</sup>



## 3.3 . FARMACOLOGÍA.

### 3.3.1. Farmacocinética.

#### Absorción.

La principal ruta farmacocinética de administración de la marihuana es bronquial ya que se fuma. Aproximadamente 30% de THC se estima que es destruido por la pirólisis durante el fumar. Las drogas fumadas son de fácil abuso, en parte debido a la eficiencia de la velocidad de entrega de droga a los pulmones y al cerebro.

La concentración de cannabinoides en plasma es ligeramente más baja cuando se fuma, comparada con las concentraciones máximas cuando la administración es intravenosa. <sup>(5)</sup>

La disponibilidad sistémica del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol producida al fumar un cigarrillo de marihuana varía entre un 2% y un 50%, según la técnica utilizada por el fumador. Así un cigarrillo de 1g que contiene 2% de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol podría aportar entre 0.4 y 10mg a la circulación.

La biodisponibilidad del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol oral es de 4 al 12%, según el vehículo.

Los efectos farmacológicos se producen poco después de comenzar a fumar; se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de 7 a 10 minutos; se obtienen efectos fisiológicos y subjetivos máximos en 20 a 30 minutos, no hay efectos máximos hasta la segunda o tercera hora y se correlacionan bien con las concentraciones plasmáticas de la droga.<sup>(4,7)</sup>

### **Distribución.**

El delta-9-THC es muy liposoluble. Casi el 100% está ligado a proteínas, para distribuirse entre lipoproteínas y albúmina, en proporción de 6 a 4, respectivamente.

Después de la inhalación, los niveles en el plasma descienden rápidamente. En cambio, la fase de eliminación es lenta.<sup>(7)</sup>

El THC tiene un volumen grande de distribución (10 L/kg). Favorablemente se introduce a órganos como el cerebro, en los tejidos se introduce más despacio como THC redistribuyéndose en los tejidos vasculares de los compartimientos periféricos.

La solubilidad lipofílica del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol es alta. En tejido graso se han detectado concentraciones de la droga después de cuatro semanas de haberse consumido.<sup>(5)</sup>

### **Metabolismo y Eliminación.**

Los tres principios activos principales de la marihuana se metabolizan en el hígado y posiblemente también en los pulmones, los cuales son hidrolizados rápidamente a los ácidos correspondientes que, junto con los ácidos polares, constituyen los metabolitos que se detectan en los exámenes de orina. Los ácidos polares son metabolitos que, contrariamente a los carboxiácidos monohidroxilados, no se desplazan cuando se identifican mediante el método de la cromatografía en capa delgada.<sup>(2)</sup>

El  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol se convierte con rapidez en un metabolito activo, el 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, que produce efectos idénticos al del compuesto original. El 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol es, a su vez, convertido en metabolitos inactivos, más polares, que se excretan por la orina. Uno de los metabolitos más comunes es el ácido 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol-9-carboxílico, pero se han identificado ahora 80 compuestos. Las concentraciones plasmáticas de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol y de 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol caen con rapidez, después de alcanzar sus valores máximos reflejando la distribución de estos compuestos lipofílicos hacia tejidos ricos en lípidos. Esta primera fase de declinación rápida es



seguida por una fase terminal mucho más lenta; la vida media de eliminación es de alrededor de 30 horas. Esto es compatible con la persistencia de vestigios de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol y sus metabolitos en el plasma; también puede detectarse en la orina. En ciertas circunstancias, la inhalación pasiva del humo puede producir una absorción suficiente de cannabinoides como para ocasionar respuesta positiva en pruebas de sensibilidad para metabolitos urinarios.<sup>(4)</sup>

La excreción en heces, a través de la bilis, constituye la ruta principal de eliminación de metabolitos cannabinoides no conjugados: 30% de la dosis endovenosa y 50% de la dosis oral. La eliminación de estos metabolitos suele ocurrir después de tres días.

El  $\Delta^9$ -THC puede atravesar la placenta cuando se halla en niveles elevados en el plasma de la madre. Así mismo, puede eliminarse en la leche materna.<sup>(7)</sup>

### **3.3.2. Farmacodinamia.**

#### **Mecanismo de acción.**

Finalmente se han encontrado receptores específicos en los que actúa el THC, son los CB1 que se localizan principalmente en las moléculas de los ganglios basales que intervienen en la coordinación de los movimientos voluntarios, en el hipocampo que es el asiento de la memoria a corto plazo y en el cerebelo, encargado de la coordinación del equilibrio y de los movimientos finos. En el lóbulo frontal y el temporal se halla el asiento de la memoria operativa y aquí también hay bastantes receptores CB1.

Asimismo se encuentran en sitios como la corteza estriada, la corteza cerebral y en el corte frontal que controla las funciones cerebrales "ejecutivas", como por ejemplo las fantasías, la despersonalización y las alteraciones en la percepción del tiempo. Por último, la existencia de receptores CB1 en las regiones del sistema límbico relacionado con la conducta emocional y motivacional puede ayudar a explicar tanto los efectos euforizantes como su capacidad para desencadenar reacciones de pánico/ansiedad y el llamado "síndrome amotivacional" asociado al uso prolongado de este psicoactivo.<sup>(11)</sup>

### **3.3.3. Sistema Nervioso Central**

Una dosis oral de 20mg de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol o el fumar un cigarrillo que contenga un 2% de la droga produce efectos sobre el ánimo, la memoria, la coordinación motora, la capacidad cognoscitiva y el sentido del tiempo; la somnolencia cuando los sujetos están solos, pero es menos pronunciada cuando los consumidores pueden interactuar y a menudo pueden producir risas espontáneas. La memoria reciente está alterada y se deteriora la capacidad de realizar tareas que requieran pasos mentales.

### **3.3.4. Sistema Endocrino**

Existen datos contradictorios en relación con los efectos de dosis crónicas elevadas de marihuana sobre la función sexual humana. Se han informado concentraciones disminuidas de testosterona e inhibición reversible de la espermatogénesis en el hombre. Las mujeres pueden ser más sensibles. Un solo cigarrillo puede suprimir la LH plasmática durante la fase lútea del ciclo menstrual; esta propiedad puede ser responsable de ciclos anovulatorios asociados con el uso de la marihuana. El recién nacido tiende a presentar un menor peso, períodos de gestación más cortos y mayor frecuencia de malformaciones cuando la madre es consumidora de la marihuana.

### **3.3.5. Sistema Respiratorio**

Aunque no se producen cambios constantes en la frecuencia respiratoria, durante mucho tiempo se ha asociado el uso prolongado de marihuana con bronquitis y asma; este hábito afecta en forma adversa la función pulmonar y el epitelio bronquial, aún en personas jóvenes. Sin embargo, la respuesta aguda al  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol es una broncodilatación significativa y relativamente duradera a la que se desarrolla poca tolerancia.

### **3.3.6. Efectos Psicotóxicos**

Las dosis más elevadas de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol pueden inducir alucinaciones francas, ilusiones y sentimientos paranoides. El pensamiento se torna confuso y desorganizado; la despersonalización y la alteración del sentido del tiempo se acentúan. La euforia puede ser reemplazada por una ansiedad que alcanza proporciones de pánico, con frecuencia como resultado de la sensación de que el estado inducido por la droga nunca finalizará.

No obstante, el efecto subjetivo máximo de la marihuana fumada se produce 20 a 30 minutos después de la inhalación y se encuentra algo retrasado respecto de las concentraciones plasmáticas de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol.

### **3.3.7. Tolerancia y Dependencia Física**

Informes provenientes de muchos países indican que un número regular de usuarios de marihuana consumen cantidades de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol que producirán efectos tóxicos en la mayoría de los consumidores. Cuando se administra  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol oral a voluntarios cada 4 horas, se desarrolla tolerancia a los estados de ánimo inducidos por la droga, la taquicardia, la disminución de la temperatura cutánea, el aumento de la temperatura corporal y el deterioro en la realización de las pruebas psicomotoras. En realidad los consumidores experimentados pueden manifestar más efectos subjetivos como consecuencia de fumar marihuana que los sujetos no habituados.

Se ha observado cierto grado de tolerancia cruzada entre alcohol o los opiodes y el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol en los animales.

### **3.3.8. Usos Terapéuticos**

Algunos cannabinoides sintéticos pueden utilizarse como analgésicos o anticonvulsivantes. La capacidad de algunos cannabinoides naturales y sintéticos para disminuir la presión intraocular ha tenido poca utilidad hasta la fecha. Ahora se dispone de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol y un cannabinoide sintético para ser usado como antiemético oral. Están indicados para el control de las náuseas asociadas con quimioterapia.<sup>(4)</sup>



### 3.4. MARCO LEGAL.

Aunque etimológicamente la palabra *narcótico* hace referencia al sueño inducido artificialmente, en México y en muchas otras partes del mundo, siguiendo la doctrina estadounidense, se les llama narcóticos a todas las sustancias prohibidas, ya sea que produzcan sueño, lo quiten o simplemente no interfieran en las funciones del sueño. En la terminología oficial todas son *narcóticos*. Desde aquí es posible constatar que los criterios de clasificación oficial obedecen poco a la farmacología y mucho menos a la etimología.

La República Mexicana ha firmado una serie de acuerdos internacionales que le obligan a prohibir todas las sustancias que la Organización Mundial de la Salud considere objeto de control internacional, no obstante, no existe una sola ley dentro del territorio nacional que castigue el consumo de sustancias ilegales; por el contrario, el Artículo 195 del Código Penal señala que: "No se procederá en contra de quien, no siendo farmacodependiente se le encuentre en posesión de alguno de los narcóticos señalados en el artículo 193, por una sola vez y en cantidad tal que pueda presumirse que está destinada a su consumo personal".

Por su parte el Artículo 199 del mismo código establece: "Al farmacodependiente que posea para su estricto consumo personal algún narcótico de los señalados en el artículo 193 no se le aplicará pena alguna". Así pues, tanto farmacodependientes como no farmacodependientes están protegidos por la ley en cuanto al consumo y a la posesión de pequeñas cantidades. La posesión de cantidades mayores a las que se explicitan en las tablas anexas al Código Penal se castiga con diversas penas puesto que eso cae ya dentro del delito tipificado como tráfico de narcóticos (para la legislación mexicana, un narcótico no es sólo una sustancia que deprima el sistema nervioso central, sino cualquier sustancia prohibida).

En el código penal para el Distrito Federal, en el título séptimo, delitos contra la salud capítulo I nos explica que:

De la producción, tenencia, tráfico, proselitismo y otros actos en materia de narcóticos. Esto se especifica en los siguientes artículos:

**Artículo 193.** Se consideran narcóticos a los estupefacientes, psicotrópicos y demás sustancias o vegetales que determinen la Ley General de Salud, los convenios y tratados internacionales de observancia obligatoria en México y los que señalen las demás disposiciones legales aplicables en la materia.

Los narcóticos empleados en la comisión de los delitos a que se refiere este capítulo, se pondrán a disposición de la autoridad sanitaria federal, la que procederá de acuerdo con las disposiciones o leyes de la materia y su aprovechamiento lícito o a su destrucción.

Tratándose de instrumentos y vehículos utilizados para cometer los delitos considerados en este capítulo, así como de objetos y productos de estos delitos, cualquiera que sea la naturaleza de dichos bienes, se estará a lo dispuesto en los artículos 40 y 41. Para este fin el Ministerio público dispondrá durante la averiguación previa el aseguramiento que corresponda y el destino procedente en apoyo a la procuraduría de justicia, o lo solicitará en el proceso, y promoverá el decomiso para que los bienes de que se trate o su producto se destinen a la impartición de justicia, o bien, promoverá en su caso, la suspensión y la privación de derechos agrarios o de otra índole, ante las autoridades que resulten competentes conforme a las normas aplicadas.

**Artículo 194.** Se impondrá prisión de diez a veinticinco años y de cien hasta quinientos días de multa al que:

**I.** Produzca, transporte, trafique, comercie, suministre aún gratuitamente o prescriba alguno de los narcóticos señalados en el artículo anterior, sin la autorización correspondiente a que se refiere la Ley General de Salud.

Para los efectos de esta fracción, por producir se entiende manufacturar, fabricar, elaborar, preparar o acondicionar algún narcótico, y por comerciar: vender, comprar, adquirir o enajenar algún narcótico;

**II.** Introduzca o extraiga del país alguno de los narcóticos comprendidos en el artículo anterior, aunque fuere en forma momentánea o en tránsito.

Si la introducción o extracción a que se refiere esta fracción no llegare a consumarse, pero de los actos realizados se desprenda claramente que ésta era la finalidad del agente, la pena aplicable será de hasta las dos terceras partes de la prevista en el presente artículo.

**III.** Aporte recursos económicos o de cualquier especie, o colabore de cualquier manera al financiamiento, supervisión o fomento para posibilitar la ejecución de alguno de los delitos a que se refiere este capítulo; y

**IV.** Realice actos de publicidad o propaganda, para que se consuma cualesquiera de las sustancias comprendidas en el artículo anterior.

Las mismas penas previstas en este artículo y, además, privación del cargo o comiso e inhabilitación para ocupar otro hasta por cinco años, se impondrán al servidor público que, en ejercicio de sus funciones o aprovechando su cargo, permita, autorice o tolere cualesquiera de las conductas señaladas en este artículo.



**Artículo 195.** Se impondrá de cinco a quince años de prisión y de cien a trescientos cincuenta días de multa, al que posea alguno de los narcóticos señalados en el artículo 193, sin la autorización correspondiente a que se refiere la Ley General de Salud, siempre y cuando esa posesión sea con finalidad de realizar alguna de las conductas previstas en el artículo 194.

**Artículo 198.** Al que dedicándose como actividad principal a labores propias del campo, siembre, cultive o coseche plantas de marihuana, amapola, hongos alucinógenos, peyote o cualquier otro vegetal que produzca efectos similares, por cuenta propia, o con financiamiento de terceros, cuando en el concurran escasa instrucción y extrema necesidad económica, se le impondrá prisión de uno a seis años.

Igual pena se impondrá al que en un predio de su propiedad, tenencia o posesión, consienta la siembra, el cultivo o la cosecha de dichas plantas en circunstancias similares a la hipótesis anterior.

Si en las conductas descritas en los dos párrafos anteriores no concurren las circunstancias que en ellos se precisan, la pena será de hasta las dos terceras partes de la prevista en el artículo 194, siempre y cuando la siembra, cultivo o cosecha se hagan con la finalidad de realizar alguna de las conductas previstas en las fracciones I y II de dicho artículo. Si falta esa finalidad la pena será de dos a ocho años de prisión.

Si el delito fuere cometido por servidor público de alguna corporación policial, se le impondrá, además de la destitución del empleo, cargo o comisión públicos y se le inhabilitará de uno a cinco años para desempeñar otro, y si el delito lo cometiera un miembro de las Fuerzas Armadas Mexicanas en situación de retiro, de reserva o en activo, se le impondrá, además de la pena de prisión señalada, la baja definitiva de la Fuerza Armada a que pertenezca y se le inhabilitará de uno a cinco años para desempeñar cargo o comisión públicos.<sup>(12)</sup>

En la ley general de salud en el capítulo VI en el apartado de sustancias psicotrópicas se encuentran los siguientes artículos:

**Artículo 255.** En relación con las medidas de control y vigilancia que deberán adoptar las autoridades sanitarias, las sustancias psicotrópicas se clasifican en cinco grupos:

**I** Las que tienen valor terapéutico escaso o nulo y que, por ser susceptibles de uso indebido o abuso, constituyen un problema especialmente grave para la salud pública.

Cualquier otro producto, derivado o preparado que contenga las sustancias señaladas en la relación anterior y cuando expresamente lo determine la Secretaría de Salud o el Consejo de Salubridad General, sus precursores



químicos y en general los de naturaleza análoga.

**II** Las que tienen algún valor terapéutico, pero constituyen un problema grave para la salud pública.

**III** Las que tienen valor terapéutico, pero constituyen un problema para la salud pública.

**IV** Las que tienen amplios usos terapéuticos y constituyen un problema menor para la salud pública.

**V** Las que carecen de valor terapéutico y se utilizan corrientemente en la industria, mismas que se determinarán en las disposiciones reglamentarias correspondientes.

En la tabla I se muestra una lista de algunas sustancias psicotrópicas del grupo I al cual pertenece los principios activos de la marihuana.<sup>(13)</sup>

**Tabla I.** Lista de sustancias psicotrópicas del grupo I

<b>Denominación Común Internacional</b>	<b>Otras Denominaciones Comunes o Vulgares</b>	<b>Denominación Química</b>
Lisergida	LSD, LSD-25	(+)-N,N-Dietilsergamida (dietilamida del ácido lisérgico)
No tiene	MDA	3,4-Metilenodioxiamfetamina
Tenamfetamina	MDMA	D1-3,4-Metilendioxi-N-dimetilfeniletilamina
Mescalina	Peyote; Lophophora Williams II; Anhalonium Williams II	3,4,5-Trimetixifenetilamina
Psilocibina	Hongos alucinantes de cualquier variedad botánica, en especial las especies Psilocybe mexicana, Estropharia cubensis y Conocybe y sus principios activos	Fosfato dihidrogenado de 3-(2-dimetil-aminoeti)-indol-4-ilo
No tiene	THC	Tetrahidrocannabinol,, los siguientes isómeros: <6a (10a), <6a(79), <7, <8, <9, <10, <9(11) y sus variantes estereoquímicas

### **3.5. ASPECTOS LEGALES RELACIONADOS CON LA TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE DROGAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.**

#### **3.5.1. En personas vivas.**

1. El personal que tome la muestra es responsable de que se rotule, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos (solicitud de peritaje).
2. La toma de la muestra debe ser supervisada con el objetivo de que no sea adulterada o sustituida lo que conlleva a la invalidación de la misma.
3. El grupo de expertos de Bruselas recomienda la orina como muestra idónea para el análisis de drogas de abuso, de manera que dicha muestra debe tomarse por duplicado en frascos de 50 mL de capacidad, que deben llenarse sus 2/3 partes. Deben evitarse los frascos plásticos siempre que sea posible debido a que las drogas pueden absorberse en la superficie de los frascos y se afecta considerablemente los recobrados.
4. Inmediatamente después de la colección debe medirse la temperatura ( que debe estar entre 32 y 38 °C dentro de los 4 minutos después de su colección) y el pH . Si se sospecha cualquier adulteración se debe notificar al laboratorio. La orina debe observarse para determinar si tiene algún precipitado, su color y si tiene espuma.
5. Es importante mantener las muestras en frío y en un lugar oscuro en el período de tiempo entre su toma y el análisis de las mismas.
6. Cuando la muestra llega al laboratorio se debe revisar y checar contra las solicitudes de peritaje para asegurarnos que los datos coincidan plenamente, guardándose una de las muestras para reiteración de los análisis si fuese necesario.
  - Las solicitudes de peritaje deben contener:
    - Órgano que solicita el peritaje y antecedentes del caso.
    - Nombre y apellidos del implicado, edad y peso.
    - Fecha, hora y tipo de muestra que se colecta.
    - Tiempo aproximado del último consumo.
    - Sustancias consumidas en las últimas horas o días.
    - Patrón de consumo.
    - Temperatura y pH de la muestra en el momento de su colección.

7. Los casos se deben inscribir en un registro de entrada, dándole a la misma un número consecutivo que será escrito en los frascos y en solicitud de peritaje por la persona que la reciba, anotando también la cantidad de muestra recibida, hora de recepción, etc.
8. Si los análisis no se comienzan en el momento de la recepción las muestras deben guardarse en congelación.
9. Es importante mantener una completa seguridad y confidencialidad en todo momento. Cualquier información relacionada con el caso debe considerarse secreta y colocarse en un lugar seguro.
10. Al concluir el caso debe realizarse un informe pericial dirigido al órgano de instrucción que lo solicitó, el cual debe reflejar no solo los resultados de los análisis sino todos los procedimientos que se utilizaron para arribar a los mismos.

### 3.5.2. En cadáveres.

1. En el caso de cadáveres, las muestras pueden ser muy variables pero la orina sigue siendo la muestra mas importante para la determinación de drogas de abuso. En la tabla II aparece información adicional acerca del muestreo en casos de cadáveres.

**Tabla II.** Muestreo en el caso de cadáveres.

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Droga a Investigar.</b>
Estómago y su contenido	Todo	Cualquier droga ingerida
Hígado	250 gr.	Todas las drogas
Bilis	Toda	Opiáceos
Orina	Toda	Para drogas de abuso
Cerebro	100 gr. parte media y central	Disolventes, Cocaína
Sangre	2 muestras de 5 mL. y 30 mL.	Una para Etanol, otra para drogas
Cabellos		Drogas de abuso

2. Todas las muestras deben guardarse en congelación antes y después de terminados los análisis y las muestras de sangre para determinación de etanol deben conservarse con fluoruro de sodio al 2 %.

3. De manera general los análisis de drogas en fluidos biológicos por parte de los laboratorios forenses tiene esencialmente dos objetivos fundamentales:

- Diagnóstico del consumo de una droga de abuso en el marco de un proceso judicial.
- Diagnóstico clínico en toxicología clínica y en tratamientos de rehabilitación.<sup>(14)</sup>



### **3.6. AMPLITUD Y PROFUNDIDAD EN EL ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO.**

El químico forense debe ser capaz de detectar cualquier sustancia química presente en el material biológico.

El químico forense tiene dos tipos de necesidades en su metodología:

1. Test generales ó métodos de screenig. Deben ser sensibles, aunque no necesariamente específicos, detectar un gran número de sustancias de modo que los resultados negativos permitan centrar la atención en unos pocos grupos. En caso de resultados negativos es de gran valor para descartar la presencia de un determinado grupo de sustancias esos casos pueden ser muy variados, de acuerdo con el equipamiento, personal, volumen de trabajo, etc.
2. Métodos cuantitativos. Una vez que se sospecha la presencia de una sustancia por métodos de screenig anteriores, su presencia debe confirmarse. Los resultados cuantitativos deben ser consistentes, lo que significa: evitar al máximo las interferencias y conocer la precisión y exactitud del método utilizado. La necesidad de un resultado cuantitativamente riguroso y exacto es lo que caracteriza los análisis.

Una vez que la muestra ha llegado al laboratorio, comienza la investigación, en la que pueden darse dos situaciones:

- a) Que se conozca la naturaleza de la droga.
- b) Que la droga sea desconocida, que es lo que ocurre más frecuente, incluso no se sabe si existe o no la droga en la muestra a analizar.

La orina es ideal para hacer controles de exposición a sustancias, pero presenta el inconveniente de que sólo se podrán analizar aquellas que presenten el tóxico original o más frecuentemente un metabolito del mismo.

El plasma/suero es la elección en muchas situaciones, ya que se encuentra presente la droga de origen.

El vómito y el contenido gástrico (sobre todo las primeras fracciones) son muy útiles para el análisis cualitativo ya que no se encuentran metabolitos y, en el caso de los plaguicidas, el olor proporciona indicios de la sustancias en cuestión.<sup>(15)</sup>

### 3.7. CROMATOGRAFÍA.

#### Definición de Cromatografía.

La cromatografía puede definirse como: Un proceso de separación que involucra la interacción entre uno o más solutos y dos fases, una estacionaria y otra móvil. Los componentes de la mezcla son transportados por una fase móvil a través de la fase estacionaria.

En la práctica, la cromatografía se divide en varias clases:

1. **Cromatografía de adsorción.** Es la forma más antigua de la cromatografía, en la cual se utiliza una fase sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. El equilibrio entre el estado adsorbido y la solución es la causa de la separación de las moléculas de soluto.
2. **Cromatografía de reparto.** En esta técnica una fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido. El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida o gaseosa.
3. **Cromatografía de intercambio iónico.** En este tipo de cromatografía, aniones o cationes se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida, por lo común una resina. Los iones de soluto, de carga opuesta a los de la fase estacionaria, son atraídos por esta última mediante una fuerza electrostática. La fase móvil es un líquido.
4. **Cromatografía de exclusión molecular.** En esta técnica no existen interacciones por atracción entre la fase estacionaria y el soluto. La fase móvil pasa a través de un gel poroso. Los poros son suficientemente pequeños para excluir las moléculas grandes de soluto, pero no las pequeñas.
5. **Cromatografía por afinidad.** En esta clase de cromatografía, la cual es muy selectiva, se utilizan interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y otras moléculas involucradas.<sup>(16,17)</sup>



### 3.7.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC).

El éxito en la aplicación correcta de esta técnica para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil y de los platos teóricos.

La migración diferencial en la cromatografía de líquidos de alta resolución o de alta presión es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre fase estacionaria y fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emigraron, hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención (**tr**), se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de Cromatografía esto es líquido-líquido o de partición.

Los parámetros que hay que considerar para que se lleve una buena separación son:

#### 1. Factor de capacidad $K'$

$$K' = t_r - t_0 / t_0$$

En donde :

$t_r$  es el tiempo de retención

$t_0$  es el tiempo cero

#### 2. Número de platos teóricos $N$

$$N = 16(t_r / w)^2$$

En donde:

$t_r$  es el tiempo de retención

$w$  es el ancho del pico en la base.

### 3. Resolución R

$$R = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

En donde:

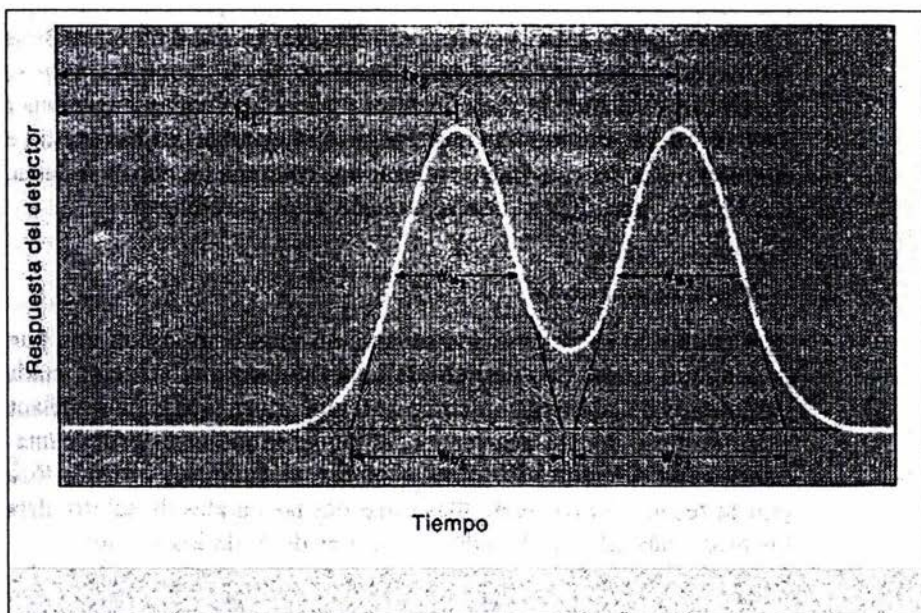
$t_1$  es el tiempo de retención del primer pico

$w_1$  es el ancho del primer pico en la base.

$t_2$  es el tiempo de retención del segundo pico

$w_2$  es el ancho del segundo pico en la base.<sup>(16,17)</sup>

En la figura 3 se observan las mediciones necesarias para el calculo de los parámetros antes mencionados



**Figura 3.** Mediciones que se utilizan para calcular R ,N, K' de los picos.

### **3.7.2. Constituyentes De Un Cromatógrafo De Líquidos De Alta Resolución.**

#### **Disolventes.**

A fin de no degradar costosas columnas y minimizar el ruido de fondo en detectores, los disolventes utilizados deben ser muy puros para incrementar la sensibilidad del detector. Las burbujas de gas que se forman por cambios de presión o por mezclado de ciertos disolventes interfieren en el funcionamiento adecuado de la columna y el detector.

#### **Columna.**

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer.

Las dimensiones de una columna dependerá también del tipo de separación que se desee hacer. Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio. La longitud puede ser de 10 cm a 1 m. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.<sup>(18)</sup>

#### **Bombas.**

La calidad de una bomba es determinada por el grado de estabilidad y reproducibilidad del flujo que genera. En el caso de algunos detectores, las fluctuaciones en el gasto dan resultado una respuesta oscilante, la cual es ruido que degrada las señales débiles.



### **Válvula de inyección.**

Existen varios tipos de puestos de inyección . En la posición de carga se utiliza una jeringa para lavar y cargar la muestra. Ocurre un flujo de alta presión desde la bomba hacia la columna por el segmento de la válvula. Cuando la válvula se hace girar en sentido de las manecillas del reloj, el contenido de la muestra se inyecta en la columna alta presión.

### **Horno para columna.**

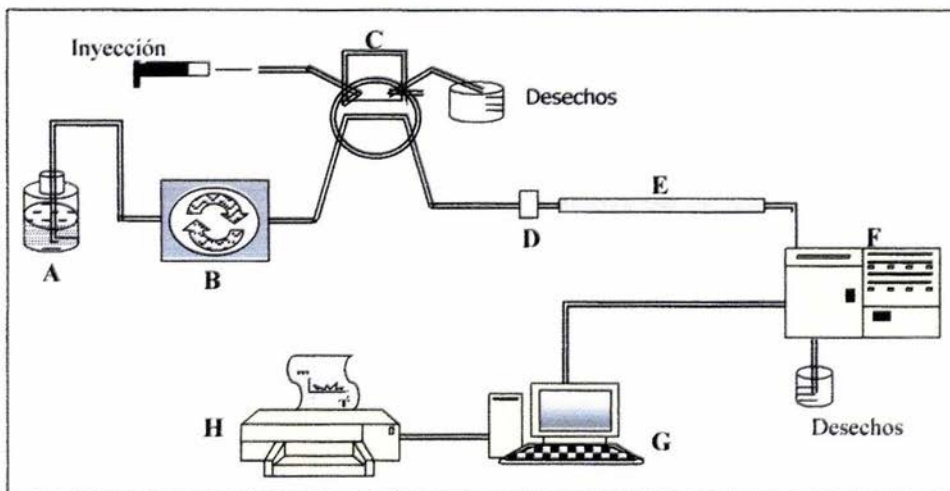
La columna cromatográfica se mantiene a temperatura ambiente. En algunos sistemas, la columna se coloca en un horno cuya temperatura puede regularse a valores entre 30 y 100°C. Al aumentar la temperatura disminuye la viscosidad del solvente, de modo que se requiere menos presión para obtener un resultado. El aumento de la temperatura modifica la selectividad de la columna. La eficiencia de la columna aumenta a alta temperatura por que se eleva la rapidez de difusión en ambas fases, lo cual puede dar como resultado una mayor rapidez de equilibrio entre fases.<sup>(19,20)</sup>

### **Detectores.**

Un detector ideal es sensible a bajas concentraciones de cualquier analito, da una respuesta lineal en un amplio intervalo de concentraciones, y genera un ensanchamiento nulo de los picos de elusión. Asimismo debe ser insensible a los cambios de temperaturas y de composición de disolvente. La presencia de burbujas de gas en el detector es una importante fuente de ruido, por lo que suele eliminarse el gas disuelto en los disolventes antes de utilizarlos.

Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector , la señal que provoca en éste debe ser registrada por un graficador o un integrador.

En el caso del graficador es necesario calcular el área obtenida para cada pico. El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica. Los componentes esenciales de un sistema de HPLC son: a) Depósito de disolvente, b) Sistema de bombeo, c) Inyector de muestra , d) Pre-columna de guardia, e) Columna analítica, f) Detector, g) Sistema de datos y h) Una impresora.<sup>(21)</sup> En la figura 4 se muestra un esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.



**Figura 4.** Diagrama de bloques de los componentes de un instrumento para HPLC

### 3.7.3. Análisis Cualitativo Por HPLC.

Para el análisis cualitativo se puede realizar con la identificación de picos pero comúnmente por el volumen o el tiempo de retención que son característicos del compuesto. Con buenos instrumentos la medida de estos parámetros es altamente reproducible. Las desviaciones normales relativas típicas son del orden del 2%. La seguridad de la identificación cualitativa se mejora comparando el cromatograma de un compuesto y el de un estándar bajo condiciones significativamente diferentes.

### 3.7.4. Análisis Cuantitativo Por HPLC.

Como en cualquier otra técnica analítica, los resultados del análisis cuantitativo no pueden ser mejores, existe la posibilidad de que se altere la muestra en el curso del análisis, aparte de todos los errores posibles debidos a las distintas partes del cromatógrafo, la detección y la amplificación son pasos importantes del proceso cuantitativo no siempre estimadas debidamente.<sup>(22)</sup>

### **3.8. ESPECTRÓMETRO DE MASAS (MS).**

El espectrómetro de masas es una técnica usada ampliamente para el cromatógrafo de gases y el cromatógrafo de líquido, que proporciona la información cuantitativa y cualitativa sobre los componentes de una mezcla. El espectrómetro puede ser muy selectivo para el analito de interés. Esta selectividad ayuda en los requisitos para la preparación de la muestra o la separación completa de los componentes de una mezcla en el cromatógrafo. Cuando se opera en un método que es muy selectivo para un analito en particular, el espectrómetro de masa aumenta la proporción del ruido en el análisis cuantitativo y baja el límite de cuantificación para el analito.

Un obstáculo en el acoplamiento de Cromatografía de líquidos (LC) y MS es la cantidad grande de disolvente que acompaña al analito. MS es un dispositivo del alto-vacío que no puede aceptar 1mL de disolvente por minuto. Por esta razón, una columna de cromatografía de 2.1 mm-diámetro con una proporción de flujo de 0.2mL/min. aproximado es una opción buena para el uso con un MS. Al bajar el diámetro de la columna de 4.6 mm a 2.1 mm, es importante que la que une tubería tenga un diámetro interno de 0.1mm, para minimizar señales muy anchas. Los aditivos no volátiles de la fases móviles (como el pulidor de fosfato) también debe evitarse al usar MS.

#### **Detección selectiva con un Espectrómetro de Masas.**

El espectro de masas de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa, siendo la determinación del peso molecular lo más importante, la fragmentación de la molécula ayuda en gran medida la identificación del compuesto; su campo de interés abarca todas las áreas donde sea precisa la identificación de compuestos: química orgánica, inorgánica, bioquímica, química agrícola, tecnología de los alimentos, medicina, por supuesto en química forense, etc.

La manera más simple de usar el espectrómetro de masas como un detector de cromatografía es medir el ión total actual de todos los iones que alcanzan el detector. En esta técnica, un espectrómetro de masas descubre todo lo que atraviesa por la columna que puede ionizarse. Alternativamente, el espectrómetro puede ser selectivo midiendo el ión actual para una masa particular.

El espectro de masas de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa, siendo la determinación del peso molecular lo más importante, la fragmentación de la molécula ayuda en gran medida la identificación del compuesto; su campo de interés abarca todas las áreas donde sea precisa la identificación de compuestos: química orgánica,



inorgánica, bioquímica, química agrícola, tecnología de los alimentos, medicina, por supuesto en química forense, etc.

Estos adelantos pusieron a la cromatografía de líquidos en una metodología prácticamente similar a la cromatografía de gases (CG) que se había vuelto el método cromatográfico más popular de los años sesenta. Desde que el HPLC no se limita para probar volatilidad y la estabilidad termal como en GC, casi todas clases de compuestos orgánicos pueden ser separados por esta técnica analítica de manera eficaz y rápida.

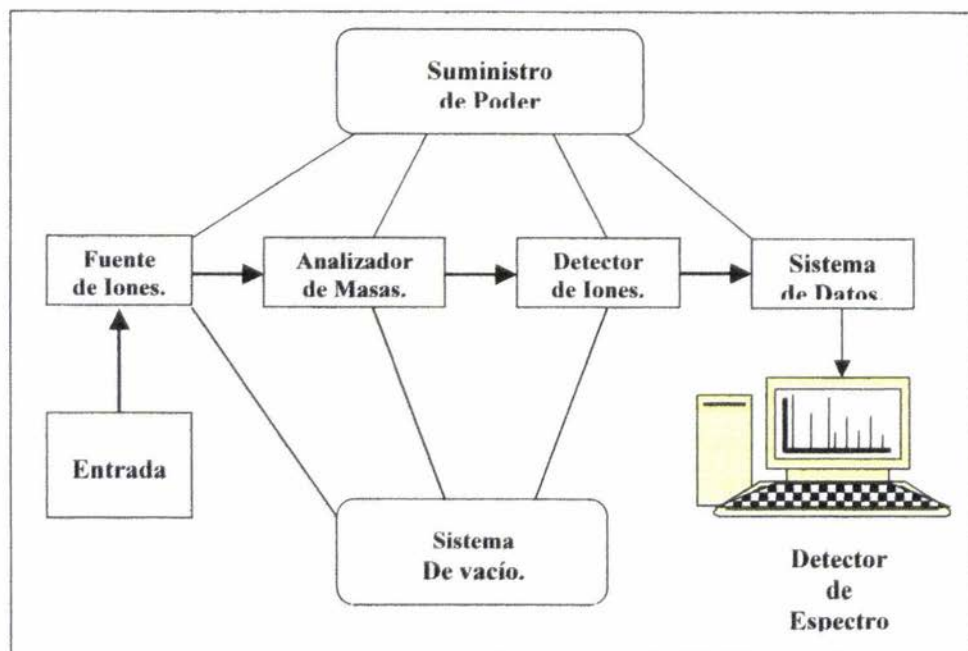
Principio: una muestra es fragmentada e ionizada obteniendo un registro característico para cada analito.

El Espectrómetro de Masas es un instrumento que medirá la ionización de las moléculas (iones gaseosos) según sus proporciones de masa-a-carga,  $m/z$ . Los físicos que lo desarrollaron estaban interesados en explorar la interacción de partículas cobradas con los campos eléctricos y magnéticos; y después se descubrió que tal información podría ser útil también para químicos. Principalmente en áreas con aplicaciones orgánicas y bioquímicas.

El espectrómetro de masas esta constituido básicamente por los siguientes componentes:

1. Cámara de ionización: electrones generados por un filamento bombardean una muestra, los fragmentos ionizados (carga +1) son repetidos por el electrodo positivo y conducidos al separador magnético.
2. Salida de vacío: todo el interior de un espectrómetro de masas debe encontrarse al alto vacío.
3. Separador magnético: los iones atraviesan un campo magnético. Durante este paso solo atraviesan algunos iones de determinada masa y carga.
4. Detector: una válvula fotomultiplicadora o un fotodiodo genera una señal proporcional al número de iones que incide sobre un elemento.

La figura 5 indica la secuencia interna de los componentes que debe poseer un Espectrómetro de Masas.



**FIGURA 5.** Diagrama de bloques de un Espectrómetro de Masas.

### **Ionización Por Electro Spray en Espectrometría De Masas.**

La técnica de Cromatografía Líquida acoplada a Ionización por Electro Spray en Espectrometría de Masas es uno de los desarrollos más excitantes de recientes tiempos en la metodología analítica. La combinación de HPLC con MS es un consorcio poderoso entre las dos técnicas analíticas. Se establecen bien las aplicaciones analíticas de HPLC y MS. El HPLC es un método donde puede resolverse una mezcla de compuestos en sus componentes individuales, es aplicable a varias clases de compuestos polares y térmicamente lábiles, (pequeños así como muy grandes), no resignado a la técnica complementaria de cromatografía de gases (GC). Sin embargo, el HPLC solo, no proporciona información para la confirmación de la identidad del analito. La ionización química crea los iones gaseosos de la molécula del analito, que estaban en la solución.

La presión atmosférica de la ionización química usa el calor y el flujo coaxial de N<sub>2</sub> para convertir el disolvente en un aerosol fino como una llovizna para que el solvente se evapore. Esta técnica probablemente es la interfase más versátil entre el cromatografía de líquido y el espectrómetro de masas que puede ocuparse de una variedad de analitos y puede aceptar que en los cromatógrafos convencionales fluyen las proporciones a 2mL/min. Generalmente, los analitos, deben ser capaces de formar el ión protonado MH<sup>+</sup>. Hay fragmentación, normalmente pequeña de iones en el espectrómetro de masas de la presión atmosférica de la ionización química. Los espectros son fáciles de interpretar, pero proporcionan la información estructural desde la fracción más pequeña hasta el peso molecular. Los analitos inestables podrían descomponer a los 125°C, temperatura del aerosol.

En la presión atmosférica de la ionización química, una alto-voltaje con una descarga, hace que la aguja inyecte los electrones en el aerosol, donde una sucesión de reacciones químicas puede crear cationes y aniones, y formarse de la manera siguiente:

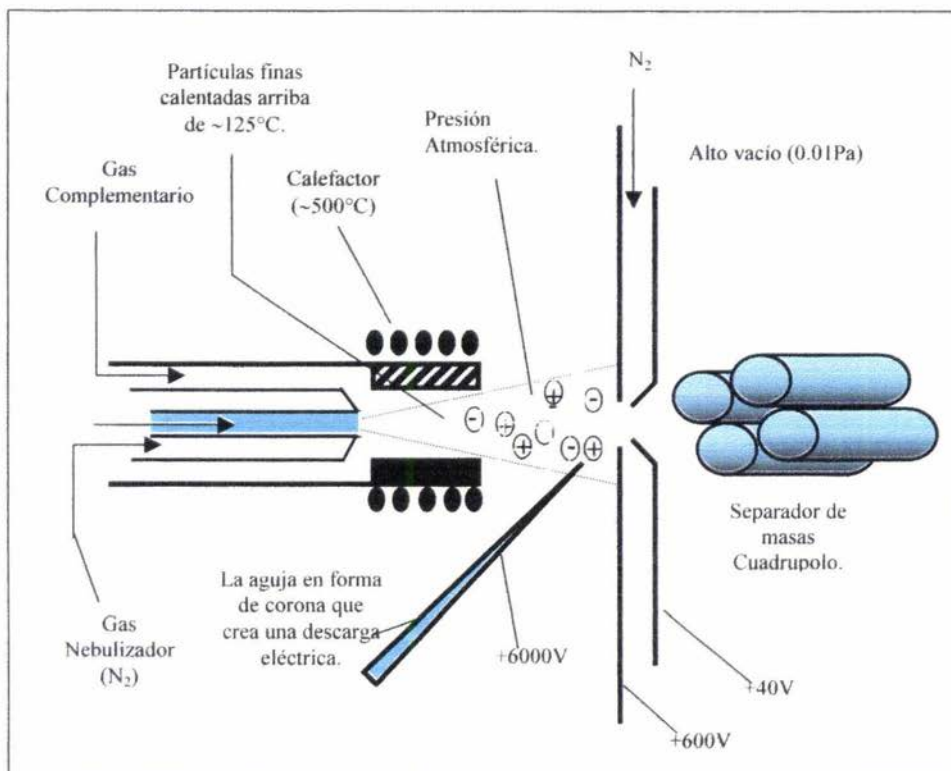


I. Un ion formado se fragmenta:



El líquido cargado que termina en las formas capilares finalmente descarga las gotas en forma de rocío. Las gotas se encogen hasta una 1 micra en el diámetro por la evaporación del solvente hasta que la fuerza repulsiva de los cargas del exceso es igual a la fuerza de cohesión de la tensión superficial. A ese punto, la gota empieza a separarse y se derivan los iones de la fase gaseosa.<sup>(20,23,24)</sup>

En la figura 6 se muestra el funcionamiento del equipo acoplado.



**FIGURA 6.** Interfase entre la presión atmosférica e ionización química de una columna de Cromatografía Líquida y un Espectrómetro de masas.



### **3.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.**

Tomando en cuenta que este proyecto se encuentra orientado al desarrollo del método analítico para identificación y cuantificación, no cabe duda que es necesario validar este método, y así mismo, es de gran valor el sugerir al laboratorio interesado en llevar a la práctica este tipo de análisis, y la importancia de la acreditación en este método.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.<sup>(25)</sup>

Como ya se había mencionado antes la marihuana es una sustancia de uso ilegal, por lo que los resultados obtenidos serán de gran valor al ser presentados en una corte, que esperará mediante la información proporcionada soportar o impugnar los argumentos presentados, con el fin de indicar sanciones penales; es por esto que es importante la fundamentación y homogeneidad en los resultados presentados tanto por la defensa como por la parte acusadora sobre la misma prueba, para que esto sea posible es necesario llegar a la validación.

Para llevar a cabo una validación es necesario delimitar un proceso de validación el cual se base en los siguientes puntos:

1. Planeación: escribir el Plan de Validación.
2. Especificaciones: Definir los criterios de aceptación.
3. Plan de Pruebas: Preparar los documentos que describan las pruebas a llevar a cabo.
4. Pruebas: Llevar a cabo las pruebas y coleccionar los datos.

5. Revisión: Revisar los resultados. Determinar que el elemento a validar cumple con los criterios de aceptación.<sup>(26)</sup>

Es recomendable tomar en cuenta los siguientes puntos al momento de llevar a cabo el método de análisis y la validación de un método. En este análisis el producto es el resultado emitido, por ello será necesario tomar en cuenta que la validación cumpla con los siguiente parámetros:

- Rango: Establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.
- Recuperación absoluta: Analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas: Baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, dentro del rango. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de estas razones no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración del rango.
- Linealidad: Definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.
- Precisión:
  - Repetibilidad: Analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta de los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango.
  - Reproducibilidad: Analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta de los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango.

- Exactitud: El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración, de los datos de Repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.
- Estabilidad: Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento
- Selectividad: Establecer la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos de seis voluntarios.
- Límite de detección: Determinar la concentración a la cual la señal de los compuestos por analizar puede distinguirse de las señales de ruido o de una muestra libre del compuestos de interés.
- Límite de Cuantificación: Analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. <sup>(27,28,29)</sup>.

## **4. PROYECTO EXPERIMENTAL.**

### **4.1. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS DE CANNABINOIDES.**

Al iniciar con esta propuesta de un método de análisis cuantitativo-cualitativo es importante aclarar, que hasta donde se tiene conocimiento, no existe ningún estudio químico similar de forma escrita sobre el análisis de cannabinoides por HPLC-MASAS. Es necesario aclarar que para la identificación de cannabinoides y de cualquier sustancia en general es necesario tomar en cuenta el tipo de muestra de la cuál se extraerá para su posterior análisis ya que como se sabe el cannabinoal al metabolizarse se excreta como ácido tetrahidrocannabinol por lo que será este ácido lo que se identificará en el caso de muestras de fluidos biológicos.

Como primer paso será llevar a cabo las pruebas presuntivas, tanto en el vegetal como en fluidos biológicos, debido a que el análisis cualitativo por HPLC resulta ser muy caro y consume mucho tiempo en comparación con las pruebas calorimétricas e inmunoensayos, esto es para dar una idea de que tipo de sustancias se encuentran presentes en la muestra problema y con esto orientar hacia la elección del procedimiento a seguir, con lo que también se dará un adecuado tratamiento a las muestras que presuntamente pueden ser consideradas como evidencia en caso legales.

En el caso de observar que las pruebas presuntivas o de screenig registran hacia la identificación de tetrahidrocannabinol, sera necesario seguirs con la prueba confirmatoria, por lo que la muestra se procesará mediante extracciones, a manera de determinar la sustancia presente, analizando el extracto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. A través de este tipo de análisis se confirmarán los compuestos ya sospechosos.



## **4.2. TIPOS DE MUESTRA.**

Los fármacos en general pueden ser determinados en matrices biológicas y no biológicas.

Matrices biológicas:

- a) Orina
- b) Cabello

Matrices no biológicas :

- a) Hojas
- b) Resinas
- c) Flores

En cualquier caso se recomienda que se lleven a cabo los análisis indirectos o presuntivos como las pruebas de color, cromatografía en capa fina, e inmunoensayos, ya que por la gran cantidad de fármacos existentes no sería posible el análisis directo de muchas muestras sin tener idea del tipo de sustancia que se trate.

Las pruebas presuntivas serán siempre la base de cualquier análisis donde se sospeche de la presencia de drogas de abuso.

### **4.2.1. Matrices Biológicas.**

El personal que tome las muestras es responsable de que se rotule, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos.

La selección de las muestras adecuadas para el análisis y su correcta conservación son requisitos indispensables en una investigación toxicológica.

Las muestras para el análisis debe recogerse teniendo en cuenta las condiciones particulares de cada caso y las referentes a la distribución y metabolismo.

La orina representa una muestra idónea para realizar una gran variedad de ensayos preliminares.

Las mayores ventajas de esta muestra son que la concentración de una droga de abuso como lo es la marihuana en este fluido puede llegar a ser 100 veces mayor que en la sangre, además la orina está exenta de proteínas, por lo que las interferencias son mínimas.

Es aconsejable no añadir conservadores que podrían interferir en el análisis posterior, debiendo conservarse en frío hasta su estudio.

De acuerdo a la NOM-177, todas las muestras de fluidos biológicos deben considerar potencialmente peligrosas o infecciosas y manejarse de conformidad con la normatividad aplicable.

El transporte de las muestras biológicas debe llevarse a cabo de acuerdo con un PNO que considere tipo de contenedor, registros de condiciones de transporte (temperatura, humedad y tiempo), y correcta identificación.

En el laboratorio analítico: la recepción de muestras biológicas debe hacerse de acuerdo con un PNO (Procedimiento Normalizado de Operación), donde se indiquen los aspectos que se deben revisar como, número, integridad de contenedores, identificación, estado físico de la muestra.

Las muestras se deben almacenar en condiciones que aseguren su identidad e integridad durante su periodo de estabilidad.<sup>(30)</sup>

El cabello, es muy útil en los casos de muerte y en casos que haya pasado mucho tiempo, ya que la marihuana se almacena hasta por un mes, debido a que el cuero cabelludo tiene una gran cantidad de lípidos y los cannabinoides tienen afinidad por el tejido graso.

Todas estas muestras deben ser introducidas en recipientes adecuados, de ser posible de un solo uso, para evitar los contaminantes. De no ser así deben estar perfectamente limpios y secos.

Las muestras líquidas como la orina deben recogerse en tubos o envases de vidrio y debe evitarse el uso de tapones de goma o material similar, ya que pueden adsorberse algunas sustancias o contaminar las muestras.

Las muestras sólidas como el cabello pueden depositarse en envases de plástico provistos de boca ancha. El tamaño del recipiente debe ser de acuerdo con el tipo de la muestra, con el objeto de que el recipiente quede lleno.

El éxito de la investigación se encuentra estrechamente ligado a la calidad, cantidad y grado de conservación de las muestras que se remitan. Las muestras se dispondrán en recipientes de tamaño adecuado, perfectamente limpios y secos, y cerrados herméticamente. Cada recipiente debe llevar una etiqueta con indicación de la muestra contenida, nombre de la persona, fecha, procedencia de la muestra y cualquier advertencia sobre las precauciones en su manipulación. Al tomar la muestra es necesario que el personal verifique los datos de la muestra así como las condiciones en que llegó la muestra (que la muestra no sea alterada o cambiada y que corresponda al donante) y firme de recibido.

#### **4.2.2. Matrices No Biológicas.**

El personal que tome las muestras es responsable de que se rotule, de su conservación antes de que llegue al laboratorio y de su transporte, además de facilitar los documentos necesarios con todos los datos requeridos.

La toma de la muestra debe ser supervisada con el objeto de que no sea adulterada o sustituida, lo que conlleva a la invalidación de la misma.

En algunas ocasiones para su análisis hay que secar los vegetales como lo es la marihuana esto es con la finalidad de eliminar la humedad que contenga y no altere los resultados analíticos.

Las formas de secado pueden ser diversas, desde colocar las hojas en papel periódico o papel impreso por algunas semanas, hasta poner los vegetales en hornos a una temperatura aproximada de 30° C por algunas horas.

#### **4.3. PRETRATAMIENTO.**

La extracción de los cannabinoides se hace utilizando disolventes orgánicos como por ejemplo: hexano, acetato de etilo y cloroformo.

### 4.3.1. Extracción a partir de orina.

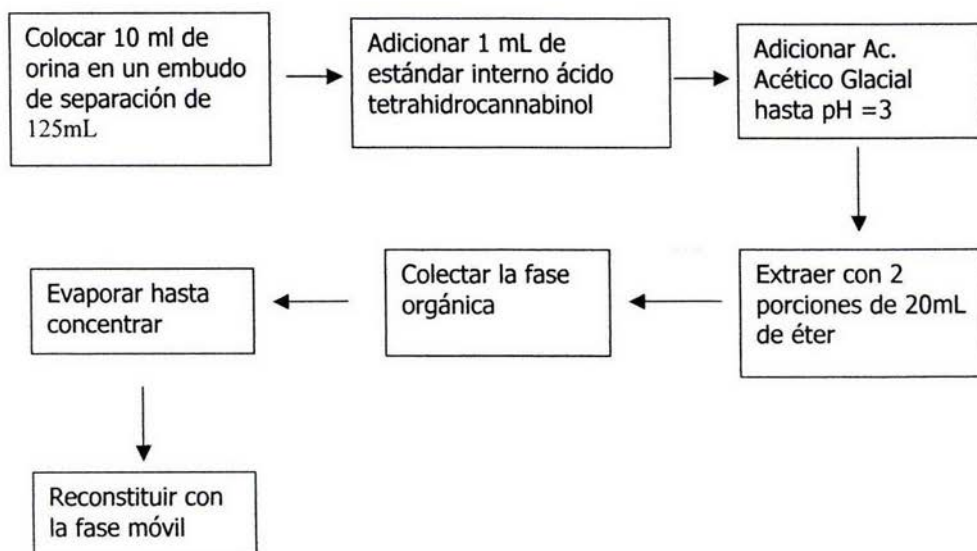
Volumen requerido: 50 mL de orina recientemente obtenido o almacenado de 2 a 8° C por un lapso de 6 meses máximo.

Ventajas: Es más fácil de obtener en volumen alto; cuando se ingieren la mayoría de las drogas se encuentra en la concentración suficiente para permitir su identificación.

Desventajas: Contiene muchos productos metabólicos que pueden interferir con la identificación ya que se determina por lo general el metabolito.

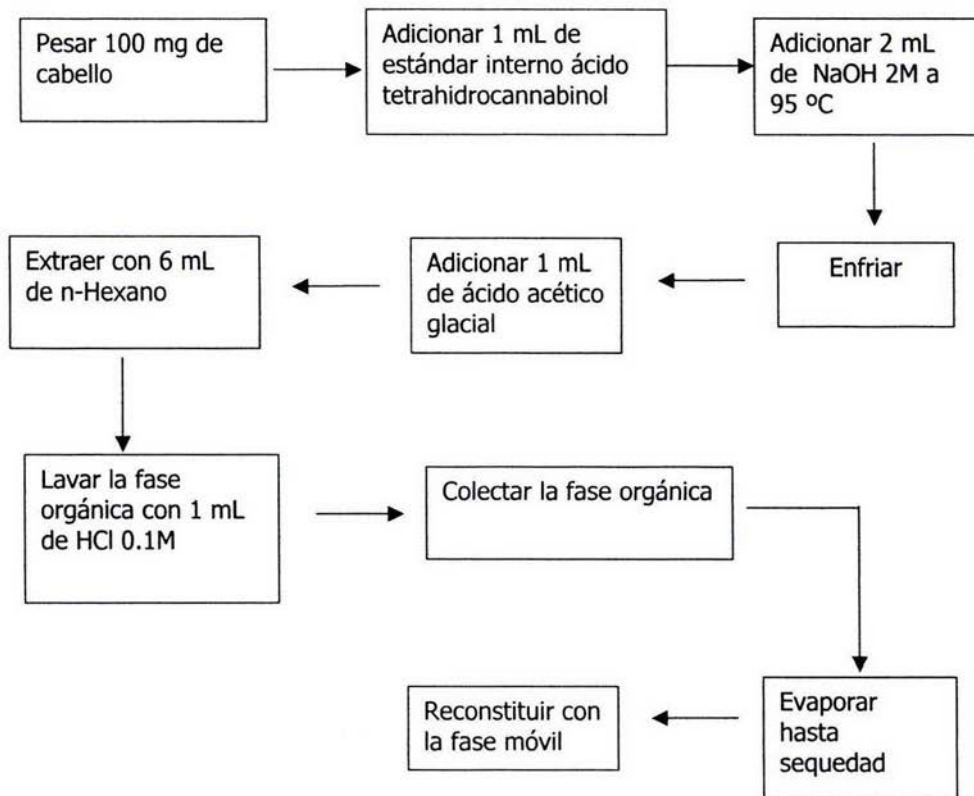
Tomar en cuenta el tiempo comprendido entre la ingesta de la droga y el análisis ya que si pasa demasiado tiempo será casi imposible detectar la presencia de la sustancia, ya que como se sabe esto depende de la dosis, factores fisiológicos y excreción.

Método para la extracción de Cannabinoides en orina.





### 4.3.2. Extracción a partir de cabello.



#### **4.4 PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA CANNABINOIDES.**

Inmunoensayo.

Son pruebas científicas que usan anticuerpos para identificar y medir cantidades de sustancias químicas. En la toxicología forense estos ensayos se usan en las muestras biológicas para la identificación de una droga de abuso.

Cromatografía en capa fina.

El desarrollo de las cromatografías de capa fina se realizan por el método ascendente, permitiendo que un eluyente y una mezcla de sustancias ascienda en una placa casi en posición vertical por la acción de la capilaridad, provocando la separación de la mezcla en sus componentes.

#### **4.5 CONDICIONES DE TRABAJO**

##### **Fase Móvil:**

Mezcla: Acetonitrilo-Metanol- 0.01 M Acido Sulfurico.

Proporción: 49:21:30

Esta es una fase reversa por lo que es de una alta polaridad, hay que recordar que los disolventes son de alto grado de pureza.

La fase móvil se tiene que filtrar y desgasificar antes de usarla, para evitar que dañe la columna.

##### **Fase Estacionaria:**

C<sub>8</sub> de 25 cm de largo por 4.6mm de diametro y un tamaño de particula de 5 µ

Es importante que el diametro de la columna sea mayor, lo cual incrementa la sensibilidad. El que la columna sea larga nos permite una mayor capacidad de retención.

### **Volumen de inyección.**

50  $\mu$ L

### **Velocidad de flujo.**

1 ml/min.

Es una velocidad de flujo adecuada por que al aumentar el flujo puede dañar la bomba del sistema, además de que la separación de los compuestos no sería lo suficientemente clara.

### **Método de identificación.**

La identificación positiva se basa en la comparación de los tiempos de retención a las condiciones expresadas comparadas con un patrón de referencia.

### **Detector.**

El detector utilizado será el Espectrómetro de Masas, éste es un dispositivo adecuado para el análisis ya que nos permite mediante señales, la obtención de datos cualitativos y cuantitativos de cada uno de los compuestos presentes en las muestras.

### **Bibliotecas de Espectros de Masas.**

Comercialmente existen diferentes bibliotecas que pueden ser de utilidad en la identificación.

Una vez que se ha determinado el Espectro de masas de los cannabinoides es conveniente proceder con la creación de bibliotecas propias de espectros de masas.

### **Operación del equipo.**

Los parámetros operacionales del HPLC-Masas así como el procesamiento de datos y de formato de salida de informes se almacena como un programa propio del equipo.

### **Método de cuantificación.**

Se utilizará el método del estándar interno esto es para que nos permita observar la cuantificación de la droga a través de la concentración conocida de una sustancia parecida a la de interés. Sólo se reportarán los resultados cualitativos, los cuantitativos se presentarán sólo en los casos legales en que así lo requieran.

### **Salida de resultados.**

El cromatograma y espectros de masas mostrarán los picos característicos de la muestra a partir de la cuál se realizará el informe de picos buscando en las bibliotecas de la computadora para la identificación.

En las bibliotecas electrónicas muestran los principales fragmentos que se obtienen de un espectrometro de masas para los cannabinoides.

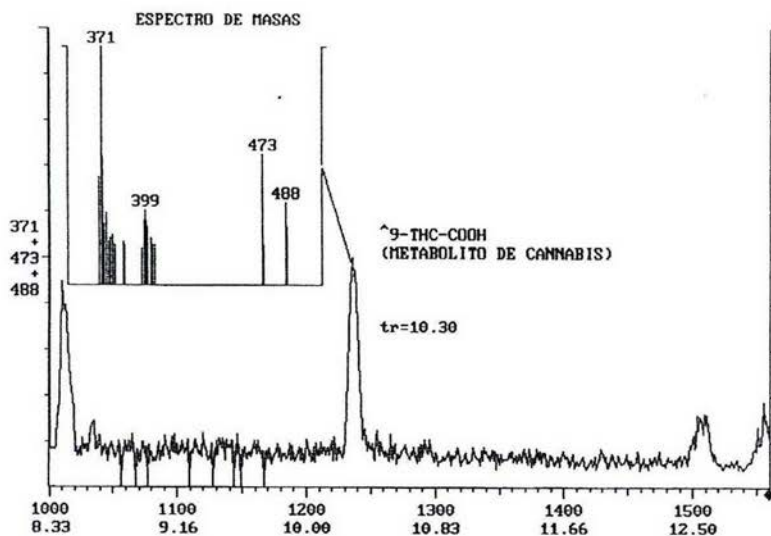
En la figura 7 se muestra un espectro de masas acoplado a un cromatografo de gases, el cual fue proporcionado por los Laboratorios Azteca S.A. de C.V., en donde se pueden observar los principales fragmentos del  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol.



Chromatogram Plot  
 Comment:

C:\SATURN\DATA\CANRPD

Date: 10/24/02 17:17:06



Quantitation Report    Quan File: CANRPD    Cali File: CALCAN    Entries: 1  
 Comment:   
 Sorted via: Entry Number ↑    IS Factor: 1.000    Mult: 1.000    Div: 1.000

Cal	Name of Compound	S	Scan#	R Time	Me	Calc Amt(A)	Units
1	TETRAHIDROCANNABINOL-C	E	1236	10.30	BB	46.420	NG/ML

Figura 7. Espectro de Masas de  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol

#### 4.6 CONTROLES DE CALIDAD.

Como en todas las pruebas de laboratorio, hay que controlar continuamente el desempeño y confiabilidad del equipo así como de los patrones utilizados, documentando que se cumpla con:

- Sensibilidad
- Especificidad
- Linealidad
- Selectividad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Límite de Cuantificación

El Programa interno involucra :

1. El análisis diario de los materiales de control que puedan proveerse comercialmente siempre que el laboratorio posea las licencias apropiadas para manejar estas sustancias.
2. Los controles positivos y negativos deberán procesarse en la misma manera que las muestras problema.
3. Si el desempeño de la columna verificado el día de la prueba no es el idóneo será inaceptable también el resultado.
4. Los resultados de las pruebas presuntivas serán las esperadas para los Metabolitos de la Marihuana.

#### 4.7 INTERPRETACIÓN

El hallazgo positivo indica el uso de la droga, pero no puede interpretarse el deterioro o severidad del daño en la persona

Para el análisis cuantitativo será necesario ajustar el sistema de acuerdo con el manual de operación del equipo para obtener los datos como se muestra a continuación:

Nombre del compuesto	Tiempo de Retención	Cantidad obtenida	Unidades

#### 4.8 CONCLUSIONES.

Al realizar la revisión bibliográfica sobre las propiedades de los Cannabinoides se encontró que en el cabello y la orina es donde se pueden encontrar dichos compuestos.

Los métodos presuntivos que se encuentra en uso actualmente son muy útiles ya que nos orientan si se encuentra presente la droga de interés.

Los resultados que se esperarían, son muy semejantes a los obtenidos en un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas. Así como se mostró en el trabajo. Con las ventajas de que el método propuesto en este trabajo nos proporciona resultados precisos y exactos, reduce el tiempo de análisis, tiene una sensibilidad muy alta que permite la identificación y cuantificación de los metabolitos.

Se cuentan con bibliotecas electrónicas de diferentes compuestos, en donde las muestras son identificadas inmediatamente y los resultados son comparados en estas bibliotecas.

De igual manera en que se presentan los resultados de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas, se reportan los resultados de un HPLC acoplado a espectrómetro de masas.

Hay que documentar el tipo de muestra, condiciones de manejo, unidades en que se detectan, compuestos detectados, finalmente el cromatograma y su espectro de masas del analito de interés, que en este caso se trata de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol.

También deben anexarse los datos del individuo, como son:

- Nombre
- Edad
- Sustancia que se busca
- Fecha y hora del estudio.

Una vez teniendo este tipo de bibliotecas electrónicas con un buen funcionamiento y validadas, la identificación de los metabolitos de la marihuana así como otras drogas de abuso, será más fácil y rápido identificarlas y dar una respuesta o dictamen en el marco legal de manera confiable.

Y de acuerdo a los requerimientos legales es de importancia el manejo adecuado de las muestras, así como la forma identificarlas y resguardarlas como lo indica la cadena de custodia.



## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Toca Porraz, Luis Esteban. Determinación de metabolitos de Marihuana en orina, por radioinmunoensayo.(Tesis de licenciatura). México, D.F. Facultad de Química, UNAM. 1977; 2-4.
2. Kinight, Bernard Medicina Forense de Simpson. El Manual Moderno. México. 1994; 326.
3. Tello Flores, Francisco Javier. Medicina Forense. Harla. México. 1991; 300, 301, 314.
4. Goodman Gilman, Alfred. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. Medica Panamericana. 1990; 538-542.
5. Lewine, Barry. Principles of Forensic Toxicology" 1999; 246-294.
6. Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos. Grijalva. 1994; 454-455 (2).
7. Vargas Alvarado, Eduardo. Medicina Lega. Trillas. México. 1996;.324-329.
8. Moffat A., Clarke's. Isolation and identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body fluids, and Post-Mortem material. 2ª edition. The Pharmaceutical Press. London. 1986; 216, 250-263, 423-425.
9. Dictionary of Plant Toxins. Editor Gerard P. Moss. 1997; 355.
10. Susan Budavari,. The Merck Index. Twelfth edition. Whitehouse station, NY. 1996; 285, 1573-1574.
11. Iversen, Leslie. Marihuana conocimiento científico actual. Ariel. Barcelona. 2001; 2-3,9-11.
12. Código Penal para el Distrito Federal en Materia Común y para toda la republica en Materia Federal Titulo Séptimo Artículo 197.
13. Ley General de Salud. Elaborada en México D.F. a 26 de Diciembre de 1983. Publicada en el Diario Oficial de la federación el 7 de Febrero de 1984 ultima reforma aplicada el 05/01/2001. Congreso de los Estados Unidos Mexicanos.
14. <http://www.medicinalegal.com.ar/bruzon.htm>. Martes 19 de mayo de 2003.
15. Gisbert Calabaig, J.A. Medicina Legal y Toxicología. 4ª edición. Masson-Salvat. 1996; 576,579-50,585.
16. Harris, Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Iberoamericana. México. 1992; 619-629, 653-689.
17. Chritian, Gary D. Química Analítica. 2ª edición. Limusa. México. (1990)Págs. 174-185.
18. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª edición. Secretaria de Salud. 2000; 232-237.

19. Day, Jr Química Analítica Cuantitativa. 5ª edición. Prentice Hall. México. 1999; 665-683.
20. Harris Daniel. Quantitative Chemical Analysis. 5ª edition. Freeman, NY. 1999; 745-749.
21. T. Hanai. HPLC a Practical Guide. Royal Society of Chemistry. 1999;1-6, 18,22.
22. Bermejo Martínez, Francisco. Química Analítica General, Cuantitativa e instrumental. Paraninfo, Madrid España. 1991; 1447-1449.
23. Runser, Dennis. Maintaining and Troubleshooting HPLC systems.\_John Wiley & Sons, NY. 1981; 91-93.
24. Settle, Frank A. Handbook of Instrumental Technique for Analytical Chemistry. Prentice Hall, New Jersey, USA. 1997;647-661.
25. Métodos Analíticos Validación CIPAM, 1-3.
26. Guidance for industry. Validation of Analytical Procedures, Methodology, United States. 1996; 2-6.
27. Sachs, Hans and Ulrich, Dressler Detection of THCCOOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up Forensic Science International 107(2000) 239-247.
28. Swartz, Michael Analytical method development and validation. Marcel Dekker. 1997; 39-67.
29. NOM-177-SSA1-1998, Pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.