



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"

Alumno: Rivera Rodríguez Gabriel

No. de cuenta: 9754960-2

Orientación: Farmacia

Tesina para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo

Título

Propuesta de un método por cromatografía de líquidos-
espectrometría de masas para la determinación de 2-oxo-3-
hidroxi-LSD en orina

Vo. Bo. Asesor: M. en C. Elizabeth Guadalupe Sánchez González



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

Contenido	Página
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Definición de droga.....	3
2.2. El descubrimiento de las droga.....	3
2.3. Fármacodependencia.....	3
2.4. Aspectos generales de la Legislación Mexicana en materia de drogas.....	4
2.5. Drogas de las que se abusa comúnmente.....	5
2.6. Alucinógenos.....	6
2.6.1. Dietilamida del ácido lisérgico (LSD).....	7
2.7. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).....	12
2.7.1. Equipo.....	23
2.8. Cálculo de la concentración de analito (estándares de referencia).....	26
2.9. Validación de métodos analíticos.....	29
2.9.1. Parámetros de validación de métodos analíticos.....	30
2.10. Espectrometría de masas.....	52
2.10.1. Espectrómetro de masas de cuadrupolo.....	57
2.10.2. Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.....	59
2.10.3. Espectrómetro de masas de trampa iónica.....	60
2.11. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas.....	63
2.12. Detección selectiva con un espectrómetro de masas.....	67
3. Resultados y discusión.....	70
3.1. Estabilidad de la dietilamida del ácido lisérgico.....	70
3.2. Métodos analíticos para la determinación de LSD y algunos de sus metabolitos.....	71
3.3. Pruebas presuntivas (Inmunoanálisis).....	75
3.4. Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia (CLAE-DF).....	82
3.5. Métodos por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas o Espectrometría de Masas en Tándem (CG-EM o CG-EM-tándem).....	82
3.6. Métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de Masas o Espectrometría de Masas en Tándem (CLAE-EM o CLAE-EM-tándem).....	91
4. Propuesta de un método para la determinación de O-H-LSD en orina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas.....	97
5. Propuesta de procedimiento general de validación del método analítico para O-H-LSD en orina por CLAE-EM.....	101
6. Conclusiones.....	107
7. Glosario.....	109
8. Referencias bibliográficas.....	112

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia el hombre se ha preocupado de descubrir, adquirir y utilizar sustancias, primero naturales y luego sintéticas, capaces de influir en el estado de ánimo, la percepción y el comportamiento. Las más antiguas de estas sustancias son el opio, que se extrae de la adormidera (*Papaver somniferum*), la cocaína de la hoja del arbusto de coca (*Erythroxylum coca*) y los productos de la Cannabis (*Cannabis sativa*). El uso indebido de tales sustancias, entraña graves peligros para el individuo. Por ejemplo, una persona adicta a opiáceos y barbitúricos, no sólo corre el riesgo de intoxicación crónica, sino también el de morir de una sobredosis. El uso indebido de estimulantes, como las anfetaminas o la cocaína, puede causar una pérdida del apetito y provocar cambios radicales en el comportamiento. 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 (OMS) considere objeto de control internacional. En la Ley General de Salud se indica que la Secretaría de Salud elabora un programa nacional contra la farmacodependencia y lo ejecuta en coordinación con dependencias y entidades del sector salud y con los gobiernos de las entidades federativas.¹

A pesar de las diversas acciones tomadas por el Gobierno Federal, en cuanto a la educación, prevención y tratamiento, cada día aumenta el consumo de drogas de abuso en la sociedad. Por lo tanto, los laboratorios especializados en el ámbito legal, requieren realizar una investigación toxicológica en los casos en que se sospeche de la intoxicación con cierto tipo de droga. Esta investigación comprende el conjunto de métodos analíticos que tienen por objeto el aislamiento, identificación y determinación cuantitativa de los tóxicos, tanto en la persona viva como en el cadáver, con el fin de permitir el diagnóstico y esclarecimiento de los hechos. Desde el punto de vista puramente analítico, la investigación toxicológica es la misma en las distintas ramas de la Toxicología (clínica, forense, industrial, ambiental y alimentaría). Básicamente, las técnicas utilizadas son muy semejantes; no obstante, el análisis toxicológico médico-legal tienen algunas peculiaridades: (1) debe ser capaz de detectar cualquier sustancias química (exógeno) presente en el material biológico, una vez que se ha reunido toda la

Comentario [XL1]: sustancia con efectos sobre el sistema nervioso central (psicotropa) que crea adicción, taquifilaxia y cuadros de abstinencia.

información del caso, con los datos del médico, familiares y allegados, y se ha realizado un minucioso estudio del lugar de los hechos; que permitirá solicitar un análisis toxicológico lo más específico posible; (2) la ejecución del análisis toxicológico involucra un proceso sistemático, partiendo de métodos sensibles pero no necesariamente específicos para detectar gran número de sustancias, mediante pruebas comúnmente denominadas presuntivas u orientadoras; hasta emplear métodos más específicos para confirmar la presencia de dichas sustancias. La necesidad de un resultado cuantitativo, preciso y exacto es lo que caracteriza a los análisis en toxicología forense y (3) por último, la interpretación de los resultados requiere tener en cuenta, todas las circunstancias implicadas en el caso, que de alguna forma intervienen en la investigación médico-legal.²

El propósito del presente proyecto, es realizar una investigación documental, para proponer un método analítico en la determinación y cuantificación del principal metabolito de la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), el 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD), en muestras de orina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas (CLAE-EM).

1. ANTECEDENTES

1.1. Definición de droga.

La OMS define el término droga; como toda sustancia química que introducida voluntariamente en el organismo de un sujeto, posee la propiedad de modificar las condiciones físicas o químicas de éste.²⁻³

Comentario [GR1]: sustancia con efectos sobre el sistema nervioso central (psicotropa) que crea adicción, taquifilaxia y cuadros de abstinencia.

1.2. El descubrimiento de las drogas.

En un inicio, los descubrimientos de las drogas y fármacos que resultaron administrados (en algunos de ellos), se ignoraban sus efectos o repercusiones a mediano y a largo plazo; las siguientes investigaciones, junto con el tiempo, permitieron restringir y explicar sus efectos negativos o positivos, según sea el caso. El uso y abuso de las drogas va ligada a la historia del hombre mismo. Los egipcios, griegos, mayas, incas y otros pueblos las han utilizado con fines religiosos, místicos, y para predecir el futuro; dichas culturas han tenido sus propias leyes; valiéndose de las plantas, fueron usuarios de las drogas para reafirmar sus valores culturales. En cambio las sociedades modernas hacen uso de ellas muchas veces como una forma de rebelión, como una búsqueda de placer o como un escape de la realidad.³⁻⁴

Comentario [XL2]: sustancia química empleado en el tratamiento o prevención de enfermedades (terapéutico)

1.3. Fármacodependencia.

El término fármacodependencia, cuyo uso fue recomendado por la OMS en 1965, se refiere a la necesidad de recibir en forma periódica o continua un agente químico denominado droga. Cuando se tiene un deseo compulsivo por ingerir la droga para experimentar sus efectos físicos o evitar estados desagradables de no hacerlo, se habla de dependencia química. Cuando los componentes que impulsan al consumo de una droga determinada son puramente emocionales o psicológicos se habla de dependencia psicológica. Algunos de estos agentes químicos producen además dependencia física, es decir una droga o su metabolito se ha convertido en necesaria para el funcionamiento normal del organismo. Usualmente la dependencia química abarca, la dependencia psicológica y física. Otro término de importancia es tolerancia; que ocurre cuando el organismo se adapta a una determinada cantidad (dosis)

de droga y se da una reacción menor del organismo, lo que ocasiona que una persona necesite dosis mayores del fármaco ó droga con la finalidad de que obtenga el mismo efecto inicial.¹⁻⁴

1.4. Aspectos generales de la Legislación Mexicana en materia de drogas.

En México, el consumo de drogas no está prohibido y las personas que sean sorprendidas consumiendo o portando cualquier sustancia prohibida cuya cantidad se considere como de estricto consumo personal, no pueden ser sujetas a ningún proceso judicial. Lo contrario es una violación de lo establecido por la legislación penal mexicana en materia de delitos contra la salud.⁵

La República Mexicana ha firmado una serie de acuerdos internacionales que le obligan a prohibir todas las sustancias que la OMS 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".⁵

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 deprime el sistema nervioso central, sino cualquier sustancia prohibida).⁵

Además del tráfico de drogas lo que se castiga en nuestro país es la producción, (esto es, la manufactura, fabricación, elaboración, preparación o acondicionamiento de algún narcótico), el transporte, el tráfico, el suministro gratuito, la prescripción y el comercio (esto es, vender, comprar, adquirir o enajenar algún narcótico). También se imponen penas a quienes aporten recursos o colaboren financieramente en los delitos anteriores, a quienes siembren o permitan que se siembre en terrenos de su posesión alguna planta cuyo alcaloide esté prohibido y realicen actos de publicidad o propaganda para favorecer el consumo de narcóticos.⁵

De acuerdo a los principios del derecho penal liberal, la penalización de una conducta requiere que ésta afecte o ponga en grave riesgo un bien jurídicamente protegido tal como la vida, el patrimonio, la integridad física o la seguridad nacional. En el caso de las drogas no queda muy claro cuál es el bien jurídicamente protegido. En un primer momento se les consideró delitos contra la salud, sin embargo, no está definido cómo es que los elementos que configuran el tipo penal del tráfico de drogas efectivamente ponen en peligro el bien jurídico en cuestión.⁵

1.5. Drogas de las que se abusa comúnmente.

No todas las drogas son adictivas físicamente. La mayoría, sin embargo, puede causar adicción psicológica, que es cuando una persona siente que necesita esa droga para poder seguir con su vida cotidiana. Las drogas de las que se abusa con mayor frecuencia se encuentran en las siguientes categorías:⁶⁻⁷

1. Drogas legales.

- Alcohol.
- Tabaco.
- Esteroides.
- Cafeína.

2. Drogas ilegales.

- Marihuana (Cannabis; también llamada porro, dope, fumo, grass, hierba, María, pot, hashish, hash)
- Estimulantes (como cocaína, crack, anfetaminas; también llamados piedras, coca, blanca, merca, pala, nevados)
- Depresivos (como los barbitúricos y sedantes; también llamados downers, ludes, somníferos)
- Narcóticos/Opiáceos (como la heroína, opio, morfina; también llamados junk, smack)
- Alucinógenos (como la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), la mescalina y psilocibina)
- Inhalantes (como el pegamento, los disolventes, gases de aerosoles, fluidos correctores y rebajadores de pintura).

1.6. Alucinógenos.

Como su nombre lo indica, los alucinógenos son sustancias que son capaces de alterar la percepción de la realidad. Tradicionalmente los alucinógenos se han dividido en dos grupos: fenilalquilaminas (tales como la mezcalina) y las indolalquilaminas (tales como psilocibina y LSD). La mayor parte de ellos son de origen vegetal, pero desde hace unos 30 años se producen en los países industrializados de manera sintética e incrementando en número. El término "alucinógenos" es empleado frecuentemente en periódicos y otros medios de comunicación para referirse en general a las sustancias psicoactivas. Este uso es inadecuado, pues aun cuando muchas sustancias pueden producir alucinaciones (los inhalables, las anfetaminas, la cocaína, el alcohol) este es un efecto secundario, resultante generalmente de intoxicaciones crónicas o severas, no es su efecto principal. Los alucinógenos de uso más frecuente son por lo general la mezcalina, psilocibina y LSD.⁸⁻¹⁸

Los alucinógenos, por lo general, no producen dependencia. El peligro de estas sustancias se encuentra relacionado con el desencadenamiento de fenómenos de percepción que pueden inducir pánico o conductas imprevisibles y con la posibilidad de aparición de trastornos durables en personas que tienen una predisposición o una historia de problemas psiquiátricos. La mezcla con otras sustancias también puede dar lugar a la aparición de

complicaciones difíciles de predecir. La utilidad de los alucinógenos es reducida, aun cuando algunos psiquiatras han propuesto a lo largo de los años que pueden facilitar el "entrar en contacto con uno mismo". Hasta el momento actual tales experiencias han sido un fracaso y pueden ser bastante riesgosas para los pacientes. En la mayoría de los países su uso es ilegal.⁸⁻¹⁸

1.6.1. Dietilamida del ácido lisérgico (LSD).

El ácido lisérgico, es un alcaloide que se encuentra de forma natural en el cornezuelo, un hongo que se halla en los granos, principalmente de la especie *Claviceps purpurea*, que crece en el centeno, la cebada y el trigo. La dietilamida del ácido lisérgico (LSD) es una indolalquilamina perteneciente a la familia de los alcaloides y fue sintetizada en 1937 por Albert Hofmann en los laboratorios Sandoz, a partir del ácido lisérgico y dietilamida (Figura. 1). El LSD, con formula química $C_{20}H_{25}N_3O$ y peso molecular de 323.44 g/mol, es un aceite insípido, incoloro e inodoro; puede ser cristalizado a partir de benceno, el cual es un cristal blanco con punto de fusión de 80 a 85 °C. Ilícitamente esta disponible como polvo, en tabletas, en cápsulas de gelatina dura o impregnado en cubos de azúcar, papel absorbente o estampillas. Clandestinamente los laboratorios pueden manufacturar tabletas, que son usualmente pequeñas y coloreadas. Es muy frecuente referirse a ellas por su color, tal como sol anaranjado, neblina púrpura y micropuntos amarillos.⁸⁻¹⁸

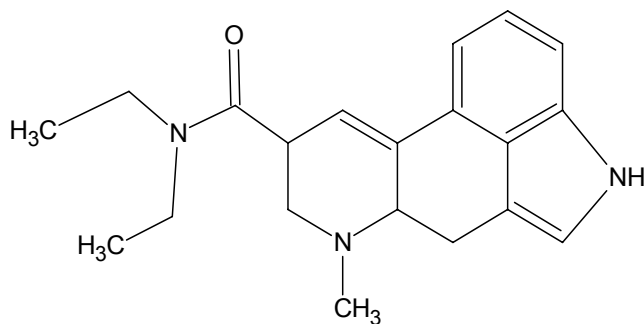


Figura 1. Estructura de la dietilamida del ácido lisérgico.

Teóricamente, son posibles cuatro estereoisómeros de la molécula de LSD a partir de dos átomos de carbono asimétricos (C-5 y C-8). Muchos de los alcaloides del cornezuelo son isómeros en el C-8. Por lo tanto, solo dos compuestos, ácido lisérgico y ácido *iso*-lisérgico, son formados de la hidrólisis de los alcaloides del cornezuelo. En el ácido lisérgico, el átomo de hidrógeno del C-5 y el grupo amida del C-8 están en configuración *cis* y en el ácido *iso*-lisérgico estos dos grupos funcionales se encuentran en posición *trans* (Figura 2). Si estos isómeros no son separados antes de la preparación de LSD, tanto LSD y *iso*-LSD se forman.⁸⁻

18

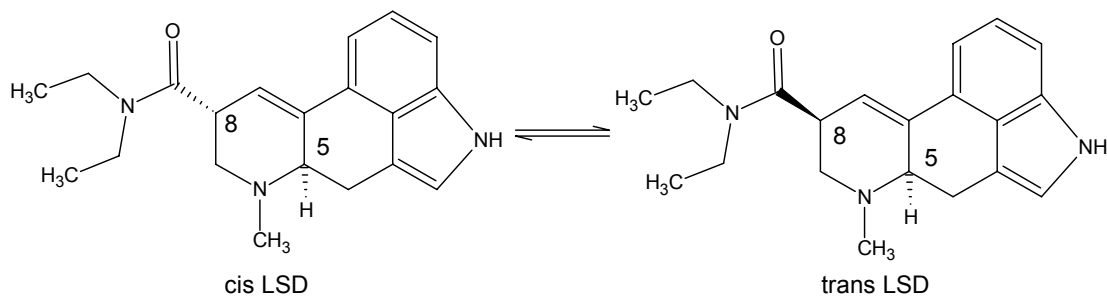


Figura 2. Estructura química de los isómeros del LSD.

El LSD es una droga psicoactiva de acción central; el isómero dextro es farmacológicamente activo, mientras que el isómero levo es aparentemente inactivo. Es aproximadamente de 100-150 más potente que la psilocibina y 4500-9200 más potente que la mezcalina. Algunos alcaloides del cornezuelo de centeno son antagonistas competitivos de la serotonina. Se ha sugerido la posible implicación de la serotonina en la esquizofrenia y otras psicosis. Muchos fármacos psicotomiméticos contienen en su estructura el núcleo indol o incluso la estructura completa de la serotonina y actúan sobre receptores o interfieren en el metabolismo de la serotonina y pueden inducir o atenuar estados de psicosis y han mostrado actividad antipsicótica, antiagresiva, ansiolítica y alucinogénica (Figura 3). Los derivados del ácido lisérgico, como la dietilamida del ácido lisérgico y su acción sobre los receptores de la serotonina son complejos, ya que se comporta como agonista parcial y, por tanto, antagonista en algunos músculos lisos, mientras que en las sinápsis centrales actúa como potente agonista.⁸⁻¹⁸

Comentario [XL3]: Son moléculas que tienen la misma fórmula empírica, pero presentan una disposición distinta de los átomos en el espacio. Los estereoisómeros se diferencian en sus propiedades físicas y químicas y gracias a ello se pueden separar.

La isomería óptica es un tipo importante de estereoisomería (enantiómeros) y se produce cuando un compuesto contiene un centro de asimetría.

Comentario [GR4]: Isómeros, dos o más moléculas con composiciones químicas idénticas, pero que difieren en la disposición de los átomos. Los isómeros se clasifican en isómeros estructurales, en los cuales la secuencia de los átomos es diferente, y en estereoisómeros, en los cuales los átomos están unidos en el mismo orden, pero están orientados de forma distinta en el espacio. Un tipo particular de estereoisomería es la isomería *cis-trans* (isomería geométrica), producida por una molécula forzada por la rotación limitada de los enlaces a una de las posibles posiciones.

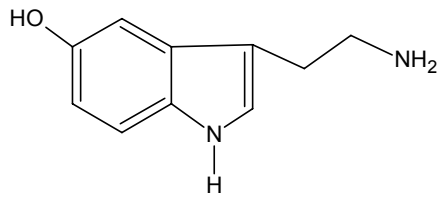


Figura 3. Estructura química de la serotonina.

EL LSD puede ser administrado por vía oral, nasal o por inyección. Sin embargo, la ruta oral es la más común. La absorción es rápida y completa con esta ruta de administración. Si el estómago contiene alimentos la absorción es más lenta. Los efectos se observan dentro de los primeros 5-10 min, con evidentes psicosis después de los 15-20 min. Los efectos máximos se han reportado a los 30-90 min después de una dosis, con efectos de decline después de 4-6 h. La unión a proteínas plasmáticas del LSD es mayor al 80 %. Como la droga penetra el sistema nervioso central, esta se concentra en áreas del cerebro relacionadas con la visión y en el sistema límbico y reticular, lo que se correlaciona con sus efectos. EL LSD también se encuentra en el hígado, bazo y pulmón. El volumen de distribución sea reportado de 0.28 L/kg. En un modelo de dos compartimientos el LSD se ha descrito con una vida media de 3 h.⁸⁻¹⁸

Comentario [AAV5]: Relacionado con la motivación y los instintos

Comentario [AAV6]: Se localizan los centros de control de las funciones cardíacas, vasoconstrictoras y respiratorias, así como otras actividades reflejas, incluido el vómito. Las lesiones de estas estructuras ocasionan la muerte inmediata.

El metabolismo y la eliminación del LSD en humanos no está por completo investigado. Los estudios han demostrado la existencia de por lo menos cinco metabolitos principales. Estos incluyen a *nor*-desmetil-LSD (*nor*-LSD), 2-oxo-LSD, 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD), 13-hidroxi-LSD-glucurónico y 14-hidroxi-LSD-glucurónico (Figura 4). Los resultados recientes sugieren que el 2-oxo-LSD es un simple intermediario en la formación del O-H-LSD, uno de los metabolitos que se encuentran en mayor concentración en orina. Klette LK. y col.¹⁹ investigaron el metabolismo del LSD a O-H-LSD mediante la incubación de LSD con hepatocitos y microsomas de hígado humano. Sus resultados demostraron que efectivamente el O-H-LSD es el principal metabolito de la biotransformación del LSD y sus concentraciones se incrementan de manera dependiente con el tiempo y este puede ser determinado en orina a concentraciones de 16 a 46 veces mayores que el mismo LSD. Además, demostraron que el O-H-LSD no se genera durante la extracción de la muestra, proceso analítico o debido a la degradación del LSD y proponen la formación del O-H-LSD, por otro metabolito intermedio aun no reportado, tentativamente identificado como dihidroxi-LSD, por dos vías metabólicas

Comentario [AAV7]: El hígado está constituido por formaciones diminutas que reciben el nombre lóbulos hepáticos y están separados entre sí por tejido conectivo. Estos lobulillos tienen forma hexagonal; están compuestos por columnas de células hepáticas o hepatocitos dispuestas de forma radial alrededor de la vena central, rodeadas por canales diminutos, conocidos como canaliculos biliares, hacia los que se vierte la bilis que segregan los hepatocitos.

que ellos mismos presentaron y plantearon los vías de fragmentación de la molécula en su determinación por espectrometría de masas. Sin embargo no se demostró concluyentemente con este estudio que el O-H-LSD sea el único metabolito del LSD que se forma in vivo.

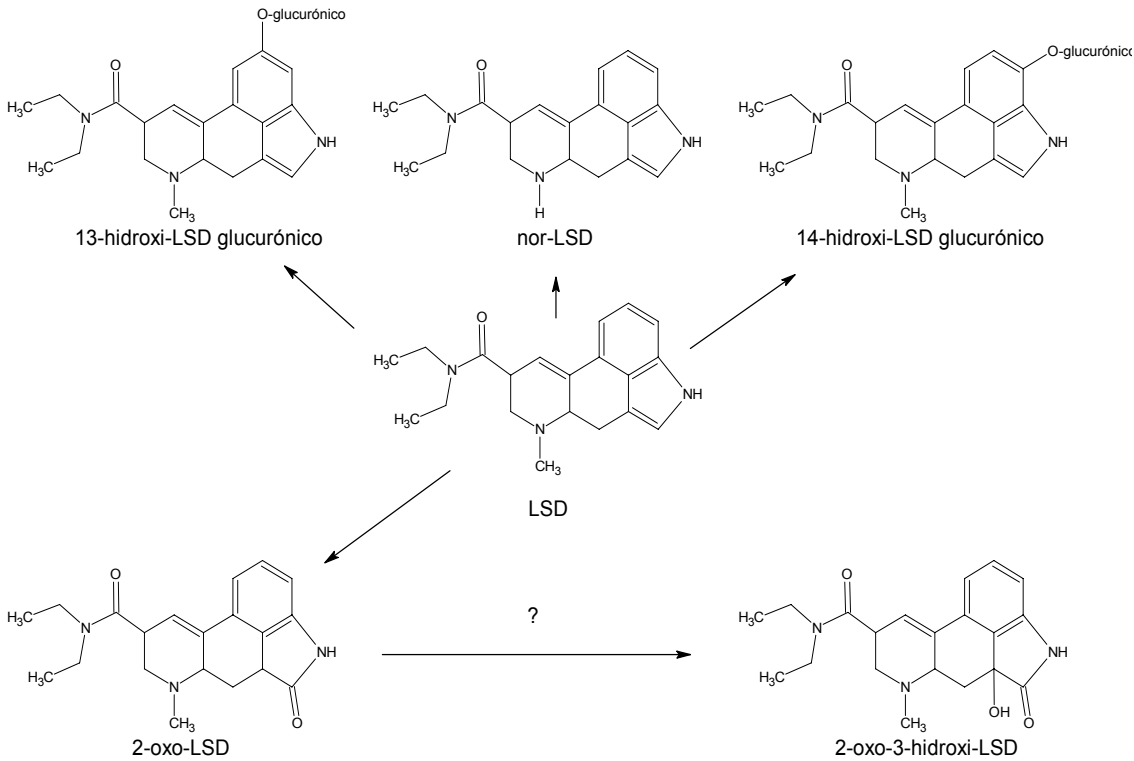


Figura 4. Principales metabolitos del LSD en humanos.

En 1950 el LSD fue usado en medicina como un auxiliar en el tratamiento del alcoholismo, adicción a opiáceos, psiconeurosis y desordenes sexuales. En cualquier caso su uso terapéutico se abandonó tras la prohibición internacional de esta sustancia, puesto que fue incluida en la Lista I de Sustancias Controladas de la Ley General de Salud, donde se supone que están las drogas sin utilidades terapéuticas, lo cual impide incluso las investigaciones al respecto. En el excepcional caso de la LSD sus dosis se miden en microgramos (μg) y de todas las drogas ilícitas es la menos adulterada; dado a sus característicos efectos y la singularidad de su potencia. Actualmente existen dos tipos de dosificaciones en el mercado negro, las dosis bajas o "dosis de rave" (tripis o micropuntos) y las dosis altas o "dosis psicodélicas" (ácidos o tickets). Las primeras fluctúan entre los 10 y los 15 μg , mientras que las dosis psicodélicas van de 25 a 50 μg . Las dosis que se venden se encuentran en el rango

de 40 a los 120 μg , pero con solo cantidades superiores a los 20 μg son suficientes producir profundos efectos alucinógenos. Los usuarios de LSD son típicamente usuarios de otras drogas, experimentan con etanol, marihuana y anfetaminas. Pero no es común que este grupo de usuarios empleen simultáneamente sedantes-hipnóticos y opioides.⁸⁻¹⁸

Los efectos del LSD pueden ser divididos en fisiológicos y psiquiátricos. Los efectos fisiológicos son principalmente la midriasis, lagrimación, taquicardia, piloerección, hiperglicemia y elevación de la temperatura del cuerpo. El signo de mayor frecuencia y consistencia de los usuarios de LSD es la dilatación de la pupila. Después de grandes dosis salivación, temblores, náuseas, vómito, hiperactividad e hiperreflexia suelen ocurrir. Las experiencias psicológicas incluyen percepción alterada, tal como ilusiones y alteración de los sonidos e intensificación de los colores. La falsedad de las ideas sensoriales es la más notable y consistente alteración. Se observan fijos objetos ondulantes y las superficies asumen profundidad. Puede ocurrir amplificación de los ruidos de fondo, con un rebosar del suministro sensorial, tanto que los colores pueden oírse y la música es palpable. El juicio es afectado a tal grado que la imagen del cuerpo sufre cambios lo que ocasiona despersonalización. Típicamente la orientación se conserva, solo que el juicio suele ser pobre debido a la paranoia o ideas de persecución. El patrón de comportamiento después de usar LSD es difícil de predecir puesto que depende del ambiente, expectativa y el estrés emocional en adición a la dosis y si los individuos tiendan a estar quietos, pasivos y concentrados.⁸⁻¹⁸

Comentario [AAV8]: Ritmo cardíaco acelerado.

Otro efecto psiquiátrico incluye el llamado "flashbacks" (la recurrencia de los efectos de la droga sin el uso de la misma), reacciones psicóticas agudas y comportamiento traumático. Las experiencias con "flashbacks" incluyen alteraciones visuales, distorsión del tiempo y cambios en la imagen del cuerpo después de un periodo de abstinencia. Este efecto puede ser precipitado por estrés emocional y fisiológico y ocurre en aproximadamente el 15 % de los usuarios que la consumieron por varios años. Sin embargo, la etiología del efecto "flashbacks" es desconocida.⁸⁻¹⁸ Las recurrencias espontáneas de las experiencias con LSD, días o semanas después de haber ingerido la droga, han sido descritas anteriormente por Sandison, Spencer & Whitelaw (1954), por Eles, Eles & Mayer-Gross (1955) y por Cooper

(1955), en los años en que el LSD se empleo en psiquiatría.¹⁹⁻²⁰ Las personas raramente se presentan en el hospital con intoxicaciones por LSD, pero puede ocurrir. Estos usualmente acuden como resultado de un "mal viaje", reacciones de pánico, alucinaciones, agresiones o después de accidentes como resultado de cambios en el comportamiento del individuo inducidos por la droga. En casos raros por inhalación a resultado en coma, sangrado y severa pirexia, aunque todos los pacientes se recuperan completamente.⁸⁻¹⁸

1.7. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

La CLAE es una técnica de separación que se fundamenta en la interacción de un soluto con una fase estacionaria (líquida o sólida) y una fase móvil líquida. Cuando dos solutos se introducen en una columna estos eluyen a través de la columna por la adición continúa de nueva fase móvil. En la columna los solutos se distribuyen entre las dos fases mediante interacciones repetidas, cuando ambas fases se han escogido de forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil y al final del proceso los componentes separados emergen de la columna, consiguiendo así ser detectados. El detector que responde a la presencia de los solutos proporciona una señal en función del tiempo y se obtienen una serie de picos que se representan en un gráfico denominado cromatograma (Figura 5), él cual es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. Del cromatograma presentado se puede introducir las definiciones de algunos términos importantes para la cromatografía en columna como son:

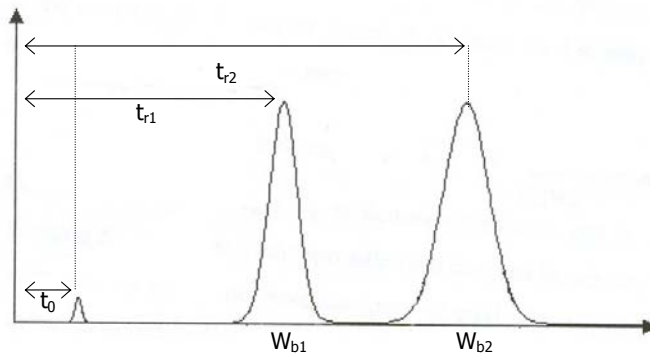


Figura 5. Cromatograma típico en CLAE.

- *Línea base*. Es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elusión de la fase móvil, sin señal debida al analito.
- *Tiempo de retención* (t_r). Tiempo que un soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elusión del pico máximo y es característico del soluto para condiciones de operación constantes, auxiliar en la identificación de solutos.
- *Tiempo muerto* (t_0). El tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria y representa el espacio vacío de la columna.
- *Tiempo de retención ajustado* (t'_r). Mide el tiempo que el componente permanece en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

- *Velocidad lineal* (u). Como la velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es sólo función del caudal sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Si "L" es la longitud de la columna expresada en cm y t_0 es el tiempo muerto medido en segundos, la velocidad lineal en cm/s puede calcularse como.

$$u = \frac{L}{t_0}$$

- *Ancho a la base* (W_b). Es la porción de la línea base interceptada por las tangentes al pico y para un pico gaussiano es igual a cuatro, tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema.
- *Ancho a la mitad de la altura* ($W_{1/2}$). Una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).

- *Número de platos teóricos (N)*. Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos representa el poder de separación o eficacia de una columna; por consiguiente, una buena columna tienen un número alto de platos teóricos y se calcula de la siguiente manera:

$$N=16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2=5.54\left(\frac{t_r}{W_{1/2}}\right)^2$$

- *Constante de distribución, razón de distribución o coeficiente de distribución (K)*. Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se distribuye entre la fase móvil y estacionaria. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de distribución:

$$K = C_s / C_m$$

donde C_s y C_m son las concentraciones molar de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases. El coeficiente de distribución determina la velocidad promedio de cada zona de soluto, más específicamente, del centro de la zona de soluto conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna.

- *Factor de capacidad (k')*. El factor de capacidad es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas. Para una especie A, el factor de capacidad k'_A se define como:

$$k'_A = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Cuando el factor de capacidad para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos

de retención. Cuando el factor de capacidad es del orden de 20 a 30 o tal vez mayor, los tiempos de retención son demasiado largos. Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de capacidad para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5.

- *Factor de selectividad* (α). El factor de selectividad de una columna define la habilidad del sistema para separar dos especies, por ejemplo A y B; y se puede calcular por la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0}$$

Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. A diferencia de k' , no depende de la fuerza de elusión, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna.

- *Resolución* (R). La resolución de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución de una columna se define como:

$$R = \frac{2 [t_{r2} - t_{r1}]}{W_2 + W_1}$$

Con una resolución de 1.5 se logra una separación esencialmente completa de dos componentes, mientras que con una resolución de 0.75 no se separan satisfactoriamente. Con una resolución de 1.0 el solapamiento de los picos es de aproximadamente un 4.0 % y con una resolución de 1.5 el solapamiento es del orden de un 0.3 %. Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos teóricos. Sin embargo, una consecuencia adversa del aumento del número de platos es un aumento del tiempo necesario para la separación. La resolución alcanzada en un sistema es proporcional al producto de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema, que son los tres

parámetros más importantes de control en una columna cromatográfica, siendo la expresión matemática para la resolución la siguiente:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

Es incuestionable que la CLAE es la técnica de separación más ampliamente utilizada por varias razones importantes como son su sensibilidad, su adaptación a las determinaciones cuantitativas, su aplicación a la separación de compuestos no volátiles o termolábiles y, sobre todo, a su aplicación en compuestos que son de primordial interés en la industria, para la ciencia y la sociedad en general. La naturaleza tan diversa de las fases estacionarias y móviles que se pueden emplear llevan consigo una gran versatilidad en los mecanismos de separación y los más usados en la práctica son los siguientes.^{21-25,58}

La *cromatografía de reparto* ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado. La cromatografía de reparto se puede dividir en cromatografía *líquido-líquido* y cromatografía con *fases unidas químicamente*. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma como se une la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del relleno. En *líquido-líquido*, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción. En *fase unida químicamente*, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. Los soportes para casi todos los rellenos con fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 µm. La superficie de la sílice totalmente hidrolizada está constituida por grupos silanoles (SiOH) químicamente reactivos (Figura 6).^{21-25,58}

Comentario [GR9]: Ley de reparto, relación de equilibrio definida entre las concentraciones de un soluto disuelto en un sistema formado por dos fases líquidas no miscibles. Cuando se agita un soluto con dos disolventes inmiscibles, el soluto se disuelve en ambos de tal forma que la relación entre las concentraciones en cada uno es una cantidad constante que no depende de la cantidad de soluto.

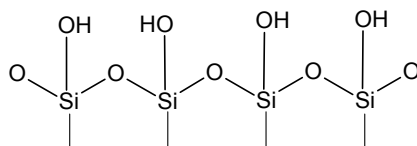
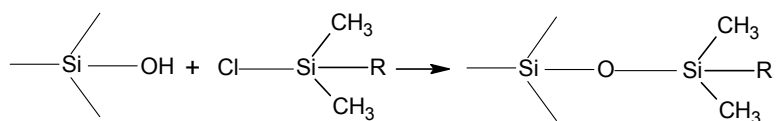


Figura 6. Superficie de Sílice rígida con grupos SiOH reactivos.

Los recubrimientos de fase enlazada más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano. Por ejemplo,



donde R es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido. El recubrimiento de la superficie por sililación se limita a 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ o menos a causa de los efectos estéricos. Los grupos SiOH que no han reaccionado, imparten una polaridad indeseable a la superficie, lo que origina picos con cola. Para reducir este efecto, los rellenos de siloxano muchas veces se desactivan por reacción con clorotrimetilsilano, el cual, debido a su pequeño tamaño, puede unirse químicamente a los grupos SiOH que no habían reaccionado.^{21-25,58}

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de de cromatografía de reparto. Inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol colocadas sobre partículas de sílice o alúmina. Por razones históricas, a este tipo de cromatografía se le conoce como *cromatografía en fase normal*. En la *cromatografía de fase inversa*, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol y acetonitrilo). En cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero. En contraste, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero. Los rellenos de fase enlazada se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido químicamente tiene un carácter no polar. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C₈ (*n*-octilo) o una cadena C₁₈ (*n*-octadecilo). En estas preparaciones, los grupos de hidrocarburo de cadena larga se alinean el uno junto al otro y en perpendicular a la superficie de la partícula, dando una estructura semejante a una brocha o a un cepillo. Las moléculas de la fase móvil compiten entonces con las del analito por una posición en la superficie orgánica. Sin considerar detalladamente el mecanismo de separación, un recubrimiento enlazado se puede considerar como si fuera un líquido convencional retenido físicamente.^{21-25,58}

En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía de fase inversa, la elusión se lleva a cabo con una fase móvil de levada polaridad como es el caso de una solución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Se ha de procurar que el pH sea menor de aproximadamente 7.5 porque si no se disuelve la sílice de base de las columnas, y a un pH menor de 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada. Con rellenos de fase enlazada en fase normal, R en la estructura del siloxano es un grupo funcional polar como es el caso de los grupos ciano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), diol ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) y los dimetilamino [$-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$]. Las polaridades de estos materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el grupo amino el más polar. Con los rellenos de fase normal, la elusión se realiza con disolventes relativamente no polares, tales como el etiléter, el cloroformo y el *n*-hexano.^{21-25,58}

La *cromatografía de pares iónicos* (o *de formación de pares de iones*) es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil esta constituida por una disolución acuosa amortiguada que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un *contraion* de carga opuesta al analito. Un *contraion* es un ion que se combina con el ion analito para formar una *pareja de iones*, que es una especie neutra que es retenida por el relleno de fase inversa. La elusión de los pares iónicos se consigue mediante una disolución acuosa de metanol o de otro disolvente orgánico soluble en agua.^{21-25,58}

Comentario [GR10]: Ion, partícula que se forma cuando un átomo neutro o un grupo de átomos ganan o pierden uno o más electrones. Un átomo que pierde un electrón forma un ion de carga positiva, llamado catión; un átomo que gana un electrón forma un ion de carga negativa, llamado anión. Los átomos pueden transformarse en iones por radiación de ondas electromagnéticas con la suficiente energía.

La importancia que tiene la diferenciación de isómeros óptimamente activos (enantiómeros) desencadenó a mediados de los años sesenta, un interés creciente por el desarrollo de procedimientos que permitieran su separación. La separación de enantiómeros mediante cromatografía de líquidos puede abordarse desde diferentes modos. El procedimiento tradicional para la separación de enantiómeros es su transformación en diastereoisómeros, que posteriormente pueden separarse por CLAE, generalmente en fase inversa, sin el empleo de

fases quirales. Sin embargo, este procedimiento conlleva la necesidad de preparar derivados, con el consiguiente riesgo de reacciones secundarias, y requiere la disponibilidad de reactivos quirales de pureza controlada. Además, el proceso es largo y laborioso y, en muestras con bajo contenido en enantiómeros, es difícil lograr un rendimiento cuantitativo. Estos inconvenientes se evitan con la separación directa de los enantiómeros, que pueden realizarse mediante fases estacionarias quirales o añadiendo aditivos quirales en la fase móvil. Actualmente las fases estacionarias quirales están constituidas por recubrimientos sobre soportes de gel de sílice. El recubrimiento por lo general consiste en un material polimérico al cual se le ha unido un isómero ópticamente activo. La separación con fases estacionarias quirales puede realizarse por unión iónica o covalente del reactivo quiral al material de relleno de la columna.^{21-25,58}

La *cromatografía de adsorción* o *líquido-sólido* se basa en la distinta magnitud de las interacciones de los componentes de la mezcla con la superficie activa de la fase estacionaria. Las únicas fases estacionarias que se utilizan en este tipo de cromatografía son la sílice y la alúmina, siendo la primera la que se prefiere para casi todas las aplicaciones debido a su capacidad de carga y a su diversidad de presentaciones. La cromatografía de adsorción es más adecuada para compuestos no polares probablemente con masas moleculares inferiores a 5000. En general, es más adecuada para muestras que son solubles en disolventes no polares.^{21-25,58}

La *cromatografía iónica* está relacionada con los métodos modernos y eficaces para la separación y determinación de iones que se basan en el uso de las resinas de intercambio iónico. Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble. Los puntos activos en las resinas de intercambio catiónico son los grupos de ácido sulfónico $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$, un ácido fuerte, y los grupos de ácido carboxílico $-\text{COO}^-\text{H}^+$, un ácido débil. Los intercambiadores aniónicos contienen grupos de amina cuaternaria $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ o grupos de amina primaria $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$; el primero es de base fuerte y el último de base débil.^{21-25,58}

Históricamente, en cromatografía de intercambio iónico se han empleado pequeñas partículas esféricas porosas que se forman en la copolimerización del estireno y del divinilbenceno emulsionados. La presencia de divinilbenceno (normalmente ~8 %) origina una polimerización entrecruzada que imparte estabilidad mecánica a las bolitas. Con objeto de activar el polímero frente a los iones, a la estructura se le unen químicamente grupos funcionales ácidos o básicos; y los grupos más comunes son el ácido sulfónico y las aminas cuaternarias, respectivamente. Las partículas poliméricas porosas no resultan de todo adecuadas como rellenos cromatográficos debido a la baja velocidad de difusión de las moléculas de los analitos a través de los microporos de la matriz polimérica, y también debido a la compresibilidad de la matriz. Para resolver este problema se emplea un relleno de partícula pelicular en el que la superficie relativamente grande (de 30 a 40 μm) de una partícula, esférica y no porosa, de vidrio o polimérica se recubre con una resina sintética de intercambio iónico o un segundo tipo de relleno se prepara recubriendo micropartículas porosas de sílice, tal como las que se usan en la cromatografía de adsorción, con una pequeña partícula del intercambiador.^{21-25,58}

Comentario [GR12]: Consiste en la polimerización de dos monómeros denominados comonómeros. Polímero, sustancia que consiste en grandes moléculas formadas por muchas unidades pequeñas que se repiten, llamadas monómeros. El número de unidades que se repiten en una molécula grande se llama grado de polimerización. Los materiales con un grado elevado de polimerización se denominan altos polímeros. Los homopolímeros son polímeros con un solo tipo de unidad que se repite. En los copolímeros se repiten varias unidades distintas.

La *cromatografía de exclusión por tamaños*, que también se ha denominado *cromatografía en geles permeables* o de *filtración en geles*, es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas ($\sim 10 \mu\text{m}$) poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. En los poros las moléculas son atrapadas efectivamente y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los poros del relleno son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen y, por lo tanto, son las primeras que eluyen. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo, éstas son las últimas en eluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de sus diámetros. En las separaciones por exclusión por tamaños difieren de los otros procedimientos, en que no implican una interacción química o física entre los analitos y

la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones dado que originan una mala eficiencia de la columna. ^{21-25,58}

En cromatografía de exclusión por tamaños se encuentran dos tipos de rellenos –partículas poliméricas y partículas de sílice- con diámetros de partícula que oscilan de 5 a 10 μm . Los rellenos con partículas de sílice tienen la ventaja de una gran rigidez, lo que facilita el empaquetamiento; una mayor estabilidad, lo que permite el uso de una gran variedad de disolventes incluyendo el agua; una equilibración más rápida al cambiar de disolvente; y una buena estabilidad a elevadas temperaturas. Sus inconvenientes implican la tendencia a retener solutos por adsorción. Las partículas poliméricas que se utilizan implican copolímeros de estireno-divinilbenceno entrecruzados y el tamaño de poro en estos polímeros se controla por el grado de entrelazamiento entre las cadenas poliméricas y por tanto con la cantidad relativa de divinilbenceno presente en la fabricación. Los geles de estireno-divinilbenceno son hidrofóbicos y de este modo sólo pueden utilizarse con fases móviles no acuosas. Sin embargo, en la actualidad se disponen de geles hidrofílicos, por lo general copolímeros de estireno-divinilbenceno con grupos sulfónicos o poliácridamidas, que hacen posible el uso de disolventes acuosos para la separación de moléculas grandes solubles en agua como los azúcares. ^{21-25,58}

La *cromatografía de afinidad* se basa en la interacción específica entre una molécula y un ligando, que es una molécula que se fija a la fase estacionaria para interactuar con las del soluto. El mayor auge de la cromatografía de afinidad, desde sus orígenes a finales de los años 60, ha correspondido a la cromatografía de bioafinidad, en la que las interacciones entre ligandos y moléculas se basan en reconocimientos de tipo biológico. La retención en cromatografía de bioafinidad se debe a uniones complejas que incluyen distintos tipos de interacciones no covalentes, como son las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas, dipolo-dipolo, de transferencia de carga o electroestáticas. La orientación espacial adecuada de los grupos a través de los cuales se realiza la interacción facilita una elevada combinación cooperativa de fuerzas, lo que constituye la base de la elevada selectividad y especificidad del enlace en cromatografía de bioafinidad. Entre los modos más

selectivos de cromatografía de bioafinidad se encuentra la *cromatografía de inmunoafinidad*, basada en el reconocimiento entre antígenos y anticuerpos. Un antígeno es una sustancia que introducida en un organismo origina una respuesta inmune, es decir, origina la producción de anticuerpos específicos frente a ese antígeno. Esta respuesta altamente específica de la naturaleza se ha aprovechado en los métodos inmunológicos de análisis para emplear los anticuerpos como reactivos específicos contra los antígenos. Cuando los anticuerpos se inmovilizan en un relleno cromatográfico en la columna, a través de la cual se hace pasar la muestra que contiene el antígeno, es decir el analito de interés. Éste es capturado y queda retenido en la columna, mientras que el resto de los componentes de la muestra que no son reconocidos por el anticuerpo eluyen sin retenerse. La detección de los compuestos retenidos puede realizarse de diferentes formas, siendo la más usual su elusión con un agente de desorción para medir la respuesta en el detector del cromatógrafo.^{21-25,58}

La CLAE tiene distintas ventajas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. En la cromatografía de gases, la fase móvil se comporta como un gas ideal y no contribuye al proceso de separación; sólo sirve como portador de los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria. Al contrario, el éxito en una separación por cromatografía de líquidos depende de la elección adecuada de los disolventes a emplear en la fase móvil y el tipo de fase estacionaria, que como se mencionó anteriormente, se dispone de un número considerable de posibilidades en la opción de estas lo que permite una mayor gama de mecanismos de separación. Además, los compuestos a ser analizados son disueltos en un líquido orgánico, y la mayor parte de las separaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente y dado que la mayoría de los compuestos orgánicos son no volátiles o térmicamente estables, pueden ser separados sin descomposición o sin la necesidad de sintetizar derivados volátiles. La mayor parte de los análisis farmacéuticos están basados en cromatografía de adsorción y son completados en un tiempo menor de 30 minutos. El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por el factor de capacidad (k') que depende de la naturaleza química del analito, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil, además de la composición y el área de la superficie de la fase estacionaria. La longitud de la columna es determinante de la resolución. Solo compuestos con diferentes factores de capacidad pueden ser separados por CLAE.^{20-25,58}

1.7.1. Equipo.

Un equipo moderno de CLAE dispone de uno o más recipientes de vidrio de una capacidad de 500 a 1000 mL para la fase móvil, una bomba que empuja la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector que introduce la muestra a la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un aparato para recolectar los datos, como una computadora o integrador (Figura.7).^{21-25,58}



Figura. 7. Equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

1. *Sistema de bombeo.* Las micropartículas de las columnas, entre 3 y 10 μm , desarrollan una alta resistencia a la presión durante la operación. Esto acarrea que sea necesario disponer de ciertos requisitos para el sistema de bombeo empleado en CLAE e incluyen: (1) la generación de presiones por arriba de 6000 psi (lbs/in²), (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de flujo de 0.1 a 10 mL/min., (4) simplicidad de operación y reproducibilidad del flujo mejor del 0.5 % relativo y (5) componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón). Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas (que se utilizan en aproximadamente el 90 % de los equipos de CLAE), bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.^{20-25,58}

2. *Inyectores.* A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser pequeños de unas pocas décimas de microlitro y además se debe introducir la muestra sin despresurizar el sistema. Existen dos diseños de inyectores: los de desplazamiento y los de aguja. Ambos pueden ser incorporados a un sistema de inyección manual o automático. Los inyectores de desplazamiento fuerzan la muestra hasta un loop (un tubo de acero inoxidable de diámetro interno pequeño y de volumen fijo, lo que permite inyectar el mismo volumen de muestra), pero presentan baja reproducibilidad cuando están parcialmente llenos. En consecuencia, es necesario cambiar físicamente el loop para cambiar los volúmenes de inyección. Los inyectores de tipo aguja conducen la muestra a través del loop. Este mecanismo puede operar con precisión con un loop parcialmente lleno y es, por lo tanto, más versátil.^{20-25,58}

3. *Columnas.* La columna contiene la fase estacionaria necesaria para la separación deseada. Están construidas con una pared gruesa de acero inoxidable, el interior es liso, de diámetro interno uniforme y el relleno se mantiene con filtros de acero poroso. La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud de 100 a 300 mm., aunque hay más cortas o largas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3, 4 y 10 μm . Tal vez la columna más utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partícula de 5 μm , las cuales tienen de 40000 a 60000 platos/metro. La columna por lo común se mantiene a temperatura ambiente y en algunos sistemas se coloca en un horno cuya temperatura puede regularse. Recientemente, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5 μm . estas columnas tienen hasta 100000 platos/metro y presentan la ventaja de rapidez y mínimo consumo de disolvente. En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la precolumna debe ser

semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión. ^{20-25,58}

4. *Disolventes.* En todas las formas de cromatografía, la calidad y la manipulación de los disolventes a emplear en la preparación de la fase móvil es tan crítica como cualquier parte del sistema cromatográfico. A fin de no degradar costosas columnas de CLAE y minimizar el ruido de fondo en el detector, los disolventes utilizados deben ser muy puros. La primera rutina que se debe llevar a cabo con la fase móvil, antes de introducirlos en el recipiente, es la filtración a vacío con filtros de tamaño de poro de 0.22 a 0.45 μm para eliminar los gases y la materia en suspensión. El tubo de entrada al depósito de los disolventes se protege con un filtro de poro fino el cual retiene partículas de polvo mayores de 2 a 5 μm . Las burbujas que se forman por cambios de presión o por mezclado de ciertos disolventes interfieren en el funcionamiento adecuado de la columna y del detector. En consecuencia, de manera sistemática se eliminan los gases de los disolventes por medio de evacuación, ebullición, ultrasonido o purga con helio (el cual es muy insoluble). Una separación en que se utiliza un solo disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante se denomina una *elución isocrática*. Con frecuencia, la eficiencia de la separación se aumenta notablemente por una *elución por gradiente*. En este caso una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes empleados de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. Los equipos de CLAE se encuentran equipados con unos dispositivos que permiten introducir los disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo. ^{20-25,58}

5. *Detectores.* El detector ideal debe de ser (1) sensible a bajas concentraciones de cualquier analito, (2) dar una respuesta lineal (señal proporcional a la concentración del analito) en un amplio intervalo de concentraciones, (3) de buena estabilidad y reproducibilidad, (4) de baja respuesta a los cambios de temperatura, (4) con un tiempo de respuesta corto y (5) de alta fiabilidad y de manejo sencillo. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los *detectores basados en una propiedad de la disolución*, que responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante

dieléctrica o la densidad, que se modifican por la presencia del analito. Y los *detectores basados en una propiedad del soluto*, que responden a una propiedad del analito, como la absorbancia ultravioleta, fluorescencia o intensidad de difusión. Los sistemas de detección más empleados en CLAE son los de absorbancia ultravioleta-visible, arreglo de diodos, índice de refracción y electroquímicos, pero existen otros detectores que son capaces de proporcionar información estructural, como por ejemplo el espectrómetro de masa.^{20-25,58}

1.8. Cálculo de la concentración de analito (estándares de referencia).

La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber:

- Normalización interna (estandarización interna)
- Estándar externo
- Estándar interno
- Estándar agregado

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia.

El método de la *normalización interna*, llamado también *estandarización interna*, consiste en referir el contenido de analito al total de áreas en el cromatograma. Para ello se suman las áreas de todos los picos presentes (exceptuando al pico que corresponde al solvente) y el contenido de analito en la muestra se calcula con:

$$P_i = \frac{A_i}{\sum A_i} 100$$

Donde P_i es el porcentaje del componente i en la mezcla, A_i es el área del componente i , y $\sum A_i$ es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma. Este método tiene, fundamentalmente, dos ventajas: no requiere estándar de referencia y es muy preciso ya que los errores de inyección y de preparación de la muestra se compensan. En contrapartida tiene varias

limitaciones: en primer lugar, para obtener resultados medianamente exactos es necesario que todos los componentes de la mezcla se separen en el sistema cromatográfico elegido, lo cual no siempre ocurre. Y en segundo lugar se requiere que todos los componentes tengan el mismo factor de respuesta (f_i). Es decir que si trabaja con un detector UV, todas las sustancias deben tener el mismo valor de absorptividad a la longitud de onda elegida. Este caso suele darse pocas veces y habitualmente con familias de compuestos o sustancias que están muy relacionadas. Por este motivo, a pesar de sus ventajas y de su amplia difusión en CG con el detector de llama, este método prácticamente no se utiliza en CLAE.^{20-25,58}

El método de *estándar externo* es, sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en CLAE. Consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. Es decir:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_s} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_s son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. De hecho, la precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones, típicamente tres inyecciones de estándar y dos inyecciones de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestras y estándar o intercalar estándares después de un grupo de unas 5 o 6 muestras.^{20-25,58}

El método de *estándar interno* consiste en agregar cantidades exactamente medidas de sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra. Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra y como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas. Es decir:

$$P = \frac{R_m C_s}{R_s} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno tanto en la muestra y el estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. Este método requiere de patrones de referencia, al igual que el método del estándar externo, por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos. Además requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra
- Debe presentar un área similar al analito
- Debe fluir a un valor de k' cercano al analito
- Debe resolverse completamente ($R \geq 1.5$)
- Debe ser estable y químicamente inerte
- Debe responder de forma semejante al analito con el detector seleccionado

El método del estándar interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de área, y en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra cuando se realiza dilución, extracción y derivatización. La utilidad del estándar interno para compensar los errores de dilución es innegable, a un que en el caso de la derivatización y extracción, los resultados deben manejarse con cuidado por que es posible empeorar los resultados en lugar de mejorarlos. El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado

en CG porque el error de inyección es grande, pero tiene menor sentido en CLAE donde éstos son mucho menores.^{20-25,58}

El método del *estándar agregado* consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la cual se agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_{ms} - A_m} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_{ms} son las áreas del analito tal cual y la muestra a la que se le ha agregado estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. Este método como el del estándar externo, tiene principalmente dos desventajas: requiere el uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios o deformaciones en los picos.^{20-25,58}

1.9. Validación de métodos analíticos.

La validación de los métodos analíticos apareció en la química analítica desde los años 50. La necesidad de evaluar la confiabilidad de un método de cuantificación para asegurar y documentar la calidad de la ejecución analítica, llevó de manera directa al concepto de validación de un método analítico. Se entiende por validación a la evidencia documentada establecida que proporciona un alto grado de confianza que en un proceso específico se obtendrá consistentemente un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados. La validación implica validar el *Sistema de Medición* y el *Método de Medición*, por lo que es necesario definir y diferenciar estos conceptos. El Sistema de Medición, también llamada Técnica de Medición, es el procedimiento donde se asocia la concentración de la sustancia de interés a un valor específico de una propiedad física o

química y en los métodos espectrofotométricos es conocida como curva de calibración. El Método de Medición, consiste en cuantificar la sustancia de interés en un tejido, fluido o lugar. Se deben utilizar, en el estudio de validación, materiales de referencia bien caracterizados con pureza documentada.²¹⁻²⁵

1.9.1. Parámetros de validación de métodos analíticos.

De inicio, proceder a llevar a cabo la calificación de instalación del instrumento de medición, considerando todos aquellos factores mecánicos, eléctricos y electrónicos que pudieran afectar el desempeño del instrumento, a saber:⁵⁹⁻⁶⁵

- Adecuación de la instalación eléctrica.
- Tuberías, conexiones y entradas de servicios.
- Celdas, detectores y potencia de lámparas.
- Estándares de calibración adecuados.
- La adecuabilidad (funcionamiento exacto de los componentes del equipo) se lleva a cabo de acuerdo con lo consignado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª edición, las guías de validación FDA o las especificaciones del fabricante del instrumento.

A. La validación del sistema de medición consiste en determinar la linealidad y precisión. La *precisión* del sistema de medición, es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de la solución patrón. Se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación (CV). Para determinar la precisión del sistema de medición, un analista debe preparar de manera independiente por lo menos seis diluciones a partir de la misma solución patrón, correspondiente al 100 % de lo establecido en la linealidad del sistema de medición y medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición. En este caso el coeficiente de variación debe de ser:

- Sistema de medición cromatográfico < 2 %.
- Sistema de medición químico y espectrofotométrico < 3 %.
- Sistema de medición microbiológico < 5 %.
- En muestras biológicas (como plasma, orina u otra matriz) < 15 %.

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Propiedad medida (y)	Porcentaje del metabolito
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Calcular la suma de la propiedad medida (Σy) y determinar el número de mediciones (n).

$$\Sigma y = \underline{\hspace{2cm}} \qquad n = \underline{\hspace{2cm}}$$

Calcular la media aritmética y la desviación estándar de la propiedad medida con las siguientes ecuaciones:

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y_i}{n} \qquad s = \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{y} - y)^2}{n - 1}}$$

Calcular el coeficiente de variación con:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \cdot 100$$

La *linealidad* del sistema de medición, consiste en determinar si existe relación lineal entre la concentración y una propiedad física, química y/o biológica de la muestra. Para determinar la linealidad de la técnica de medición, un analista debe preparar de manera independiente, por lo menos tres diluciones por duplicado a partir de una solución patrón, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones de medición. ⁵⁹⁻⁶⁵

- La relación entre la concentración y la propiedad medida, debe ser altamente significativa.
- Es recomendable que la ordenada al origen de la regresión lineal simple, concentración y propiedad medida, sea estadísticamente igual a cero.
- El coeficiente de determinación (r^2) de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98.
 - Si el r^2 es $\geq 98.0\%$, el sistema de medición tiene buen ajuste.
 - Si el r^2 es $< 98.0\%$, el sistema de medición tiene falta de ajuste.

En la práctica, se construye una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos cinco diluciones y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar depende del rango de trabajo. ⁵⁹⁻⁶⁵

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Propiedad medida (x)	Cantidad adicionada (y)
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Calcular la suma de la propiedad medida ($\sum x_i$), la suma de cuadrados de la propiedad medida ($\sum x_i^2$), la suma de la cantidad adicionada ($\sum y_i$), la suma de cuadrados de la cantidad adicionada ($\sum y_i^2$), la suma del producto de la propiedad medida por la cantidad adicionada ($\sum x_i y_i$), determinar el numero de cantidades adicionadas (t), el numero de determinaciones por cantidad adicionada (r) y el numero de pares ordenados (n).

Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b), con las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{n (\sum x_i y_i) - (\sum x_i) (\sum y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad b = \frac{\sum y_i}{n} - m \frac{\sum x_i}{n}$$

Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCR), la suma de cuadrados de error de regresión (SCER) y la suma de cuadrados del total (SCT) con las siguientes ecuaciones:

$$SCR = m^2 \left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]$$

$$SCER = \sum y_i^2 - m \sum x_i y_i - b \sum y_i$$

$$SCT = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

El coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{SCR}{SCT} = \frac{SCR}{SCR + SCER} = \frac{m^2 \left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]}{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}$$

- Construir la tabla de análisis de varianza (ANADEVA) con base al siguiente formato y establecer una decisión con forme a la siguiente regla:

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	<hr/> MCR/MCER
Error de regresión	n - 2	SCER	MCER = SCER/n - 2	

- Si la F calculada para la regresión es $>$ a la F de tablas existe una relación lineal significativa entre la cantidad medida y la cantidad adicionada. Hay linealidad del Sistema de Medición.
- Si la F calculada para la regresión es \leq a la F de tablas no existe una relación lineal significativa entre la cantidad medida y la cantidad adicionada. No hay linealidad del Sistema de Medición.

B. La validación del método de medición consiste en determinar la *exactitud*, *la linealidad*, *limite de detección*, *limite de cuantificación*, *la precisión (reproducibilidad y repetibilidad)* y *la estabilidad de la muestra de análisis*.⁵⁹⁻⁶⁵

La *exactitud* del método de medición consiste en determinar si existe concordancia absoluta entre el porcentaje recuperado y el porcentaje adicionado. Para ello se calcula el porcentaje de recobro de al menos diez determinaciones de un mínimo de tres concentraciones diferentes, también es posible realizar la exactitud a un porcentaje definido.

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Cantidad adicionada	Cantidad recuperada
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Para cada cantidad recuperada calcular el *porcentaje recuperado* (y_i) de la siguiente manera.

$$\text{Porcentaje recuperado} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

Calcular la suma del porcentaje recuperado (Σy_i) y el número de determinaciones (n).

$$\Sigma y_i = \underline{\hspace{10em}} \qquad n = \underline{\hspace{10em}}$$

Calcular la media aritmética y la desviación estándar del porcentaje recuperado con las siguientes ecuaciones.

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y_i}{n} \qquad s = \sqrt{\frac{\Sigma (\bar{y} - y)^2}{n - 1}}$$

Al determinar el valor absoluto de la t (t_{calc}) mediante la siguiente ecuación:

$$t_{\text{calc}} = \frac{100 - \bar{y}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)}$$

donde \bar{y} y s son la media aritmética y la desviación estándar del porcentaje recuperado, respectivamente; y el valor de t en tablas al 95 % con $n-1$ grados de libertad, se establece una decisión con base a la siguiente regla:

- Si el valor absoluto de la t_{calc} es mayor o igual al valor de la t de tablas, el método de medición es inexacto.
- Si el valor absoluto de la t_{calc} es menor al valor de la t de tablas, el método de medición es exacto.

La *linealidad* del método de medición es la relación que se establece por medio de una recta, entre una propiedad medible (cantidad recuperada) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada). Para que exista linealidad del método de medición:

- La relación lineal simple cantidad adicionada y cantidad recuperada debe ser altamente significativa, es decir, la F calculada debe ser mayor que la F de tablas.
- El coeficiente de determinación de la relación lineal simple de la cantidad adicionada y cantidad recuperada debe mayor al 98.0 %.

Si la F calculada es mayor que la F de tablas pero el coeficiente de determinación es menor al 98.0 %, hay linealidad pero el método de medición tiene falta de ajuste. Sí y sólo si hay linealidad, independientemente de la falta de ajuste, se puede seguir evaluando la linealidad del método de medición, para ello es necesario revisar el valor de la pendiente y de la ordenada al origen:

- La ordenada al origen de la relación lineal simple cantidad adicionada y cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.
- La pendiente de la relación lineal simple cantidad adicionada y cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a uno.

Cuando la pendiente es diferente de uno, el método de medición tiene error sistemático consistente. Si la ordenada al origen es diferente de cero el método de medición tienen error sistemático constante.⁵⁹⁻⁶⁵

La *linealidad* del método de medición se realiza con placebos adicionados del principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, cuando menos a cinco diferentes concentraciones, incluyendo el 100 %, haciendo los análisis por duplicado de cada concentración. En química clínica es común el uso de muestras biológicas controles y calibradores para establecer la linealidad del método de medición, si calculamos los valores recuperados a partir de la recta de calibración, es posible establecer la linealidad del método de medición si se realiza un análisis de regresión entre los valores calculados y los valores reales de las muestras biológicas controles y/o calibradores.⁵⁹⁻⁶⁵

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Cantidad adicionada (x)	Cantidad recuperada (y)	Total (Ti)
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Calcular la suma de la cantidad adicionada ($\sum x_i$), la suma de cuadrados de la cantidad adicionada ($\sum x_i^2$), la suma de la cantidad recuperada ($\sum y_i$), la suma de cuadrados de la cantidad recuperada ($\sum y_i^2$), la suma del producto de la cantidad adicionada por la cantidad recuperada ($\sum x_i y_i$), la suma de cuadrados de los totales ($\sum T_i^2$) y determinar el número de cantidades adicionadas (t), el numero de determinaciones por cantidad adicionada (r) y el numero de pares ordenados (n).

$$\begin{aligned} \sum x_i &= \underline{\hspace{2cm}} & \sum y_i &= \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum x_i^2 &= \underline{\hspace{2cm}} & \sum y_i^2 &= \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum x_i y_i &= \underline{\hspace{2cm}} & \sum T_i^2 &= \underline{\hspace{2cm}} \\ t &= \underline{\hspace{2cm}} & r &= \underline{\hspace{2cm}} \\ n = tr &= \underline{\hspace{2cm}} \end{aligned}$$

Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b), con las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{n (\sum x_i y_i) - (\sum x_i) (\sum y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \qquad b = \frac{\sum y_i}{n} - m \frac{\sum x_i}{n}$$

Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCR), la suma de cuadrados de error de regresión (SCER) y la suma de cuadrados del total (SCT) con las siguientes ecuaciones:

$$SCR = m^2 \left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]$$

$$SCER = \sum y_i^2 - m \sum x_i y_i - b \sum y_i$$

$$SCT = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

El coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{SCR}{SCT} = \frac{SCR}{SCR + SCER} = \frac{m^2 \left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]}{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}$$

Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCEP) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCFA) con las siguientes ecuaciones.

$$SCEP = \sum y_i^2 - \frac{\sum T_i^2}{r}$$

$$SCFA = SCER - SCEP$$

Donde r = número de replicaciones.

Al construir una tabla de ANADEVIA con el siguiente formato y al determinar los valores de F se establece una decisión con base a la siguiente regla:

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	MCR/MCER
Error de regresión	$n - 1$	SCER	MCER = SCER/ $n - 2$	
Falta de ajuste	$(n - 2) - t(r-t)$	SCFA	MCFA = SCFA/g.I.F.A.	MCFA/MCEP
Error puro	$t(r-1)$	SCEP	MCEP = SCEP/g.I.E.P.	

- Si F calculada para la regresión es \geq que la F de tablas existe una relación lineal significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. Hay linealidad del método de medición.
 - Si F calculada para la regresión es $<$ que la F de tablas no existe una relación lineal significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. No hay linealidad del método de medición.
-
- Si r^2 es \geq a 96.0 %, hay linealidad y el método de medición tiene buen ajuste.
 - Si r^2 es $<$ a 96.0 %, hay que evaluar la F calculada de la falta de ajuste.

Si la F calculada de la falta de ajuste es mayor que la F de tablas, hay linealidad y el método de medición tiene mal ajuste. Si la F calculada de la falta de ajuste es menor que la F de tablas, hay linealidad y el método de medición es impreciso. ⁵⁹⁻⁶⁵

Calcular el intervalo de confianza para la pendiente (I.C.M.) y el intervalo de confianza para la ordenada al origen (I.C.B.) con las siguientes formulas y tomando una decisión con base a la siguiente regla:

$$\text{I.C.M.} = m \pm 1.95 S_m$$

Donde S_m es.

$$S_m = S_{y/x} \left[\frac{1}{(\sum x^2) - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Y el termino $S_{y/x}$ es:

$$S_{y/x} = (\text{MCER})^{1/2} = \left(\frac{\text{SCER}}{n - 2} \right)^{1/2}$$

$$\text{I.C.B.} = b + 1.95S_b$$

Donde S_b es:

$$S_b = S_{y/x} \left[\frac{1}{n} + \frac{\left(\frac{\sum x}{n} \right)^2}{\left(\sum x^2 \right) - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Y el término $S_{y/x}$ es:

$$S_{y/x} = (\text{MCER})^{1/2} = \left(\frac{\text{SCER}}{n - 2} \right)^{1/2}$$

- Si el intervalo para la pendiente abarca el uno el método de medición carece de error sistemático consistente, si el intervalo no abarca uno el método de medición tiene error sistemático consistente.
- Si el intervalo para la ordenada al origen abarca el cero el método de medición carece de error sistemático constante, si el intervalo no abarca cero el método de medición tiene error sistemático constante.

El *límite de detección* del método de medición, es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que bajo las condiciones de operación establecidas, puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Para establecer el límite de detección del método de medición se evalúa la cantidad recuperada de la sustancia de interés, como mínimo a tres

cantidades adicionadas por triplicado y determinando la respuesta de al menos cinco blancos o placebos preparados de manera independiente. ⁵⁹⁻⁶⁵

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Concentración (x)	Propiedad medida (y)
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Blancos

Calcular la suma de la concentración ($\sum x_i$), la suma de cuadrados de la concentración ($\sum x_i^2$), la suma de la propiedad medida ($\sum y_i$), la suma de cuadrados de la propiedad medida ($\sum y_i^2$), la suma del producto de la concentración por la propiedad medida ($\sum x_i y_i$), determinar el número de concentraciones (t), el número de replicas por concentración (r), el número de pares ordenados (n), la suma de los blancos ($\sum Z_i$), la suma de cuadrados de los blancos ($\sum Z_i^2$) y el número de blancos (n').

$\sum x_i =$ _____	$\sum y_i =$ _____
$\sum x_i^2 =$ _____	$\sum y_i^2 =$ _____
$\sum x_i y_i =$ _____	t = _____
r = _____	n = tr = _____
$\sum Z_i =$ _____	$\sum Z_i^2 =$ _____
$n' =$ _____	

Calcular el valor de la pendiente (m).

$$m = \frac{n (\sum x_i y_i) - (\sum x_i) (\sum y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

Calcular la desviación estándar de los blancos (DEb) y calcular el límite de detección (LD), con las siguientes ecuaciones:

$$DEb = \sqrt{\frac{n (\sum Z_i^2) - (\sum Z_i)^2}{n' (n' - 1)}}$$

$$LD = \frac{3 (DEb)}{m}$$

El *límite de cuantificación* del método de medición, es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas. Se evalúa la respuesta de la sustancia de interés a partir del límite de detección. Considerar como mínimo tres diluciones por quintuplicado, partiendo de una misma solución patrón y determinando la respuesta contra dos blancos preparados de manera independiente. La determinación se efectúa por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación.

Procedimiento.

Con los datos de linealidad del sistema de medición (curva de calibración), se determina el valor teórico de la propiedad medida para las diluciones seleccionadas.

Dilución	Valor teórico de la propiedad medida
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Tabular los valores experimentales de la propiedad medida (y_i) que se obtuvieron para cada dilución.

Dilución	Valor experimental de la propiedad medida
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Para cada dilución calcular la suma de los valores experimentales de la propiedad medida (Σy_i) y el número de determinaciones (n).

$$\Sigma y_i = \underline{\hspace{2cm}} \qquad n = \underline{\hspace{2cm}}$$

Calcular para cada dilución la media y la desviación estándar con las siguientes ecuaciones.

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y_i}{n} \qquad s = \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{y} - y)^2}{n - 1}}$$

Determinar el valor absoluto de la t (t_{calc}) mediante la siguiente ecuación:

$$t_{calc} = \frac{V.T. - \bar{y}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)}$$

Donde V.T. es el valor teórico de la propiedad medida correspondiente a la dilución que se evalúa.

Determinar el valor de la t de tablas al 95.0 % con $n-1$ grados de libertad, estableciendo un criterio en base a la siguiente regla:

- Si el valor absoluto de la $t_{\text{calc}} \geq$ al valor de la t de tablas, se concluye que bajo las condiciones de operación establecidas, la concentración estudiada no se cuantifica con exactitud y precisión aceptable.
- Si el valor absoluto de la $t_{\text{calc}} <$ al valor de la t de tablas, se concluye que bajo las condiciones de operación establecidas, la concentración estudiada es cuantificada con exactitud y precisión aceptable.
- El límite de cuantificación será la concentración estudiada más pequeña, que bajo las condiciones de operación establecidas, puede cuantificarse con exactitud y precisión.

La *precisión* de un método de medición es el grado de concordancia relativa entre resultados individuales de una muestra homogénea del producto. La precisión es también una medida del grado de *reproducibilidad* y/o *repetibilidad* del método analítico bajo condiciones normales de operación. La *reproducibilidad* es la concordancia relativa entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de análisis, como diferentes analistas, diferentes días, diferentes equipos, etc. La *repetibilidad* es la concordancia relativa entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de prueba. Para realizar la precisión del método analítico se requiere trabajar de manera independiente, partiendo de una muestra homogénea del producto de preferencia cercana al 100 % de la concentración teórica o a una concentración conocida y realizar por triplicado cada muestra considerando las variables o *factores* que se desean analizar y evaluar. Cada *factor* por analizar debe tener al menos dos niveles o clasificaciones, con estos niveles, se construye una matriz de tratamiento y a partir de ésta se realiza un diseño de experimentos con dos criterios de clasificación. ⁵⁹⁻⁶⁵

MATRIZ DE TRATAMIENTO.

FACTOR 2	FACTOR 1	
	NIVEL 1	NIVEL 2
NIVEL 1	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2

	Resultado n	Resultado n
NIVEL 2	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2

	Resultado n	Resultado n

Una forma común de evaluar la precisión de un método de medición consiste en usar como *factores* de prueba a analistas y días. Para ello, al menos dos analistas con pericia suficiente se les asignan por lo menos dos días para que cuantifiquen como mínimo por triplicado un mismo producto. Con estos factores se tiene la siguiente matriz de tratamientos:

DÍA	ANALISTA	
	1	2
1	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2

	Resultado n	Resultado n
2	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2

	Resultado n	Resultado n

El modelo estadístico para evaluar la precisión del método de medición es:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

Donde:

Y_{ijk} = el k-ésimo resultado realizado por el i-ésimo analista el j-ésimo día.

μ = media general.

A_i = efecto del i-ésimo analista sobre el recobro experimental.

$D_{j(i)}$ = efecto que tiene sobre el recobro experimental el j-ésimo día de un analista dado.

$E_{k(ij)}$ = error experimental.

Procedimiento.

Calcular la suma de los valores para cada analista (y_i), la suma de los valores de la combinación Día-Analista (y_{ij}), la suma total de los datos ($y_{...}$) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ($\sum\sum\sum y_{ijk}^2$).

$$\begin{array}{ll} y_{1..} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{11.} = \underline{\hspace{2cm}} \\ y_{2..} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{12.} = \underline{\hspace{2cm}} \\ y_{...} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{21.} = \underline{\hspace{2cm}} \\ y_{22.} = \underline{\hspace{2cm}} & \sum\sum\sum y_{ijk}^2 = \underline{\hspace{2cm}} \end{array}$$

Anotar el número de analistas (a), días (d) y repeticiones (r).

$$a = \underline{\hspace{2cm}} \quad d = \underline{\hspace{2cm}} \quad r = \underline{\hspace{2cm}}$$

Calcular la suma de cuadrados del analista (SCA_i) con la siguiente ecuación.

$$SCA_i = \frac{\sum y_{i..}^2}{dr} - \frac{y_{..}^2}{adr}$$

Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista ($SCD_{j(i)}$), por medio de la siguiente ecuación.

$$SCD_{j(i)} = \frac{\sum\sum y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{rd}$$

Calcular la suma de cuadrados del error ($SCE_{k(j)}$), con la siguiente ecuación.

$$SCE_{k(j)} = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{r}$$

Con los datos anteriores construir una tabla de ANADEVa con forme al siguiente formato y establecer las decisiones con base a las siguientes reglas:

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Analista	a - 1	SCA _i	MCA _i = SCA _i /a-1	FA _i = MCA _i /MCD _{j(i)}
Día	(d - 1)a	SCD _{j(i)}	MCD _{j(i)} = SCD _{j(i)} /(d-1)a	FD _{j(i)} = MCD _{j(i)} /MCE _{k(ij)}
Error experimental	(k - 1)ad	SCE _{k(ij)}	MCE _{k(ij)} = SCE _{k(ij)} /(k-1)ad	

- Si FA_i ≥ F de tablas. El método analítico no es reproducible por los analistas.
- Si FA_i < F de tablas. El método analítico es reproducible por los analistas.
- Si FD_{j(i)} ≥ F de tablas. El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.
- Si FD_{j(i)} < F de tablas. El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

La variación en el método analítico debido a los analistas se estima de la siguiente manera.

$$\text{Variación interanalista} = \pm \sqrt{\frac{MCA_i - MCD_{j(i)}}{rd}}$$

La variación en el método analítico debido a los días para un mismo analista es:

$$\text{Variación interdías} = \pm \sqrt{\frac{\text{MCD}_{j(i)} - \text{MCE}_{k(ji)}}{r}}$$

La repetibilidad del método analítico se determina, calculando la media general y la desviación estándar total, para finalmente obtener el coeficiente de variación del método analítico que no debe ser mayor al 3 % para métodos analíticos y no mayor del 15 % para métodos bioanalíticos. ⁵⁹⁻⁶⁵

$$\text{Media general} = \mu = \frac{Y_{\dots}}{n}$$

$$\text{Desviación estándar total} = s = \sqrt{\frac{n \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - (Y_{\dots})^2}{n(n-1)}}$$

donde n = (a) (d) (r)

Calcular el coeficiente de variación del método analítico con la siguiente formula.

$$\text{CV} = \frac{s}{\mu} \cdot 100$$

La *estabilidad de la muestra* de análisis del método de medición, consiste en determinar las condiciones donde la muestra para análisis mantiene constante su propiedad medible con respecto al tiempo. En esencia esta prueba consiste en almacenar las muestras para análisis en distintas condiciones de temperatura y luz durante un tiempo definido de antemano y determinar la diferencia en los resultados con respecto a una muestra cuantificada en condiciones óptimas de operación. El procedimiento consiste en analizar por el método analítico, al menos por triplicado, una muestra a una concentración conocida y definida. Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo a temperatura ambiente, refrigeración, congelación, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista. Reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de

operación utilizando una solución patrón recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a la establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista. La muestra es estable si la valoración de las muestras reanalizadas es estadísticamente equivalente a la valoración inicial. ⁵⁹⁻⁶⁵

Hay varias formas para determinar si existe diferencia entre la valoración inicial y cada una de las condiciones de almacenamiento. Es posible usar cualquiera de las siguientes pruebas:

- Prueba t de Dunnett.
- Análisis de varianza de un factor y comparaciones múltiples.
- Prueba de t para dos medias.

Para determinar las condiciones donde la muestra de análisis del método de medición es estable, es necesario realizar los cálculos del análisis de varianza de un factor y las comparaciones contra un control o prueba de t de Dunnett.

Como existen restricciones de cálculo para la t de Dunnett es necesario tener ciertas consideraciones:

- Además del control, se deben ensayar al menos dos condiciones de almacenamiento.
- Tanto control como cada condición de almacenamiento debe analizarse al menos por triplicado.

El modelo estadístico para evaluar la estabilidad de la muestra de análisis del método de medición es:

$$Y_{ij} = \mu + (\tau_i + E_{j(i)})$$

Y_{ij} = el j -ésimo resultado obtenido bajo la i -ésima condición de almacenamiento.

μ = Media general.

τ_i = efecto de la i -ésima condición de almacenamiento.

$E_{j(i)}$ = error experimental.

Tomadas las consideraciones anteriores se procede de la siguiente manera.

- Definir al menos dos condiciones de almacenamiento.
- Realizar el proceso de cuantificación de la muestra en condiciones de trabajo al menos por triplicado.
- Someter por triplicado, muestras de análisis a las diferentes condiciones de almacenamiento.
- Determinar el porcentaje de recobro.
- Tabular los resultados obtenidos.

MUESTRA CONTROL	CONDICIÓN 1	CONDICIÓN 2	CONDICIÓN i
.....Y ₁₁Y ₂₁Y ₃₁Y _{i1}
.....Y ₁₂Y ₂₂Y ₃₂Y _{i2}
.....Y ₁₃Y ₂₃Y ₃₃Y _{i3}
.....Y _{1n_i}Y _{2n_i}Y _{3n_i}Y _{in_i}
SUMA DE VALORES (Y _{1•})	SUMA DE VALORES (Y _{2•})	SUMA DE VALORES (Y _{3•})	SUMA DE VALORES (Y _{i•})

Calcular la suma de los valores para cada condición de almacenamiento (y_{i•}), la suma total de los datos (y_{••}) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ($\sum \sum y_{ij}^2$).

$$\begin{array}{ll}
 y_{1\bullet} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{2\bullet} = \underline{\hspace{2cm}} \\
 y_{3\bullet} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{i\bullet} = \underline{\hspace{2cm}} \\
 y_{\bullet\bullet} = \underline{\hspace{2cm}} & \sum \sum y_{ij}^2 = \underline{\hspace{2cm}}
 \end{array}$$

Determinar el número de tratamientos n = _____, el número de repeticiones para cada tratamiento y el total de repeticiones N = _____.

Determinar los siguientes valores.

$$\frac{\sum y_{i\bullet}^2}{n_i} \qquad \sum \sum y_{ij}^2 \qquad \frac{y_{\bullet\bullet}^2}{N} =$$

Para evaluar el efecto de cada una de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de la muestra se calculan los valores requeridos para la tabla de ANADEVa siguiente:

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Tratamiento τ_i	n - 1	$\frac{\sum y_{i.}^2}{n_i} - \frac{y^2_{..}}{N} = \text{SCT}$	MCT = SCT/n-1	MCT/MCE
Error experimental $E_{j(i)}$	N - n	$\sum \sum y_{ij}^2 - \frac{\sum y_{i.}^2}{n_i} = \text{SCE}$	MCE = SCE/N-n	

SCT = Suma de cuadrados del tratamiento.

MCT = Media de cuadrados del tratamiento.

SCE = Suma de cuadrados del error.

MCE = Media de cuadrados del error.

N = Total de unidades experimentales.

n_i = Número de unidades de la i-ésima nivel del factor.

Con los valores obtenidos concluir de acuerdo a la siguiente regla de decisión:

- Si la F calculada es menor a la F de tablas no se rechaza H_0 (hipótesis nula) y bajo las condiciones de estudio no se existen diferencias significativas entre la muestra de análisis y las diferentes condiciones de almacenamiento.
- Si la F calculada es mayor a la F de tablas se rechaza H_0 (hipótesis nula) y bajo las condiciones de estudio existen diferencias significativas entre la muestra de análisis y al menos una las diferentes condiciones de almacenamiento.

La *robustez* del método de medición consiste en comprobar la confiabilidad de un análisis con respecto a variaciones deliberadas de los parámetros del método. Si las mediciones son susceptibles de variación en condiciones analíticas, éstas deben ser controladas convenientemente o se deben incluir las precauciones en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la robustez debe ser que se establecen una serie de parámetros para

asegurar que la validez del método es mantenida en cualquier modo que se use. En el caso de la cromatografía de líquidos, las variaciones típicas son:⁵⁹⁻⁶⁵

- ⇒ Influencia de las variaciones del pH de la fase móvil.
- ⇒ Influencia de las variaciones de la composición de la fase móvil.
- ⇒ Columnas diferentes (Lotes o proveedores).
- ⇒ Temperatura.
- ⇒ Velocidad de flujo.

1.10. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es probablemente una de las herramientas analíticas de aplicación más general en el sentido que la técnica es capaz de proporcionar información sobre (1) la composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas., (2) las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas, (3) las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras y (4) la estructura y composición de superficies sólidas. Debe señalarse que los pesos atómicos y moleculares en espectrometría de masas, difieren de los utilizados en la mayoría de los otros métodos analíticos, ya que los espectros de masas discriminan entre la masa de los isótopos. En espectrometría de masas los pesos atómicos y moleculares se expresan generalmente en términos de *unidades atómicas de masa* (amu o dalton). La unidad atómica de masa se basa en una escala relativa en la que la referencia es el isótopo del carbono $^{12}_6\text{C}$, al cual se le asigna una masa de exactamente 12 amu. Así el amu se define como 1/12 de la masa de un átomo neutro de $^{12}_6\text{C}$. En espectrometría de masas, se está interesado en la masa exacta y estas se expresan con tres o cuatro decimales, ya que los espectrómetros masas tienen esta precisión. El peso molecular promedio o químico de un compuesto es la suma de los pesos atómicos químicos para los átomos que aparecen en la fórmula del compuesto. Así, por ejemplo el peso molecular químico de CH_4 es $12.01115 + 4 \times 1.00797 = 16.0434$ daltons. Otro término de importancia en espectrometría de masas es la relación *masa/carga* de un ion atómico o molecular, el cual se obtiene dividiendo la masa atómica o molecular de un ion (m)

Comentario [GR13]: Isótopo, una de las dos o más variedades de un átomo que tienen el mismo número atómico, constituyendo por tanto el mismo elemento, pero que difieren en su número másico. Puesto que el número atómico es equivalente al número de protones en el núcleo, y el número másico es la suma total de protones y neutrones en el núcleo, los isótopos del mismo elemento sólo difieren entre ellos en el número de neutrones que contienen.

por el número de cargas (z) que tiene el ion. Debido a que la mayoría de los iones en espectrometría de masas tienen una sola carga, el término *masa/carga* se reduce al término más adecuado de *masa*. Los espectros de masas que se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos y la siguiente fragmentación de las moléculas, que posteriormente se separan en relación a su m/z , constituyen, por lo consiguiente, un gráfico que muestra la abundancia relativa de los iones producidos en el eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se expresa la relación m/z , m en unidades atómicas de masa, dividida por el número de cargas que lleva el ión z , que llegan al detector en un espectrómetro de masas.^{26-28,58}

Por lo tanto, la espectrometría de masas está relacionada con una propiedad fundamental de la materia, a saber, la verdadera composición molecular. Los grupos funcionales de una molécula determinan la fragmentación de ésta de manera que, conociendo la estructura de la molécula, es posible predecir el patrón de fragmentación. Inversamente, conociendo el patrón de fragmentación se puede sugerir una estructura para la molécula original, lo que constituye la información más valiosa de un espectro de masas. En la actualidad la espectrometría de masas con la cromatografía de gases o líquidos, es con toda probabilidad el método más efectivo para la identificación y cuantificación de tóxicos y sus metabolitos.^{26-28,58}

El diagrama de bloques de la figura 8 muestra los componentes principales de un espectrómetro de masas. El *sistema de entrada* permite introducir una muestra representativa pequeña (un μmol o menos) en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío, donde sus componentes se convierten en iones gaseosos.^{26-28,58}

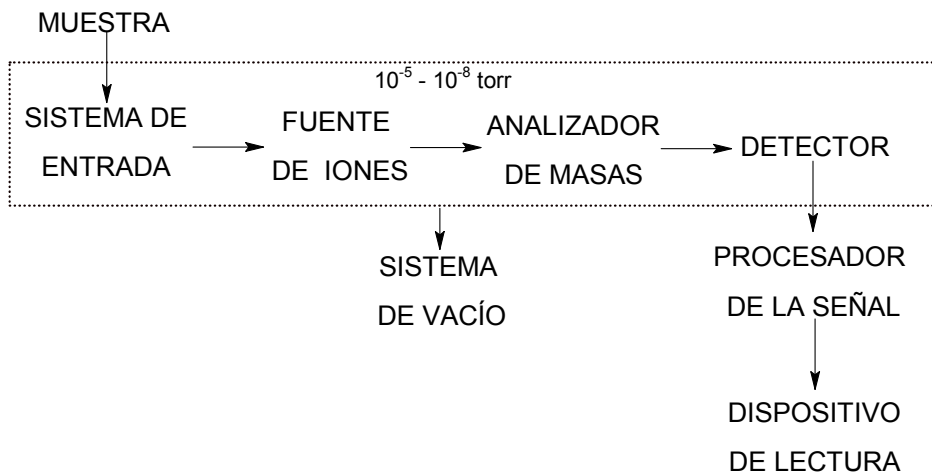
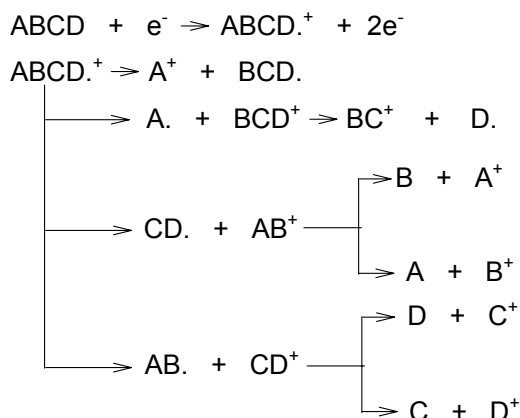


Figura 8. Componentes de un espectrómetro de masas.

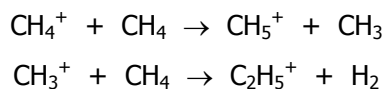
La *fente de iones* de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En muchos equipos actualmente el sistema de entrada y la fuente de iones están combinados en un único componente. Las fuentes de iones se clasifican a menudo en *duras* o *blandas*. La fuente dura más importante es la fuente de impacto de electrones, donde se comunica energía elevada a los iones formados de manera que se encuentran en estados vibracionales y rotacionales excitados. La relajación de estos iones produce una fragmentación elevada y da como resultado espectros de masas complejos. Por el contrario las Fuentes blandas, tales como las fuentes de ionización química, producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que, tiene lugar poca fragmentación y los espectros obtenidos son sencillos. Ambos espectros de masas son útiles; los espectros sencillos de las fuentes blandas permiten la determinación exacta del peso molecular del analito, mientras que los espectros más complejos de las fuentes duras a menudo permiten una identificación inequívoca del mismo. En ambos casos lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que son entonces acelerados en el analizador de masas. A continuación se detalla con un ejemplo la formación de iones en un espectrómetro de masas por impacto de electrones. Las moléculas del analito en la muestra simbolizadas por ABCD son bombardeadas por electrones (impacto de electrones) y se forma su ion molecular representado por $ABCD.^+$, el punto indica que es un

ion radical que tiene el mismo peso molecular que la molécula y este ion formado se fragmenta: ^{26-28,58}

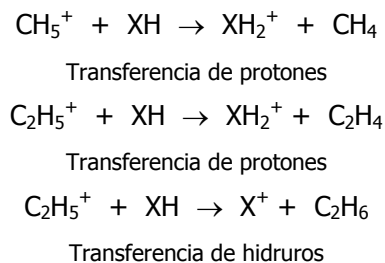


En los espectros de masas el pico correspondiente al ion molecular es de gran importancia en las determinaciones estructurales, debido a que su masa proporciona el peso molecular del analito. Desafortunadamente, no es siempre posible identificar el pico del ion molecular, dado que con ionización por impacto de electrones, ciertas moléculas no dan pico de ion molecular. El pico más grande de un espectro de masas se llama *pico base*, normalmente los picos base en espectros de impacto de electrones corresponden a fragmentos de la molécula y no al ion molecular. Algunos picos resultado de las colisiones ion-molécula, pueden producir picos a masa más elevadas que la del ion molecular. A presiones de muestra ordinarias, sin embargo, la única reacción importante de este tipo es una en la que las colisiones transfieren un átomo de hidrógeno al ion para dar un ion molecular protonado; que da como resultado un pico intenso y de mayor altura $(M+1)^+$. La extensa fragmentación y consecuentemente número de picos es una ventaja que proporciona la fuente de iones por impacto de electrones, debido a que permite identificaciones inequívocas de los analitos. Sin embargo, está fragmentación puede ser también una desventaja cuando da lugar a la desaparición del pico del ion molecular por lo que no se puede establecer el peso molecular del analito. Otra limitación es la necesidad de volatilizar la muestra, lo cual puede dar lugar a una degradación térmica de algunos analitos antes de tener lugar la ionización. ^{26-28,58}

Los espectrómetros de masas modernos están equipados con fuentes de ionización por impacto de electrones y de ionización química intercambiables. En la ionización química las moléculas gaseosas de una muestra se ionizan por colisión con iones producidos por el bombardeo por electrones de un exceso de un gas reactivo. Uno de los reactivos comunes es el metano, que reacciona con electrones de elevada energía para dar varios iones como CH_4^+ , CH_3^+ y CH_2^+ . Los dos primeros predominan y representan alrededor del 90% de los productos de reacción. Estos iones reaccionan rápidamente con moléculas de metano adicionales como sigue:



Generalmente, las colisiones entre la molécula de la muestra XH y CH_5^+ o C_2H_5^+ son muy reactivas e implican transferencia de protones o de hidruro. Por ejemplo:



En las reacciones de transferencia de protones se obtiene el ion $(\text{M}+1)^+$ mientras que la transferencia de hidruros produce un ion con una masa unidad inferior a la del analito o el ion $(\text{M}-1)^+$. Con algunos compuestos, también se encuentra un pico $(\text{M}+29)^+$ que resulta de la transferencia de un ion C_2H_5^+ al analito. Otros reactivos, tales como el propano, isobutano y amoníaco, se utilizan en la ionización química y cada uno de ellos produce un espectro diferente con un analito dado. ^{26-28,58}

Los fragmentos iónicos formados, ya sea por impacto de electrones o ionización química, pasan al *analizador de masas* donde son separados magnéticamente de acuerdo con sus masas moleculares. Para la separación de iones con diversas relaciones masa/carga son posibles varios métodos. Idealmente, un analizador de masas debe distinguir diferencias

pequeñas de masa y permitir el paso de un número suficiente de iones. La capacidad de distinguir entre masas pequeñas se expresa en términos de la resolución R , que se define matemáticamente como:

$$R = m/\Delta m$$

Donde Δm es la diferencia entre dos picos adyacentes que están resueltos y m es la masa nominal del primer pico (a veces se utiliza la masa media de los dos picos). Dos picos se consideran que están separados si la altura del valle entre ellos no es más que un porcentaje de su altura (a menudo un 10%). Así, un espectrómetro con una resolución de 4000 podrá resolver picos que tengan valores de m/z de 400.0 y 400.1. La resolución que se necesita en un espectrómetro de masas depende en gran parte de su aplicación. Por ejemplo para diferenciar iones de la misma masa nominal tales como $C_2H_4^+$, CH_2N^+ , N_2^+ y CO^+ (todos ellos con 28 daltons de masa nominal pero con masas exactas de 28.0313, 28.0187, 28.0061 y 27.9949 daltons respectivamente) se necesita un instrumento con una resolución de varios miles. Por otro lado, los iones que difieren en una unidad de masa o más, como NH_3^+ ($m = 17$) y CH_4^+ ($m = 16$), pueden distinguirse con un instrumento que tenga una resolución inferior a 50. Comercialmente se dispone de espectros de masas con resoluciones de 500 a 500 000. Entre los distintos analizadores de masas disponibles a continuación expondremos brevemente los más utilizados.^{26-28,58}

1.10.1. Espectrómetro de masas de cuadrupolo.

La figura 9 muestra un espectrómetro de masas de cuadrupolo conectado a una columna tubular abierta de un cromatógrafo, que registra el espectro de masas de los picos a medida que se eluyen. Los eluatos pasan a través de un conector caliente a una cámara de ionización de impacto del espectrómetro, conectada a una bomba que la mantiene a un vacío elevado. Los iones son acelerados a través de un potencial de 5-15 V antes de penetrar en el separador de masas de cuadrupolo.²⁶⁻²⁸

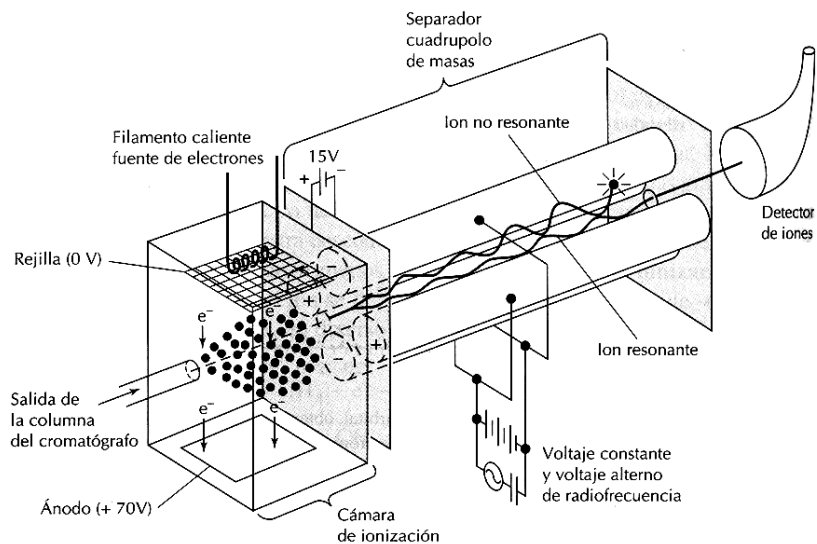


Figura 9. Espectrómetro de masa de cuadrupolo.

El separador consiste de cuatro barras cilíndricas metálicas paralelas. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa. Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180 grados. Las barras cilíndricas son normalmente de 6 mm de diámetro y raramente tienen más de 15 cm de longitud. Están sujetas rígidamente sobre soportes cerámicos construidos con precisión que proporcionan una buena estabilidad mecánica aunque cambie la temperatura. Para entender la trayectoria de los iones en un cuadrupolo es necesario considerar el efecto de los potenciales de corriente continua y de corriente alterna que tienen sobre los iones durante su paso a través de las barras. Para empezar, se considera que en el par de barras positivas en ausencia de un potencial de corriente continua, los iones tendrán a converger en el centro del canal durante la parte positiva del ciclo de corriente alterna y a diverger durante la mitad negativa. Si durante la mitad negativa del ciclo un ion choca contra la barra, la carga positiva se neutralizará y la molécula resultante se extraerá. Que un ion positivo choque o no contra la barra depende de la velocidad de movimiento de los iones, su relación m/z y la frecuencia y la magnitud de la señal de corriente alterna. Si se considera ahora el efecto del potencial positivo de corriente continua que se superpone a la señal de corriente alterna. Si un ion en el canal es pesado y/o la frecuencia del potencial de corriente alterna es elevada, el ion no

responderá significativamente al potencial alterno y estará influido en gran parte por el potencial de corriente continua. En estas circunstancias, el ion tenderá a permanecer en el espacio entre las barras. Por el contrario, si el ion es ligero y/o la frecuencia es baja, puede chocar con las barras y ser eliminado durante el recorrido negativo de la señal de corriente alterna. Así, el par de barras positivas constituye un filtro de paso de masas elevadas para iones positivos. En el par de barras que se mantienen a un potencial negativo. En ausencia de potencial de corriente alterna, todos los iones positivos tendrán hacer atraídos por las barras donde serán eliminados. Para los iones ligeros, sin embargo, este movimiento puede ser contrareestado por el recorrido positivo del potencial de corriente alterna. Así, estas barras operan como un filtro de paso de masas bajas. Para que un ion atraviese el cuadrupolo hasta el detector debe tener una trayectoria estable, lo que implica que debe ser lo suficientemente pesado para no ser eliminado por el filtro de paso de masa elevada y lo suficientemente ligero para no ser eliminado por el filtro de masa baja. Por lo consiguiente, ajustando los potenciales de corriente continua y alterna se puede seleccionar un intervalo limitado de valores de m/z transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral. Todos los otros iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin carga.^{26-28,58}

1.10.2. Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

En este instrumento los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Estos impulsos tienen normalmente una frecuencia de 10 a 50 kHz y un tiempo de vida de 0.25 μ s. Los iones producidos de esta manera son acelerados por un impulso de campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V que tiene la misma frecuencia, pero retrasada, que el impulso de ionización. Las partículas aceleradas pasan entonces a un *tubo analizador* de un metro de longitud sobre el que no actúa ningún campo (Figura 10). Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo típico están entre 1 y 30 μ s. El espectro de masas representa la corriente del detector en función del tiempo.^{26-28,58}

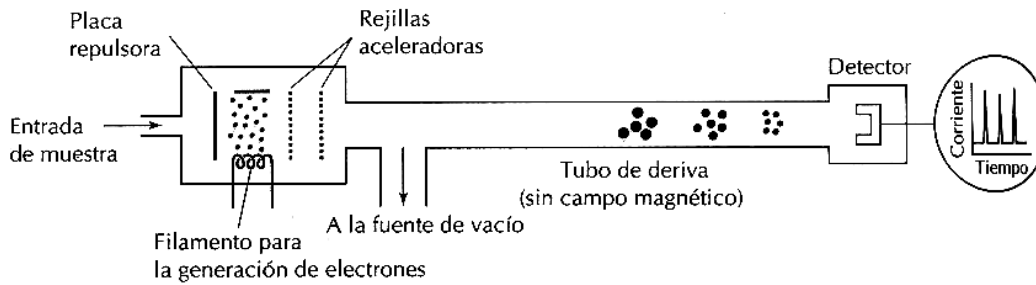


Figura 10. Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

1.10.3. Espectrómetro de masas de trampa iónica.

El espectrómetro de masas de trampa iónica, que se representa en la figura 11 que ha sido desarrollado para cromatografía de gases, es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Como se ve en el diagrama esquemático, los eluatos penetran en la cavidad del analizador desde la parte inferior izquierda a través de un conducto caliente. Un electrodo tipo puerta admite periódicamente electrones procedentes de un filamento, situado en la parte superior, dejándolos pasar a la cavidad a través de los orificios de una tapa situada en un extremo. El impacto producido por los electrones ioniza las moléculas del eluato que se encuentran en la cavidad. O bien, se puede producir una ionización química añadiendo a la cavidad un reactivo gaseoso como metano. Aplicando un voltaje oscilante de radiofrecuencia al electrodo central se obliga a que los iones, con un valor apropiado de m/z , circulen en una órbita estable dentro de la cavidad. Al aplicar un campo de radiofrecuencia entre las placas situadas en los extremos se expulsa los iones que tienen un valor determinado de m/z , imponiéndoles trayectorias inestables que les obliga a pasar a través de los orificios de las tapas. Los iones que pasan por los orificios de la tapa inferior son capturados por un fotomultiplicador y finalmente son detectados con gran sensibilidad. ^{26-28,58}

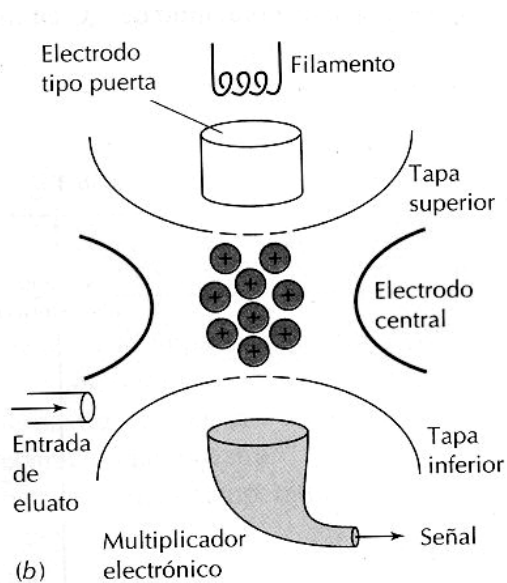


Figura 11. Espectrómetro de masas de trampa iónica.

Los espectrómetros de masas de cuadrupolo son normalmente compactos, baratos y robustos. También ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido bajos (esto es < 100 ms), lo que es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real; por lo consiguiente son los de utilización más frecuente. Los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo, desde el punto de vista de la resolución y reproducibilidad, no son tan satisfactorios como los de cuadrupolo. Sin embargo, algunas ventajas compensan parcialmente estas limitaciones como son la simplicidad y la robustez, el fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas. Los espectrómetros de trampa iónica son robustos, compactos y más económicos que los instrumentos de cuadrupolo. Este instrumento es capaz de resolver iones que difieren en una unidad de masa en el intervalo de masas de 500 a 1000.^{26-28,58}

Comercialmente son asequibles varios tipos de *detectores* para espectrómetros de masas. El multiplicador de electrones de dínodos diseñado para la detección de iones positivos es el detector de elección. Este detector es muy parecido al detector fotomultiplicador utilizado para la radiación ultravioleta-visible; cada dínodo se mantiene a un potencial más alto que el anterior. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de Cu/Be de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. Se pueden

adquirir multiplicadores de electrones con 20 dínodos, que proporcionan una ganancia de corriente de 10^7 . En general, los multiplicadores de electrones son robustos, seguros y capaces de suministrar ganancias de corriente elevadas y tiempos de respuesta de nanosegundos. ^{26-28,58}

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, si bien la fragmentación de la molécula puede ayudar en gran medida a la identificación del compuesto. Además, el estudio de los modelos de fragmentación que se pone de manifiesto en el espectro de masas a menudo proporciona información sobre la presencia de varios grupos funcionales. Finalmente, la identidad real de un compuesto puede establecerse a menudo por comparación de su espectro de masas con los de compuestos conocidos hasta llegar a una total coincidencia. Para aquellos compuestos que dan el ion molecular o un ion molecular protonado, el espectrómetro de masas es una herramienta insuperable para la determinación del peso y/o fórmula molecular. Esta determinación, requiere la identificación del pico del ion molecular o en algunos casos el pico $(M+1)^+$ o $(M-1)^+$. La localización del pico en la abscisa da entonces el peso molecular con una precisión que no puede alcanzarse por ningún otro método. Su campo de interés abarca todas las áreas donde sea preciso la identificación de compuestos: química orgánica, inorgánica, bioquímica, química agrícola, tecnología de los alimentos, medicina, etc. Las aplicaciones analíticas de la espectrometría de masas son muy variadas y las más prometedoras son: ^{26-28,58}

- A. Elucidación estructural de moléculas orgánicas.
- B. Identificación y análisis cualitativo y cuantitativo de picomoles de analitos sólidos, líquidos y gaseosos en estado puro o en mezclas complejas (previa separación cromatográfica, p. e., por CG o CLAE).
- C. Identificación, detección y cuantificación de trazas.
- D. Metabolismo de los fármacos.
- E. Química forense.
- F. Estudios de contaminación del medio ambiente (análisis de aguas superficiales, potables y residuales, detección de pesticidas, herbicidas e insecticidas, detección de surfactantes, detección de colorantes azo sulfonatos).

- G. Caracterización de aromas, de proteínas, de vinos, de polímeros, de lacas, de pinturas, de ceras, análisis de péptidos, proteínas y nucleótidos.
- H. Análisis de procesos industriales, control de calidad de productos en química fina e industria farmacéutica.
- I. Análisis isotópico en Hidrología, Meteorología, Geología, Geocronología y Geoquímica, Paleoclimatología, Agricultura y Alimentación, Medio Ambiente; Biomedicina, e Industria Nuclear.

1.11. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas.

Los espectrómetros de masas se pueden acoplar a la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, lo cual permite obtener información cualitativa y cuantitativa de los componentes de una mezcla. El espectro puede ser muy selectivo de los analitos que interesan. Esta selectividad facilita las exigencias de la preparación de la muestra o la separación cromatográfica completa de los componentes de la muestra. Cuando se trabaja en un modo que es muy selectivo de un analito determinado, el espectrómetro de masas disminuye la relación señal-ruido en análisis cuantitativo y aumenta el límite de detección del analito. El mayor problema a resolver en el desarrollo de ambos métodos acoplados es que en la cromatografía de líquidos se opera a alta presión, temperatura próxima a la ambiente y flujos de líquido relativamente altos, mientras que la espectrometría de masas opera con gases en un alto vacío y a temperatura elevada. Además, cuando se usa espectrometría de masas se deben evitar los aditivos no volátiles en la fase móvil (como el amortiguador de fosfatos). Esta falta de compatibilidad se concreta en tres problemas que hay que resolver para poder usar este acoplamiento:^{26-28,58}

- A. Flujo de la fase móvil.
- B. Carácter de la fase móvil.
- C. Características de los compuestos eluidos.

Estos problemas se han tratado de resolver por medio de diferentes interfases; como las interfases de introducción, en las que se pretende eliminar la fase móvil de forma que la muestra llegue a la cámara de ionización en condiciones que permitan registrar su espectro mediante impacto de electrones o las interfases de introducción e ionización, en estas se intenta conseguir una ionización suave de la muestra, sin pretender eliminar por completo la fase móvil que se utiliza a veces en el proceso de ionización.^{26-28,58}

De los muchos métodos que se han utilizado para introducir el eluato de una columna cromatográfica en el entorno de alto vacío de un espectrómetro de masas, los más frecuentes son *ionización química a presión atmosférica* y *electronebulización asistida con un gas*. La ionización química produce iones gaseosos a partir de moléculas neutras de analito que hay en la disolución. La electronebulización pasa los iones preexistentes en la disolución a fase gaseosa, pero no crea nuevos iones.^{26-28,58}

La ionización química a presión atmosférica utiliza calefacción y un flujo coaxial de nitrógeno (N₂) convirtiendo el eluato en una nube fina de aerosol de la que se evapora el disolvente (Figura 12). Esta técnica es probablemente el acoplamiento (interfase) más versátil entre la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas, por que es aplicable a muchos tipos de analito y puede aceptar flujos convencionales en cromatografía de hasta 2 mL/min. Por lo general, para que el analito (M) pueda ser observado, debe ser capaz de formar el ión protonado (M+H)⁺. Normalmente, existe poca fragmentación de iones en un espectro de masas obtenido mediante ionización química a presión atmosférica. Los espectros son fáciles de interpretar, pero dan poca información estructural, fuera del peso molecular. Los analitos inestables se podrían descomponer a una temperatura de 125°C en el aerosol.^{26-28,58}

Comentario [AAV14]: Coloide , suspensión de partículas diminutas de una sustancia, llamada fase dispersada, en otra fase, llamada fase continua, o medio de dispersión.

Tanto la fase dispersada, como el medio de suspensión pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos, aunque la dispersión de un gas en otro no se conoce como dispersión coloidal. Un aerosol es una dispersión coloidal de un sólido en un gas (como el humo de un cigarro) o de un líquido en un gas (como un insecticida en spray)

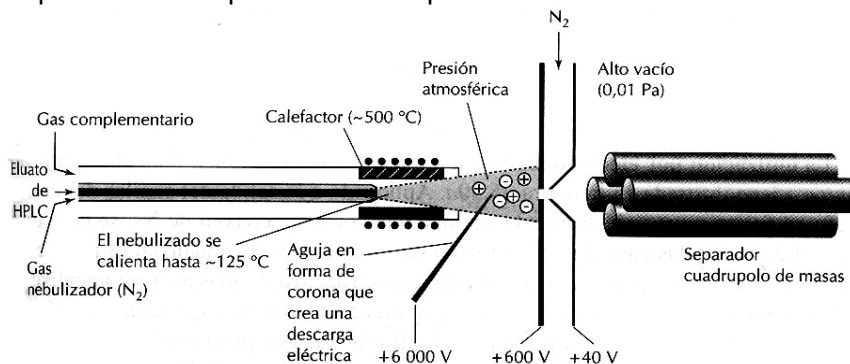
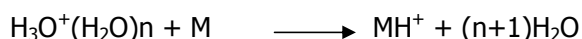
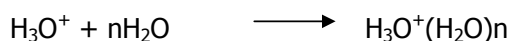
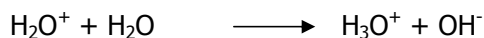
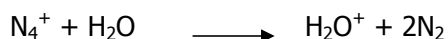
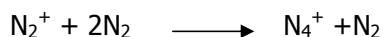
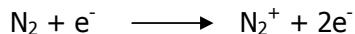
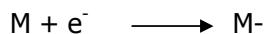


Figura 12. Ionización a presión atmosférica.

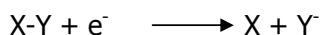
En la ionización química a presión atmosférica, una carga corona de alto voltaje, aplicada a una aguja, inyecta electrones en el aerosol donde puede desencadenar una serie de reacciones químicas, en las que se forman cationes y aniones. El analito protonado $(M+H)^+$ se puede formar de la siguiente manera: ^{26-28,58}



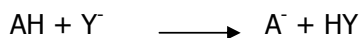
El analito M podría formar un anión por captura electrónica:



Una molécula (X-Y) en el eluato podría dar origen a aniones mediante reacciones como:



La especie Y^- podría sustraer un protón de un analito débilmente ácido, AH:



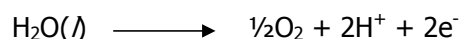
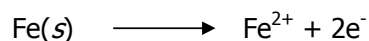
La ionización por electronebulización (*electrospray*), también llamada nebulización iónica, se encuentra ilustrada en la figura 13. Se aplica a la salida del capilar del cromatógrafo un fuerte campo eléctrico a la vez que una corriente coaxial de N_2 crean un fino aerosol de partículas cargadas. Los iones que eventualmente se vaporizan a partir de las gotitas de aerosol ya estaban presentes en la disolución que pasa por la columna cromatográfica. El aerosol estará cargado positivamente, si el potencial del capilar es positivo respecto a la entrada del espectro de masas. Y es negativo, si el voltaje del capilar es negativo. Por ejemplo, se

pueden observar bases protonadas (BH^+) y ácidos ionizados (A^-) mediante el ajustar del pH del eluyente para favorecer BH^+ o A^- según se desee. Se forman otros iones en fase gaseosa por reacción entre el analito M (que podría ser neutro o cargado) e iones estables que ya hubiera en la disolución. Se pueden citar como ejemplos:^{26-28,58}



Como ocurre en la ionización química a la presión atmosférica, se produce poca fragmentación de analito y los espectros de masas son muy simples.^{26-28,58}

La figura 13a proporciona con mayor detalle el proceso de ionización. El voltaje impuesto al eluato a la salida del capilar metálico crea un exceso de carga en el líquido por reacciones redox. Si el capilar está polarizado positivamente (como se indica en la figura 13b), la oxidación que tiene lugar en la salida enriquece el líquido en cationes. Por ejemplo, se puede oxidar el capilar de acero o el agua del disolvente:^{26-28,58}



Los electrones procedentes de la oxidación circulan a través del circuito externo y, eventualmente, neutralizan cationes gaseosos a la entrada del espectro de masas.^{26-28,58}

El líquido cargado que sale del capilar forma un cono, y luego un hilo fino que finalmente se rompe en una nube de gotitas muy finas. Las gotitas se reducen a un diámetro de ~ 1 μm por evaporación del disolvente, hasta que las fuerzas repulsivas de las cargas en exceso igualan las fuerzas de cohesión debida a la tensión superficial. En este punto, las gotitas empiezan a romperse en diminutas partículas de diámetros del orden de 10 nm. Los iones gaseosos se forman eventualmente a partir de esas minúsculas partículas.^{26-28,58}

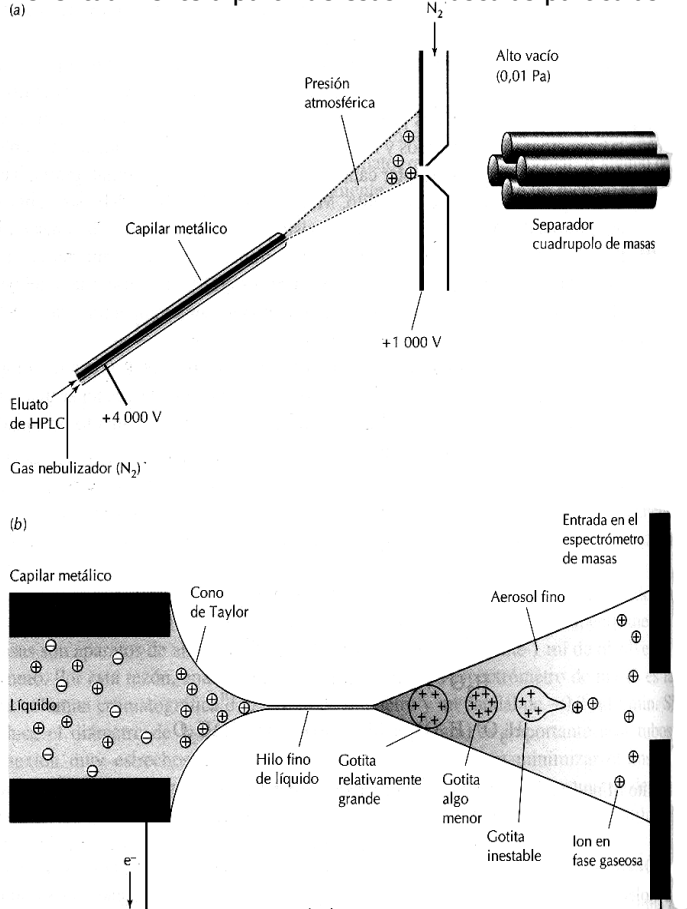


Figura 13. Electronebulización.

1.12. Detección selectiva con un espectrómetro de masas.

El modo más simple de usar un espectro de masas como detector cromatográfico es mediante la corriente iónica total de todos los iones que llegan al detector. De esta manera un espectro de masas, simplemente, detecta todo lo que puede ser ionizado procedente de la muestra que viene de la columna. O bien, el espectro puede ser selectivo mediante la corriente iónica de una masa determinada. La selectividad y la relación señal-ruido se pueden

mejorar aún más mediante el acoplamiento de un espectrómetro de masas a otro. En este instrumento el primer espectrómetro sirve para aislar los iones moleculares de varios componentes de una muestra. Estos iones se introducen entonces uno detrás de otro en un segundo espectrómetro de masas. Esta técnica se llama *espectrometría de masas en tándem* (a menudo abreviada como EM-tandem). El primer espectrómetro en un instrumento en tándem está normalmente equipado con una fuente de ionización suave (a menudo una fuente de ionización química) para que la salida de iones sea predominantemente de iones moleculares o iones moleculares protonados. Estos iones pasan entonces a la fuente de ionización del segundo espectrómetro. Normalmente esta segunda fuente de iones consiste en una cámara de colisiones sin campo en la que se bombea helio, nitrógeno o argón. Las colisiones entre los iones progenitores de movimiento rápido y los átomos del gas reactante producen la fragmentación de los primeros iones dando numerosos iones denominados iones hijos. El espectro de estos iones hijos se efectúa entonces por el segundo espectrómetro. Este proceso se muestra en la figura 14 con un espectrómetro de cuadrupolo doble de masas. La mezcla de iones entra en el cuadrupolo Q1, que deja pasar iones precursores de una masa dada a una segunda fase Q2. La segunda fase deja pasar todos los iones producto de determinada masa a la tercera fase Q3 de separación. En Q2 se encuentra una celda de colisión que está llena de helio, nitrógeno o argón. El ión precursor seleccionado por Q1 choca con átomos del gas reactante con suficiente energía para romperse en fragmentos llamados iones producto. El cuadrupolo Q3 selecciona sólo una clase de iones producto que son los que llegan al detector. La espectrometría de masas tándem es extraordinariamente selectiva respecto al analito de interés.^{26-28,58}

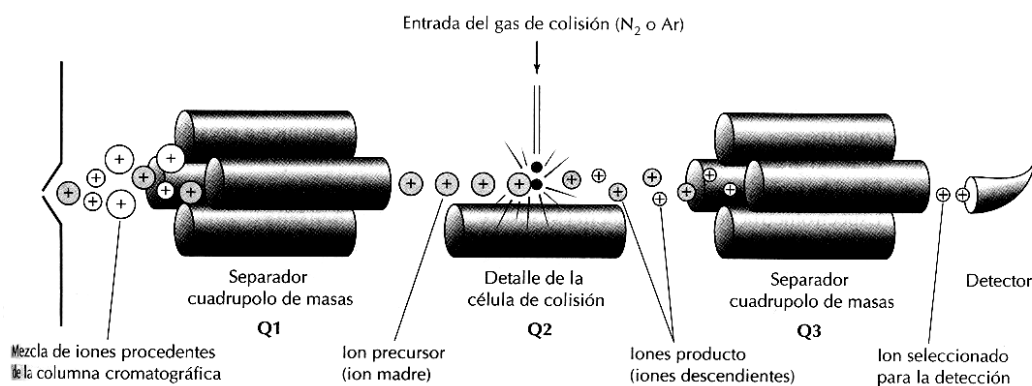


Figura 14. Fundamento de la espectrometría de masas tándem.

El gran avance en el análisis de mezclas complejas orgánicas y biológicas se inició cuando los espectrómetros de masas se combinaron primero con un cromatógrafo de gases y después con la cromatografía de líquidos. La espectrometría de masas en tándem parece ofrecer las mismas ventajas que la CG/EM y CL/EM pero es significativamente más rápida. Mientras que las separaciones en una columna cromatográfica se alcanzan en una escala de tiempo de unos pocos minutos, en el primero de los dos espectrómetros de masas se completan separaciones igualmente satisfactorias en milisegundos. Además, las técnicas cromatográficas requieren la dilución de la muestra con un gran exceso de fase móvil y la siguiente eliminación de la fase móvil, lo que aumenta mucho la probabilidad de introducir interferencias. Como consecuencia la espectrometría de masas en tándem es potencialmente más sensible que cualquiera de las otras dos técnicas cromatográficas acopladas, ya que el ruido asociado con su uso es generalmente menor. Una desventaja de la espectrometría de masas en tándem con respecto a los otros dos procedimientos cromatográficos es el costo del equipo requerido.^{26-28,58}

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.1. Estabilidad de la dietilamida del ácido lisérgico.

Con respecto a la estabilidad del LSD en solución y en muestras biológicas, lo descrito en la literatura científica no es consistente y esto ha provocado una incertidumbre de cómo deben manejarse y almacenarse estas muestras. No obstante, Reuschel y col.²⁹ se enfocaron a la estabilidad del LSD y encontraron que las concentraciones de LSD en muestras de orina, almacenadas en frascos de polietileno de alta densidad a temperatura ambiente y expuestas a la incandescencia normal de la luz del sol en el laboratorio no varían más del 10 % en un periodo de cuatro semanas; las concentraciones de LSD en muestras de orina almacenadas en frascos de vidrio y expuestas a la incandescencia normal de la luz del sol en el laboratorio varían un 10 % en un periodo de 13 h y reportaron que el LSD es estable en orina a -4 °C por cuatro semanas, a -16 °C por 45 días y a -20 °C por tres meses en muestras protegidas de la luz. Así mismo, las concentraciones de LSD en orina no cambiaron significativamente cuando se almacenaron a 25 °C por cuatro semanas en contenedores de vidrio ámbar o de polietileno no transparente; pero existió una pérdida de un 30 % de LSD a 37 °C y un 40 % a 45 °C, en los mismos contenedores y por el mismo periodo. Además, se debe evitar la presencia de cationes metálicos, como el Fe^{3+} , el cual es capaz de catalizar la descomposición del LSD en soluciones amortiguadoras y en orina. La isomerización de LSD a *iso*-LSD puede ocurrir en alcohol a 0 °C. Por esta razón, las soluciones stock de LSD deben prepararse en acetonitrilo (ACN) antes que en metanol (CH_3OH) o agua (H_2O).

Comentario [AAV15]: líquido excretado por los riñones a través de las vías urinarias, con el cual se eliminan sustancias innecesarias para el organismo. Desempeña un papel importante en la regulación del balance de líquidos y electrolitos y del equilibrio entre ácidos y bases. Tiene un pH de 6.0.

Comentario [AAV16]: Polímero de etileno. Es uno de los materiales plásticos de mayor producción. Se distinguen varios tipos de polietilenos: de baja densidad, de alta densidad y lineales de baja densidad.

Skopp G. y col.³⁰ evaluaron la estabilidad del LSD, *nor*-LSD y O-H-LSD en orina, analizando las muestras por CLAE-EM-tándem. La estabilidad se evaluó en una alícuota de 2.5 mL de orina libre de droga a un pH = 6.5, en un vial de vidrio Tipo I cubierto con aluminio y con tapa de teflón, a la cual se añadió una alícuota del analito correspondiente a una concentración final de 5000 pg/mL y se almacenaron a -20 °C, 4 °C y 22 °C por siete días protegidos de la luz. Dos series más fueron almacenadas, una a 40 °C protegida de la luz y otra a 22 °C expuesta a la luz natural en una ventana, ambas por tres días. Cada experimento se realizó por triplicado y a cada muestra se le realizó una extracción en fase sólida (EFS) y fueron analizadas dos veces por CLAE-EM-tándem. Los resultados finales

Comentario [AAV17]: Es el politetrafluoretileno ($-\text{CF}_2=\text{CF}_2-$), resistente al calor y a los agentes químicos. Es un plástico resistente al calor (300 °C) y presenta una inercia química extraordinaria a todos los disolventes y agentes químicos. Frente al agua presenta una resistencia completa y una absorción absolutamente nula. El teflón es incombustible, no inflamable, antiadherente y no absorbe olores ni sabores. Además presenta resistencia total a los rayos ultravioletas.

indicaron que todas las muestras almacenadas a -20 °C son estables por el periodo establecido, mientras que en las muestras almacenadas a 40 °C las concentraciones de los analitos (LSD, *nor*-LSD y O-H-LSD) indiscutiblemente disminuyen. A 4 °C y 22 °C son estables solo por tres días. Con las muestras expuestas a la luz natural en la ventana las concentraciones de los analitos disminuyeron rápidamente y después de un día de almacenamiento, la concentración del LSD se redujo en aproximadamente un 3 % de la concentración, mientras que las concentraciones de *nor*-LSD y O-H-LSD disminuyeron a un 21 % y 69 % de su concentración inicial, respectivamente. La importancia relevante de estos resultados, es que se encontró que el O-H-LSD es el analito con una estabilidad similar o inclusive mejor a la del LSD; y que junto con las altas concentraciones determinadas en orina, se facilita la determinación del uso LSD, mediante el análisis del O-H-LSD.

2.2. Métodos analíticos para la determinación de LSD y algunos de sus metabolitos.

La determinación y cuantificación del LSD en orina es todo un reto para la química analítica, debido a varios factores, entre los que destacan: (1) las dosis administradas de esta droga alucinógena son bajas (típicamente entre los 20 a 150 µg), (2) es ampliamente metabolizada y menos del 1 % de la droga se excreta sin biotransformación, (3) posee un tiempo de vida media relativamente corta de 3.6 horas y (4) su estabilidad limitada a las temperaturas altas o la luz. En conjunto, estos factores contribuyen a que la droga posea un tiempo de detección corta de 12 a 22 h, cuando se usa al LSD como analito blanco. Actualmente, se han desarrollado un gran número de métodos para la determinación y cuantificación de LSD a concentraciones bajas o mediante uno de sus metabolitos que se excrete en orina en concentraciones altas por un periodo más largo de tiempo. Afortunadamente, progresos significativos se han logrado en ambas áreas y cada uno de estos métodos presenta sus respectivas ventajas o desventajas con respecto a la sensibilidad, precisión y/o su simplicidad de uso.^{28,31-32}

Entre los métodos disponibles, debemos mencionar primero las pruebas presuntivas o de "screening", que básicamente se basan en inmunoanálisis en sus distintas variantes. Entre los métodos confirmatorios podemos citar la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia (CLAE-DF), la Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas o Espectrometría de masas en tándem (CG-EM o CG-EM-tándem), la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de Masas o Espectrometría de masas en tándem (CLAE-EM o CLAE-EM-tándem) y en la actualidad la Electroforesis Capilar con Detector de Fluorescencia Inducida por Láser.^{28,31-32,56-57}

Durante el periodo que abarca esta revisión (1985-2002) se han realizado importantes avances en el desarrollo de los métodos cromatográficos y en la espectrometría de masas para la detección y cuantificación de LSD y algunos de sus metabolitos en distintas matrices biológicas. Los métodos basados en CG-EM o CG-EM-tándem continúan siendo de gran uso y de constante desarrollo, principalmente por que estos instrumentos se encuentran ampliamente disponibles en los laboratorios de toxicología. No obstante, el empleo de la CLAE-EM o CLAE-EM-tándem se ha incrementado en los últimos años, esto debido a las mejoras en la técnica y a la disminución de precio de tales instrumentos. A continuación se presentan dos tablas con un resumen de los principales métodos existentes; en la tabla 1 se resumen los principales métodos por CG-EM o CG-EM-tándem y en la tabla 2 se resumen los principales métodos por CL-EM o CL-EM-tándem.^{28,31-32}

Tabla 1. Resumen de los principales métodos por CG-EM o CG-EM-tándem para el análisis de LSD y algunos de sus metabolitos.

Condiciones cromatográficas									
Ref.	Analito y Matriz	Tipo de extracción	Columna y/o Programa de temperatura	Gas y velocidad de flujo	Condiciones del espectro de masas	Límite de detección	Límite de cuantificación	Ventajas	Desventajas
42	LSD Orina	Cloruro de sodio/Cloruro de n-butil	15 m X 0.25 mm D.I. Temperatura inicial de 190 °C, que se incrementa a 290 °C a 20 °C/min. y es mantenida por 3 min.	Helio (1.26 mL/min.)	EM: Modalidad de impacto electrónico a 70 eV a una temperatura de 200-250 °C y en monitoreo selectivo de iones.	29 pg/mL	N/R	En el método se determino la linealidad, la precisión y el recobro	No se reporta el límite de cuantificación y algunos parámetros de la validación se omitieron
43	LSD iso-LSD nor-LSD Orina y Sangre	Tolueno/Cloruro de metileno (7:3 v/v)	12 m X 0.20 mm D.I., 0.33µm. Temperatura inicial de 175°C (por 0.8 min.), que se incrementa a 298°C (por 3-5 min.) a 19 °C/min.	Hidrógeno (67 cm/s)	EM/EM: Ionización química con amoniaco como gas reactante, a una temperatura de 150 °C, en Q2 con Argon, presión de 30-40 % y un voltaje de 45 eV.	10 pg/mL LSD ^a 10 pg/mL iso-LSD ^a 100 pg/mL nor-LSD ^a	20 pg/mL LSD ^a 25 pg/mL iso-LSD ^a 400 pg/mL nor-LSD ^a 50 pg/mL no-LSD ^b	Un método prometedor para el análisis de trazas de LSD, iso-LSD y nor-LSD en orina y sangre	Bajos niveles de recobro y poca información respecto a la validación
44	LSD Suero	Cloruro de n-butil/Ciclohexano (1:1)	30 m X 0.25 mm D.I., 0.25 µm. Temperatura inicial a 150 °C por 2 min. y incrementa a 290 °C por 25 min. A 30 °C/min.	N/E	EM: Modalidad de monitoreo selectivo de iones.	N/R	N/R	Un método simple y rápido para la determinación de LSD en suero	No se especifica el gas acarreador ni el límite de detección y cuantificación
45	LSD Orina	1-Clorobutano	15 m X 0.25 mm D.I. Temperatura inicial de 160 °C (por 1 min.) y se aumenta a 300 °C (por 3 min.) a 30 °C/min.	Helio (1.4 mL/min.)	EM: En modalidad de ionización electrónica, con un voltaje del detector de 800-1000 V.	25 ng/mL	50 ng/mL	Conversión de iso-LSD a LSD, lo que incrementa la concentración del analito	Bajos valores de recobro y límites de detección y cuantificación altos
46	LSD Orina	Hidróxido de amonio al 2% en Cloruro de metileno/isopropanol (78:20 v/v)	15 m X 0.25 mm D.I., 0.25 µm. Temperatura inicial a 150 °C por 1.5 min. y se aumenta a 220 °C a 30 °C/min. y se incrementa a 280 °C a 20 °C/min.	Helio (1.4 mL/min.)	EM/EM: Ionización electrónica a 80 µA, con espectrómetro de trampa iónica.	20 pg/mL	80 pg/mL	No es necesario la formación de un derivado	Conversión de LSD a iso-LSD durante el proceso de extracción
47	LSD O-H-LSD Orina	Acetato de etilo con Hidróxido de amonio al 4%	15 m X 0.25mm D.I., 0.25 mm. Temperatura inicial a 175 °C por 0.8 min. y se aumenta a 298 °C a 20 °C/min.	Hidrógeno	EM/EM: Ionización química con amoniaco.	N/R	N/R	Uno de los primeros métodos por CG en los que se detecta y cuantifica O-H-LSD	No se reportan los valores del límite de detección y cuantificación para los analitos

N/R: No reportado. N/E: No especificado

EM = Espectrometría de masas y EM-tándem = Espectrometría de masas en tándem.

a = Ionización química de ion negativo. b = ionización química de ion positivo.

O-H-LSD = 2-oxo-3-hidroxi-LSD

Tabla 2. Resumen de los principales métodos por CL-EM o CL-EM-tándem para el análisis de LSD y algunos de sus metabolitos.

Condiciones cromatográficas									
Ref.	Analito y Matriz	Tipo de extracción	Columna y/o temperatura	Fase móvil	Condiciones del espectro de masas	Límite de detección	Límite de cuantificación	Ventajas	Desventajas
48	LSD Orina	Inmunoafinidad	C-18 de 150 mm X 0.3mm D.I., 3 µm.	Acetonitrilo/Metanol/Ácido Acético/Acetato de Amonio (30 %/30 %/0.1 %/40 %) con una velocidad de flujo de 3.5 µl/min.	EM: Modalidad de monitoreo selectivo de reacción.	N/R	N/R	Método que permite detectar LSD a concentraciones de ppt	Método solo experimental, que requiere a un ser optimizado y validado
49	LSD nor-LSD Orina	Éter dietílico/Tolueno (6:4 v/v)	C-18 de 150 mm X 1mm D.I.	Formiato de amonio 2 mM (pH 3) / Acetonitrilo (70:30, v/v) con una velocidad de flujo de 40 µl/min.	EM: Con interfase de ionización por electrospray, con flujo del gas nebulizador de 0.95 L/min.; con flujo de corte de 1.16 L/min. y un voltaje de orificio de 20 V.	24 pg/mL LSD 30 pg/mL nor-LSD	50 pg/mL LSD 100 pg/mL nor-LSD	Método específico, sensible y preciso para el análisis de LSD y nor-LSD	Realmente pocas desventajas, solo realizar estudios de estabilidad con el método propuesto
50	LSD Orina	Hidróxido de amonio al 2% en cegato de etilo	C-18 de 125 mm X 3mm D.I., 3 µm.	Buffer de acetato 0.1 M (pH 8) /Acetonitrilo-Trietilamina (75:25:0.25, v/v/v) con una velocidad de 0.5 mL/min.	EM: Con interfase de ionización por electrospray, y un voltaje de orificio de 20 V.	10000 pg/mL	500 pg/mL	Método específico, sensible y preciso para el análisis de LSD y nor-LSD	No se reportan datos de exactitud y precisión y los límites de cuantificación y detección son relativamente altos en comparación con otros métodos
51	O-H-LSD nor-LSD Orina	Cloruro de metileno/Isopropanol (95:5 v/v)	Eclipse XDB-C-18 de 150X4.6mm D.I., 3.5 µm.	Buffer de acetato de amonio 0.01 M (pH 8)-Acetonitrilo (80:20, v/v) y trietilamina 0.02 %) a una velocidad de 0.8 mL/min.	EM: Ionización química en un espectrómetro de masas de trampa iónica.	200 pg/mL O-H-LSD N/R nor-LSD	400 pg/mL O-H-LSD N/R nor-LSD	Buenos límites de detección y cuantificación, uno de los primeros métodos para determinar O-H-LSD	No se valido con respecto a los parámetros sugeridos y el procedimiento de extracción u purificación de la muestra son largos
52	LSD iso-LSD Orina	Buffer de amonio y Dietiléter	Spherisorb 5RP 8S de 100 X 2.1 mm D.I., 5 µm.	Agua-Acetonitrilo (40:60, v/v) con 0.1 % de ácido fórmico y formato de amonio a una velocidad de 400 µl/min.	Tándem-EM: Con interfase de ionización por electrospray, ajustado a un voltaje de 5.2 kV.	10 pg/mL LSD e iso-LSD	20 pg/mL LSD e iso-LSD	Método simple y validado para la determinación de LSD a 20pg/mL y un procedimiento de extracción rápido	Realmente un método con pocas desventajas

N/R: No reportado. N/E: No especificado

a= Ionización química de ion negativo. b= Ionización química de ion positivo.

EM= Espectrometría de masas y EM-tándem= Espectrometría de masas en tándem.

O-H-LSD= 2-oxo-3-hidroxi-LSD

2.3. Pruebas presuntivas (Inmunoanálisis).

Los inmunoanálisis son pruebas que usan anticuerpos para identificar y medir la cantidad de sustancias químicas. En toxicología forense este tipo de análisis se emplea típicamente como pruebas presuntivas en muestras biológicas para identificar y cuantificar el antígeno que corresponda a la droga de abuso. Los anticuerpos son moléculas glicoproteicas, denominadas como inmunoglobulinas (Ig) y existen cinco diferentes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD producidas y segregadas por los linfocitos B de los mamíferos en respuesta a la presencia de sustancias extrañas (antígeno) en el organismo. Un antígeno puede definirse como todo aquel material soluble o particulado capaz de despertar una respuesta inmune en un animal inmunológicamente competente. Este fenómeno biológico ha sido aprovechado para obtener el suero que contiene anticuerpos específicos hacia compuestos que previamente se introdujeron en animales hipersensibles. Este suero (denominado antisuero) es entonces usado para desarrollar pruebas de laboratorio que identifiquen el compuesto de interés. Todas las clases de inmunoglobulinas están presentes en la sangre, pero la IgG es la clase dominante y además es una importante proteína sérica (el suero de los seres humanos normales contiene entre 8 y 16 mg/mL de IgG). Los anticuerpos IgM se inducen en la sangre en las primeras fases de la respuesta inmunitaria y los IgA se segregan en los fluidos gástricos y pulmonares, en el sudor y en la saliva. La IgE media las respuestas anafiláctica (liberadora de histamina) y alérgica y puede ser importante en la protección frente a los parásitos y la función de la IgD circulante no se conoce bien. Los anticuerpos se unen específicamente con el antígeno que desencadenó su producción, con base a la composición y orientación espacial de la molécula. Así los anticuerpos pueden no acoplarse a sustancias que son disímiles al antígeno pero también pueden unirse a otras que son estructuralmente similares. La unión a compuestos relacionados estructuralmente es conocida comúnmente como reactividad cruzada. Las moléculas de peso molecular inferior a los 2000 dalton, por ejemplo la metanfetamina de 149 dalton no son antigénicas, pero uniendo esta molécula a otra de mayor peso molecular para formar un conjugado se vuelve antigénica. Estos materiales reciben el nombre de antígenos conjugados y los más

ampliamente utilizados consisten de un acarreador, generalmente proteico, acoplado a una molécula relativamente simple llamada hapteno. La mayoría de las veces los conjugados de este tipo se preparan cuando se quieren producir anticuerpos dirigidos en contra del hapteno (Figura 15).³³⁻³⁴

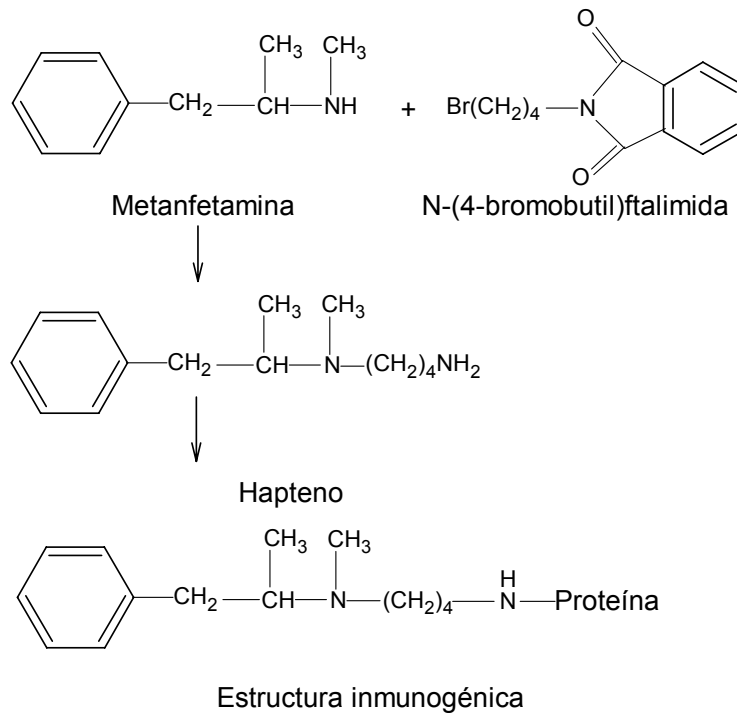


Figura 15. Ejemplo de un conjugado inmunogénico.

De forma natural los animales producen un antisuero policlonal, esto significa, que se encuentran tipos diferentes de anticuerpos, cada uno con diferente afinidad al compuesto de interés en base a la parte de la estructura del compuesto que reconocen. En la actualidad con el desarrollo de la tecnología hibridoma se puede obtener antisuero monoclonales. La figura 16 resume la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales. La producción de anticuerpos policlonales es simple: se inyecta el inmunogénico, se colecta la sangre y entonces se separa el antisuero. La producción de un antisuero con las propiedades requeridas es relativamente fácil, las variables que lo afectan son: la respuesta inherente del animal y el tiempo de respuesta; sin embargo, esto es más difícil de lograr de lo que aparenta. Además, el animal huésped, usualmente

un conejo, oveja o cabra, requieren ser bastantes grandes para obtener volúmenes suficientes de sangre a drenar sin causarles algún daño o la muerte. ³³⁻³⁴

En la sangre de quienes sufrían una forma de tumor maligno denominado mieloma múltiple se encuentro una concentración elevada de un tipo de anticuerpo. En la década de 1970 los científicos descubrieron cómo fusionar estas células del mieloma con linfocitos procedentes de tejidos que habían sido expuestos a un antígeno. Las células híbridas resultantes (hibridomas) producían grandes cantidades de anticuerpos de un tipo específico (clones), que se denominaron anticuerpos monoclonales. Mediante la selección del hibridoma apropiado, se pueden obtener anticuerpos puros que se combinan con cualquier sustancia extraña elegida. El empleo de anticuerpos monoclonales se ha convertido en una herramienta de gran valor en biología y medicina, ya que es posible combinar líneas puras de anticuerpo, y por lo tanto marcar o identificar, con las sustancias que componen las células y los tejidos. Las células cancerígenas son necesarias, ya que las células normales mueren después de cierto número de replicaciones. El antisuero producido es específico para el analito y se pueden conservar sus características, si la línea celular seleccionada se mantiene. ³³⁻³⁴

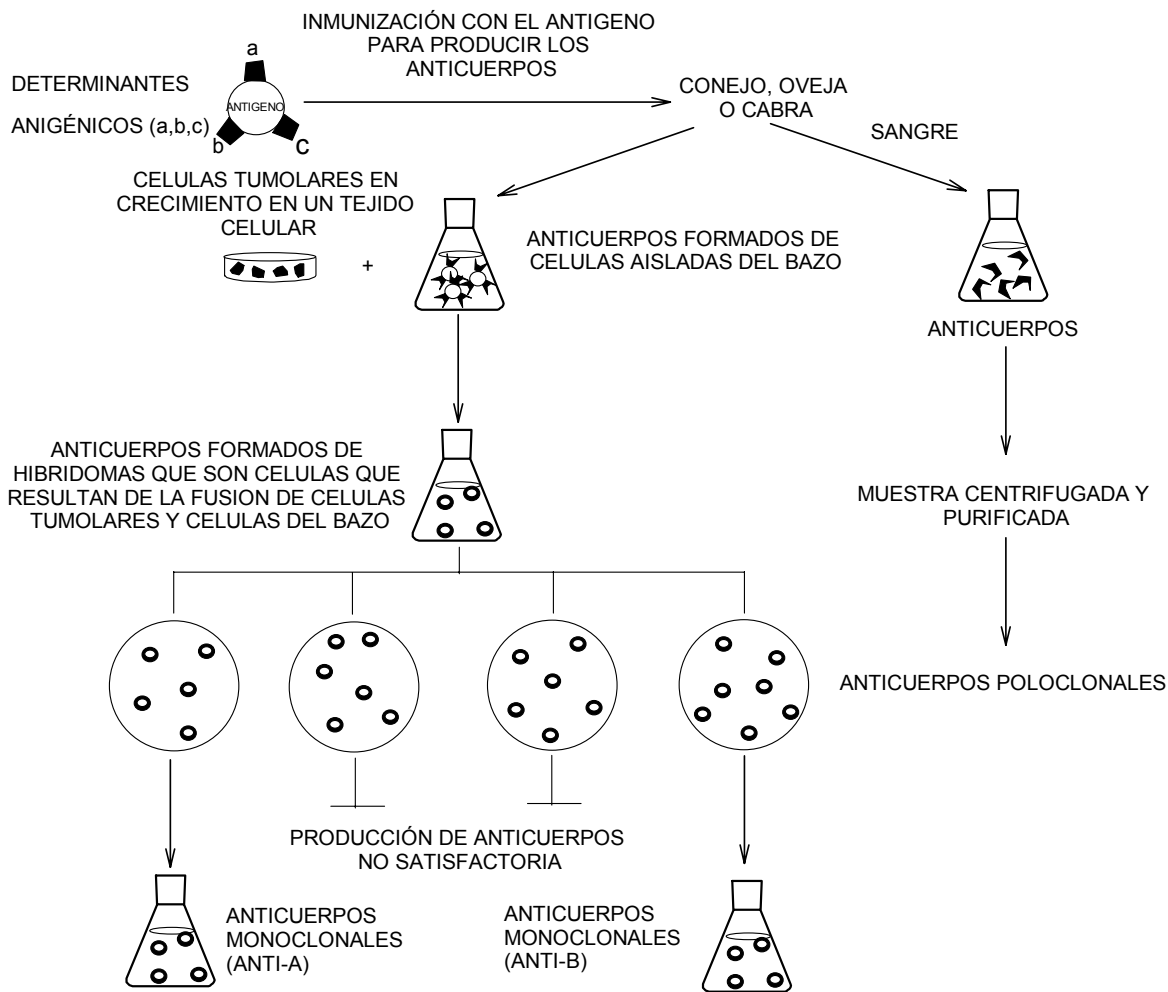


Figura 16. Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales

El radioinmunoanálisis (RIA) es la técnica de mayor empleo para determinar LSD, principalmente en orina, como lo demuestran los primeros trabajos realizados por Taunton-Rigby A. y col.³³ Ellos obtuvieron un anticuerpo específico para LSD, mediante la inmunización de conejos con un conjugado de LSD-Albúmina de suero humano. Mediante pruebas para determinar las posibles reactividades cruzadas (el grado de respuesta a un compuesto que no es el analito de interés) se ensayaron 50 compuestos relacionados al LSD y se encontró que el antisuero producido es altamente específico y es posible detectar hasta 20 pg de LSD en orina. Solo un compuesto proporcionó una

reacción cruzada significativa, el cual es el *levo*-LSD a una concentración de 50 ng y para los demás compuestos evaluados se requirieron concentraciones mayores a los 1 µg para obtener una reactividad cruzada significativa.³³ Trabajos posteriores realizados por Ratcliffe AW. y col.³⁴ diferenciaron la obtención de anticuerpos para LSD, mediante la inmunización de conejos por medio de un conjugado de LSD-Albúmina de suero bovino vía nitrógeno del indol (antisuero I) y otro mediante la inmunización de un carnero por medio de un conjugado de LSD-Albúmina de suero de carnero vía grupo amida (antisuero II). Mediante pruebas de reactividad cruzada con los metabolitos del LSD y compuestos relacionados estructuralmente, se observó una diferencia notable en la especificidad, debido a la posición de acoplamiento del hapteno. Las pruebas revelaron que el antisuero I tiene una especificidad similar a la descrita por Taunton-Rigby A y col.³³, ya que se utilizó el mismo método y ambos son específicos para LSD, aunque su antisuero I es menos reactivo con el isomero *levo* de LSD. Mientras que el antisuero II presentó menos reactividad cruzada con alcaloides del cornezuelo, tales como la ergonovina y ergotamina, que tienen grupos largos sustituidos en el carbono ocho de su estructura. Este mejoramiento en la especificidad presentada por el antisuero II se debe probablemente a que el hapteno difiere del LSD, no solo en la sustitución de un átomo de hidrógeno indólico como sucede con el hapteno empleado en la obtención del antisuero I, sino que se encuentra separado de la proteína por una cadena de seis átomos de carbono. Aun así estos antisueros presentan reactividad cruzada con los principales metabolitos del LSD y cuando se evaluaron con muestras de orina obtenidas después de la administración de LSD, se obtuvieron valores altos, por la presencia de los metabolitos.

Comentario [AAV18]: A dosis moderadas, la ergotamina provoca la contracción de las fibras musculares lisas, como las que revisten las arteriolas. Se utiliza para combatir hemorragias y para favorecer la contracción del útero durante el parto, además de como tratamiento de la migraña. A dosis elevadas, el fármaco paraliza las terminaciones nerviosas motrices del sistema nervioso simpático.

Por tal motivo se prefiere el análisis de lavado estomacal, que reflejará la concentración probable de LSD, siempre y cuando se disponga de esta muestra, debido a la ausencia o baja concentración de los metabolitos en esta.³⁵⁻³⁶ Altunkaya D. y Smith RN.³⁷, evaluaron un equipo comercial de radioinmunoanálisis para LSD en orina (Diagnostic Products Corporation Coat-A-Count radioimmunoassay Kit), con varios tipos de muestras, entre las que se disponían suero, sangre total hemolizada, orina y contenido

Comentario [AAV19]: La porción líquida de la sangre

estomacal. Ellos calcularon principalmente la concentración de corte del LSD en las muestras mencionadas; los valores determinados fueron de 60, 50-55, 180 y 180 pg/mL, respectivamente. Además, determinaron el por ciento de recobro y el coeficiente de variación (C.V.) para cada una de las muestras y todos sus resultados están de acuerdo a lo requerido para su aplicación rutinaria en el análisis toxicológico. El instructivo del equipo de radioinmunoanálisis indicaba que es específico para LSD y listaba algunos compuestos, incluyendo varios derivados del cornezuelo, que no son detectados o la reactividad cruzada con estos era despreciable. No obstante, el estudio reveló que existe reacción cruzada con varios compuestos que no están incluidos en la lista de manufactura y entre estos se encuentran el 2-oxo-LSD, metilpropilamida del ácido lisérgico (LAMPA), monoetilamida del ácido lisérgico (LSM) y nor-LSD.

En la actualidad, se encuentran disponibles comercialmente varias técnicas de "screening" por inmunoanálisis para LSD en orina. Entre estos principalmente EMIT II, de las siglas en inglés de Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique, producido por Dade Berhring y CEDIA de las siglas en inglés de Cloned Enzyme Doner Immunoassay, producido por Microgenics, ambas técnicas son inmunoanálisis fotométricos que usan la respuesta cinética de una enzima para determinar la concentración de un analito. Un tercer tipo de inmunoanálisis para el LSD, producido por Diagnostic Products Corp (DPC), comprende el radioinmunoanálisis (RIA) que involucra la medición de la radiactividad del LSD acoplado con ^{125}I para determinar la concentración del analito y de sus metabolitos más comunes.³⁸

En el trabajo realizado por Wiegand FR. y col.³⁸ compararon los inmunoanálisis EMIT II, CEDIA y DPC RIA para la detección de LSD en muestras de orina. En su trabajo se evaluó la precisión, exactitud y linealidad de los tres inmunoanálisis, con los resultados obtenidos se demostró que el RIA exhibe los mejores C.V., seguido por CEDIA y por último EMIT II; la mejor exactitud es mostrada por CEDIA y RIA; en contraste EMIT II y CEDIA poseen mejor linealidad, con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9809 y 0.9620, respectivamente, en comparación con el de RIA que es de 0.9540. La especificidad se evaluó con compuestos de estructura y propiedades químicas similares

al LSD, productos comunes, fármacos de prescripción médica, algunas drogas de abuso y algunos metabolitos del LSD. Los tres inmunoanálisis proporcionan reactividad cruzada con los siguientes compuestos: nor-LSD y nor-iso-LSD, a una concentración mínima de 100 ng/mL para EMIT II y CEDIA; y de 10 ng/mL para RIA; para iso-LSD a una concentración mínima de 50 ng/mL para EMIT II y CEDIA; y de 100 ng/mL para RIA; para O-H-LSD a una concentración mínima de 100 ng/mL para EMIT II, CEDIA y RIA. Con Ergonovina a una concentración menor de 4000 ng/mL no interfiere para CEDIA, pero si para EMIT II y RIA. Para lisergol a una concentración menor de 50000 ng/mL no interfiere para RIA, pero si para EMIT II y CEDIA. Otros compuestos como el maleato de bromofeniramina, clorhidrato de imipramina y clorhidrato de metilfenidato interfieren con EMIT II a una concentración mínima de 50000 ng/mL, pero no para los otros dos inmunoanálisis. También EMIT II presenta reacción cruzada con otros 32 compuestos, y aunque a las concentraciones en que se producen estas interacciones parecerían altas, estas son fácilmente alcanzadas por la administración de estos compuestos. Conjuntamente, se evaluó la especificidad con 221 muestras de orina, que previamente habían dado positivo por EMIT II. Estas muestras fueron re-analizadas por EMIT II, CEDIA y RIA. De las 221 muestras que dieron positivo por EMIT II para LSD, solo 11 resultaron positivas por CEDIA (5 %) y tres por RIA (2 %); las tres muestras que dieron positivo por RIA fueron analizadas por CG-EM y en ninguna se detectó LSD. Por lo tanto, EMIT II posee una alta proporción de reacciones cruzadas (baja especificidad).

Esta baja especificidad del inmunoanálisis por EMIT II, ya había sido reportada en un trabajo de Gagajewski A. y col.³⁹. Ellos reportaron un caso, donde se tenían dos muestras de orina que dieron positivo para LSD por EMIT II y CEDIA, pero al momento de realizar la confirmación por CLAE-EM, para LSD y O-H-LSD, no fue detectado ninguno de los dos. Al revisar el instructivo de los inmunoanálisis y reconocer los posibles compuestos que interferían en el análisis del LSD, se encontró que el Fentanilo proporciona falsos positivos a una concentración mayor de 400 ng/mL. Revisando el registro médico de ambos casos, se descubrió que el Fentanilo fue administrado 24 horas antes de realizar el "screening" para LSD en las muestras de orina y al realizar la determinación de este analgésico por CG-EM, para ambas muestras de orina se localizó

Comentario [AAV20]: Un potente analgésico opiáceo (fármaco que alivia el dolor sin producir pérdida de conciencia)

una concentración de 0.67 ng/mL y 0.7 ng/mL. Para establecer si este fármaco fue la causa de los falsos positivos, se probaron de nuevo los inmunoanálisis CEDIA y EMIT II, con dos muestras de orina de dos pacientes que previamente usaron parches epidérmicos de Fentanilo. Los análisis dieron un falso positivo para LSD y este se confirmó por CLAE-EM. Sus estudios, indicaron que se pueden obtener falsos positivos para LSD por EMIT II y CEDIA, cuando se usa Fentanilo y que además interfieren los metalitos de éste, puesto que las concentraciones de Fentanilo en las muestras de orina son menores de a 40 ng/mL. En otro trabajo realizado por Ritter D. y col.⁴⁰; investigaron el alto porcentaje de falsos positivos por EMIT II, ellos re-analizaron 79 muestras de orina que previamente dieron positivo por EMIT II para LSD. De estas muestras, ocho se encontraban en cantidad insuficiente para ser re-analizadas y solo se re-analizaron 71 muestras con dos RIA de proveedores diferentes y todas ellas subsecuentemente dieron negativo con ambos re-análisis. Para confirmar que los falsos positivos se debieron a la presencia de otros compuestos que interfieren con el análisis, se seleccionaron diez muestras al azar y se sometieron a la detección de LSD por CG-EM y en ninguna se detectó al LSD. Para determinar los posibles compuestos que interfirieron con el inmunoanálisis se pusieron a prueba 47 fármacos de prescripción en muestras de orina libres de fármaco. De estos 26 no interfirieron en la determinación de LSD por EMIT II a la concentración de 1 mg/mL y estos fármacos son: acetaminofen, albuterol, alopurinol, alprazolam, atenolol, cafeína, carbamazepina, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, gliburida, clorohidrato de tiazida, ibuprofeno, indometacina, librium, lidocaina, lorazepam, metacualona, metocarbamol, nicotina, nifedipina, perfenazina, fenobarbital, procainamida, ranitidina y temazepam; mientras que los 21 compuestos restantes dieron lectura, entre los que se encontró el Fentanilo. Lo cual confirma el porcentaje alto de falsos positivos para este inmunoanálisis.

Con base a lo anteriormente mencionado, se puede concluir que el inmunoanálisis por medio de CEDIA para LSD en orina, es el apropiado ya que exhibe buena exactitud, precisión y menos reactividad cruzada con otros compuestos en comparación con EMIT II. Y aunque el RIA, es uno de los primeros inmunoanálisis empleados y de mayor difusión, su empleo presenta varias desventajas que hay que tener en cuenta, una de

estas es el costo elevado del Kit de RIA, la necesidad de contar con instrumentos especiales y los requerimientos necesarios para asegurar el transporte, manejo, uso y disposición del material radiactivo.

2.4. Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia (CLAE-DF).

Grobosch T. y Lemm-Ahers U.⁴¹ presentaron un método para la determinación de LSD por cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector de fluorescencia, en el cual 3872 muestras de orina, procedentes de pacientes del área de psiquiatría y adictos, las cuales fueron previamente analizadas por el inmunoanálisis CEDIA, de esta manera 48 muestras dieron positivo y sólo en sólo 13 muestras se confirmó la presencia de LSD por CLAE-DF, después del aislamiento de las muestras por una técnica de extracción por inmunoafinidad (EIA) y las concentraciones de LSD se encontraron en el rango de 82 a 800 pg/mL. Ellos mismos investigaron los posibles compuestos que entorpecían el análisis por CEDIA, entre los que se encuentran el ambroxol, prilocaína, pipamperona, difehidramina, metoclopramida, amitriptilina, doxepina, atracurium, bupivacaina, dosilamida, lidocaina, mepivacaina, prometazina, ranitidina y tramadol. En este trabajo no se reportaron los resultados en cuanto a la validación del método analítico (precisión, exactitud y linealidad), sólo reportan los resultados obtenidos para el porcentaje de recobro obtenido por la técnica de EIA para LSD que fue del 89 % \pm 8 %, el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) de 20 pg/mL y 60 pg/mL para LSD, respectivamente. Se limitaron a reportar las concentraciones empleadas en la curva de calibración y argumentar que su relación era lineal. Al mismo tiempo, determinaron la concentración de nor-LSD en las muestras que abarcan un rango de 70 a 800 pg/mL, con un LDD y un LDC de 20 pg/mL y 70 pg/mL, correspondientemente.

2.5. Métodos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas o Espectrometría de masas en Tándem (CG-EM o CG-EM-tándem).

En un estudio realizado por Buddha DP. y col.⁴² se desarrollo un método sensible para la detección y cuantificación de LSD en orina por CG-EM; en el cual se confrontaron dos métodos de purificación, después de un tratamiento inicial de las muestras con disolventes, las muestras se purifican por extracción líquido-líquido (ELL) y extracción en fase sólida (EFS) y posteriormente se formo un derivado trimetilsilano del LSD, con el reactivo trimetilsililtrifluoroacetamida (Figura 17), para ser analizado por CG-EM. EL sistema de CG-EM consistió de un cromatógrafo de gases HP 5890 acoplado a un espectrómetro de masas HP 5970, la velocidad de flujo del gas portador (helio) fue de 1.26 mL/min, a través de una columna capilar de 15 m X 0.25 mm de diámetro interno (D.I.), el programa de temperatura residió en una temperatura inicial de 190 °C, que se incremento a 290 °C a 20 °C/min y se mantuvo por 3 min. El detector de masas es utilizado en la modalidad de impacto electrónico a 70 eV con una temperatura de la fuente de iones de 200-250 °C y el rango de 50-400 m/z . Para evaluar la eficiencia de la extracción, se prepararon seis muestras de orina con LSD a una concentración de 400 pg/mL sin estándar interno y fueron extraídas y purificadas. Después de esto se añado 40 μ l del estándar interno (LAMPA=metilpropilamida del ácido lisérgico) a una concentración de 500 ng/mL y se forman los derivados. Al mismo tiempo se prepararon un grupo control de seis muestras que contienen LSD a una concentración de 400 pg/mL y estándar interno (LAMPA, 40 μ l, 500 ng/mL) estas fueron evaporados y se forman los derivados. El porcentaje de recobro se determinó por comparación de los resultados obtenidos en orina con los obtenidos con los controles. EL rendimiento total del tratamiento con disolventes y la purificación por ELL vario del 92-95 %, mientras que para el tratamiento con disolventes y la purificación por EFS fue del 89-92 %. Cuando se realizó la cuantificación usando LAMPA como estándar interno los resultados fueron similares al emplear una purificación por ELL y EFS. Al construir una curva de calibración con concentraciones de LSD de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg/mL y analizando las muestras por triplicado, se obtuvo una linealidad excelente en el rango de 50-2000 pg/mL. La pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación obtenidos fueron de 0.00066, -0.02052 y 0.9992, respectivamente. El LDD fue de 29 pg/mL. En el rango de concentraciones de 50-2000 pg/mL, los coeficientes de variación intra-corrída e inter-corrída fueron menores del 5 % y 7 %, respectivamente.

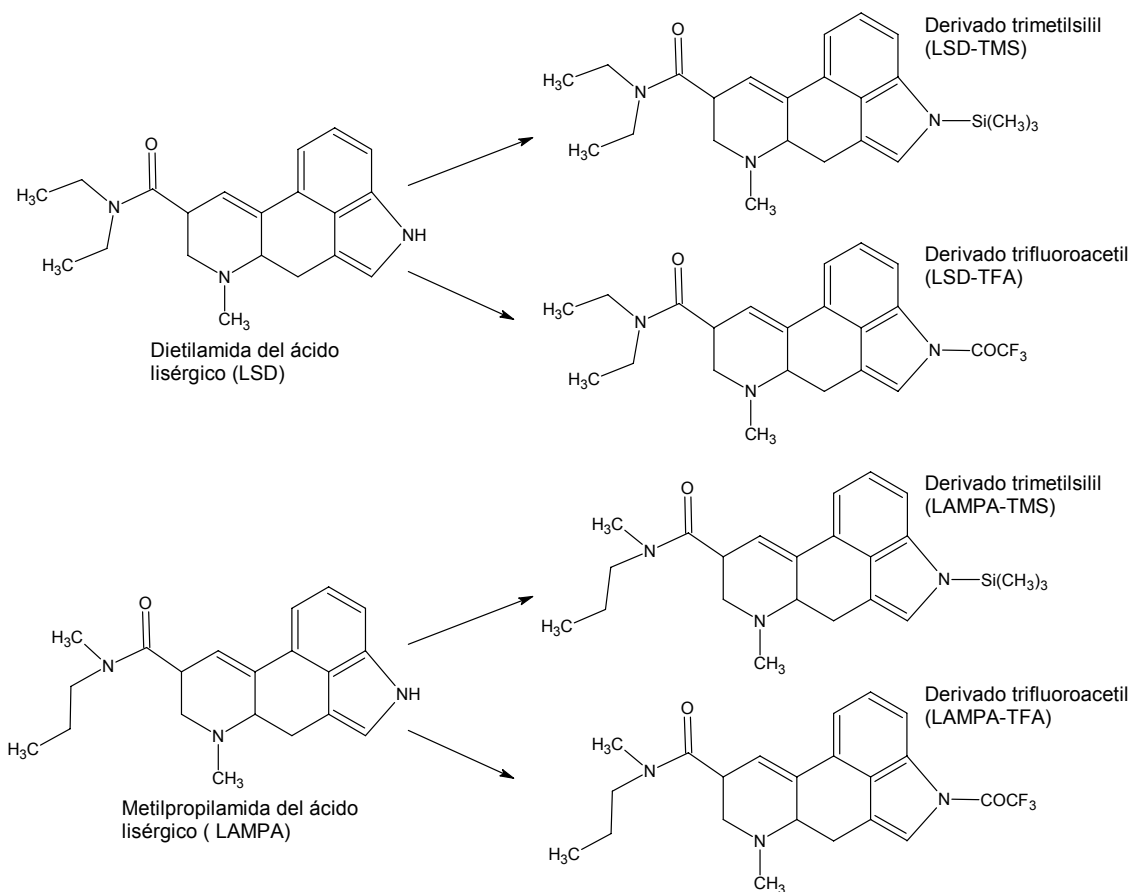


Figura 17. Estructura del LSD, LAMPA (estándar interno) y sus derivados con dos reactivos distintos trifluoroacetilimidazol y trimetilsililtrifluoroacetamida.

Nelson CC. y Foltz LR.⁴³ mostraron un método para la detección y cuantificación de LSD por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en tándem (CG-EM-tándem) en orina y sangre. Los autores compararon dos reactivos para la formación de los derivados LSD-TFA y LSD-TMS y la formación de ión positivo o negativo en la ionización química, mediante el empleo de metano (CH_4) y amoníaco (NH_3), para obtener los parámetros óptimos en la producción de una ionización eficiente y una sensibilidad y especificidad apropiada en la producción de iones. El sistema consistió de un cromatógrafo de gases Varian HP 3400 acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Finnigan TSQ-70, la velocidad lineal del gas portador (hidrógeno) fue de 67 cm/s, a través de una columna capilar Ultra-2 de 12 m X 0.20 mm de D.I. y con un

grosor de cubierta de 0.33 μm , el programa de temperatura inició a 175 $^{\circ}\text{C}$ (mantenida por 0.8 min.) y llevada a 298 $^{\circ}\text{C}$ (mantenida por 3-5 min.) a 19 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. En la celda de colisión (Q2) se empleo Argón y una energía de colisión de 45 eV.

Al comparar el empleo de gas amoníaco y metano, se obtuvo que al usar amoníaco como gas reactante se generan los iones MH^+ y M^- a una razón de 5 a 3 veces mayor en intensidad que cuando se emplea metano. Por lo tanto, se empleó amoníaco en la ionización química en el análisis de LSD en orina y sangre. Además, la abundancia de los iones MH^+ y M^- , se evaluó en función de la temperatura de la cámara de ionización en un rango de 100 a 200 $^{\circ}\text{C}$ en incrementos de 10 $^{\circ}\text{C}$. Una temperatura entre los 140 y 150 $^{\circ}\text{C}$ fue la óptima para producir el ión positivo MH^+ y para el ión negativo M^- la temperatura óptima fue de 130 $^{\circ}\text{C}$, por ionización química con NH_3 o CH_4 .⁴³

Una vez establecida la temperatura y gas reactante. Se procedió a comparar la intensidad iónica relativa para los derivados LSD-TFA y LAMPA-TFA, en la modalidad de ión negativo y para los derivados LSD-TMS y LAMPA-TMS, en la modalidad de ión positivo. Los espectros de masas por ionización química para ión positivo mostraron sólo esencialmente la molécula protonada (MH^+); mientras que los espectros de masas por ionización química para ión negativo muestran solo el anión molecular (M^-).⁴³

Una vez que se establecieron los parámetros anteriores, procedieron a evaluar la eficiencia de extracción en orina y sangre. La extracción de orina se realizó por medio de una ELL y se prepararon tres controles de orina con 400 pg/mL de LSD, cada una dividida en dos y se añadió el estándar interno (LAMPA) a tres alícuotas antes de la extracción y a las otras tres después de la extracción, posteriormente se formaron los derivados y se analizaron. Comparando los resultados obtenidos se determinó un porcentaje de recobro del 65 %. Para la extracción en sangre se emplearon dos procesos de extracción colectivamente, una ELL y EFS y la eficiencia del proceso se determinó del 55 %.⁴³

Al realizar un análisis de muestras de orina por CG-EM-tándem con ionización química negativa, se determinó que las vías de disociación son similares para los derivados de LSD-TFA y LAMPA-TFA; y la abundancia relativa de los iones producidos difirieron escasamente. Así mismo, los derivados de LSD-TFA e iso-LSD-TFA eluyeron muy cerca lo que inherentemente dificultó su identificación y cuantificación. Al realizar un análisis de muestras de orina o sangre por CG-EM-tándem con ionización química positiva, se comprobó que se proporcionaba mejor sensibilidad y alta grado de especificidad. De este modo, los productos iónicos de una relación m/z de 353, 295 y 280, a consecuencia de la disociación de la molécula protonada (MH^+ 396), fueron monitoreados para los derivados de LSD-TMS y LAMPA-TMS. Como resultado de esto, se pudieron detectar cantidades trazas de LSD sin ninguna interferencia en matrices complejas. Al mismo tiempo, se logró una separación cromatográfica clara entre LSD e iso-LSD. Para muestras de orina una curva de calibración fue lineal en el rango de 20 a 1000 pg/mL; el LDD y LDC establecido fue de 10 pg/mL y 20 pg/mL, respectivamente para LSD-TMS. Al analizar 12 muestras de orina con una concentración de LSD a 250 pg/mL, se obtuvo un promedio de 248 pg/mL, con una desviación estándar relativa de 5.9 %. Conjuntamente, se analizaron 30 muestras y se obtuvo un C.V. menor al 20 %.⁴³

Aunque se pretendía determinar y cuantificar tanto iso-LSD y nor-LSD, como se mencionó anteriormente el derivado de LSD-TFA y iso-LSD-TFA, no se separaron satisfactoriamente cuando se analizaron por CG-EM-tándem por ionización química de ión negativo, lo cual dificultó su identificación y cuantificación. Sólo para el derivado nor-LSD-TFA fue posible determinar su LDD y su LDC en orina de 10 pg/mL y 50 pg/mL, respectivamente. Cuando se analizaron por CG-EM-tándem por ionización química de ión positivo los derivados iso-LSD-TMS y nor-LSD-TMS en muestras de orina se consiguieron LDD y LDC de 10 pg/mL y 25 pg/mL, respectivamente para iso-LSD-TMS; y de 100 pg/mL y 400 pg/mL respectivamente para nor-LSD-TMS. Sin embargo, no se reportaron ningún dato referente a la validación del método con respecto a estos analitos. Al final no reportaron sus resultados obtenidos en sangre, aunque aseguran que los resultados son comparables con los obtenidos en orina, una vez que se han empleado procedimientos de extracción eficientes.⁴³

Musshoff F. y Daldrup T.⁴⁴ presentaron un método para la detección y cuantificación de LSD en muestras de suero, después de la ELL y la formación de un derivado trimetilsililado para ser determinado por CG-EM. El sistema de CG-EM consistió de un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II, con una columna capilar HP 5MS de 30 m X 0.25 mm D.I., con una capa de recubrimiento de 0.25 μm , acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972; el programa de temperatura inició a 150 °C por 2 min y llevada a 290 °C por 25 min a 30 °C/min y la temperatura del inyector fue de 250 °C. Al realizar la validación del método obtuvieron una linealidad excelente en el rango de 0.1 a 10 ng/mL, con un coeficiente de correlación de la curva de calibración de 0.9997. El recobro y la precisión fue evaluada por el análisis de siete muestras de suero que contenían cada una 2000 ng/mL. El recobro determinado fue de 76.8 % \pm 4.6 % y un C.V. del 9.3%. En cuanto a la estabilidad de la solución stock de LSD, sus estudios han demostrado que es sensible a la luz, ya que después de su exposición por 8 h se localizó solo un 37 % de la concentración inicial evaluada (100 ng/mL). Como conclusión, comprobaron que el procedimiento descrito es de utilidad para determinar LSD en suero a concentraciones de nanogramos/mililitro, ya que se aplicó para el análisis de dos muestras provenientes de estudiantes, uno de 16 años y otro de 17 años, en las cuales se hallaron concentraciones de 2.3 ng/mL y 0.8 ng/mL, respectivamente.

Claekson DE. y col.⁴⁵ presentaron un método más sensible para la detección de LSD en orina por CG-EM, después de la conversión de iso-LSD a LSD. El sistema de CG-EM consistió de un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II Plus acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972, con un separar de cuadrupolo. La velocidad de flujo del gas acarreador (helio) a través de la columna capilar de 15 m X 0.25mm D.I. fue de 1.4 mL/min. El programa de temperatura inició a 160 °C (por 1 min) y se aumentó a 300 °C (por 3 min) a 30 °C/min. La temperatura del inyector y del detector fueron de 285 °C y 300 °C, respectivamente.⁴⁵

La preparación de la muestra en este estudio implicó la extracción inicial de LSD e iso-LSD de la orina, la isomerización de iso-LSD a LSD, su purificación por EFS y ELL; y la

posterior formación de un derivado trimetilsililado. Los autores investigaron las condiciones óptimas para lograr una conversión cuantitativa de iso-LSD a LSD y establecieron que calentando a 50 °C por 10 min, con una solución de etóxido de sodio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$) en etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a 0.5 mol/L, se lograba una conversión del 98 %. Además, investigaron el efecto del etóxido de sodio sobre el estándar interno (LAMPA). Después de tratar cantidades conocidas de LSD y LAMPA con etóxido de sodio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$) a 50 °C por 60 min y al comparar las áreas obtenidas por la señal de los analitos y al comprobar que estas permanecían sin cambios durante el proceso de incubación, se estableció que LAMPA era apropiado como estándar interno para la cuantificación de LSD. Para determinar el recobro del procedimiento, se adicionaron cantidades conocidas de LSD, iso-LSD y LAMPA al principio y al final de las etapas de extracción y purificación. El resultado obtenido indicó un recobro del 69 % \pm 4 %. Al realizar la validación del método, la linealidad se evaluó en un rango de concentraciones comprendido entre los 25 a 5000 ng/mL de LSD en orina. Una excelente linealidad se consiguió en el rango de concentraciones de 50 a 2000 ng/mL, con una pendiente, un intercepto y un coeficiente de correlación de 1.1, -8.2 y 0.9998, respectivamente. El LDD y LDC determinado para este método fue de 25 ng/mL y 50 ng/mL, respectivamente.⁴⁵

Sklerov HJ. y col.⁴⁶ desarrollaron un método para la detección y cuantificación de LSD empleando CG-EM-tándem con un espectrómetro basado en trampa iónica con fuente de iones por impacto electrónico; después de su extracción en orina por un simple paso de EFS y algo muy interesante en este procedimiento fue la omisión de formar un derivado. El sistema de CG-EM-tándem radicó en un cromatógrafo de gases Varian 3400, con una columna capilar ZB-5 de 15 m X 0.25 mm D.I., con una capa de recubrimiento de 0.25 μm . El inyector se mantuvo a una temperatura de 85 °C por 0.2 min y después de la inyección se incremento a 300 °C a 180 °C/min. La velocidad de flujo del gas acarreador (helio) fue mantenida a 1.4 mL/min con una temperatura de la columna de 300 °C. El programa de temperatura inició a 150 °C (por 1.5 min) y se incremento a 220 °C a 30 °C/min, posteriormente se aumento a 280 °C a 20 °C/min y finalmente a 300 °C a 10 °C/min donde se mantuvo por 1.5 min. La detección fue

realizada con un espectrómetro de masas de trampa iónica Saturn 2000, que permitió aislar al ión precursor de LSD y del estándar interno.

La linealidad del método se determinó por la extracción de muestras de orina con concentraciones conocidas de LSD en el rango de 20 a 2000 pg/mL. La respuesta del analito fue lineal en el rango evaluado con una pendiente de 0.0019, un intercepto de 0.0033 y un coeficiente de correlación de 0.9998. El LDD y LDC establecidos fueron de 20 pg/mL y 80 pg/mL, respectivamente. La estabilidad fue evaluada en un día con muestras de orina que contenían estándar de LSD a 400 pg/mL donde se obtuvo un promedio de 387 pg/mL \pm 19.6 pg/mL, con un C.V. del 5.0 %. A diferentes días durante un periodo de tres semanas, se evaluó la estabilidad de muestras a tres concentraciones de LSD (150, 200 y 450 pg/mL), con once repeticiones para cada concentración, obteniendo una concentración media para cada nivel de 149.8, 205.4 y 448.4 pg/mL, respectivamente; con un C.V. menor del 13 % para todos los niveles. Al obtener un cromatograma usando el método anteriormente descrito de una muestra que contenía 454 pg/mL de LSD y 500 pg/mL de LAMPA, se observaron dos picos secundarios, uno de ellos correspondió al iso-LSD, el cual se formó durante el procedimiento de extracción y otro pico no identificado, que se sospecha como resultado de la isomerización de LAMPA; sin embargo, aun no se dispone de un estándar de iso-LAMPA para comprobar esta suposición. Cuando se analiza LSD por CG es necesario poner atención a la pérdida del analito por su adsorción en la columna de separación. Este efecto se puede minimizar a través de la formación de derivados y acondicionamiento de la columna. El acondicionamiento de la columna con inyecciones repetidas de los reactivos para formar los derivados da como resultado un incremento en las interferencias de fondo que pueden deberse a la acumulación de trazas de estos reactivos en el ensamblaje del inyector, por tal motivo se debe evitar esta práctica. Para evitar problemas de este tipo, se deben inyectar 1 μ L por triplicado de extractos negativos de orina antes de procesar las muestras. Igualmente, mediante el uso de un programa de temperaturas en la columna e inyectores, las pérdidas de LSD son mínimas y la detección del LSD sin la necesidad de formar un derivado es posible.⁴⁶

Por último, Reuschel AS. y col.⁴⁷ desarrollaron un método para la determinación de LSD y su metabolito O-H-LSD en orina, después de la EFS y la formación de un derivado trimetilsililado, por CG-EM-tándem usando ionización química positiva. En este trabajo se emplearon como estándares internos el LAMPA y 2-oxo-3-hidroxi-Metilpropilamida del ácido lisérgico (O-H-LAMPA) ver figura 18. El sistema de CG-EM-tándem consistió de un cromatógrafo de gases Varian 3400, con una columna capilar ZB-5 de 15 m X 0.25 mm D.I., con un grosor de cubierta de 0.25 μm . La temperatura inicial de la columna fue mantenida a 175 $^{\circ}\text{C}$ por 0.8 min, entonces se aumenta a 298 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y el tiempo total de corrida fue de 7.0 min. La temperatura del inyector y de la línea de transferencia fue de 298 $^{\circ}\text{C}$. El gas acarreador, hidrógeno (H_2), se mantuvo a una presión de aproximadamente 20 psi. El gas reactante, amoníaco (NH_3) se ajustó a un flujo apropiado para mantener una presión de aproximadamente 3000 Torr. Para acondicionar la columna se inyectaron de 1-2 μL del extracto derivatizado.

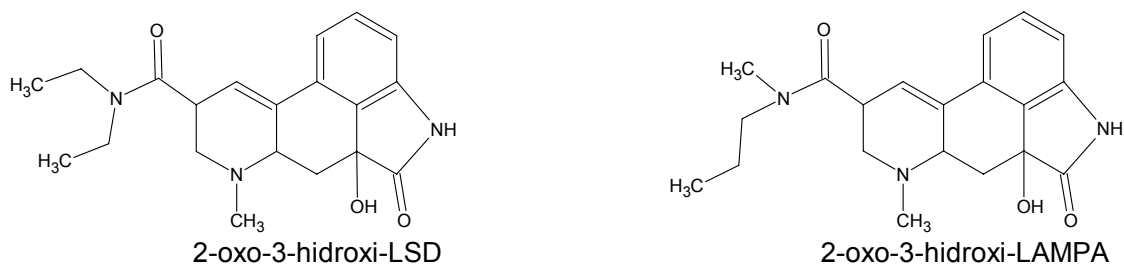


Figura 18. Estructura del 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD) y el estándar interno 2-oxo-3-hidroxi-Metilpropilamida del ácido lisérgico (O-H-LAMPA).

En la validación del método se determinó la linealidad, precisión y exactitud, mediante tres corridas analíticas separadas. Cada corrida incluía una curva de calibración con ocho concentraciones (10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2500 y 5000 pg/mL) preparadas en orina, tanto para LSD y O-H-LSD, por duplicado. Así como, muestras control en orina para LSD y O-H-LSD a concentraciones de 40, 400 y 4000 pg/mL , por triplicado.

Además, se re-analizaron 49 muestras en las que previamente se había identificado que contenían LSD y 22 muestras más de un estudio clínico en el que dos personas, un hombre y una mujer, recibieron una dosis 4 µg de LSD/Kg de peso. En cuanto a los resultados obtenidos para LSD de las curvas de calibración, solo se reportaron las concentraciones promedio, la precisión en porcentaje de C.V. que fue menor del 10 % y la exactitud en porcentaje de recobro que se encontró entre el 82-105 %, para cada concentración. De igual modo, los resultados obtenidos para O-H-LSD de las curvas de calibración, solo se reportaron las concentraciones promedio, la precisión en porcentaje de C.V. que fue menor del 10 % y la exactitud en porcentaje recuperado que se encontró entre el 91-109 %, para cada concentración. En cuanto a los controles de LSD se obtuvieron resultados de precisión y exactitud <2.9 % y 98-108 %, respectivamente; y para O-H-LSD se obtuvieron resultados de precisión y exactitud <3.7 % y 95-103 %, respectivamente. De las 49 muestras que se re-analizaron se halló una media de 357 pg/mL y 3470 pg/mL, para LSD y O-H-LSD, respectivamente. De lo cual se comprobó que las concentraciones de este metabolito son hasta 24 veces mayores a las del LSD. De las concentraciones determinadas para LSD en las muestras del estudio clínico, se comprueba que éstas disminuyen por debajo de la concentración de corte (200 pg/mL) de la mayor parte de los métodos confirmatorios a las 24 a 36 h después de su administración. Sin embargo, la dosis de LSD en este estudio son considerablemente altas (4 µg/Kg) en comparación con las dosis representativas (aproximadamente 50 µg). En cambio, las concentraciones del O-H-LSD son mayores a la concentración de corte aun después de 48 horas. Este es fue el único estudio por cromatografía de gases en que se detectó y cuantificó el O-H-LSD.⁴⁷

2.6. Métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de Masas o Espectrometría de Masas en Tándem (CLAE-EM o CLAE-EM-Tándem).

En uno de los primeros estudios realizados por Cai J. y Henion J.⁴⁸ describieron el empleo de un procedimiento de extracción en línea para el análisis de trazas LSD en orina empleando CLAE-EM-tándem. El sistema involucró tres columnas, la primera de

inmunoafinidad, con anticuerpos específicos para el analito de interés, la segunda una precolumna y la tercera una analítica. La orina se diluyó 1:1 con un amortiguador de fosfatos (pH=7.4) y se bombeo directamente a la columna de inmunoafinidad sin un tratamiento previo y se analizó por EM-tándem con ionización por electrospray. El sistema consistió de un EM-tándem API-III de doble cuadrupolo, con una interfase de electrospray que se mantuvo a 4.5 kV. Se empleó Argón ultra puro como gas de colisión en la cámara de colisión. La columna de inmunoafinidad fue una HiPac de 3.3 mm X 2.1 mm 30 μ m, que recibía un flujo de 2.5-4 mL/min. La columna analítica fue una C-18 de 150 mm X 4 mm D.I. con un tamaño de partícula de 3 μ m, que recibía un flujo de 2 mL/min. Las dos columnas estaban conectadas a través de una precolumna C-18 de 15 mm X 5 mm con un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil residió de Acetonitrilo (ACN)/Metanol (C₂H₅OH)/Amortiguador de acetatos 5mM pH = 4.7 (20%/20%/60%) que fue mantenida a una velocidad de flujo de 2 mL/min.

El método propuesto fue probado para determinar LSD, iso-LSD, nor-LSD, iso-nor-LSD, etil-LSD y nor-alil-LSD (Figura 19) en orina a una concentración de 10 partes por trillón (ppt). Lo primero que realizaron fue obtener cromatogramas de un blanco y de muestras de orina con los analitos anteriores, pero detectándolos por ultravioleta (UV). Al comparar los cromatogramas se observó la completa obstrucción de la señal de los analitos por interferencias significativas procedentes de la matriz, por lo que el detector de UV fue incapaz de proporcionar la selectividad y sensibilidad para el análisis de cantidades trazas de los analitos en orina. De igual manera obtuvieron cromatogramas con un sistema acoplado a espectrometría de masas, manejado en la modalidad de monitoreo selectivo de iones, de los cuales solo nor-alil-LSD fue detectado. Aunque la modalidad de monitoreo selectivo de iones proporciona cierto grado de selectividad, esta aun no es suficiente para detectar cantidades trazas de los componentes en muestras de orina sin previo tratamiento. El experimento anterior se repitió en la modalidad de monitoreo selectivo de reacción. De este forma fue posible obtener los perfiles cromatográficos esperados para cada analito, lo que demostró que es posible detectar cantidades trazas de los componentes en orina sin un tratamiento adicional. En este trabajo lo que se busco comprobar fue la utilidad de la extracción por

inmunoafinidad de LSD y algunos análogos; aunque los resultados previos son prometedores, todavía falta optimizar el método y desde luego validarlo para cada compuesto a ser analizado.⁴⁸

	PM	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
LSD	323	CH ₃	H		H
iso-LSD	323	CH ₃	H	H	
nor-LSD	309	H	H		H
iso-nor-LSD	309	H	H	H	
etil-LSD	295	CH ₃	H		H
nor-alil-LSD	349	CH ₂ CH=CH ₂	H		H

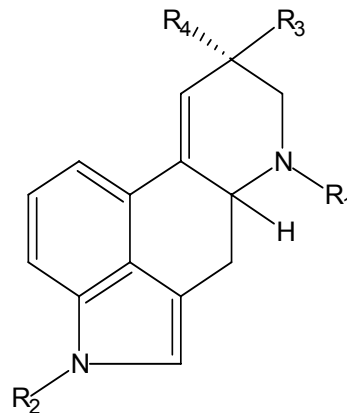


Figura 19. Estructura del LSD y algunos de sus análogos.

Hoja H. y col.⁴⁹ definieron un método sensible y específico para la determinación de LSD y nor-LSD en orina, después de la EFS, empleando CLAE-EM con una interfase de ionización por electrospray. El sistema de CLAE-EM consistió de una columna analítica Nucleosil C-18 de 150 mm X 1 mm D.I., en la que se empleó una fase móvil que consistió de una mezcla de formiato de amino (HCOONH₄) 2 mM pH 6.4-Acetonitrilo (ACN) (70:30 v/v) a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. El espectrómetro de masas fue un API-100 Perkin Elmer-Sciex equipado con una interfase de ionización de electrospray. El nitrógeno (N₂) de alta pureza fue usado como gas nebulizador y el voltaje aplicado de 20 a 70 V.

El procedimiento de validación del método radicó en la determinación de la exactitud expresada como por ciento de recobro, la precisión intra-análisis se evaluó a las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 20 ng/mL por sextuplicado para cada nivel el mismo día y la precisión intermedia se evaluó a las concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 20

ng/mL por sextuplicado, por un total de cinco días; todos los parámetros anteriores se realizaron tanto para LSD y nor-LSD. Lo primero que efectuaron fue experimentar con varias mezclas de disolventes para obtener un extracto lo más puro posible. Con la mezcla de éter dietílico ((C₂H₅)₂O):tolueno (C₆H₅CH₃) (6:4 v/v), se consiguieron los mejores porcentajes de extracción y la pureza requerida para ambos analitos. Los porcentajes de extracción obtenidos a 1, 10 y 20 ng/mL fueron respectivamente de 93.3 % (C.V.= 6.3 %), 93.2 % (C.V.= 8.2 %) y 98.2 % (C.V.= 4.1 %) para LSD y de 78.4 % (C.V.= 8.8 %), 79.7 % (C.V.= 10.1 %) y 84.4 % (C.V.= 4.3 %) para nor-LSD. La precisión intra-análisis fue excelente para LSD con C.V. de 9.0, 3.6, 5.1 y 4.7 % y para nor-LSD los C.V. fueron de 13.2, 8.7, 7.5 y 4.6 %, respectivamente para las concentraciones evaluadas. La precisión intermedia para LSD implicó C.V. menores del 14 % para todas las concentraciones y la exactitud se encontró entre un recobro del 94.7 al 107.4 %. Para nor-LSD la exactitud se encontró valores de recobro entre el 85.9 al 118.8 %; en cuanto a la precisión los valores obtenidos de C.V. fueron satisfactorios, con excepción de la concentración de 0.05 ng/mL que presentó un C.V. mayor al 20 %. Tomando en consideración los resultados anteriores y los criterios establecidos, se obtuvieron así LDD y LDC de 24 y 50 pg/mL para LSD y de 30 y 100 pg/mL para nor-LSD; los coeficientes de correlación obtenidos para ambos compuestos fueron de 0.999. Los resultados obtenidos por medio del método anteriormente presentado, lo ubicaron entre los más sensibles, mediante el uso de un solo espectrómetro de masas.⁴⁹

White AS. y col.⁵⁰ presentaron un método para la cuantificación de LSD en orina en donde la preparación de la muestra implicó la EFS, para su posterior análisis por CLAE-EM con interfase de ionización por electrospray. El sistema de CLAE-EM estuvo conformado por un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer, con una columna C-18 de 12.5 cm X 3 mm D.I. con un tamaño de partícula de 3 μm, a través de la cual fluyó la fase móvil de amortiguador de acetatos 0.1 M pH = 4.8-Acetonitrilo-Trietilamina (75:25:0.25 v/v/v) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. El espectrómetro de masas fue un Finnigan SSQ7000 equipado con una interfase de ionización de electrospray. Los autores reiteran que a pesar de que varios métodos previos por cromatografía de líquidos para la determinación de LSD que incorporan amortiguadores de fosfatos en la

fase móvil, no deberían de emplearse éstos en la preparación de la fase móvil, pues son sales no volátiles que causan complicaciones en el análisis. Por lo tanto, los buffer de fosfatos son siempre evitados y se prefieren los de acetatos. Una curva de calibración se evaluó en el rango de 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 ng/mL, de la cual se obtuvo una pendiente, un intercepto y un coeficiente de correlación de 0.0604, 0.0827 y 0.998, respectivamente. El método fue probado mediante el análisis de dos grupos de muestras, en el primer grupo se contaba con una cantidad del analito y el segundo grupo no contenía cantidad alguna del analito. Después del análisis de las muestras los resultados obtenidos no presentaron una diferencia significativa, entre los valores medidos y la concentración real con un límite de confianza del 95 % y en las muestras que no poseían analito no se detectó.

En un trabajo interesante realizado por Poch KG. y col.⁵¹ se re-analizaron 74 muestras de orina en las que previamente se había determinado la presencia de LSD, a través de un "screening" por RIA con una concentración de corte de 500 pg/mL y su confirmación por CG-EM con una concentración de corte de 200 pg/mL. Después de su almacenamiento en congelación por un año, estas muestras que contenían cantidades detectables de LSD se descongelaron y re-analizaron como se describe a continuación: para LSD e iso-LSD por CG-EM y para nor-LSD y O-H-LSD por CLAE-EM-tándem.

En la extracción de LSD e iso-LSD para su análisis por CG-EM a las muestras de orina se les realizó un tratamiento inicial con disolventes y posteriormente purificadas por EFS. El sistema de CG-EM estuvo conformado por un cromatógrafo de gases HP 5890 acoplado a un espectrómetro de masas 5970 de ionización por impacto electrónico. Como gas acarreador se empleó helio y se usó a una velocidad de flujo de 30 mL/min. La temperatura del inyector y de la línea de transferencia fue de 245 °C y 293 °C, respectivamente. La columna capilar empleada fue una HP 5 de 12 m X 0.25 mm D.I., con una capa de recubrimiento de 0.25 µm. El programa de temperatura inició a 193 °C por 0.5 min, y se aumentó a 293 °C a 20 °C/min. y se mantuvo por 5 min. Los LDD y LDC para LSD e iso-LSD obtenidos fueron de 100 y 200 pg/mL, respectivamente.⁵¹

En la extracción de nor-LSD y O-H-LSD para su análisis por CLAE-EM-tándem a las muestras de orina se les realizó el mismo tratamiento que el indicado anteriormente. El sistema de CLAE-EM-tándem consistió de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia HP 1050 con una columna analítica Eclipse XDB-C-18 de 150 mm X 4.6 mm D.I., con un tamaño de partícula de 3.5 μm . A través de la cual fluyó la fase móvil que consistió de una mezcla de amortiguador de acetatos 0.01M (pH 4.8):Acetonitrilo (80:20 v/v) y un 0.02 % de trietilamina a 0.8 mL/min. El EM-tándem se encontraba equipado con una interfase de ionización química a eficiencia atmosférica en la cual el nitrógeno (N_2) se usa como gas de colisión. La temperatura del capilar de interfase fue de 150 $^{\circ}\text{C}$.⁵¹

Con los resultados obtenidos se concluyó que el LSD puede ser detectado y cuantificado por CG-EM, con una concentración de corte de 200 pg/mL, sin embargo su detección en orina debe realizarse entre las primeras 12 a 22 h. Al realizar el análisis de las 74 muestras se obtuvo una concentración media de 444.5 pg/mL para LSD en un rango de 37 a 2541 pg/mL. La concentración media determinada para iso-LSD fue de 749.5 pg/mL de un rango de 0-7540 pg/mL. Al realizar una curva de calibración de iso-LSD, obtuvieron que fue lineal en el rango de 200 a 1000 pg/mL con un coeficiente de correlación de 0.9896. Para O-H-LSD la curva de calibración fue lineal en el rango de 0.4 a 2000 ng/mL ($r^2=0.9834$), con un LDD y LDC de 200 pg/mL y 400 pg/mL, respectivamente. De todas las muestras analizadas para nor-LSD, sólo en 15 fue posible determinar a este metabolito, con una concentración media de 490 pg/mL de un rango de 0 a 2185 pg/mL. La concentración media que obtuvieron de O-H-LSD fue de 14440.5 pg/mL de un rango de 425-201808 pg/mL. Con este estudio se reiteraron varias conclusiones importantes, en primer lugar el iso-LSD es solo detectado en 64 muestras, sólo nueve muestras de las 15 en la que se determinó nor-LSD contenían este metabolito a una concentración mayor a 200 pg/mL; mientras que todas las muestras contenían O-H-LSD a concentraciones significativamente mayores que cualquiera de los otros analitos y dado a que este es un metabolito de la biotransformación del LSD, resulta factible encaminar los análisis en la detección y cuantificación del O-H-LSD que indicaría el uso de este agente alucinógeno.⁵¹

Canezin J. y col.⁵² desarrollaron y validaron un método para la determinación de LSD e iso-LSD, después de un solo paso de ELL en orina por CLAE-EM-tándem. EL instrumento de CLAE-EM-tándem consistió de un EM-tándem equipado con un doble cuadrupolo API 300 Perkin-Elmer SCIEX el cual esta conformado con una interfase de ionización por electrospray, ajustado a un voltaje a 5.2 kV, con un voltaje de extracción de ión a 60 V y una energía de fragmentación de 27 eV. El nitrógeno (N₂) se empleó como gas nebulizador, cortante y de colisión. En el cromatógrafo de líquidos se utilizó una columna analítica Spherisorb 5RP 8S de 100 mm X 2.1 mm D.I., con un tamaño de partícula de 5 μm. La fase móvil fue constituida de una mezcla de agua (H₂O):Acetonitrilo (ACN) (40:60 v/v) que contenía 0.1 % de ácido fórmico y formiato de amonio 2mM, con una velocidad de flujo de 0.4 mL/min.

En este trabajo la validación se realizó para LSD e iso-LSD, determinando la linealidad, limite de cuantificación, el recobro, la precisión intra-día e inter-día y la exactitud en una matriz de orina. Las curvas de calibración para cada analito fueron lineales en el rango de 10, 20, 40, 100, 400, 1000, 2000 y 4000 pg/mL, con coeficientes de correlación mayores a 0.998. El LDC establecido para LSD e iso-LSD fue de 20 pg/mL. El recobro de seis muestras de orina para LSD e iso-LSD se encontró entre el 80 y 100 %. Los datos de precisión son determinados a tres concentraciones (20, 200 y 2000 pg/mL), los C.V. intra-día, calculados para seis replicas de cada punto en un sólo día, son menores al 11 % tanto para LSD e iso-LSD; para inter-día, calculados en seis días diferentes para cada punto, son menores al 10 %. La exactitud conseguida para seis determinaciones a tres concentraciones (20, 200 y 2000 pg/mL) se encuentra entre el 88 % y 110 % para LSD e iso-LSD. Una vez que el método analítico fue validado se empleó el método para la determinación de LSD e iso-LSD en muestras de orina procedentes de dos casos. En el caso 1 se encontró LSD e iso-LSD a concentraciones en orina de 1300 pg/mL y 820 pg/mL, respectivamente. En el caso 2 se localizó LSD e iso-LSD a concentraciones en orina de 240 pg/mL y 600 pg/mL, respectivamente.⁵²

3. Propuesta de un método para la determinación de O-H-LSD en orina por Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia acoplado a Espectrometría de Masas.

El análisis de orina para la determinación y cuantificación de LSD es difícil, debido principalmente a varios factores entre los que se encuentran: (1) las dosis bajas consumidas (40 a 150 μg); (2) su extenso metabolismo, por lo que solo menos de 1 % de la droga se excreta sin cambios y (3) tiene un tiempo de vida media corta (3.6 h). En conjunto, estos factores contribuyen a que el tiempo de detección sea corto (12-22 h), cuando se destina al LSD como analito blanco. Los métodos de mayor aplicación para la determinación y cuantificación de LSD, son la CG-EM o CG-EM-tándem, a pesar de que el LSD es poco volátil y tiende a sufrir absorción irreversible en la columna durante la separación; por tal motivo existe la necesidad de formar un derivado para poder ser analizado. Recientemente, se ha buscado alternativas para superar estas complicaciones, entre las más sobresalientes encontramos la conversión del subproducto iso-LSD a LSD, que se encuentra en algunas muestras para incrementar la concentración de LSD y solamente un método se ha reportado para establecer el uso de LSD por medio de la determinación del O-H-LSD, su mayor metabolito como lo han demostrado los estudios más recientes.⁵³⁻⁵⁵

De esta manera han surgido los métodos por CLAE con detector de fluorescencia para determinar LSD, pero aunque se pueden lograr límites de detección por debajo de 1 ng/mL, estos carecen de la especificidad que se puede lograr al compararlos con los equipos acoplados a EM. Con base en estas limitaciones, recientemente se han realizado grandes esfuerzos, encaminados a identificar y caracterizar a los metabolitos del LSD que se eliminan en orina a concentraciones mayores. Específicamente, han surgido métodos por CLAE-EM-tándem y CLAE-EM, con interfase de ionización química a presión atmosférica para la detección y cuantificación de O-H-LSD en orina. El O-H-LSD es el principal metabolito del LSD y se ha comprobado que se encuentra a concentraciones mayores en orina, no se forma durante los procesos de extracción de la muestra, el proceso analítico o como resultado de la degradación de LSD en muestras de orina.

Además, estudios recientes han demostrado que su estabilidad es similar o inclusive mejor a la del LSD en orina.⁵³⁻⁵⁵

Reactivos.

Todos los reactivos y disolventes empleados deben ser grado analítico o grado CLAE. El 2-oxo-3-hidroxi-Dietilamida del ácido lisérgico (O-H-LSD) y 2-oxo-3-hidroxi-Metilpropilamida del ácido lisérgico (O-H-LAMPA) como estándar interno deben ser estándares primarios. Durante el desarrollo experimental es importante evitar toda fuente de radiación luminosa directa.

Procedimiento de extracción.

En un tubo de vidrio de 150 mm X 20 mm que contenga 5 mL de orina añadir 20 μ L del estándar interno O-H-LAMPA a 4000 pg/mL, 250 mg de cloruro de sodio (NaCl) y 0.1 mL de hidróxido de amonio (NH₄OH) concentrado para alcalinizar la orina a pH de 10. Agregar 5 mL de una mezcla de cloruro de metileno/isopropanol (85:15 v/v). Mezclar en Vortex por 30 s. y en una plataforma giratoria por 30 min a 60 ciclos/min. Posteriormente centrifugar a 2500 rpm por 15 min. Separar la capa orgánica y evaporar bajo corriente de nitrógeno (N₂) a 45 °C hasta sequedad. Reconstituir el extracto con 2 mL de fase móvil constituida por formiato de amonio (HCOONH₄) 20 mM pH = 6.5 y metanol (CH₃OH) en una proporción de 70:30 v/v. Inyectar un volumen de 90 μ L en el equipo para su análisis por CLAE-EM. El diagrama siguiente muestra este proceso:

Comentario [GRR21]: La composición en solutos de la orina (1200mL) es de glucosa <0.02g, aminoácidos 0.5g, amoníaco 0.8g, urea 25g, creatinina 1.5g, ácido úrico 0.7g, H⁺ pH 5-8, Na⁺ 3, K⁺ 1.7, Ca²⁺ 0.2, Mg²⁺ 0.15, Cl⁻ 6.3, Fosfato 1.2, Sulfato 1.4 y Bicarbonato 0-3.

5 mL de orina en un tubo de vidrio de 150 X 20 mm



20 μ L de estándar interno (O-H-LAMPA a 4000 pg/mL)



250 mg de cloruro de sodio (NaCl)



0.1 mL de hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH)



5 mL de una mezcla de cloruro de metileno :isopropanol (85:15 v/v)



Agitar 30 s en vortex



Agitar en plataforma giratoria 30 min a 60 ciclos/min



Centrifugar a 2500 rpm por 15 min



Separar la capa orgánica y evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno (N_2) a 45 °C



Reconstituir el extracto con 2 mL de Fase Móvil e inyectar 90 μ L en el CLAE

Equipo y condiciones de análisis.

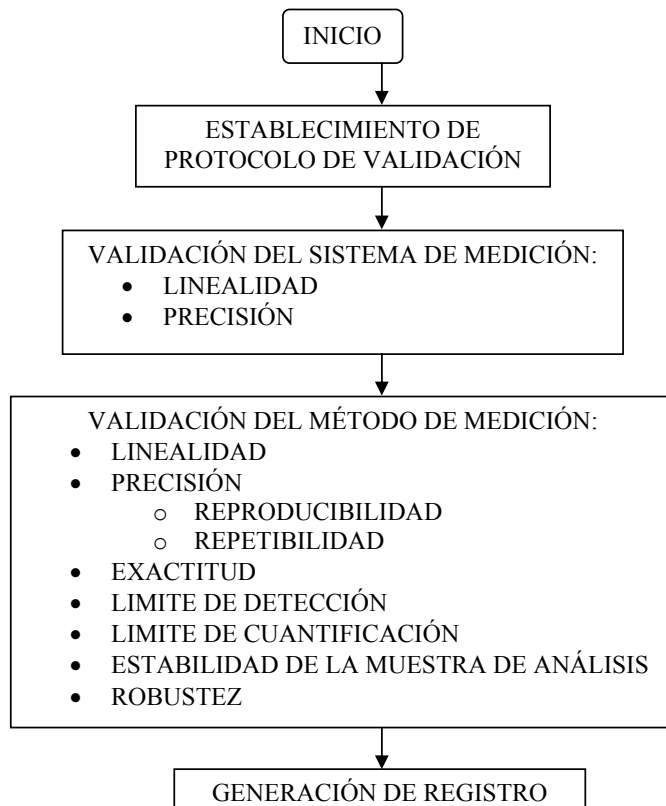
El análisis se realiza en un CLAE equipado con una columna analítica C18 de 150 mm X 4.6 mm con un tamaño de partícula de 3.5 μm ., acoplado a un EM de cuadrupolo equipado con una interfase de ionización a presión atmosférica. El control del instrumento y proceso de la señal es realizado por el software disponible. Como fase móvil se utilizara una mezcla de formiato de amonio(HCOONH_4)/ 20 mM pH = 6.5 y metanol (CH_3OH) en una proporción de 70:30 v/v; con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min durante 10min. La ionización química a presión atmosférica se lograra mediante el empleo de nitrógeno (N_2) como gas complementario y de colisión a una presión de 60 psi. La temperatura del vaporizador y del capilar se mantendrá a 450 °C y 350° C, respectivamente. La descarga empleada en la aguja corona será de 4.0 μA . Los fragmentos que se esperan se seleccionaran a 140 V para m/z de 237, 130 V para m/z de 338 y 100 V para m/z de 356. Con las condiciones descritas se espera obtener un tiempo de retención aproximado para O-H-LSD de 7.828 min. y para O-H-LAMPA de 8.591 min.

Las principales ventajas que presenta la aplicación del método propuesto, mediante la utilización de tecnología por cromatografía de líquidos de alta eficiencia y espectrometría de masas son: la confirmación del uso de LSD, a partir del análisis de 2-oxo-3-hidroxi-LSD como analito blanco, de manera más rápida y efectiva, mediante la aplicación de un método analítico en el cual el tiempo de preparación de muestra, abarcando desde la extracción, la purificación y la reconstitución con fase móvil para ser inyectada, comprende solo una hora, más 10 minutos requeridos en la corrida analítica. Además, la eliminación de la necesidad de la formación de un derivado reduce significativamente el tiempo de preparación de la muestra para su análisis, lo que permite una verificación rápida de O-H-LSD, en aquellas muestras que han sido previamente establecidas con un presunto positivo mediante el empleo de un inmunoanálisis. Al emplear un espectrofotómetro de masas se puede asegurar con exactitud la identificación de O-H-

LSD mediante el tiempo de retención y la proporción de los iones producto. Es importante considerar que los reactivos y disolventes empleados en la preparación de la muestra y fase móvil son de uso común en cualquier laboratorio, por lo que no habría problemas en la obtención de los mismos; así mismo el reciente aumento de la aplicación de esta tecnología en el análisis de compuestos orgánicos a conducido a la consiguiente reducción de costos de los equipos.

4. Propuesta de procedimiento general de validación del método analítico para O-H-LSD en orina por CLAE-EM.

4.1. DIAGRAMA DE FLUJO.



4.2. DESARROLLO.

4.2.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN.

De inicio, proceder a llevar a cabo la calificación de instalación del instrumento de medición, considerando todos aquellos factores mecánicos, eléctricos y electrónicos que pudieran afectar el desempeño del instrumento, a saber:

- Adecuación de la instalación eléctrica.
- Tuberías, conexiones, entradas de servicios.
- Celdas, detectores, potencia de lámparas.
- Estándares de calibración adecuados.
- Adecuabilidad del sistema. Llevar a cabo pruebas de adecuabilidad (funcionamiento exacto de componentes del equipo), de acuerdo con lo consignado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª edición, las guías de validación FDA o las especificaciones del fabricante del instrumento.

4.2.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICIÓN.

Para determinar si la relación entre concentración y respuesta es lineal. Preparar curvas patrón de O-H-LSD a las concentraciones de 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2500 ng/mL. Analizar todas las diluciones preparadas en un mismo día por triplicado en las condiciones señaladas. Una vez obtenidos resultados, llevar a cabo la correlación de la respuesta vs. la concentración del analito. Obtener el coeficiente de determinación, pendiente y ordenada al origen de cada curva.

Los criterios de aceptación son: El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98, pendiente mayor a cero, ordenada al origen igual a cero y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración no debe ser mayor al 2.0 %.

4.2.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN.

Para determinar el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición. Se analizan en un mismo día por quintuplicadas diluciones de O-H-LSD a la concentración de 500 ng/mL.

El criterio de aceptación es: El coeficiente de variación para el nivel de concentración no debe ser mayor al 2.0 %.

4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN.

4.3.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO DE MEDICIÓN.

Es la relación que se establece por medio de una recta, entre una propiedad medible (cantidad recuperada) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada). Preparar curvas patrón de O-H-LSD a las concentraciones de 400, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 pg/mL. Analizar todas las diluciones preparadas en tres días diferentes por quintuplicado en las condiciones señaladas. Una vez obtenidos resultados, llevar a cabo la correlación de la respuesta vs. la concentración del analito. Obtener el coeficiente de determinación, pendiente y ordenada al origen de cada curva.

Los criterios de aceptación son: El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98, pendiente mayor a cero, ordenada al origen igual a cero y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración no debe ser mayor al 15.0 %.

4.3.2. PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN.

Es el grado de concordancia relativa entre resultados individuales de una muestra homogénea del producto. La precisión es también una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

4.3.3. REPETIBILIDAD.

Con el fin de determinar la repetibilidad del método de medición, comparar las respuestas obtenidas en 5.3.1. a cada nivel de concentración y calcular el valor de coeficiente de variación a cada nivel.

El criterio de aceptación es: El valor de coeficiente de variación no debe ser mayor a 15.0 %.

4.3.4. REPRODUCIBILIDAD.

Con el fin de determinar la reproducibilidad del método de medición, comparar la población de respuestas obtenidas en 5.3.1. a cada nivel de concentración con la población de respuestas obtenidas en cada nivel de concentración al desarrollar 5.3.1. en otro día.

El criterio de aceptación es: Las poblaciones de respuestas no deben ser diferentes y el coeficiente de determinación para cada nivel de concentración no debe ser mayor al 15.0 %..

4.3.5. EXACTITUD DEL MÉTODO DE MEDICIÓN.

Para determinar si existe concordancia absoluta entre el porcentaje recuperado y el porcentaje adicionado en este parámetro se toman los resultados obtenidos en repetibilidad y reproducibilidad.

El criterio de aceptación es: Las concentraciones encontradas de la media para cada nivel de concentración deben estar dentro del $\pm 15.0 \%$ del valor nominal de concentración.

4.3.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN.

Con las soluciones preparadas en 5.3.1. y a partir de los cálculos de exactitud y repetibilidad, determinar la concentración del analito donde todavía se mantiene la linealidad, precisión y exactitud en la determinación.

Si en todos los niveles de la curva se mantienen los parámetros mencionados, tomar la solución de menor concentración y llevar a cabo diluciones 1:1 en concentración decreciente, hasta obtener el valor de concentración donde se pierda alguno de los parámetros. Dicha concentración es el límite de detección. La concentración mínima donde se mantienen exactitud, linealidad y precisión es el límite de cuantificación.

4.3.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

4.3.7.1. ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE MESA DE TRABAJO.

Las muestras empleadas en 5.3.1. deben guardarse en la mesa de trabajo y ser analizarlas de nuevo a la mitad y final del día, es decir a los tiempos 0, 12 y 24 horas.

Determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en las respuestas obtenidas a partir de estas muestras en relación con su tiempo de permanencia en condiciones de trabajo. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15.0 % y el valor de la media debe caer dentro del ± 15.0 % del valor nominal para cada nivel.

4.3.7.2. ESTABILIDAD EN REFRIGERACIÓN.

Preparar las muestras indicadas en el punto 5.3.1. y analizarlas. Guardar dichas muestras en refrigeración durante 15 días y analizar las muestras al quinceavo día.

Determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en las respuestas obtenidas a partir de estas muestras en refrigeración. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15.0 % y el valor de la media debe caer dentro del ± 15.0 % del valor nominal para cada nivel.

4.3.7.3. ESTABILIDAD EN CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.

Preparar las muestras indicadas en 5.3.1. y guardar dichas muestras en congelación. Descongelar totalmente los días 6 y 12; y analizar las muestras cada día.

Determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en las respuestas al someter las muestras en matriz biológica a ciclos de congelación-descongelación. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15.0 % y el valor de la media debe caer dentro del ± 15.0 % del valor nominal para cada nivel.

4.3.8. ROBUSTEZ.

Preparar las soluciones a las concentraciones de 500, 2000 y 8000 ng/mL. Analizar las muestras por triplicado considerando cambios en los factores analíticos. Por ejemplo:

- Cambio de $\pm 2.5 \%$ en la proporción de metanol en la fase móvil.
- Cambio de ± 0.1 mL/min en velocidad de flujo de la fase móvil.

El criterio de aceptación es: El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15.0 % y el valor de la media debe caer dentro del $\pm 15.0 \%$ del valor nominal para cada nivel de concentración.

6. CONCLUSIONES.

Los métodos desarrollados para la cuantificación de drogas en fluidos biológicos, son de gran importancia para establecer un dictamen acertado sobre el uso de las mismas, ya que a un que se dispone de pruebas rápidas de realizar y de bajo costo, estas sólo proporcionan un positivo presuntiva del uso de la droga, puesto que estas técnicas presenta el inconveniente de exhibir falsos positivos en la presencia de otras drogas o compuestos relacionados estructuralmente, así como la necesidad de que el analito a determinar se encuentre en concentraciones relativamente altas, que en muchas ocasiones no se encuentran dependiendo de la matriz biológica empleada, por lo que se debe contar con métodos confirmatorios que permitirán determinar y cuantificar con precisión y exactitud la droga de abuso empleada. Por esta razón se propuso un método para cuantificar el 2-oxo-3-hidroxi-LSD en orina, él metabolito de la droga alucinógena conocida mundialmente como LSD, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas.

El haber elegido la técnica por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el desarrollo y validación del método se deben a las características fisicoquímicas que posee el 2-oxo-3-hidroxi-LSD, ya que es una molécula polar que permite fácilmente su análisis por esta técnica que acoplada a la espectrometría de masas, permite detectar cantidades considerablemente pequeñas en orina, con la exactitud y precisión necesaria para un análisis químico en química legal, ya que los resultados obtenidos darán la pauta en dictaminar que algún persona sea culpable de algún delito, de la muerte de terceros o de la misma persona debido al consumo de la droga de abuso; en base a la sensibilidad, resolución, selectividad y rango de masas que se puede manejar con el espectrómetro de masas. Para reducir las perdidas que se tengan del analito durante la extracción se selecciono la adición de un estándar interno a un volumen y concentración igual en todas las muestras, con lo que dichas perdidas quedaran compensadas con una pérdida igual al estándar ya que los resultados se expresan como la relación del área del analito entre el área del estándar interno. Como un estándar debe cumplir con ciertas características como ser químicamente similar a la sustancia de interés, estable y no

interferir con los picos de interés. En nuestro caso se eligió el 2-oxo-3-hidroxi-metilpropilamida del ácido lisérgico(O-H-LAMPA) como estándar interno, el cual proporcionó buenos resultados.

En relación al procedimiento de extracción y condiciones de análisis se eligieron las más adecuadas para tener un tiempo de retención aproximado para O-H-LSD de 7.828 min. y para O-H-LAMPA de 8.591 min. Además, se propone un protocolo de validación para el método desarrollado que cumple con los parámetros mínimos sugeridos. Por lo tanto el método analítico puede ser implementado y usado de manera confiable en el análisis de muestras de orina con la finalidad de concluir el uso del LSD, por la determinación y cuantificación de su metabolito O-H-LSD.

7. GLOSARIO

α	Factor de separación
ACN	Acetonitrilo
Alcaloides	Son un grupo de compuestos débilmente alcalinos que contienen nitrógeno, y son en su mayoría de origen vegetal; poseen una complejidad molecular moderada que produce varios efectos fisiológicos en el cuerpo
amu o dalton	unidades atómicas de masa
Antagonismo	Ocurre cuando la actividad selectiva de un fármaco se bloquea por acción de otros agentes que bloquean los receptores. Se considera que tales agentes bloqueadores específicos tienen una gran afinidad por el receptor, pero tienen poca o ninguna actividad intrínseca
Antagonismo competitivo	Se refiere a que la respuesta a una dosis particular del agonista quedara reducida o bloqueada por un antagonista, una mayor dosis del agonista podría superar tal bloqueo, y ser eficaz
CLAE-EM	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas
CLAE-DF	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia
CG-EM	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas
CG-EM-tándem	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de masas en tándem
CLAE-EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de Masas
CLAE-EM-tándem	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de masas en tándem
Cromatograma	Es un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen del efluente o <i>tiempo</i>
Droga	Sustancia que produce cambios fisiológicos y psicológicos en el organismo y que es utilizada sin un fin terapéutico

Estereoisómeros	Son moléculas que tienen la misma fórmula empírica, pero presentan una disposición distinta de los átomos en el espacio. Los estereoisómeros se diferencian en sus propiedades físicas y químicas y gracias a ello se pueden separar. La isomería óptica es un tipo importante de estereoisomería (enantiómeros) y se produce cuando un compuesto contiene un centro de asimetría
Espectros de masas	Gráfico que muestra la abundancia relativa de los iones producidos en el eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se expresa la relación m/z , m en unidades atómicas de masa, dividida por el número de cargas que lleva el ión z , que llegan al detector en un espectrómetro de masa
Fármaco	Sustancia química empleado en el tratamiento o prevención de enfermedades
Farmacodependencia	Se refiere a la necesidad de recibir en forma periódica o continua un agente químico denominado droga
Ig	Inmunoglobulina y existen cinco diferentes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD producidas y segregadas por los linfocitos B de los mamíferos en respuesta a la presencia de un antígeno en el organismo
Isótopo	Una de las dos o más variedades de un átomo que tienen el mismo número atómico, constituyendo por tanto el mismo elemento, pero que difieren en su número másico. Puesto que el número atómico es equivalente al número de protones en el núcleo, y el número másico es la suma total de protones y neutrones en el núcleo, los isótopos del mismo elemento sólo difieren entre ellos en el número de neutrones que contienen
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
Metabolismo	Conjunto de reacciones químicas que tienen lugar dentro de las células de los organismos vivos, las cuales transforman energía, conservan su identidad y se reproducen
Orina	Líquido excretado por los riñones a través de las vías urinarias, con el cual se eliminan sustancias innecesarias para el organismo. Desempeña un papel importante en la regulación del balance de líquidos y electrolitos y del equilibrio entre ácidos y bases. En las

personas sanas es clara y de color ambarino con un pH de 5 a 8. La cantidad de orina producida diariamente es de 1 a 1,5 litros, valor que aumenta si se ingieren muchos líquidos y disminuye en caso de sudoración intensa

OMS	Organización Mundial de la Salud
Psicoactiva	Una droga es llamada psicoactiva o psicotrópica porque inducen cambios en la "psique", es decir, en las funciones nerviosas consideradas como superiores como la conducta. En general las drogas psicoactivas pueden agruparse en 1) estimulantes, 2) con efectos combinados euforizantes, depresores y de cambios en la percepción sensorial y 3) alucinógenas
<i>nor</i> -LSD	nor-desmetil-dietilamida del ácido lisérgico
2-oxo-LSD	2-oxo-dietilamida del ácido lisérgico
O-H-LSD	2-oxo-3-hidroxi-dietilamida del ácido lisérgico
13-OH-LSD-glucurónico	13-hidroxi-dietilamida del ácido lisérgico-glucurónico
14-OH-LSD-glucurónico	14-hidroxi-dietilamida del ácido lisérgico-glucurónico
O-H-LAMPA	2-oxo-3-hidroxi-Metilpropilamida del ácido lisérgico
<i>t_r</i>	Tiempo de retención
<i>t_o</i>	Tiempo muerto
<i>t'_r</i>	Tiempo de retención ajustado
<i>u</i>	Velocidad lineal
<i>W_b</i>	Ancho a la base
<i>W_{1/2}</i>	Ancho a la mitad de la altura
<i>N</i>	Número de platos teóricos
<i>K</i>	Constante de distribución, razón de distribución o coeficiente de distribución
<i>k'</i>	Factor de capacidad
<i>α</i>	Factor de selectividad
<i>R</i>	Resolución
RIA	Radioinmunoanálisis
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas Valencia MT. Identificación de precursores e intermediarios químicos en la síntesis de anfetaminas para investigar laboratorios clandestinos [Tesina licenciatura]. México, D. F.: UNAM Fes. Zaragoza; 2003: 1-3.
2. Gisbert Calabaig JA. Medicina legal y toxicología. 4ª edición. México, D. F.: Massan-Salvat; 576-608.
3. Cole MD, Caddy B. The analysis of drugs of abuse: an instruction manual. Primer edition. USA New York: Ellis Horwodd; 1995: 61-165.
4. Pérez Reyes O. Propuesta de un método para identificar y cuantificar psilocibina por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas [Tesina licenciatura]. México, D. F.: UNAM Fes. Zaragoza; 2003: 1-23.
5. Valbuena BA, Alamo GC. Avances en toxicomanías y alcoholismo: Aspectos conceptuales, farmacológicos, clínicos-terapéuticos y médicos-legales. Primera edición. México, D. F.: Servicio de publicaciones; 1996: 26-28.
6. Pasantes H. De neuronas, emociones y motivaciones. Primera edición. México, D. F.: La ciencia para todos; 1997: 81-108.
7. Martín Velasco A, Gonzáles Álvarez FJ. Compendio de psicofarmacología. Primera edición. Madrid España: Ediciones Díaz de Santos; 1988: 165-175.
8. Ellenhorn JM, Bareloux GD. Medical toxicology diagnosis treatment of human poisoning. Primer edition. E. U. A. New York: Elsevier; 1988: 664-671.
9. Kleaassen DC. Toxicology: the basic science of poisons. Fifth edition. USA New York: Mc Graw-Hill; 1996: 951-966.
10. Jones LA, Dargon IP. Churchill's pocketbook of toxicology. Primer edition. Philadelphia St. Louis Sydney Toronto: Churchill Livingtone; 2001: 2-29, 63-65.
11. Fenton JJ. Toxicology a case-orineted approach. Primer edition. USA Washington, D.C.: CRC Pres; 2002: 474-479.
12. Page. Curtis. Sotter. Walker. Hoffman. Integrated pharmacology. Second edition. China; 2002: 219-241.
13. Martínez Velasco A. Farmacología. 16ª edición. Madrid España: Interamericana Mc Graw-Hill; 1993: 208-215.
14. Hollister LE, Radouco-Thomas S. Hallucinogens. Primer Edition. USA New York: Elsevier; 1974: 173.
15. Levine B. Principles of Forensic Toxicology. Primer edition. USA New York: CRC Press; 1999:
16. Karch BS. Drug abuse handbook. Primer edition. USA New York: CRC Press; 1998: 20-21, 41-56, 188-189, 491, 552-553.
17. Eckert GW. Introduction to forensic science. Second edition. USA New York: CRC Press; 1997: 107-131.
18. Karch BS. Pathology of drug abuse. Third edition. USA New York: CRC Press; 2002: 281,307-311.
19. Klette LK, Anderson JC, Poch KG. Metabolism of lysergic acid diethylamide (LSD) to 2-oxo-3-hydroxy LSD (O-H-LSD) in human liver microsomes and cryopreserved human hepatocytes. J Anal Toxicol 2000; 24: 550-556.
20. Madden JS. LSD and post-hallucinogen perceptual disorder. Addiction 1994; 89: 762-3
21. Chávez Carpinteyro MJ. Propuesta de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de fitofármaco β -escina en solución [Tesina licenciatura]. México, D. F.: UNAM Fes. Zaragoza; 2003: 16-30.
22. Prado FM, Covarrubias Herrera MR. Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. Primera edición. México, D. F.: CBS; 1996: 1-84.
23. Wilson K, Walker J. Principles and techniques of practical biochemistry. Fifth edition. USA New York: Cambridge University Press;
24. O'Neal LC, Crouch JD, Fatah AA. Validation of twelve chemical spot tests for the detection of drug of abuse. Forensic Sci Int 2000; 109: 189-201.
25. Suzuki O, Seno H, Ishii A. Analytical toxicology. Forensic Sci Int 1996; 80: 137-146.

26. Harris CD. Quantitative chemical analysis. Fifth edition. ASA New Cork: W.H. Freeman and Company; 199: 699-705, 712-748.
27. Dabrio MV, Cromatografía y electroforesis en columna. Primera edición. Barcelona España: Springer-Verlag Ibérica; 2000: 1-19, 265-281.
28. Marquet P, Lachâtre G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1999; 733: 93-118.
29. Reuschel AS, Eades D, Foltz LR. Recent advances in chromatography and mass spectrometry methods for determination of LSD and its metabolites in physiological specimens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1999; 733: 145-159.
30. Skopp G, Pötsch L, Mattern R, Aderjan R. Short-stability of lysergic acid diethylamide (LSD), N-demethyl-LSD and 2-oxo-3-hydroxy-LSD in urine, assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002; 48: 1615-1618.
31. Röhrich J, Zörntlein S, Becker J. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying immunElute columns. *Forensic Sci Int* 2000; 107: 181-190.
32. Fang C, Liu JT, Lin CH. Optimization of the separation of lysergic acid diethylamide in urine by a sweeping technique using micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 775: 37-47.
33. Taunton-Rigby A, Sher ES, Kelley RP. Lysergic acid diethylamide: Radioimmunoassay. *Science* 1973; 181: 165-166.
34. Ratcliffe AW, Fletcher MS, Moffat CA, Ratcliffe GJ, Harland WA, Levitt ET. Radioimmunoassay of lysergic acid diethylamide (LSD) in serum and urine by using antisera of different specificities. *Clin Chem* 1977; 23: 169-174.
35. Fysh RR, Oon MCH, Robinson KN, Smith RN, White PC, Whitehouse MJ. A fatal poisoning with LSD. *Forensic Sci Int* 1985; 28: 109-113.
36. Smith RN, Robinson K. Body fluid levels of lysergide (LSD). *Forensic Sci Int* 1985; 28: 229-237.
37. Altunkaya D, Smith RN. Evaluation of a commercial radioimmunoassay kit for the detection of lysergide (LSD) in serum, whole blood, urine and stomach contents. *Forensic Sci Int* 1990; 47: 113-121.
38. Wiegand FR, Klette LK, Stout RP, Gehlhausen MJ. Comparison of EMIT® II, CEDIA®, and DPC® RIA assays for the detection of lysergic acid diethylamide in forensic urine samples. *J Anal Toxicol* 2002; 26: 519-523.
39. Gagajewski A, Davis KG, Kloss J, Poch KG, Anderson JC, Apple SF. False-positive lysergic acid diethylamide immunoassay screen associated with fentanyl medication. *Clin Chem* 2002; 48: 205-206.
40. Ritter D, Cortese MC, Edwards CL, Barr LJ, Chung DH, Long C. Interference with testing for lysergic acid diethylamide. *Clin Chem* 1997; 43: 635-637.
41. Grobosch T, Lemm-Ahers U. Immunoassay screening of lysergic acid diethylamide (LSD) and its confirmation by HPLC and fluorescence detection following LSD immunElute extraction. *J Anal Toxicol* 2002; 26: 181-185.
42. Buddha DP, John MM, Burbage R, Moy M, Sroka R. Gas chromatographic-electron-impact mass fragmentometric determination of lysergic acid diethylamide in urine. *J chromatogr A* 1990; 529: 103-112.
43. Nelson CC, Foltz LR. Determination of lysergic acid diethylamide (LSD), iso-LSD and N-demethyl-LSD in body fluids by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 1992; 64: 1578-1585.
44. Musshoff F, Daldrup T. Gas chromatographic/mass spectrometric determination of lysergic acid diethylamide (LSD) in serum samples. *Forensic Sci Int* 1997; 88: 133-140.
45. Claekson DE, Lesser D, Paul DB. Effective GC-MS procedure for detecting iso-LSD in urine after base-catalyzed conversion to LSD. *Clin Chem* 1998; 44: 287-292.
46. Sklerov HJ, Kalasinsky SK, Ehorn AC. Detection of lysergic acid diethylamide (LSD) in urine by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 474-478.
47. Reuschel AS, Percey ES, Liu S, Eades MD, Foltz LR. Quantitative determination of LSD and a major metabolite, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 306-312.

48. Cai J, Henion J. On-line immunoaffinity extraction-coupled column capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry: trace analysis of LSD analogs and metabolites in human urine. *Anal Chem* 1996; 68: 72-78.
49. Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Dupuy JL, Lachâtre G. Determination of LSD and N-demethyl-LSD in urine by high-performance liquid coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1997; 692: 329-335.
50. White AS, Catterick T, Harrison EM, Johnston ED, Reed DG, Webb SK. Determination of lysergide in urine by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1997; 689: 335-340.
51. Poch KG, Klette LK, Hallare AD, Manglicmot GM, Czarny JR, McWhorter KL et al. Detection of metabolites of lysergic acid diethylamide (LSD) in human urine specimens: 2-oxo-3-hydroxy-LSD, a prevalent metabolite of LSD. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1999; 724: 23-33.
52. Canezin J, Cailleux A, Turcant A, Le Bouil A, Harry P, Allain P. Determination of LSD and its metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2001; 765: 15-27.
53. Poch KG, Klette LK, Anderson C. The quantitation of 2-oxo-3-hydroxy lysergic acid diethylamide (O-H-LSD) in human urine specimens, a metabolite of LSD: Comparative analysis using liquid chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 170-179.
54. Sklerov HJ, Maglulilo J, Shannon KK, Smith LM. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the detection of lysergide and a mayor metabolite, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, in urine and blood. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 543-549.
55. Klette LK, Horn KC, Stout RP. LC-MS analysis of human urine specimens for 2-oxo-3-hidroxy-LSD: method validation for potential interferants and stability study of 2-oxo-3-hidroxy-LSD under various store conditions. *J Anal Toxicol* 2002; 26: 193-200.
56. Frost M, Köhler H, Blaschke G. Determination of LSD in blood by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1997; 693: 313-319.
57. Frost M, Köhler H. Analysis of lysergic acid diethylamide: comparison of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) with conventional techniques. *Forensic Sci Int* 1998; 92: 213-218.
58. Douglas AS, James JL. Análisis instrumental. Cuarta edición. Madrid España: Mc Graw-Hill; 1994: 731-770.
59. Hinojosa TMA. Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de niveles plasmáticos terapéuticos de ácido valpróico por cromatografía de gases aplicado a un estudio de biodisponibilidad [tesis maestría]. México D.F.: IPN Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.; 1999.
60. Sanchez RJF, Mora GLA. Control de calidad en el laboratorio de química legal. México D.F.; 2003.
61. FDA. (2001). Guidance for Industry. Bioanalytical methods validation.
62. Hokason, G. (1994). A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I: The initial method validation process. *Pharm. Technol.* 18(9), 118-130.
63. Hokason, G. (1994). A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II: Changes and the need for additional validation. *Pharm. Technol.* 18(9), 118-130.
64. Secretaría de Salud (2000). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª Edición. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México.
65. CDER (2000). Guidance for Industry: Analytical methods validation. Food and Drug Administration, USA.