



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DETECCION DE AMFETAMINAS EN CABELLO
POR CROMATOGRAFIA DE GASES

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

APOLINAR ESCOBAR BARRUETA

ASESOR:

M. EN C. FRANCISCO OSCAR GUADARRAMA MORALES



MÉXICO, D.F.

ENERO DE 2009



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

A3 RESUMEN E INTRODUCCIÓN.....	1
A4 OBJETIVOS	4
A5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
A6 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	6
A7 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....	7
A8 TIPO DE ESTUDIO	8
A9 MARCO TEÓRICO.....	9
8.1 Antecedente Histórico.....	9
8.2 Pelo.....	12
8.2.1 Fases del Crecimiento del Pelo.....	14
8.2.2 Velocidad de Crecimiento del Pelo Humano.....	15
8.2.3 Mecanismos de Incorporación de Drogas al Pelo.....	16
8.2.4 Factores que Afectan la Incorporación de Drogas en Pelo.....	18
8.2.5 Pelo Animal.....	19
8.3 Drogas de Diseño.....	20
8.4 Anfetaminas.....	24
8.4.1 Productos Anfetamínicos.....	27
8.4.1.1 Acción Farmacológica.....	27
8.4.1.2 Metabolismo.....	28
8.4.1.3 Influencia de las Isoenzimas Citocromo (CYP).....	30
8.5 Cromatografía de Gases	33
8.5.1 Columna	36
8.5.2 Gas portador.....	37
8.5.3 Detectores.....	38
8.5.4 Acoplamiento de la Cromatografía de Gases a la Espectrometría de Masas	41
8.6 Toma, Conservación y Traslado de la Muestra	41

8.7 Metodología del Análisis.	45
8.7.1 Recolección de la Muestra	45
8.7.2 Eliminación de Impurezas.	45
8.7.3 Extracción	46
8.7.4 Derivatización	46
8.7.5 Análisis por Cromatografía de Gases	
Acoplado a Masas.	47
A10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	50
A11 CONCLUSIONES	51
A12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

A3 RESUMEN

El cabello gracias a sus características, proporciona una alternativa de muestra biológica para la determinación de sustancias y metabolitos, la información que nos brinda ha sido empleada desde hace mucho tiempo para la detección de algunas sustancias tóxicas tales como el plomo.¹ Una de las características que posee el cabello es la capacidad de almacenar dichas sustancias por tiempos prolongados proporcionando un periodo de detección mayor a diferencia de otros medios biológicos. Por lo que, el presente trabajo bibliográfico proporcionará elementos teóricos para determinar la viabilidad del análisis de amfetaminas en cabello; así como su cuantificación y dar los conceptos necesarios para proponer una metodología experimental por cromatografía de gases.²

INTRODUCCIÓN

El cabello posee ciertas características de mucho valor en una investigación criminalística o judicial tales como la resistencia a la putrefacción, conservación de su estructura aun después de un tiempo prolongado, absorción e impregnación de olores, entre otras.

En 1857, Lassaige fue uno de los primeros en publicar un trabajo para ayudar a la investigación judicial (examen físico de los cabellos), el cual hacía referencia a un estudio microscópico sistemático. En 1869, el Profesor Prfaff sentó las bases para el estudio científico del cabello en su libro “El Pelo Humano y su Significado Fisiológico, Patológico y Forense” (Das Menschliche Haar in Seiner Physiologischen, Pathologischen und Forensischen Bedeutung), conocimientos que hasta la fecha son vigentes, este documento hizo referencia de las diferencias entre el pelo humano y animal.³

Oesterlen, en 1874 en el trabajo “El Pelo Humano y su Significado Legal” (Das Menschliche Haar Und Seine Gerichtzalztliche Bedeutung), describió las características del bulbo piloso que permiten diagnosticar si un cabello cayó por causas naturales o fue arrancado.

El análisis de cabello para la determinación de drogas de abuso se llevó a cabo en 1954 por dermatólogos en casos de dermatitis tóxica por barbitúricos. Pero hasta la década de 1970, fue cuando se consideró el cabello como una muestra alternativa para el análisis de drogas de abuso.⁴

Tanto las diferentes drogas, como sus principales metabolitos se incorporan al cabello desde el torrente sanguíneo y permanecen allí por tiempo indefinido hasta que es cortado.

En la actualidad, existen laboratorios que se especializan en el análisis de muestras capilares para la detección del consumo de drogas en entornos laborales con porcentajes de detección más elevados que en muestras de orina. Por lo que, es importante su estudio y divulgación como análisis de orientación y confirmación.⁵

En 1951, se introdujo una forma diferente de cromatografía, en la que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna actualmente conocida como Cromatografía de Gases (GC). Esta técnica, descrita por Martin y James, es en la actualidad el método más usado para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra.²

A4 OBJETIVOS

Objetivo general

- Buscar información relacionada a la detección de amfetaminas en cabello mediante el análisis de cromatografía de gases acoplada a masas⁶.

Objetivos específicos

Analizar y clasificar la información obtenida para poder:

- Presentar las diferencias entre cabello humano y el de animales.
- Demostrar la viabilidad del análisis por cromatografía de gases para determinar amfetaminas en cabello.
- Proporcionar los elementos teóricos para una metodología analítica por cromatografía de gases, para fines forenses.

A5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, es difícil determinar si un individuo es sospechoso de algún delito y además si consumió amfetaminas, ya que el tiempo en que pueden ser detectadas en orina o en sangre es relativamente corto.⁵ El presente estudio, es una alternativa para llevar a cabo esta determinación en cabello, mediante cromatografía de gases acoplada a masas. Además de ser un problema de salud grave en la juventud actual, ya que se ha propagado mucho su uso en las discotecas, antros, escuelas, etc. En ocasiones, se reúnen grupos de personas con el fin de consumir amfetaminas y/o algunos de sus derivados por periodos prolongados (fiestas raves, que duran fines de semana completos) todo esto en secreto.

A diferencia con los fluidos antes mencionados, el pelo posee características únicas como son: resistencia a la putrefacción, conservación de su estructura aún después de un tiempo prolongado, absorción e impregnación de olores, entre otras, que pueden permitir llevar a cabo un análisis de este tipo, incluso un año después de haber consumido la droga⁷.

A6 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Actualmente, el análisis de orina y/o sangre para la detección cuantitativa de amfetaminas tiene una limitante muy relevante: el tiempo en el cual puede ser detectada después de haberla consumido (2 a 3 días en orina, 12 horas en sangre)⁸. Por lo que, una metodología alternativa para llevar a cabo este análisis aún después de haber pasado semanas e incluso meses, es el cabello, además de ser un análisis de mucho valor judicial.

El análisis de amfetaminas en cabello por cromatografía de gases, puede ser una buena opción como auxiliar en la investigación de delitos relacionados con el consumo de este tipo de droga. Además de que el consumo de amfetaminas en jóvenes se está volviendo más frecuente, por lo que se convierte en un problema grave de salud, a nivel nacional e internacional⁹. Por lo antes expuesto, el presente trabajo, pretende proporcionar los elementos teóricos que se deben de tomar en cuenta para la elaboración de una metodología de análisis adecuado para la detección de amfetaminas en cabello por cromatografía de gases.

A7 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Para la elaboración del presente trabajo, se revisará información bibliográfica relacionada desde 1997 a la fecha, tanto nacional como internacional, para respaldar la metodología propuesta.

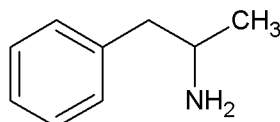
A8 TIPO DE ESTUDIO

Es una tesina monográfica, descriptiva, retrospectiva y longitudinal.

A9 MARCO TEÓRICO

8.1 Antecedente Histórico

La amfetamina cuyo nombre genérico proviene de su propia estructura química en inglés: **Alpha-Methyl-PHENyl-ETHyl-AMINE**⁴ (figura 1).



Amfetamina

Figura 1. Estructura química de la amfetamina.

El tratamiento clásico de las crisis de asma había sido la epinefrina pero se buscaba un preparado más estable y, sobre todo, que permitiese su administración oral.

A principios de la década de 1920, un farmacólogo de los laboratorios Lilly, K. K. Chen, descubre la existencia de una planta *Ephedra vulgaris* que aparecía descrita en las clasificaciones chinas de medicamentos como antiespasmódico, antihemorrágico y eficaz en el tratamiento del asma. Chen consiguió aislar el principio activo, sustancia de estructura similar a la epinefrina pero activo por vía oral, a este principio activo se le dio el nombre de *efedrina* el cual en un corto periodo de tiempo se convirtió en uno de los fármacos principales en el tratamiento del asma.

La necesidad de grandes cantidades de efedrina y la escasez de la planta obligó a los investigadores a buscar un sustituto sintético. En 1927, Gordon Alles, sintetizó un compuesto que superaba ampliamente a la efedrina al que llamo *amfetamina*, la cual se comercializo con el nombre de "*benzedrina*" en forma de

aerosol para ser usado por inhalación, de forma que el principio activo llegaba directamente a los pulmones aliviando las crisis de asma. Sin embargo, no se prestó la atención suficiente a las propiedades estimulantes y los efectos eufóricos que el mismo Alles había descrito.

En 1930, se comenzó su estudio junto con otros compuestos y fue introducida como antidepresivo en enfermedades mentales hasta que en algunas ciudades se reportó su abuso. Los primeros en utilizarla con fines no médicos fueron los estudiantes de las universidades de los Estados Unidos, que las usaron para incrementar el rendimiento en la preparación de exámenes o con fines recreativos para permanecer despiertos y activos en las fiestas nocturnas, se introdujo en el mercado europeo en 1932 como una alternativa a la efedrina para el tratamiento del asma, entre otras indicaciones². En el año 1937, la revista Time alertaba sobre los peligros de la *benzedrina* y denunciaba su creciente utilización por la población estudiantil. Las amfetaminas también fueron ampliamente consumidas durante la Guerra Civil Española y la segunda Guerra Mundial, con el fin de mitigar el agotamiento y aumentar su agresividad en los soldados¹⁰.

En Inglaterra las amfetaminas fueron muy prescritas por sus efectos como agente anoréxico, pero fueron muy empleadas en el tratamiento de la narcolepsia y la hiperquinesis en niños. Cobraron gran importancia en el estudio de la fisiología y farmacología de catecolaminas, además de la psicosis producida.

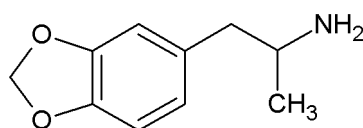
Durante los primeros veinte años del siglo XX, las principales compañías farmacéuticas europeas y norteamericanas impulsaron el desarrollo de feniletilaminas y fenilisopropilaminas, sintetizándose centenares de análogos de los que sólo unos cuantos alcanzaron la etapa comercial tras las primeras pruebas farmacológicas y toxicológicas.

En 1940, tras la amfetamina se introdujo al mercado la metaamfetamina, primero en Japón, luego en Europa y en los Estados Unidos, después de haber difundido su consumo durante la segunda Guerra Mundial.

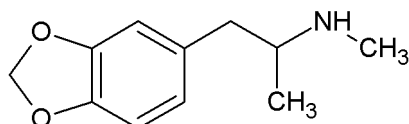
La metaamfetamina o "speed" ha sido la amfetamina protagonista de los laboratorios químicos clandestinos que, a lo largo del siglo pasado, nunca han dejado desabastecido el mercado de psicoestimulantes, sobretudo el de los consumidores de opioides por vía parenteral. Algunos análogos de la amfetamina tienen propiedades sobre la percepción y, desde un punto de vista estructural, pueden clasificarse en dos grupos, según se trate de sustituciones en el anillo de la amfetamina:

- a) Metilendioxi.
- b) Metoxi

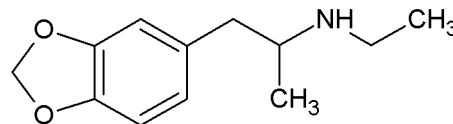
Dentro de las metilendioxiamfetaminas más importantes se encuentran la *3,4-metilendioxiamfetamina* (MDA) o "píldora del amor", la *3,4-metilendioxi-N-metilamfetamina* (MDMA) o Éxtasis y *3,4-metilendioxi-N-etilamfetamina* (MDEA) o "Eva"⁵ (figura 2).



3,4-metilendioxiamfetamina (MDA)



3,4-metilendioxi-N-metilamfetamina (MDMA)



3,4-metilendioxi-N-etilamfetamina (MDEA)

Figura 2. Metilendioxiamfetaminas más importantes¹¹.

Una de las mayores desventajas que ofrece el análisis de sangre u orina para la detección de drogas ilícitas es el corto tiempo en el cual se puede realizar dicho análisis, además de que no proporciona información de consumo a largo plazo, por lo que el análisis de pelo se ha expandido como una técnica alternativa para la detección, análisis y tiempos de exposición de drogas ilícitas¹².

8.2 Pelo.

El análisis de pelo para determinar la presencia de drogas fue utilizado por primera vez en 1954 en puercos de guinea intoxicados con barbitúricos¹³. Pero no fue sino hasta la década de 1970, cuando se consideró el pelo como alternativa a la orina en el análisis de drogas de abuso. A partir de entonces, el pelo ha recibido considerable atención ya que puede ser utilizado para la detección de consumidores habituales (crónicos) de drogas de abuso³.

El pelo es un anexo de la piel, originado desde el folículo piloso donde se encuentran las células germinativas. Estas células dan origen a los distintos estratos del pelo, incluyendo la cutícula y la médula. En su nacimiento, las células están en activa proliferación mientras que en su extensión el metabolismo residual es prácticamente insignificante¹⁴.

El pelo está compuesto morfológicamente por cinco partes:

- Cutícula. Es la capa más externa del pelo cuya función sería la de proteger de la agresión del ambiente a las células de la corteza.
- Corteza. Capa intermedia del pelo la cual contiene una capa protectora de células epiteliales.
- Médula. Capa más interna del pelo.
- Gránulos de melanina.
- Células complejas de la membrana.

Cada una es diferente tanto en su morfología como en su composición química. El número de folículos pilosos en la cabeza del ser humano se encuentra entre 80,000 y 100,000, pero éstos disminuyen con la edad. Los folículos emergen de la dermis de la piel y se encuentran altamente vascularizados para alimentar y permitir el crecimiento del bulbo y raíz (figura 3).

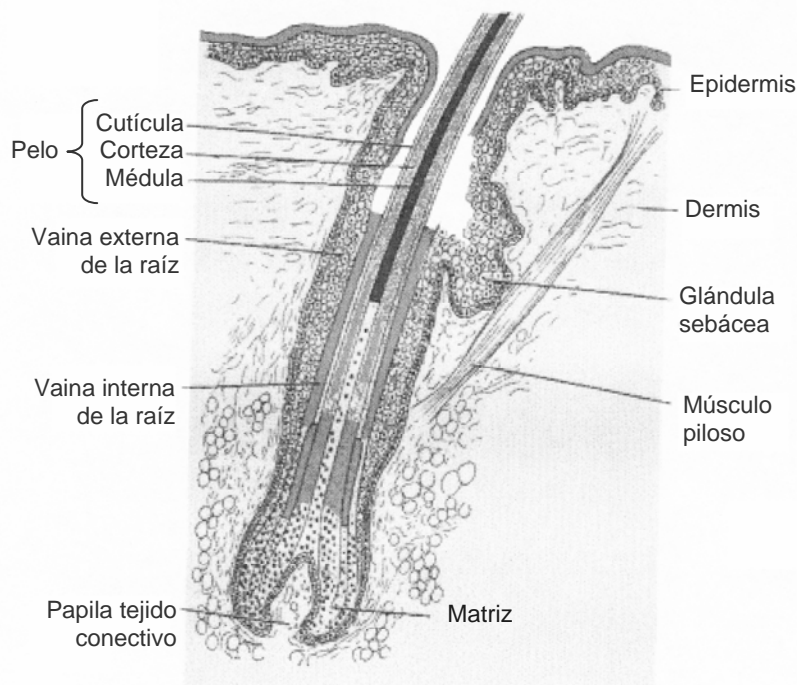


Figura 3. Morfología del pelo¹⁵

El bulbo en la base del folículo contiene células de la matriz que tienen la capacidad de cambiar morfológica y estructuralmente durante el crecimiento, formando distintas calidades de pelo, difiriendo en calidad y cantidad de proteínas y pigmentos.

El pelo está constituido aproximadamente de la siguiente forma:

- Proteínas fibrosas: del 65 por ciento al 95 por ciento (alto porcentaje de keratinas).
- Lípidos: del 1 por ciento al 9 por ciento.

- Melaninas: porcentaje variable, depende del color de pelo.
- Sales minerales: del 0.25 por ciento al 0.95 por ciento (sobre peso seco).
- Sustancias hidrófilas.
- Trazas de otros elementos.
- Polisacáridos.
- Agua: del 15 por ciento al 35 por ciento.
- pH de la matriz pilosa: ácida.

La estructura básica del pelo, consiste en dos o tres cadenas de α -keratina entrecruzadas en hebras llamadas microfibrillas que se encuentran organizadas en haces de microfibrillas abarcando todo el volumen de la corteza. Las hebras de pelo son estabilizadas y adquieren su forma por uniones disulfuro y puente de hidrógeno que hacen que el pelo adquiera una estructura semicristalina. (figura 4)

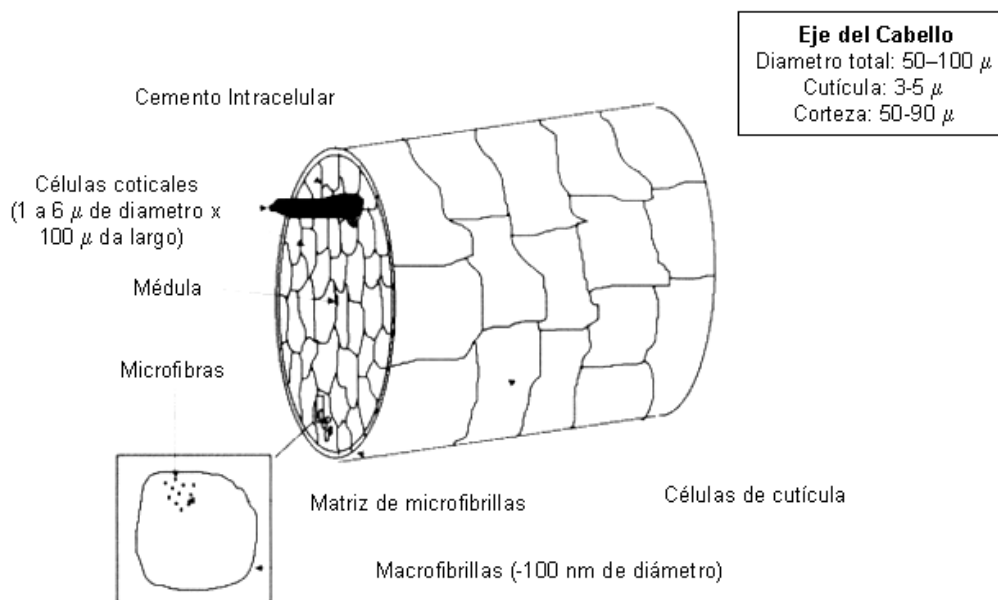


Figura 4. Anatomía del pelo¹⁵

En el folículo del pelo han sido identificadas enzimas de la familia Citocromo P₄₅₀ así como otras enzimas que proveen evidencia de que puede ocurrir metabolismo de drogas dentro de la estructura pilosa, sin embargo como la

queratinización del pelo se produce en dos o tres días esta capacidad metabólica se encontraría muy restringida.

8.2.1 Fases del Crecimiento del Pelo

Los folículos pilosos continúan su crecimiento por un número variable de años, pasando por distintas fases durante un ciclo normal de crecimiento (tabla 1). Aproximadamente entre un 85 y 90 por ciento del pelo se encuentra en fase de crecimiento o fase anagénica; una pequeña porción de material piloso comienzan la fase catagénica en la cual hay disminución del rango de crecimiento que dura entre dos y tres semanas que es rápidamente seguida por la fase telogénica o fase de reposo del pelo, estadio durante el cual no hay crecimiento. Aproximadamente entre un 10 a 15 por ciento del pelo del cuero cabelludo se encuentra todo el tiempo en la fase telogénica.

Tabla 1. Fases de crecimiento del pelo humano.

Fases de crecimiento para el pelo humano	
Anagénica	Fase de crecimiento: 4 a 6 años
Catagénica	Fase de transición: pocas semanas
Telogénica	Fase final: 4 a 6 meses

8.2.2 Velocidad de Crecimiento del Pelo Humano.

El pelo de la cabeza crece en promedio a razón de 0.7 - 1.5 cm /mes aunque existen variaciones de acuerdo al sexo, edad y grupo étnico, puede ser de 0.3 - 1.8 cm/mes¹⁶. Este parámetro varía aún entre pelos del cuero cabelludo con respecto al pelo de otras regiones del cuerpo (axilar, torácico, púbico y otros), aún en un mismo individuo, en el pelo del cuero cabelludo puede haber variantes dependiendo de situaciones como: stress, alimentación, enfermedades de distinta etiología, alteraciones metabólicas y hormonales, entre otras.

8.2.3 Mecanismos de Incorporación de Drogas al Pelo

Se sugiere que las drogas pueden incorporarse al pelo en distintos sitios, por múltiples mecanismos y en varios momentos del ciclo de crecimiento del pelo^{17, 18}, pero en general las más aceptadas son las siguientes:

- Difusión pasiva de la droga desde la sangre a las células en crecimiento en el folículo piloso o durante la formación del eje piloso.
- Excreción o transferencia en la superficie del pelo a través del sudor y el sebo^{19, 20}.

Las drogas y sus metabolitos son distribuidos a lo largo del cuerpo del pelo básicamente por difusión pasiva desde la sangre. La distribución de drogas a través de las membranas celulares es facilitada generalmente por la alta solubilidad lipídica, baja unión a proteínas y factores físico químico como la forma no ionizada de las drogas en la sangre. La difusión de drogas desde capilares de sangre arterial a las células de la matriz en la base del folículo piloso es considerada la causa principal de deposición de drogas en el pelo que presumiblemente se unen a pigmentos y otros componentes de la matriz.

El sebo es un material lipídico excretado por las glándulas sebáceas y que puede también contribuir a la deposición de drogas en el pelo. Estas glándulas se hallan asociadas principalmente a los folículos pilosos, aunque algunas glándulas tienen ductos que les hace secretar sebo directamente a la superficie de la piel.

La concentración con que contribuye el sebo al depósito de drogas en el pelo se desconoce aún, pero si la droga está presente en el sebo puede depositarse en el pelo a través de un íntimo contacto de éste con la piel del cuero cabelludo. (figura 5)

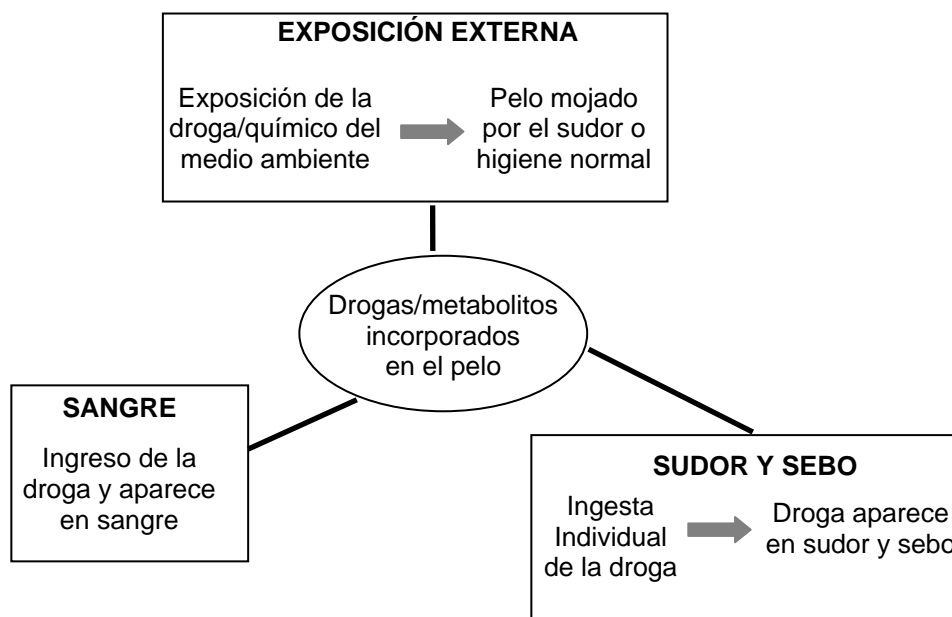


Figura 5. Formas de incorporación de las drogas en el pelo²¹

La mayor contribución de drogas en el pelo proviene del sudor y de la excreción sebácea que impregna el pelo, tanto en su formación como en su maduración.

El sudor juega un rol importante en la incorporación de drogas en el pelo. Los analitos predominantemente encontrados en pelo son las drogas intactas, o sea sin metabolizar en vez de los metabolitos más polares que preferiblemente predominan en orina.

La contaminación ambiental, puede recontaminar al pelo dificultando entonces la distinción de una administración voluntaria de la droga de una involuntaria (administración pasiva) ante un resultado analítico positivo. Cuando esto llega a suceder un buen lavado previo al análisis puede eliminar este tipo de contaminación y no afectar los metabolitos de droga que se encuentran unidos estructuralmente al pelo¹⁴.

8.2.4 Factores que Afectan la Incorporación de Drogas en Pelo

Tanto en la toxicología forense como clínica, el análisis del cabello para la determinación de drogas ha ido en incremento. Hasta ahora, se han podido determinar que existen varios factores que interfieren en la incorporación y retención de la droga en el pelo, como:

- La afinidad con la melanina.
- La lipofilicidad.
- La basicidad²².

El aspecto racial también se ha tomado en cuenta para la realización de los análisis de pelo por la aparente variación que se vincula con la afinidad de la droga y los diferentes grupos étnicos de pelo²³.

Un componente que juega un rol importante en la incorporación de drogas en el pelo es la melanina ya que hay una buena correlación entre la afinidad a la melanina y la incorporación de la droga en el pelo por lo que la concentración de drogas fijadas en pelo pigmentado es mucho mayor que en pelo claro.

La lipofilicidad es un factor clave para la fijación de las drogas en este tipo de matriz; ya que al ser más liposoluble la droga o metabolito será mejor incorporado a la matriz del pelo. Por ejemplo: la metaamfetamina es mejor incorporada que la acetilamfetamina, debido a que la primera es más liposoluble. Las drogas neutras o ácidas apenas se incorporan al pelo en comparación con la gran capacidad de las drogas básicas en el cabello²⁴.

Si bien los mecanismos de incorporación de drogas no han sido aún completamente aclarados y aún existe discusión al respecto, evidentemente la concentración de drogas fijada en pelo, dependerán de la capacidad química de la

droga para ser incorporada a la matriz del mismo, así como para ser retenida por la estructura del pelo^{14, 25}.

8.2.5 Pelo Animal

La identificación del pelo animal se determina, básicamente mediante la observación al microscopio. Los pelos animales se dividen en tres grandes grupos.

- Familia del venado o antílope. Posee características que al observarse al microscopio pueden dar la seguridad de que no son humanas: diámetro constante a lo largo del pelo y grueso (300 μm aproximadamente), médula compuesta por células esféricas que ocupan todo el pelo, raíz con forma de base de una copa de vidrio y forma ondulada regular.
- Animales comerciales. En este grupo se encuentran animales como el conejo, chinchilla y foca, poseen características finas a comparación del grupo anterior: diámetro total de fino a medio con variaciones amplias (20 a 150 μm), formaciones medulares características (seriales o vacuolas) y pelos generalmente bandeados.
- Animales domésticos. En este grupo existe una variación de color y longitud de entre muestras de pelo así como de especímenes, por ejemplo: gato, perro, aves pequeñas y caballo. Diámetro total medio (75 a 150 μm) y variación moderada, médula generalmente amorfa, los pelos presentan bandeado en pocas ocasiones y raíz en forma elongada²⁶.

El cabello humano presenta consistencia en color a lo largo del pelo a diferencia de los animales que presenta cambios de color en distancias cortas y están en bandas. La pigmentación en el cabello humano es distribuida de manera uniforme y en los animales presenta una distribución más central.

La médula en el caso del cabello humano presenta apariencia amorfa y diámetro menor de una a tres veces que la punta, en el caso de los animales la

médula es regularmente continua y estructurada además de tener un diámetro mayor de una a tres veces que la punta. Por último, la raíz del cabello humano es en forma de bulbo y en los animales es extremadamente variable²⁷.

8.3 Drogas de Diseño

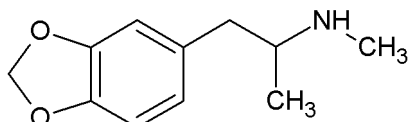
Las “*designer drugs*” (drogas de diseño o de síntesis) son sustancias que han sido modificadas químicamente a partir de sustancias controladas, esto se hace en base de algún efecto que produzca como euforia, mitigar la fatiga, mitigar el apetito, entre otros. El término de droga de diseño se empezó a emplear en la década de 1960 por el farmacólogo californiano Guy Henderson para describir sustancias estimulantes del Sistema Nervioso Central (SNC), obtenidas con fines “recreativos” que eran diseñadas y sintetizadas en laboratorios clandestinos con el objetivo de imitar el efecto de otra droga cuyo tráfico era ilegal, que por tratarse de productos “nuevos” no estaban registrados como sustancias ilegales²⁸.

La 3,4-metilendioxiamfetamina, fue la primera droga de diseño sintetizada por una compañía farmacéutica alemana en 1910, investigando la obtención de agentes anorexígenos. Durante la segunda Guerra Mundial, Wehrmacht la utilizó para mantener el estado de alerta y vigilancia de ciertas unidades militares, usando amfetaminas. En 1953, se emplearon en ensayos toxicológicos realizados en la Universidad de Michigan por encargo de la armada de los EE.UU, con finalidad de evaluar su toxicidad potencial en distintas especies animales¹⁴.

Originalmente, las drogas de diseño se clasificaron de la siguiente forma:

- Análogos de la amfetamina y mezcalina. Comparten propiedades estimulantes, similares a la amfetamina y alucinógenas a la mezcalina.
- Opioides sintéticos. Análogos del fentanilo y meperidina.
- Arilhexilaminas. Análogos de la fenciclidina.
- Análogos y derivados de la metacualona.

Pero a medida que ha pasado el tiempo, se consideran drogas de diseño al primer grupo. Existe una gran lista de tipo de sustancias, pero los más representativos son los *metilendioxi-derivados* de amfetamina y metaamfetamina. Una de las más conocidas es la *3,4-metilendioxi-N-metilamfetamina* (MDMA) o mejor conocida como *éxtasis*. (figura 6)

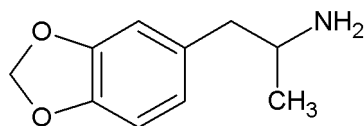


3,4-metilendioxi-N-metilamfetamina (MDMA)

Figura 6. Estructura de 3,4-metilendioxi-N-metilamfetamina (MDMA) éxtasis.

La MDMA fue sintetizada y patentada por Merck en 1914, para control del apetito, después de que la patente expiró no tuvo interés comercial y la MDMA no salió al mercado. En la década de 1950 se estudiaron los severos efectos tóxicos en animales y en 1968 fue aprobado su uso *no médico* en los Estados Unidos. Durante la década de 1970, el abuso de esta droga fue muy notorio en los Estados Unidos y fue conocido en las calles con una variedad de nombres como: XTC, Adam, MDM, M and M y varios otros. En 1980, pequeñas dosis de MDMA fueron legalmente empleadas en un tratamiento psicoterapéutico, a mediados de esa década un gran número de laboratorios clandestinos se encargaron de proveer y distribuir MDMA así como otras drogas de diseño en Estados Unidos.

Una droga de diseño, que incremento su uso muy rápido, fue la *3,4-metilendioxiamfetamina* (MDA), que difiere de la MDMA en un grupo metilo, fue sintetizada por primera vez en 1910²⁹. (figura 7)



3,4-metilendioxiamfetamina (MDA)

Figura 7. Estructura de la 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA).

Los estudios farmacológicos demostraron las propiedades estimulantes pero no de conducta hasta 1939, posteriormente fue patentado en 1940 y en los inicios de la década de 1960 se comenzó a utilizar como droga anoréxica. Fue hasta 1970, que el abuso de esta droga condujera a varios reportes de muertes en California y Canadá. En la calle se comercializaba como “*Love Drug*” (droga del amor).

Debido al potencial adictivo, a los reportes de uso excesivo y sobredosis es que el “*US Department of Justice’s Drug Enforcement Agency*” (DEA) colocó a la MDMA y derivados con propiedades estimulantes en la lista de sustancias psicotrópicas de control internacional, cédula I. Los criterios de inclusión para sustancias psicotrópicas según la DEA para cédula I son los siguientes:

- Drogas u otras sustancias que son altamente potenciales para abuso.
- Drogas u otras sustancias que actualmente no sean aceptadas en tratamientos médicos en Estados Unidos de Norteamérica.
- Drogas u otras sustancias que carecen de seguridad aceptada sin supervisión médica³⁰.

Después de 1986, una larga lista de derivados de la MDA y MDMA han sido sintetizados en laboratorios. Actualmente, existen alrededor de 200 derivados diferentes que se han sintetizado y descrito en la literatura. Ejemplos de estos derivados con uno o dos grupos metoxi unidos al anillo aromático con grupos halógenos, sulfuros, metilos y fosfatos. En Noruega, se han detectado seis o siete derivados (figura 8) con grupos funcionales en diferentes posiciones³¹.

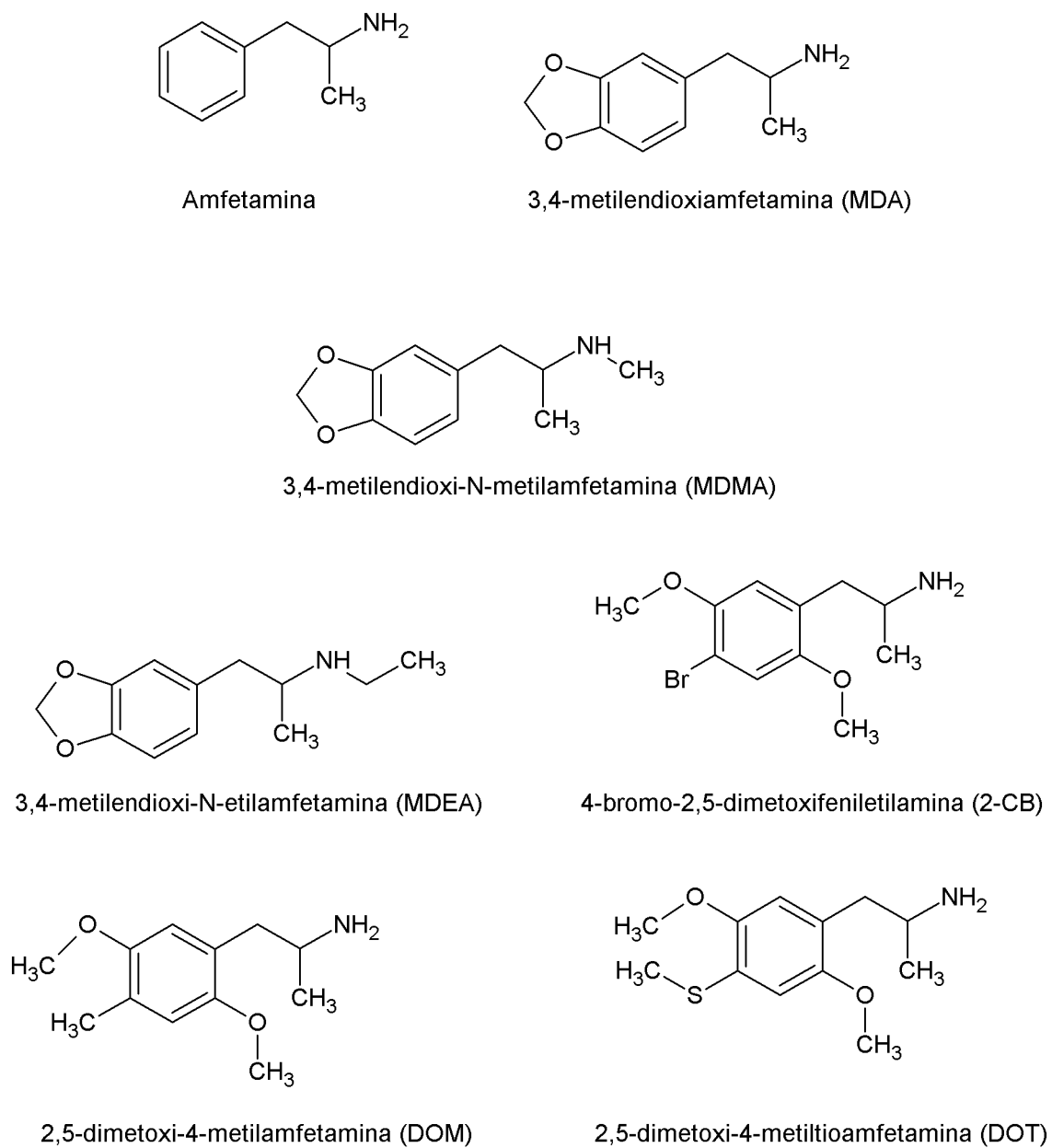


Figura 8. Estructura de amfetaminas y derivados.

Las modificaciones químicas de sustituyentes R1 a R9 dan un número ilimitado de compuestos activos unos con mayor poder estimulante que otros. (figura 9)

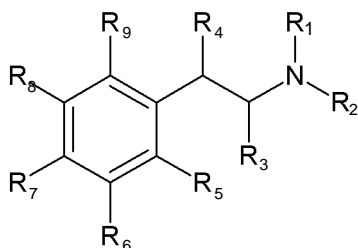


Figura 9. Modificaciones químicas de los estimulantes amfetamínicos.

Las modificaciones en función de características estructurales pueden dividirse en tres grandes grupos de acuerdo en la posición del anillo aromático en la que esté sustituido:

1. No hay sustitución en el anillo aromático. Por ejemplo la amfetamina y la metaamfetamina.
2. Sustitución *metilendioxi* en el anillo aromático. Por ejemplo la MDA y MDMA.
3. Otros tipos de patrones de sustitución, usualmente incluyen uno o varios grupos alquiloxi. Por ejemplo la 2CB y STP/DOM³².

8.4 Anfetaminas.

La amfetamina, cuyo nombre genérico proviene de su propia estructura química en inglés: **Alfa-Methyl-PHENyl-ETHyl-AMINE** (AMPHETAMINE), fue desarrollada con fines comerciales por G. Alles en 1927 e introducida en el mercado europeo en 1932 como una alternativa a la *efedrina* para el tratamiento del asma, entre otras indicaciones. La posición del carbono asimétrico en la formulación de la amfetamina da lugar a tres formas estructurales de la amfetamina (figura 10):

- *d-amfetamina*.
- *l-amfetamina*.
- Forma racémica.

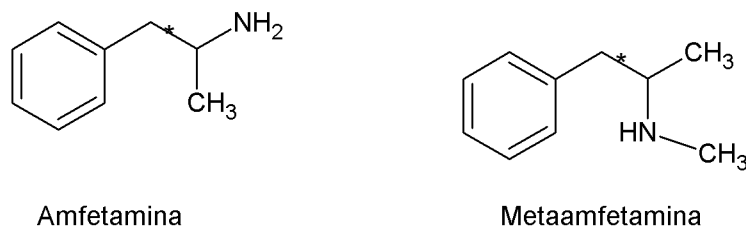


Figura 10: Estructura de derivados amfetamínicos indicando el carbono asimétrico (*).⁷

Los principales derivados amfetamínicos después de su introducción al mercado fueron:

- Sulfato de amfetamina (Centramina)
- Sulfato de dexamfetamina (Dexedrina)
- Metilamfetamina (Metedrina)⁷

El abuso moderado de las amfetaminas produce un efecto primario de euforia por lo que su uso ha ido en aumento a nivel mundial y en especial Norteamérica, Europa, el este de Asia y Australia. En el año 2000 la *United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention*, informó que en la década de 1990, 180 millones de personas consumían alguna droga de las cuales, 29 millones de personas consumían algún tipo de amfetamina.

Las formas en las cuales pueden ser administradas las amfetaminas son muy variadas y depende de cada grupo de personas o grupos culturales, esto puede ser: fumada, inyectada o de forma oral. La *World Health Organization*, las clasificó según su uso en la siguiente forma:

1. Instrumental: Para activar el estado de alerta, mejorar la concentración y disipar el cansancio en la salas hospitalarias.

2. Recreativo/Subcultural: Por sus propiedades estimulantes son usadas para mantener un estado de alerta por largos periodos en reuniones sociales/recreativas, como eventos musicales y bailes.
3. Crónico: Cuando por diversas razones, el individuo presenta síntomas como ansiedad, tolerancia y síndrome de abstinencia, algunos individuos consumidores crónicos experimentan sensaciones no deseadas en la abstinencia.

La *World Health Organization* también las clasificó en función de las consecuencias o efectos que producen en la salud de la siguiente forma:

1. Desórdenes físicos y neurológicos.
 - Síndrome de excitación. Hipertermia y taquicardia seguido de un colapso circulatorio con un resultado eventual fatal.
 - Accidentes vasculares. Incremento de la presión sanguínea, hemorragia cerebral, infarto al miocardio o ambos con incremento del riesgo de morir.
 - Convulsiones cerebrales y coma, seguido de choque cardiovascular y eventualmente la muerte.
 - Movimientos estereotipados y síndrome colérico.
2. Inductor de desórdenes mentales.
 - Dependencia y abuso.
 - Intoxicación.
 - Síndrome de abstinencia.
 - Delirio de intoxicación.
 - Desórdenes psicóticos.
 - Desórdenes de humor.
 - Desórdenes de ansiedad.
 - Disfunción sexual.
 - Desórdenes de sueño.
3. Consecuencias en la salud.

- Posible infección del Virus de Inmunodeficiencia Humana.
 - Hepatitis.
 - Otras enfermedades de transmisión sexual.
 - Tuberculosis.
 - Infecciones virales, fúngicas y bacterianas.
4. Consecuencias sociales por el uso de Anfetaminas.
- Violencia.
 - Crimen.
 - Accidentes³³.

8.4.1 Productos Anfetamínicos

Los derivados anfetamínicos son indicados en el tratamiento de desórdenes de atención e hiperactividad en pacientes mayores de 6 años. En incorporación en el tratamiento de narcolepsia de acuerdo con la cédula 2 según la DEA son:

- Drogas u otras sustancias que son de alto potencial para abuso.
- Drogas u otras sustancias que son aceptadas para tratamiento médico en Estados Unidos de Norteamérica con severas restricciones.
- Droga de abuso u otra sustancia que causa severa dependencia psicológica y física³⁰.

8.4.1.1 Acción Farmacológica

Son catecolaminas simpatomimétricas con acción similar a la efedrina. Son bloqueadores de los receptores de la norepinefrina y dopamina en la sinápsis, de esta manera incrementa la circulación de norepinefrina y dopamina a la corteza cerebral activando el sistema reticular. Inhibe la acción de la monoamina oxidasa y provoca la liberación de catecolaminas. Producen estimulación del SNC y sistema respiratorio (SR), midriásis, broncodilatación y contracción del esfínter urinario. Los

efectos anoréxicos son probablemente un efecto secundario a los efectos estimulantes del SNC, el sitio de acción probable es centro de apetito del hipotálamo.

8.4.1.2 Metabolismo

El metabolismo de los derivados de amfetamina ha sido bien estudiado en los seres humanos y ratas^{34, 35}. Estos derivados predominantemente se someten a la superposición de dos vías metabólicas (figura 11): O-desmetilación a derivados dihidroxi (catecol) seguido por la metilación de uno de los grupos hidroxilo, y la sucesiva degradación de la cadena lateral de la N-desalquil. Una tercera ruta a través de la hidroxilación aromática (no se muestra) se ha propuesto, lo que resulta en la producción de neurotóxicos trihidroxiamfetaminas^{36, 37}.

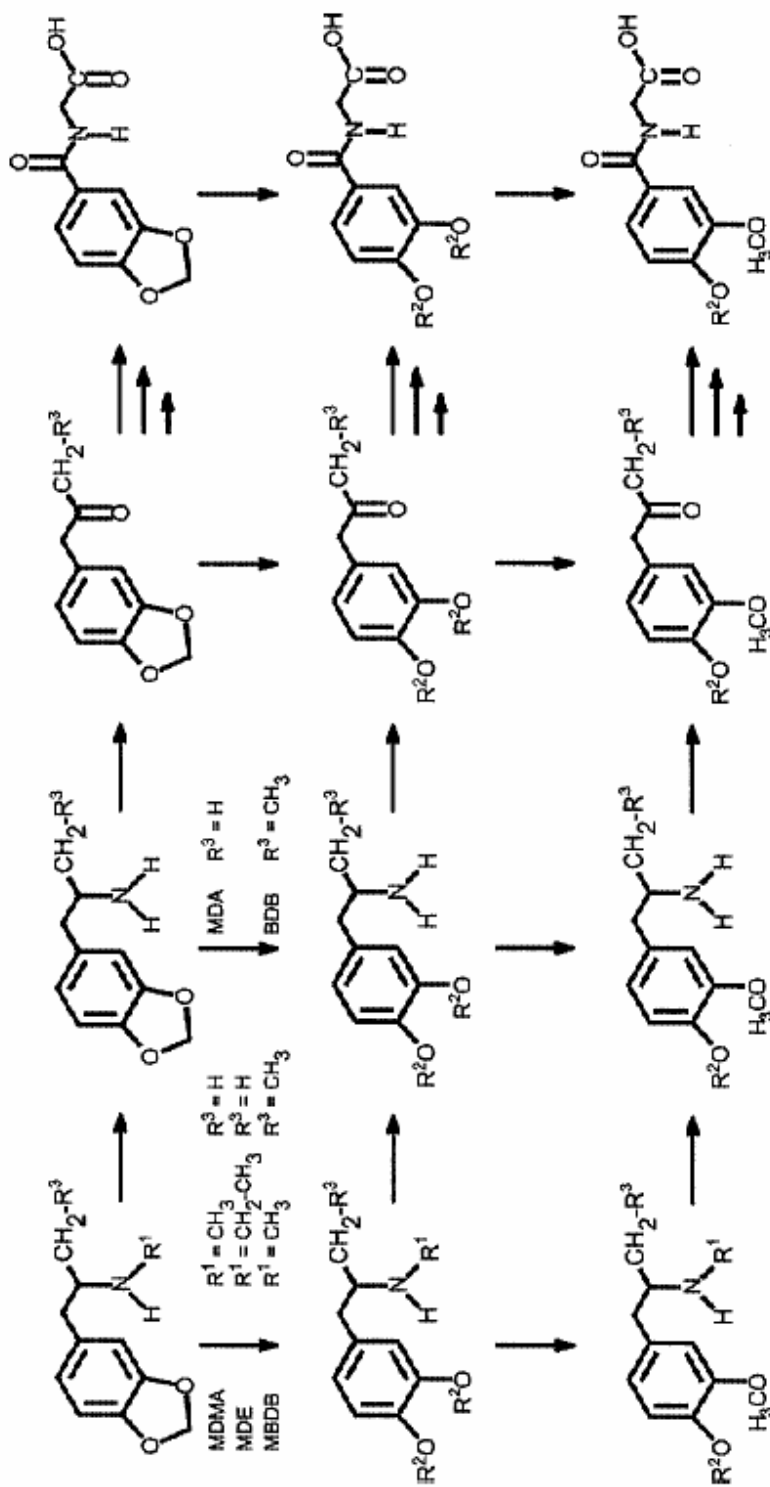


Figura 11. Esquema propuesto para el metabolismo de las racémicas MDA, MDMA, MDE, BDB, y MBDB como derivados del ácido hipúrico en humanos y ratas. Los metabolitos hidroxilados ($R^2 = H$) también están presentes como ácido glucurónico y/o sulfatos conjugados ($R^2 =$ sulfato o ácido glucurónico) en la orina. MDA, metilendioxiamfetamina; MDMA, (R, S)-metilendioximetamfetamina; MDE, (R, S)-metilendioxietilamfetamina; BDB, benzodioxolilbutanamina; MBDB, R,S-N-metil-benzodioxolilbutanamina.³⁸

Sin embargo, estos estudios se realizaron con ratas recibiendo dosis muy altas de la MDMA. Estos metabolitos pueden ser detectados sólo en el cerebro. Además, otros estudios sugieren que la neurotoxicidad inducida por la MDMA puede tener lugar principalmente a través de la producción de superóxido o de otro tipo en lugar de los radicales hidroxilos, como metabolitos trihidroxi³⁹. Adicionalmente las propilaminas MDA, MDMA y MDE son metabolizadas en su correspondiente glicina conjugado ácido benzoico 3,4-disustituido, llamados derivados de ácido hipúrico (figura 12)³⁸. Sin embargo, el ácido 3,4-dihidroxi hipúrico y el ácido 3-metoxi-4-hidroxi hipúrico también pueden ser metabolitos⁴⁰. Se encontraron metabolitos hidroxilados que se excretan en forma conjugada. Se han detectado en extractos de orina de seres humanos después de la ingesta de MDE³⁵ el glucurónido del metabolito hidroximetoxi del MDE y el sulfato de su metabolito dihidroxilado.

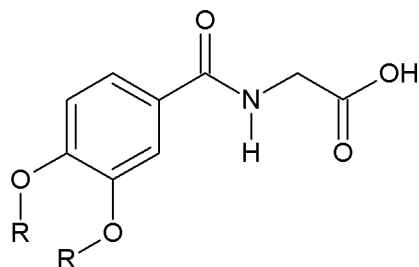


Figura 12. Ácido Hipúrico⁴¹, R= H, sulfato o ácido glucurónico.

8.4.1.3 Influencia de las Isoenzimas Citocromo (CYP)

En el folículo piloso han sido identificadas enzimas de la familia CYP₄₅₀ así como otras enzimas que proveen evidencia de que puede ocurrir metabolismo de drogas dentro de la estructura pilosa, sin embargo como la queratinización del pelo se produce en dos o tres días esta capacidad metabólica se encontraría muy restringida¹⁴.

Como ya se ha mencionado, existe una gran variedad de derivados amfetamínicos. El metabolismo de éstas ha sido estudiado meticulosamente en humanos recientemente⁴².

Su capacidad estimulante sobre el SNC y simpaticomimética hace que muchos de los efectos de las amfetaminas sean similares a los de la cocaína. Sin embargo, al contrario que la cocaína, las amfetaminas carecen de capacidad anestésica, los efectos psicoactivos son más prolongados (4 a 8 veces) que los de la cocaína y los efectos simpaticomiméticos periféricos pueden ser más potentes. Las amfetaminas en el sistema nervioso central facilitan la neurotransmisión monoaminérgica (catecolaminérgica y serotoninérgica) aunque su función fundamental parece estar unida a la potenciación de los sistemas de neurotransmisión dopaminérgicos en áreas relacionadas con el Sistema Cerebral de Recompensa (figura 13)

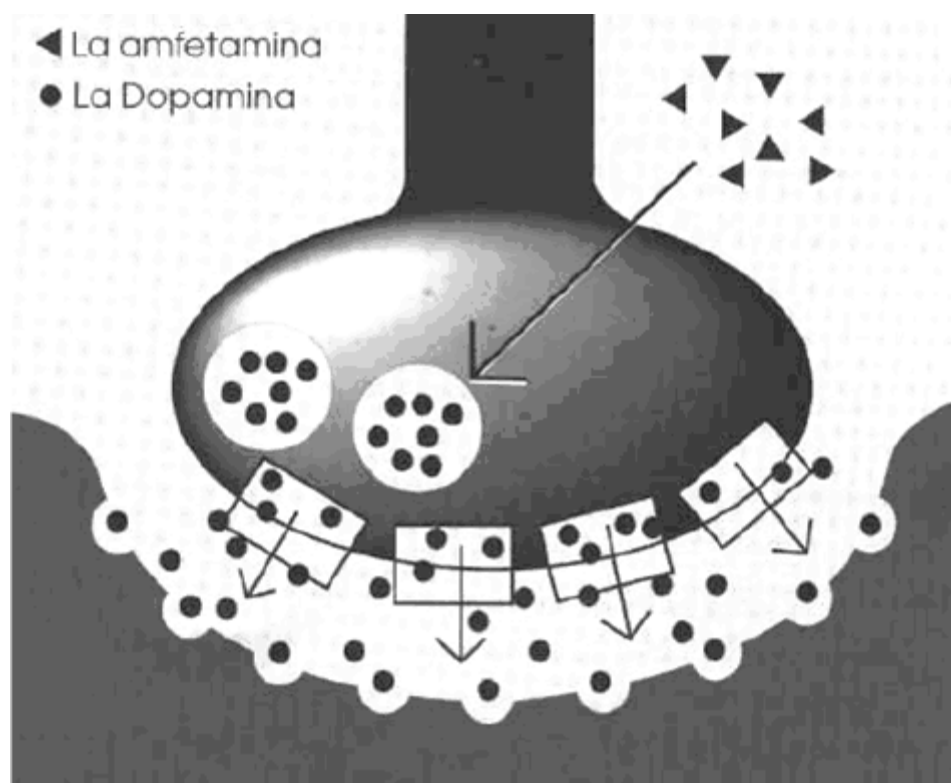


Figura 13. Mecanismo de acción de las amfetaminas, provocando desprendimiento de dopamina

Los efectos subjetivos relacionados con el consumo de amfetamina dependen del consumidor, del ambiente, de las dosis de la droga y de la vía de consumo (tabla 2).

Tabla 2. Efectos de las amfetaminas utilizadas por vía intranasal, oral o intravenosa.

<i>Efectos estimulantes sobre SNC</i>	<i>Efectos simpaticomiméticos</i>
Euforia	Taquicardia
Exaltación, excitación nerviosa	Hipertensión
Locuacidad	Taquipnea
Incremento de la atención	Hipertermia
Insomnio	Boca seca
Pérdida del apetito	Sudoración
Ausencia de fatiga	Midriasis
Movimientos estereotipados	Náuseas
	Cefalea

Los efectos se mantienen durante unas horas para posteriormente producirse un estado de letargia en el que el sujeto se siente cansado, apático, irritable, triste, e incapaz de mantener la atención y la concentración. Cuando el consumo de amfetaminas se produce a dosis elevadas o de forma continua, puede dar lugar a un cuadro de intoxicación caracterizado por graves complicaciones tanto a nivel mental como físico que pueden llegar a producir la muerte. (tabla 3)

Tabla 3. Complicaciones relacionadas con la intoxicación con amfetaminas.

<i>Complicaciones Mentales</i>	<i>Complicaciones Físicas</i>
Ansiedad	Arritmias cardíacas
Agitación	Hipertensión arterial
Irritabilidad	Angor y colapso circulatorio
Confusión	Hemorragias cerebrales
Alucinaciones	Hipertermia
Delirios paranoides	Anorexia
Crisis de Pánico	Nauseas, vómitos, diarrea
Auto y Heteroagresividad	Dolor abdominal
	Convulsiones
	Coma

La Organización Mundial de la Salud en su Décima Revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) define el síndrome de dependencia de las amfetaminas como el conjunto de manifestaciones

fisiológicas, comportamentales y cognoscitivas en el cual el consumo de amfetaminas adquiere la máxima prioridad para el individuo, mayor incluso que cualquier otro tipo de comportamiento de los que el pasado tuvieron el valor más alto¹⁰.

8.5 Cromatografía de Gases

La cromatografía, es la técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva. La cromatografía fue descubierta por el botánico ruso, de origen italiano, Mijaíl Tswett en 1906, pero su uso se generalizó hasta la década de los 30. Tswett separó los pigmentos de las plantas (clorofila) vertiendo extracto de hojas verdes en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo en el interior de una probeta. A medida que la disolución va filtrándose por la columna, cada componente de la mezcla se separa a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Cada banda corresponde a un pigmento diferente⁴³.

Keulemans, ha definido la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área de contacto, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria⁴⁴.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido dispuesto en la columna de gran área de contacto, que actúa como soporte. La fase móvil es un fluido (puede ser gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla.

Por otro lado, en la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los que rigen el proceso de separación: la adsorción y la desorción.

La adsorción es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial. Esta retención superficial puede ser física o química. La adsorción depende de la naturaleza de la sustancia adsorbida, de la temperatura, de la naturaleza y estado de subdivisión del adsorbente, y de la concentración.

El primer trabajo en el que se hizo pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, descrita por Martin y James en 1952, es en la actualidad un método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido en una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios químicos (figura 14).

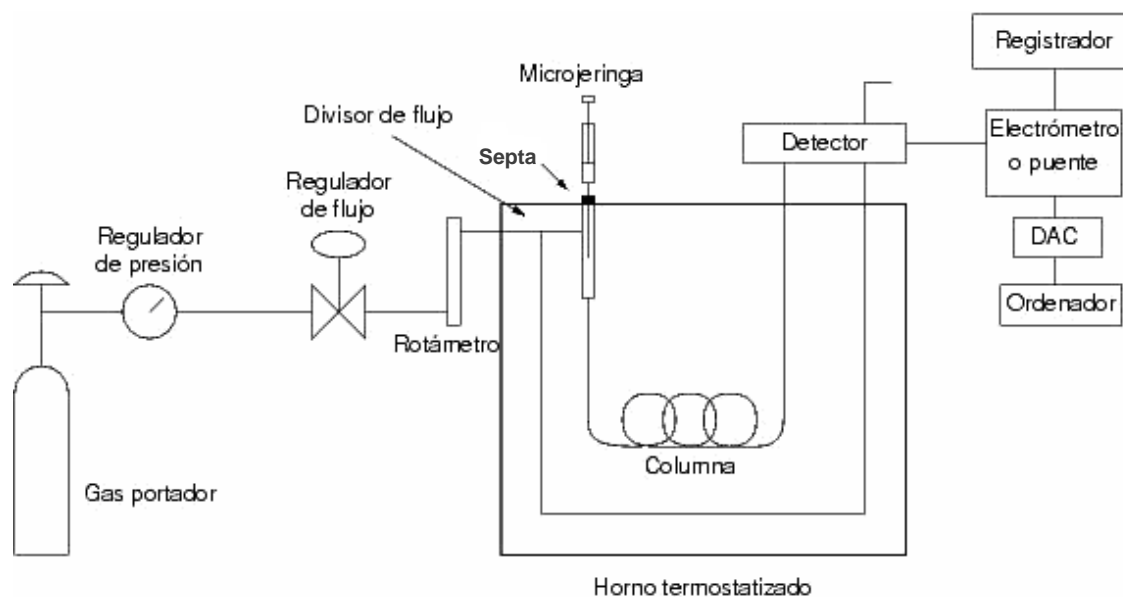


Figura 14. Diagrama general de un cromatógrafo de gases.

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta disuelta, después se hace pasar una corriente de gas inerte (normalmente He, N₂, H₂ ó mezclas). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria, que se encuentra fija en una columna dentro de un horno con programación de temperatura. A continuación pasa a través de un detector, el cual indica la presencia del analito al salir de la columna, esta señal se convierte en una señal eléctrica la cual puede ser graficada⁴⁵.

Existen tres técnicas básicas de inyección de muestras (líquidas o gaseosas) en columnas capilares: *split*, *split-less* y *on column*, (figura 15). Las dos primeras consisten en inyectar y vaporizar la muestra en una cámara de vaporización. El sistema *split* desvía la mayor parte de la muestra fuera del sistema cromatográfico y envía sólo una pequeña fracción a la columna. El método *split-less* dirige toda la muestra a la columna, por lo que resulta más adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles. La inyección *on column* se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los compuestos termolábiles⁴⁴.

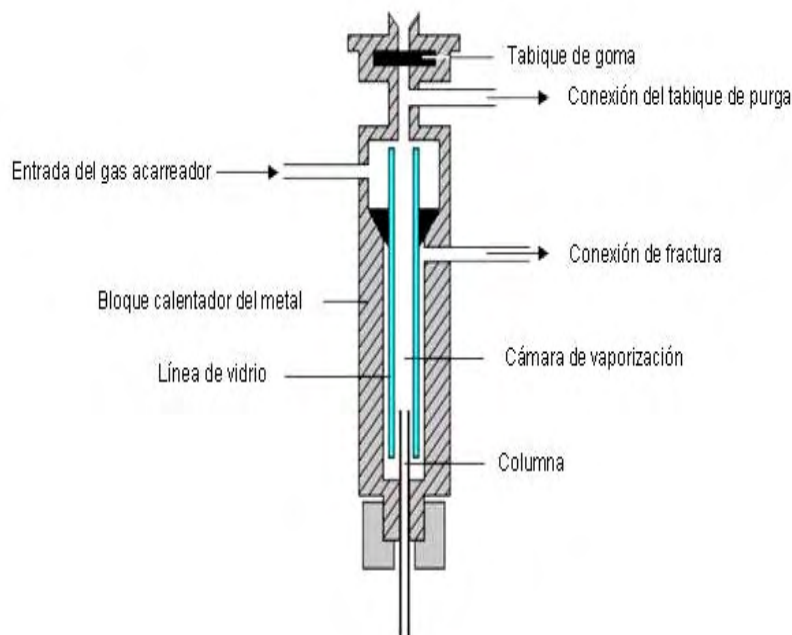


Figura 15. Diagrama de un inyector split, split-less.

8.5.1 Columna

La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativa mediante el empleo de los detectores seleccionados.

Entre los principales factores que afectan la eficiencia de una columna están:

- Longitud de la Columna.
- Diámetro de la Columna (1/4", 1/8", 1/16" de diámetro externo).
- Tamaño de las partículas del relleno.
- Naturaleza de las fases.
- Cantidad de fase estacionaria.
- Temperatura de la columna.
- Velocidad del gas portador.
- Cantidad de muestra inyectada.
- Material del cual está elaborada la columna.
- Enrollado de la columna.

Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio ó teflón. El relleno puede ser un sólido ó un líquido recubriendo un sólido. Las columnas se pueden clasificar según el propósito del proceso cromatográfico de la siguiente manera:

- Empacadas.
- Analítica.
- Preparativas.
- Capilares.
- W.C.O.T. (Wall Coated Open Tubular).
- S.C.O.T. (Support Coated Open Tubular).

8.5.2 Gas Portador

El gas portador cumple básicamente dos propósitos:

1. Transportar los componentes de la muestra.
2. Crear una matriz adecuada para el detector.

Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:

- Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria).
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Fácilmente disponible y puro.
- Económico.
- Adecuado al detector a utilizar.

8.5.3 Detectores

Un detector es un dispositivo para revelar la presencia de las sustancias eluídas a la salida de la columna cromatográfica. Podemos expresar que el detector son los "ojos" de un cromatógrafo.

El Detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

En cromatografía un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico ó integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes⁴⁵.

Los detectores se pueden clasificar de acuerdo al:

- Grado de Selectividad :
 - Universales. Responde a la mayoría de los solutos que pasan por él.
 - Específicos ó Selectivos. Exhibe una gran respuesta a un grupo particular de sustancias con un mínimo de respuesta a otras.
 - Destructivos y No destructivos.

- Modo de Respuesta:
 - Dependientes del flujo másico. Producen una señal que es proporcional a la cantidad de soluto que pasa a través de él en la unidad de tiempo pero es independiente del volumen de gas portador requerido para la elución.
 - Dependiente de la concentración. Dan una señal proporcional a la cantidad de soluto por unidad de volumen de gas portador que pasa a través de él.
 - Detectores según el proceso de detección Ionización, óptico-espectroscópico, electroquímico, etc.

Para que un detector funcione y dé una respuesta óptima debe tener ciertas características, como:

- Sensibilidad. Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- Linealidad. Rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria. El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable.

En cromatografía de gases existe una gran variedad de detectores que pueden ser empleados, pero los que más comúnmente se usan son:

- Detector de Conductividad Térmica. Mide la conductividad térmica del gas portador, ocasionada por la presencia de sustancias eluídas.
- Detector de Ionización a la Llama. Basado en la medida de las variaciones de la corriente de ionización en una llama oxígeno-hidrógeno debido a la presencia de sustancias eluídas.
- Detector de Captura Electrónica. Basado en la electronegatividad de las sustancias eluídas, y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones.
- Detector de Fotometría a la Llama. Basada en la medida de la intensidad de la emisión molecular de la fluorescencia de heteroátomos en las moléculas orgánicas.
- Detector de Ionización de Llama Alcalina

La cromatografía de gases presenta limitaciones en tres casos:

- Compuestos poco volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a.
- Compuestos sensibles a una elevación de la temperatura incluso moderada (determinados compuestos de interés biológico),
- Compuestos que se encuentran en forma iónica (puesto que son en general poco volátiles).

Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C. En cambio, cuando los compuestos a analizar son poco volátiles y/o termolábiles, la técnica separativa adecuada suele ser la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la derivación química de la mezcla a analizar.

8.5.4 Acoplamiento Cromatografía de Gases a Espectrometría de Masas

A menudo la cromatografía de gases se emplea para confirmar la presencia de un compuesto en una muestra determinada.

Esto se lleva a cabo por comparación del cromatograma de la sustancia pura con el de la muestra, siempre que las condiciones para la obtención de ambos sean idénticas. Una de las dificultades de esta comparación es que puede haber diferentes compuestos que presenten el mismo comportamiento cromatográfico bajo condiciones idénticas, lo que llevaría a identificaciones erróneas. En consecuencia, las mejores técnicas de análisis cualitativo son aquéllas que combinan la capacidad de separación de la cromatografía con la capacidad de la identificación de técnicas como la espectrometría de masas (técnicas acopladas) ⁴⁵.

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar⁴³.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera certera cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes de una mezcla sin separarlos previamente, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC ("Gas

Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) dá lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

Las principales cualidades de GC-MS son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb) y en casos específicos se puede llegar hasta partes por trillón (ppt) e incluso partes por cuatrillón (ppq).
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en minutos, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas, se ioniza la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto

electrónico, en el cual se bombardea a las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas.

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmentados debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ion será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, el cual es diferente para cada compuesto y que constituye una identificación plena del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o biblioteca) y proceder a su identificación o pueden estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula de origen.

8.6 Toma, Conservación y Traslado de la Muestra

Para la toma de muestras se requiere de un área de trabajo limpia y libre de fuentes de contaminación, tales como reactivos o residuos de drogas, debiéndose coleccionar una cantidad suficiente de muestra, tal que la misma permita repetir los análisis en caso de ser necesario.

Se recomiendan los siguientes pasos generales de colección de muestra:

- El pelo debería coleccionarse de la región posterior de la cabeza, prefiriéndose esta área porque un 85 por ciento de ella presenta pelo en fase de

crecimiento activo y por lo tanto mayor cantidad de droga podría fijarse en ella.

- El pelo debe ser cortado tan próximo como sea posible al cuero cabelludo o la piel si es de otra región del cuerpo.
- El peso de la muestra adecuado para permitir los estudios de rastreo y de confirmación sería de unos 100 - 200 mg, (cantidad equivalente al diámetro de un lápiz).
- Para su almacenamiento, el pelo deberá guardarse en una bolsa de papel adecuadamente rotulada, para posteriormente colocarla en un folio de aluminio que garantiza su integridad y previene su contaminación.
- Las muestras pueden ser conservadas a temperatura ambiente.
- Si la muestra pilosa se encontrara mojada, deberá secarse y acondicionarse correctamente para su posterior análisis¹⁴.

Empaquetamiento y Preservación de Muestras

Se deben de colocar los siguientes rótulos:

- Tipo de muestra.
- Pertenencia y/o procedencia.
- N° de referencia de la muestra.

En el empaquetado se debe:

- Evitar el uso de bolsas de plástico.
- Evitar emplear frascos de cristal.
- Emplear cajas de cartón o sobre de papel.
- Cada muestra en un recipiente precintado o cerrado herméticamente.

Custodia de la Muestra:

Identificación y firma de la persona que recoge la muestra, fecha y hora de recolección.

8.7 Metodología del Análisis

Dentro de las metodologías empleadas para la determinación de amfetaminas en cabello esta la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, de manera general, la muestra tiene que pasar por todo un proceso para la realización del análisis:

- Recolección de la muestra.
- Eliminación de impurezas no deseadas.
- Extracción.
- Derivatización.
- Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas.

8.7.1 Recolección de la Muestra

La *Society Hair Testing*, ha realizado una serie de recomendaciones para el análisis del cabello en casos forenses, en el cual menciona que la muestra debe ser cortada de la región vértice posterior de la cabeza, lo más cercano al cuero cabelludo⁴⁶. Hay que hacer notar si es que el cabello ha sido sometido a algún tratamiento capilar (decoloración, teñido, etcétera) ya que esto podría interferir en el análisis⁴⁷. Con un mechón de aproximadamente 5 mm de diámetro y una longitud de 2 a 4 cm es suficiente para la realización del análisis^{48, 49, 50}.

8.7.2 Eliminación de Impurezas

En el cabello tiene que pasar por una proceso de lavado para eliminar residuos o impurezas (polvo, grasa, etcétera) que pudieran interferir en el análisis, lo cual se puede realizar con jabón neutro líquido⁴⁷ y enjuagar con agua destilada

o desionizada⁵¹ hasta eliminar el jabón que haya quedado, posteriormente se procede a secar en ambiente de Nitrógeno evitando humectar o hidratar la muestra. Para hacer eficiente el lavado es recomendable el empleo de disolventes orgánicos como: diclorometano, metanol⁵², acetona^{49, 51}, éter de petróleo⁴⁸ o mezclas de éstos, combinados con agua o después de que la muestra esté seca, ya que la matriz pilosa mantiene en su estructura a las amfetaminas hasta la digestión alcalina^{51, 52}.

8.7.3 Extracción

Para extraer las amfetaminas del cabello se emplea una extracción sólido-líquido, ésta es favorecida en un medio alcalino ya que se incrementa la solubilidad de las amfetaminas, el compuesto más usado es Hidróxido de Sodio (NaOH)^{47, 50, 51, 52}, otro compuesto al cual se recurre en combinación con el NaOH es el Sulfuro de Sodio (Na₂S)⁵², también es recomendable la utilización de tubos silanizados evitando la interacción del vidrio con el NaOH^{47, 48, 50, 51, 52}. Posteriormente, se realiza una extracción líquido-líquido para la cual existe una variedad de disolventes orgánicos que pueden ser empleados ya sean solos o combinados, los que se usan con más frecuencia son:

- Cloruro de metileno / isopropanol⁴⁷
- Acetato de etilo⁵⁰
- *ter* butil-metil éter⁵²

Al llevar a sequedad la fase orgánica se emplea un ambiente de Nitrógeno, metanol y ácido clorhídrico^{47, 50, 52} evitando que se volatilicen las amfetaminas⁴⁸.

8.7.4 Derivatización

El uso de compuestos derivados en cromatografía de gases es de suma importancia ya que permite mejorar el comportamiento fisicoquímico del

compuesto a analizar. Dentro de los más empleados para el análisis de amfetaminas en cabello están:

- Anhídrido Pentafluoropropionico (PFPA)⁴⁷.
- Metil-bis-(trifluoroacetamida) (MBTFA)⁵².
- Anhídrido Heptafluorobutírico (HFBA)⁵⁰.
- Anhídrido Propiónico (PSA)⁴⁸.
- Anhídrido Trifluoroacético (TFA)⁴⁸.

en solución con algún disolvente orgánico, por ejemplo acetato de etilo o metanol^{47, 50, 52}.

En algunos casos, no es necesaria la formación de un compuesto derivado, ya que la microextracción con hidrólisis básica (NaOH al 30 por ciento)⁵¹ proporciona una extracción satisfactoria.

8.7.5 Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a Masas

Para el análisis de amfetaminas en cabello es necesario contar con una muestra tomada de la parte posterior del vértice de la cabeza, lo más cercano al cuero cabelludo de 10 a 50 mg como mínimo para después realizar el lavado y eliminar las impurezas presentes con agua, jabón neutro y algún disolvente orgánico^{48, 49, 50}. La matriz pilosa es destruida con la digestión alcalina permitiendo “liberar” a las amfetaminas de esta matriz^{47, 50, 51, 52}. Posteriormente, las amfetaminas son obtenidas por medio de una extracción líquido-líquido^{47, 50, 52} con disolventes orgánicos para posteriormente evaporarlo en presencia de un ácido para evitar que se volatilicen las amfetaminas⁴⁸. A continuación al residuo se le adiciona el compuesto derivatizante disuelto en un disolvente orgánico, se calienta llevando a sequedad^{47, 48, 50, 52}. El compuesto derivatizado formado, se reconstituye en un disolvente orgánico para inyectarlo en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, el volumen de inyección oscila entre 1 μL y 5 μL ^{47, 52}. Es

de suma importancia, el empleo de un ambiente de Nitrógeno, evitando la presencia de humedad, así como es recomendable el empleo de baños ultrasónicos^{47, 50, 51, 52}.

El Limite de Cuantificación para derivados amfetamínicos en cabello (LOQ, por sus siglas en inglés: Limit of Quantification) se recomienda que sea menor o igual a 2.0 ng/mg por cada derivado⁴⁶.

Las columnas capilares con recubrimiento de película de fenilmetilsiloxano al 5 por ciento⁴⁷, fenilmetilsilicona al 5 por ciento⁵², 5 por ciento difenil-95 por ciento dimetilpolisiloxano⁵⁰, fenilmetilsiloxano al 5 por ciento o metilsilicona al 5 por ciento⁵¹ son las que han dado mejores resultados, ya que permiten una separación de amfetaminas y derivados amfetamínicos.

El gas portador o acarreador tiene un papel importante ya que si no reúne las condiciones suficientes, el análisis sería inadecuado, el más comúnmente empleado es el Helio (He)^{47, 48, 50, 51, 52} ya que es inerte con la muestra, no interacciona con la fase estacionaria, se puede encontrar sin impurezas. Una de las ventajas del análisis por cromatografía de gases acoplado a masas es el hecho que el análisis es rápido, ya que el tiempo de análisis es relativamente corto (14 a 19 minutos)^{47, 52}. (figura 16, 17)

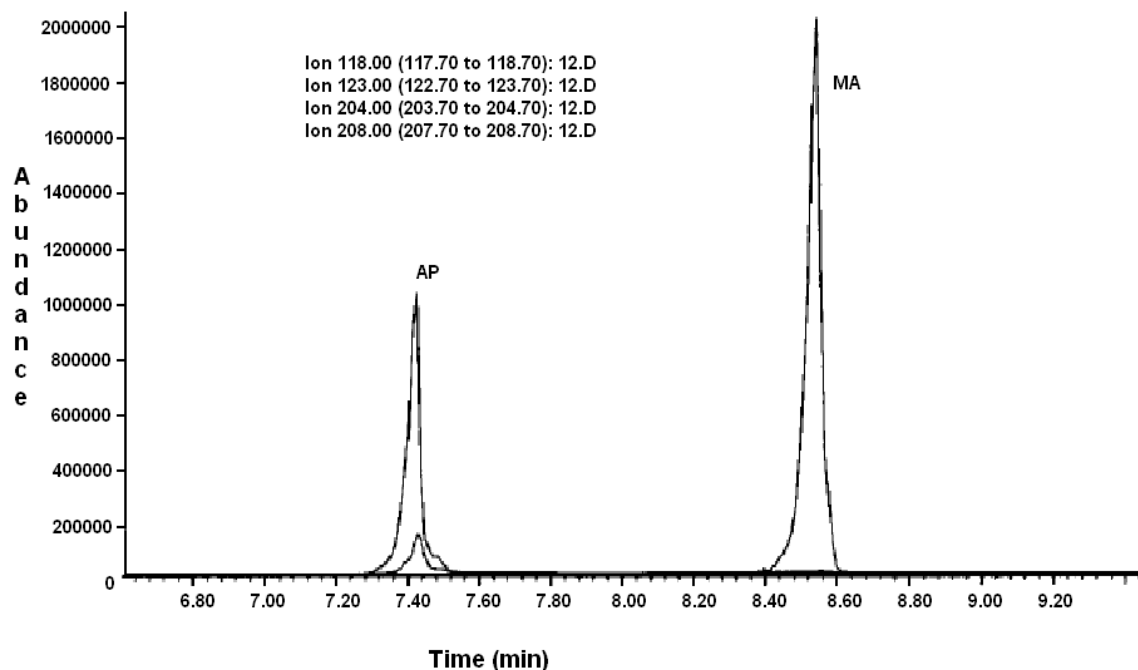


Figura 16. Cromatograma de una muestra de cabello positiva para amfetaminas (AP) y metaamfetaminas (MA)⁴⁷.

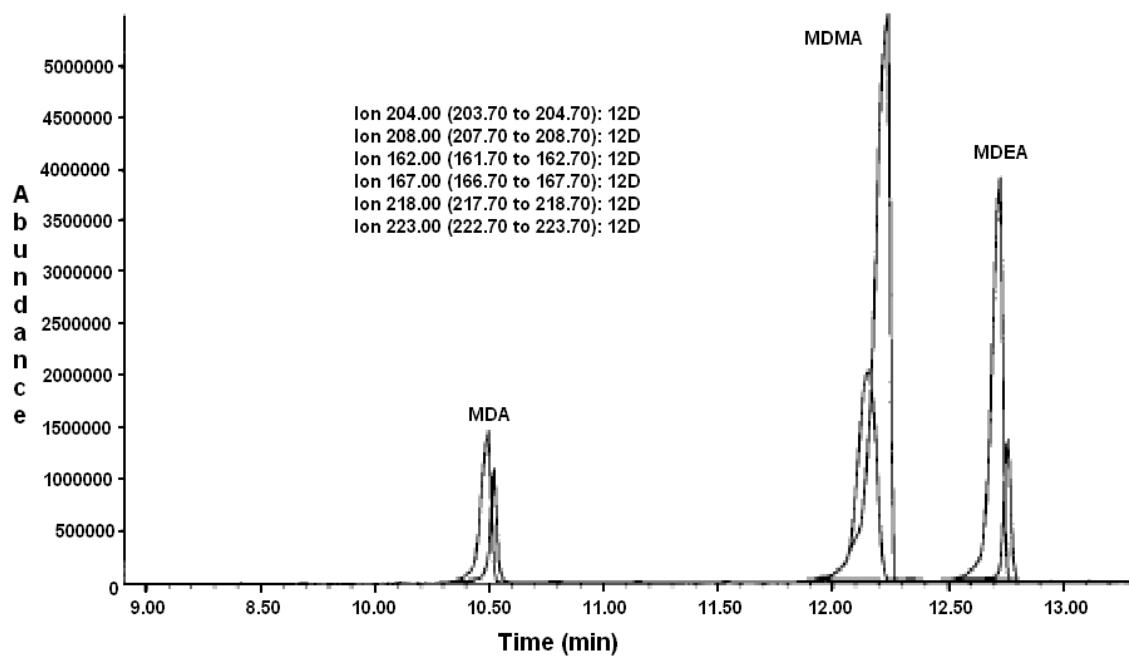


Figura 17. Cromatograma de una muestra de cabello positiva para 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxietamfetamina (MDEA)⁴⁷.

A10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS) es uno de los métodos utilizados para el análisis de amfetaminas en pelo, ya que permite la obtención de resultados confiables, todo esto siguiendo una metodología apropiada y tomado en cuenta las variables que puedan interferir como:

- Contaminación externa del cabello. El lavar la muestra antes de iniciar el análisis nos dará la certeza de que solo se va a trabajar con cabello y no con algún componente que pudiera alterar los resultados y dar algún falso⁴⁷.
- La extracción de amfetaminas del cabello. La digestión o hidrólisis alcalina^{47, 50, 51, 52} la cual incrementa considerablemente la cantidad de droga recuperada de la matriz pilosa aún en comparación con la hidrólisis enzimática⁴⁷.
- Un medio ácido al concentrar la muestra después de la digestión o hidrólisis alcalina permite que las amfetaminas no se volatilicen^{47, 51, 52}.
- Formación de compuestos derivados. Proporciona un fácil manejo del analito y mejor resolución^{47, 52}.
- Condiciones cromatográficas. La columna, gas acarreador, flujo, tiempo de análisis y demás parámetros en las cuales se obtiene una mejor separación de las amfetaminas.
- Trabajar en las mejores condiciones en el laboratorio (Buenas Prácticas de Laboratorio).

A11 CONCLUSIONES

El consumo de amfetaminas se ha incrementado mundialmente, por lo que es de suma importancia el desarrollo de una técnica que permita su identificación y cuantificación en individuos donde el consumo es habitual. El cabello tiene la capacidad de almacenar el consumo de sustancias tóxicas a largo plazo, por lo que la cromatografía de gases en conjunto con la matriz pilosa es la técnica más reconocida internacionalmente para la detección de amfetaminas en cabello.

En dicho protocolo de análisis se deben de considerar las variables como:

- Toma, conservación y traslado de la muestra.
- Parámetros cromatográficos.
- Sistemas de extracción.
- Formación de un compuesto derivado.
- Buenas prácticas de laboratorio.

para asegurar el éxito en el desarrollo de una metodología analítica efectiva por cromatografía de gases de las amfetaminas en cabello.

Un elemento al que se recurre con mucha frecuencia conjuntamente con la cromatografía de gases, es la espectrometría de masas, la cual proporciona la capacidad de identificar y cuantificar la droga presente en la muestra.

A12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández, A., Pla, A., Villanueva, E., Aplicación de los Inmunoensayos EMIT st y Triage al Análisis de Opiáceos y Cocaína en Muestras de Pelo. XI Jornadas Mediterráneas de Medicina Legal. **1994**; 104-106.
2. Casas, J. M., García, J., Guadayol, J. M., Olivé, J., Análisis Instrumental 2: Cromatografía y Electroforesis. UPC. Barcelona. **1994**: 250-256.
3. Jiménez, R., Estudio Criminalístico de Pelos y Fibras. Cuadernos del Instituto Nacional de Ciencias Penales. México. **1981**: 26, 26, 35-40, 80-88.
4. Mieczkowski, T., Drug Testing Technology. CRC press LLC. Florida. **1999**: 5-8, 51-59, 293-296.
5. Camí, J., Farré, M., Farmacología de los Alucinógenos. Ediciones en Neurociencias; Barcelona. **1996**: 11-28.
6. Kłys, M., Rojeka, S., Kulikowskab, J., *et al.*, Usefulness of Multi-Parameter Opiates–Amphetamines –Cocainics Analysis in Hair of Drug Users for the Evaluation of an Abuse Profile by Means of LC–APCI-MS-MS. *J. Chrom. B.* **2007**; 854: 299-307.
7. Saferstein, R., Criminalistics an Introduction to Forensic Science. 6a ed. Prentice Hall. New Jersey. **1998**: 211-236.
8. Pomillo, A., Vitale, A., Técnicas para Determinación Cualitativa/Cuantitativa de Drogas de Abuso en Fluidos Biológicos. *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.* **2006**; 40(3): 347-382.
9. Suzuki, O., Hattori, H., Asano, M., Detection of Methamphetamine and Amphetamine in a Single Human Hair by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Forensic Sci.* **1984**; 29 (2): 611-617.
10. Terán, A. Lo que Usted Debe Saber Sobre las Drogas Estimulantes Cocaína y Anfetaminas. Cartilla de Divulgación, Caja España. Palencia. **2002**. 40-43, 45-47.
11. Ankara, Y., Kikura, R., Hair Analysis for Drugs of Abuse XIII. Effect of Structural Factors on Incorporation of Drugs into Hair: The Incorporation Rates of Amphetamine Analogs. *Arch. Toxicol.* **1996**; 70: 841-849.

12. Cirimele, K., Kintz, P., Mangin, P., Detection of Amphetamines in Fingernails: An Alternative to Hair Analysis. *Arch Toxicol.* **1995**; 70: 68-69.
13. Goldblum, R. W., Goldblum, R. L., Piper, W. N., Barbiturate Concentrations in the Skin and Hair of Guinea Pigs. *J. Invest. Dermatol.* **1954**; 22: 121-128.
14. Perkins, A. M., Locani, O. A., Lorenzo, J. L., Drogas en Pelo: Sus Alcances y Limitaciones. I. *Cuadernos De Medicina Forense.* **2004**; 3: 31-34.
15. Pichini, S., Distribution of 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) in non Conventional Matrices and it's Applications in Clinical Toxicology. Doctoral Thesis. Universiat Autónoma de Barcelona. Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología. **2006**: 40-47
16. Wenning, R., Potential Problems with the Interpretation of Hair Analysis Result. *Forensic Sci. Int.* **2000**, 107: 5-12.
17. Henderson, G. L., Harkey, M. R., Jones, R. T., *et al.*, Incorporation of Isotopically Labeled Cocaine and Metabolites into Human Hair: Dose-Response Relationships. *J. Anal. Toxicol.* **1996**; 20:64-80
18. Henderson, G. L., Mechanisms of Drug Incorporation into Hair. *Forensic Sci. Int.* **1993**; 63: 19-29.
19. Henderson, G. L., Harkey, M. R., Jones, R. T., Zhou, C., Effect of External Contamination on the Analysis of Hair for Cocaine. Paper Presented at the Joint Meeting of Forensic. *J. Anal. Toxicol.* **1996**; 20: 1-12.
20. Blank, D., Kidwell, D., Decontamination Procedures for Drugs of Abuse in Hair: are they Sufficient? *Forensic Sci. Int.*, **1995**; 70: 13-38.
21. Kintz P., Drug-Testing in Addicts a Comparison Between Urine, Sweat and Hair. *Ther Drug Monit.* **1996**; 18: 450-455.
22. Nakahara, Y., Hanajiri, R., Hair Analysis for Drugs of Abuse XXI. Efect of Para-substituents on Benzene Rig of Methamphetamine on Drug Incorporation into Rat Hair. *Life Sci.* **2000**; 66: 563-574.
23. Joseph, R. E. Jr., Su, T. P., Cone, E. J., *In Vitro* Binbing Studies of Drug to Hair: Influence of Melanin and Lipids on Cocaine Binding to Caucasoid and Africoid Hair. *J. Anal. Toxicol.* **1996**; 20: 338-344.

24. Nakara, Y., Detection and Diagnostic Interpretation of Amphetamines in Hair. *Forensic Sci. Int.* **1995**; 70:135-153.
25. Gygi, S. P., Joseph, R. E. Jr., Cone, E. J., *et al.*, Incorporation of Codeine and Metabolites into Hair. Role of Pigmentation. *Drug Metab. Dispos.* **1996**; 24: 495-501.
26. Koch, S., Deedrick, D., Microscopy of Hair Part II: A Practical Guide and Manual for Animal Hairs. *Forensic Sci. Com.* **2004**; 6 (1)
27. Deedrick, D., Koch, S., Microscopy of Hair Part 1: A Practical Guide and Manual for Human Hairs. *Forensic Sci. Com.* **2004**; 6 (1)
28. Roig-Traver, A., Sobre el Uso Recreativo de la Metilendioximetamfetamina: Aspectos Históricos y Efectos Adversos. *Adicciones.* **1994**, 6 (4): 437-452.
29. Poklis, A., Mackell, M., Drake, W., Fatal Intoxication From 3,4-methylenedioxyamphetamine. *J. Forensic Sci.* **1979**; 24: 70-75.
30. Joseph, D. E., Vigil, S. T., Feussner, G., Drugs of Abuse. *Drug Enforcement Administration.* Virginia. **2003**: 3.
31. Christophersen, A., Amphetamine Designer Drugs – an Overview and Epidemiology. *Toxicol. Lett.* **2000**; 112–113: 127–131.
32. Laboratory and Scientific Section the United Nations Office on Drugs and Crime. Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and Their Ring-Substituted Analogues in Seized Materials. Manual for Use by Nations Drug Testing Laboratories. United Nations. New York. **2006**: 5-8, 10.
33. Department of Mental Health and Substance Dependence. World Health Organization. Systematic Review of Treatment for Amphetamine-related Disorders. World Health Organization. Switzerland. **2001**: 6-8.
34. Lim, H. K., Foltz, R. L. *In Vivo* and *in Vitro* Metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the Rat: Identification of Metabolites Using an Ion Trap Detector. *Chem. Res. Toxicol.* **1988**; 1: 370–8.
35. Maurer, H. H., Bickeboeller-Friedrich, J., Kraemer, T., *et al.*, Toxicokinetics and Analytical Toxicology of Amphetamine-derived Designer Drugs (“Ecstasy”). *Toxicol Lett.* **2000**; 112: 133–142.

36. Lim, H. K., Foltz, R. L., *In Vivo* Formation of Aromatic Hydroxylated Metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the Rat: Identification by Ion Trap Tandem Mass Spectrometric (MS/MS and MS/MS/MS) Techniques. *Biol. Mass Spectrom.* **1991**; 20: 677–86.
37. Lim, H. K., Foltz, R. L., Ion Trap Tandem Mass Spectrometric Evidence for the Metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine to the Potent Neurotoxins 2,4,5-trihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxyamphetamine. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**; 4: 626–32.
38. Maurer, H. H., On the Metabolism and the Toxicological Analysis of Methylenedioxyphenylalkylamine Designer Drugs by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit.* **1996**; 18: 465–70.
39. Yeh, S. Y., Effects of Salicylate on 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)- Induced Neurotoxicity in Rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**; 58: 701–8.
40. Liebich, H. M., Forst, C., Basic Profiles of Organic Acids in Urine. *J. Chrom.* **1990**; 525: 1–14.
41. Kraemer, T., Maurer, H. H., Toxicokinetics of Amphetamines: Metabolism and Toxicokinetic Data of Designer Drugs, Amphetamine, Methamphetamine, and Their N-Alkyl Derivatives. *Ther. Drug. Monit.* **2002**; 24: 277–289.
42. Maurer, H. H., Kraemer, T., Springer, D., Staack, R. F., Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Hepatic Metabolism of Designer Drugs of the Amphetamine (Ecstasy), Piperazine, and Pyrrolidinophenone Types. *Ther. Drug. Monit.* **2004**; 26 (2): 127-131.
43. Giddings, J., Calvin, J., Unified Separation Science. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. **1991**: 216, 232-237.
44. Jennings, W., Mittlefehldt, E., Stremple, P., Analytical Gas Chromatography. 2a. ed. Academic Press. San Diego. **1997**: 6-21, 49, 135-142.
45. McNair, H. M., Miller, J. M., Basic Gas Chromatography. John Willey & Sons, Inc. New York. **1997**: 86-97, 153-163.

46. These Areas were Addressed in a Previous Consensus from the Society of Hair Testing/Forensic Science International **1997**; 84: 3-6.
47. Villamor, J., Bermejo, A., Fernández, P., A New GC–MS Method for the Determination of Five Amphetamines in Human Hair. *J. Anal. Toxicol.* **2005**; 29: 135-139.
48. Röhrich, J., Kauert, G., Determination of Amphetamine and Methylenedioxy-amphetamine-derivates in Hair. *Forensic Sci. Int.* **1997**; 84: 179-188.
49. Uhl, M., Determination of Drugs in Hair Using GC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.* **1997**; 84: 281-294.
50. Skender, L., Karac̆ic, V., Br̆c̆ic, I., Quantitative Determination of Amphetamines, Cocaine, and Opiates in Human Hair by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **2002**; 125: 120-126.
51. Gentili, S., Torresi, A., Marsili, R., Simultaneous Detection of Amphetamine-like Drugs with Headspace Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography–mass Spectrometry. *J. Chrom. B.* **2002**; 180: 183-192.
52. Pujadas, L., Pichini, M., Poudevida, S., Development and Validation of a Gas Chromatography-Mass Spectrometry Assay for Hair Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and Methylenedioxy Derivates. *J. Chrom. B.* **2003**; 798: 249-255.