



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE TETRAHIDROCANNABINOL (THC) EN
MUESTRAS DE ORINA POR CROMATOGRFÍA DE GASES
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ANA PATRICIA ALMARAZ SIBAJA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Josefina Elizalde Torres**

VOCAL: **Profesor: Lucía Hernández Garcíadiego**

SECRETARIO: **Profesor: Dr. Miguel Ángel Delgadillo Marín**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Martín Daniel Trejo Valdéz**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Guadalupe de la Rosa Canales**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO NACIONAL DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL DOPAJE. COMISIÓN NACIONAL DE CULTURA FÍSICA Y DEPORTE

ASESOR DEL TEMA:

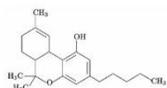
DR. MIGUEL ÁNGEL DELGADILLO MARÍN

SUSTENTANTE (S):

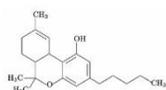
ANA PATRICIA ALMARAZ SIBAJA

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Dopaje en el deporte.....	4
3.2 Agencia Mundial Antidopaje. (WADA)	5
3.2.1. Orígenes.....	5
3.2.2. Lista de sustancias y métodos prohibidos.....	6
3.3. Marihuana	7
3.3.1. Cannabinoides.....	8
3.3.2. Tetrahidrocannabinol y su metabolismo.....	11
3.3.3. Marihuana y dopaje	15
3.3.4. Estrategias de análisis para tetrahidrocannabinol.....	16
3.4. Cromatografía	18
3.4.1. Clasificación de los métodos cromatográficos.....	18
3.4.2. Cromatografía de Gases	20
3.4.2.1. Componentes del cromatógrafo de gases.....	21
3.4.2.1.1. Gas portador	21
3.4.2.1.2. Inyector	21
3.4.2.1.3. Columna cromatográfica.....	22
3.4.2.1.4. Detectores.....	24
3.5. Espectrometría de Masas	26
3.5.1. Componentes del espectrómetro de masas.....	27
3.5.2. Analizadores de masa	28
3.5.2.1. Analizador de masas tipo cuadrupolo	28
3.6. Acoplamiento CG/EM.....	30
3.6.1. Instrumentación	30
3.7. Análisis Cuantitativo.....	31
3.8. Método de Estándar interno y Estándar externo.....	32
3.9. Matrices biológicas.....	33
3.10. Técnicas de preparación de muestras.....	34
3.10.1. Hidrólisis	34
3.10.1.1. Hidrólisis enzimática.....	34
3.10.1.2. Hidrólisis alcalina.....	34
3.10.2. Extracción líquido-líquido.....	35
3.10.2.1. Salting Out.....	35
3.10.3. Extracción en fase sólida.....	37
3.10.4. Derivatización.....	37
3.11. Validación de métodos analíticos.....	38
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
5. OBJETIVOS.....	42
5.1. Objetivo General	42
5.2. Objetivos Particulares	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1. Reactivos	43
6.2. Materiales.....	43
6.3. Instrumentación.....	44
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL	45
7.1. Desarrollo del método por CG-EM.....	45
7.1.1. Análisis cromatográfico.....	45

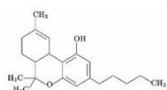


7.1.2. Condiciones cromatográficas de análisis	49
7.2. Tratamiento de las muestras.	49
7.3. Optimización del método.	52
7.3.1. Eficiencia de hidrólisis	52
7.3.2. Evaluación del efecto del pH en la extracción líquido-líquido.	54
7.3.3. Evaluación del efecto de salting out.	54
7.3.4. Evaluación de diferentes disolventes orgánicos en la extracción líquido-líquido.	55
7.3.5. Evaluación de dos diferentes columnas para la extracción en fase sólida (EFS)	55
7.4. Validación del método analítico.	56
7.4.1. Linealidad.	57
7.4.2. Precisión intraensayo y recuperación a 25 ng/mL	58
7.4.3. Precisión interensayo, límite de detección, cuantificación y recuperación a 15 ng/mL	58
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
8.1. Eficiencia de hidrólisis	60
8.2. Evaluación del efecto del pH en la extracción líquido-líquido	60
8.3. Evaluación del efecto de salting out.	62
8.4. Evaluación de diferentes disolventes orgánicos en la extracción líquido-líquido.	63
8.5. Evaluación de dos diferentes columnas para la extracción en fase sólida (EFS)	64
8.6. Resumen de la optimización del método analítico	65
8.7. Validación del método analítico	66
8.7.1. Linealidad	66
8.7.2. Precisión y Recuperación	68
8.7.2.1. Precisión intraensayo	68
8.7.2.2. Precisión interensayo	69
8.7.2.3. Recuperación	70
8.7.3. Límite de detección y límite de cuantificación	70
9. CONCLUSIONES.....	72
10. LISTA DE REFERENCIAS.....	74
11. ANEXOS.....	79
ANEXO 1.....	80
Curva de calibración 10-350 ng/mL	80
ANEXO 2.....	83
Curva de calibración 5-50 ng/mL	83
ANEXO 3.....	86
Curva de calibración 5-35 ng/mL	86



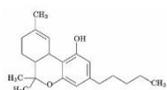
INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Logo de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en ingles)	5
Figura 2	Planta macho y hembra de <i>Cannabis sativa</i> . Características generales.	8
Figura 3	Estructura de los principales cannabinoides.....	9
Figura 4	Distribución de los receptores cannabinoides en el organismo.	10
Figura 5	Metabolismo de Δ^9 -THC.	14
Figura 6	Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.....	21
Figura 7	Inyector para Cromatógrafo de Gas, de vaporización instantánea.	22
Figura 8	Columnas cromatográficas..	23
Figura 9	Principales componentes de un espectrómetro de masas.	27
Figura 10	Analizador de masas tipo cuadrupolo.....	29
Figura 11	Instrumentación general del acoplamiento CG-EM.	31
Figura 12	Representación esquemática de la reacción de la enzima β -glucoronidasa	34
Figura 13	Representación esquemática del proceso de salting out.....	36
Figura 14	Molécula de THC-COOH, derivatizada con MSTFA.....	38
Figura 15	Equipo empleado para el análisis por CG/EM	45
Figura 16	Cromatograma por extracto de iones de tipo <i>overlay</i> donde se muestran los iones seleccionados para la cuantificación de THC-COOH y el estándar interno THC-COOHd3.	48
Figura 17	Metodología empleada en la optimización.....	51
Figura 18	Metodología general empleada para la extracción en fase sólida	56



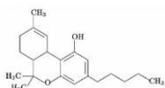
INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Áreas relativas de las muestras hidrolizadas por el método de hidrólisis enzimática e hidrólisis básica	60
Gráfico 2 Áreas relativas de los diferentes analitos del THC, al extraerlos a diferentes valores de pH	61
Gráfico 3 Áreas relativas de los diferentes analitos del THC en la evaluación del efecto Salting out, a 5 diferentes concentraciones de NaCl al 30%.	62
Gráfico 4 Áreas relativas de los analitos del THC evaluados con 3 diferentes disolventes orgánicos.....	63
Gráfico 5 Áreas relativas de los diferentes analitos del THC en la extracción en fase sólida con dos diferentes tipos de cartuchos	64
Gráfico 6 Curvas de calibración realizadas para la validación del método analítico.....	67



LISTA DE ABREVIATURAS

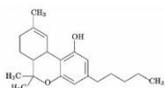
- **%CV:** Coeficiente de variación
- **11-OH THC:** 11 hidroxil- Δ^9 tetrahidrocannabinol
- **Ar:** Área relativa
- **CBD:** Cannabidiol
- **CBN:** Cannabinol
- **CG-EM:** Cromatografía de Gases- Espectrometría de masas
- **CGL:** Cromatografía gas-líquido
- **CGS:** Cromatografía gas-sólido
- **COI:** Comité Olímpico Internacional
- **EFS:** Extracción en fase sólida
- **EI:** Estándar Interno
- **KOH:** Hidróxido de Potasio
- **LC:** Límite de Cuantificación
- **LD:** Límite de Detección
- **MSTFA:** N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
- **SA:** Solución Amortiguadora
- **SIM:** Monitoreo Selectivo de Iones
- **TBME:** Terc-butil metil éter
- **THC:** Δ^9 - tetrahidrocannabinol
- **THC-COOH:** 11 nor-9 carboxi- tetrahidrocannabinol
- **Tr:** Tiempo de retención
- **WADA:** Agencia Mundial Antidopaje



1. RESUMEN

La metodología desarrollada en el presente trabajo abarcó diversos procesos químicos como: hidrólisis, elección de pH óptimo de extracción, elección del disolvente para la extracción líquido-líquido, evaluación de dos tipos de cartuchos (C8 y C18) para la extracción en fase sólida y la formación de derivados silanizados para el posterior análisis cromatográfico, se evaluaron los parámetros analíticos antes mencionados, hasta encontrar las condiciones óptimas de preparación de la muestra.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de análisis, hidrólisis básica con KOH, extracción líquido-líquido con acetato de etilo, pH de extracción a 5, se realizó un ensayo de validación preliminar del método, con objeto de garantizar la calidad y confiabilidad de los resultados, y así poder utilizar el método desarrollado de manera rutinaria como método de análisis, o para la confirmación de la presencia de cannabinoides en orina de atletas y por lo tanto el consumo de esta sustancia prohibida, los resultados obtenidos en este ensayo de validación fueron: linealidad coeficiente de correlación de 0.99, límite de detección 1.15 ng/mL, límite de cuantificación 3.82 ng/mL, % de recuperación de 107.65%, 110.55% y 99.82%, el coeficiente de variación de cada uno fue 3.72%, 3.05% y 3.40% respectivamente.



2. INTRODUCCIÓN

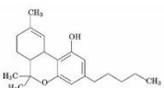
El tetrahidrocannabinol (THC) es el mayor componente psicoactivo de la marihuana, proveniente de la planta *Cannabis sativa*, está compuesto generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno.[1,2]

Presenta propiedades hidrofóbicas por lo que se encuentra mayoritariamente unido a proteínas plasmáticas (90-95%), es decir, se encuentra altamente distribuido en todo el organismo, debido a su naturaleza liposoluble al llegar a la circulación sistémica, el THC se distribuye rápidamente por el organismo, primero a los tejidos más irrigados (cerebro, riñón, estómago, pulmones, hígado, corazón, bazo, etc.) y posteriormente se acumula en el tejido adiposo. El THC acumulado en el tejido adiposo se va liberando lentamente a la sangre, de forma que su eliminación completa puede necesitar 30 días, y pasa en parte al sistema nervioso central.[3]

Los cannabinoides son metabolizados en gran parte en el hígado por hidroxilación y oxidación microsomal por el citocromo P450 (sobre todo por la subunidad CYP2C9). Otros tejidos como el intestino y el pulmón también participan en menor grado en la metabolización de los cannabinoides. [3]

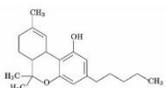
Los metabolitos activos (11-OH-THC) e inactivos (THC-COOH) son eliminados por la orina (12%) y por las heces (68%). El THC-COOH es el metabolito urinario predominante; un 50% del mismo se excreta el primer día de la administración éste aparece también en otros líquidos biológicos como el sudor, la saliva y el cabello. [4,5]

El 11-OH-THC puede sufrir varias modificaciones, siendo la más importante la oxidación a 11-nor-9-carboxy-THC (THC-COOH) y posterior glucoronidoconjugación. El propio THC y algunos metabolitos activos son sometidos a recirculación enterohepática y ello contribuye a prolongar la duración de su efecto. [1]



INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se desarrolló y optimizó en primera instancia una metodología cromatográfica y posteriormente una metodología de preparación de muestra, para la determinación del consumo de Cannabinoides por medio del análisis de Tetrahidrocannabinol (THC), que es la sustancia psicoactiva consumida y de sus dos metabolitos mayoritarios, 11-Nor-9-carboxy-THC (THC-COOH) y el 11-OH- Δ^9 -THC (11-OH-THC), ambos como confirmación del consumo de esta sustancia prohibida por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en inglés) como parte del control antidopaje en atletas de alto rendimiento. Cabe destacar que para optimizar la metodología desarrollada en este trabajo, partimos de un método ya establecido en el Laboratorio, que se describe más a detalle en la parte de metodología.



3. ANTECEDENTES

3.1 Dopaje en el deporte.

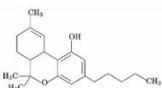
La palabra dopaje se deriva probablemente del término holandés “*Dop*”, el nombre de una bebida alcohólica hecha de piel de uva y usada por los guerreros Zulú a fin de mejorar sus habilidades en batalla. [9]

Los antiguos atletas griegos eran conocidos por el uso de dietas especiales y pociones estimulantes para fortalecerse. La estricnina, cafeína, cocaína y alcohol eran usados a menudo por ciclistas y otros atletas de resistencia durante el siglo XIX. [9]

En el Código Mundial Antidopaje, se define la palabra dopaje como la presencia de una sustancia prohibida, sus metabolitos o marcadores, en una muestra corporal de un atleta siendo éste responsable del hallazgo de cualquier sustancia prohibida en su sistema, independientemente de la forma de llegada de ésta al organismo. [9,10]

Este código también establece otros criterios para considerar que se incurre en un delito de dopaje, mencionados a continuación:

- La presencia de una sustancia prohibida, de sus metabolitos y/o marcadores.
- Uso o intento de uso de una sustancia o método prohibido, no siendo necesario que el empleo consiga éxito, además, el rehusarse, o no realizarse sin justificación evidente, la toma de muestras tras la oportuna notificación, no estar disponible para el estudio como consecuencia de no ofrecer información para la localización o no acudir a una prueba, alterar o intentar alterar, cualquier parte del control de dopaje.
- Posesión de sustancias o métodos prohibidos. Esto incluye la posesión por los atletas y/o el personal de apoyo.
- Tráfico de cualquier sustancia o método prohibido.
- Administración o intento de administración de una sustancia prohibida o método prohibido a algún deportista, o a la asistencia, incitación, contribución, instigación, encubrimiento o cualquier otro tipo de complicidad



en relación con una infracción de la norma antidopaje, o cualquier otra tentativa de infracción [10]

3.2 Agencia Mundial Antidopaje. (WADA)

3.2.1. Orígenes.

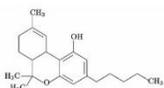
A principios de 1999 en Lausana, Suiza, se llevó a cabo la Conferencia Mundial sobre dopaje de la cual se produjo la Declaración de Lausana sobre el dopaje en el deporte. Este documento facilitó la creación de un organismo internacional independiente que fuese completamente operativo para el inicio de los XXVII juegos olímpicos en Sydney en el 2000. [9]

De acuerdo a los términos de la declaración de Lausana, La Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en ingles), fue establecida el 10 de Noviembre de 1999 para promover y coordinar la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel internacional. La WADA fue establecida como una fundación bajo la iniciativa del Comité Olímpico Internacional (COI) con el respaldo y participación de organizaciones intergubernamentales, autoridades Públicas y Deportivas, así como otros entes públicos y privados involucrados en la lucha contra el dopaje.

La WADA es responsable de monitorear todas las actividades antidopaje de las autoridades públicas y deportivas, desde la aceptación, hasta la implementación y el cumplimiento. Para esto debe asegurarse de que todas las autoridades en todos los países cumplan con el Código Mundial Antidopaje, que es el documento que armoniza las reglas relacionadas con las actividades antidopaje en todos los deportes y áreas del mundo, fue adoptado unánimemente en 2003 por las organizaciones deportivas y los gobiernos, y entró en vigor el 1 de enero de 2004, el código asegura que las reglas y reglamentos antidopaje son los mismos para todos los deportistas de todos los países. [9 -11]



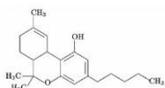
Figura 1 Logo de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en ingles)



Además la WADA se encarga de acreditar a los laboratorios distribuidos en varios países, encargados de llevar a cabo análisis de dopaje. [10,11]

3.2.2. Lista de sustancias y métodos prohibidos.

Desde el 2004, como un mandato del Código Mundial Antidopaje, la WADA es responsable de la preparación y publicación anual de la Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos, que consiste en una relación de categorías de las sustancias y métodos que están controlados por la WADA. La prohibición puede ser permanente, durante la competición, o para algunos deportes en concreto. [10,11] Esta lista no es exhaustiva, ya que varias categorías están abiertas e incluyen otras sustancias de estructura química y/o efectos biológicos similares. En el Cuadro 1, se muestra la lista de Sustancias y Métodos Prohibidos del año 2013, en donde se observan las sustancias y métodos prohibidos en todo momento, es decir, en competición y fuera de ella, las sustancias prohibidas en la competición y las sustancias prohibidas en ciertos deportes. [11]



Cuadro 1. Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos por la WADA.

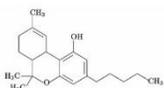
Sustancias y métodos prohibidos en todo momento (en la competición y fuera de ella)	
Sustancias:	
S1. Agentes anabolizantes	
S2. Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias relacionadas.	
S3. Agonistas β -2	
S4. Hormonas y Moduladores metabólicos	
S5. Diuréticos y otros agentes de Enmascaramiento	
Métodos:	
M1. Manipulación Sanguínea y Componentes sanguíneos	
M2. Manipulación Física y Química	
M3. Dopaje Genético	
Sustancias Prohibidos durante la competición	
S6. Estimulantes	
S7. Narcóticos	
S8. Cannabinoides	
S9. Glucocorticoides	
Sustancias Prohibidas en deportes específicos	
P1. Alcohol	
P2. Bloqueadores β	

3.3. Marihuana

En nuestro medio, en general, la marihuana a la que podríamos tener acceso procede de la planta *Cannabis sativa*, de la cual se han identificado hasta un total de 483 componentes químicos diferentes, de los grupos monoterpenos, sesquiterpenos y alcaloides. [2, 3,12]

Entre los componentes más abundantes en la planta se encuentran los llamados cannabinoides, que son los responsables de la actividad de la planta sobre el organismo [2, 3, 12,13].

La planta *Cannabis sativa*, es de crecimiento rápido en cualquier medio y puede alcanzar una altura de 4-6 metros. Pocos pesticidas afectan a este cultivo, y pocos cambios bruscos de temperatura alteran su crecimiento. Las hojas tienen cinco o



ANTECEDENTES

más hojuelas más estrechas con aspecto de estrellas, bordes dentados y de color verde oscuro, cada una de ellas irradia de un tallo unido a otro más grande y hueco. Las flores son blanquecinas y están en racimos abundantes. [12,13]

La especie es dioica, es decir, que hay plantas macho y hembra; el macho crece más y presenta flores cubiertas de polen. La planta hembra, más pequeña, tiene flores más grandes que recogen el polen y produce semillas en forma de nueces que protege con una resina pegajosa (Ver Figura 2). [2, 3, 5,12-14]

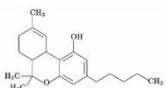


Figura 2 Planta macho y hembra de *Cannabis sativa*. Características generales.

3.3.1. Cannabinoides

Los cannabinoides están colocados en el grupo S8 de la lista de Sustancias y Métodos Prohibidos por la Agencia Mundial Antidopaje (ver cuadro 1).

Son sustancias que tienen una estructura carboxílica con veintiún carbonos y están formados por tres anillos: ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Los



ANTECEDENTES

principales cannabinoides son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN) [2, 3, 8, 12,15] (Ver Figura 3).

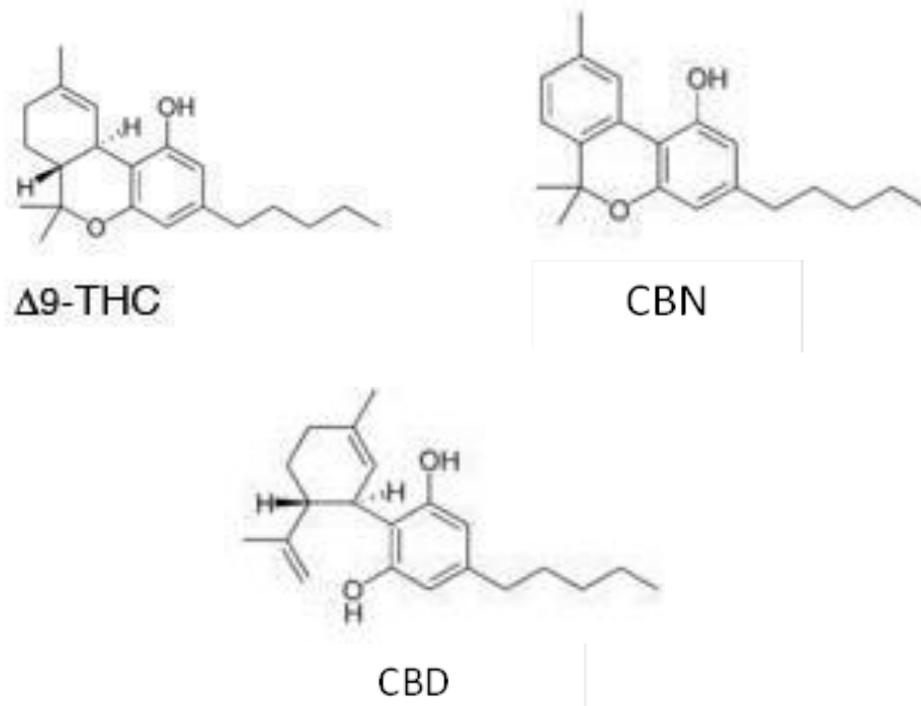
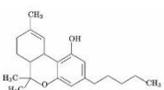


Figura 3 Estructura de los principales cannabinoides

Actualmente, se reconocen tres tipos generales de cannabinoides:

1. Los cannabinoides herbarios o fitocannabinoides: que son sintetizados naturalmente en la planta de cannabis.
2. Los cannabinoides endógenos; producidos por organismos animales y por el cuerpo humano. (ej. Anandamidas)
3. Los cannabinoides sintéticos: producidos en un laboratorio.

Todos los cannabinoides son derivados de sus respectivos 2-acidocarboxílico (2-COOH) por descarboxilación catalizados por calor, luz o condiciones alcalinas, son altamente insolubles en agua pero muy solubles en lípidos, alcoholes y otros disolventes orgánicos polares.[15-16]



ANTECEDENTES

El motivo por el cual el cannabis y sus derivados están dotados de multitud de efectos en nuestro organismo, radica en la presencia de receptores cannabinoides distribuidos por el organismo, sobre muchos tipos de células. [15-17]

En la actualidad, se han identificado dos principales tipos de receptores cannabinoides (Figura 4):

- Receptores CB1: localizados principalmente en las neuronas del cerebro, médula espinal, sistema nervioso periférico, glándulas endócrinas, salivales, bazo, corazón, aparato urinario, reproductor y gastro-intestinal.
- Receptores CB2: son menos abundantes y se encuentran principalmente en las células del sistema inmunológico. [11,16]

Modo de acción

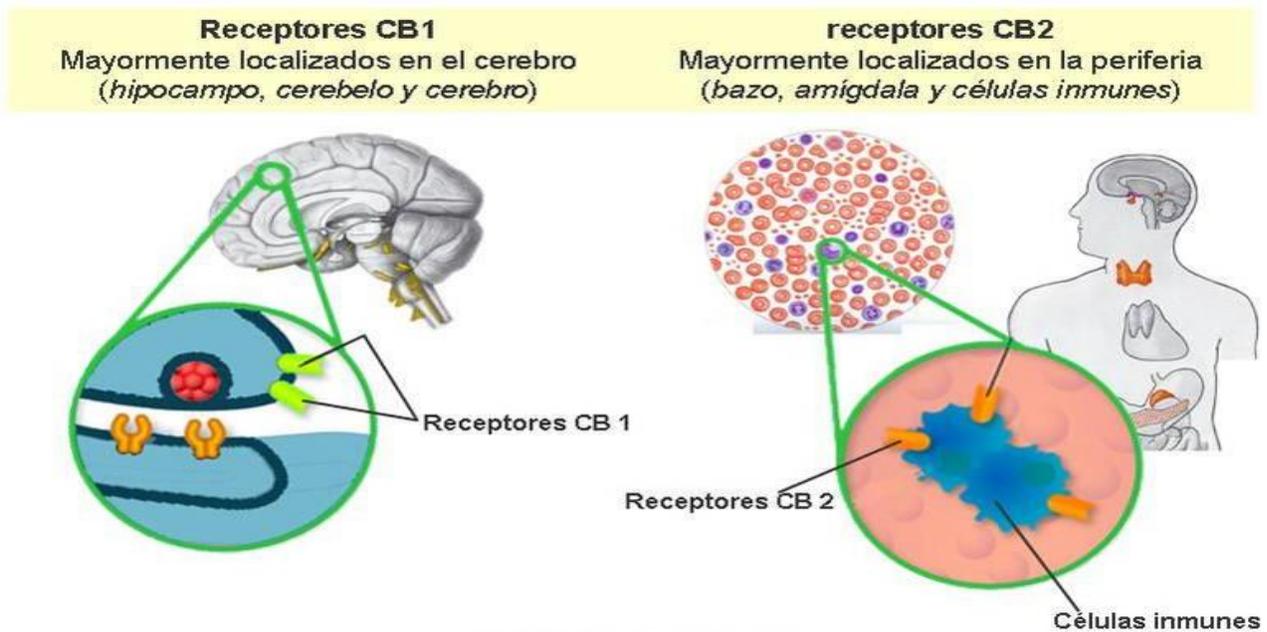
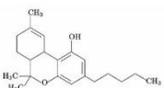


Figura 4 Distribución de los receptores cannabinoides en el organismo.



3.3.2. Tetrahidrocannabinol y su metabolismo

El cannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) es el más abundante en la planta *Cannabis sativa*, y por consiguiente el principal causante del efecto psicoactivo de la marihuana, en conjunto con el cannabinol y el cannabidiol. [13,16-18]

En estado puro es un sólido vítreo a bajas temperaturas, y se torna viscoso y pegajoso al calentarlo, es poco soluble en agua (altamente hidrofóbico Log Kw 7.61) pero se disuelve fácilmente en la mayoría de los disolventes orgánicos como el etanol o hexano, y posee altas propiedades de absorción en el espectro de UV-B (280-315 nm) [17-19]

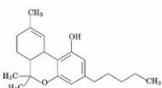
Los Cannabinoides pueden ingresar en el organismo de varias formas:

- a) Por inhalación del humo procedente de cigarrillos.
- b) Por ingestión oral de bebidas o alimentos sólidos.
- c) Por aerosoles o pulverizadores.
- d) En forma de gotas, tratamiento ocular.
- e) Por administración rectal o parenteral.

La inhalación es uno de los métodos más rápidos de administración del THC. Una vez en los pulmones, el humo entra en contacto directo con el torrente circulatorio a través de una amplia red de capilares: esta sangre se dirige casi de inmediato al cerebro, que es el lugar donde se encuentran la mayoría de los receptores cannabinoides como ya se explicó con anterioridad. [17-19]

Los fumadores podrían alcanzar una concentración máxima de THC en la sangre mientras todavía están fumando, aunque la concentración del THC depende de diversos factores como:

- El tipo de preparación utilizada, que puede ser sola o con otros ingredientes.
- La combustión de la mezcla, ya que algunos cannabinoides se descomponen rápidamente con el calor.



ANTECEDENTES

- El tiempo empleado en fumarlo ya que la duración de la inhalación y de la retención del aliento tras la aspiración, dan lugar a diferentes tiempos de contacto.

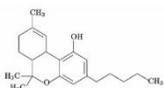
El THC se deposita rápidamente en todos los tejidos adiposos, pero a la larga se dirige al hígado y a los riñones a través de la sangre, donde es metabolizado y excretado. [18,20]

La ingestión de marihuana por vía oral puede producir efectos menores que la marihuana fumada a igual cantidad, dado que una gran parte de ésta sustancia se degrada con la digestión. [13, 21,22]

Solo un porcentaje del THC presente en sangre está en forma libre dadas sus propiedades hidrófobas, también se une a diferentes componentes plasmáticos otro porcentaje se une a las lipoproteínas plasmáticas y el resto a la albúmina, en cuanto a su distribución en los tejidos corporales el THC es captado del plasma en un 70% por los tejidos y el resto es metabolizado, dada su alta lipofilidad penetra rápidamente en los tejidos encontrando elevadas concentraciones en aquellos órganos altamente vascularizados y posteriormente se redistribuye en el tejido adiposo, por lo cual puede tardar varias semanas en ser totalmente eliminada.

El metabolismo del THC ocurre principalmente en el hígado, solo una mínima cantidad de THC en su forma original, es eliminada del cuerpo mientras que la mayor parte aparecen en forma de metabolitos tanto en las heces como en la orina. En la orina hay una apreciable presencia de 11-OH-THC y una elevada concentración de ácido THC-11-oico, ambos en forma libre o conjugada con glucurónidos. [16, 21,22]

En la figura 5 observamos el metabolismo del THC donde la primera reacción implicada en el catabolismo del Δ^9 -THC o THC, es la del citocromo P-450 que oxida el cannabinoide a derivados mono-, di- o trihidroxilados, el Δ^9 -THC es rápidamente hidroxilado a 11-hidroxi- Δ^9 -THC, o al 8-hidroxi- Δ^9 -THC, la hidroxilación puede producirse en más de ocho sitios diferentes, ya que existen diferentes tipos de citocromos P-450. La hidroxilación en posición 11 es la reacción más importante del Δ^9 -THC. [2, 23,24]



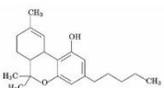
ANTECEDENTES

Así el 11-hidroxi- Δ^9 -THC puede oxidarse al ácido carboxílico correspondiente (11-nor-9 carboxi- Δ^9 -THC) o volverse a hidroxilar, que en esta segunda vía se convierte a 8,11-dihidroxi- Δ^9 -THC; estos compuestos hidroxilados son transformados, posteriormente a otros metabolitos más polares por rotura de la cadena lateral y oxidación en el C-11 al correspondiente ácido carboxílico [2, 23,24]

Un segundo tipo de conjugación, implica la esterificación del 11-hidroxi-THC con ácidos grasos de cadena larga como el oleico, el palmítico y el esteárico, siendo los responsables de la retención de los cannabinoides en los tejidos grasos. [16,23-25]

La máxima concentración de 11-hidroxi-THC es más baja que la de THC y aparece cuando se deja de fumar, el ácido Δ^9 -THC-11-oico, se detecta algunos minutos después del consumo y su concentración crece lentamente y alcanza una meseta durante un periodo prolongado de tiempo, pudiendo llegar a superar los niveles de THC hasta 5 veces. [23,24]

Los metabolitos procedentes de la degradación de los cannabinoides son eliminados en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónico (Reacciones de fase II) o con ácidos grasos. Para poder realizar esta condensación es necesario que se produzca una esterificación entre los grupos hidroxilo de los cannabinoides y los grupos carboxilo de los compuestos con los que se conjugan. Los glucuronatos así formados se almacenan en el cuerpo durante períodos relativamente prolongados de tiempo y pueden llegar a ser detectados en la orina varias semanas después del consumo.



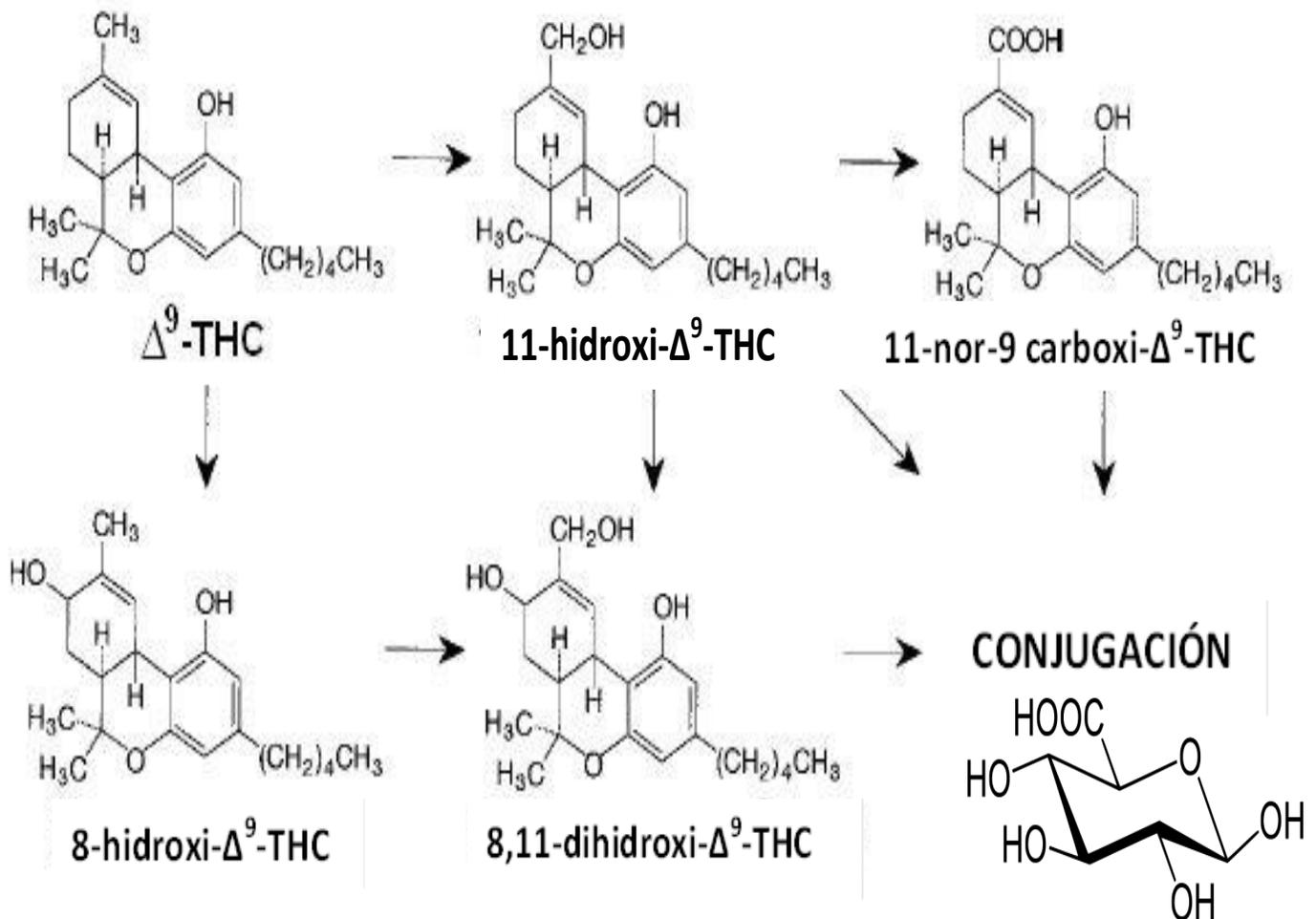
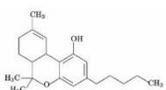


Figura 5 Metabolismo de Δ^9 -THC, en donde se muestran las principales estructuras que se forman, y la estructura del ácido glucurónico con el que se conjugan en reacciones de Fase II.



3.3.3. Marihuana y dopaje

El cannabis es popular entre las generaciones de jóvenes y es una droga social, por lo cual el cannabis está colocado en la cima de la lista de compuestos detectados por laboratorios de antidopaje acreditados por la Agencia Mundial Antidopaje, incluso se encuentra arriba de sustancias como la testosterona y la nandrolona. [6,26]

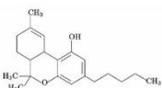
El THC es bien conocido por sus propiedades sedativas y ansiolíticas. Fumar marihuana puede afectar los procesos cognitivos, psicomotrices y el rendimiento en el ejercicio, por lo cual es considerada como una droga ergolítica, es decir que disminuye la energía. [6,26,27]

Estas propiedades pueden ser usadas por los atletas para reducir el estrés y/o la tensión en la competencia en deportes donde la relajación y el control juegan un papel importante, pueden permitir a un atleta relajarse, para escapar u olvidarse por un instante de presiones sociales, y poder dormir con mayor facilidad y tranquilidad, pero también corre el riesgo de convertirse en una persona estresada, con depresión y/o paranoia. Adicionalmente, la acción anticonvulsiva y analgésica puede ser muy atractiva para algunos atletas, especialmente para dolores óseos, de articulaciones o bien para los dolores menstruales. [6, 27]

De acuerdo con los estándares establecidos por la WADA, las muestras de orina se consideran positivas a la exposición al cannabis si la suma de las concentraciones de THC libre y conjugado es mayor a 15 ng/mL, cuando son determinadas por CG-EM. [6,10,11]

Los fumadores ocasionales de marihuana pueden tener resultados positivos en sus muestras de orina tres o cuatro días después de haber recibido una dosis promedio de marihuana. En fumadores crónicos, las muestras de orina pueden mostrar resultados positivos por 7 a 10 días después del último uso de la droga. [6, 27]

Una simple cuantificación de concentraciones urinarias de THC-COOH nos revela muy poca información del tiempo transcurrido desde su consumo. La cantidad detectada en orina depende de diversos factores:



- Dosificación del consumo más reciente.
- Tiempo transcurrido entre el consumo más reciente y la toma de muestra de orina.
- La manera de consumo (una sola ocasión o consumo regular)
- El metabolismo de cada individuo. [27]

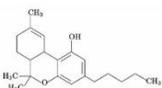
3.3.4. Estrategias de análisis para tetrahidrocannabinol.

Actualmente, los laboratorios donde se determina el consumo de sustancias de abuso han evolucionado de forma muy sofisticada y práctica para poder detectar niveles del orden de nanogramos de metabolitos de sustancias de abuso, así como terapéuticas. [28-30]

Entre las técnicas más usadas destacan las siguientes:

- El inmunoensayo: Es un método de determinación de antígenos, anticuerpos, utilizando la capacidad biocatalizadora de una enzima que enlazada covalentemente a algunos de ellos, nos permite analizar cuantitativamente una determinada sustancia. [31,32]
- Método de Elisa: También se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo para determinación de sustancias de abuso utilizando enzimas como marcadores. [31,32]
- Métodos cromatográficos: Se basan en la separación de los distintos componentes de la muestra según su peso molecular, su estado iónico. Según el estado físico de las muestras a analizar, para estas puede utilizarse la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas o bien la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM), ésta última es la técnica de confirmación más satisfactoria y de mayor validez legal. [33,34]

Para poder llevar a cabo un análisis de dopaje, es necesario establecer e identificar los compuestos de interés del THC, para ello debemos llevar a cabo un



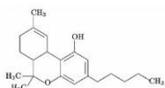
ANTECEDENTES

análisis llamado screening, este nos permitirá observar alguna de las sustancias principales o metabolitos secundarios de interés presentes en la muestra y posteriormente llevar a cabo un método de confirmación para proveer un mayor nivel de confiabilidad en los resultados. [18,34,35]

Indudablemente la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), especialmente con el detector del espectrómetro en modo impacto de electrones, es el método de referencia para la confirmación de resultados adversos obtenidos en el método de screening. [34]

Para el caso de los análisis de dopaje, las muestras de orina son las más comunes. La preparación adecuada de la muestra es un importante prerrequisito para el análisis cromatográfico, esto abarca el aislamiento y si es necesaria la separación de conjugados y/o derivatización de las sustancias y sus metabolitos. El aislamiento del compuesto de interés usualmente se lleva a cabo mediante extracción líquido-líquido a un pH al cual el analito se encuentra desionizado, o por extracción en fase sólida seguida de métodos de limpieza, posteriormente el extracto se concentra y se derivatiza para finalmente realizar el análisis cromatográfico. [34]

El análisis del THC puede llevarse a cabo en distintas muestras biológicas como son: saliva, cabello, sangre, pero la más común es en orina debido al fácil manejo de la muestra y a la permanencia de los metabolitos en ésta.



3.4. Cromatografía

En la industria moderna existen mezclas complejas que incluyen uno o más componentes activos, que provienen de distintas matrices biológicas como sangre, suero, orina e incluso tejidos, además de productos farmacéuticos, por esto el analista debe ser capaz de separar los componentes individuales de esas mezclas antes del análisis cualitativo y cuantitativo.

Entre las técnicas más poderosas con las que dispone el analista para la resolución de estas mezclas, existe la Cromatografía (derivado de chroma que significa color y graphein que significa escribir), que es un poderoso método de separación. [36]

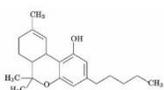
La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas complejas basadas en las afinidades diferenciales de los solutos, entre dos fases no miscibles, de las cuales una de las fases es estacionaria, es una fase fija de gran área superficial, que se fija a una columna o a una superficie sólida mientras que la otra la fase móvil, es un líquido, gas o fluido supercrítico, el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o dentro de ella. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez, lo cual provoca que los componentes de la mezcla se separen en bandas o zonas las cuales se analizan.[33,36,37]

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada sobre material de soporte inerte, es necesario que las partículas sean lo más pequeñas y homogéneas para proveer una superficie de gran tamaño, de modo que la adsorción y desadsorción de los solutos ocurra con frecuencia.

La fase móvil, puede ser un líquido, gas o fluido supercrítico puro o una mezcla de soluciones.

3.4.1. Clasificación de los métodos cromatográficos.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de las fases estacionarias y móvil; si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se

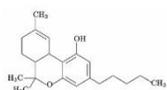


ANTECEDENTES

denomina cromatografía de adsorción, mientras que si es un líquido se llama cromatografía de partición, la diferencia de estas dos se puede atribuir a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre las dos fases. Si la fase móvil es un líquido, el proceso se denomina cromatografía líquido-sólida (CLS) pero cuando la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-sólida (CGS) (Ver Cuadro 2). [33,36,37]

Cuadro 2 Clasificación de los métodos cromatográficos

Clasificación General	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (CL). Fase móvil: Líquida	Líquido-Líquido o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (CG) Fase móvil: gas	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) fase móvil: fluido supercrítico		Sólido Especie orgánica unida a una superficie sólida.	Reparto entre fluido supercrítico y superficie químicamente modificada.



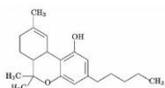
En la cromatografía de adsorción la fase móvil contiene los solutos disueltos y pasa sobre la fase estacionaria que está compuesta por un sólido, los componentes se distribuyen entre dos fases a través de la combinación de los procesos de adsorción y desorción. [28,29]

En la cromatografía de partición un material sólido inerte sirve para sostener una capa delgada de líquido que es la fase estacionaria, al paso de la fase móvil que contiene los solutos se produce la retención y separación a causa de la solubilidad relativa de los componentes analizados en los líquidos, según lo determinen sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido se denomina cromatografía de líquido-líquido (CLL) y si es un gas cromatografía líquido-gas (CGL). [33,36,37]

3.4.2. Cromatografía de Gases

En cromatografía de gases, se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa llamada gas portador.

La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyectan a través de un septo en un inyector caliente, en cuyo interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador, que puede ser Helio, Nitrógeno o Hidrógeno, y los analitos después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador, en un registrador o integrador. La columna debe de estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más elevada que la columna, de forma que los analitos se mantengan en forma gaseosa. En la figura 6 se muestran los componentes de un cromatógrafo de gases.



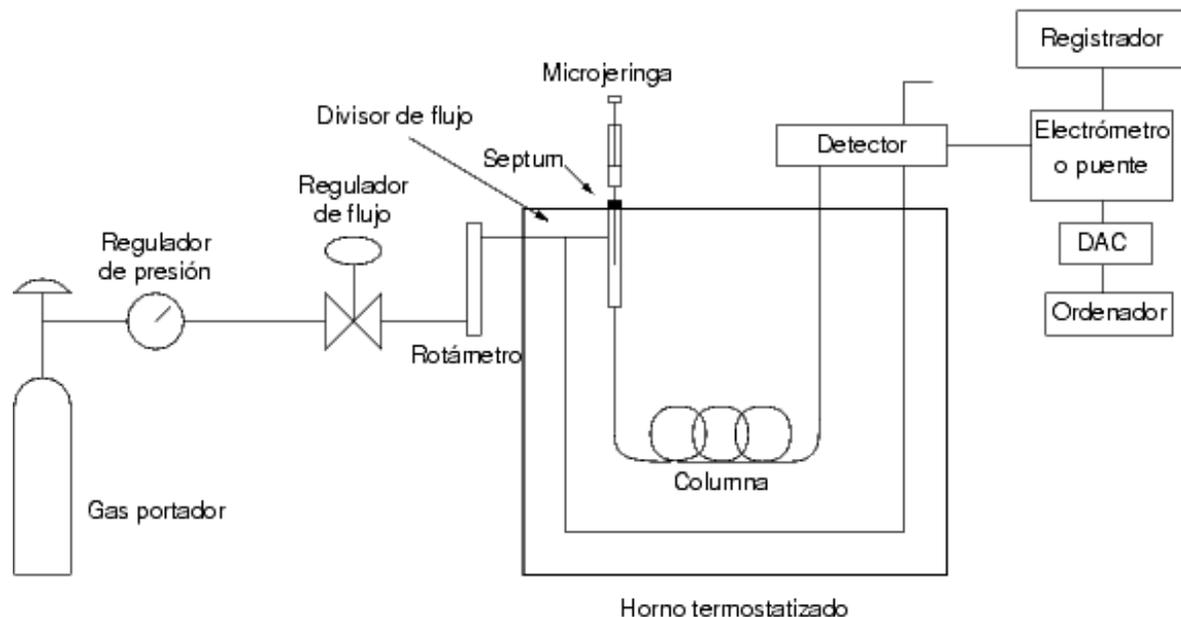


Figura 6 Representación esquemática de un cromatógrafo de gases

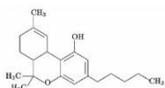
3.4.2.1. Componentes del cromatógrafo de gases.

3.4.2.1.1. Gas portador

En primer lugar se encuentra el gas portador o acarreador sirve como fase móvil, se provee en tanques de alta presión y debe tener un sistema que regule la presión del tanque al equipo, con el fin de reducir la presión y el flujo a un nivel compatible con el instrumento y adecuado al método utilizado, este debe ser un gas inerte y de alta pureza como helio, nitrógeno o hidrogeno, y se selecciona por el tipo de detector que se utilice. [33,36-38]

3.4.2.1.2. Inyector

El siguiente componente es la puerta de inyección de la muestra o inyector, que es una pequeña cámara (cámara de vaporización instantánea) calentada, por lo común, por separado a una temperatura algo superior a la de la columna (Ver Figura 7) en la cual se hace vaporizar rápidamente la muestra analítica, antes de



que entre en la cabeza de la columna, la muestra se introduce al centro de la corriente del gas a través de una goma autosellante o septum, utilizando una jeringa en el orden de los microlitros.

La muestra se inyecta dentro de la cámara directamente al comienzo de la columna para reducir la difusión debida a la turbulencia, pero también las columnas capilares exigen muestras mucho menores ($\approx 10^{-3} \mu\text{L}$) en estos casos se emplea un sistema divisor de la muestra que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechando el resto (modo Split). [33, 36-38]

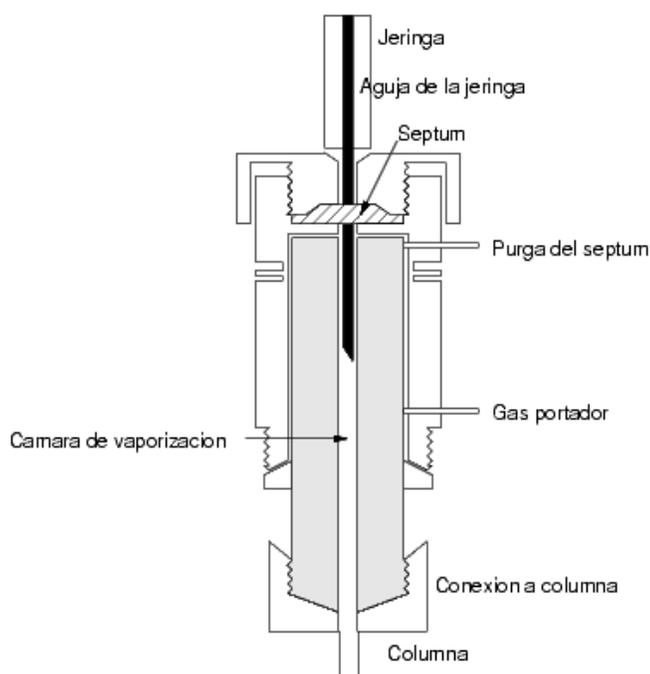
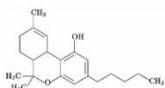


Figura 7 Inyector para Cromatógrafo de Gas, de vaporización instantánea.

3.4.2.1.3. Columna cromatográfica.

Las muestras pueden ser sólidos o líquidos, disueltos en solventes líquidos o gases, después esta mezcla gaseosa entra en la columna, se usan dos tipos generales de columnas, las rellenas y las abiertas o capilares (ver figura 8) las cuales son más eficaces y rápidas, varían en longitud desde menos de 2 metros hasta 30 metros de longitud o más, con un diámetro de 0.2 a 0.6 mm, están construidas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón, esta se coloca



ANTECEDENTES

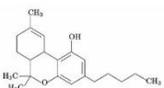
dentro de un horno con temperatura controlada, ya que esta es una variable para un trabajo preciso, la temperatura óptima depende mucho del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido.[33, 36-38]

La columna puede tener forma recta, en espiral y en forma de U, esta se llena con un material adsorbente sólido para la CGS o en el caso de la CGL una fase líquida que cubre como una capa delgada directamente sobre las paredes o sobre un aglomerado de partículas sólidas pequeñas e inertes, dependiendo de su atracción electrostática por la superficie del sólido o sus coeficientes de partición entre los dos líquidos, los solutos son retenidos en forma temporaria por la fase estacionaria, a medida que el gas transportador continua fluyendo, las moléculas retenidas difunden de nuevo a la fase móvil.[33, 36-38]



Figura 8 Columnas cromatográficas. A la izquierda se muestra una columna capilar y a la derecha una columna empacada.

Al final de la columna, cada uno de los solutos separados crean una mezcla binaria con el gas transportador que se mueve dentro del detector, que es calentado a un nivel superior que el de la columna para evitar la condensación de los solutos, los detectores deben cumplir con varias características como: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, buena respuesta



lineal, varias temperaturas de trabajo, tiempo de respuesta corto, muy confiable y manejo sencillo, respuesta selectiva a varios analitos.[37,38,39]

3.4.2.1.4. Detectores

El detector es un dispositivo que convierte a una señal eléctrica alguna propiedad física del soluto, como ejemplo la conductividad térmica, la capacidad de ionizarse o la de capturar electrones y la emite, esta señal eléctrica es proporcional a la cantidad de soluto en el gas transportador, esto se amplifica electrónicamente y se envía a un registrador adecuado que produce un registro gráfico del nivel de la señal contra el tiempo, (el cromatograma) esta se envía comúnmente a una computadora la cual almacena los resultados obtenidos.[33]

Características del detector ideal

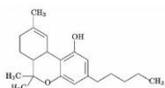
El detector ideal para cromatografía de gases tiene las siguientes características:

1. Adecuada sensibilidad
2. Buena estabilidad y reproducibilidad
3. Respuesta lineal para los solutos que se extiende a varios órdenes de magnitud.
4. Intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde temperatura ambiente hasta al menos 400 °C
5. Tiempo de respuesta corto que sea independiente del caudal
6. Alta fiabilidad y manejo sencillo
7. Respuesta semejante para todos los solutos o, por el contrario una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.

Clasificación de los detectores

Los detectores para Cromatografía de gases son clasificados de la siguiente manera:

- Detectores según su grado de selectividad: pueden ser universales, y específicos o selectivos

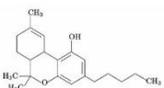


- Detectores destructivos y no destructivos
- Detectores según su modo de respuesta: pueden ser dependientes del flujo másico o dependientes de la concentración
- Detectores según el proceso de ionización

Entre los detectores más utilizados se encuentran:

- Detector de conductividad térmica
- Detector de ionización de llama
- Detector de captura electrónica
- Detector de espectrometría de masas

Éste último es uno de los más útiles debido a su alta especificidad, en el siguiente punto se describe más a fondo cómo funciona. [33,36-38]



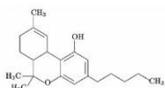
3.5. Espectrometría de Masas

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa/carga (m/z), la gran mayoría de iones presentan una sola carga de modo que la relación es la masa del ion. [34,36,37,40]

Es una técnica de análisis cualitativo muy sensible y altamente selectiva, el tamaño de la muestra generalmente es muy pequeño (microgramos a nanogramos) y los patrones son altamente reproducibles; las principales limitaciones son el costo relativamente alto, la necesidad de profesionales en el uso para la correcta interpretación de datos, el mantenimiento apropiado del equipo. En la actualidad la EM se ha convertido en una herramienta en diversos aspectos del desarrollo analítico.

La muestra que por diferentes técnicas se convierte en iones gaseosos, mediante el bombardeo por un haz de electrones, fotones, iones o moléculas, lo lleva a un estado iónico gaseoso constituido por un ion padre y diversos fragmentos iónicos de la molécula original, luego este flujo de iones positivos o negativos, son acelerados y separados de acuerdo con su masa/carga (m/z) dentro del analizador de masa, así el flujo de iones llega al detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica para que sea procesada y registrada. [34,36,37,40]

El espectro de masas registra la cantidad de diferentes tipos de iones formados en condiciones específicas graficadas contra la relación m/z , así el espectro de cada compuesto es único e irrepetible y por lo tanto puede proporcionar información valiosa en cuanto a la estructura molecular y en muchos casos hasta en una medición exacta en su peso molecular. [34,36,37,40]



3.5.1. Componentes del espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas se puede dividir en un número de componentes diferentes: una entrada simple, una fuente de iones, uno o más analizadores, un detector y finalmente una computadora que colecta los datos y controla los parámetros operacionales del instrumento (Figura 9). [34]

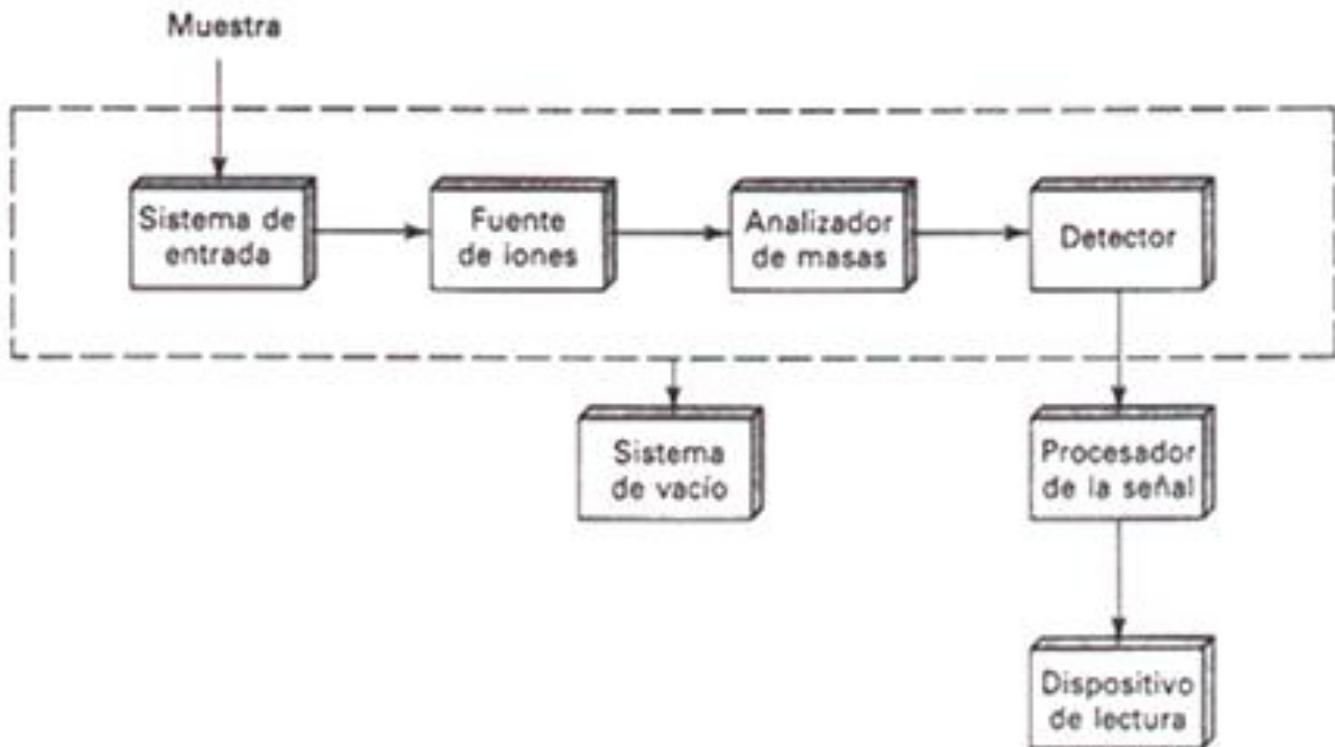
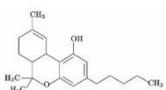


Figura 9 Principales componentes de un espectrómetro de masas. Para el análisis por espectrometría de masas (EM) de una muestra, los analitos neutros (sin carga) primero son ionizados positivamente o negativamente para permitir la manipulación por los campos magnéticos y / o eléctricos en el Espectrómetro de masas. Los iones se acomodan de acuerdo a su relación masa carga (m/z), que se representa a continuación en contra de su intensidad para generar un espectro de masas.



La electro ionización (EI) es ampliamente usada en Espectrometría de masas para muestras relativamente volátiles que son térmicamente estables y tienen un peso molecular bajo.

La ionización se produce por la interacción de las moléculas en fase gaseosa del analito y una corriente de electrones de alta energía, lo que origina la pérdida de un electrón del analito y la formación de un ión molecular M^+ como se muestra en la siguiente ecuación:



La especie cargada es el ión molecular que tiene la misma masa molecular que la molécula analizada.

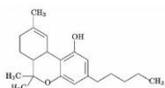
La fragmentación observada durante la EI es definida por la estructura química del analito.

3.5.2. Analizadores de masa

Después de la ionización de la muestra, los iones pasan al analizador de masas, donde son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Ésta separación puede basarse en propiedades diferentes del ión, incluyendo momentum (sectores magnéticos), energía cinética (analizador electrostático), estabilidad de recorrido (cuadrupolo lineal), frecuencias de resonancia (trampa de iones), velocidad (Tiempo de vuelo), o frecuencias axiales (Orbitrap). [34]

3.5.2.1. Analizador de masas tipo cuadrupolo

El cuadrupolo consiste en cuatro barras circulares de sección transversal circular o hiperbólica, extendida en dirección del haz de iones. Una alta frecuencia de oscilación del campo eléctrico es creado en el espacio entre las barras por el



ANTECEDENTES

rápido cambio de las tensiones, con varillas adyacentes que tienen polaridad opuesta. [34,41]

Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial de 5 a 10 V. En cualquier momento todos los iones excepto aquellos que tengan un determinado valor de m/z inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de m/z esté dentro de un intervalo limitado alcanzarán al detector (Figura 10). [34,41]

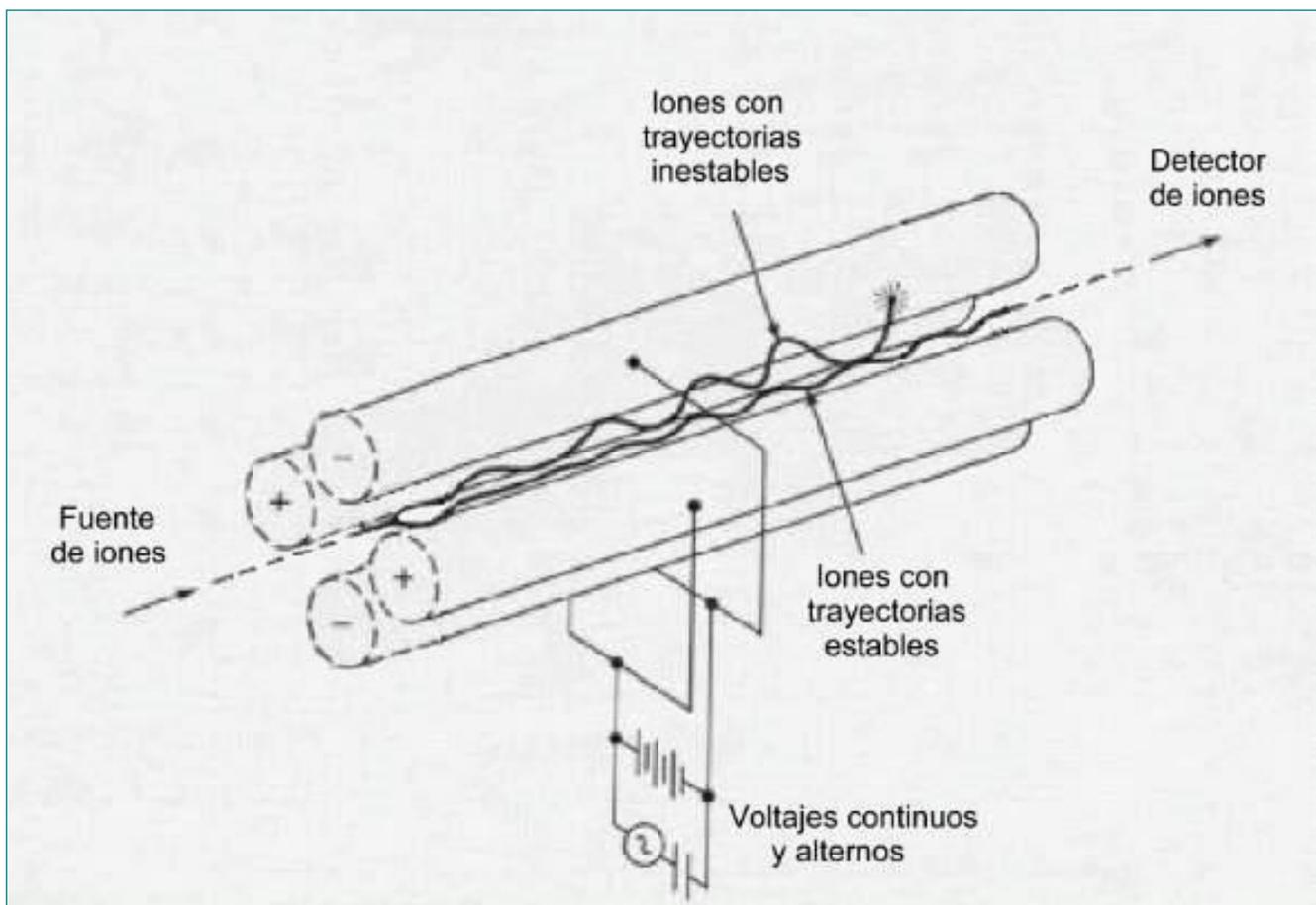
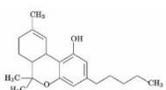


Figura 10 Analizador de masas tipo cuadrupolo; los iones de la muestra entran en el campo transversal, en donde solo los iones con trayectorias estables pasan hasta el detector de iones que son leídos en un dispositivo que transforma estas señales.



3.6. Acoplamiento CG/EM.

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales 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 a veces no resulta suficiente para una identificación inequívoca del o los analitos de interés, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes.

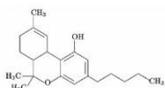
Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero es insuficiente para el análisis de mezclas debido al gran número de fragmentos con diferentes valores de m/z producidos en cada caso, el espectro resultante es tan complejo que es imposible de leer; por esta razón, se han desarrollado varios métodos en los cuales el espectrómetro de masas esta acoplado a un sistema de separación eficaz. [34,41,42]

La introducción del cuadrupolo como analizador de masas ha facilitado en gran medida en análisis por CG-EM, debido al escaneo más rápido y a las menores restricciones de vacío. [34,41,42]

3.6.1. Instrumentación

La instrumentación general para la CG-EM en línea consiste en un cromatógrafo convencional, el cual está conectado a una interfase (línea de transferencia) y al espectrómetro de masas (Figura 11).

La línea de transferencia protege el sistema de alto vacío en el analizador de masas donde también hay grandes cargas de gas provenientes del cromatógrafo, simultáneamente la línea de transferencia tiene la función transferir muchos de los analitos eluidos de la columna hacia el analizador de masas.



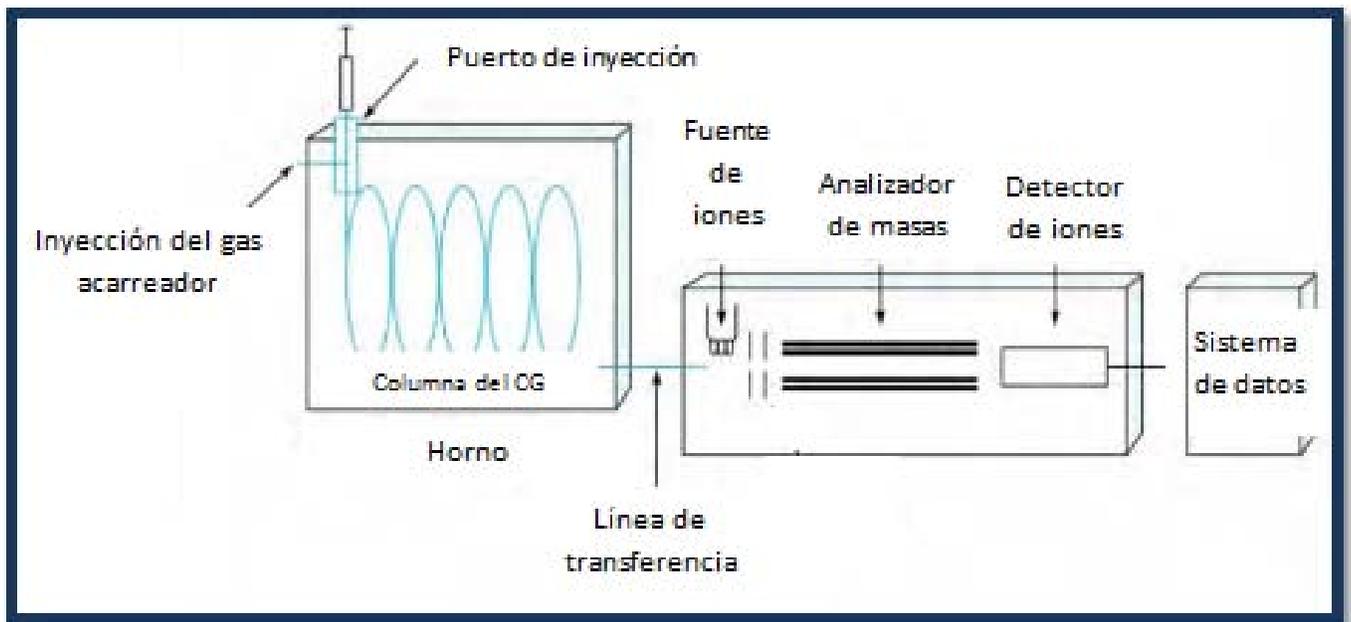
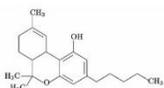


Figura 11 Instrumentación general del acoplamiento CG-EM.

3.7. Análisis Cuantitativo

La medida del área o de la altura del pico cromatográfico, es el factor más importante a la hora de realizar un análisis cuantitativo. La utilización de la altura del pico para la cuantificación es de gran comodidad, pero únicamente proporciona una exactitud aceptable en cromatogramas que presenten picos bien definidos, agudos, estrechos y muy simétricos; por ello es más frecuente utilizar el área del pico.

Existen multitud de métodos que permiten medir las áreas bajo los picos cromatográficos para ayudarnos a la cuantificación de los analitos, aunque la medida por medio de integración electrónica es por mucho la más utilizada. Este método es un dispositivo de naturaleza digital, digitaliza la señal analógica proporcionada por el detector, detecta el comienzo y el final de cada pico cromatográfico, integra digitalmente el área bajo la curva y corrige automáticamente la línea base, también se puede corregir los errores de la integración automática, modificándolo manualmente, en caso de ser necesario.



Otro método utilizado es el área relativa, que también permite corregir las diferencias del área debidas a las variaciones en la inyección de cada muestra.

Se define mediante esta ecuación:

$$A_r = A_{\text{muestra}}/A_{\text{EI}}$$

Ec.1. Área relativa.

Donde A_{muestra} es el área de la muestra que se trata de identificar y A_{EI} es el área del estándar interno a emplear cuyas características se definen más adelante. La utilización de esta área ayuda a disminuir los errores provocados al momento de la inyección de la muestra. [33,36,38]

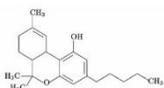
3.8. Método de Estándar interno y Estándar externo.

El estándar externo, consiste en inyectar en el equipo volúmenes constantes de disoluciones conocidas y crecientes del compuesto que se pretende cuantificar, se representa la cantidad de compuesto frente al tamaño del pico obteniéndose una línea recta, a partir de esta recta es posible cuantificar de la muestra desconocida, por interpolación gráfica.

El estándar interno, se utiliza con frecuencia para compensar posibles errores derivados de la manipulación de la muestra, consiste en añadir una cantidad conocida de un compuesto patrón a la muestra a analizar antes de realizar con ella cualquier manipulación, así en el cromatograma aparecerá el analito y el patrón añadido, y la relación entre ambos podrá calcularse.

Las características del estándar interno son:

- No se encuentra presente en la muestra.
- Se separan de los otros analitos de interés.
- Eluye en tiempo cercano al analito de interés.
- Usados en concentraciones similares al analito de interés
- De propiedades cromatográficas y fisicoquímicas similares al analito de interés.
- Estructuralmente con características iguales al analito de interés. [33,36-38].



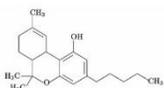
3.9. Matrices biológicas.

La calidad de los resultados de los análisis clínicos y analíticos de muestras biológicas de pacientes y en este caso de atletas para el control del dopaje, comienza con una solicitud de análisis o de control de dopaje y una correcta obtención de la muestra, que puede ser Sangre, Suero, Orina, Saliva, Líquido Cefalorraquídeo, Heces e incluso Cabello, dependiendo del análisis. Es de igual importancia su manipulación, conservación, transporte, y procesado, una buena metodología de trabajo por parte del personal para asegurar la fiabilidad de los datos obtenidos reduciendo al mínimo errores que conllevan al rechazo de la muestra, repetición del análisis y un perjuicio en la calidad del servicio.

En este caso en el control de dopaje comúnmente se utiliza más como matriz biológica la orina, y en segundo lugar la sangre y el suero.[32,43]

La orina es uno de los fluidos resultantes del metabolismo y su análisis aporta información rápida, su obtención es relativamente fácil, lo que hace que sea una prueba fundamental en el control de dopaje, la muestra se analiza de varias maneras y con diversos objetivos, por ejemplo el abuso de drogas, medicamentos, y análisis clínicos.[32,44]

Cuando obtenemos una muestra de orina primero realizamos un examen macroscópico, esto se complementa con el análisis de sustancias anormales ajenas al organismo, por métodos analíticos y cromatográficos, al paso de las 24 horas del día, estas sustancias varían dependiendo de la ingesta y actividad del paciente, por eso es de gran importancia conocer que sustancias conforman la orina, así de esta manera no tendremos ninguna interacción en el análisis por parte de esta. [32,44]



3.10. Técnicas de preparación de muestras

3.10.1. Hidrólisis

3.10.1.1. Hidrólisis enzimática

En la hidrólisis enzimática, la enzima ejerce un efecto catalítico hidrolizante, es decir producen una ruptura en el enlace de la molécula a hidrolizar; a este tipo de enzimas se les conoce como hidrolasas, pero comúnmente se les asigna el nombre de sustrato seguido de la palabra hidrolasa y cuando la enzima es específica para separar un grupo en particular, este puede utilizarse como prefijo. Este tipo de enzimas actúa en un rango de pH específico en el cual su trabajo es óptimo, al no encontrarse en este rango la enzima no actúa y se desactiva. [39,45] La enzima β -glucuronidasa rompe los enlaces glucorónidos derivados de reacciones metabólicas de conjugación, para darnos como resultado el ácido glucorónico y alcohol (Figura 12), en el caso del presente trabajo el resultado de esta hidrólisis es el ácido glucorónico y en su mayoría THC-COOH el metabolito de interés.

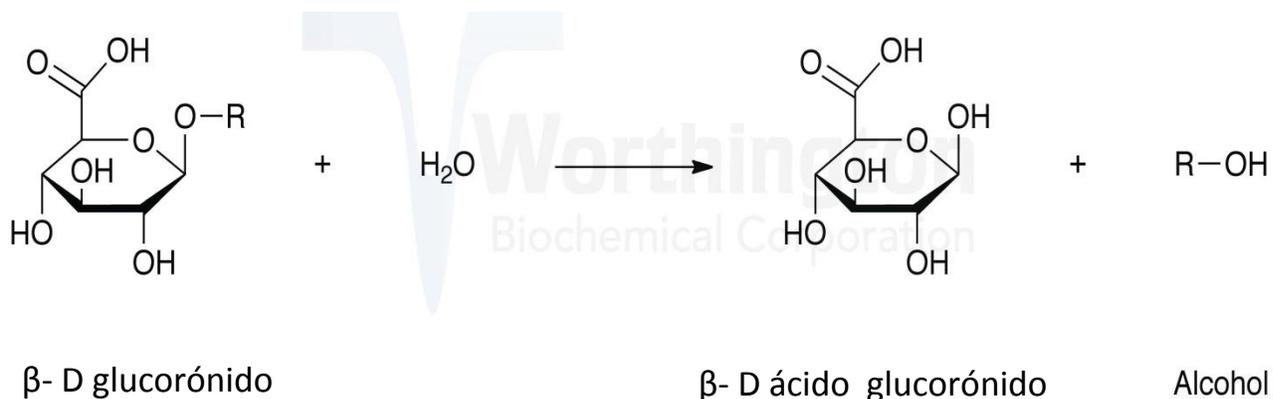
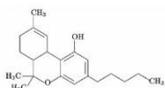


Figura 12 Representación esquemática de la reacción de la enzima β -glucuronidasa

3.10.1.2. Hidrólisis alcalina

Se denomina hidrólisis alcalina, a determinados tipos de reacciones de sustitución nucleofílica en las que el nucleófilo reactivo, es un ion hidróxido, en este caso empleamos Hidroxido de Potasio, para favorecer la hidrólisis del analito de interés que se encuentra unido al glucorónido.



3.10.2. Extracción líquido-líquido.

La extracción líquido-líquido es una operación unitaria que consiste en la separación de los componentes de una disolución acuosa mediante el contacto con otro líquido (disolvente) insoluble o parcialmente soluble.

Cuando un soluto se distribuye entre dos líquidos inmiscibles, existe una relación definida entre las concentraciones en las dos fases en el equilibrio, siendo esto los principios de la ley de distribución.[50,51]

En muchos casos esta relación no es exacta, lo que se mantiene constante es la relación entre las actividades en lugar de la relación entre las concentraciones, es decir, que la actividad de una especie química en una fase mantiene una relación constante con la actividad de esta misma especie en la otra fase líquida, a esta relación se le llama coeficiente de distribución de la especie. [50,51]

$$K_{DA} = a_{A1} / a_{A2}$$

Ec. 2. Ecuación coeficiente de distribución.

Dónde:

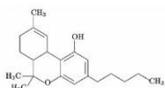
K_{DA} : es el coeficiente de distribución de la especie

a_{A1} : actividad del soluto en la fase 1

a_{A2} : actividad del soluto en la fase 2

3.10.2.1. Salting Out

El salting out es un fenómeno que mejora la extracción de un soluto, ya sea orgánico o inorgánico, de una fase acuosa hacia una orgánica mediante la adición de una sal, la cual permanece preferentemente en la fase acuosa. Al adicionar mayores concentraciones de sal la solubilidad de los solutos disminuye como consecuencia de la competencia por las moléculas de solvatación entre los iones salinos agregados y los otros solutos disueltos.



A concentraciones salinas elevadas están solvatados tantos iones agregados que la capacidad del disolvente disponible se torna insuficiente para disolver otros solutos, es decir, se reduce la actividad del disolvente por lo que las interacciones entre los solutos se vuelven más fuertes que las interacciones entre soluto y disolvente, lo que conduce a la precipitación del soluto (Figura 13). [46,47]

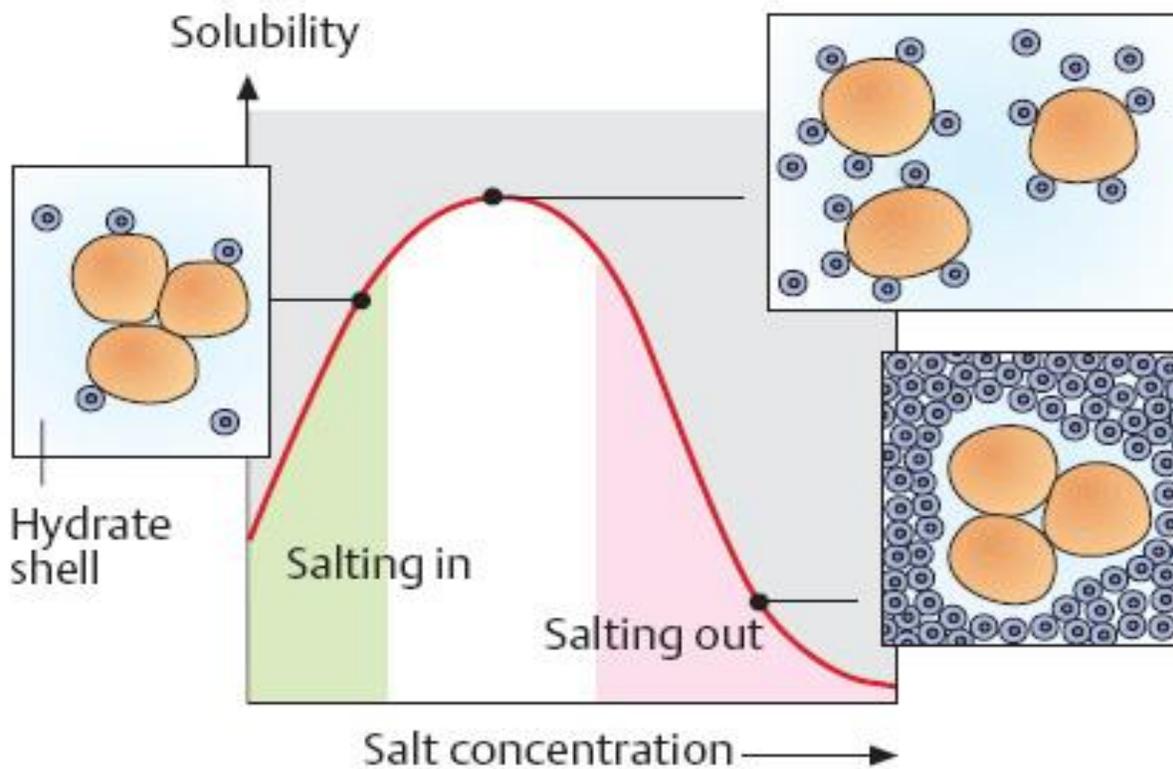
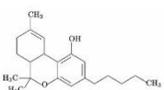


Figura 13 Representación esquemática del proceso de salting out, en donde se observa que al aumentar la concentración de sal, la solubilidad de los solutos disminuye por el fenómeno de solvatación.

3.10.2.2. pH

Para lograr una mejor extracción del o los analitos de interés es necesario mantenerlos en estado desionizado, por lo cual debemos obtener condiciones de pH cercanas a su naturaleza (ácida o básica), para favorecer más el reparto de las partículas de interés en este caso, hacia la fase orgánica cuando realicemos la extracción líquido-líquido. [47]



3.10.3. Extracción en fase sólida

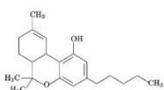
La extracción en fase sólida se basa en la partición selectiva de uno o más componentes en dos fases, una de las cuáles es un sólido adsorbente. La segunda fase es generalmente un líquido. El sólido adsorbente suele estar contenido en cartuchos desechables con forma de jeringa y están disponibles comercialmente en muchos tamaños [33,52]

3.10.4. Derivatización.

La derivatización es un procedimiento por el que se modifica químicamente al analito para detectarlo o separarlo con más facilidad evitando los inconvenientes derivados por la incompatibilidad de la muestra con el sistema cromatográfico, nos ayuda a reducir al mínimo los errores de matriz, además de ayudar en algunos casos a: (1) disminuir la polaridad de las especies, (2) aumentar la respuesta del detector y la selectividad de la respuesta (3) aumenta la volatilidad, (4) aumenta la estabilidad de las moléculas, (5) mejora la fragmentación y (6) aumenta la sensibilidad, disminuyendo su reactividad. [33,36,38]

Los reactivos derivatizantes más utilizados son los acilantes, metilantes o sililantes como: N-trimetilsililimidazol (TSIM), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), y N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA); estos reaccionan con compuestos que tienen protones como los alcoholes, las aminas, los ácidos o los tioles para producir los correspondientes éteres, sililaminas, ésteres o tioéteres. [53]

Debido a la polaridad reducida, los derivados tienen mayor volatilidad y estabilidad que los compuestos originales, y eluyen con mucha rapidez, además de ser útiles como agentes productores de derivados, estos compuestos sililantes se usan para desactivar soportes sólidos y superficiales de columnas de vidrio, en estas aplicaciones reaccionan con facilidad con los grupos silanol ubicados sobre la



superficie, bloqueando de esta manera los sitios polares que interfieren con el proceso de derivatización. [53,54].

El reactivo derivatizante empleado en éste trabajo (MSTFA), forma compuestos silanizados en la estructura del analito de interés. (Figura 14)

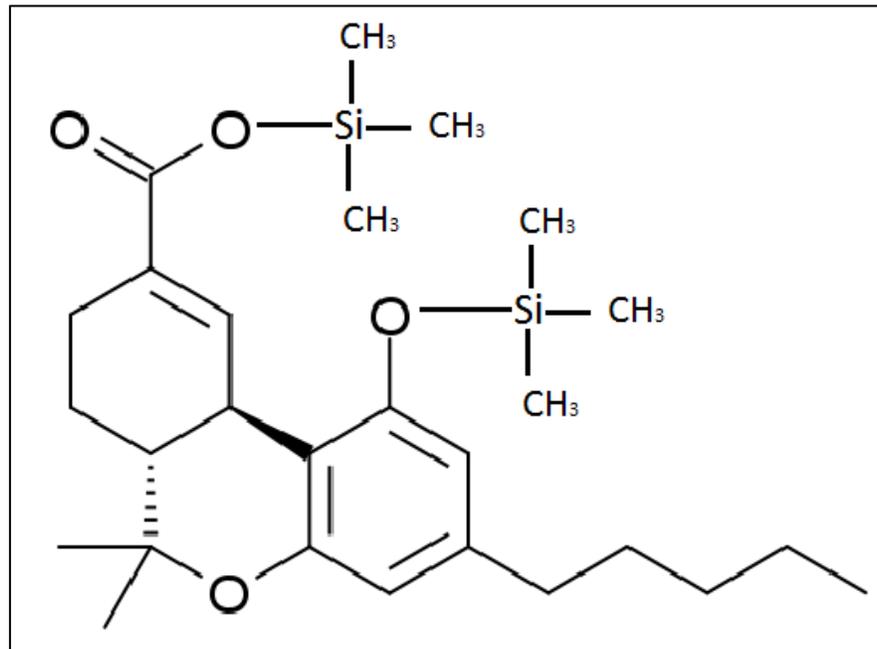
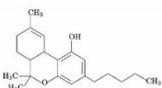


Figura 14 Molécula de THC-COOH, derivatizada con MSTFA

3.11. Validación de métodos analíticos.

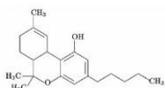
La validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista. La validación puede verse en los siguientes parámetros:

- **Linealidad:** Es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida para el analito responde linealmente a la concentración. Se verifica mediante la obtención de un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99 en el caso de mezclas complejas.
- **Especificidad:** Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. La especificidad del método puede comprobarse mediante el corrimiento de una muestra con el compuesto de



interés, si está disponible. El método puede ser comparado con otro método de especificidad conocida. Usualmente se esperan interferencias menores al 2% pero un valor mayor puede ser aceptado.

- **Exactitud:** La exactitud del método es la medida más cercana al valor real de los resultados que el método nos da. La exactitud puede comprobarse mediante la preparación de muestras adicionadas con cantidades conocidas del compuesto de interés. Los resultados para los experimentos de exactitud pueden ser aceptados con el $\pm 2\%$ del valor normal.
- **Precisión:** La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente. Usualmente se especifica en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa. Para identificar la precisión en los procedimientos analíticos se deben realizar mediciones repetidas y aplicar algunos conceptos estadísticos fundamentales como el cálculo de la media (\bar{X}), la desviación estándar (DE), la desviación estándar relativa (DER), el coeficiente de variación (%CV) y la varianza (s^2). La repetibilidad de la muestra y la preparación estándar puede ser evaluada preparando las muestras y estándares de muestras, para posteriormente examinar los coeficientes de variación de la respuesta. La precisión interlaboratorio puede ser determinada teniendo el análisis de la misma muestra efectuada por diferente analista. En mezclas complejas el criterio de aceptación por este parámetro es $\%CV < 10\%$.
- **Recuperación:** Debido a que usualmente no se conoce la cantidad de un analito en particular que está presente en una porción de prueba, es difícil estar seguros de que tan exitoso ha sido el método para extraer el analito de la matriz. Una forma de determinar la eficiencia de extracción es agregar a una matriz porciones de prueba con el analito a varias concentraciones,



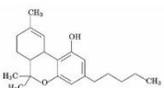
después se extraen las porciones de prueba fortificadas y se mide la concentración del analito.

- **Límite de detección:** Se refiere a la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba. El límite de detección, expresado como la concentración c_L , o la cantidad q_L , se deriva de la medida más pequeña x_L , que puede detectarse con certeza razonable por un procedimiento analítico dado. El valor de x_L es dado por la ecuación:

$$x_L = x_{bl} + k s_{bl}$$

Donde x_{bl} es la media de las mediciones del blanco y s_{bl} la desviación estándar de las mediciones del blanco y k es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado.

- **Límite de cuantificación:** Es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad.



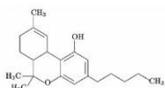
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que en el mundo deportivo el THC ocupa los primeros lugares en la lista de sustancias prohibidas encontradas en orina de atletas durante competencias, y la WADA exige su identificación y cuantificación en muestras para el control de dopaje, es necesario el desarrollo de métodos analíticos precisos, confiables y reproducibles para la cuantificación de esta sustancia y sus metabolitos.

La cuantificación de cannabinoides en orina es necesaria para estudios farmacocinéticos, pruebas de antidopaje evaluación del uso reciente de esta sustancia en pruebas forenses, entre otros.

La preparación adecuada de la muestra es un importante prerrequisito para la cromatografía en muestras biológicas, esto abarca el aislamiento y si es necesaria la separación de conjugados y/o derivatización de las sustancias y sus metabolitos.

Considerando lo anterior, es necesario desarrollar y establecer una metodología analítica para la separación, cuantificación e identificación del THC, que sea confiable y reproducible para su determinación en orina de atletas como parte del control de dopaje deportivo.



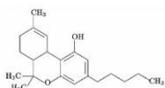
5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General

- Desarrollo y establecimiento de condiciones científicamente validas de un método analítico para la determinación de THC y su metabolito principal (Δ^9 -THC-COOH) por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas para Control de Dopaje.

5.2. Objetivos Particulares

- Optimizar una metodología por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la determinación del THC y sus metabolitos en las muestras de orina.
- Comparar la eficiencia de hidrólisis del THC y sus metabolitos excretados en forma conjugada utilizando hidrólisis enzimática e hidrólisis alcalina.
- Optimizar el procedimiento de extracción de THC en orina humana, evaluando diferentes disolventes orgánicos en la extracción líquido-líquido, el efecto del pH, así como el efecto de la concentración de un electrolito fuerte en la muestra para lograr una mejor extracción (efecto de salting out).
- Realizar un manejo estadístico adecuado de los resultados para garantizar la confiabilidad de los mismos.
- Evaluar la linealidad, precisión, exactitud, recuperación, límite de detección y de cuantificación de la metodología desarrollada.



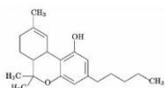
6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos

- ✓ Orina control de THC COOH
- ✓ Solución metanólica de Metiltestosterona 10 ppm
- ✓ Solución metanólica de THC-COOH D₃ 10 ppm
- ✓ Solución metanólica de delta 9 THC 10 ppm
- ✓ Solución metanólica de 11-OH-THC 10 ppm
- ✓ Agua Milli-Q
- ✓ Enzima β -glucoronidasa de *E. coli* tipo K12 Roche®
- ✓ S.A. de fosfatos y acetatos a pH 5.00
- ✓ S.A. de fosfatos pH 7.00
- ✓ S.A. de fosfatos y amonio a pH 9.00
- ✓ Solución de KOH 10M
- ✓ Solución NaCl al 30%
- ✓ Acetato de etilo
- ✓ Terc butil metil éter (TBME)
- ✓ Cloroformo
- ✓ Metanol
- ✓ MSTFA:NH₄I:Ditioeritritol (1000:1:2 v,p,p)

6.2. Materiales

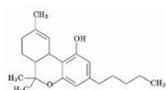
- ✓ Microviales y tapas para cromatografía de 2.5 mL
- ✓ Insertos para viales de cromatografía de gases
- ✓ Tubos de ensaye
- ✓ Gradillas
- ✓ Pipetas de volumen variable
- ✓ Matraces volumétricos de 25 y 50 mL
- ✓ Agitador Vortex
- ✓ Agitador oscilatorio



- ✓ Estufa
- ✓ Centrífuga
- ✓ Baño criogénico
- ✓ Evaporador
- ✓ Baño seco
- ✓ Procesador para extracción en fase sólida
- ✓ Columnas para extracción en fase sólida Bond Elut C8, capacidad de 5 mL.
- ✓ Columnas para extracción en fase sólida Nexus C18, capacidad de 5 mL

6.3. Instrumentación

- ✓ Cromatógrafo de gases modelo 7890-A acoplado a un Espectrómetro de masas modelo 5975C marca Agilent-Technologies.
- ✓ Software Chem Station versión E.02.01.1177.



7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1. Desarrollo del método por CG-EM.

7.1.1. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo 7890 A, acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975 C, ambos de la marca Agilent-Technologies (Figura. 17), la inyección de cada una de las curvas de calibración con sus respectivas muestras problema y control se realizó por triplicado.

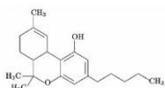


Figura 15 Equipo empleado para el análisis por CG/EM

Para identificar al metabolito de interés del THC que es el THC-COOH se empleó un espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo como detector, el método de adquisición de datos fue SIM (método del ión selectivo), la cuantificación del THC-COOH se realizó mediante el método de estándar interno, para ello los iones evaluados para la fragmentación del THC-COOH fueron los siguientes:

- 371 (Ión diagnóstico)

Se cuantificaron además otros dos iones que nos sirven de confirmación (Figura 16 inciso c):

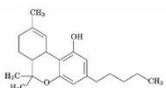


- 473
- 488 (ión molecular)

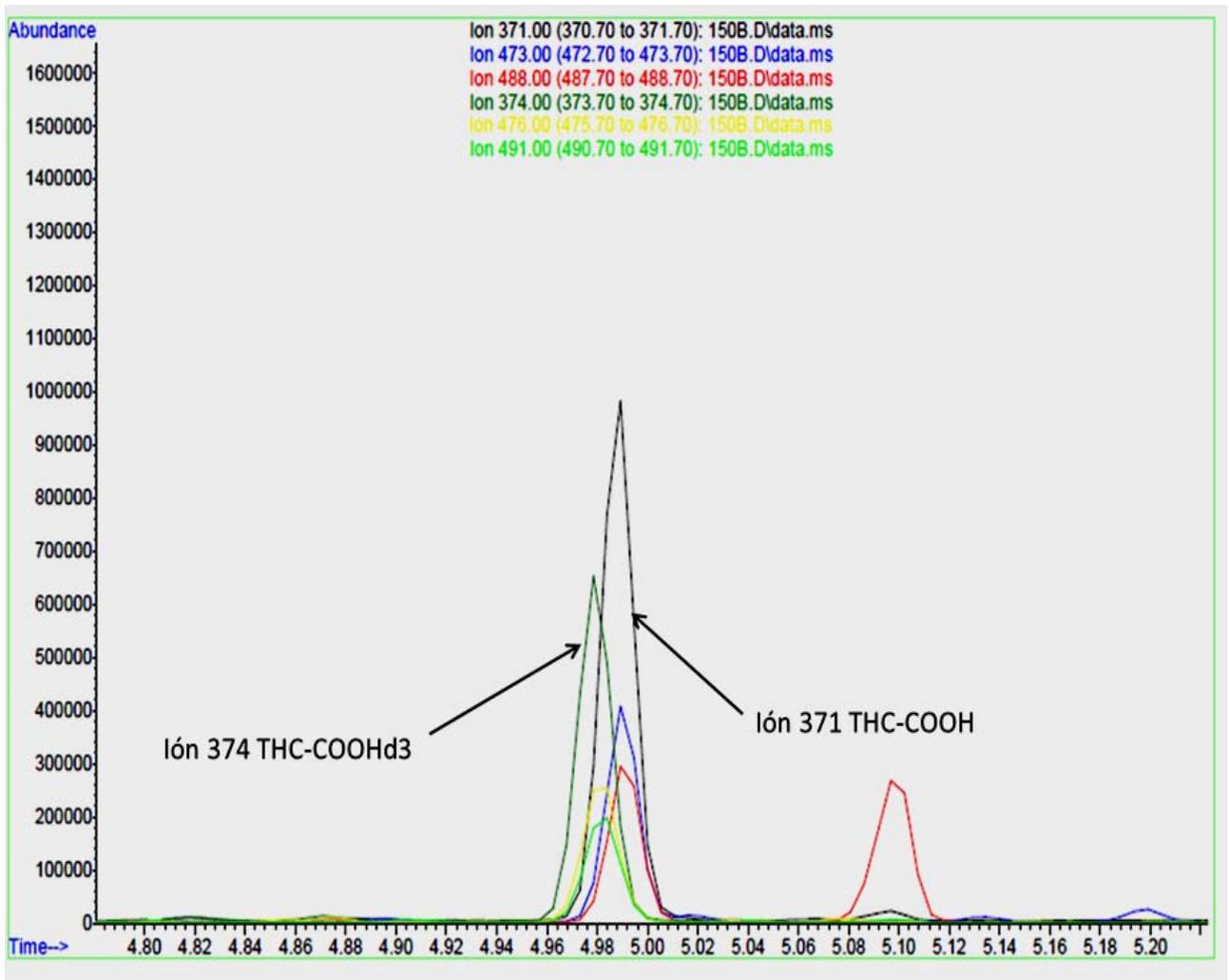
En el caso del estándar interno empleado (THC-COOH₃) el ión diagnóstico evaluado fue:

- 374 (Ver figura 16).

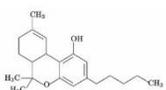
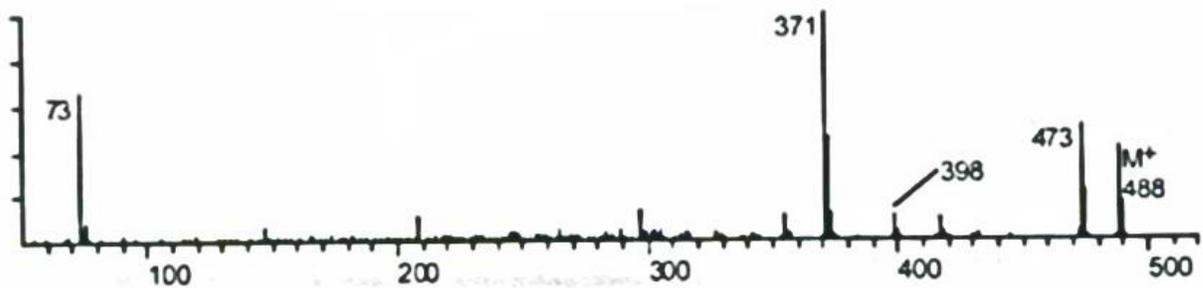
En la figura 16 inciso b observamos el patrón de fragmentación por Espectrometría de masas del metabolito de interés en el estudio (THC-COOH) con los iones analizados.



a)



b)



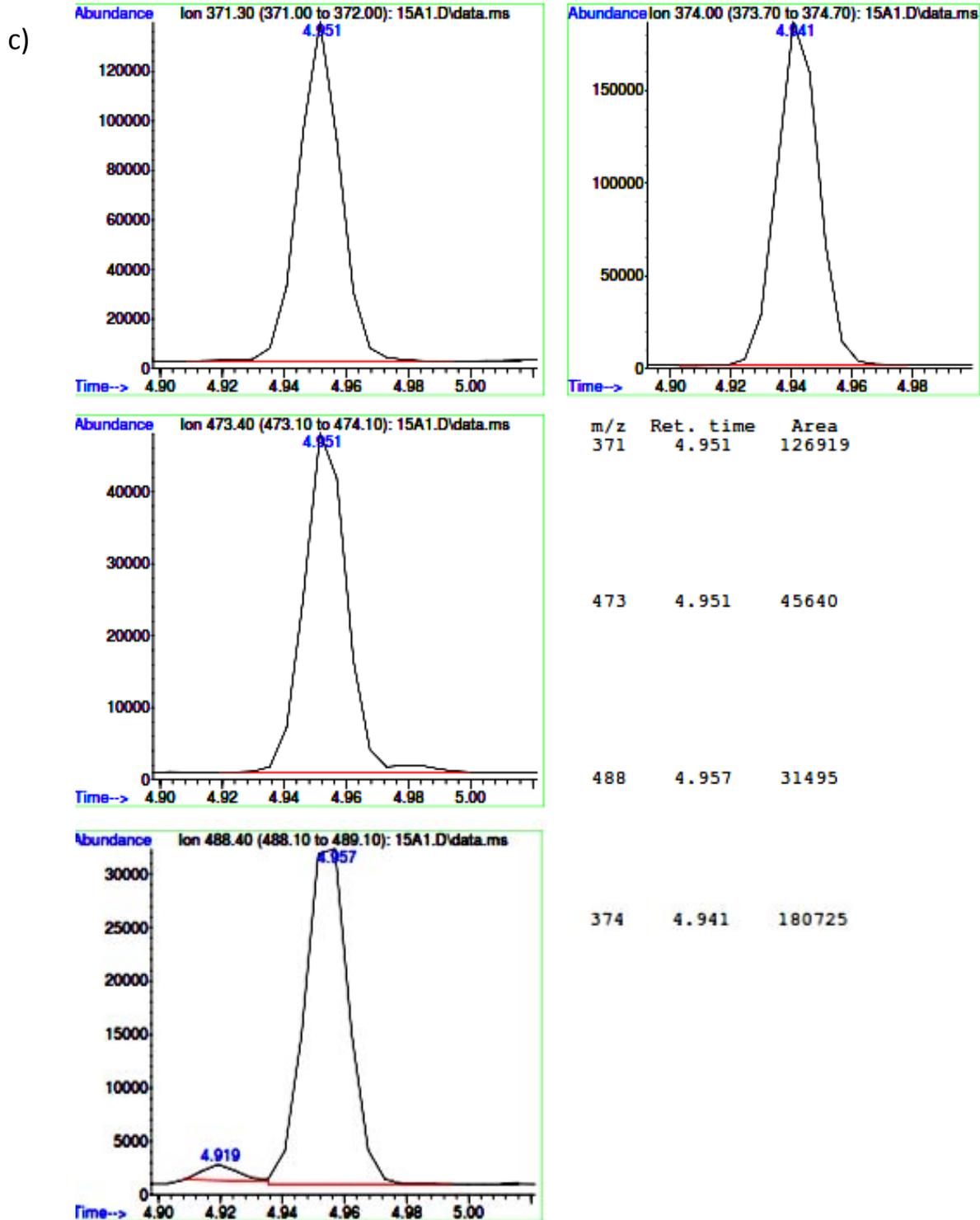
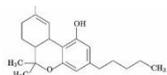


Figura 16 a) Cromatograma por extracto de iones de tipo *overlay* donde se muestran los iones seleccionados para la cuantificación de THC-COOH y el estándar interno THC-COOH₃. b) Patrón de fragmentación por EM del analito THC-COOH c) Cromatograma por extracto de iones donde se muestran los tiempos de retención y las áreas relativas para los iones del THC-COOH (371,473,488) y para el estándar interno (374)

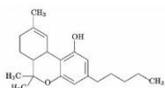


7.1.2. Condiciones cromatográficas de análisis

- ✓ Columna capilar (fase estacionaria 100% metilsilicón, diámetro interno 0.2 mm, espesor de película 0.11 μm , longitud 25 m, marca Agilent).
- ✓ Gas portador: Helio
- ✓ Flujo del gas portador: 1.0 mL/min
- ✓ Temperatura del inyector: 280°C
- ✓ Volumen de inyección: 1 μL
- ✓ Temperatura de la línea de transferencia: 280°C
- ✓ Programa de temperatura del horno: inicial: 200 °C durante 0 min, con una rampa de 25 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C.
- ✓ Relación Split: 1:10.
- ✓ Analizador de masas en modo SIM

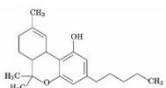
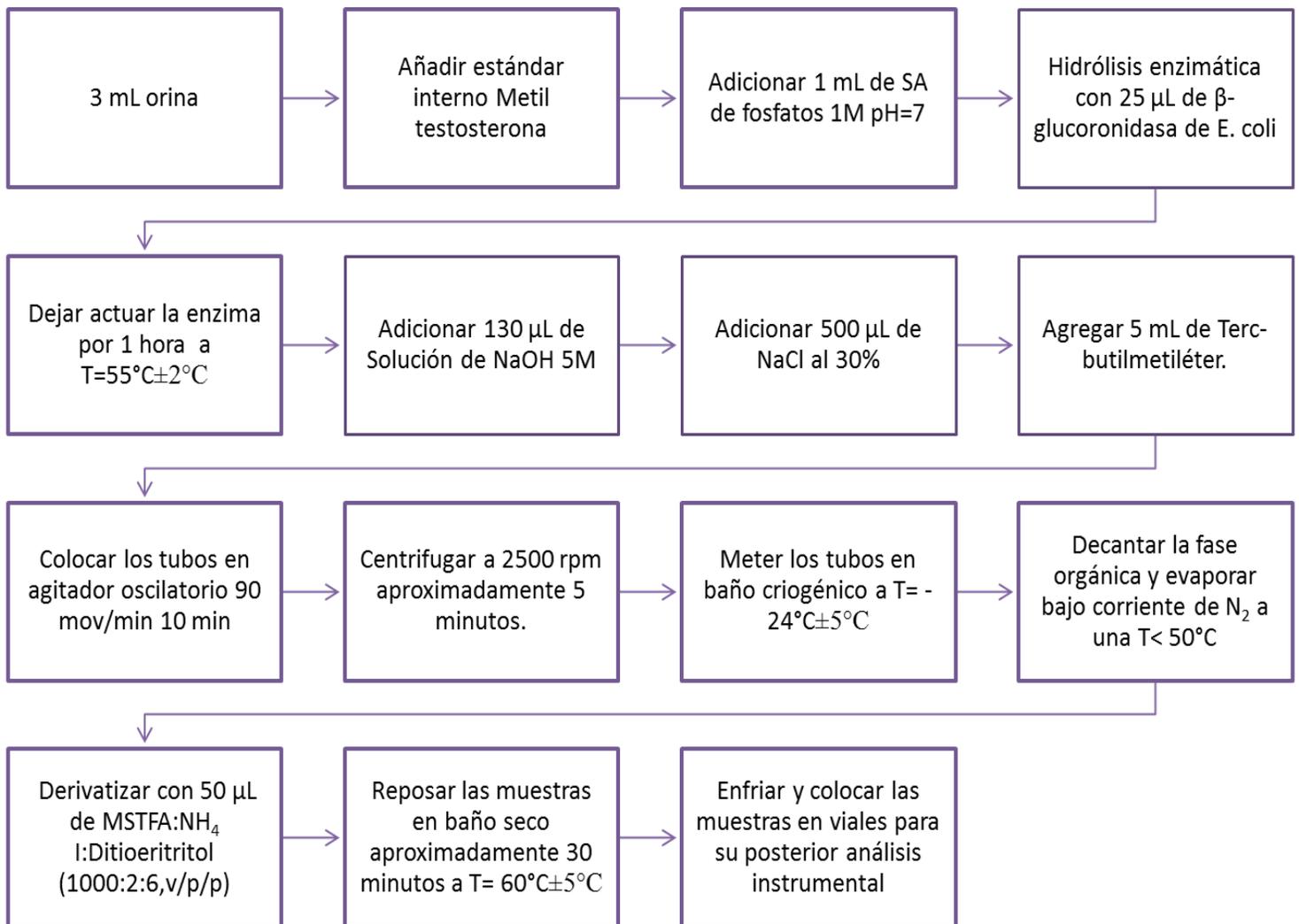
7.2. Tratamiento de las muestras.

En la figura 17 incisos a) y b) se muestran los pasos fundamentales para la preparación de muestras de orina, resaltando en el inciso b con color rojo los pasos críticos que fueron optimizados por medio de la evaluación de diferentes parámetros hasta encontrar las condiciones óptimas del método, y en el inciso a) el procedimiento establecido previamente en el laboratorio para análisis de muestras con resultado adverso a THC.



DESARROLLO EXPERIMENTAL

a)



DESARROLLO EXPERIMENTAL

b)

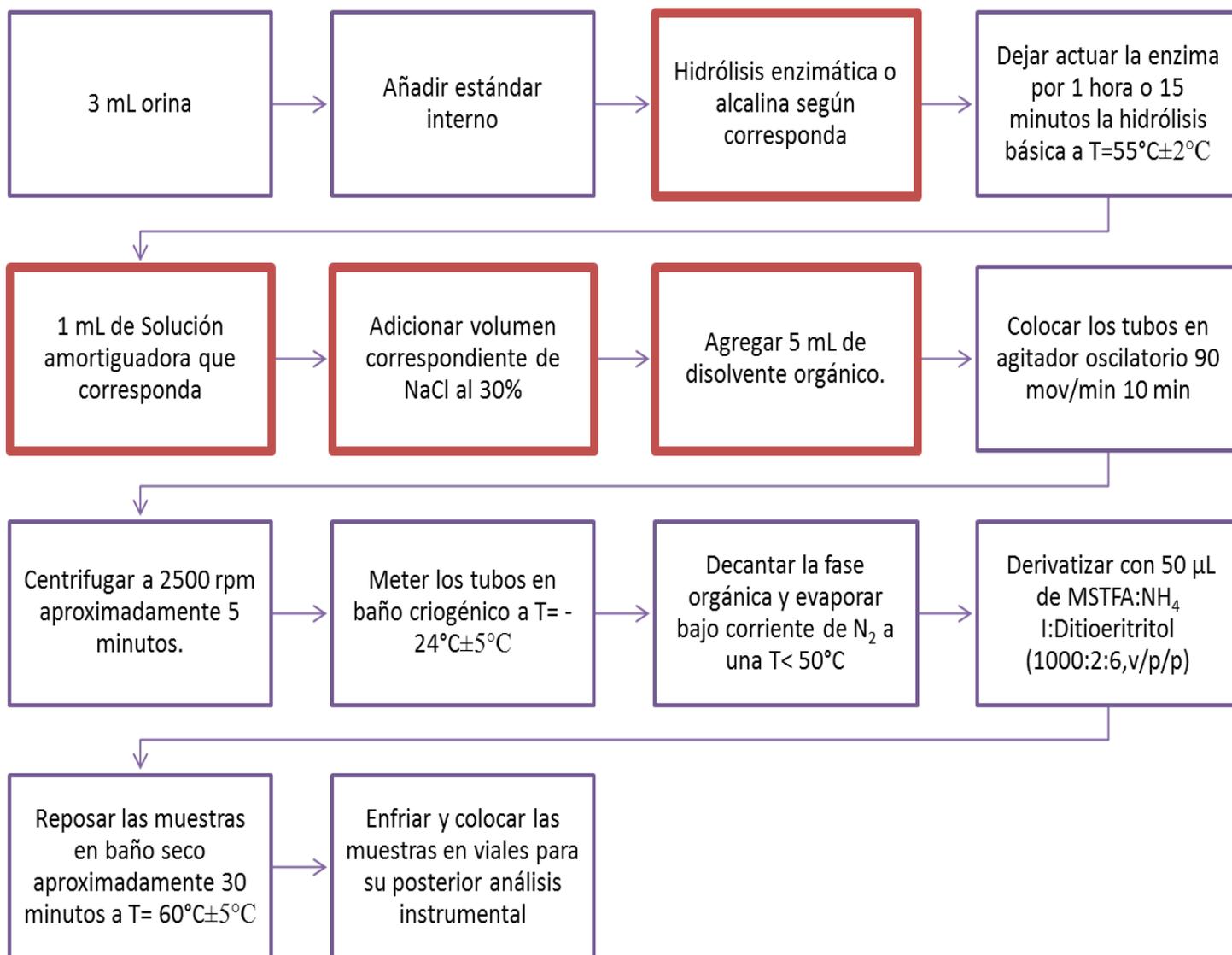
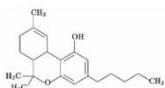


Figura 17 a) Metodología establecida previamente en el Laboratorio para el análisis de muestras con resultado adverso a THC b) Metodología para la preparación de muestras de orina en el análisis de dopaje, resaltando en rojo los pasos optimizados partiendo del método ya establecido en el Laboratorio



7.3. Optimización del método.

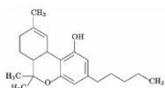
7.3.1. Eficiencia de hidrólisis

La evaluación de la eficiencia de hidrólisis se determinó bajo dos condiciones distintas:

1. Hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa de *E. coli*.

En tubos por triplicado de dos muestras diferentes de orina positivas a THC (volumen 3 mL), se adicionaron 10 μ L de EI de metiltestosterona a una concentración de 10 μ g/mL, posteriormente se agregó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH=7 1M, agitación en vortex 5 segundos aproximadamente, se adicionaron 25 μ L de enzima β -glucuronidasa de *E.coli*, se dejó actuar la enzima por una hora a $55 \pm 2^\circ\text{C}$, enfriar a temperatura ambiente, para después adicionar 1 mL de SA de fosfatos y 500 μ L de disolución de NaCl al 30 %, nuevamente agitación en vortex por aproximadamente 5 segundos. La extracción líquido-líquido la realizamos con 5 mL de terc butilmetil éter, y agitación oscilatoria a razón de 90 movimientos por minuto, durante 10 minutos.

Al terminar este proceso centrifugar las muestras a 2500 rpm por aproximadamente 5 minutos para proseguir a meter los tubos en un baño criogénico con condiciones de temperatura de $-24^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$; decantar la fase orgánica en otros tubos limpios, de los cuales se evapora el disolvente bajo corriente de Nitrógeno a una temperatura menor a 50°C , una vez evaporado el disolvente añadir a cada tubo 50 μ L de derivatizante MSTFA:NH₄I:Ditioeritritiol (1000:1:2 v,p,p) tapándolos inmediatamente para evitar la cristalización de la muestra, agitar en vortex por aproximadamente 30 segundos, reposar en un baño seco a $60^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ durante 30 minutos los tubos ya derivatizados, transcurrido el tiempo enfriar los tubos a temperatura ambiente para después transferirlos a los viales de 2mL y



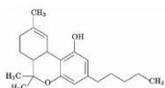
encapsularlos. Proceder con el análisis instrumental de las muestras por CG-EM.

2. Hidrólisis básica con KOH 10M

En tubos por triplicado de dos muestras diferentes de orina positivas a THC (volumen 3 mL), se agregaron 10 μ L de estándar interno (EI) de Metiltestosterona a una concentración de 10 μ g/mL, posteriormente 300 μ L de hidróxido de potasio (KOH) 10 M, se agitando en vortex por aproximadamente 5 segundos, se dejó actuar por 15 minutos a 60°C, y se dejó enfriar a temperatura ambiente, seguido de la adición de 165 μ L de ácido acético glacial; el pH final quedó en el intervalo de 4.5-6.5, y finalmente 2 mL de solución de acetato de sodio 0.1 M [7].

Una vez realizado el proceso de hidrólisis adicionamos 1 mL de SA de fosfatos y 500 μ L de disolución de NaCl al 30 %, nuevamente agitación en vortex por aproximadamente 5 segundos. La extracción líquido-líquido la realizamos con 5 mL de terc butilmetil éter, y agitación oscilatoria a razón de 90 movimientos por minuto, durante 10 minutos.

Al terminar este proceso centrifugar las muestras a 2500 rpm por aproximadamente 5 minutos para proseguir a meter los tubos en un baño criogénico con condiciones de temperatura de $-24^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$; decantar la fase orgánica en otros tubos limpios, de los cuales se evapora el disolvente bajo corriente de Nitrógeno a una temperatura menor a 50°C, una vez evaporado el disolvente añadir a cada tubo 50 μ L de derivatizante MSTFA:NH₄I:Ditioeritritiol (1000:1:2 v,p,p) tapándolos inmediatamente para evitar la cristalización de la muestra, agitar en vortex por aproximadamente 30 segundos, reposar en un baño seco a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos los tubos ya derivatizados, transcurrido el tiempo enfriar los tubos a temperatura ambiente para después transferirlos a los viales de 2mL y



encapsularlos. Proceder con el análisis instrumental de las muestras por CG-EM.

7.3.2. Evaluación del efecto del pH en la extracción líquido-líquido.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de hidrólisis, se prosiguió a evaluar la extracción del metabolito de nuestro interés, empleando cinco diferentes disoluciones amortiguadoras (S.A.) de concentración 1 M:

- S.A. de fosfatos y acetatos a pH 5.00
- S.A. de fosfatos pH 7.00
- S.A. de fosfatos y amonio a pH 9.00

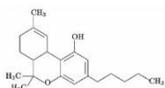
Éstas pruebas se realizaron por triplicado en tubos con 3 mL de orina blanco (que no contenían los analitos de interés) fortificadas con concentraciones conocidas de THC y sus metabolitos 11-OH-THC, THC-COOH (concentración 30 ng/mL), adicionando el mismo estándar interno que en los casos anteriores (Metilttestosterona de concentración 10 µg/mL), y según lo indicado en la figura 15 inciso b.

7.3.3. Evaluación del efecto de salting out.

En este paso se evaluaron diferentes volúmenes (0 µL, 250 µL, 500 µL, 1 mL y 2 mL) de cloruro de sodio al 30%, para así determinar cual nos ayuda a obtener resultados más cuantitativos del compuesto de nuestro interés.

Por triplicado en tubos con 3 mL de orina blanco, adicionadas con THC y sus metabolitos 11-OH-THC, THC-COOH, utilizando como estándar interno metiltestosterona a una concentración de 10 µg/mL, colocamos los diferentes volúmenes de NaCl al 30% ya mencionados con anterioridad.

En todos los casos después de la adición del estándar interno, se realizaron extracciones líquido-líquido a pH 5, de acuerdo con el resultado obtenido en el paso anterior, utilizando *tert*-butilmetiléter, seguido de la evaporación de la fase



orgánica por corriente de N_2 a $45\text{ }^\circ\text{C}$ y 15 psi y la derivatización de los extractos con una mezcla de MSTFA: NH_4I :Ditioeritritol (1000:1:2, v/m/v) para su posterior análisis por CG/EM.

7.3.4. Evaluación de diferentes disolventes orgánicos en la extracción líquido-líquido.

Los disolventes orgánicos utilizados para esta prueba fueron:

- Cloroformo
- *Terc*-butilmetiléter (TBME)
- Acetato de etilo

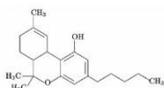
Las pruebas se realizaron por triplicado en tubos con 3 mL de orina blanco, adicionadas con THC y sus metabolitos 11-OH-THC y THC-COOH, utilizando como estándar interno metiltestosterona de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Se adicionó 1mL de S.A. de acetatos pH 5.00 y 500 μL de NaCl al 30%, y se realizaron extracciones líquido-líquido con 5 mL de cada uno de los disolventes mencionados. Se evaporó la fase orgánica de cada extracto por corriente de N_2 a $45\text{ }^\circ\text{C}$ y 15 psi, y se derivatizó cada una con una mezcla de MSTFA: NH_4I :Ditioeritritol (1000:1:2, v/m/v), para su posterior análisis por CG/EM.

7.3.5. Evaluación de dos diferentes columnas para la extracción en fase sólida (EFS)

La extracción en fase sólida se llevó a cabo en dos columnas de fase C8 y C18, con la muestra previamente tratada hasta antes de la extracción, la siguiente figura muestra el procedimiento efectuado en dónde los números corresponden a:

1. Acondicionamiento. Depositar 2 mL de metanol, eluir y posteriormente 2 mL de agua calidad MiliQ, y eluir nuevamente.
2. Aplicación de la muestra. Depositar la orina en la columna y eluir.
3. Lavado de interferencias. Depositar 2 mL de agua calidad MiliQ y eluir.
4. Elución de la muestra. Depositar 4 mL de metanol y en tubos de ensaye recuperar lo eluido en este paso.



DESARROLLO EXPERIMENTAL

Una vez concluida la extracción en fase sólida, se procedió con la evaporación del metanol, derivatización de las muestras y finalmente el análisis instrumental.

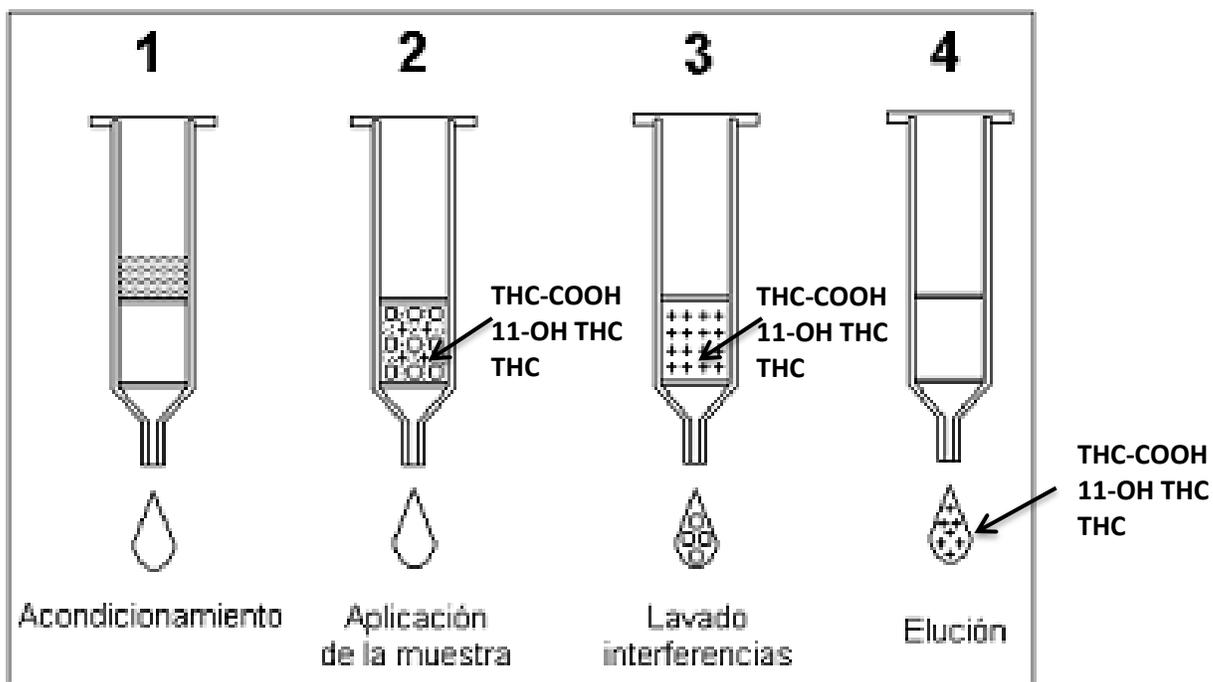
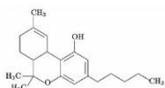


Figura 18 Metodología general empleada para la extracción en fase sólida

7.4. Validación del método analítico.

Una vez evaluados los diferentes pasos críticos de la preparación de la muestra, y optimizando cada uno de ellos, se emplearon las mejores condiciones obtenidas para validar el método analítico; los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Linealidad
- Precisión
- Recuperación
- Límite de detección
- Límite de cuantificación [28,30,56]



7.4.1. Linealidad.

Para la evaluación de los parámetros antes mencionados, se realizaron curvas de calibración empleando como estándar interno THC-COOH deuterado y como estándar externo THC-COOH (el analito que la WADA pide cuantificar en estas pruebas).

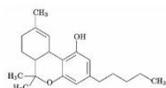
Primero se elaboraron curvas de calibración con intervalos de concentración alta, media y baja basándonos en el límite de corte impuesto por la WADA de 15ng/mL, 3 de 10 a 350 ng/mL, posteriormente 3 curvas con concentraciones de estándar externo de 5-50 ng/mL, y finalmente 2 curvas con concentraciones de estándar externo de 5-35 ng/mL, la concentración de estándar interno en todos los casos fue la concentración media de cada una de las curvas realizadas.

En tubos con 3 mL de orina blanco se añadieron, los estándares externo e interno con la relación de concentraciones presentada en las tablas 1, 2 y 3:

Tabla 1. Relación de concentraciones para las curvas de 10-350 ng/mL

[THC-COOH ng/mL]	[THC-COOH D ₃ ng/ mL]
10	150
30	150
90	150
150	150
250	150
350	150

Cada punto se realizó por triplicado y para el procesamiento de estas pruebas empleamos las condiciones óptimas obtenidas en los ensayos anteriores. La linealidad se obtuvo del promedio del coeficiente de correlación de estas curvas de diferentes intervalos de concentración (Ver sección de resultados y anexos 1, 2 y 3).



7.4.2. Precisión intraensayo y recuperación a 25 ng/mL

Una vez calculadas las concentraciones de las muestras empleadas, proseguimos a realizar otras tres curvas de calibración a intervalos más pequeños (Ver tabla 2 y anexo 2) con la finalidad de evaluar la precisión intraensayo del método desarrollado y optimizado, calculando el Coeficiente de variación expresado en porcentaje.

Tabla 2. Relación de concentraciones para las curvas a intervalos de 5-50 ng/mL.

[THC-COOH ng/mL]	[THC-COOH _{D3} ng/ mL]
5	25
15	25
25	25
35	25
50	25

Para evaluar la precisión intraensayo se procesaron 7 tubos con orina control fortificada a 25 ng/mL de los analitos de interés y a 25 ng/mL de estándar interno de THC d3, 3 tubos que no fueron sometidos al procesamiento de preparación de muestra, únicamente se evaporó el disolvente y se derivatizó a 25 ng/mL de estándar interno y a 25/ng mL de estándar externo.

7.4.3. Precisión interensayo, límite de detección, cuantificación y recuperación a 15 ng/mL

Finalmente para calcular el límite de detección y cuantificación del método desarrollado, evaluar el % de recuperación a 15 ng/mL y la precisión interensayo, se procesaron 2 curvas con intervalos de concentración de THC-COOH de 5-35 ng/mL, empleando como estándar interno THC-COOH deuterado a 15 ng/mL, 6 tubos con orina fortificada con THC-COOH a 15 ng/mL (3 para cada día evaluado), y 6 tubos (3 para cada día evaluado) que no fueron sometidos al procesamiento de preparación de muestra a concentraciones de 15 ng/mL de estándar externo e interno (Ver tabla 3 y anexo 3).

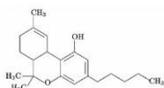
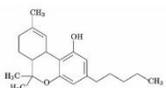


Tabla 3. Relación de concentraciones para las curvas a intervalos de 5-35 ng/mL.

[THC-COOH ng/mL]
5
10
15
25
35



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Eficiencia de hidrólisis

Como podemos observar en el gráfico 1, para las dos muestras, con resultado adverso a THC, la hidrólisis básica con KOH 10 M mostró una mayor área relativa con respecto a la hidrólisis enzimática realizada con β - Glucoronidasa de *E. coli*, (1.219 para la muestra 1 y 0.601 para la muestra 2 contra 0.737 y 0.240 respectivamente), la enzima β - Glucoronidasa de *E. coli*, rompe los enlaces que se forman por reacciones metabólicas de conjugación, pero en la estructura del THC-COOH al tener un grupo carbonilo es más afín a un ataque nucleofílico por parte de la base, que por un rompimiento enzimático que si bien es específico para los enlaces glucorónidos no nos asegura que se rompan todos los enlaces existentes.

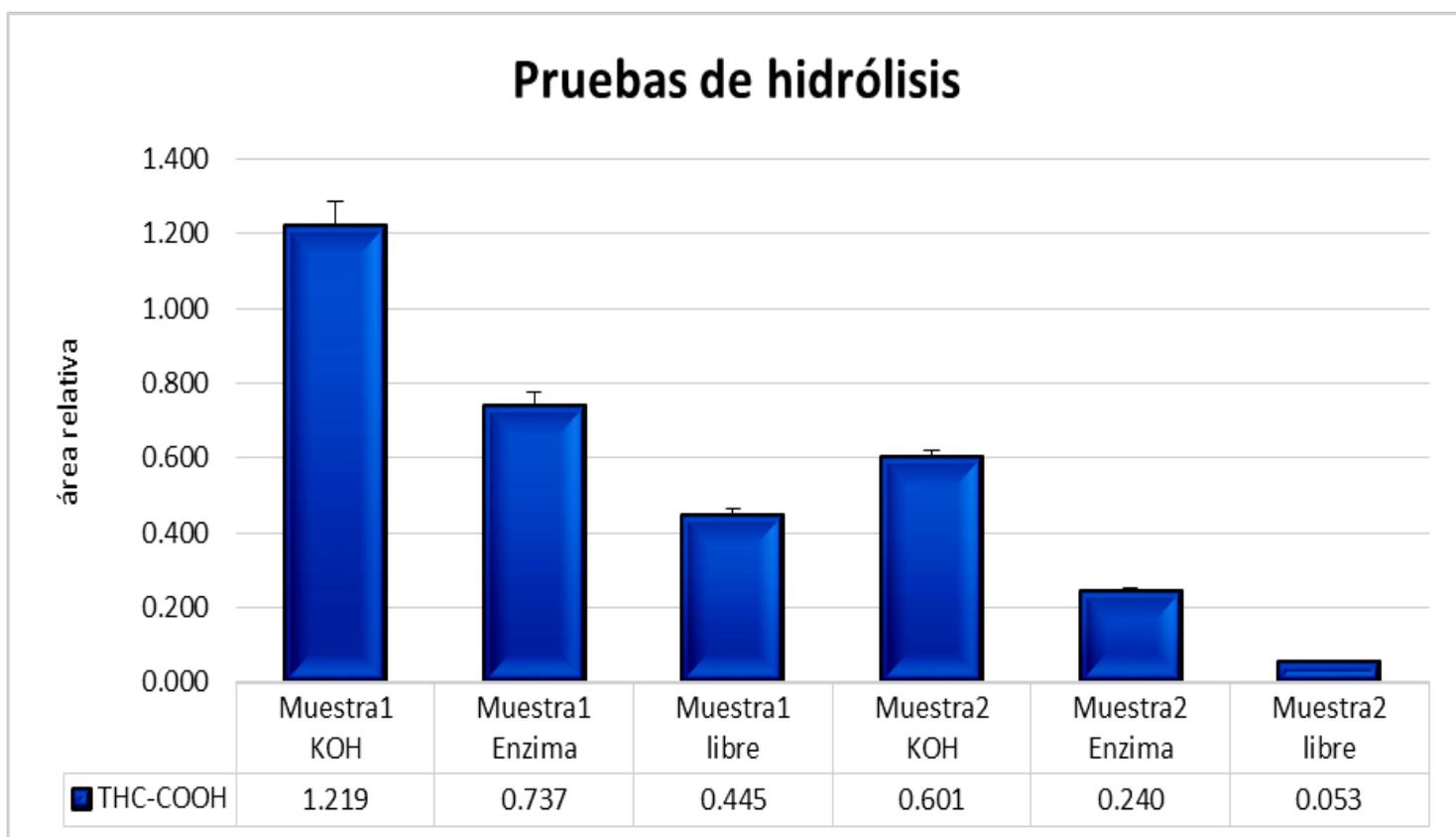
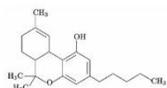


Gráfico 1 Áreas relativas de las muestras hidrolizadas por el método de hidrólisis enzimática e hidrólisis básica



8.2. Evaluación del efecto del pH en la extracción líquido-líquido

La evaluación del efecto del pH en la extracción líquido-líquido de los compuestos de interés se evaluó con tres valores diferentes: pH 5, pH 7 y pH 9, según los resultados obtenidos la solución amortiguadora de acetato pH 5, muestra una mayor área relativa para los 3 analitos de interés analizados (Ver gráfico 2); THC inalterado, 11-OH-THC y THC-COOH, debido a que la molécula de THC-COOH que es nuestro metabolito de interés para confirmar la presencia de THC en una muestra, es medianamente polar y su pka es de 4.5, en medios ácidos debido a que se mantiene en un estado neutro, favorece su paso a la fase orgánica, es decir aumentamos la eficiencia de extracción; la razón por la que no se evaluó un pH más ácido fue porque en el laboratorio no contábamos con algún otro reactivo que nos ayudara a tener un medio más ácido.

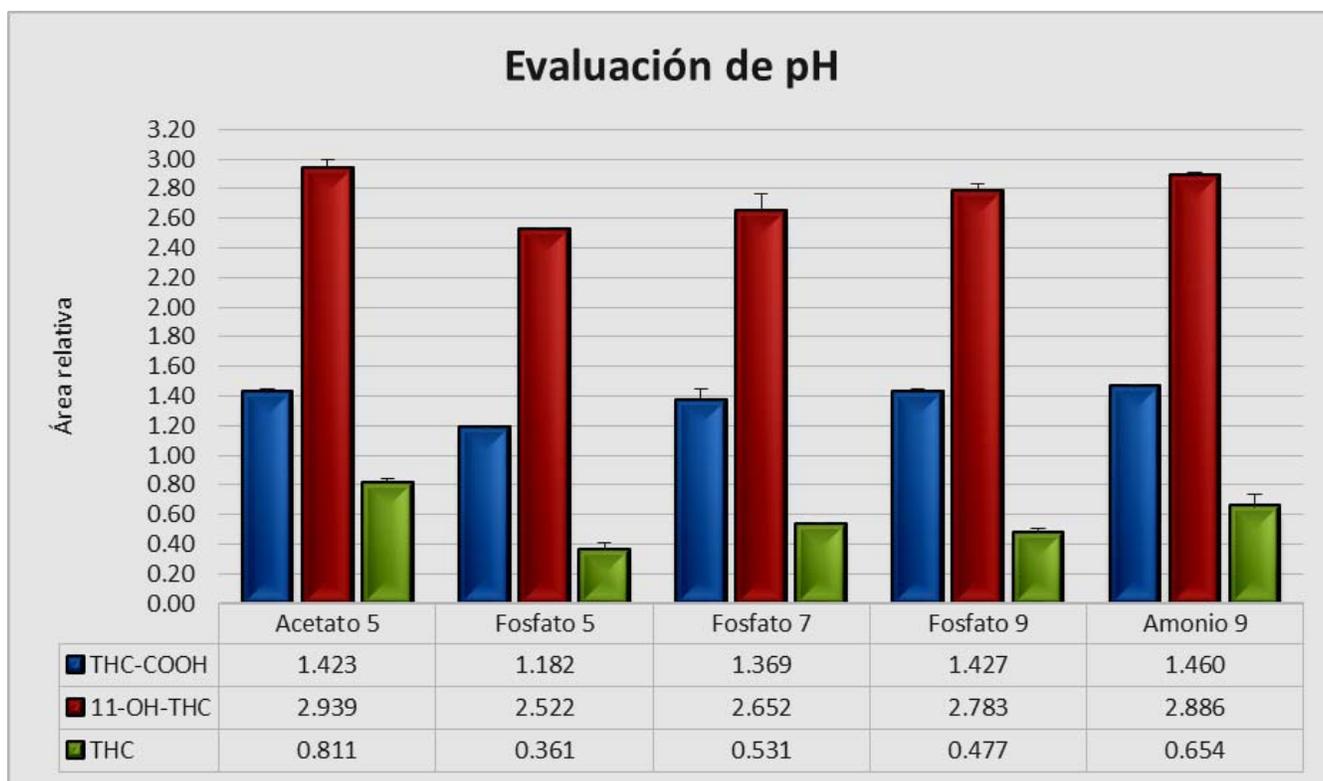
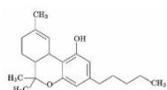


Gráfico 2 Áreas relativas de los diferentes analitos del THC, al extraerlos a diferentes valores de pH



8.3. Evaluación del efecto de salting out.

Como podemos observar en el gráfico 3, las áreas relativas mostradas para los principales analitos del THC, son muy parecidas a diferentes volúmenes de NaCl al 30%, sin embargo conforme la concentración aumenta observamos que la desviación estándar igual lo hace, por lo que en este caso elegimos trabajar con un volumen de 500 μ L de solución salina, porque el analito de interés (THC-COOH), muestra una mayor área relativa y un error más pequeño, además el efecto Salting out nos ayuda a precipitar el analito (disminuir su solubilidad) presente en la fase acuosa para favorecer su intercambio hacia la fase orgánica y así obtener una extracción más cuantitativa.

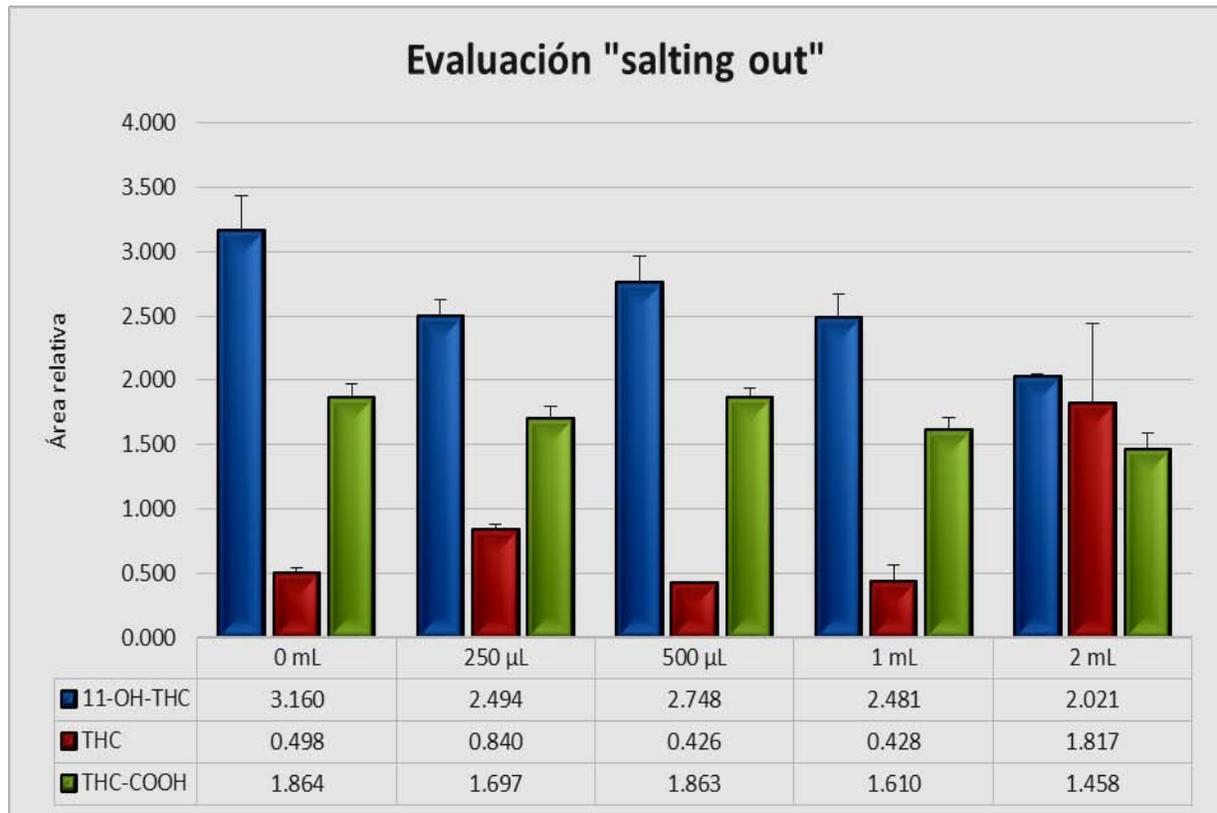
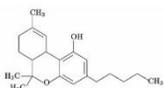


Gráfico 3 Áreas relativas de los diferentes analitos del THC en la evaluación del efecto Salting out, a 5 diferentes concentraciones de NaCl al 30%.



8.4. Evaluación de diferentes disolventes orgánicos en la extracción líquido-líquido.

En el gráfico 4, observamos que para los 3 analitos evaluados, el que muestra una mayor área relativa para todos estos es el acetato de etilo, principalmente para el analito de interés que es el THC-COOH, donde tenemos una respuesta relativa de 2.251 contra 1.929 obtenida con el TBME y 0.992 con el cloroformo; el THC-COOH es una molécula que presenta una mayor polaridad que el THC libre y el 11-OH-THC, por lo que al realizar la extracción líquido-líquido, se verá más afín al disolvente orgánico que tenga características similares a este.

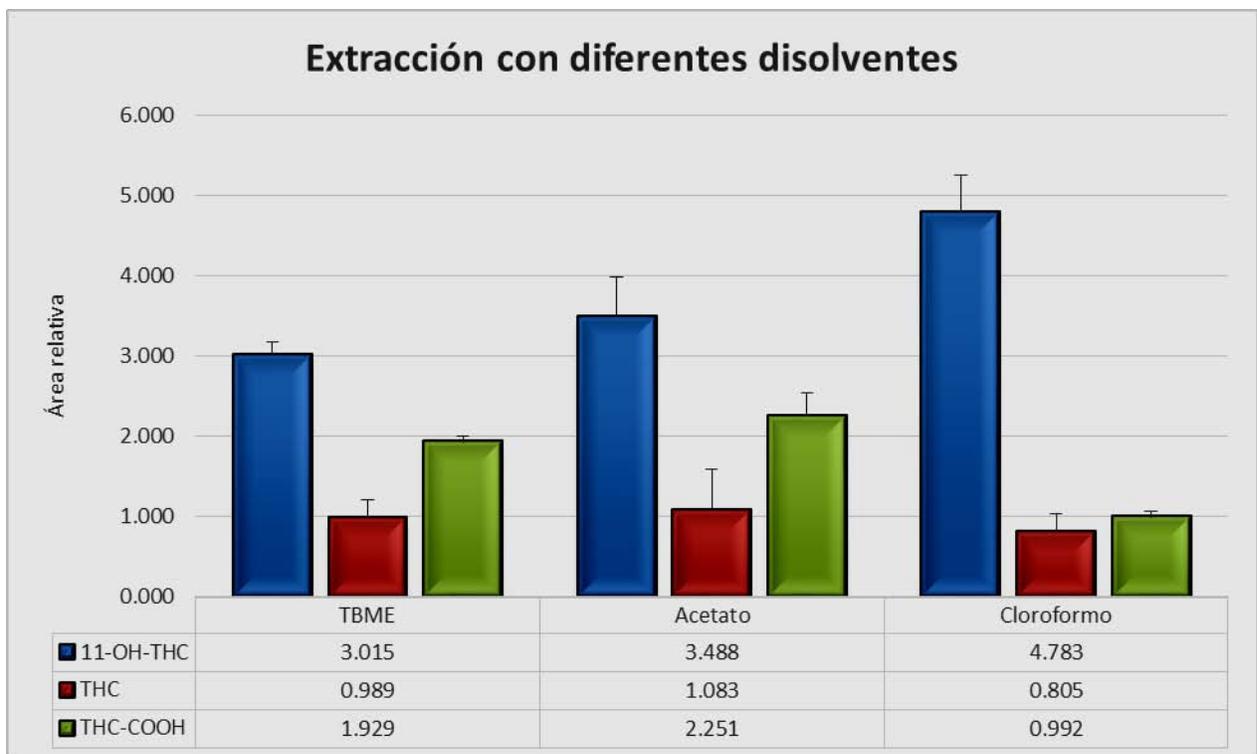
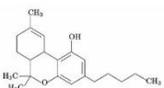


Gráfico 4 Áreas relativas de los analitos del THC evaluados con 3 diferentes disolventes orgánicos. Terc butil metil éter (TBME), Acetato de Etilo (Acetato) y Cloroformo.



8.5. Evaluación de dos diferentes columnas para la extracción en fase sólida (EFS)

En la gráfica observamos que la extracción en fase sólida evaluada con dos diferentes cartuchos de fase no polar, se obtuvo una mayor área relativa del compuesto de nuestro interés con el cartucho Bond Elut (C8) debido a la naturaleza medianamente polar de nuestro compuesto, sin embargo la variabilidad en los resultados es muy grande (barra de error), el área de contacto en la columna de extracción en fase sólida es mayor, por lo que la resolución es baja y por ende la repetibilidad no es buena. Debido a estas variaciones el método de elección para la extracción del THC-COOH, fue la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos.

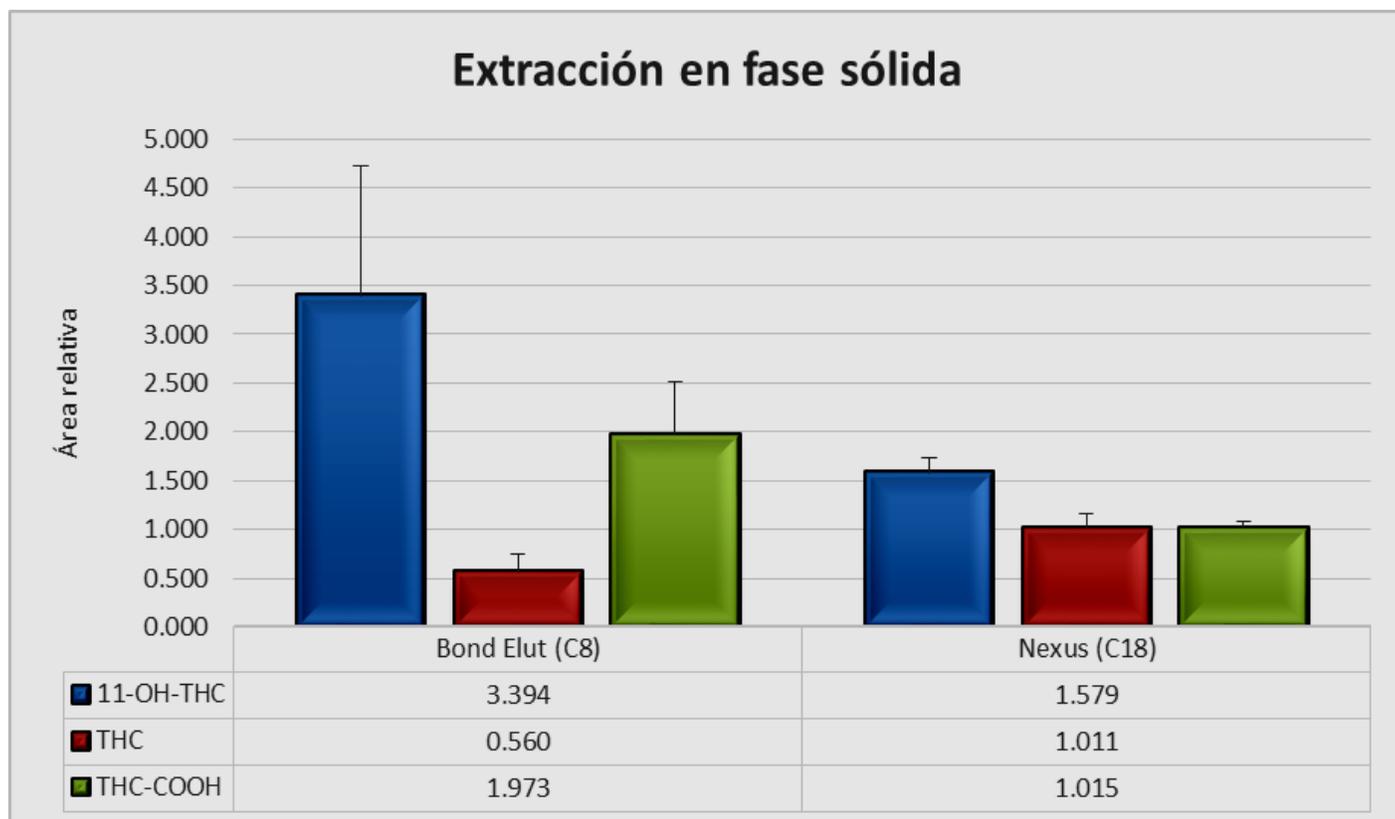
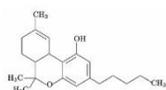


Gráfico 5 Áreas relativas de los diferentes analitos del THC en la extracción en fase sólida con dos diferentes tipos de cartuchos, del lado derecho se muestran los resultados con el cartucho Nexus (fase C18) y del lado izquierdo los resultados con el cartucho Bond Elut (Fase C8)

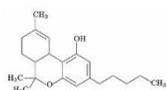


8.6. Resumen de la optimización del método analítico

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados obtenidos en la optimización del método analítico para cuantificación de THC

Tabla 4. Condiciones optimizadas del método

Parámetro	Resultado
Hidrólisis	Alcalina con KOH 10 M
pH de extracción	pH 5, buffer de acetatos
Volumen de NaCl al 30%	500 μ L
Método de extracción	Extracción líquido-líquido con Acetato de Etilo.

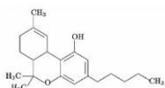


8.7. Validación del método analítico

Una vez obtenidas las condiciones óptimas del método desarrollado, se realizó la validación del mismo evaluando los parámetros mencionados en los puntos siguientes.

8.7.1. Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante tres ensayos con curvas de calibración preparadas con estándares, utilizando como estándar interno THC-COOH deuterado a una concentración de 150 ng/mL, 25 ng/mL y 15 ng/ml y como estándar THC-COOH a intervalos de concentración de 10-350 ng/mL, un segundo ensayo con intervalos de 5-50 ng/mL y por último a intervalos de 5-35 ng/mL, cada una de las curvas se inyectó por triplicado al equipo. En el gráfico 6, mostrado a continuación se presentan los resultados obtenidos para este ensayo (Ver anexo 1 para más detalles).



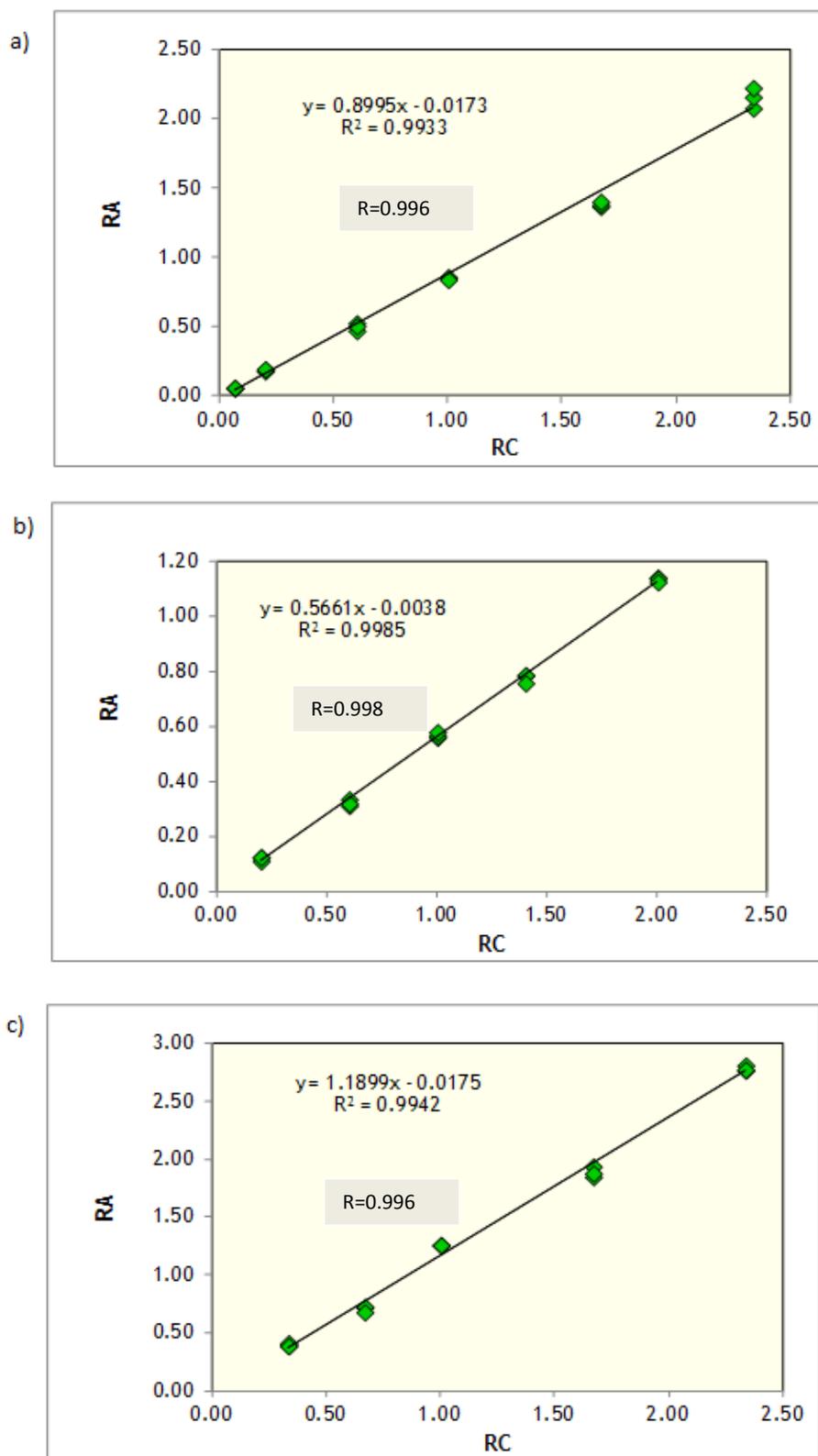
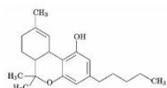


Gráfico 6 Curvas de calibración realizadas para la validación del método analítico. En el inciso A se muestra la gráfica de intervalos de concentración 10-350 ng/mL, en el inciso B la de intervalos de concentración de 5-50 ng/mL y en el inciso C la de intervalo de concentración de 5-35 ng/mL.



En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos en este ensayo, en las curvas realizadas a diferentes intervalos de concentración.

Tabla 5. Resultados de linealidad del método optimizado

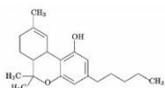
Intervalos de curva (ng/mL)	Ecuación de la recta
10-350	$y=0.8995x-0.0173$ $r = 0.993$
5-50	$y=0.5661x-0.0038$ $r = 0.998$
5-35	$y=1.1898x-0.0164$ $r = 0.996$

Como observamos en la tabla 4 y en el gráfico 6 incisos a, b y c, la linealidad del método es arriba de 0.99, esto nos habla de que el método lineal desde concentraciones de 5 hasta 350 ng/mL

8.7.2. Precisión y Recuperación

8.7.2.1. Precisión intraensayo

La precisión intraensayo se determinó en 7 tubos de orina fortificada con THC-COOH a una concentración de 25 ng/mL, empleando como estándar interno THC-COOHd3 a la misma concentración, comparado contra 3 tubos con estándar interno y externo, a los que no se somete al proceso de preparación de muestras. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos expresados en %Coeficiente de variación.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. Resultados del % de Recuperación para la evaluación de la precisión intraensayo

Día 1		%Recuperación	Promedio	%CV
[THC-COOH] _{OF1*} (ng/mL)	23.75	97.99	99.82	3.40
[THC-COOH] _{OF2*} (ng/mL)	23.51	96.97		
[THC-COOH] _{OF3*} (ng/mL)	24.81	102.33		
[THC-COOH] _{OF4*} (ng/mL)	23.94	98.76		
[THC-COOH] _{OF5*} (ng/mL)	23.26	95.97		
[THC-COOH] _{OF6*} (ng/mL)	25.60	105.63		
[THC-COOH] _{OF7*} (ng/mL)	24.50	101.08		
[THC-COOH] _{SP**} (ng/mL)	24.24			

*OF: Muestra de orina fortificada 1, 2, 4..7

**SP: Tubo con estándar interno y externo que no se sometió al proceso de preparación de muestra.

8.7.2.2. Precisión interensayo

La precisión interensayo se determinó en 2 días diferentes, preparando en cada día un triplicado de tubos con orina fortificada con THC-COOH a 15 ng/mL, empleando como estándar interno THC-COOHd3 a la misma concentración, y 3 tubos con estándar interno y externo, a los que no se somete al proceso de preparación de muestras.

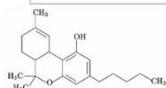
Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran a continuación, evaluados en % Coeficiente de variación.

Tabla 6. Resultados del % de Recuperación para la evaluación de la precisión interensayo

Día 1		%Recuperación	Promedio	%CV	Día 2		%Recuperación	Promedio	%CV
[THC-COOH] _{OF1*} (ng/mL)	16.00	107.31	107.65	3.72	[THC-COOH] _{OF1*} (ng/mL)	16.38	109.86	110.55	3.05
[THC-COOH] _{OF2*} (ng/mL)	16.67	111.80			[THC-COOH] _{OF2*} (ng/mL)	17.03	114.22		
[THC-COOH] _{OF3*} (ng/mL)	15.48	103.82			[THC-COOH] _{OF3*} (ng/mL)	16.04	107.58		
[THC-COOH] _{SP**} (ng/mL)	14.91				[THC-COOH] _{SP**} (ng/mL)	15.14			

*OF: Muestra de orina fortificada 1, 2 y 3

**SP: Tubo con estándar interno y externo que no se sometió al proceso de preparación de muestra.



De acuerdo con los resultados obtenidos observamos que el coeficiente de variación en ambos casos (precisión inter e intraensayo), es menor al 10% con lo que aseguramos que nuestro método es confiable, reproducible independientemente del día en que se procesen las muestras.

8.7.2.3. Recuperación

La recuperación, evaluada en dos niveles, a 15 ng/mL y a 25 ng/mL, puede observarse en las tablas 5 y 6, como observamos la recuperación en ambos niveles es buena, esto quiere decir que durante el proceso de preparación de muestra, nos aseguramos de recuperar una buena concentración del analito de interés, cuando el % de recuperación es mayor al 100% no quiere decir que sea incorrecto, si no que la orina es considerada una matriz biológica compleja por la cantidad de sustancias de desecho que contiene, hay ocasiones que pueden presentarse ciertas interferencias.

8.7.3. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) y cuantificación (LC) se obtuvo mediante el análisis de 3 curvas de calibración de concentraciones de estándar de THC-COOH desde 5 ng/mL hasta 50 ng/mL, empleando como estándar interno THC-COOH deuterado, para este ensayo los resultados obtenidos son los siguientes:

- LD 0.99 ng/mL
- LC 3.31 ng/mL

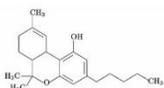
El cálculo de estos parámetros se presenta a continuación:

Del promedio de la desviación estándar del área relativa presentada por el triplicado de los puntos de la concentración más baja de la curva de intervalos de concentración de 5-50 ng/mL, calculamos la concentración del analito de interés (THC-COOH), al que posteriormente multiplicamos por 3 para calcular el límite de detección y por 10 para calcular el límite de cuantificación, es decir:

Ar 1: 0.124

Ar 2: 0.111

Ar 3: 0.124



Desv. Estándar: 0.0075

Frr: 0.5661.

Calculando la concentración de THC-COOH:

$$[THC - COOH] = \left(\frac{0.0075}{0.5661} \right) \left(25 \frac{ng}{mL} \right) = 0.331 \text{ ng/mL}$$

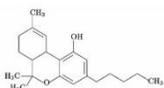
Por lo tanto:

LD= (0.331 ng/mL) (3)= 0.99 ng/mL

LC= (0.331 ng/mL) (10)= 3.31 ng/mL

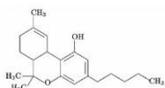
Estos resultados nos hablan de que a concentraciones bajas de hasta 0.99 ng/mL el método para la detección de THC es confiable y podemos cuantificarlo hasta en concentraciones cercanas a los 3.3 ng/mL.

La razón por la cual se emplea el estándar interno deuterado es porque tiene las mismas propiedades fisicoquímicas que el analito de interés, que ayuda a que el tiempo de análisis no se prolongue demasiado, no se encuentra presente en la muestra por lo que no interfiere con su análisis e identificación, además al tener un patrón de fragmentación similar pero no idéntico al analito de interés, nos facilita el análisis por espectrometría de masas al permitir cuantificarlo con una menor incertidumbre. Durante la optimización del método empleamos como estándar interno la metilttestosterona que aunque no es de estructura química similar, ofrece buena estabilidad para el análisis y no está presente en la muestra además es menos costoso que el estándar deuterado.



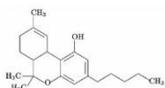
CONCLUSIONES

empleando estándar interno deuterado (THC-COOHd₃), ayudándonos a mejorar la precisión del método por tener características fisicoquímicas y cromatográficas similares al compuesto de interés, es estructuralmente igual al analito de interés y no se encuentra presente en la muestra a analizar.



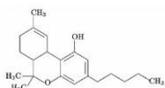
10. LISTA DE REFERENCIAS.

1. Adams R, Hunt M, Clar J.H. Structure of THC, cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. J. Am. Chem Soc.2008; 62. p 196-200.
2. Comprehensive Natural Products. II. Chemistry and Biology. 1°edition. Elsevier Ltd; UK, 2010. Vol III, IX.
3. Earleywaine Mitchell. Entender la marihuana: Reconsiderando la evidencia científica. 1° ed.Elsevier; España, 2005.
4. Evans F.J. The medicinal chemistry of cannabis: O`Shaughnessy's legacy Pharmaceutical Sciences 1997; p 245-291.
5. Mechoulam R. Química de la marihuana. Ciencia168 (3936); 1970. p 1159-1165.
6. Saugy M., Avois L, Saudan, et al. Cannabis and sport. Br J Sports Med 2006; 40 (Suppl I): i13-i15.
7. De Cock, Delbeke. Quantitation of 11-nor- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid with GC-MS in urine collected for Doping Analysis. J. Anal. Toxicol 2003; 27 (2): 106-109.
8. Marín Aguayo. Propiedades de los cannabinoides. . Clínica del Dolor del Hospital General Buenos Aires, Argentina 2005; Vol IV.No. 4. Febrero 2005.
9. Agencia Mundial Antidopaje (AMA). Historia. <http://www.wada-ama.org/en/About-WADA/History/A-Brief-History-of-Anti-Doping/>. Acceso Abril 2013
10. The World Antidoping Code. 2009
11. Agencia Mundial Antidopaje. Lista Prohibida. <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Prohibited-List/>. Acceso Mayo 2013.
12. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Monografía de la marihuana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>. Acceso Abril 2013.



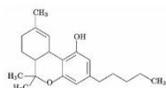
LISTA DE REFERENCIAS

13. Gaoni Y, Mechoulam R. "Aislamiento, estructura y síntesis parcial de un componente activo del hachís". Diario de la sociedad química americana. 1964; 86 (8): p 1646-1647.
14. Grispoon L, Bakalar J, Marihuana La Medicina Prohibida. Ed: Paidós; Buenos Aires 1997. p 25-47,49-143.
15. Rodríguez, Carrillo, Soto. Cannabinoides: Neurobiología y usos médicos. Elementos BUAP. 2005; 60: 3-9.
16. Huestis A. Pharmacokinetics and metabolism of the cannabinoids plant, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol y cannabinol. HandbExpPharmacol 2005; (168): p 657-690.
17. Turner C.E, Elsohly M.A, Constituent of Cannabis Sativa. Review of the natural constituent Journal of Natural Products 2008; p 169-204.
18. Bataller Ramón. Toxicología Clínica. Universidad de Valencia; España 2004.
19. Walker J.M, Huang S.M. Analgesia de Cannabinoides. Farmacología y terapéutica. El 2002; 95 (2). 127-35.
20. Fundación Instituto Catalán de Farmacología. Uso terapéutico del cannabis: Farmacología básica. España 2007.
21. Soriano M. Carles, et al. Fundamentos de Neurociencia. 1ª Ed. Editorial UOC. Vol.59. Cataluña, España 2007
22. Abel Ernest. L. Marihuana, tabaco, alcohol y reproducción. 1ª Ed. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España 1986.
23. Steven B. Karch. Drug Abuse Handbook. CRC Press Edition. Second Edition Florida USA 2007.
24. Karch Steven B. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs. CRC Press Editions. Florida USA 2008.
25. Wall M.E, Pérez Reyes. The Metabolism of Δ^9 - Tetrahydrocannabinol and Related Cannabinoids in Man. Journal of Clinical Pharma 1981; (21): 1785-1895.
26. Mallén C. Dopaje Salud y Deporte. Sistema Nacional de Salud de España. 2005;(29): 1-11.



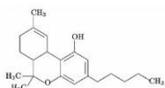
LISTA DE REFERENCIAS

27. Martín -Sánchez E, R. Martín José Luis. Efectos del consumo de cannabis en las personas jóvenes: Algo más sobre el cannabis. Revista de estudios de juventud. 2009; (64): 144-153
28. Milano M, Melendez G. Manual de farmacología del doping. 6a ed. Argentina: Ed. Alfa-Beta; 2008.
29. Escohotado A. Historia General de las Drogas. Ed. Espasa; 2005. p. 1305-1316.
30. H. Maurer Hans. Screening Procedures for Simultaneous Detection of Several Drug Classes Used for High Throughput Toxicological Analyses and Doping Control. A Review. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2000; 31 (6): 467-480.
31. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Traducción libre. Centro Nacional de Metrología. 1998.
32. Díaz Portilo, Fernández del Barrio, Paredes Salido. Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica. 1ª Ed. Ediciones Díaz de Santos S.A. España 1997.
33. Harris C. Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. 3ª Ed. Ed. Reverte; España. Barcelona 2007.
34. Lindon John C, Tranter George, Holmes John. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. First Edition. Academia Press, 2000. Vol I, III.
35. Hildebrand R. El programa mundial antidopaje y el médico de atención primaria. Pediatr Clin N Am. 2007 (54). 701-711.
36. Skoog D, Holler F.J, Nieman T.A. Análisis Instrumental. 5ª Ed. McGraw Hill: España; 2003. p 786-828.
37. Rubinson y Rubinson. Análisis Instrumental. 1ª Ed. Prentice Hall: Madrid España; 2000.
38. R.A. Underwood Química Analítica Cuantitativa. 5ª Ed. Pearson Prentice Hall; México 2005.
39. Mc Murry J. Química orgánica. Ed: Thomson México 2004. p. 1129-1132.



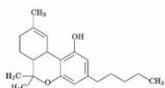
LISTA DE REFERENCIAS

40. Watson J. Throck, Sparkman O. David. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. 4th edition. England 2007
41. Herbert G. Christopher, Johnstone A.W. Robert. Mass Spectrometry basics. Ed. CRC Press. USA 2003.
42. Niessen Dekker W.M.A. Current Practice of Gas Chromatography- Mass Spectrometry. Ed. CRC Press. USA 2001.
43. Rojo García María. Medicina del Deporte. 5^a Ed. Universidad de Sevilla. España 2000.
44. Strasinger, Di Lorenzo. Análisis de orina y de los líquidos corporales. 5^a Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España 2008.
45. Vioque Javier. Jornada Internacional sobre proteínas alimentarias. 1^a Ed. Universidad de Sevilla. España 2000.
46. Remington Gennaro A.R. Farmacia. 20^a Ed. Ed. Panamericana; México. 2000. P 557-718.
47. Voet Donald. Bioquímica. 3^a Ed. Editorial Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay 2004.
48. De Sá O.J. Douglas. Instrumentation Fundamentals for Process Control. 1^a Ed. CRC Press Editorial. NY, USA 2001.
49. Skoog D, West D. Introducción a la Química Analítica 1^a Ed. Editorial Reverté. Barcelona, España 2002.
50. Valcárcel C, Gómez A. Técnicas Analíticas de Separación. 1^a Ed. Editorial Reverté. Barcelona, España 1988.
51. Laitinen H, Larris W. Análisis Químico: Texto avanzado y de referencia. 2^a Ed. Editorial Mc Graw Hill. NY, USA 1982.
52. Repetto M, Repetto G. Toxicología Fundamental. 4^a Ed. Editorial Díaz de Santos. España 2009.
53. Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. J of Chromatography B. 1998; 713: 61-90

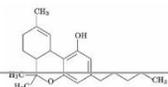


LISTA DE REFERENCIAS

54. Sherma Joseph. Handbook of Chromatography. Volume II. 1° Ed. CRC Editorial. 1972 USA. p 217.
55. NMX-CH-152-IMNC-2005 “Metrología en Química”– Vocabulario.
56. NMX-EC-17025-IMNC-2006 “Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.



11. ANEXOS



ANEXO 1

Curva de calibración 10-350 ng/mL

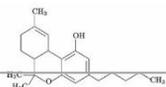


Tabla A 1 Relación de áreas obtenidas y tiempo de retención para la Curva de Calibración a intervalos de concentración 10-350 ng/mL

ANÁLISIS CUANTITATIVO											
Introduzca en las celdas sombreadas la información requerida.											
Determinación: Curva de calibración por GC/MS-10				Analito: THC-COOH				PNT: NA			
Fecha: 14/05/2012				Estándar interno: THC-COOHd3				Lote: NA			
				Límite de corte (µg/mL): NA				Submuestra: NA			
<u>Curva de calibración</u>											
Muestra	EI	Ion	374	ANALITO	Ion	371	t _{RR}	RC	RA Analito/EI	ΔRA _i y el valor	Evaluación (% < 10 %)
	C (ng/mL)	t _R (min)	Área	C (ng/mL)	t _R (min)	Área					
BLO1											
CA11	150	4.957	761737	10	4.962	48493	1.0010	0.067	0.064	3.945	Se acepta réplica
CA12	150	4.957	696591	10	4.962	44943	1.0010	0.067	0.065		
CA13	150	4.957	776762	10	4.962	52788	1.0010	0.067	0.068		
CA21	150	4.957	930527	30.0	4.962	182660	1.0010	0.200	0.196	3.562	Se acepta réplica
CA22	150	4.957	958266	30.0	4.962	178793	1.0010	0.200	0.187		
CA23	150	4.957	928817	30.0	4.962	187483	1.0010	0.200	0.202		
CA31	150	4.957	967194	90.0	4.962	462148	1.0010	0.600	0.478	5.022	Se acepta réplica
CA32	150	4.957	974267	90.0	4.962	519268	1.0010	0.600	0.533		
CA33	150	4.957	869266	90.0	4.962	444788	1.0010	0.600	0.512		
CA41	150	4.957	1044358	150.0	4.962	897494	1.0010	1.000	0.859	1.000	Se acepta réplica
CA42	150	4.957	961188	150.0	4.962	831941	1.0010	1.000	0.866		
CA43	150	4.957	1039515	150.0	4.962	879427	1.0010	1.000	0.846		
CA51	150	4.957	1118152	250.0	4.962	1536060	1.0010	1.667	1.374	1.371	Se acepta réplica
CA52	150	4.957	1276701	250.0	4.962	1772002	1.0010	1.667	1.388		
CA53	150	4.957	1166366	250.0	4.962	1643930	1.0010	1.667	1.409		
CA61	150	4.957	1026357	350.0	4.962	2137233	1.0010	2.333	2.082	3.300	Se acepta réplica
CA62	150	4.957	1016146	350.0	4.962	2197394	1.0010	2.333	2.162		
CA63	150	4.957	1060729	350.0	4.962	2364619	1.0010	2.333	2.229		
	\bar{x}	4.957	976,274.4		4.9620		1.001	0.98	0.86		
	s	0.0000	142,844.0		0.00000		0.000	0.829	0.75		
	%CV	0.000	14.6		0.000		0.000				
Regresión Lineal											
Ordenada al origen											
Pendiente											
r²											
Desviación estándar											
x_i - \bar{x}											
y_i - \bar{y}											
(x_i - \bar{x})*(y_i - \bar{y})											
				CA11			(0.91)	(0.80)	0.73		
				CA12			(0.91)	(0.80)	0.73		

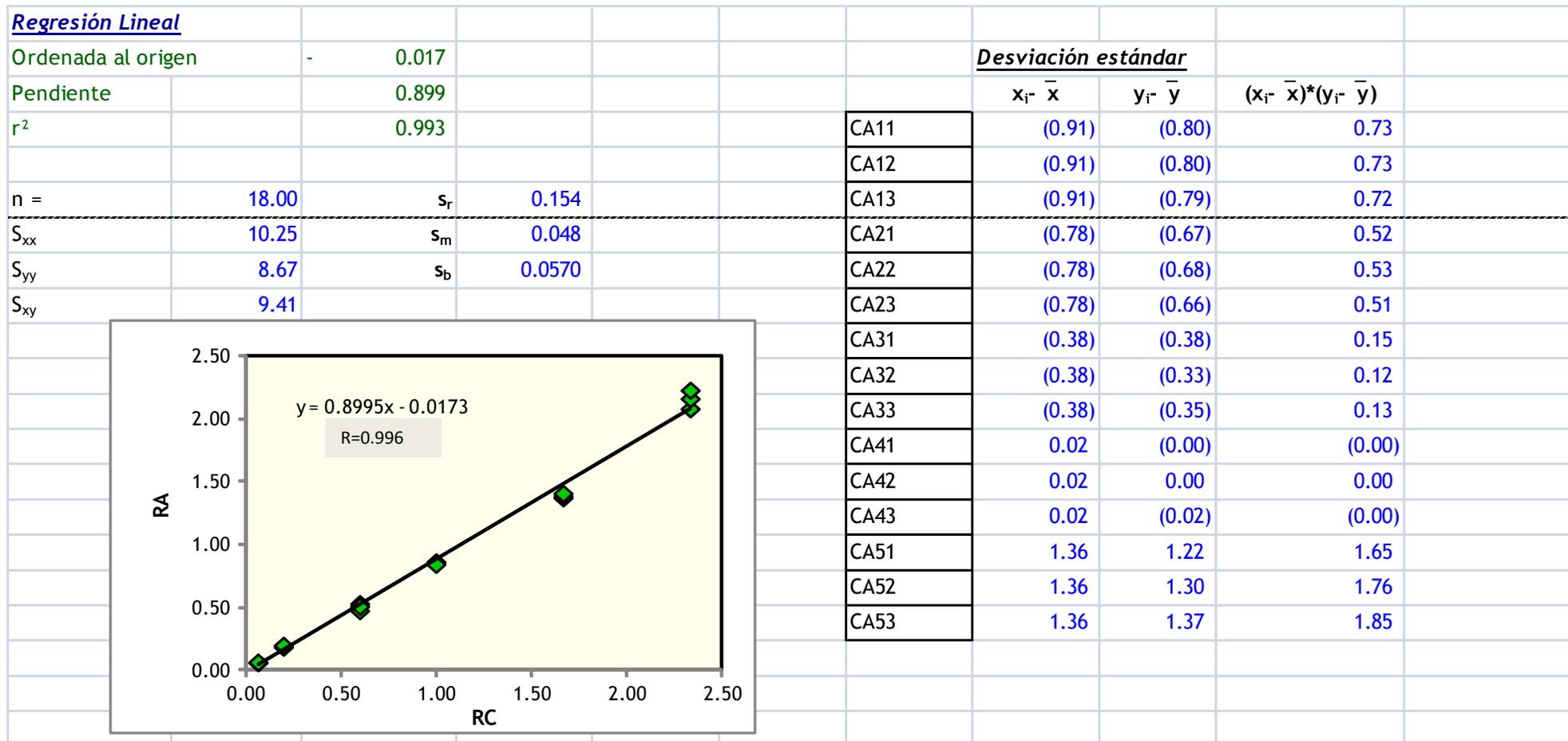
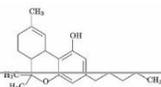
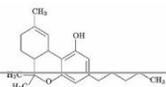


Gráfico A 1 Regresión lineal y gráfico obtenido para la curva de intervalos de concentración de 10-350 ng/mL



ANEXO 2.

Curva de calibración 5-50 ng/mL



<u>Regresión Lineal</u>				<u>Desviación estándar</u>			
Ordenada al origen	-	0.004		$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})$	
Pendiente		0.566					
r^2		0.998					
n =	15.00	s_r	74.784	CA11	(0.84)	(0.46)	0.39
S_{xx}	50.14	s_m	10.562	CA12	(0.84)	(0.47)	0.40
S_{yy}	72721.25	s_b	37.4942	CA13	(0.84)	(0.46)	0.39
S_{xy}	1851.34			CA21	(0.44)	(0.25)	0.11
				CA22	(0.44)	(0.27)	0.12
				CA23	(0.44)	(0.27)	0.12
				CA31	(0.04)	(0.02)	0.00
				CA32	(0.04)	(0.02)	0.00
				CA33	(0.04)	(0.00)	0.00
				CA41	0.36	0.20	0.07
				CA42	0.36	0.20	0.07
				CA43	0.36	0.17	0.06
				CA51	3.96	156.00	617.77
				CA52	3.96	156.18	618.47
				CA53	3.96	154.89	613.38

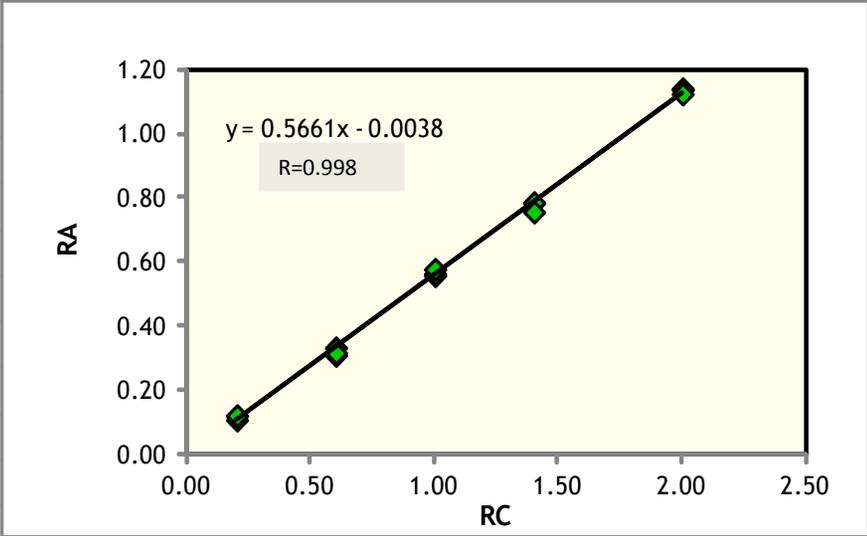
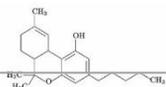


Gráfico A 2 Regresión lineal y gráfico obtenido para la curva de intervalos de concentración de 5-50 ng/mL



ANEXO 3.

Curva de calibración 5-35 ng/mL

