



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**T E S I S:**

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN POSTMORTEM DE  
BENZOILECGONINA EN SANGRE POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA  
MEDIANTE CROMATOGRFIA DE GASES MASA”**

**PARA OBTENER EL TITULO DE LA CARRERA DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA-BIÓLOGICA**

**PRESENTA:  
MORALES CAMPUZANO XOCHIQUETZAL**

**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ**

**ASESOR DE TESIS:  
QFB. JOSÉ LUIS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ**

**México D.F 20 de Abril del 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.

## **AGRADECIMIENTOS:**

*Es muy difícil resumir en tan pocas palabras lo agradecida que estoy con dios, con ustedes y con la vida, por ello agradezco y dedico este trabajo a:*

**Mis papas, Ing. Víctor Morales y Dra. Carolina Campusano:**

*Gracias por que para ustedes y por ustedes es todo esto, por ser mi apoyo y mi impulso, por cuidarme, guiarme y educarme, por que gracias a ustedes sé lo que es tener una familia unida y feliz, por que nunca me ha faltado nada y por que juntos superamos todos y hemos llegado muy lejos e iremos por mas, gracias por la confianza, por las alegrías, no tengo palabras para agradecer el que ustedes hicieran que yo sea la persona que soy, los amo inmensamente y gracias por que además de que tuve la fortuna de que dios los eligiera para ser mis papas son mis amigos.*

**A mis tíos:**

*Javier y Leticia Gracias por ser mis segundos papas, mis amigos, mis confidentes, gracias por todo el apoyo, los consejos y el amor que me han dado, por consentirme y también guiarme los amo.*

**Mis primos:**

*Giovanni y Luis, los amo mucho gracias por todo el apoyo, amor, por los momentos y aventuras vividas y por las que faltan, por las risas, gracias por estar siempre ahí para cuidarme y defenderme.*

**A mis tíos y primos:**

*Mario, Yolanda, Alma, Mayin y Oto: gracias por los momentos vividos los quiero mucho.*

**A mis tíos:**

*Raúl y Anita: La tía consentidora, la que nos llevaba a donde queríamos y la que mas paciencia tuvo, gracias por que me ayudaste a hacer mis tareas de pequeña y me apoyas siempre que lo necesito, junto con mi tío los quiero mucho.*

*Lupita y Manuel: Gracias por los consejos, por siempre estar ahí, cuidarme y por escucharme , los quiero muchísimo.*

*Fernando y Esperanza: Ustedes han estado ahí conmigo, gracias por consentirme, por cuidarme, por apoyarme, por las aventuras que nos hemos aventado los quiero.*

*Irma y Gerardo: Gracias por todos los momentos vividos por que tu tío siempre fuiste y serás un pilar importante en la familia Campuzano, por todos tus detalles, estoy segura que siempre vivirás en nuestros corazones, Irmita no estas sola, lo sabes te quiero mucho.*

*Rocío y Edwin: Que les puedo decir , estoy inmensamente agradecida por todo el apoyo que me han brindado, los quiero inmensamente.*

*Felipe: Aunque ya no estés, siempre te siento cerca...*

*Gracias por que indudablemente en algún momento de mi vida y siempre han estado ahí para mí. Por que somos unidos e incondicionales.*

***A todos mis primos:***

*Que son los primeros amigos que conocí, gracias por su apoyo y presencia en mi vida. En especial quiero agradecer los cuidados, el amor y la paciencia de mi prima Elizabeth Luna Campuzano, te quiero.*

***A la que considero mi segunda familia por el tiempo y los momentos compartidos en INCIFO, quiero agradecer enormemente el apoyo de:***

*QFB José Luis Domínguez Rodríguez (mi querido asesor): Por tu apoyo incondicional, tus enseñanzas y confianza en mi y en mis conocimientos, por todos los momentos divertidos que vivimos. No hay forma de describir lo agradecida que estoy contigo, por brindarme a demás de todo tu amistad sincera, no tengas duda de que todo es reciproco, siempre agradeceré el haberte conocido.*

*Doc. Carlos E. Díaz Otáñez: No se como agradecer a la vida que te pusiera en mi camino eres una excelente persona, en ti no nada mas encontré un apoyo incondicional también encontré una gran amistad, gracias por tu particular interés en la realización de mis proyectos, por tus conocimientos que compartiste conmigo, por tus cuidados, y por la confianza que depositaste en mi y en mis conocimientos, te tengo un gran cariño y un profundo respeto.*

*QFB. Adrián Waldo Capetillo: Desde que lo conozco lo digo y lo sostengo usted es un líder, gracias por apoyar mi desarrollo profesional, por impulsarme y darme la confianza para aprender sin temor, por darme la libertad de realizar mi trabajo con todas las facilidades, por creer en mi y en mis capacidades, le tengo un gran cariño y una profunda admiración.*

*QFB. Lulú Aburto Juárez: Amiga muchísimas gracias por todos tus conocimientos que compartiste conmigo sin dudarlo, por ayudarme a realizar mi trabajo y por que a ti te debo muchas cosas, infinitas gracias, te quiero mucho.*

*Pao: Muchas gracias por todos tus cuidados te quiero muchísimo por que sin duda tu me apoyaste al igual que todos, y siempre estuviste al pendiente de mi.*

**A mis amigos, también es para ustedes:**

*Raúl: chaparrito siempre digo que dios no me dio hermanos pero me dio la oportunidad de elegirlos, agradezco a la vida el tenerte a mi lado a cada momento, el cuidarme, apoyarme, consentirme, tolerar mi adicción a la adrenalina eso no lo hace un amigo, lo hace el mejor de los amigos, Te amo.*

*Paty: Impresionante lo que nos paso, eres mi hermana perdida, te adoro, te agradezco infinitamente el estar conmigo como sólo tu has estado, gracias por que también tu trabajas conmigo iiihombro a hombro!!!*

*Betzabet y Mayito: Gracias por el apoyo permanente, la confianza, la amistad tan grande y bonita que juntos hemos construido y que seguirá por siempre, los quiero mucho.*

*Toñito: iiiTu y yo siempre juntos!!! Gracias por cada momento, por que aunque no estemos muy cerca, siempre estamos al pendiente, Te amo.*

*Javo: No sé como expresar lo mucho que te amo y lo importante que eres para mi, gracias por todos los momentos, por las aventuras, por tantos años juntos,*

*quedémonos siempre y sigamos apoyándonos como hasta ahora, que por nosotros no pasen los años.*

*David: Amoshi, sabes lo importante que eres para mí, gracias por tantos años y los que faltan, las risas, los momentos que hemos compartido, por estar constantemente aquí te amo.*

*Julio: Mi mugroso, gracias por todo el apoyo que me diste mientras fuimos compañeros de clase y por seguir conmigo, cuidándome y tendiéndome la mano siempre que lo necesito, te amo.*

*Ivonne: Otro momento importante que puedo compartir a tu lado, que así sea siempre, continuemos como hasta ahora, levantándonos, impulsándonos juntas, te amo hermanita.*

***Ustedes testigos fieles de mi esfuerzo, compañeros de mis logros, amigos que siempre me escuchan, manos que siempre están para apoyarme, agradezco el conocerlos y compartir tantos momentos juntos los quiero muchísimo.***

*Eduardo Villaseñor, Luís Morín, Fernando Peralta, Lis Parra, Sam Mejía, Yered Palafox, Jorge Roque, Natalia, Diana Torres.*

***A mis profesores:***

*Valentín Islas Pérez (Director de tesis): gracias por su apoyo incondicional, su confianza, y su interés en mi superación profesional, con profundo respeto y un gran cariño.*

***Por sus grandes conocimientos que con tanta dedicación transmiten, por que de todos aprendí y sin duda alguna sigo aprendiendo, muchas gracias por todo su apoyo durante mi estancia en la UNAM y en la culminación de la misma.***

*Holber Zuleta Prada  
Carlos Salvador Valadez Sánchez  
Víctor Hugo Becerra López*

***A mi Universidad la mejor de todas, UNAM Fes Zaragoza***

## **Tabla de Contenido**

### **1. Introducción**

### **2. Marco Teórico**

- 2.1. Fenómeno de la drogadicción
- 2.2. Panorama nacional epidemiológico del consumo de sustancias
- 2.2.1. Panorama internacional epidemiológico del consumo de sustancias
- 2.3. Prevalencia de consumo de drogas en distintos países de América y su comparación con México 2008
- 2.3.1. Prevalencia de consumo de drogas en distintos países de Europa y su comparación con México 2008-2011
- 2.4. Tendencias del consumo de drogas en 2011

### **3. Cocaína**

- 3.1. Propiedades, químicas y físicas
- 3.2. Ruta metabólica de la cocaína
- 3.3. Mecanismo de acción y efectos
- 3.4. Principales Metabolitos de la cocaína
- 3.5. Benzoilecgonina

### **4. Métodos analíticos para la identificación de metabolitos de cocaína**

- 4.1. Validación
- 4.2. Cuándo y cómo debe validarse
- 4.3. Parámetros
- 4.4. Criterio de Horwitz
- 4.5. Importancia de la validación de un método analítico, para el análisis de muestras en condiciones postmortem y su aplicación en el ámbito forense.

### **5. Cromatografía**

- 5.1. Fundamento teórico
- 5.2. Detectores
- 5.3. Cromatografía de gases
- 5.4. Espectrometría de masas
- 5.5. Acoplamiento, cromatografía de gases-espectrometría de masas
- 5.6. Extracción
- 5.6.1. Tipos de extracción
- 5.7. Extracción en fase sólida

### **6. Planteamiento del problema**

### **7. Objetivos**

- 7.1. General
- 7.2. Específicos

### **8. Hipótesis**

## **9. Diseño Experimental**

- 9.1. Especificaciones de la validación del método
- 9.2. Evaluación del método
  - 9.2.1. Población objetivo
  - 9.2.2. Población de estudio
  - 9.2.3. Criterios de inclusión
  - 9.2.4. Criterios de exclusión

## **10. Metodología**

- 10.1. Procedimiento de extracción en fase sólida que se llevo a cabo para la evaluación del método
- 10.2. Procedimiento de extracción en fase sólida que se llevo a cabo para la validación del método
- 10.3. Material empleado
  - 10.3.1. Equipo
  - 10.3.2. Material
  - 10.3.3. Disoluciones
  - 10.3.4. Reactivos
  - 10.3.5 Muestra
- 10.4. Elaboración de disoluciones

## **11. Resultados de la Validación**

- 11.1. Recuperación
- 11.2. Límite de detección del método
- 11.3. Límite de cuantificación del método
- 11.4. Límite práctico de cuantificación del método
  - 11.4.1. Precisión en el límite práctico de cuantificación o cantidad mínima cuantificable
- 11.5. Intervalo lineal
- 11.6. Intervalo de trabajo
- 11.7. Repetibilidad
- 11.8. Reproducibilidad
- 11.9. Sesgo
- 11.10. Incertidumbre
- 11.11. Sensibilidad
- 11.12. Selectividad
- 11.13. Robustez

## **12. Análisis de resultados**

## **13. Conclusión**

## **14. Referencias bibliográficas**



## **Anexos**

- Anexo 1: Cromatograma y Tabla de Selectividad del método**
- Anexo 2: Robustez del sistema.**
- Anexo 3: Incertidumbre**
- Anexo 4: Cromatograma de tiempo de retención de la benzoilecgonina**
- Anexo 5: Certificate of Analysis Blon Elut (cartucho para extracción en fase sólida)**
- Anexo 6: AUTOTUNE Cromatógrafo gases masa**
- Anexo 7: Certificate of Analysis standar Benzoylecgonine**

## 1. INTRODUCCIÓN:

La cocaína es el principal alcaloide que se obtiene de la planta *Eritroxilum coca*. Aunque generalizado, el uso de las hojas en algunos países de la región Andina, hoy día la cocaína está asociada casi exclusivamente con el abuso del alcaloide. Los efectos estimulantes de la cocaína, así como sus propiedades anestésicas y vasoconstrictoras han sido objeto de numerosos estudios por parte de médicos y toxicólogos.

La cocaína es además la sustancia psicoactiva de más amplia gama de posibilidades de consumo: puede ser inhalada, fumada, inyectada, bebida en infusiones, aplicada en las mucosas y también puede mezclarse con otras drogas. La misma se metaboliza rápidamente y la benzoilecgonina, que es su principal metabolito, es considerado como marcador del consumo de la misma; no obstante, se han reportado adicionalmente otros 18 metabolitos, de los cuales los más importantes son la Metil Ester de Ecgonina (EME), Ecgonina (EG), Norcocaina (NORCOC) y el Cocaetileno (COCET). Este último resultado del consumo simultáneo con etanol.

La drogadicción en el mundo es un problema contemporáneo que afecta aproximadamente a 243 millones de personas. Un 5% de la población mundial de entre 15 y 64 años de edad, han consumido una sustancia ilícita durante el 2014. En México, la drogadicción ha alcanzado cifras altas de consumo en comparación con algunos años atrás. Hay alrededor de 20.000 jóvenes entre 10-24 años que son procesados por algún delito. De los mismos, el 50% se cometieron bajo el efecto de alguna droga. Este nicho de población es el que más incurre en el consumo de sustancias ilícitas, como la marihuana, cocaína (cuyo consumo se ha elevado principalmente en mujeres durante los últimos años) heroína y fármacos. Por esto, se ha convertido en un problema apremiante para la salud pública.

En la mayoría de los casos, los asaltos, homicidios, suicidios y prostitución son consumados por personas que se encuentran bajo el efecto de las drogas. Por lo tanto, se convierte en un factor que promueve la delincuencia en el país. México, durante los últimos 30 años, ha estado sometido por el rigor del narcotráfico, que ha sido el motor fundamental en el aumento del consumo de drogas.

El uso de estas sustancias ha desatado en nuestra sociedad un ambiente plagado de violencia y corrupción, en el que los más afectados son los jóvenes. Por ello, se genera en los padres de familia una mayor preocupación y necesidad de control sobre sus hijos con el fin de evitar que resulten involucrados en este tipo de problemática.

La determinación de la cocaína y sus principales metabolitos en fluidos biológicos se lleva a cabo, en la mayoría de los laboratorios, a través de inmunoensayos realizados de manera directa en sangre u orina o mediante la aplicación de un procedimiento de extracción líquido-líquido (ELL) o de extracción en fase sólida (SPE), seguido de la ejecución de una técnica cromatográfica, por ejemplo: la Cromatografía en Capa Delgada, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y Cromatografía de Gases (CG). La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS), dada su elevada

especificidad y sensibilidad, es la técnica mediante la cual se obtiene la más adecuada eficiencia para este tipo de estudio.

Desde el punto de vista analítico, en el estudio toxicológico se debe contar con métodos analíticos selectivos para la evaluación cualitativa de las sustancias tóxicas que conduzcan a una correcta interpretación forense, teniendo en cuenta que, además de esto, se deben buscar resultados confiables que sean obtenidos a la luz de rigurosos controles de calidad. Por consiguiente resulta necesario validar cualquier método desarrollado, con el fin de demostrar que es congruente con el propósito para el cual fue diseñado y asegurar su aplicación rutinaria.

Los parámetros que se evalúan en un método analítico cuantitativo son los siguientes: precisión, especificidad, selectividad, límite de detección y robustez. También, para la validación, se evalúa la idoneidad del sistema que, para métodos cromatográficos, incluye el factor de selectividad, determinación, estabilidad del tiempo de retención de cada uno de los metabolitos, la resolución, el factor de capacidad y el número de platos teóricos. El análisis de estos parámetros permiten determinar la capacidad del sistema cromatográfico para obtener resultados reproducibles cada vez que el método sea aplicado.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Fenómeno de la drogadicción**

El abuso de sustancias psicotrópicas, constituye uno de los problemas de salud pública de nuestra época, que se presenta tanto a nivel nacional como internacional. Este fenómeno de salud afecta, sin distinción de género, incidiendo principalmente en niños y adolescentes, de cualquier estrato social y de todas las regiones de nuestro país <sup>(1,20,21)</sup>. Los estudios epidemiológicos, tanto nacionales como mundiales nos demuestran que este fenómeno es cambiante y se presenta con mayor frecuencia en jóvenes. Se observa además un aumento en el uso de drogas (legales e ilegales) en la mujer. <sup>(1)</sup>

México ha estado en la vanguardia en el estudio epidemiológico de las adicciones ya que desde 1980, se han realizado cinco encuestas nacionales, en 1988, 1993, 1998, 2002 y 2008. En las tres primeras registraban datos urbanos y en las dos últimas se agregaron datos del medio rural. Con estos estudios se ha logrado tener datos sobre la evolución del problema tanto en el medio urbano y rural, a nivel regional y estatal.

Estos estudios epidemiológicos se han llevado a cabo con una periodicidad de aproximadamente seis años, por ello la Sexta Encuesta Nacional de Adicciones (2011), constituye un parteaguas en esta serie y señala el interés para tener información actualizada sobre este fenómeno, y así conocer la actitud de la población ante este problema. <sup>(2,3)</sup>

### **2.2. Panorama Epidemiológico del Consumo de Sustancias:**

México cuenta con una amplia experiencia en investigaciones epidemiológicas y cualitativas acerca del consumo de drogas. Desde la década de los setentas se han llevado a cabo estudios con una misma metodología, utilizando técnicas de recolección y análisis uniformes por cada tipo de población estudiada, que permiten conocer el panorama global del fenómeno del consumo de drogas en distintos escenarios tales como el hogar, las escuelas y los centros de tratamiento. <sup>(1,2)</sup>

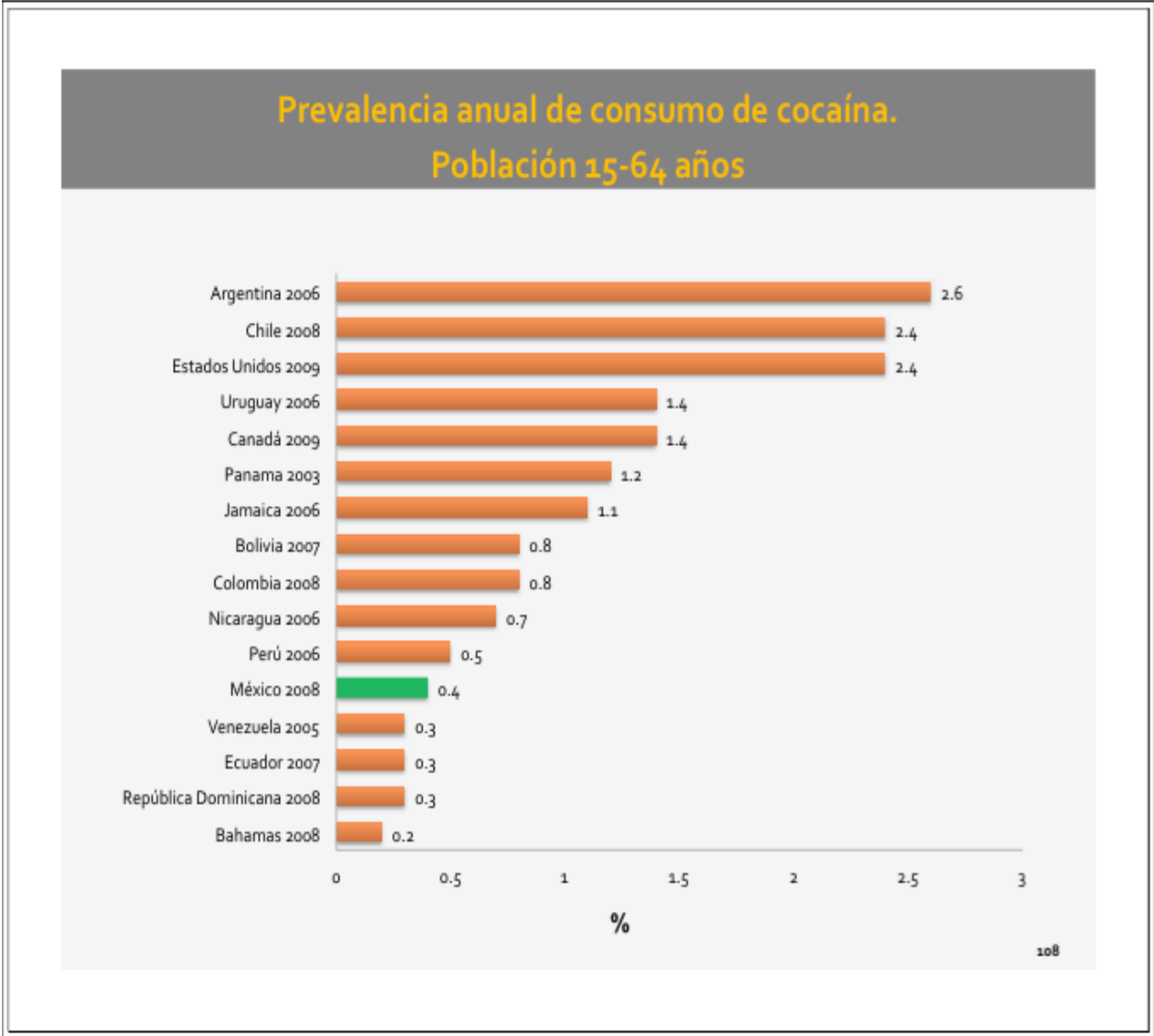
#### **2.2.1. Panorama internacional:**

A nivel internacional, se cuenta con diversas fuentes de información sobre el consumo de drogas. Dentro de las más relevantes se encuentran los observatorios continentales, donde América cuenta con la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD) (2008), y cada año se presenta el Reporte Anual de la Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (ONUDD).

El reporte indica que América del Norte donde se sitúa México junto con Canadá y Estados Unidos sigue siendo el mayor mercado mundial de drogas, a pesar de que ha disminuido en términos económicos, en comparación con una o dos décadas anteriores. En ella, se ha desarrollado un modelo de consumo diversificado en el que no surge un solo tipo de droga dominante. La marihuana, los opiáceos y la cocaína son igualmente representados y constituyen partes similares en la demanda total de atención por consumo de drogas. <sup>(1,2)</sup>

**2.3. Prevalencia anual de consumo de drogas en distintos países de América y su comparación con México 2008 (Figura 1).<sup>(1)</sup>**

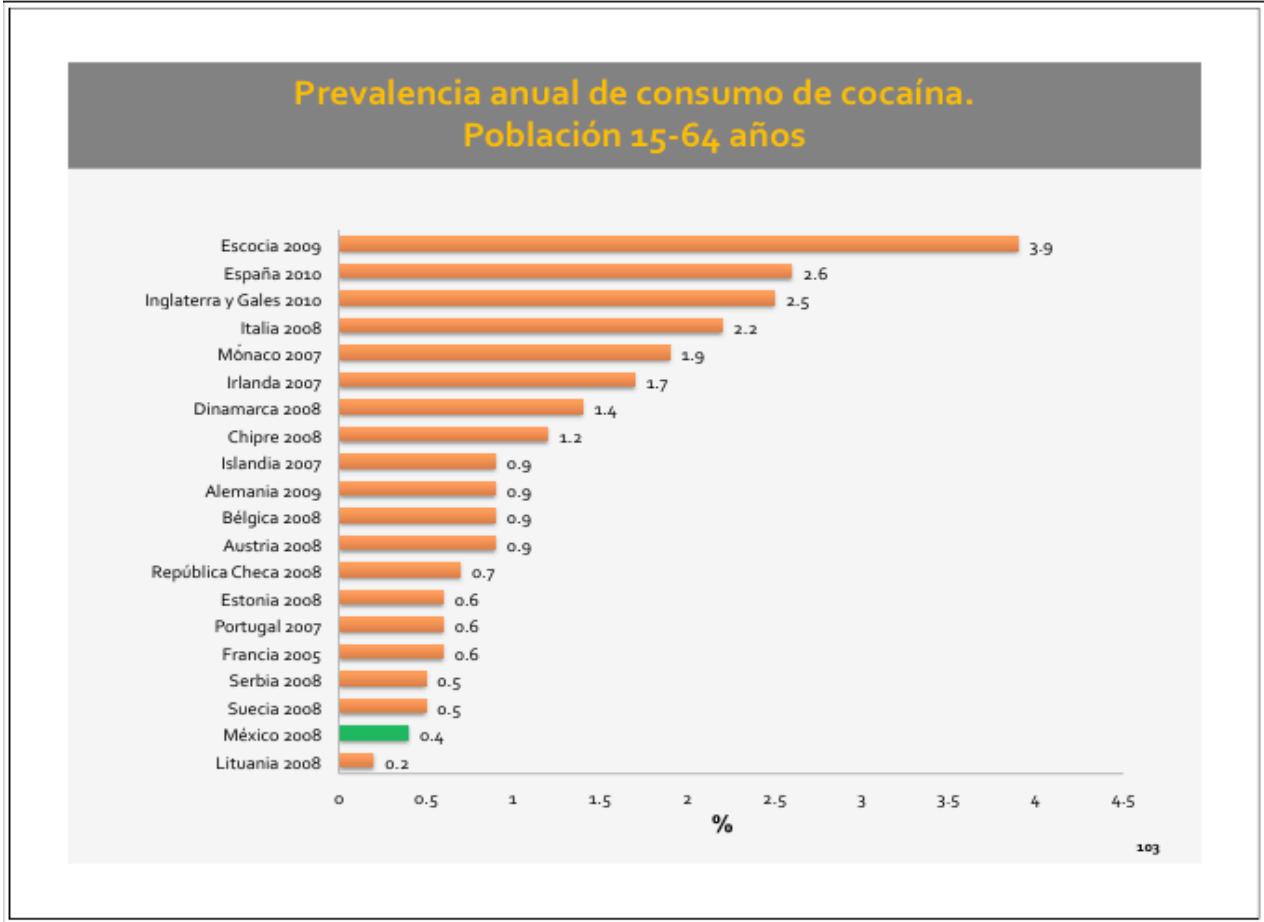
A nivel internacional, refiriéndose al continente americano, (ver figura 1) se tiene registro que Argentina es el país con más altos índices de consumo de cocaína, seguido por Chile y Estados Unidos, este último ha desarrollado un modelo de consumo diversificado en el que existe también consumo de otros tipos de drogas.



**Figura 1**

**2.3.1. Prevalencia de consumo de drogas en distintos países de Europa y su comparación con México 2008-2011 (Figura 2):<sup>(1)</sup>**

En cuanto a el panorama Europeo y su comparación con México se puede observar que Escocia es el país con un mayor índice en el consumo de, así al analizar los datos presentes en la figura 2 podemos observar que el consumo anual relativo a países de la Comunidad Europea indican claramente que México se encuentra entre los países de menor consumo.

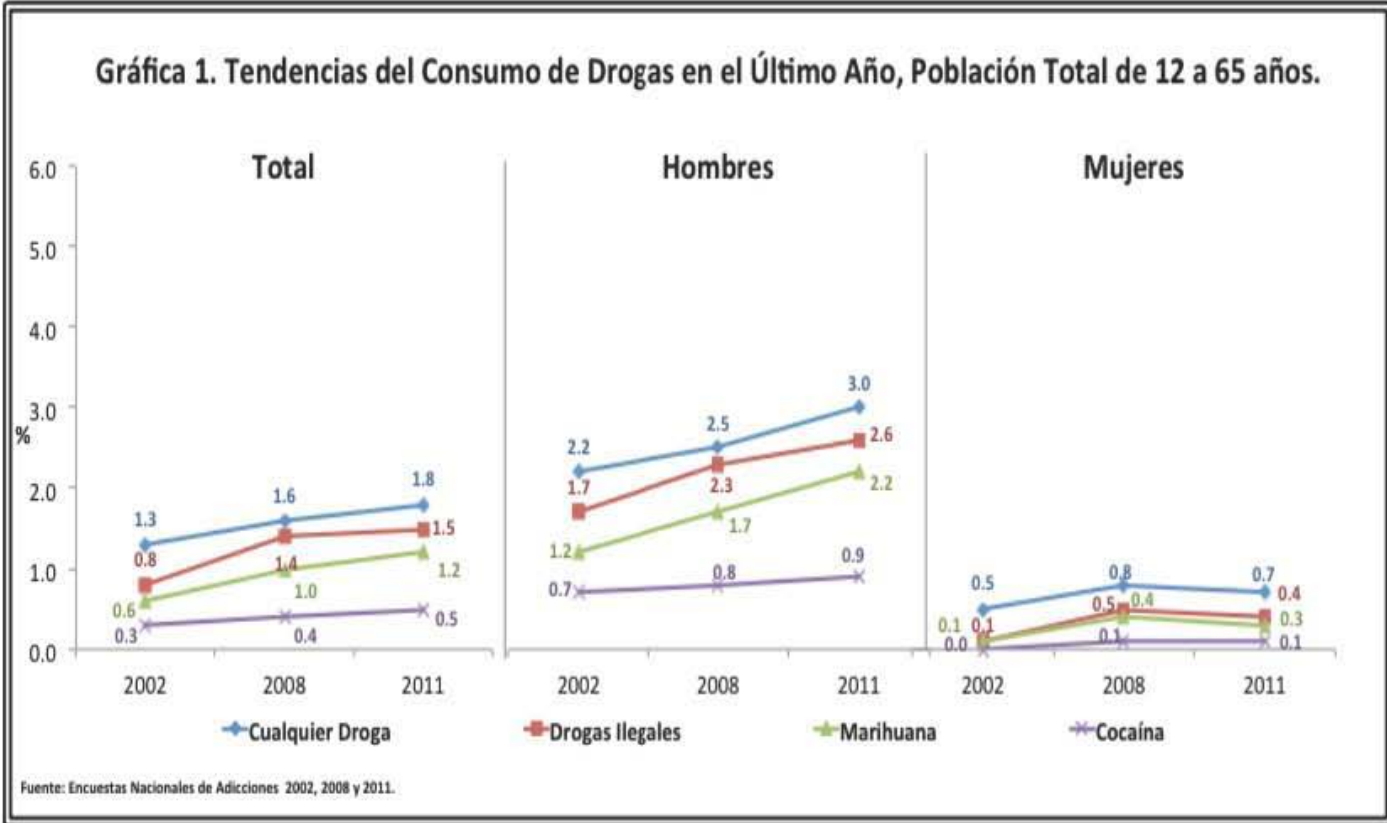


**Figura 2**

**2.4. Tendencias del consumo de drogas en 2011 (Figura 5):**

La Encuesta Nacional de Adicciones, llevada a cabo de manera periódica, tiene la finalidad de medir la evolución del consumo de sustancias y otras problemáticas de salud mental. La marihuana continúa siendo la sustancia de preferencia de los usuarios. En tanto, en la cocaína se observó un incremento del 1.4%, en 2002, a 2.4% en el 2008 (Ver Figura 3) (Secretaría de Salud, 2009).<sup>(1,19,20)</sup>

Por otro lado La información proveniente del SRID (Ortiz, Martínez & Meza, 2010), que se realiza sólo en la Ciudad de México<sup>(1)</sup>, la cocaína ocupa el tercer lugar de consumo en la prevalencia. El grupo más afectado es el de los 15 a 19 años de edad (45.9%).<sup>(1,20-25)</sup>



**Figura 3**

### 3. COCAÍNA

La cocaína es un estimulante extremadamente adictivo que afecta directamente al cerebro. La cocaína ha sido llamada la droga de los años ochenta y noventa por su gran popularidad y uso extendido en esas décadas. Sin embargo, no es una droga nueva. En realidad, la cocaína es una de las drogas que se conoce desde hace más tiempo. Las hojas de la coca, de donde se obtiene la cocaína, se han ingerido por miles de años, mientras que la sustancia química pura, el clorhidrato de cocaína, se ha consumido por más de 100 años. A principios del siglo XX, por ejemplo, la cocaína purificada se convirtió en el principio activo básico que se empleaba en la mayoría de los tónicos y elixires creados para tratar una gran variedad de enfermedades.

La cocaína pura era extraída originalmente de la hoja del arbusto de la coca del género *Erythroxylum*, (Figura 6) que crecía principalmente en Perú y Bolivia. En la década de los noventa, y después de varios esfuerzos para reducir el cultivo en esos países, Colombia se convirtió en el país con mayor cultivo de coca. Hoy en día, la cocaína es una droga clasificada bajo la Lista II ("Schedule II") de la Ley sobre Sustancias Controladas, lo que significa que se considera que tiene un gran potencial para ser abusada, pero que puede ser administrada por un doctor para usos médicos legítimos, por ejemplo, como anestesia local en ciertos tipos de cirugías de los ojos, oídos y garganta. <sup>(9,16)</sup>

La cocaína usualmente se vende en la calle en forma de un polvo blanco, fino y cristalino que se conoce en español como "coca", "nieve", "dama blanca" o "talco". Algunos de sus nombres en inglés son "coke", "C", "Snow", "flake" y "blow". Los traficantes generalmente mezclan la cocaína con otras sustancias inertes, tales como la maicena, el talco o el azúcar; o con ciertas drogas activas como la procaína (una anestesia local de composición química parecida) u otros estimulantes, como las anfetaminas. Algunos consumidores combinan la cocaína con la heroína en lo que suelen llamar un "speedball" (en español también se conoce como "revuelto", "rebujo", "francés" o "café con leche"). <sup>(9,12)</sup>



Figura 4

Hay dos formas químicas de la cocaína que suelen consumirse: la sal de clorhidrato (que es soluble en agua) y los cristales de cocaína o base, conocida en inglés como "freebase" (que no son solubles en agua). La sal de clorhidrato, o la forma en polvo de la cocaína, se consume de forma inyectada o inhalada ("snorting"). Los cristales de cocaína o freebase han sido procesados con amoníaco o bicarbonato sódico y agua y luego calentados para eliminar el clorhidrato y producir una sustancia que se puede fumar. El término "crack", el nombre de la calle para los cristales o base de cocaína, se refiere al sonido crujiente que se oye al fumar esta mezcla. <sup>(16)</sup>

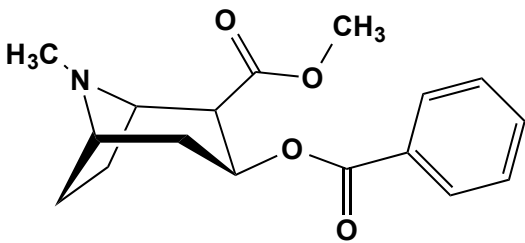
#### 3.1. Propiedades químicas y físicas:

El clorhidrato de cocaína y sulfato de cocaína, son los dos productos más puros en el proceso de refinación de la coca (Figura 7). Las sales de cocaína son termo resistentes,



poco volátiles y su punto de fusión se alcanza a los 190°C<sup>(3)</sup>. Es una base débil (pKa= 8.6)<sup>(20)</sup>

La cocaína contiene cuatro átomos de centros estereogénicos, las cocaínas derivadas de la forma trans, se distinguen por la letra griega  $\alpha$  a las cuales son d-cocaína o isococaína y las cocaínas que tienen configuración cis, son las l-cocaínas; una mezcla de ambos isómeros en proporciones iguales genera la llamada cocaína racémica que no tiene actividad óptica.<sup>(16)</sup>



**Figura 5**

Los centros estereogénicos en la molécula de l-cocaína que es la más importante y tiene actividad biológica. Los centros estereogénicos que contienen las moléculas de cocaína compiten entre sí y se contrarresta, por tanto la actividad óptica de la cocaína así como de todos los alcaloides se ve condicionada por la presencia del átomo de nitrógeno en su estructura, es decir la cocaína presenta actividad óptica por el nitrógeno más que por los centros estereogénicos pero tampoco se debe ignorar que estos producen algún efecto, en la desviación de la luz polarizada por la cocaína.<sup>(16,12)</sup>

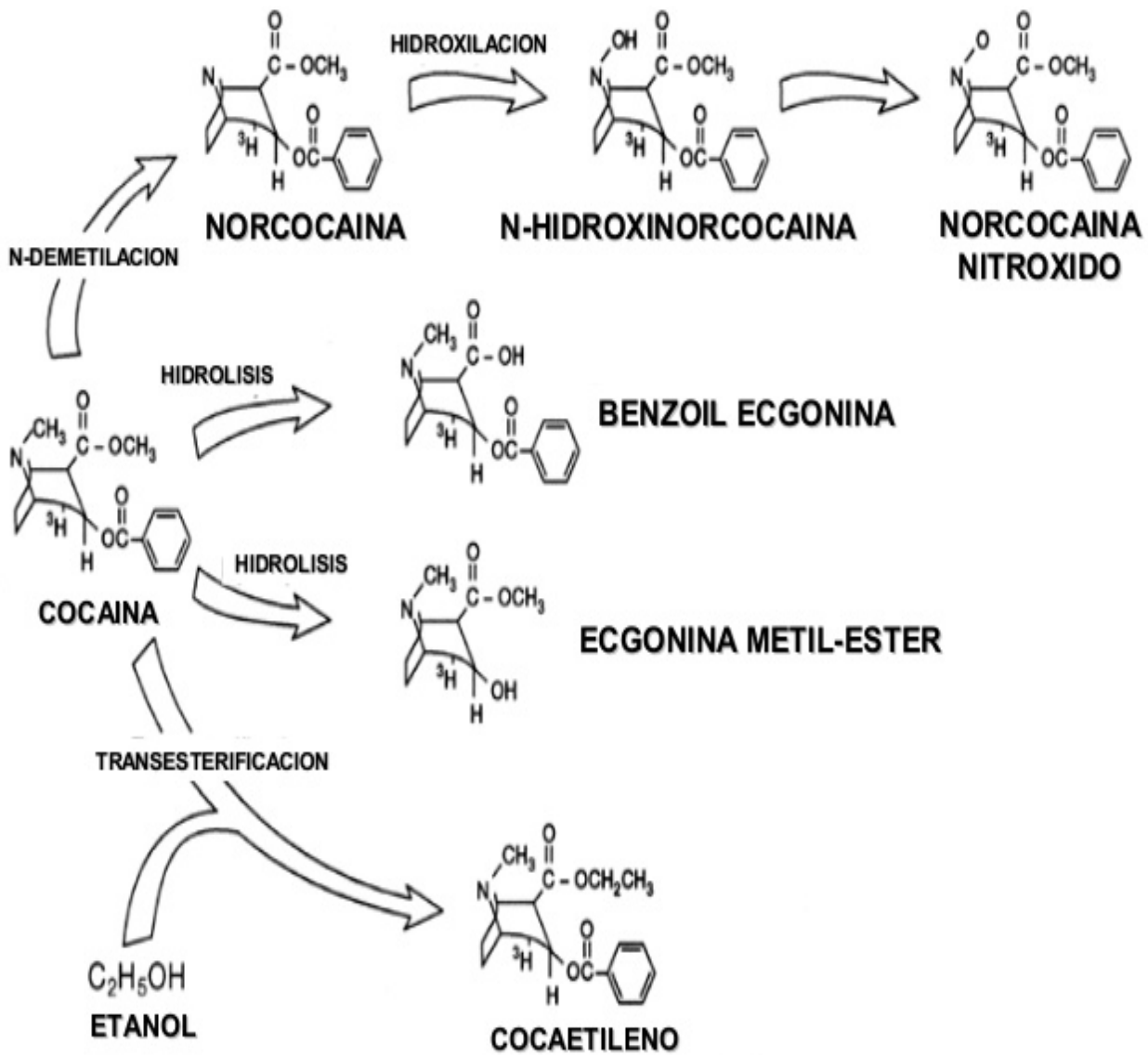
### 3.2. Ruta metabólica de la cocaína:

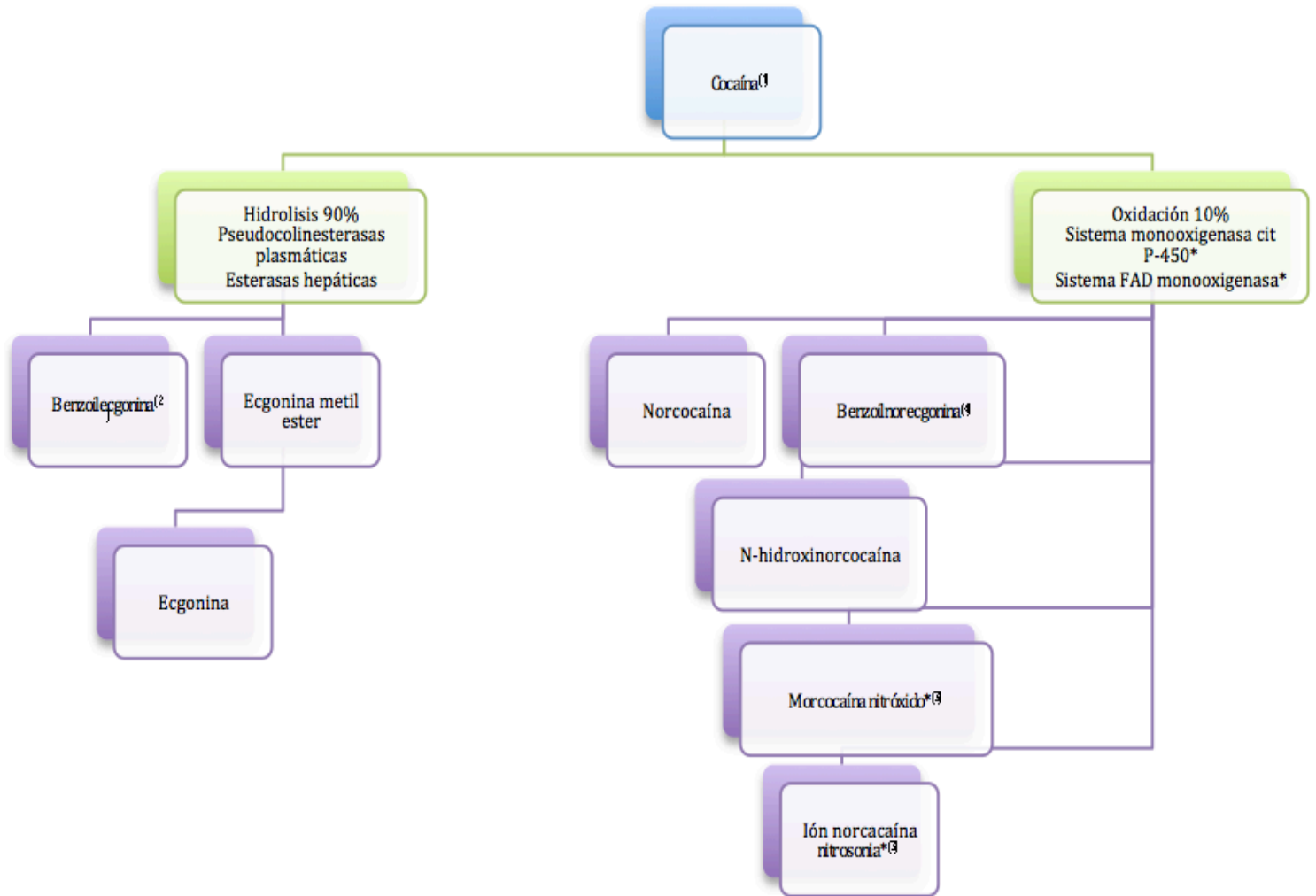
La cocaína es bien absorbida por la mayoría de las vías de administración. Las sales de cocaína son termolábiles y difunden bien cuando están solubles en agua, es decir, la hidrosolubilidad de las sales de cocaína permite que sean fácilmente absorbibles por las mucosas nasales ("sniffin"), pero no permite que sean fumadas, una línea típica de cocaína para aspiración nasal contiene entre 20-30 mg. Las sales de cocaína también pueden ser absorbidas por vía parenteral<sup>(4)</sup>. Una vez absorbida la cocaína pasa rápidamente a la sangre y se distribuye por todo el organismo, teniendo especial afinidad por receptores en el cerebro. Debido a su alta liposolubilidad atraviesa la barrera hematoencefálica y la barrera feto placentaria. La cocaína tiene un volumen de distribución de 2 l/kg. La biotransformación del principio activo se inicia rápidamente en la sangre misma debido al pH del medio acuoso y se ve favorecida por la acción de la colinesterasa y posteriormente se completa en el hígado donde es hidrolizada por colinesterasas produciendo sus dos metabolitos principales la benzoilecgonina (BEG) y la ecgoninametilester (EME). 15-30 minutos después de la administración aparece la benzoilecgonina (BEG), el principal metabolito del cual se pensaba que era farmacológicamente inactivo (Figura 8). La BEG puede detectarse en plasma hasta 24 horas después de su administración.<sup>(28)</sup>

Ni la cocaína ni sus metabolitos se unen a proteínas plasmáticas, la vida media de sus metabolitos oscila entre 4-6 horas y es más larga que la de la cocaína libre que es de aproximadamente 60 minutos<sup>(4)</sup>. La cantidad encontrada en sangre corresponde fielmente a la cantidad a la que están expuestos los receptores. En personas con sobredosis, la sustancia muestra concentraciones diferenciales importantes en cerebro y sangre, llegando a encontrarse en el primero hasta 10 veces la concentración en la sangre,

tomada al mismo tiempo. Su eliminación se efectúa por vía renal principalmente como metabolitos, los cuales pueden ser detectados hasta seis horas después del consumo y con una pequeña cantidad en forma libre. <sup>(28)</sup>

Metabolismo de la cocaína:





**Figura 6: Metabolismos oxidativo y no oxidativo de la cocaína, en reacciones y diagrama.** (1) Del 1 al 5% de la cocaína se excreta en orina sin metabolizar. (2) Metabolitos excretados en orina. (3) Metabolitos reactivos. (4) La FAD monooxigenasa actúa también en la conversión de Norcocaína a N-hidroxinorcocaína. \*Sistemas enzimáticos inducidos en presencia de fenobarbital.

### 3.3. Mecanismo de acción y efectos:

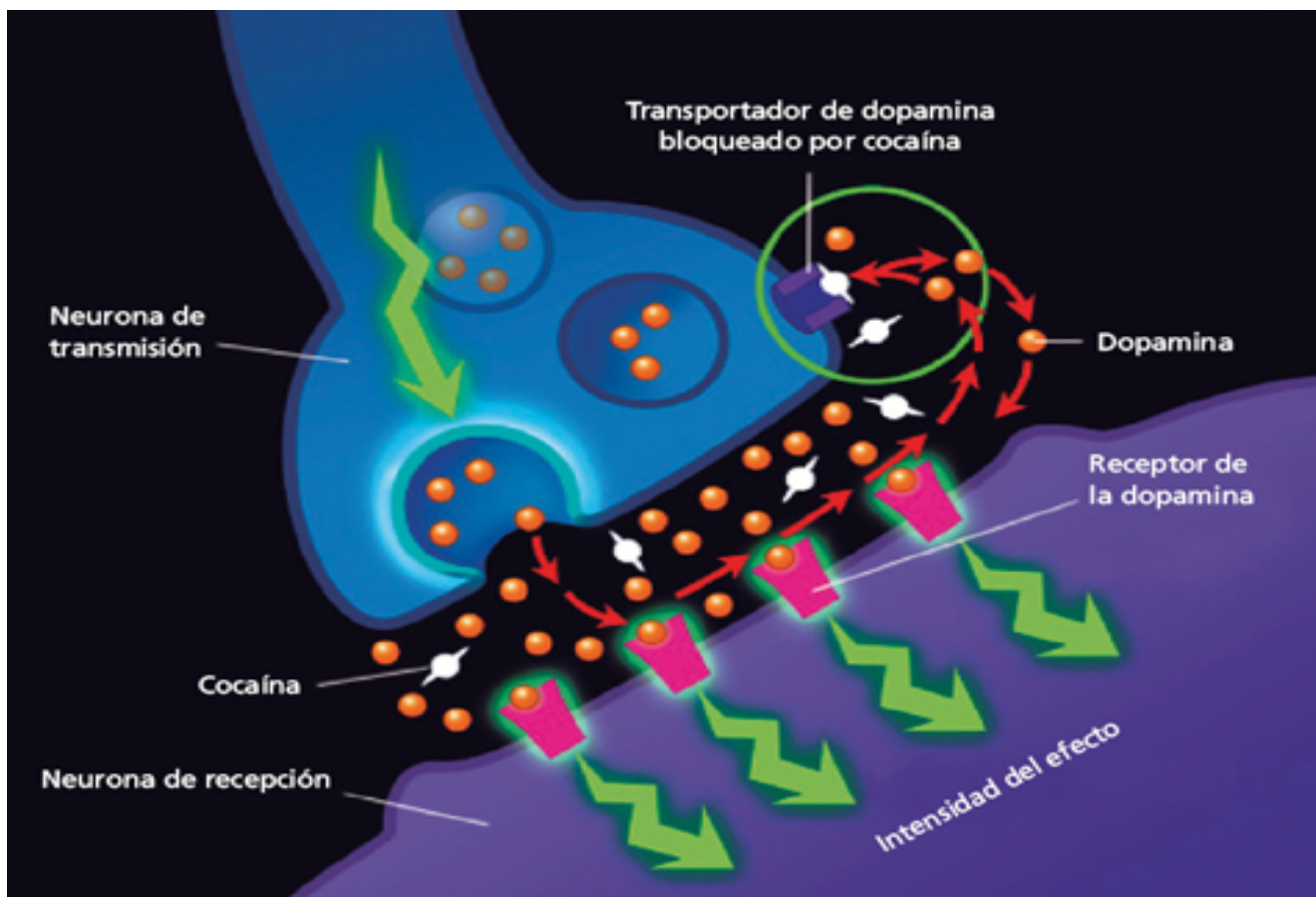
La cocaína administrada intranasalmente produce un incremento de la presión arterial, tanto diastólica como sistólica. Una dosis intranasal entre 20-30 mg de cocaína produce efectos eufóricos y estimulantes hasta unos 30 minutos. Está asociada con numerosas complicaciones agudas y crónicas, síndromes coronarios, infarto de miocardio y problemas respiratorios. Además de alteraciones psiquiátricas y neurológicas, desórdenes del humor y psicosis.

El uso de cocaína también se ha asociado con el incremento en el riesgo de VIH, hepatitis B y C, y violencia. Desde hace unos años, la adicción a la cocaína constituye el problema sanitario más grave en el mundo occidental en el campo de las toxicomanías.

La cocaína es un estimulante que conduce a la rápida acumulación de catecolaminas y serotonina en el cerebro mediante el bloqueo de la recaptación de serotonina, dopamina y noradrenalina principalmente en el sistema mesocorticolímbico, por lo tanto la disponibilidad de estas monoaminas aumenta significativamente (Figura 9).

Los estudios acerca de la acción de la cocaína con modelos animales nos indican que están relacionadas estructuras cerebrales implicadas con las funciones reforzantes, como son el área tegmental ventral (ATV), el núcleo *accumbens* (NAc), la amígdala y el córtex prefrontal (PFC).

Los estudios realizados con humanos son consistentes con los observados en estos modelos experimentales, y muestran activación de las funciones subcorticales y corticales en regiones del refuerzo y aversión durante la exposición a la droga, asociándose los efectos reforzadores de la cocaína con incrementos en los niveles de dopamina cerebral.  
(19)



**Figura 7.** Mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína bloquea el proceso de reciclaje provocando una acumulación de dopamina en la sinapsis. Este aumento de dopamina se asocia con los efectos placenteros provocados por la cocaína  
*Fuente: Tomada del National Institute of Drug Abuse (NIDA) Estados Unidos*

### 3.4. Principales metabolitos de la cocaína:

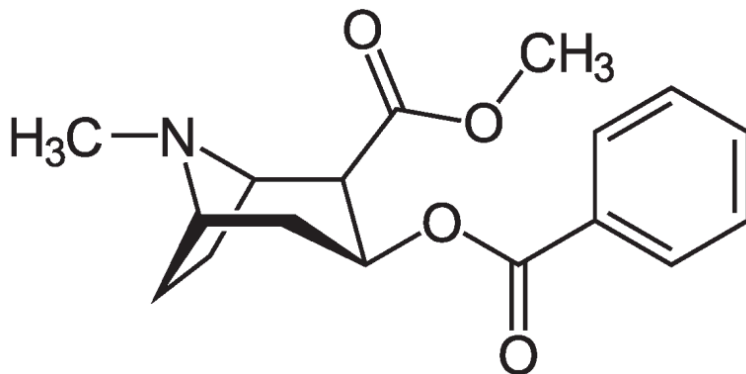
Cuadro 1

Metabolitos	Efectos
<b>Benzoilecgonina</b>	No produce cambios en la presión arterial, vasoconstrictor.
<b>Cocaetileno Alcohol-cocaína</b>	Produce aumento significativo en la presión arterial, se encuentra rápida y principalmente en hígado, pulmón y riñón. Unos minutos más tarde, este metabolito es detectado en otros tejidos como el cerebro, el Corazón o el bazo
<b>Norcocaína</b>	No produce efectos significativos sobre el corazón. aumenta la presión, pero no la frecuencia poca duración
<b>Éter metílico de ecgonina</b>	No produce cambios en la presión arterial. Produce vasodilatación cerebral. Tiende a ser opuesta a la cocaína

(4)

### 3.5. Benzoilecgonina:

Es un analgésico tópico y el principal metabolito de la cocaína. La benzoilecgonina es el compuesto ensayado en la mayoría de los análisis de orina para la identificación de cocaína. Es el correspondiente ácido carboxílico de la cocaína, su éster metílico. Se forma en el hígado por el metabolismo de la cocaína, catalizada por carboxilesterasas y posteriormente se excreta en la orina. Se puede encontrar en la orina durante mucho más tiempo que la propia cocaína que generalmente desaparece en el plazo de 5 días. Pequeñas cantidades pueden ser rastreadas a ciertos medicamentos OTC (over the counter), después de haber sido metabolizada en el hígado. <sup>(14,31)</sup>



ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA  
BENZOILECGONINA

#### 4. Métodos analíticos para la identificación de anabolitos de cocaína:

**Cromatografía en capa delgada (TLC):** La TLC es una técnica utilizada habitualmente para la separación e identificación de drogas fabricadas ilícitamente. Se trata de una técnica económica, rápida, sensible (solo se requieren cantidades inferiores al miligramo de la sustancia objeto de análisis), flexible en la selección de las fases estacionaria y móvil y aplicable a una amplia variedad de sustancias, en forma de sal o de base, desde los materiales más polares a los no polares. <sup>(15,20)</sup>

**Espectrometría de masas para cromatografía de gases (GC-MS):** La GC-MS es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para la identificación de muestras de drogas con fines forenses. Como técnica combinada, aúna el poder de discriminación y la sensibilidad de un cromatógrafo de gases (GC) con la especificidad para la muestra analizada que aporta una técnica espectroscópica. Puede proporcionar datos espectrales altamente específicos de las distintas sustancias presentes en una mezcla compleja sin necesidad de aislarlos previamente. <sup>(20)</sup>

**Cromatografía de gases (GC) con detección de ionización de llama (GC-FID):** El instrumento GC preferido para trabajos analíticos de rutina es el cromatógrafo de gases con columna capilar de pequeño calibre, en el que se utilizan columnas con un diámetro interno de entre 0,2 y 0,32 mm. Los sistemas de GC están equipados actualmente con columnas capilares. <sup>(8,7)</sup>

**Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (HPLC):** Además de la GC, la HPLC es otra importante técnica de separación utilizada con frecuencia en el análisis de drogas con fines forenses. Por la facilidad de preparación de las muestras y la mejor reproducibilidad y capacidad de detección, para el análisis de cocaína se recomienda la cromatografía de fase inversa. La columna más universal y versátil es la columna adherida de octadecil sílice (C18). Antes de adoptar una decisión definitiva sobre la elección de la columna deben tenerse en cuenta la longitud, el diámetro, el tamaño de la partícula, el tamaño del poro y la carga de carbono. Todos los métodos deben validarse y/o verificarse antes de pasar a formar parte de los procedimientos rutinarios. <sup>(8,13)</sup>

**Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):** La identidad de una sustancia puede confirmarse mediante la FTIR. Puede conseguirse la identificación inequívoca de la cocaína a partir de cada espectro único. En el caso del material pulverizado, considerado razonablemente puro a partir de un análisis cromatográfico previo, el espectro infrarrojo del polvo puede introducirse directamente en un disco de KBr para su comparación con los de base libre o sales de clorhidrato. <sup>(7,20)</sup>

**Espectrofotometría ultravioleta (UV):** La cocaína en medio acuoso ácido muestra los siguientes picos de absorción: 233 nm  $\{A (1\% 1 \text{ cm})=430\}$ , 275 nm. <sup>(8,7)</sup>

## 4.1 Validación:

Existen muchas definiciones aceptables sobre validación en base a diferentes autores o instituciones, pero todas con el mismo contexto de interés, algunas provenientes de Normas Mexicanas (NMX), Normas Oficiales Mexicanas (NOM), Organización Internacional de Estandarización (ISO), Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM), las cuales son:



**Cuadro 2**

## 4.2. Cuándo y cómo debe validarse:

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico, aunque todos los métodos deberían ser validados sin importar que este o no en los puntos establecidos en el cuadro 4, debido a que todo método debe proporcionar un resultado verídico.

¿Cuándo  
debe  
validarse?

---

Cuando es desarrollado un nuevo método para un problema específico.

---

Cuando un método normalizado es revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema, por ejemplo: cambio de matriz.

---

Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.

---

Cuando un método es usado en un laboratorio diferente, con instrumentación y analistas diferentes.

---

Para demostrar la equivalencia entre dos métodos.

---

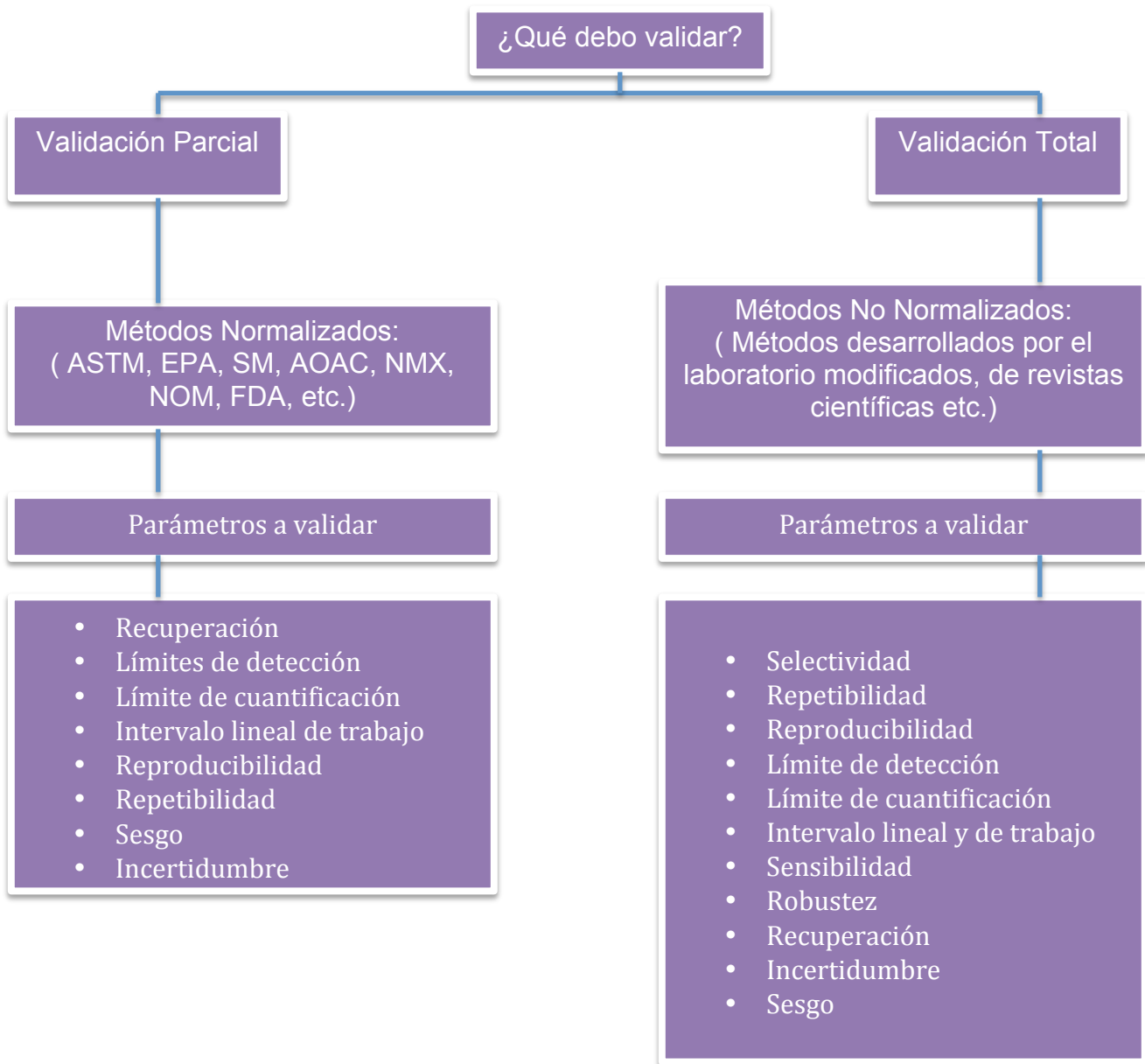
Cuando cambia alguna de sus condiciones, por ejemplo: cambio en la técnica de extracción, cambio de equipo, cambio de disolvente.

---

**Cuadro 3**

Si el método cumple con las causas de validación, entonces es claro que se puede y debe validar, según las exigencias y necesidades del método en cuestión.





**Cuadro 4**

Según el tipo de método ya sea normalizado o no normalizado serán los parámetros a considerar para el desarrollo de la validación. Según el cuadro 4 en el caso de los métodos normalizados cuando se presenta alguna modificación como tipo de matriz, extensión del rango o sistemas de detección, se considerará como método no normalizado para la validación, debido a que al modificar alguno de estos parámetros en el método normalizado se pueden modificar la selectividad, límites de detección y cuantificación, linealidad, precisión y selectividad por lo que es necesario validar todos los parámetros.

### 4.3. Parámetros:

La validación de un método analítico cuantitativo como el realizaremos en el presente proyecto, incluye los siguientes parámetros:

**Selectividad y especificidad:** Se considera selectividad como la habilidad de un método para diferenciar uno o varios analitos en presencia de otros componentes que se sospecha puedan estar presentes en la muestra. Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de degradación, impurezas etc. El método se considera selectivo si ninguno de los blancos u otras sustancias analizadas presenta el mismo tiempo de retención de los analitos de interés.

La especificidad está definida como la habilidad que tiene el método para medir de forma inequívoca los analitos de interés en presencia de otros componentes que pudiesen estar presente en la muestra. <sup>(33)</sup>

**Límite de detección:** Es la mínima concentración o la mínima masa de un analito que se puede detectar y que proporciona una señal igual a la señal del blanco (ySB) más tres veces la desviación estándar del blanco SB. <sup>(33)</sup>

**Precisión:** Es la concordancia mutua entre datos que se han obtenido de la misma forma, e indica la medida del error aleatorio de un análisis. Se divide en repetibilidad y precisión intermedia. <sup>(33)</sup>

**Repetibilidad:** Se refiere a la concordancia de los resultados recolectados por el mismo investigador, los mismos reactivos, laboratorio e instrumento en un corto periodo de tiempo, se evalúa determinando el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD). <sup>(33)</sup>

$$CV \text{ o RSD} = (s/x) * 100$$

S: desviación estándar X: media aritmética.

**Reproducibilidad:** Coincidencia en los resultados entre laboratorios o la coincidencia de los resultados obtenidos por dos analistas diferentes que llevan a cabo el mismo método (como en un estudio colaborativo). <sup>(33)</sup>

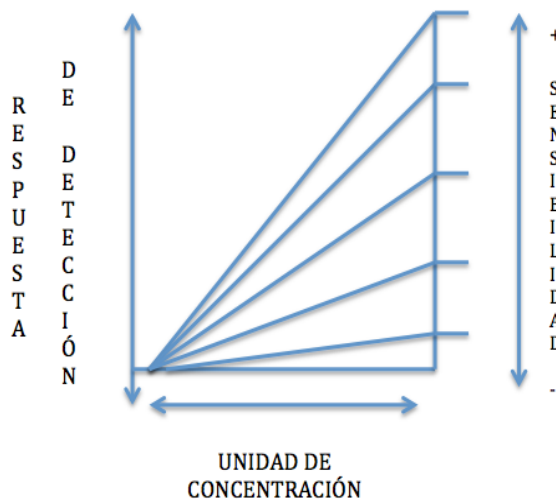
**Límite de cuantificación:** La menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas. <sup>(33)</sup>

**Robustez:** Se refiere a la validez de aplicación del método en las condiciones dadas, así como su reproducibilidad en dichas condiciones. Se dice que un método es robusto, cuando los datos de variabilidad están dentro de los límites establecidos por parámetros como selectividad y precisión. <sup>(33)</sup>

**Intervalo:** El intervalo de un método analítico es la amplitud entre los niveles superior e inferior del analito (incluidos estos niveles) que se demostró que se determinó con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método según se describe en el protocolo. <sup>(33)</sup>

**Linealidad:** La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. <sup>(33)</sup>

**Sensibilidad:** Es la pendiente de la curva de calibración, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del compuesto. Cuando se ha establecido que la respuesta es lineal con respecto a la concentración (o sea, dentro del intervalo lineal del método), la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación. La sensibilidad algunas veces se usa para referirse al límite de detección pero este uso no se acepta generalmente (Figura 8). <sup>(33)</sup>



**Figura 8:** Evaluación de la Sensibilidad

**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 asegurar que tan exitoso ha sido el método para extraer el analito matriz. Una forma de determinar la eficiencia de la extracción es agregar a una matriz porciones prueba con el analito a varias concentraciones. <sup>(33)</sup>

**Incertidumbre:** Parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser atribuidos razonablemente al mesurando. El mesurado: Magnitud sujeta a medida. Se refiere a la concentración del analito o a la propiedad que se determina. <sup>(33)</sup>

**Sesgo:** Es la veracidad de la determinación, lo que anteriormente se conocía como exactitud de las determinaciones y, gráficamente, el sesgo o el error sistemático es la diferencia existente entre el valor "verdadero" y el valor medio de un número de determinaciones que son medidas experimentalmente. <sup>(33)</sup>

## Error sistemático

- Son errores que afectan los resultados en una dirección, ya sea positiva- o negativamente, por lo que causan que los resultados sean elevados o bajos
- Los errores sistemáticos son una medida de **INEXACTITUD**



Figura 9: Definición de error sistemático

### 4.4. Criterio de Horwitz:

Horwitz y Alber comentan que el coeficiente de variación (CV) de Horwitz ha sido propuesto como un valor de referencia para evaluar el desempeño en pruebas interlaboratorio. Cabe destacar que las autoridades regulatorias de la Unión Europea lo han incorporado como criterio de aceptación para métodos de análisis con fines regulatorios.<sup>(34)</sup>

También existen publicaciones recientes de la Asociación Nacional de Autoridades de Prueba (NATA) y la Comisión del Codex Alimentarius que reconoce a la ecuación de Horwitz como un constituyente relevante de la estimación de la incertidumbre de métodos de química analítica.<sup>(34.35)</sup>

En 1980 Horwitz et. al. Exponen que el comportamiento de la dispersión de los resultados en pruebas interlaboratorio puede presentarse en un gráfico del CV expresado en potencia de 2 contra la concentración medida expresada en potencia de 10; según se muestra en la figura 10 y que por su forma fue conocido como la trompeta de horwitz donde el CV es igual al coeficiente de variación expresado en %; C es igual al nivel de concentración del analito expresado en valores adimensionales de masa. Los valores representativos de la figura 10 se muestran en el cuadro 5.<sup>(36)</sup>

Concentración de analito	CV de Horwitz
10%	2.8%
1%	4.0%
0.1%	5.6%
0.01%	8.0%
1ppm	16%
1ppb	45%

Cuadro5: CV de Horwitz para diferentes concentraciones

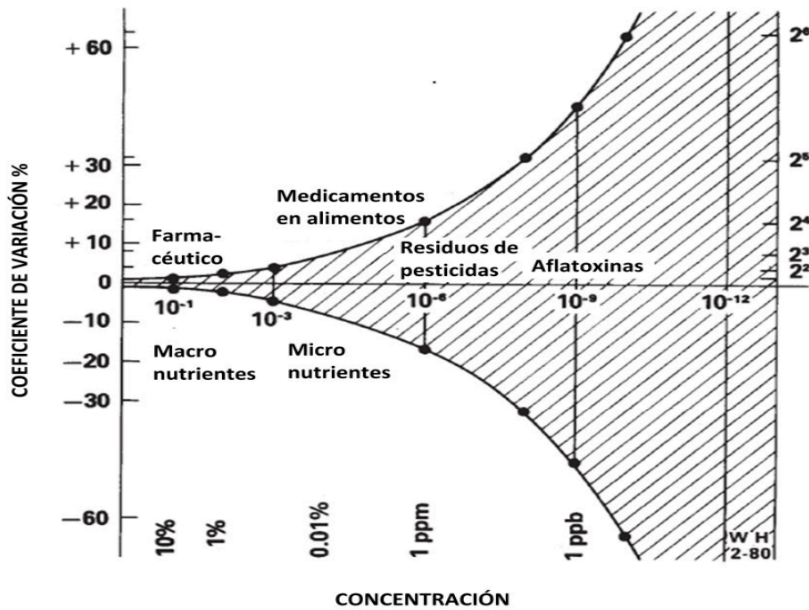


Figura 10. Trompeta de Horwitz

#### 4.5. Importancia de la validación de un método para el análisis de muestras en condiciones postmortem y su aplicación en el ámbito forense:

La validación de un método para el análisis de muestras en condiciones postmortem, toma importancia a raíz de la implementación del nuevo Sistema Penal Acusatorio (2015) ya que; el valor de los resultados analíticos toxicológicos encontrados en el laboratorio sirven de apoyo para establecer posibles causas de muerte. Por estas razones, es muy importante garantizar que estos resultados sean confiables y legalmente defendibles en juicio oral.<sup>(26)</sup> El resultado del dictamen pericial que se le está entregando a la autoridad competente es más completo y con una mayor credibilidad lo que conlleva a estar cada vez más relacionado con la utilización de sistemas de gestión que permitan asegurar una monitorización del control de calidad sobre el trabajo desarrollado, mejorando la prestación de los servicios forenses debido a la reducción de tiempos de repuesta.<sup>(27)</sup>

Logrando así que la metodología sea fácilmente aplicada en la institución por las bondades anteriores y el manejo previo que posee el equipo de GC/MS.

Es importante resaltar que el análisis cromatográfico depende de una cuidadosa toma y preparación de muestras, es decir, lograr la separación del agente tóxico con suficiente pureza y cantidad para permitir que sea caracterizado y cuantificado.<sup>(12)</sup>

En el caso de la cocaína, al ser absorbida pasa a la sangre y se distribuye en todos los órganos, metabolizándose especialmente en el hígado<sup>(28)</sup>. Su eliminación se efectúa por vía renal con varios metabolitos de la ecgonina y con una pequeña cantidad de cocaína libre<sup>(16)</sup>. Por lo anterior se sabe que la muestra idónea sería orina, pero al tener condiciones postmortem es muy poco probable contar con este tipo de matriz, por ello se toma la sangre de la zona craneal, como única muestra, la cual es recolectada por un perito al momento de realizar la necropsia, dicha matriz es colocada en un transfer y se procede a su traslado a laboratorio de química por cadena de custodia para su procesamiento, y emisión de resultados.<sup>(22,25,26)</sup>

## 5. Cromatografía:

La cromatografía comprende un conjunto de técnicas que tienen como finalidad la separación de mezclas basándose en la diferente capacidad de interacción de cada componente en otra sustancia. De forma general, consiste en pasar una fase móvil (una muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto deseado en el disolvente) a través de una fase estacionaria fija sólida. La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado **tiempo de retención**. Cuando el tiempo de retención del compuesto deseado difiere del de los otros componentes de la mezcla, éste se puede separar mediante la separación cromatográfica. <sup>(29, 30)</sup>

### 5.1. Fundamento teórico:

La separación de los diferentes componentes de una mezcla que se encuentran en un líquido o gas es el resultado de las diferentes interacciones de los solutos a medida que se desplazan alrededor o sobre una sustancia líquida o sólida (la fase estacionaria). Las diversas técnicas para la separación de mezclas complejas se fundamentan en la diversidad de afinidades de las sustancias por un medio móvil gas o líquido y un medio absorbente estacionario (papel, gelatina, alúmina o sílice) a través del cual circulan. <sup>(20,30)</sup>

### 5.2. Detectores:

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna.

Las características de un detector ideal son:

- Sensibilidad, es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre  $10^{-8}$  y  $10^{-15}$  g/s de analito.
- Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud.
- Tiempo de respuesta corto, independiente del caudal de salida.
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos  $350-400$  °C, temperaturas típicas trabajo.



Figura 11. Detector

- Estabilidad y reproducibilidad, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo, o a prueba de operadores inexpertos.
- Respuesta semejante para todos los analitos, o
- Respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de analitos.

Algunos tipos de detectores:

- Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector).
- Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector).
- Detector termoiónico (TID, Thermionic Detector).
- Detector de captura de electrones (ECD, Electrón-Capture Detector).
- Detector de emisión atómica (AED, Atomic Emission Detector).

Otros detectores minoritarios son el detector fotométrico de llama (PFD), empleado en compuestos como pesticidas e hidrocarburos que contengan fósforo o azufre. En este detector se hace pasar el gas eluido por una llama hidrógeno/oxígeno donde parte del fósforo se convierte en una especie  $\text{HPO}$ , la cual emite a  $\lambda = 510$  y  $526$  nm, y simultáneamente el azufre se convierte en  $\text{S}_2$ , con emisión a  $\lambda = 394$  nm. Dicha radiación emitida se detecta con un fotómetro adecuado. Se han podido detectar otros elementos, como algunos halógenos, nitrógeno, estaño, germanio y otros.

En el detector de fotoionización (PID), el gas eluido al final de la columna se somete a una radiación ultravioleta con energías entre 8,3 y 11,7 eV, correspondiente a una  $\lambda = 106$ -149 nm. Mediante la aplicación de un potencial a la celda de ionización se genera una corriente de iones, la cual es amplificada y registrada.<sup>(31.8)</sup>

### 5.3. Cromatografía de gases:

La cromatografía de gases fue la técnica cromatográfica desarrollada hace no mucho tiempo, se empleó inicialmente para compuestos volátiles que no se descompusieran al calentarse, pero ahora se ha extendido incluso a polímeros que al calentarse producen monómeros volátiles.<sup>(6)</sup>

Su rapidez y buena resolución se han aplicado al análisis de mezclas complejas de hidrocarburos, pesticidas en suelo y productos vegetales, drogas en sangre, disolventes de uso industrial y sustancias tóxicas derivadas de los pesticidas, que se consideran contaminantes ambientales, aromas, saborizantes, fragancias y en las ciencias forenses.

Para una exitosa aplicación de la técnica cromatográfica se requiere una cuidadosa selección de las columnas cromatográficas empleadas. Se podría generalizar diciendo que las columnas y detectores en cromatografía de gases son muy específicos y se cuenta con la ventaja de emplear volúmenes muy pequeños por lo mismo. Sin embargo se debe recordar que las columnas capilares en cromatografía de gases tiene mayor número de platos teóricos por lo que la separación es mas eficiente.

En este tipo de cromatografía, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, esto implica que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable.

La elución se produce por el flujo de un gas inerte, como He, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, aunque de acuerdo con el tipo de detector es necesario emplear gases específicos.

La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre las fases.

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

Existen tres técnicas básicas de inyección de muestras (líquidas o gaseosas) en columnas capilares: split, split-less y on column. Las dos primeras consisten en inyectar y vaporizar la muestra en una cámara de vaporización. El sistema split desvía la mayor parte de la muestra fuera del sistema cromatográfico y envía sólo una pequeña fracción a la columna. El método split-less dirige toda la muestra a la columna, por lo que resulta más adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles. La inyección on-column se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los compuestos termolábiles. <sup>(4,5,29)</sup>

#### **5.4. Espectrometría de masas:**

La espectrometría de masas, es una técnica de análisis cualitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría.

Ante todo, se debe establecer que la espectrometría de masas, tiene muy poco en común con las técnicas clásicas de espectrofotometría, ya que, en sentido estricto, no es propiamente un método espectroscópico (desde el punto de vista clásico, un espectro es una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la emisión o absorción de una radiación con la energía de dicha radiación); en la espectrometría de masas, no se utiliza ningún tipo de radiación, por lo que básicamente, no puede ser considerada como una técnica espectroscópica.

Otra diferencia esencial que presenta la espectrometría de masas con las espectroscopias clásicas, es que en estos últimos métodos, los procesos que se originan son puramente físicos, no destructivos, de forma que la muestra utilizada para la obtención del espectro no se modifica químicamente y se puede volver a recuperar; en contraste, en la



espectrometría de masas, durante la obtención del espectro tienen lugar procesos químicos, con lo que la muestra utilizada se destruye y no puede recuperarse; este hecho no es un inconveniente grave, ya que la cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas, es pequeñísima (del orden del  $\mu\text{g}$ ).

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

Como ya se ha mencionado, los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas, son de naturaleza química; en consecuencia, la presencia y abundancia en el espectro de determina dos tipos de iones, identificables a partir de su masa, sea función de la estructura química de cada compuesto; la información ofrecida por un espectro de masas es, de alguna forma, comparable a la obtenida mediante una gran cantidad de reacciones de las utilizadas para la determinación de estructuras por vía química, por lo que la espectrometría de masas puede ofrecer una enorme cantidad de información sobre un compuesto determinado. <sup>(29,4,5)</sup>

### **5.5. Acoplamiento, cromatografía de gases-espectrometría de masas (Figura1):**

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes 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 no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analizan muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no permite identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo considerablemente a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica

sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado.

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR ("selected ion recording").

En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias. <sup>(5,4)</sup>



**Figura 12**

## 5.6. Extracción:

La extracción es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interface. La relación de las concentraciones de dicha sustancia en cada uno de los disolventes, a una temperatura determinada, es constante. Esta constante se denomina coeficiente de reparto y puede expresarse como:

$$K = \frac{[sustancia]_1}{[sustancia]_2}$$

donde **[sustancia]<sub>1</sub>** es la concentración de la sustancia que se pretende extraer, en el primer disolvente y, análogamente **[sustancia]<sub>2</sub>** la concentración de la misma sustancia en el otro disolvente.

Si se tiene una sustancia soluble en un disolvente, pero más soluble en un segundo disolvente no miscible con el anterior, puede extraerse del primero, añadiéndole el segundo, agitando la mezcla, y separando las dos fases.

La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla o de una fuente natural, también puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente.

Este método permite separar el producto que se desea y dejar en la mezcla los productos secundarios o bien extrae los productos secundarios y dejar el principal. Para lo cual hay que tener en cuenta la regla de solubilidad que dice “Lo semejante disuelve a los semejante”, es decir que los solutos polares solo pueden disolverse en disolventes polares y los no polares en disolventes no polares.

#### **5.6.1. Tipos de extracción:**

*Extracción Líquido-Líquido:*

##### **Extracción Líquido – Líquido Simple**

Consiste en la transferencia de una sustancia de una fase a otra, llevándose a cabo entre dos líquidos inmiscibles. Las dos fases líquidas de una extracción son la Fase Acuosa y la Fase Orgánica.

##### **Extracción líquido-líquido continua**

La extracción líquido-líquido simple, que es el procedimiento de extracción más utilizado en el laboratorio químico, se suele utilizar siempre que el reparto del compuesto a extraer en el disolvente de extracción es suficientemente favorable. Cuando eso no es así, y la solubilidad del compuesto a extraer en los disolventes de extracción habituales no es muy elevada se suele utilizar otro procedimiento que implica una extracción continua de la fase inicial (normalmente una fase acuosa) con porciones nuevas del disolvente orgánico de extracción. Para evitar utilizar grandes volúmenes de disolvente de extracción, el proceso se hace en un sistema cerrado en el que el disolvente de extracción se calienta en un matraz y los vapores del disolvente se hacen condensar en un refrigerante colocado sobre un tubo o cámara de extracción que contiene la disolución acuosa a extraer. El disolvente condensado caliente se hace pasar a través de la disolución acuosa, para llegar finalmente, con parte del producto extraído, al matraz inicial, donde el disolvente orgánico se vuelve a vaporizar, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz.

*Extracción sólido-líquido*

##### **Extracción sólido-líquido discontinua**

La separación de una mezcla de compuestos sólidos también se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En

el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, podemos hacer una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en un vaso de precipitados, un matraz o una cápsula de porcelana, en frío o en caliente, agitar o triturar con ayuda de una varilla de vidrio y separar por filtración la disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble que contiene las impurezas. Si, al contrario, lo que se pretende es disolver las impurezas de la mezcla sólida, dejando el producto deseado como fracción insoluble, el proceso, en lugar de extracción, se denomina lavado.

### Extracción sólido-líquido continua

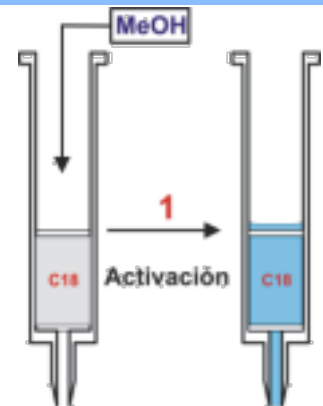
La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la comentada para la extracción líquido-líquido continua, basada en la maceración con disolvente orgánico, previamente vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante, de la mezcla sólida a extraer contenida dentro de un cartucho o bolsa de celulosa que se coloca en la cámara de extracción. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz.

### 5.7. Extracción en fase sólida <sup>(Cuadro6)</sup>:

La extracción en Fase Sólida (SPE) es una potente y simple técnica de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica. Una columna SPE consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. SPE permite la pre concentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen.

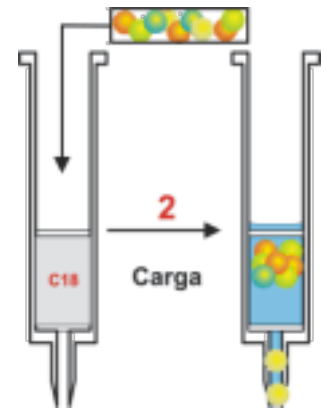
La Extracción en Fase Sólida (SPE) sigue siendo el procedimiento de preparación de muestras de crecimiento más rápido. Es la técnica más usual en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis por HPLC, HPLC/MS, GC o GCMS. <sup>(7)</sup>

Esquema del Procedimiento General en SPE <span style="float: right;">(Cuadro6)</span>	
<p><b>1. Etapa de Acondicionamiento</b></p>	<p>La activación del adsorbente y de los grupos funcionales se consigue al pasar un volumen de solvente o mezcla de solventes apropiado a través de la columna. Los discos fritados de la columna se solvatan convenientemente. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno. Se recomienda usar de 2 a 4 volúmenes de lecho.</p>



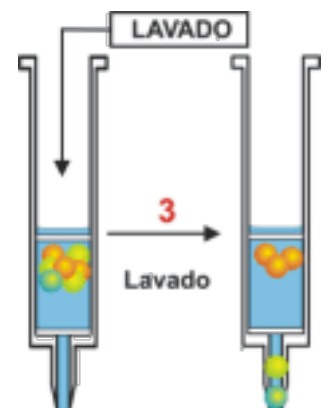
## 2. Etapa de Carga de Muestra

Aplicar la muestra en la parte superior del lecho de adsorbente. Los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Para obtener la máxima eficacia se debe controlar el caudal de la muestra. Si se desea incrementar el caudal de una muestra viscosa se pueden usar adsorbentes de 90 o 140 mm. La capacidad de intercambio y la selectividad no se ven afectadas (conviene analizar la fracción no retenida para comprobar que todos los compuestos de interés han sido retenidos).



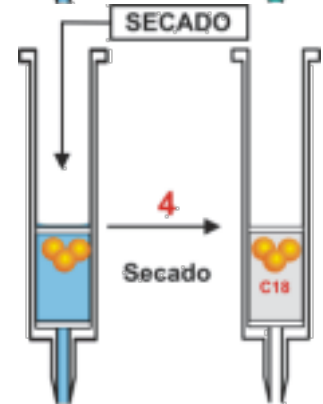
## 3. Etapa de Lavado

El lavado permite la eliminación de cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar disolventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.



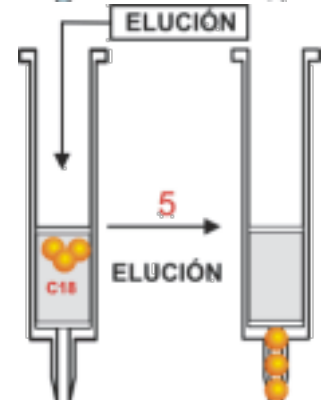
## 4. Etapa de Secado

Las trazas de solvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2 a 10 minutos. Esta etapa mejora el rendimiento de extracción.



## 5. Etapa de Elución

Se pasa un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración.



**(Los adsorbentes con partículas pequeñas**

**de 30 a 50 mm requieren un menor volumen de elución que los adsorbentes con partículas mayores entre 90 y 140mm).**

## **6. Etapa de Concentración**

Los compuestos de interés se concentran evaporando una parte del disolvente. Es necesario secar el eluato con sulfato de sodio para eliminar posibles trazas de agua. La muestra concentrada ya está lista para el análisis.

El Volumen de Lecho se define como la cantidad mínima de solvente necesaria para humedecer una cantidad definida de adsorbente en la columna. Depende de la naturaleza del adsorbente y es aproximadamente de 120 mL para 100mg o 500 mL para 500mg de SiO<sub>2</sub> de 60 Å.

## **Definición de Volumen de Lecho**

**(Si la masa de adsorbente es demasiado grande frente al volumen de solvente se puede causar una elución incompleta. Se puede causar una retención incompleta de los compuestos de interés en el caso contrario)**

### **Selección del Adsorbente**

**(Cuadro7)**

En fase reversa, los grupos funcionales no polares del adsorbente actúan según las fuerzas de Van der Waals. Las cadenas alquílicas y aromáticas son grupos funcionales que muestran afinidad con compuestos de polaridad media y baja.

## **Adsorbentes Hidrofóbicos**

Los grupos silanoles libres del adsorbente favorecen las interacciones polares.

Se recomienda el uso de la selectividad fenilo (polímeros tipo poliestireno divinilbenceno) para compuestos aromáticos, como es el caso de muchos productos de uso farmacéutico.

## **Adsorbentes Hidrofilicos**

Las fases normales permiten una limpieza eficiente de moléculas con grupos polares. Los grupos funcionales ciano (CN) pueden usarse tanto en fase normal para extraer compuestos polares como en fase reversa para la extracción de compuestos de polaridad media.

Los grupos funcionales DIOL pueden mejorar la extracción de compuestos polares frente a SiO<sub>2</sub>.

Los adsorbentes amino (NH<sub>2</sub>) pueden usarse tanto como intercambiadores de aniones débiles (para ácidos fuertes), o como adsorbente polar que puede interactuar con OH, NH, SH...

La retención de intercambio iónico se basa en la interacción iónica. Este adsorbente crea una fuerte atracción con los grupos funcionales opuestos de los compuestos de la muestra que depende esencialmente del PH del contra-ión y de la fuerza iónica.

Las fases de intercambio aniónico fuerte (SAX) contienen una fuerte amina cuaternaria. Se usan para la extracción de ácidos débiles con una o más cargas negativas.

### **Adsorbentes de Intercambio**

Las fases de intercambio catiónico fuerte (SCX) contienen un grupo sulfónico y se usan para la extracción de compuestos débilmente básicos con una o más cargas positivas.

Las fase de intercambio aniónico débil (DEAE, NH<sub>2</sub>) contienen un grupo dietilamino o amino. Se usan para la extracción de ácidos fuertes con una o más cargas negativas.

Las fase de intercambio catiónico débil (WCX) contienen un grupo carboxílico y se usan para la extracción de compuestos fuertemente básicos con una o más cargas positivas.

### **Adsorbentes Mixtos**

Los adsorbentes mixtos muestran la máxima selectividad. Las cadenas de intercambio iónico e hidrofóbicas químicamente ligadas a la sílice ofrecen una selectividad única. Esta técnica se usa para la extracción de compuestos básicos, especialmente drogas y metabolitos, en fluidos biológicos. Los compuestos que tengan funcionalidad ácida o básica son retenidos por la función de intercambio. Una etapa de lavado con un pH adecuado permite eliminar las impurezas ionizables. Una etapa de lavado con solvente orgánico elimina las impurezas retenidas por interacción hidrofóbica.

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Debido a la implementación del nuevo Sistema Penal Acusatorio, la exigencia en lo referente a la calidad de las pruebas realizadas por las instituciones que cumplan funciones de investigación ha aumentado. Por ello la validación de los métodos empleados para realizar dichas pruebas es vital.

Es importante mencionar que la cuantificación de metabolitos de cocaína o de cualquier otra droga para identificar el uso constante de alguna sustancia en personas involucradas en la comisión de un delito plantea una serie de desafíos cuando no se dispone de orina, cabello u otra matriz biológica y la sangre se convierte en el principal fluido para identificar esta droga. Si se adjunta el hecho de trabajar con sangre bajo condiciones postmortem, el problema es aun mayor. Por lo anterior, contar con análisis confiables que permitan evidenciar el consumo de estas sustancias y sirvan de apoyo en la lucha contra esta problemática es indispensable.



## **7. OBJETIVOS:**

### **7.1. Objetivo general**

Validar un método para la determinación postmortem de benzoilecgonina en sangre empleando microextracción en fase sólida para su posterior identificación por cromatógrafo de gases y espectrometría de masas.

### **7.2. Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones óptimas de separación cromatográfica para la identificación de la benzoilecgonina.
- Establecer las condiciones óptimas para la extracción en fase sólida de la benzoilecgonina.
- Determinar el límite de detección, el límite de cuantificación, linealidad y sensibilidad.
- Determinar precisión y recuperación.

## **8. Hipótesis:**

Es posible la identificación en sangre postmortem de la benzoilecgonina, principal metabolito de la cocaína y cuyas propiedades químicas hacen viable su separación por fase sólida, mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

## 9. METODOLOGÍA

El presente proyecto se realizó en dos etapas consistentes en:

- I. Validación del método:
- II. Evaluación del método

### 9.1. Especificaciones de la validación del método:

En el caso de la validación no se cuenta con población objetivo, población de estudio, criterios de inclusión o exclusión ya que esta parte se realizó única y exclusivamente con un estándar de benzoilecgonina certificado. <sup>(ver anexo 7)</sup>

### 9.2. Evaluación del método:

Esta parte se realizó después de la validación de método la cual se puede observar en el punto 12 pero se cita aquí ya que estas son las especificaciones necesarias para realizar dicha evaluación del método desarrollado y validado.

#### 9.2.1. Población objetivo:

- Muestras de sangre obtenidas de cadáveres que ingresaron al instituto de ciencias forenses (INCIFO) en un lapso comprendido de (fecha)

#### 9.2.2. Población de estudio:

- Occisos femeninos y masculinos

#### 9.2.3. Criterios de inclusión:

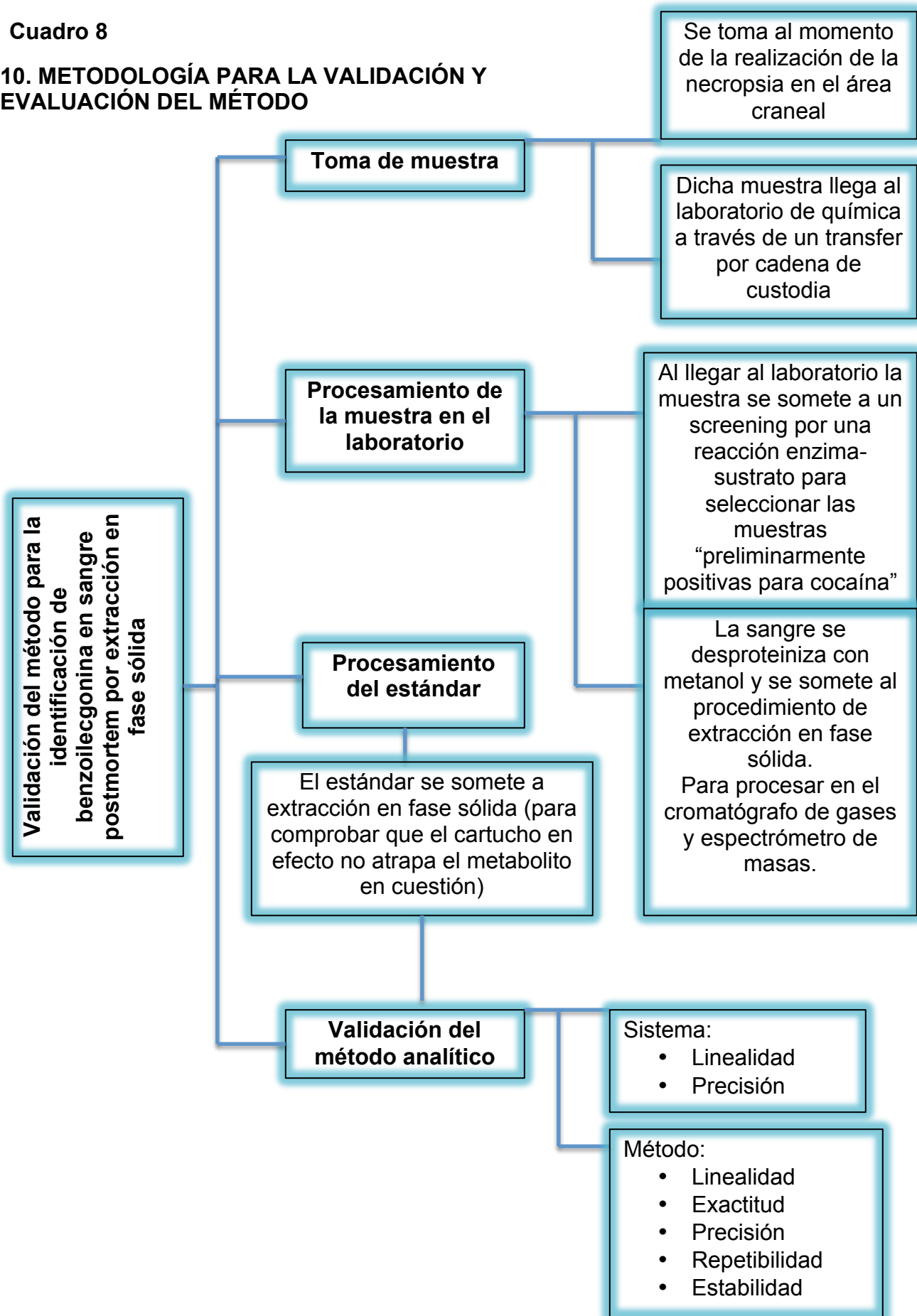
- Occisos con muestras positivas para cocaína
- Matriz biológica, sangre

#### 9.2.4. Criterios de exclusión:

- Occisos con muestras negativas para cocaína
- Otro tipo de matriz biológica

Cuadro 8

### 10. METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DEL MÉTODO



## 10.1. Procedimiento de extracción en fase sólida que se llevo a cabo para la evaluación del método:

### Muestra:

- 2 ml de sangre
- 4 ml de metanol
- Centrifugar 5 min. a 1000 rpm

### Desproteínizar muestra

### Cartucho:

- 2 ml de metanol
- 2 ml de buffer de fosfatos pH:6

### Acondicionamiento/activación

- Agregar la muestra:
- Sobrenadante

### Carga de muestra

- 6 ml de agua des ionizada
- 3 ml de acido acético 1M

### Lavado

- Secar por 5 min. sin vacío

### Secado

- 6 ml de metanol

### Elución

### *Cambiar tubo de centrifuga por tubo de vidrio*

- 2 ml de DIA

### Etapa de concentración

- Llevar a sequedad con nitrógeno a 40°C con ayuda de una baño calefactor para tubos.
- Agregar 40 µl de derivatizante TMS
- Incubar a 60°C

## 10.2. Procedimiento de extracción en fase sólida que se llevo a cabo para la validación del método:

Muestra:

- Estándar certificado

Cartucho:

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 2 ml de metanol</li><li>• 2 ml de buffer de fosfatos pH 6</li></ul>   | <b>Acondicionamiento/activación</b> |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Agregar la muestra:</li></ul>   | <b>Carga de muestra</b>             |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 6 ml de agua desionizada</li><li>• 3 ml de acido acético 1M</li></ul> | <b>Lavado</b>                       |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Secar por 5 min. sin vacío</li></ul>                                  | <b>Secado</b>                       |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 6 ml de metanol</li></ul>   | <b>Elución</b>                      |

***Cambiar tubo de centrifuga por tubo de vidrio***

- 2 ml de DIA

Etapa de concentración

- Llevar a sequedad con nitrógeno a 40°C con ayuda de una baño calefactor para tubos.
- Agregar 40 µl de derivatizante TMS
- Incubar a 60°C

### 10.3. EQUIPO Y MATERIAL

#### 10.3.1. Equipo:

- Cromatógrafo de gases. Agilent Technologies® 6890N Network GC System Detector de Masas (Cuadrupolo) Agilent 5973 MSD Columna disponible DB5-MS (30MX0.25MMXO.25µm) Inyector: Split/splitless, Purga y trampa (Teledyne Tekmar®) con software para data análisis e instrumento.
- Centrifuga Aparatos Científicos Solbat® análoga para 12 tubos.
- Bomba de vacío EASY/ VAG® con válvulas.
- Vortex 3 000 rpm Labnet® vx100 Touch
- Baño calefactor para tubos de ensaye LAB-LINE®
- Dispensador de Nitrógeno
- Estufa de laboratorio UltraClean®
- Manifold J.T. Baker®

#### 10.3.2. Material:

- Pipetas graduadas Kimax®:
  - \*4 de 5 ml
  - \*2 de 10 ml
- Micropipetas Science Med®:
  - \*1 de 10-100 µl
  - \*1 de 100-1000 µl
  - \*1 de 1000-5000 µl
- Tubos para centrifuga Axygen® de 12 ml
- Cartuchos para extracción en fase sólida Varian® Blond Elut Certify
- Viales Agilent® de 2 ml
- Tapones con septa Agilent®
- Septas Agilent®
- Insertos para viales Agilent®

#### 10.3.3. Disoluciones:

- Buffer de fosfatos pH 6
- Acido acético 1M
- DIA: Diclorometano, isopropanol, amoniaco

#### 10.3.4. Reactivos:

- Ácido acético glacial Merck® Grado Reactivo
- Metanol J.T. Baker® Grado cromatográfico
- Diclorometano E.M. Science® Grado cromatográfico
- Amoniaco Merck® Grado reactivo
- Isopropanol Merck® Grado reactivo
- Agua desionizada Reasol® Grado reactivo
- Fosfato de potasio Merck® Grado reactivo
- Hidróxido de Sodio Merck® Grado Reactivo
- Nitrógeno Infra®
- Derivatizante-TMS (Trimethylchlorosilane, BSTFA) Supelco®

#### **10.3.5. Muestra:**

- Sangre Total
- Estándar de benzoilecgonina 10 µg / µl

#### **10.4. Elaboración de disoluciones:**

Buffer de fosfatos pH 6:

- 13.6 g de fosfato de Potasio
- 1 L de agua desionizada
- .56 g de Hidróxido de Sodio

Acido acético 1M:

- 5.71 ml para 100 ml de agua desionizada

DIA:

- 8 ml de diclorometano
- 2 ml de isopropanol
- 0.2 ml de amoniaco

Sangre desproteinizada:

- 2 ml de sangre
- 4 ml de metanol

## **12. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN**



A continuación se muestran y describen los resultados obtenidos en los parámetros siguientes del método evaluado:

**11.1. Recuperación:** Se analizaron 10 muestras de control a 3 concentraciones conocidas y se determina el porcentaje de recuperación a fin de evaluar la exactitud del método.

<b>Concentración 1: 0.400 ppm</b>			
No.	Concentración Teórica ppm	Concentración Obtenida ppm	%R
1	0.400	0.400	100.00
2	0.400	0.400	100.00
3	0.400	0.400	100.00
4	0.400	0.401	100.25
5	0.400	0.399	99.75
6	0.400	0.400	100.00
7	0.400	0.399	99.75
8	0.400	0.401	100.25
9	0.400	0.401	100.25
10	0.400	0.400	100.00
			<b>Promedio: 100.03</b>

Tabla 1

<b>Concentración 2: 0.120 ppm</b>			
No.	Concentración Teórica ppm	Concentración Obtenida ppm	%R
1	0.120	0.119	99.17
2	0.120	0.120	100.00
3	0.120	0.120	100.00
4	0.120	0.119	99.17
5	0.120	0.120	100.00
6	0.120	0.119	99.17
7	0.120	0.120	100.00
8	0.120	0.120	100.00
9	0.120	0.120	100.00
10	0.120	0.118	98.33
			<b>Promedio: 99.58</b>

Tabla 2

<b>Concentración 3: 0.030 ppm</b>			
No.	Concentración Teórica ppm	Concentración Obtenida ppm	%R
1	0.030	0.035	116.67
2	0.030	0.030	100.00
3	0.030	0.035	116.67
4	0.030	0.038	126.67
5	0.030	0.037	123.33
6	0.030	0.036	120.00
7	0.030	0.028	93.33
8	0.030	0.030	100.00
9	0.030	0.035	116.67
10	0.030	0.035	116.67
			<b>Promedio: 113.00</b>

Tabla 3

**Criterio de aceptación:**

Concentración	Límites de recobro
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0.03 µg/g (ppm)	90-118%
0.1 µg/g (ppm)	85-110%
0.4 µg/g (ppm)	75-118%
10 µg/g (ppm)	70-125%

Tabla 4

**CUMPLE**

**11.2. Límite de detección del método:** Se analizaron 10 blancos fortificados y cuantificaron.

No.	Concentración de blancos mg / L
1	0.010
2	0.009
3	0.008
4	0.007
5	0.006
6	0.005
7	0.004
8	0.003
9	0.002
10	0.001

Desviación estándar: 0.0030  
 $X_0 = 0.0055$   
 $X_0 = 0.006$   
L.D.M. =  $X_0 + 3*s$   
L.D.M. = 0.0146

Tabla 5

**Criterio de aceptación:** El valor obtenido debe ser menor que el límite de cuantificación.

**CUMPLE**

**11.3. Límite de cuantificación del método**

$$L.C.M. = X_0 + 10*s$$

$$L.C.M. = 0.0358$$

**Criterio de aceptación:** El valor obtenido debe ser menor que el primer punto de calibración.

**CUMPLE**

**11.4. Límite práctico de cuantificación del método:** Se analizaron 10 estándares preparados a una concentración cercana al límite de cuantificación del método

No.	Concentración Teórica ppm	Concentración Obtenida ppm	%R
1	0.090	0.090	100.00
2	0.090	0.090	100.00
3	0.090	0.090	100.00
4	0.090	0.089	98.89
5	0.090	0.091	101.11
6	0.090	0.090	100.00
7	0.090	0.090	100.00
8	0.090	0.089	98.89
9	0.090	0.089	98.89
10	0.090	0.090	100.00
			<b>Promedio: 98.78</b>
			<b>Desviación estándar: 0.7027</b>

Tabla 6

**Criterio de aceptación:**

Concentración	Límites de recobro
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0.03 µg/g (ppm)	90-118%
0.09 µg/g (ppm)	87-109%
0.1 µg/g (ppm)	85-110%
0.4 µg/g (ppm)	75-118%
10 µg/g (ppm)	70-125%

Tabla 7

**CUMPLE**

**11.4.1. Precisión en el límite práctico de cuantificación o cantidad mínima cuantificable**

Valor más grande obtenido	Valor más pequeño obtenido
0.919	0.890

*Datos provenientes de la serie de datos del punto 12.4*

$$(Y_{i1}-Y_{i2})^2= 0.0000$$

$$[(Y_{i1}-Y_{i2})^2/(2\sigma_r^2)]= 0.0000$$

**Criterio de aceptación: se debe cumplir con la siguiente ecuación**

$$[(Y_{i1}-Y_{i2})^2/(2\sigma_r^2)] \leq X^2_{(1-a)(v)}$$

Donde:

$(Y_{i1}-Y_{i2})^2$ = Rango de los valores al cuadrado.  
 $\sigma_r$ = Desviación estándar de la repetibilidad  
 $X^2_{(1-a)(v)}$ = Valor de tablas

De tablas se toma el valor de  $X^2$

$X^2_{(95\%)(n-1)}$ = 16.9190  
 $a$ = 0.05  
 $v$ = n-1  
 $n$ = 10  
 $v$ = 9

$$[(Y_{i1}-Y_{i2})^2/(2\sigma_r^2)] \leq X^2_{(1-a)(v)}$$

$$0.0000 \leq 16.9190$$

**CUMPLE**

**11.5. Intervalo lineal:** Se preparó una curva de calibración con 6 niveles de concentración, cada punto se leyó tres veces, de igual modo se evaluaron los residuales.

Curva de Calibración					
Estándar No.	Concentración mg/L	Respuesta del instrumento	Respuesta del instrumento	Respuesta del instrumento	Promedio
1	0.03	17076	25678	22167	21640.33333
2	0.04	30789	20985	20189	23987.66667
3	0.05	33897	35678	32037	33870.66667
4	0.06	29986	41556	41474	42005.33333
5	0.08	59687	58196	59872	59251.66667
6	0.1	76800	75908	78969	77225.66667

Tabla 8

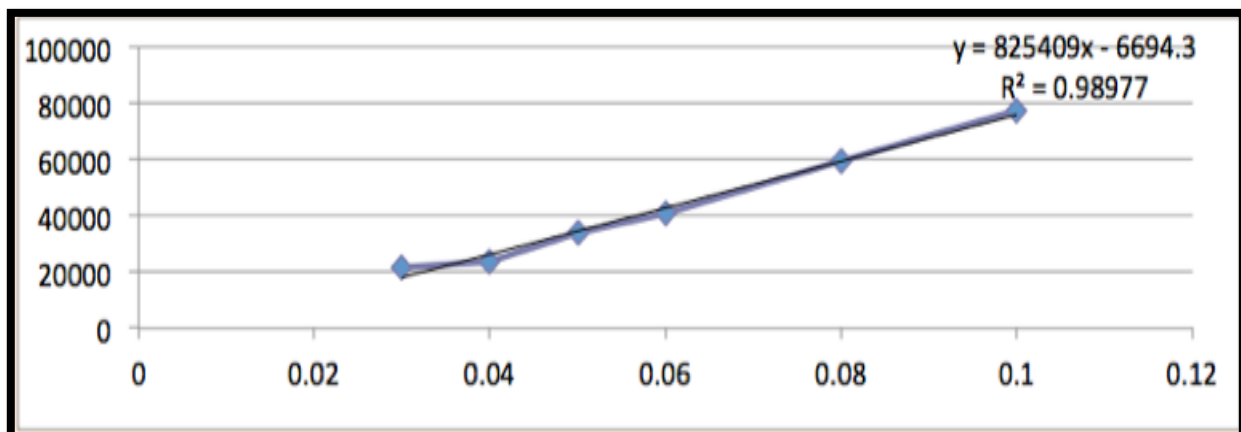


Gráfico 1

**Criterio de aceptación:** Se toma en cuenta en cuenta el coeficiente de correlación considerar:  $r \geq 0.99$  o también de puede evaluar con ayuda del calculo de residuales:

<b>m=</b>	<b>646063</b>
<b>b=</b>	<b>4731.6</b>
<b>r<sup>2</sup>=</b>	<b>0.99589</b>

Respuesta del instrumento (Promedio)	Concentración calculada	Concentración mg/L	Residuales
21640.33333	0.0262	0.03	0.0038
23987.66667	0.0298	0.04	0.0102
33870.66667	0.0451	0.05	0.0049
42005.33333	0.0561	0.06	0.0039
59251.66667	0.0844	0.08	-0.0044
77225.66667	0.1122	0.1	-0.0122

Tabla 9

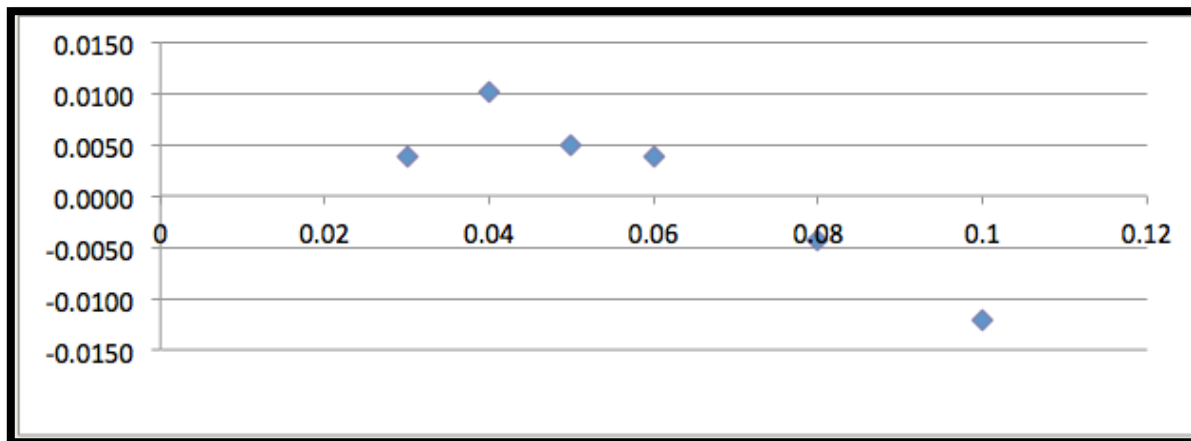


Gráfico 2

**Criterio de aceptación:** El gráfico de residuales debe mostrar datos dispersos, en el caso de que haya tendencias o datos alineados significa que no hay linealidad y se debe repetir este proceso.

**CUMPLE**

### 11.6. Intervalo de trabajo

Definido de acuerdo a la función de la aplicación, el intervalo de trabajo para este método es: 0.03 mg/L ----- 0.400 mg/L

**11.7. Repetibilidad:** Se analizaron 10 estándares a dos niveles bajo y alto, el mismo día, se consideraron periodos de tiempo cortos realizados por el mismo analista, realizando las mediciones a partir de preparaciones independientes.

<b>NIVEL 1</b>	<b>Concentración Teórica mg/L</b>	<b>0.05</b>
----------------	---------------------------------------	-------------

<b>No.</b>	<b>Concentración Obtenida mg/L</b>
1	0.0500
2	0.0400
3	0.0500
4	0.0400
5	0.0400
6	0.0500
7	0.0500
8	0.0500
9	0.0600
10	0.0500
<b>Promedio: 0.05</b> <b><math>\sigma_r = 0.0063</math></b>	

Tabla 10

Se evalúa mediante  $\chi^2$ , según lo establecido en la NMX-CH-5725-6-IMNC-2006

<b>Valor más grande obtenido</b>	<b>Valor más pequeño obtenido</b>
<b>0.0600</b>	<b>0.0400</b>

$$(Y_{11}-Y_{12})^2 = 0.0004$$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2 / (2\sigma_r^2)] = 5.0000$$

**Criterio de aceptación: Se debe cumplir la siguiente ecuación**

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2 / (2\sigma_r^2)] \leq \chi^2_{(1-a)(v)}$$

donde:

- $(Y_{11}-Y_{12})^2 =$  rango de los valores al cuadrado
- $\sigma_r =$  desviación estándar de la repetibilidad
- $\chi^2_{(1-a)(v)} =$  Valor de tablas

De tablas se toma el valor de  $\chi^2$

$$\begin{aligned} \chi^2_{(95\%)(n-1)} &= 16.9190 \\ a &= 0.05 \\ v &= n-1 \\ n &= 10 \\ v &= 9 \end{aligned}$$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_r^2)] \leq \chi^2_{(1-a)(v)}$$

$$5.0000 \leq 16.9190$$

**CUMPLE**

<b>NIVEL 2</b>	<b>Concentración Teórica mg/L</b>	<b>0.4</b>
----------------	---------------------------------------	------------

<b>No.</b>	<b>Concentración Obtenida mg/L</b>
1	0.4000
2	0.3990
3	0.4000
4	0.4010
5	0.3990
6	0.4010
7	0.4000
8	0.4000
9	0.4000
10	0.4000
<b>Promedio: 0.40</b> <b><math>\sigma_r = 0.0007</math></b>	

Tabla 11

Se evalúa mediante  $\chi^2$ , según lo establecido en la NMX-CH-5725-6-IMNC-2006

<b>Valor más grande obtenido</b>	<b>Valor más pequeño obtenido</b>
<b>0.4010</b>	<b>0.3990</b>

$$(Y_{11}-Y_{12})^2 = 0.0000$$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_r^2)] = 4.5000$$

**Criterio de aceptación: Se debe cumplir la siguiente ecuación**

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_r^2)] \leq \chi^2_{(1-a)(v)}$$

donde:

$(Y_{11}-Y_{12})^2=$  rango de los valores al cuadrado  
 $\sigma_r=$  desviación estándar de la repetibilidad  
 $X^2_{(1-a)(v)}=$  Valor de tablas

*De tablas se toma el valor de  $X^2$*

$$X^2_{(95\%)(n-1)}= 16.9189776$$

$$a= 0.05$$

$$v= n-1$$

$$n= 10$$

$$v= 9$$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_r^2)] \leq X^2_{(1-a)(v)}$$
$$4.5000 \leq 16.9190$$

**CUMPLE**

**Calculo de la desviación estándar ponderada (sp):**

$$n= 10$$

$$n-1= 9$$

$$sp= 0.0045$$

**Evaluación de la repetibilidad según el criterio de Horwitz:**

$$\text{Criterio de aceptación: } \%RSD_r = \%RSD_R * 0.67$$

Donde:

$$\%RSD_R= 12.8247294$$

$$\%RSD_{r \text{ exp}}= sp / \text{media} * 100$$

$$\text{Criterio de aceptación } \%RSD_r= 8.5926$$

**Calculo con los datos experimentales:**

$$\%RSD_{r \text{ exp}}= 2.0076$$

$$\%RSD_{r \text{ exp}} < \%RSD_r$$
$$2.0076 < 8.5926$$

**CUMPLE**



**11.8. Reproducibilidad:** Se compararon los resultados obtenidos por dos analistas, evaluando dos niveles diferentes a alta y baja concentración.

Nivel 1	Concentración teórica	0.4
<b>Analista 1: Xochiquetzal</b>		
No.	Concentración obtenida mg/L	
1	0.401	
2	0.400	
3	0.400	
4	0.400	
5	0.399	
6	0.400	
7	0.400	
8	0.400	
9	0.401	
10	0.398	
<b>Promedio: 0.400</b> <b><math>\sigma_1 = 0.0009</math></b>		

Tabla 12

Nivel 1	Concentración teórica	0.4
<b>Analista 2: José Luis</b>		
No.	Concentración obtenida mg/L	
1	0.400	
2	0.400	
3	0.400	
4	0.400	
5	0.399	
6	0.399	
7	0.401	
8	0.401	
9	0.399	
10	0.400	
<b>Promedio: 0.400</b> <b><math>\sigma_2 = 0.0007</math></b>		

Tabla 13

Promedio de la concentración:	0.3999
$\sigma_R =$	0.0008
%RSD=	0.197066498

Tabla 14

Se evalúa mediante  $\chi^2$ , según lo establecido en la NMX-CH-5725-6-IMNC-2006

Valor más grande obtenido	Valor más pequeño obtenido
0.4010	0.3980

$$(Y_{11}-Y_{12})^2= 0.0000$$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_R^2)]= 7.2458$$

**Criterio de aceptación: Se debe cumplir la siguiente ecuación**

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_R^2)] \leq \chi^2_{(1-a)(v)}$$

donde:

$(Y_{11}-Y_{12})^2=$  rango de los valores al cuadrado  
 $\sigma_R=$  desviación estándar de la reproducibilidad  
 $\chi^2_{(1-a)(v)}=$  Valor de tablas

De tablas se toma el valor de  $\chi^2$

$$\chi^2_{(95\%)(n-1)}= 30.1435$$

a= 0.05  
v= n-1  
n= 20  
v= 19

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_R^2)] \leq \chi^2_{(1-a)(v)}$$

$$7.2458 \leq 30.1435$$

**CUMPLE**

Calculo de la desviación estándar ponderada (sp):

n= 10  
n-1= 9  
sp= 0.0.000809664

Evaluación de la repetibilidad según el criterio de Horwitz:

**Criterio de aceptación: %RSD<sub>R</sub> exp < %RSD<sub>R</sub>**

Donde:

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

$$C = 0.3999000$$

$$C = 39.99$$

C = concentración expresada en fracción de %

$$\%RSD_{R \text{ exp}} = sp / \text{media} * 100$$

**Criterio de aceptación  $\%RSD_R = 1.1479$**

**Calculo con los datos experimentales:**

$$\%RSD_{R\text{ exp}} = 0.2025$$

$$\%RSD_{R\text{ exp}} < \%RSD_R$$

$$0.2025 < 1.1479$$

**CUMPLE**

Nivel 2	Concentración teórica	0.05
Analista 1: Xochiquetzal		
No.	Concentración obtenida mg/L	
1	0.050	
2	0.050	
3	0.049	
4	0.049	
5	0.049	
6	0.050	
7	0.050	
8	0.050	
9	0.051	
10	0.050	
Promedio: 0.050 $\sigma_1 = 0.0006$		

Tabla 15

Nivel 2	Concentración teórica	0.05
Analista 2: José Luis		
No.	Concentración obtenida mg/L	
1	0.050	
2	0.050	
3	0.050	
4	0.050	
5	0.050	
6	0.049	
7	0.051	
8	0.049	
9	0.049	
10	0.049	
Promedio: 0.050 $\sigma_2 = 0.0007$		

Tabla 16

Promedio de la concentración:	0.0498
$\sigma_R=$	<b>0.0006</b>
%RSD=	<b>1.283751505</b>

Tabla 17

Se evalúa mediante  $\chi^2$ , según lo establecido en la NMX-CH-5725-6-IMNC-2006

<b>Valor más grande obtenido</b>	<b>Valor más pequeño obtenido</b>
<b>0.0510</b>	0.0490

$$(Y_{11}-Y_{12})^2= 0.0000$$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_R^2)]= 4.9032$$

**Criterio de aceptación: Se debe cumplir la siguiente ecuación**

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_R^2)] \leq X^2_{(1-a)(v)}$$

donde:

$(Y_{11}-Y_{12})^2=$  rango de los valores al cuadrado  
 $\sigma_R=$  desviación estándar de la reproducibilidad  
 $X^2_{(1-a)(v)}=$  Valor de tablas

De tablas se toma el valor de  $\chi^2$

$$X^2_{(95\%)(n-1)}= 30.1435$$

$a= 0.05$   
 $v= n-1$   
 $n= 20$   
 $v= 19$

$$[(Y_{11}-Y_{12})^2/(2\sigma_R^2)] \leq X^2_{(1-a)(v)}$$

$$4.9032 \leq 30.1435$$

**CUMPLE**

**Calculo de la desviación estándar ponderada (sp):**

$n= 10$   
 $n-1= 9$   
 $sp= 0.0.000654047$

**Evaluación de la repetibilidad según el criterio de Horwitz:**

**Criterio de aceptación: %RSD<sub>R exp</sub> < %RSD<sub>R</sub>**

Donde:

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

C= concentración expresada en fracción de %.

$$C = 0.04975$$

$$C = 4.975$$

$$\%RSD_{R \text{ exp}} = \text{sp} / \text{media} * 100$$

**Criterio de aceptación %RSD<sub>R</sub>= 1.5709**

**Calculo con los datos experimentales:**

$$\%RSD_{R \text{ exp}} = 1.3147$$

$$\%RSD_{R \text{ exp}} < \%RSD_R$$

$$1.3147 < 1.5709$$

**CUMPLE**

### 11.9. Sesgo

No.	Concentración teórica mg/L	Concentración obtenida
1	<b>0.400</b>	<b>0.400</b>
2		<b>0.400</b>
3		<b>0.400</b>
4		<b>0.401</b>
5		<b>0.399</b>
6		<b>0.400</b>
7		<b>0.399</b>
8		<b>0.401</b>
9		<b>0.401</b>
10		<b>0.400</b>
		<b>Promedio: 0.4001</b>
		<b>Sesgo= 0.000</b>

Tabla 18

Dicho sesgo se evalúa como:

$$|(y-\mu)| < 2\sqrt{\sigma_R^2 - [(\sigma_R^2 * (n-1))/n]}$$

$$|(y-\mu)| = 0.00010$$

n= 10  
 $\sigma_R$ = 0.0008 (desviación estándar de la reproducibilidad)  
 $\sigma_r$ = 0.0007 (desviación estándar de la repetibilidad)  
 $< 2\sqrt{\sigma_R^2 - [(\sigma_R^2 * (n-1))/n]} = 1$

$$|y-\mu| < 2\sqrt{\sigma_R^2 - [(\sigma_R^2 * (n-1))/n]}$$
$$0.00010 < 0.00089$$

**CUMPLE**

### 11.10. Incertidumbre

Ver estimación de este parámetro en: ANEXO 3

### 11.11.Sensibilidad

Es igual a la pendiente de la curva de calibración a las condiciones del método.

m= 646063

### 11.12.Selectividad

Para la evaluación de la selectividad, ver: ANEXO 1 y ANEXO 4

### 11.13.Robustez

Para la evaluación de la robustez, ver: ANEXO 2

## 12. ANÁLISIS DE RESULTADOS:

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente proyecto para evaluar la recuperación del método se emplearon tres niveles de concentraciones diferentes a 0.400 ppm, 0.120 ppm, 0.030 ppm y se analizaron 10 muestras de cada concentración, como se observa en las tablas 1, 2 y 3 posteriormente se cuantifico la respuesta del equipo y se procedió a sacar la media de cada concentración y para evaluar el parámetro se calculó el promedio de los tres niveles de concentración antes descrito el cual es de 104.20 ppm con la obtención de este resultado se puede afirmar que se encuentra en el criterio de aceptación especificado para este parámetro (ver tabla 4). Con lo anterior podemos indicar que el método se ajusta a las condiciones necesarias para esta evaluación, ya que se demuestra que se extrae en un porcentaje de entre 90-100% el metabolito de interés.

En el proceso de realización de la validación de el método se incluyó, la determinación del limite de detección y cuantificación (ver tabla 5 y apartado 12.3, respectivamente) evaluando 10 muestras fortificadas a diferentes concentraciones (ver tabla 5) esto, para saber la capacidad del equipo de detectar a la benzoilecgonina obteniendo un valor de 0.0146 mg/L y al ser menor que el límite de cuantificación el cual se determinó que es de 0.0358 mg/L cumple con el criterios de aceptación, con respecto al límite de cuantificación para ser aceptado y afirmar que este cumple con las especificaciones del método este valor debe ser menor o igual que le primer punto de la curva de calibración el cual es e 0.03 mg/L.

Respecto a la evaluación de la precisión del método se analizaron 10 estándares a una concentración cercana al limite de cuantificación, para poder determinar la precisión del método en este límite, afirmando en relación a lo que se puede observar en el punto 12.4.1, que la precisión es muy alta.

En relación a la evaluación del parámetro de la linealidad y la estimación de la capacidad del método para poder obtener datos que prueben la proporcionalidad entre estos se preparó una curva de calibración analizando 6 niveles de concentración (0.03 mg/L, 0.04 mg/L, 0.05 mg/L, 0.06 mg/L, 0.06 mg/L, 0.08 mg/L, 0.1 mg/L) 3 veces cada uno para si poder obtener la media de cada nivel de concentración como se muestra en la tabla 8, en donde se demostró que el método se comporta linealmente en un intervalo de concentración de 0.03 mg/L a 0.1 mg/L obteniendo una  $r^2$  de 0.98977, esto se puede observar en la gráfica 1. Con ayuda de los resultados obtenidos de los 6 niveles de concentración antes citados, se calcularon los residuales para comprobar la dispersión en los datos lo cual se puede observar en el gráfico 2.

En cuanto a la tasación del intervalo de trabajo se definió con ayuda y en función del intervalo lineal. Obteniendo que dicho intervalo para el método es de 0.03µg/L-0.400µg/L indicando con este resultado que estas son las concentraciones necesarias para que el cromatógrafo de gases masa sea capaz de detectar y cuantificar a la benzoilecgonina.

Los resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad se obtuvieron a partir del análisis de 10 estándares a dos niveles de concentración uno alto y uno bajo (0.4 mg/L y 0.05 mg/L respectivamente) los datos obtenidos se pueden cotejar en las tablas 10 y 11, el promedio

de estas cifras indican la inexistencia de errores, cabe destacar que la utilización de un estándar en técnicas cromatográficas, es de gran importancia debido a que su adición permite garantizar una relación inequívoca y constante con el analito de interés. Por esto, se hace necesario evaluar la repetibilidad y la estabilidad del estándar, obteniendo como resultado que dicho parámetro cumple con los criterios de aceptación especificados en la NMX-CH-5725-6-IMNC-2006.

Los datos de reproducibilidad se obtuvieron con ayuda de dos analistas y dos niveles de concentración diferentes uno alto y uno bajo (0.4 mg/L y 0.05 mg/L) analizando 10 muestras de cada uno como se puede observar en las tablas 12, 13, 14, 15, 16 y 17. Esto para demostrar que el método es reproducible sin importar si se cambia de analista o de día de experimentación. Afirmando que los resultados obtenidos por los dos analistas diferentes tienen una coincidencia muy elevada.

Para determinar la selectividad del método se tuvo que identificar el tiempo de retención del metabolito de interés es decir la benzoilecgonina, posteriormente se evaluó los contaminantes que se pueden tener en la matriz biológica que se empleó determinando que los principales son: Colesterol con un tiempo de retención de 17.131, BSTFA con un tiempo de retención de 3.917, Ácido Hexadecanóico con un tiempo de retención de 5.248 y Ácido Octadecanóico y un tiempo de retención de 6.471 (Ver anexo 1). Se encontró de igual modo que el tiempo de retención de la benzoilecgonina es en un intervalo de entre 12 y 13 minutos (Ver anexo 4) comprobando que no hay interferencias para la identificación del metabolito de interés. Lo cual coincide con valores obtenidos por otras instituciones como las realizadas y obtenidas por el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Región Occidental.

Por los resultados obtenidos de los parámetros, anteriormente discutidos y analizados. Se puede afirmar que el método es capaz de proporcionar una confirmación de la identificación de benzoilecgonina y su cuantificación, con evidencias objetivas, las cuales se puedan documentar y asegurar de que en efecto cumple estos requisitos particulares para un uso específico y exacto, sin la presencia de interferencias para la determinación de la benzoilecgonina, proporcionando un alto nivel de confianza de que este método produce resultados que cumplan con criterios de aceptación, los cuales se citan en la NMX-CH-5725-6-IMNC-2006 la cual es una norma de exactitud, es decir se refiere a la veracidad y precisión de los resultados obtenidos de métodos.



### 13. CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos y análisis de los mismos en el presente proyecto se llegó a las siguientes conclusiones.

- Se estandarizó y validó el método analítico para la determinación de Benzoilecgonina, bajo las siguientes condiciones:

Un tiempo de análisis de 20 minutos ya que el tiempo de retención de la benzoilecgonina se encuentra entre 12 y 13 minutos  
Trampa de temperatura de 300 grados centígrados  
Derivatización

- El estudio de validación cumple con los siguientes criterios:

Recuperación VALORES

Límite de detección del método

Límite de cuantificación del método

Límite práctico de cuantificación del método

Precisión en el límite práctico de cuantificación del método

Linealidad

Intervalo de trabajo

Reproducibilidad

Sesgo

Incertidumbre

Sensibilidad

Selectividad

Robustez

Indicando así que el método es robusto y lo suficientemente confiable para generar resultados, de acuerdo a las exigencias conocidas.

- Se determinó que no existen diferencias significativas en el análisis de Benzoilecgonina, sin importar si se cambia de analista y/o día de realización del análisis, demostrando la reproducibilidad del método a las condiciones establecidas para el laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Forenses.
- El análisis obtenido, en relación a las referencias adquiridas de los parámetros analizados, confirman de manera específica que el método es capaz de detectar a la benzoilecgonina, proporcionando un alto nivel de confianza en los resultados emitidos, por el cromatógrafo de gases masa.

#### 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

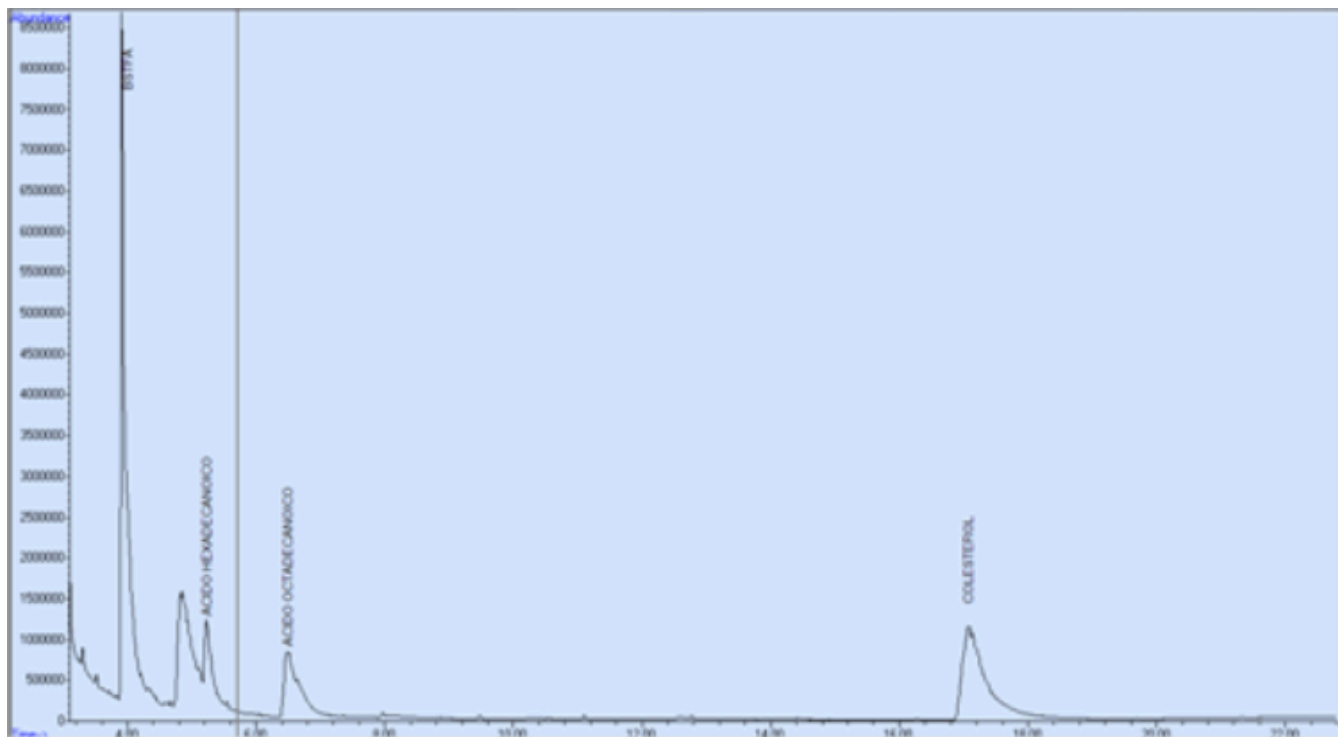
1. Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Drogas Primera Edición 2012 <http://www.inprf.gob.mx>
2. World Health Organization. WHO. Against Drugs, Adopted resolution of the World Health Organization Ginebra (Suiza) 1997
3. Oficina de las Naciones Unidas sobre droga y criminalidad. UNODC. "Informe anual sobre drogas y criminalidad". París, Francia. Junio de 2003.
4. Jaffe J. Drogadicción y abuso de drogas. En: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Goodman and Gilman Séptima edición. McGraw-Hill. E.U. 1996
5. J.M.Casas, J.García, J.M:Guadayol, J.Olivé. Análisis instrumental 2: Cromatografía y electroforesis. Edicions UPC, Barcelona, 250p. (1994).
6. M. López-Mesas. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Terrassa (2002).
7. L. Esteban. La Espectrometría de masas en imágenes. ACK editores, Madrid, 261 p. (1993).
8. M.C.Gutiérrez, M. Crespi Characterization of textile effluents treated by electrochemical techniques. Annual Conference and Anaheim (California) (2000).
9. M.Vilaseca, M.C.Gutiérrez, M.Crespi. Characterisation of dried sludge from textiletreatment plants. IFATCC 19<sup>th</sup> Congress, Paris (2002)
10. Bieri, S., A. Brachet, J. Veuthey y P. Christen, Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 (2006), 439-447.
11. Jenkins, A. J., T. Llosa, I. Montoya y E. J. Cone, Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. *Forensic Science International*, 77 (1996) 179-189.
12. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG), Recommendations, <http://www.swgdrug.org>
13. *Rapid Testing Methods of Drugs of Abuse* (ST/NAR/13/REV.1), United Nations, New York (1995).
14. Tsumura, Y., T. Mitome y S. Kimoto, False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision. *Forensic Science International*, 155 (2005), 158-164.

15. Grant, F. W., C. Martin y R. W. Quackenbush, A simple sensitive specific field test for cocaine based on the recognition of the odour of methyl benzoate as a test product. *Bulletin on Narcotics*, 27 (1975), 33-35
16. Córdoba D, Toledo D. Cocaína y base de cocaína Basuco. En: Córdoba D. Bogotá "Toxicología" ed. Editorial El Manual Moderno.
17. EL WEB Americano de Información sobre Adicciones Plantas Psicoestimulantes. INFODROGAS.
18. Ladrón de Guevara J: Moya PV. Psicoestimulantes. En "Toxicología Médica, Clínica y Laboral" McGraw-Hill Interamericana Primera edición. Madrid, España.
19. Volkow ND. Wang GJ. Fowler JS, Logan J. Gattley SJ. Wong C. Hitzemann. "Reinforcing affects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D2 receptors" *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics* (2009)
20. Moffat, A. C., M. D. Osselton y B. Widdop (2004), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3a. edición, Pharmaceutical Press.
21. Escotado A. El siglo XIX. En: *Las drogas: De los orígenes a la prohibición*. Alianza editorial S.A. Madrid (España) 1994: 75-83.
22. Osorio. L. "Manual de procedimientos de Fiscalía en el Sistema Penal Acusatorio Colombiano". 2005.
23. Arriagada. I, Hopenhayn. M. "Producción, tráfico y consumo de drogas en América Latina". Organización de las Naciones Unidas. División de desarrollo social. Santiago de Chile. 2000.
24. Organización de Naciones Unidas. ONU. Informe mundial sobre tendencias en el consumo de drogas. Ginebra, Suiza. 2004
25. INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES. REGIÓN OCCIDENTAL. Procedimiento estandarizado de trabajo (PET), "Confirmación de Cocaína, Benzoilecgonina, Cocaetileno y Cannabinoides en muestras de orina y sangre por GC/MSD."
26. Días. M, Castañera. A, Franco. J. "La importancia de la acreditación en los laboratorios de toxicología forense". Servicio de toxicología forense. Delegación sur del Instituto Nacional de Medicina Legal (INML). Rua Manuel Bento de Sousa. Lisboa-Portugal.
27. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. "Sistema integrado de Gestión de Calidad". Modelo Estándar de Control Interno MECI.

28. LITTER. M. "Farmacología experimental y clínica". Séptima edición. Editorial El ateneo. Pág. 436-437. 1988.
29. M. Barqueros Q. "Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases". Primera edición. Editorial Universidad de Costa Rica. 2006
30. J. D. Rodríguez M. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Editorial Reverté, 1991. Cap. 8: Cromatografía.
31. Schindler, Charles W; Goldberg, Steven R (2012). «Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity». Future Medicinal Chemistry 4 (2): 163
32. McNair, Harold M. & Miller, James M. (1998). Basic Gas Chromatography. Canada: John Wiley & Sons, Inc.
33. U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation; Food and Drug Administration; Center for Veterinary Medicine. BP. Mayo 2001.
34. Horwitz W; Albert R. J. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 89, No. 4, 2006; pp. 1095-1109.
35. Comisión del Codex Alimentarius CAC/GL 59-2206 Anteproyecto de revisión de las directrices para estimar la incertidumbre de los resultados para la determinación de residuos de plaguicidas.
36. NMX-CH-5725-4-IMNC-2006 Parte 4: Método básico para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado-

**Anexo 1:**  
**Cromatograma y Tabla de Selectividad del método.**

Matriz	Contaminantes	Tiempo de retención
Sangre	<i>Colesterol</i>	17.131
	<i>BSTFA</i>	3.917
	<i>Ácido Hexadecanóico</i>	5.248
	<i>Ácido Octadecanóico</i>	6.471



**Anexo 2:**  
**Robustez del sistema.**

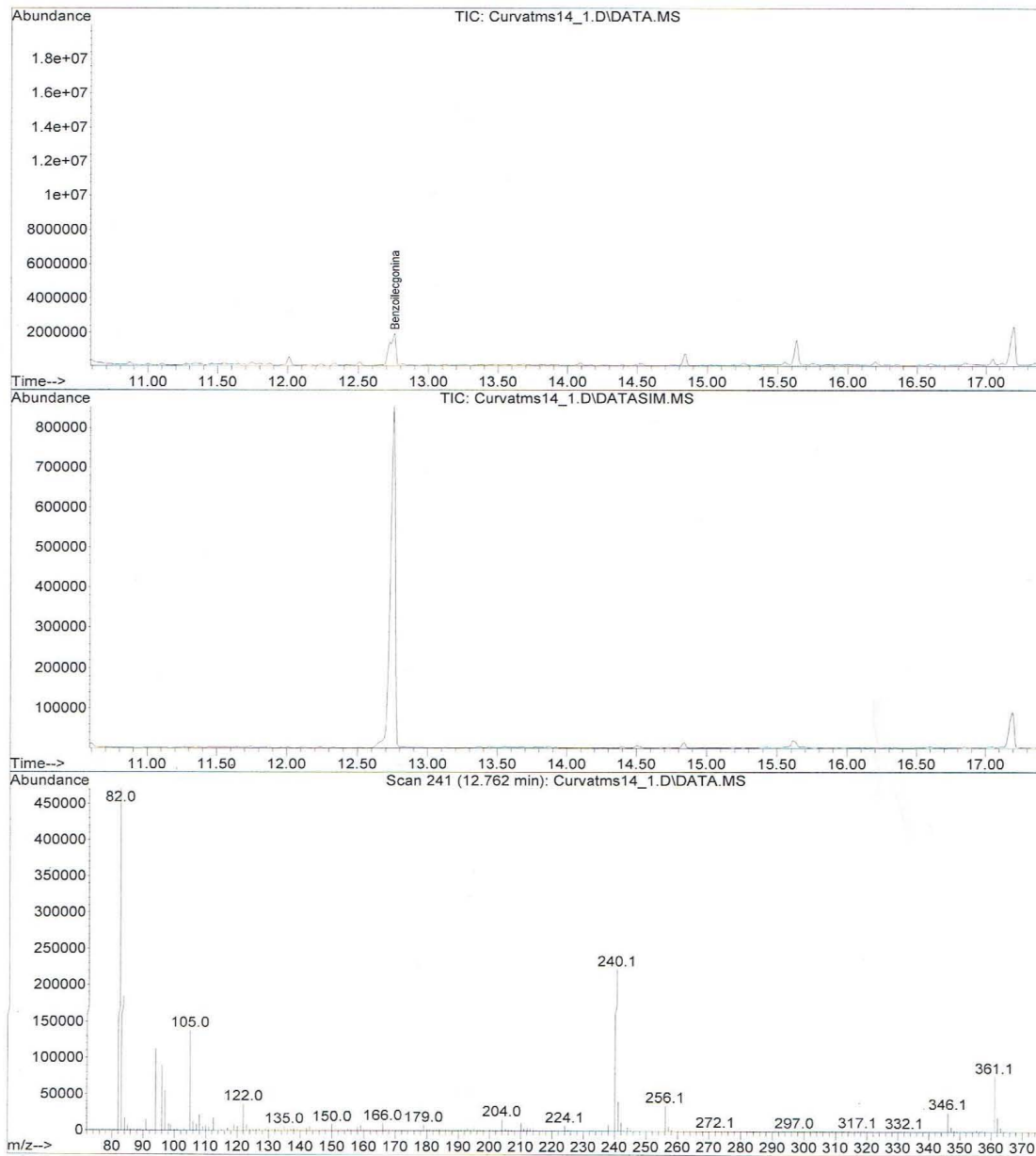
<b>Variable</b>	<b>Condición</b>
Tipo de matriz	<b>Sangre</b>
Tipo de inyección	<b>Automática</b>
Temperatura de concentración	<b>40°C</b>
Temperatura de incubación	<b>60°C</b>
Tiempo de incubación	<b>30-40min.</b>
Tiempo de degradación de una muestra (Refrigerada)	<b>28 días</b>
Temperatura de refrigeración del estándar	<b>6°C</b>
Tiempo de degradación de la muestra ya preparada	<b>8 días</b>

**Anexo 3:  
Incertidumbre**

	$U_{rep} = s / \sqrt{n}$	s = desviación estándar de la reproducibilidad	
		n = No. De repeticiones	
$U_{rep} =$	$\frac{0.0008}{\sqrt{10}}$	$=$	$0.0003 \text{ mg/L}$

## Anexo 4: Cromatograma de tiempo de retención de la benzoilecgonina

File :D:\Tesis X\CurvaTMS1\Curvatms14\_1.D  
Operator : Xochiquetzal  
Acquired : 5 Feb 2015 18:19 using AcqMethod COCA\_MTO.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: Curva  
Misc Info : Curva  
Vial Number: 20





**Anexo 5:  
Certificate of Analysis Blon Elut (cartucho para extracción en fase sólida)**

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Sorbent Lot#: 2929406

Raw Silica Lot#: 0015806

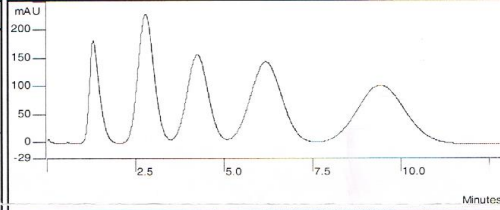
Product: BondElut® Certify

Base Silica Physical Properties			
Properties	Specifications	Results	Methods
Specific Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	460 - 520	503	N <sub>2</sub> BET
Average Particle Size (µm)	47 - 60	56	Malvern 100
Average Pore Diameter (Å)	58 - 87	67	N <sub>2</sub> BET
Particle Size Distribution (%)	$\leq 20\mu\text{m}$ $\leq 31\mu\text{m}$ $\geq 80\mu\text{m}$ $\leq 12$ $\leq 15$ $\leq 15$	$\leq 20\mu\text{m}$ $\leq 31\mu\text{m}$ $\geq 80\mu\text{m}$ 10   15   14	Malvern 100

Bonded Silica Properties			
Properties	Specifications	Results	Methods
Carbon Loading (%C)	7.80 - 11.00	8.67	CHNO-S Analysis
Hydrogen Loading (%H)	1.50 - 3.20	1.90	CHNO-S Analysis
Sulfur Loading (%S)	0.40 - 0.90	0.73	CHNO-S Analysis
Surface Coverage (µmol/m <sup>2</sup> )	1.8 - 3.0	2.1	Calculated based on %C
Turbidity (NTU)	$\leq 10.0$	3.7	Turbidity Meter
Washable Residue (mg/g)	$\leq 2.0$	1.0	Methanol and Hexane gravimetric

Component Properties and Manufacturing Control			
Properties	Specifications	Results	Methods
Tube Purity	Proprietary	Pass	GC FID Test
Frit Purity	Proprietary	Pass	GC FID Test
Bed Mass Consistency	Proprietary	Pass	Weight Measurement
Flow Characteristics	Proprietary	Pass	2ml Ethyl Glycol 50 psi

HPLC Test Conditions	Probes
<b>Varian 9100/9010/9050</b> Column Dimension: 100 X 4.6 mm Flow: 1mL/min Detector: UV @254 nm Mobile Phase: Methanol:Water (60:40) Test Temperature: 25-30 °C	Uracil Acetophenone Toluene Naphthalene Biphenyl



Every Varian product undergoes a series of carefully conducted analyses prior to acceptance and shipment to our customers. This Certificate of Analysis provides the results of some of the critical performance tests used for the evaluation of each of our sorbent lots.

All of the manufacturing and testing processes used in the preparation and evaluation of this product are in accordance with an ISO 9001:2000 regulated Quality Management System. We are always interested in your comments regarding product and quality issues. Feel free to contact us at 800-421-2825, menu 3, option 4.

  
 Quality Control Manager

10/26/2006  
 Approval Date



Varian Incorporated 25200 Commercentre Drive, Lake Forest, CA 92630 USA  
 Tel: 1-949-770-9381 Fax: 1-949-581-9118 www.varianinc.com



**Anexo 7:  
Certificate of Analysis standar Benzoylecgonine**

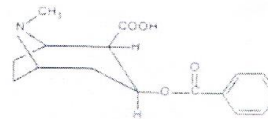


# Certificate of Analysis

## Benzoylecgonine

*3-(Benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic acid*

Catalog Number: B-004  
 Solution Lot: FC041905-01B  
 Expiration Date: September 2015  
 Solvent: Methanol  
 Amount per Ampule: 1 mL  
 Storage: Protect from light, refrigerate.  
 Handling: We advise laboratories to use measured volumes of this standard solution before diluting to the desired concentration.  
 Intended Use: For laboratory use only. This product is a quantitative standard useful for calibration, quality control, and other general applications requiring accurate solutions.



Component	Purity <sup>1</sup>	Prepared Concentration <sup>2</sup>	Analyzed Concentration <sup>3</sup>
Benzoylecgonine	99%	1.000 ± 0.031 mg/mL	0.974 ± 0.005 mg/mL

**Standard Solution Comparability**

Standard Solution	Lot Number	Concentration <sup>3</sup> (mg/mL)	% Difference from Target
New Lot	FC041905-01B	0.974	-2.6
Previous Lot	FC062303-01E	0.945	-5.5

**Standard Solution Homogeneity**

Ampuling Position	Concentration <sup>3</sup> (mg/mL)	Mean	% RSD
Early	0.965	0.974	0.8
Middle	0.981		
Late	0.977		

<sup>1</sup> Chemical purity was determined by chromatographic analysis. See following pages for more information.  
<sup>2</sup> The range of the prepared concentration is determined by statistical process control of our production and analysis systems with a 95% confidence.  
<sup>3</sup> Concentration values are determined by comparison to an independent calibration curve. We suggest using the prepared concentration value for dilutions. The concentration range is calculated from the distribution of multiple analyses of the new standard with a 95% degree of confidence.

Cerilliant certifies that this standard meets or exceeds the specifications stated in this data sheet. Accuracy is ensured by exhaustive purity determinations and gravimetric preparation using balances calibrated with NIST traceable weights. Precision is guaranteed by triplicate analysis and comparison to previous lots (when available). Finally, homogeneity is demonstrated by random analysis of the ampuled standard.

Authorized Signature: Lara Sparks  
 Lara Sparks, Quality Assurance Director

September 27, 2005  
 Date



B-004  
FE012411-02  
Revision 1  
Page 1 of 6

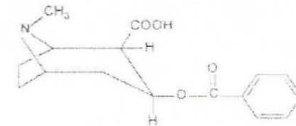
# Certificate of Analysis

## Benzoylecgonine

3-(Benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic acid

ISO GUIDE 34  
CERTIFICATE #01193  
ISO/IEC 17025  
CERTIFICATE #01192  
ISO 9001:2008  
CERTIFICATE #004

Catalog Number: B-004  
Solution Lot: FE012411-02  
Expiration Date: February 2016  
Solvent: Methanol  
Volume per Ampule: Not less than 1 mL  
Storage: Store in freezer. See Stability Section.  
Intended Use: For R&D/ analytical purposes only. Not suitable for human or animal consumption.  
Regulatory: USDEA Exempt | Canadian TK# 61-08



Safety: Flammable, Poison

- Expiration Date has been established through real time stability studies.
- Ampules are overfilled to ensure a minimum 1 mL volume fill. We advise laboratories to use measured volumes of this standard solution before diluting to the desired concentration.

Component	Chromatographic Purity	Certified Concentration
Benzoylecgonine	99.7%	1.000 ± 0.006 mg/mL
<ul style="list-style-type: none"> <li>Uncertainty of the concentration is expressed as an expanded uncertainty in accordance with ISO 17025 and Guide 34 at the approximate 95% confidence interval using a coverage factor of k = 2 and has been calculated by statistical analysis of our production system and incorporates uncertainty of the purity factor, material density, and balance and weighing technique.</li> <li>Concentration is corrected for chromatographic purity, residual water, residual solvents and residual inorganics.</li> </ul>		

### Solution Standard Verification and Homogeneity

Standard Solution	Lot Number	Verified Concentration (mg/mL)		%RSD - Homogeneity	
		Actual Results	Acceptance Criteria	Actual Results	Acceptance Criteria
New Lot	FE012411-02	1.005	± 3%	0.4	≤ 3%
Previous Lot	FE062608-06	1.011	± 3%		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Concentration is verified through multiple analyses and is calculated as the average of multiple analyses compared to an independently prepared calibration solution.</li> <li>Homogeneity of the New Lot is ensured through rigorous production process controls statistically analyzed to evaluate risk and verified by analysis. The % RSD of samples pulled from across the lot demonstrate homogeneity of the New Lot.</li> </ul>					

### Traceability

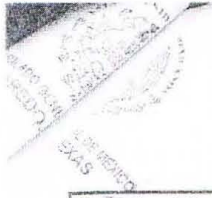
- Gravimetrically prepared using qualified balances calibrated semi-annually by Mettler Toledo using NIST traceable weights. Calibration verification performed weekly and prior to each use utilizing NIST traceable weights. Each balance has been assigned a minimum weighing by Mettler Toledo taking into consideration the balance and installed environmental conditions to ensure weighing complies with USP tolerances of no more than 0.1% relative error.
- Concentration is verified against an independently prepared calibration solution gravimetrically prepared using balances calibrated to NIST.
- In addition, each next material utilized has been identified and thoroughly characterized through the use of multiple analytical techniques. Spectral data is provided on subsequent pages of the COA.

Cerilliant certifies that this standard meets the specifications stated in this certificate and warrants this product to meet the stated acceptance criteria through the expiration/retest date when stored unopened as recommended. Product should be used shortly after opening to avoid concentration changes due to evaporation. Warranty does not apply to ampoules stored after opening.



*Lara Sparks*  
Lara Sparks, Quality Assurance Director

August 24, 2011  
Date

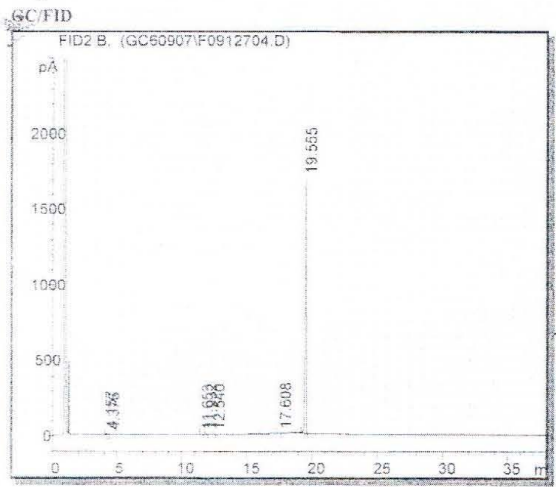


<i>Standard Solution Assay Parameters</i>		<i>Calibration Curve</i>	
Analysis Method:	UV/Vis	Calibration Curve:	Linear Regression
Wavelength:	272 nm	Number of Points:	4
Slit Width:	1.0 nm	Linearity (r):	1.000
Response:	2.0 s		

<i>Neat Material Data</i>			
Compound Name:	Benzoylcegonine	Chemical Formula:	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>
Compound Lot:	FC090707-01	CAS Number:	519-09-5
		Molecular Weight:	289.33

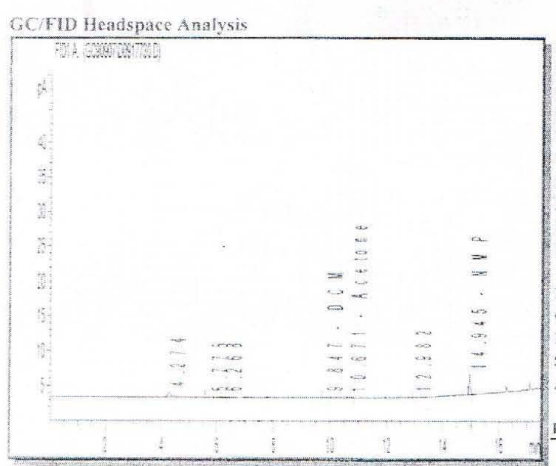
<i>Neat Material Characterization Summary</i>		
Analytical Test	Method	Results
Primary Chromatographic Purity by HPLC/PDA Analysis	SP10-0102	99.7%
Secondary Chromatographic Purity by GC/FID Analysis	SP10-0101	99.5%
Identity by GC/MS Analysis	SP10-0105	Consistent with Structure
Identity by <sup>1</sup> H-NMR Analysis	USP <761>, SP10-0116	Consistent with Structure
Residual Solvent Analysis by GC/FID Headspace	AM1087	0.17%
Residual Water Analysis by Karl Fischer Coulometry	USP <921>, SP10-0103	0.73%
Inorganic Content by Microash Analysis	Outsourced	< 0.1%
Purity Factor		98.98%

- Primary purity is calculated as the average of two independently performed analyses utilizing two different methods. Acceptance criteria requires the purity values to be within 0.5% of each other.
- The primary chromatographic purity value is used to calculate the Purity Factor.
- A secondary chromatographic purity method is utilized as a control.
- Purity Factor = [(100 - wt% residual solvent - wt% residual water - wt% residual inorganics) x Chromatographic Purity / 100]
- Purity factor does not include adjustment for chiral and/or isotopic purity.



**Column:** DB-5ms, 30 m x 0.53 mm ID, 1.0 um film thickness  
**Temp Program:** 40°C to 200°C at 40°C/min  
 200°C to 280°C at 5°C/min hold 18 min  
**Injector Temp:** Cool-on-Column  
**Detector Temp:** 325°C  
**Data File Name:** C:\HPCHEM\1\DATA\GC60907\F0912704.D  
**Operator:** LMH  
**Instrument:** GC#6  
**Sample Name:** FC090707-01  
**Method File:** B01E.M  
**Acquired:** September 12, 2007 4:23 PM

Peak #	Ret Time	Area	Height	Area %
1	4.16	11.03	10.12	0.11
2	4.38	0.93	0.42	0.01
3	11.65	1.29	0.23	0.01
4	11.93	23.66	4.96	0.23
5	12.54	4.02	0.88	0.04
6	17.61	6.68	0.71	0.06
7	19.56	10291.10	1690.19	99.54



**Column:** DB-ALC1 30m x 0.53mm, 3 um film thickness  
**Temp Program:** 40°C (12 min) to 220°C at 40°C/min (5.5 min)  
**Carrier Gas:** Helium  
**Flow Rate:** 2.0 mL/min  
**Detector Temp:** 250°C  
**Injector:** Headspace Sampler  
**Injector Temp:** 200°C  
**HS Oven Temp:** 50°C  
**Injection Volume:** 1.0 mL  
**Incubation Time:** 10 minutes  
**Data File Name:** C:\CHEM32\1\DATA\GC90907\0912704.D  
**Operator:** KRS KMJ  
**Instrument:** GC#9  
**Sample Name:** FC090707-01  
**Acquired:** September 18, 2007 1:16:53 AM

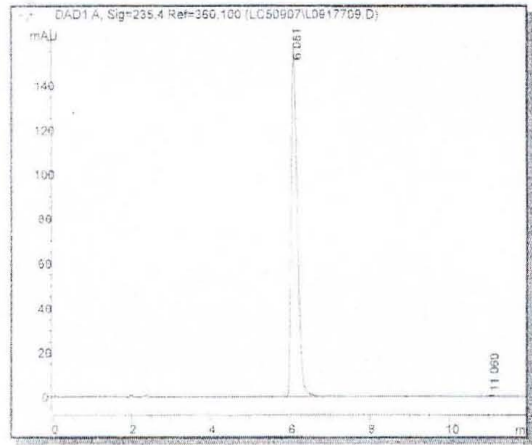
Peak	Compound	Area	Weight %
1	Pressure peak	NA	NA
2	DCM	0.737935	0.01
3	Acetone	0.261949	0.00
4	Unknown #1	0.366289	0.37
5	Unknown #2	0.273181	0.27
6	Unknown #3	0.286951	0.29
<b>Total</b>			<b>0.92</b>

100-AND-953  
 NCE-0  
 EXA-0  
 09/18/07

B-004  
 FE012411-02  
 Revision 1  
 Page 4 of 6

*Spectral and Physical Data (cont.)*

**HPLC**



**Column:** Synergi Polar RP 4.6 x 250 mm  
**Mobile Phase:** 0.05% Phosphoric Acid::Acetonitrile (80::20)  
**Flow Rate:** 1.5 mL/min  
**Wavelength:** 235 nm  
**Data File Name:** C:\HPCHEM\1\DATA\LC50907\L0917709.D  
**Operator:** MAM  
**Instrument:** LC#5  
**Sample Name:** FC090707-01  
**Method File:** RMB002-2-1.M  
**Acquired:** September 18, 2007 9:42 AM

Peak #	Ret Time	Area	Height	Area %
1	6.08	1629.89	138.02	99.62
2	11.06	6.28	0.50	0.38

**<sup>1</sup>H NMR**

**Instrument:** Bruker DRX 400  
**Solvent:** Chloroform-D  
**Reference:** TMS

