

**“UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO”**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
“ZARAGOZA”**

**CONFIRMACION DE DROGAS DE ABUSO POR CROMATOGRAFÍA DE  
GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE MUESTRAS  
PRESUNTAMENTE POSITIVAS**

**TESIS OBTENER EL GRADO DE:**

**C. JUAN PÁEZ RODRÍGUEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. EN C. ELIAS MIRANDA GONZÁLEZ.**

**ASESOR DE TESIS:**

**Q. F. B. PATRICIA VIDAL MILLÁN.**

**ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LAS INSTLACIONES DE  
LABORATORIO QUÍMICO CLINICO AZTECA, S. A. DE C. V.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

INDICE.	PAGINA
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEORICO	5
2.1. PRUEBAS PRELIMINARES O "SCREENING"	5
2.2. PRUEBA CONFIRMATORIA	8
2.2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS	18
2.3. GENERALIDADES DE LAS DROGAS DE ABUSO EVALUADAS EN ESTE TRABAJO	21
2.3.1. COCAINA	21
2.3.1.1. FARMACOLOGÍA DE LA COCAINA	22
2.3.1.2. METABOLISMO DE LA COCAINA	23
2.3.2. ANFETAMINAS	24
2.3.2.1. FARMACOLOGÍA DE LAS ANFETAMINAS	25
2.3.2.2. METABOLISMO DE LAS ANFETAMINAS	26
2.3.2.3. INTERFERENTES ANFETAMINAS	27
2.3.3. CANABINOIDES	28
2.3.3.1. FARMACOLOGÍA DE LOS CANABINOIDES	29
2.3.3.2. METABOLISMO DE LOS CANABINOIDES	30
2.3.3.3. INHALACIÓN PASIVA	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. OBJETIVOS	34
5. HIPOTESIS	34
6. DISEÑO DE INVESTIGACION	34
6.1. EQUIPO, MATERIAL Y METODOS	34
6.2. TIPO DE ESTUDIO	36
6.3. POBLACIÓN	36
6.4. CRITERIOS	36
6.5. VARIABLE	36
7. PARTE EXPERIMENTAL	36
7.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE COCAINA	37
7.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE ANFETAMINAS	38
7.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE TETRAHIDROCANABINOIDES	38
7.4. PREPARACIÓN DE CONTROLES DE CALIDAD	39
7.5. ANÁLISIS CONFIRMATORIO GC/MS	41
7.6. ANÁLISIS CONFIRMATORIO DEL METABOLITO BENZOILECGONINA PROCEDENTE DE COCAINA	42
7.7. ANÁLISIS CONFIRMATORIO DEL METABOLITO 9-TETRAHIDRO-CANNABINOL CARBOXILADO PROCEDENTE DE CANNABIS.	46
8. RESULTADOS	49
8.1. CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS	49
8.2. CONFIRMACIÓN Y CUANTIFICACION GASES MASAS	49
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
10. CONCLUSIONES	53
11. BIBLIOGRAFIA	53

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las pruebas para la detección del consumo de drogas de abuso, se ha convertido en una de las áreas en crecimiento en el Laboratorio Clínico, dado el uso extenso y en constante expansión del consumo de estas entre grandes segmentos de la población.

El uso de sustancias capaces de modificar el estado de ánimo, la percepción de la realidad e incluso el propio flujo del pensamiento es tan viejo como la humanidad. En diversas épocas y en distintas comunidades humanas, la drogas se han utilizado repetidamente como un potente instrumento de uso social, de búsqueda mística, o de dominio. De cualquier modo, consumida durante el curso de las ceremonias religiosas o en fiestas, la droga ha sido siempre objeto de juicios morales que, como tal, son históricos y mutables en función de los cambios temporales y del contexto social.

Por lo tanto, desde el momento en que nuestra sociedad acepta como legales algunas drogas y como ilícitas otras, es muy difícil formular una definición correcta y aceptada del termino de droga y más aún, del concepto de drogas de abuso. Siguiendo el diccionario, por droga se entiende una serie de “sustancias naturales o producidas por síntesis con propiedades estupefacientes, alucinógenas o excitantes que provocan en diversa medida el fenómeno de la farmacodependencia. Pero, ¿qué es la farmacodependencia?. En 1950. la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió farmacodependencia (“drug addiction”) como “Un estado de intoxicación crónica o esporádica, negativa para el individuo y para la sociedad, producto de la ingesta repetida de sustancias farmacológicamente activas”, entre cuyas principales características estarían:

- a) Un deseo irrefrenable de continuar ingiriendo la sustancia y de obtenerla a cualquier precio
- b) Una tendencia a incrementar la dosis.
- c) Una dependencia psicológica y a veces física a los efectos de la sustancia.

Hoy en día, muchos Investigadores rechazan una definición rígida, que en opinión de muchos autores, no es necesaria ni posible, prefiriendo referirse directamente a grupos específicos de drogas, siempre actualizables, que agrupen a aquellas sustancias que por sus características psicotrópicas, pueda abusarse de ellas de modo voluntario y que puedan construir un problema para la salud pública o en muchos de los casos para la seguridad de terceras personas.

A continuación, se presentan algunos datos sobre el consumo de drogas ilícitas en México, tanto en la población general, como en grupos específicos y cuadros comparativos al respecto (1).

**Alguna vez en la vida:** es la prevalencia o proporción de individuos en la población estudiada (urbana de 12 a 65 años de edad) que reportó haber consumido alguna droga ilícita. Permite hacer una primera distinción en la población entre los que han usado y los que no han usado drogas, sin considerar si las consumen actualmente.

**Último año:** es la prevalencia o proporción de individuos que refieren haber usado alguna droga ilegal una o más veces dentro de los 12 meses anteriores a la entrevista.

**Último mes:** esta prevalencia, conocida también como **uso actual** permite estimar qué proporción de la población utilizó drogas dentro de los 30 días previos al estudio.

#### Consumo por tipo de droga alguna vez, último año y último mes.

##### Población urbana de 12 a 65 años de edad

Tipo de droga	Alguna vez %	Último año %	Último mes %
Mariguana	4.70	1.03	0.70
Cocaína	1.45	0.45	0.21
Inhalables	0.80	0.15	0.09
Alucinógenos	0.36	0.03	–
Heroína	0.09	0.02	–
Cualquier droga ilegal	5.27	1.23	0.83

Fuente: Encuesta Nacional de Adicciones, SSA, 1998

De lo anterior se deriva que muchas Instituciones tanto públicas como privadas estén actualmente implementando esquemas de detección del consumo de drogas en sus lugares de trabajo con diversos propósitos. Esto ha dado un auge a la aparición de un sin número de pruebas que permiten detectar el consumo de drogas en diversos fluidos biológicos.

Desafortunadamente este tipo de pruebas tiene un porcentaje de confiabilidad, que en la mayoría de los casos no es considerado. Generando con ello a corto y mediano plazo problemas de tipo legal y científico, derivados del impacto que tiene el emitir un resultado positivo en la vida laboral, social y familiar del individuo.

Los principales y más modernos métodos para determinar la presencia de metabolitos de drogas son de dos tipos, Inmunológicos y Cromatográficos. Los métodos Inmunológicos nos permiten realizar pruebas de manera rápida, a bajo costo y con opción de automatizar los procesos para la selección de muestras probablemente positivas en operativos que involucren la toma de un considerable número de muestras (2).

Muchas pruebas de drogas se practican hoy en día utilizando el llamado Inmunoanálisis homogéneo como lo es la técnica por EMIT, Inmunoanálisis de polarización con fluorescencia (FPIA) y Radioinmunoensayo (RIA) (3).

Los resultados emitidos por este tipo de análisis preliminar o presuntivo oscilan en rangos de confiabilidad que van del 60 al 98 %, dependiendo de diversos factores. De lo anterior que se considere necesario el empleo de una prueba confirmatoria(4).

Se considera que la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es actualmente la mejor técnica de confirmación, puesto que brinda un soporte científico legal sólido y contundente. Pero su implementación en el laboratorio involucra un alto costo de inversión y personal altamente calificado. Lo que lo pone en desventaja con las pruebas preliminares (5).

En los últimos años y debido a que los resultados de estas pruebas constituyen la evidencia en los procesos legales del uso de una droga por un individuo, se hizo necesario contar con un amplio sustento legal, científico y de control de calidad que brinde validez contundente a este tipo de análisis. Lo que llevo a algunas Instituciones ha incorporar un esquema integral de detección del consumo de drogas de abuso (6).

El proceso se inicia con la supervisión de la toma de muestra, donde el supervisor articula los mecanismos necesarios para evitar la posible adulteración o sustitución de la muestra, siendo la orina uno de los fluidos más susceptibles a la adulteración (7). En este mismo paso el supervisor inicia uno de las partes más importantes e integrales del análisis denominada cadena de custodia de la muestra, que garantiza la integridad y documenta cada una de las etapas que transcurren desde la recolección de la muestra hasta su dictamen final.

Posterior a la toma de muestra el proceso continua en el laboratorio con el empleo de metodología analítica específica cuya selección depende de factores como la sensibilidad requerida, la confiabilidad, capacidad técnica e instrumental, tiempo disponible para análisis y costo. Un efectivo protocolo analítico para la detección de drogas consta de un procedimiento inicial sensitivo de filtrado o selección de muestras, que separa las muestras negativas de probables muestras positivas, que posteriormente son confirmadas por una técnica altamente específica.

Aunque existen numerosas técnicas de alta confiabilidad la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) es reconocida internacionalmente como una técnica rigurosa de confirmación para todas las drogas, debido a que provee el mejor nivel de confianza en el resultado (5).

El ciclo se cierra con el dictamen emitido por un especialista que discrimina en base a evidencia científica si la droga o metabolito encontrado se asocia al uso ilícito de una droga. Múltiples artículos han hecho patente la necesidad de incorporar este paso puesto que en muchos casos la presencia de la droga en un fluido biológico es el resultado de la exposición pasiva, inconsciente o derivada de un tratamiento farmacológico( 8,9).

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 PRUEBAS PRELIMINARES O "SCREENING".**

Los métodos para determinar la presencia de drogas son de varios tipos destacando los Inmunológicos y Cromatográficos. Los métodos Inmunológicos nos permitan realizar pruebas a bajo costo, rápidas y con opción de automatizar, este tipo de pruebas nos permiten seleccionar muestras probablemente positivas en operativos colectivos.

Muchas pruebas de drogas se practican hoy en día utilizando el llamado Inmunoanálisis homogéneo como lo es la técnica de Inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT), Inmunoanálisis de polarización con fluorescencia (FPIA) y Radioinmunoensayo (RIA)

Por ejemplo la técnica EMIT se basa en la competencia entre la droga en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (**G6P-DH**), por los lugares de unión del

anticuerpo. La actividad disminuye cuando la enzima se une al anticuerpo, y así la concentración de la droga en la muestra puede medirse basándose a la actividad enzimática. La enzima activa transforma la nicotinamida-a denin-dinucleotido (**NAD**), lo que causa un cambio en la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente.

Las diferencias peculiares entre los diversos sistemas disponibles consisten en el trazador radioactivo en el Radioinmunoensayo (RIA) enzimático, en la técnica de inmunoensayo múltiple enzimático (EMIT), y fluorescente en el inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA).

Como es natural, la valoración de cada método deberá tener en cuenta algunas características como:

### **Especificidad:**

Depende del tipo de anticuerpo usado. Puede definirse como la capacidad de un sistema analítico de no dar resultados positivos en muestras que no contengan el analito a determinar. Así, una prueba para la determinación de la benzoilecgonina, debe reconocer sólo esta sustancia; si reacciona también en presencia por ejemplo de lidocaína presenta falta de especificidad. Sin embargo, a veces un cierto grado de reactividad cruzada puede ser de utilidad, es el caso de las benzodiazepinas, por ejemplo, que reconocen anticuerpos directos para toda la familia farmacológica y no para una sola molécula; con el fin de facilitar la interpretación crítica del dato analítico, cada equipo comercial debería, de cualquier forma, ofrecer en tablas adjuntas los valores de reactividad cruzada para una serie lo más completa posible de sustancias.

### **Sensibilidad:**

Está muy influenciada por el tipo de marcador usado. Puede definirse como la capacidad de un sistema de identificar la sustancia buscada en todas las muestras que realmente la contengan. Cuanto más sensible sea el sistema analítico, más pequeña será la cantidad de sustancia detectada. Esto significa que una prueba que tenga una sensibilidad de 25 ng/ml., estará en condiciones de detectar la droga o sus metabolitos durante un período de tiempo mas largo o bien en presencia de orina mas diluida con respecto a lo que puede detectar una prueba con una sensibilidad de 100 ng/ml.

Por lo tanto, dado el tipo de funciones requeridas en "screening", es importante que la prueba de presunción sea altamente sensible y que tal sensibilidad sea declarada por el fabricante. En



realidad, mientras un eventual falso positivo puede ser de cualquier forma descubierto en las pruebas de confirmación, el falso negativo se pierde, no sometiéndose a nuevos análisis. Es obvio, que la falta de identificación de una muestra positiva puede generar para el laboratorio serias responsabilidades, incluso de tipo legal.

#### **Valor de corte (cut-off):**

El valor de corte de una prueba, establece que concentración de la droga debe estar presente antes de que la muestra sea señalada como positiva por el sistema. Esto significa que una muestra considerada negativa, en realidad puede contener droga, pero con una concentración inferior al corte. Es obvio, que el valor del corte debe mantenerse por encima del valor de sensibilidad declarado; sin embargo, es deseable por otra parte, poder fijar el valor de corte en relación al tipo de investigación que podrá ser de carácter médico-legal, epidemiológico, clínico, etc.

#### **“Carry – Over” o arrastre:**

Puede ocurrir cuando se pasa de una muestra de alta concentración de analito a otra de baja concentración, combinándose con un lavado insuficiente de las partes que están en contacto con la muestra. Un sistema eficiente no debe estar sujeto a un arrastre apreciable.

#### **Rapidez de análisis:**

Depende de la fase seleccionada, heterogéneo (RIA), u homogénea (FPIA, EMIT). Los dos últimos métodos son los más rápidos, siendo capaces de proporcionar resultados en un tiempo muy corto.

#### **Exactitud:**

La exactitud de un sistema analítico describe su habilidad intrínseca de identificar verdaderamente y/o cuantificar la sustancia a ser medida. El empleo de estándares primarios nos permite conocer que tan separado está el valor teórico del valor práctico obtenido.

#### **Precisión:**

La precisión es una evaluación estadística que mide la repetibilidad de los procedimientos de prueba. No indica la exactitud del sistema, ya que un sistema analítico puede ser muy preciso reproduciendo errores consistentemente, sin embargo; una medición exacta debe tener también una precisión aceptable.

**Confiabilidad:**

La confiabilidad de un sistema analítico describe el desempeño esperado como resultado de una exactitud y precisión consistente. La confiabilidad es afectada por las condiciones y los factores que influyen al sistema analítico y la exactitud de los resultados. El método es confiable, si el método de la prueba es exacto y preciso bajo cualquiera o la mayoría de las condiciones. Si hay un gran número de factores que disminuyen la exactitud y precisión la confiabilidad disminuye.

**Interferencias:**

La interferencia es la consecuencia de sustancias en el sistema de prueba afectando adversamente la reacción química o medición de los productos de reacción. La interferencia puede causar tanto resultados falsamente elevados o resultados disminuidos. Las sustancias químicas que son estructuralmente similares o que producen reacciones químicas similares, algunas veces son identificadas junto con la droga de interés. Adicionalmente, sustancias presentes en la muestra pueden enmascarar la presencia de la droga buscada. El impacto en los resultados afecta la especificidad y, por lo tanto, la exactitud del sistema analítico.

**Reactividad cruzada:**

Se llama reactividad cruzada a la tendencia de un método de prueba a reaccionar con más de una droga. Algunas veces llamada reactividad selectiva, la reactividad cruzada se utiliza para hacer la detección de muchos miembros de una familia de drogas con una sola prueba. Por ejemplo, los barbitúricos son una gran familia de drogas químicamente relacionadas. Considerando la reactividad cruzada en el diseño del sistema analítico, los barbitúricos usados comúnmente pueden ser detectados por un solo proceso analítico. La droga utilizada como estándar es secobarbital, y la reactividad de otros barbitúricos se determina con relación al secobarbital.

**2.2. PRUEBA CONFIRMATORIA**

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de la muestra

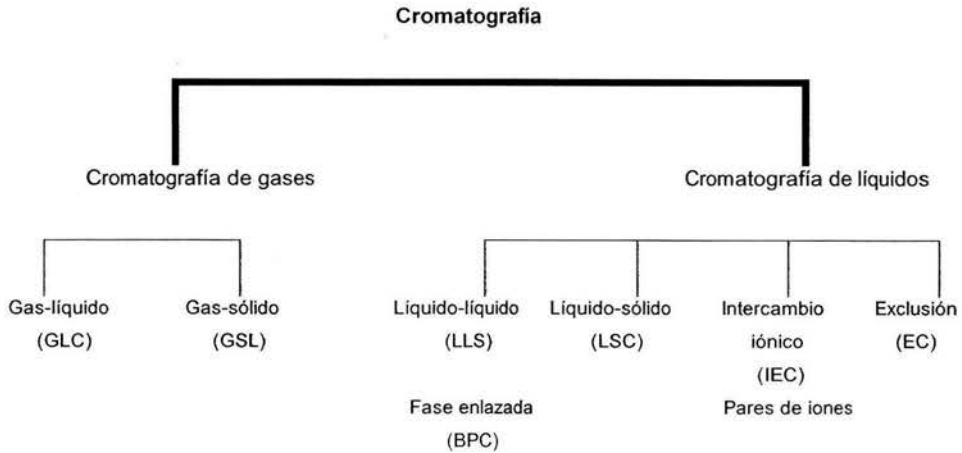
experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada, los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y químicas de los componentes de la muestra. Los componentes adyacentes (picos) se separan cuando el pico que sale después es retardado lo suficiente para impedir la sobreposición con el pico que emergió antes(10).

La columna de separación es el corazón del cromatógrafo. Proporciona versatilidad en los tipos de análisis que pueden realizarse. Esta característica, debida a la amplia gama de selección de materiales para las fases móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto y las moléculas de cada fase. Refleja la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el soluto y entre sí. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión del tipo London. En cromatografía de intercambio iónico, las fuerzas en las moléculas del soluto son sustancialmente de naturaleza iónica; pero incluyen también fuerzas polares y no polares. La polaridad relativa de los disolventes se manifiesta en su constante dieléctrica.

#### *CLASIFICACION DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS*

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido (Ver tabla)(11). Cuando la separación involucra predominantemente un reparto simple entre dos fases líquidas inmiscibles, una estacionaria y la otra móvil, el proceso se llama cromatografía líquido-líquido (LLC).

## METODOS CROMATOGRAFICOS



Cuando en la aptitud retentiva de la fase estacionaria intervienen principalmente fuerzas físicas de superficie, el proceso se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC, de liquid-solid chromatography) (o de absorción).

Otros dos métodos de cromatografía líquida difieren un poco en su modo de acción. En cromatografía de intercambio iónico (IEC, de ionic-exchange chromatography), los componentes iónicos de la muestra se separan por el intercambio selectivo con contraiones de la fase estacionaria. En cromatografía de exclusión (EC, de exclusión chromatography), la fase estacionaria proporciona una clasificación de moléculas basadas en su mayor parte en la geometría y el tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación en gel, y es aplicado en la química de los polímeros, y en área bioquímica. Cuando la fase móvil es un gas, los métodos se llaman cromatografía gas-líquido (GLC) y cromatografía gas-sólido (GSC).

### COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS SOLUTOS

El comportamiento cromatográfico de un soluto puede describirse de diversas formas. Para cromatografía en columna, el volumen de retención,  $V_R$  (o el correspondiente tiempo de retención,  $t_R$ ) y la razón de reparto,  $k'$ , son los términos que se utilizan con más frecuencia. Variando las combinaciones de fase estacionaria-fase móvil y varios parámetros de operación, el grado de retención se puede cambiar de la retención total hasta un estado de migración libre.

## Comportamiento de retención

El comportamiento de retención refleja la distribución del soluto entre a fase móvil y la fase estacionaria. El volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector (en el máximo del pico del soluto) se define como volumen de retención,  $V_R$ . Se puede obtener directamente del cromatograma multiplicando el tiempo de retención correspondiente,  $t_R$  por el gasto o flujo volumétrico,  $F_c$  expresado como el volumen de fase móvil por unidad de tiempo:

$$V_R = t_R F_c$$

El gasto, en términos de los parámetros de la columna, está dado por:

$$F_c = \frac{\pi d_c^2}{4} \times \epsilon_{tot} \times \frac{L}{\tau_M} = \frac{V_{col} \epsilon_{tot}}{\tau_M}$$

sección	porosidad	Velocidad
transversal	total	lineal
de la columna		promedio del
vacía		eluyente

donde  $d_c$  es el calibre de la columna,  $L$  la longitud de la misma,  $\epsilon_{tot}$  es la porosidad total del relleno (empaquete) de la columna y  $V_{col}$  es el volumen del lecho de esta última. La porosidad expresa la razón del volumen intersticial del relleno respecto al volumen de su masa total. Para empaques sólidos la porosidad total es 0.35-0.45, mientras que para empaques porosos es de 0.70-0.90. En las columnas capilares el valor de  $\epsilon_{tot}$  es la unidad. La velocidad lineal promedio,  $u$ , de la fase móvil,

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

Se mide con el tiempo de tránsito de un soluto no retenido,  $t_M$ . En cromatografía práctica ningún material puede eluir antes de este tiempo. Cuando se convierte a volumen,  $V_M$  (o  $V_0$ ) representa lo que se conoce como espacio muerto, volumen vacío o volumen de retraso de la columna.

Incluye las contribuciones efectivas del volumen del inyector, de cualquier tubería de conexión, de la columna en sí y del detector.

El volumen,  $V'_{R'}$  o el tiempo,  $t'_{R'}$  de retención ajustados, están dados por

$$V'_{R'} = V_R - V_M \quad \text{o bien,} \quad t'_{R'} = t_R - t_M$$

Cuando la fase móvil es un gas, la temperatura y la presión se deben especificar, y los volúmenes de retención, se deben corregir por la compresibilidad del gas, ya que éste se mueve más lentamente en la entrada que en la salida de la columna. El factor de corrección por gradiente de presión (o compresibilidad)\*,  $j$ , se expresa por

$$j = \frac{3 \left( \frac{P}{P_{e2}} - 1 \right)}{2 \left( \frac{P}{P_{e3}} - 1 \right)}$$

Donde  $P$  es la presión del gas transportador a la entrada de la columna, y  $P$  el de la salida

### **Coefficiente de repartición**

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. Si la fase móvil se detiene en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de repartición (o reparto):

$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

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

Para un pico simétrico, cuando el máximo del pico aparece en la salida de la columna, la mitad del soluto se ha eluido en el volumen de retención,  $V_{R'}$  y la mitad permanece distribuida entre el volumen de fase móvil,  $V_M$  y el volumen de fase estacionaria,  $V_s$ . Así,

$$V_{RCM} = V_{MCm} + V_s C_s$$

Reordenando y combinando con la ecuación anterior, obtenemos una ecuación fundamental en cromatografía:

Que relaciona el volumen de retención de un soluto con el volumen muerto de la columna y el producto entre el coeficiente de reparto y el volumen de la fase estacionaria. Esta ecuación es correcta para columnas de reparto líquido; pero para columnas de absorción,  $V_s$  se debe reemplazar por  $A_s$ , el área superficial del absorbente.

### Razón de reparto

La razón de reparto (o razón de capacidad),  $K'$ , es la cantidad más importante en cromatografía en columna. Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Para un conjunto dado de parámetros de operación,  $K'$  es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en fase móvil.

Se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:

$$K' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$

La razón volumétrica de fases,  $V_m / V_s$  se denota usualmente por  $\beta$ . Así,  $k' = k / \beta$ . Dicho de otra forma, la razón de reparto es el tiempo adicional que una banda de soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido (para el cual  $k' = 0$ ), dividido entre el tiempo de elución de una banda no retenida:

$$K' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

La relación establece explícitamente cuántos volúmenes muertos (o  $t_M$ ) se requieren para alcanzar  $V_R$  (o  $t_R$ ). Reordenando la ecuación anterior e introduciendo la ecuación  $u = \frac{L}{t_M}$  se relacionan los tiempos de retención con  $k'$  por medio de la ecuación:

$$t_R = t_M (1 + k') = \left[ \frac{L}{u} \right] (1 + k')$$

Como se demostrará, con valores de  $k'$  mayores que 10 se desperdicia tiempo analítico valioso. Los valores menores que la unidad no proporcionan una resolución adecuada entre los solutos de elución temprana.

### Retención relativa

La retención relativa depende de 1) la naturaleza de las fases estacionaria y móvil, y 2) la temperatura de operación de la columna. Al escoger un par de fases para los solutos adyacentes más difíciles de separar se debe ser tan selectivo como sea posible.

### EFICIENCIA DE LA COLUMNA Y RESOLUCIÓN

Bajo condiciones de operación donde el reparto del soluto entre las fases estacionarias y móvil es lineal (esto es se sigue la ley de Henry),  $K$  y  $k'$  son independientes de la concentración total de soluto. Después 50 o más repartos entre las fases, el perfil resultante de la banda se aproxima muy de cerca al dado por una curva de distribución gaussiana.

De todas maneras, conforme la banda de soluto pasa a través de la columna cromatográfica se ensancha y la concentración en el máximo del pico disminuye. Este ensanchamiento finalmente afecta la resolución de las bandas de soluto adyacentes.

### Altura del plato y número de platos

Una característica importante de un sistema cromatográfico es su eficiencia, expresada como una cantidad adimensional y llamada número efectivo de platos,  $N_{ef}$ . Refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. El número efectivo de platos se puede definir del cromatograma de una sola banda, como se muestra

$$N_{ef.} = \frac{L}{H} = \left[ \frac{t'_R}{?} \right]^2$$



Donde  $L$  es la longitud de la columna,  $H$  es la altura del plato,  $t'_R$  es el tiempo ajustado para la elución del centro de la banda y es la variancia de la banda en unidades de tiempo. El ancho en la base del pico,  $W$  (determinado con las intersecciones de las tangentes a los puntos de inflexión con una línea base), es igual a cuatro desviaciones estándar suponiendo una distribución gaussiana ideal Así, de la ecuación anterior  $\sigma = W/4$  y

La porción superior del pico determina la línea tangente, lo que minimiza cualquier contribución de un segmento con coleo (o cabeceo).

Frecuentemente es más sencillo medir el ancho a la mitad de la altura del pico. Puesto que la medición del ancho del pico a la mitad de su altura es menos sensible a la asimetría del pico, ya que el coleo frecuentemente se muestra por debajo de la localización de la medida.

Aun cuando no es recomendable, la eficiencia de la columna a veces se establece como el número de platos teóricos. En este contexto no se hace ninguna corrección por el tiempo de tránsito de un soluto no retenido.

El número de platos es solamente una indicación de qué tan bien ha sido empacada una columna; no puede predecir adecuadamente el rendimiento de la columna bajo todas las condiciones. Esta diseñado para ser principalmente una medida de las contribuciones cinéticas al ensanchamiento de la banda. Otras contribuciones al ancho del pico, como los efectos extracolumna y factores termodinámicos (como el coleo de los picos ), pueden desempeñar un papel importante.

La altura del plato  $H$ , es la distancia que el soluto se mueve mientras se lleva a cabo un reparto:

$$H = \frac{L}{N_{ef}}$$

La altura del plato es buena forma de expresar la eficiencia de la columna en unidades de longitud, sin especificar la longitud de la columna. Desde un punto de vista teórico, la altura del plato puede relacionarse directamente a las condiciones experimentales y a los parámetros de operación. Para una columna eficiente  $H$  es un número pequeño.

### **Asimetría de la banda**

Una queja común entre los cromatografistas es la presencia de bandas asimétricas. Afortunadamente, lo que las causa es bien conocido y con frecuencia es posible diagnosticar las razones de la asimetría de una banda en una separación en particular. Las bandas simétricas se observan normalmente sólo con muestras que no exceden un máximo de tamaño, usualmente 1 mg de muestra por gramo de fase estacionaria (0.1 mg/g para empaques pelliculares). Si  $k'$  es mayor a concentraciones más bajas de soluto, entonces el ala de baja concentración del pico eluyente se mueve más lentamente que el ala de la alta concentración. Conforme una banda inicialmente simétrica se mueva a lo largo de la columna se volverá sesgada y, finalmente, desarrollará un frente agudo y una cola larga. El tipo inverso de asimetría se conoce como "cabeceo". La solución en este caso es disminuir el tamaño de la muestra hasta el punto en que el perfil de todas las bandas se vuelva simétrico y los tiempos retención constantes.

Muchos problemas de coileo se pueden atribuir a una combinación equivocada de muestra y empaque de la columna. Cuando se sospecha de una incompatibilidad del sistema se debe probar un tipo diferente de columna.

### **INTEGRADOR COMPUTARIZADO:**

Los sistemas de datos basados en computadoras en línea permiten una automatización completa. Esto incluye la adquisición y reducción de datos en forma automática y la impresión de los resultados analíticos. La señal cromatográfica, inicialmente analógica, se digitaliza por medio de un convertidor digito-analógico. Con programas se puede entonces detectar la presencia de picos, hacer correcciones por la desviación de los componente utilizando factores de calibración almacenados y generar un informe completo del análisis.

Las cuentas del área del pico se acumulan cuando la señal abandona la línea base. Este alejamiento de la línea base usualmente se determina por medio de la medición de la pendiente de la señal. El tiempo de retención y las alturas de la señal en el máximo de cada pico se detectan con un programa almacenado en la memoria. El final del pico de un componente se establece cuando la señal regresa a la línea base. Durante corridas isotérmicas los programas pueden aumentar automáticamente con el tiempo la sensibilidad a la pendiente, asegurando su habilidad para detectar los picos agudos iniciales y los picos bajos más retardados con la misma precisión. En el caso de picos no resueltos es posible asignar el área a cada componente proyectando

perpendicularmente de mínimo del valle a la línea base corregida. Algoritmos especiales distribuyen el área de cada componente en el caso de picos sobrepuestos.

## **METODOS DE EVALUACIÓN:**

Los tres métodos principales de evaluación son: 1) calibración con patrones o estándares, 2) normalizaciones del área y 3) estándar interno. Cada uno tiene su lugar, dependiendo de la naturaleza del análisis.

**Calibración con estándares:**(Estándar externo) Cuando el volumen de la muestra es conocido con frecuencia se utiliza la calibración con estándares o patrones. Tiene la ventaja de que sólo se necesita medir las áreas de los picos de interés. Es un requisito que cada vez se inyecte la misma cantidad de muestra. Los estándares necesarios deben analizarse bajo las mismas condiciones de operación que la muestra. Las concentraciones porcentuales se obtienen por medio del cálculo de la proporción entre el volumen de cada componente de interés y el tamaño de la muestra. En la práctica, se preparan las soluciones estándar de (los) componente (s) de interés y se inyectan en el cromatógrafo. Luego, para el cálculo de una concentración desconocida,

$$X = (\text{área}) \times K$$

Donde K es la constante de proporcionalidad (pendiente de la curva de calibración).

Deben tomarse en cuenta factores de respuesta relativos al convertir áreas a volumen, cuando la respuesta de un detector dado difiere para cada tipo molecular o clase de compuestos. Los factores de respuestas se obtienen mejor analizando muestras estándar.

**Normalización del área:** Cuando se sabe que el cromatograma representa la muestra completa, que todos los componentes se han separado y que cada pico se ha resuelto completamente; se puede utilizar la normalización de las áreas para la evaluación. Para utilizar este método, se mide el área calculada del pico. Sumando todas estas áreas de los picos se obtiene el área total

calculada. El porcentaje en volumen de los componentes individuales se obtiene multiplicando el área calculada por 100 y luego dividiéndola entre el área total calculada.

**Estándar interno:** El método de estándar interno permite que varíen las condiciones de operación entre muestra y muestra y no requiere de repetibilidad en las inyecciones. El estándar interno debe ser un compuesto que pueda resolverse completamente de los picos adyacentes, que no esté presente en la muestra problema y que no produzca ningún efecto interferente. Una cantidad conocida de este estándar se separa por mediante cromatografía y se gráfica el área contra la concentración. Entonces se añade una cantidad conocida del estándar a la mezcla desconocida. Cualquier variación en el tamaño de la muestra se evidenciará inmediatamente al comparar el área del pico del estándar interno en corridas diferentes. Así se puede utilizar un factor de corrección al determinar la concentración exacta de los otros componentes.

### **2.2.1.- CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS**

La cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM), ha demostrado ser el estándar internacional por sus grandes posibilidades y su fiabilidad. Esta metodología como su nombre indica implica dos técnicas: una técnica de separación que es la cromatografía de gases y una técnica de identificación que es la espectrometría de masas. En la primera, los componentes son calentados directamente en la fase gas o derivados para hacerlos lábiles y facilitar su volatilización. Estos atraviesan una columna que contiene la fase estacionaria, que a menudo, consiste en un líquido, habitualmente un hidrocarburo o un aceite de silicona, que reviste el soporte sólido de la columna y ofrece una gran superficie para la absorción. La separación se basa en la capacidad de cada compuesto para absorberse sobre la fase estacionaria, lo cual depende parcialmente de las solubilidades relativas de compuesto en la fase gas contra su solubilidad en la base líquida. Una vez que los compuestos se encuentran en la fase gaseosa y son calentados, pueden obtenerse ventajas de otras de las características del sistema, la capacidad de los compuestos que han sido calentados a altas temperaturas para perder o ganar electrones.

En altas temperaturas los electrones de máxima energía del compuesto son de mínimo potencial de ionización, pueden ser excitados de modo que la molécula pierda o gane electrones y quede cargada. Este proceso puede ser ayudado por artefactos técnicos como el bombardeo de electrones en una cámara especialmente diseñada que crea directamente moléculas iones.

El espectrómetro de masas es un detector universal para cromatografía de gases, ya que cualquier compuesto que pueda pasar a través de un cromatógrafo de gases se convierte en iones en un espectrómetro de masas. Al mismo tiempo, la naturaleza altamente específica del espectro de masas hace de él un detector de cromatografía de gases muy específico. La cromatografía de gases es un separador ideal, mientras que la espectrometría de masas es excelente para la identificación. El objeto de un arreglo de acoplamiento es el de operar tanto el cromatógrafo de gases como el espectrómetro de masas sin degradar el funcionamiento de ninguno de los instrumentos. Un problema de incompatibilidad es la diferencia entre las presiones requeridas para operar el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas. Mientras que el primero opera a presiones altas, el último está diseñado para trabajar al alto vacío. Un problema asociado es la presencia de mucho gas transportador y poca muestra en la descarga del cromatógrafo de gases.

Actualmente existen en el mercado varios tipos de espectrómetros de masas para el trabajo de GC-MS. Tres características afectan la compatibilidad de las unidades de GC-MS: Velocidad de barrido, sensibilidad e intervalo dinámico útil. La conmutación rápida de los picos es importante para los análisis cualitativo y cuantitativo con selección múltiple de iones. En los instrumentos de sector magnético, los electroimanes muestran una especie de inercia, llamada reluctancia, que limita la velocidad a la cual el magneto puede ser obligado a cambiar la fuerza del campo. Este fenómeno limita las velocidades de barrido a 0.1 s/década (una década es, por ejemplo, 50-500 unidades de masa). Se necesitan alrededor de 0.2 s para restablecer el magneto entre los barridos. Así, la velocidad de repetición de los barridos para un instrumento de sector magnético es de 3-4 Hz.

En los filtros de masas de cuadrupolo se puede alcanzar una velocidad máxima de barrido de alrededor de 780 unidades de masa por segundo. Se puede lograr velocidades de barrido algo mayores aumentando la energía de ionización simultáneamente con la rampa de barrido de masas, para mantener una velocidad de iones más constante y reducir el tiempo de tránsito de los iones más pesados. La velocidad de repetición de barridos máxima útil es de 4-8 Hz. La escala de masas lineal de un filtro de masas de cuadrupolo es idealmente adecuada para el control digital, un aspecto que es importante en el análisis de rutina con alta producción de muestras y para la operación desatendida.

En el trabajo con GC-MS sólo es necesario medir las masas nominales. Es suficiente con un espectrómetro de masas de cuadrupolo de baja resolución. El pico molecular y los picos de los fragmentos forman un patrón que, con experiencia, puede interpretarse o compararse con espectros de referencia. Si se requieren las masas precisas, se necesita un espectrómetro de masas de alta resolución; éste es el dominio de los instrumentos de sector magnético.

Los espectrómetros de masas pueden usarse como detectores para cromatografía de gases en tiempo real. La corriente total de iones se mide y se registra como una función del tiempo. Es una medida del número total de iones formados del material en el eluyente. En la detección con iones selectivos, durante el ciclo de elución se registran las intensidades de iones preseleccionados, característicos de un compuesto en particular o de una clase de compuestos. Esta técnica es favorable para los análisis que requieren de la máxima sensibilidad, particularmente en el trabajo ambiental o biológico. Con la detección múltiple de iones las intensidades de dos o más iones preseleccionados se registran como una función del tiempo. Para lograr esto el analizador del espectrómetro de masas cicla por el grupo de iones que se registran, conmutando cada uno al detector en turno. La intensidad de cada uno de los iones se registra varias veces por segundo. La detección múltiple de iones es útil para descubrir picos sobrepuestos y cuando se ensaya con un isótopo estable incorporado a las moléculas de la muestra. La técnica también puede aplicarse a estudios cuantitativos en los que se usan isótopos estables como estándares internos.

Las ventajas principales de un espectrómetro de masas, como detector para cromatografía de gases, son su mayor sensibilidad y su especificidad en la identificación de desconocidos en la confirmación de la presencia de compuestos. El aumento en la sensibilidad es principalmente el resultado de la acción del analizador como un filtro de masas para reducir la interferencia de fondo y de los multiplicadores de electrones sensibles que se usan para la detección. La excelente especificidad es el resultado de los patrones de fragmentación característicos que proporcionan información acerca del peso y la estructura molecular.

La mayoría de éstas moléculas iones son cationes sueltos, estas moléculas en general tienen tamaños y pesos moleculares diferentes y se descomponen en fragmentos característicos cuyas proporciones y posiciones de migración son constantes. Las moléculas iones se pasan a través de un campo eléctrico generado por cuatro varillas que son sometidas a corrientes rápidamente alternantes, o llamado detector cuatripolar según como sea <<Sintonizado>> el campo, ciertas moléculas iones son proporciones específicas entre su masa y su carga pueden pasar a través del

campo hasta el detector. Así las moléculas iones pueden separarse sobre la base del peso molecular ó más exactamente de su proporción masa-carga.

La presencia de la molécula-ion sobre la placa se detecta mediante un sistema detector multiplicador de carga. La técnica CG-EM ha alcanzado un alto grado de refinamiento. Cada molécula-ion creada en la fase gaseosa puede sufrir nuevos cambios, como reacciones de eliminación, redistribución y una nueva degradación a pequeños fragmentos, los cuales se ionizan y dan patrones de descomposición característicos.

Hasta ahora se han determinado los patrones de miles de compuestos. La posición de la molécula-ion originaria del compuesto y los fragmentos de descomposición dan origen a un patrón de iones característico para ese compuesto, toda la metodología ha tenido un gran éxito en la detección de niveles, incluso los más bajos en drogas (10 mg/dl), y/o sus metabolitos en los que garantiza inequívocamente su presencia, lo que hace de esta técnica el método final de referencia y el mejor procedimiento de prueba confirmatoria de que se dispone en la actualidad.

## **2.3 GENERALIDADES DE LAS DROGAS DE ABUSO EVALUADAS EN ESTE TRABAJO**

### **2.3.1. COCAINA**

La cocaína es el principal alcaloide de la *Erythroxylon Coca*, planta de tallo medio (hasta 2,50 m de altura) con una difusión amplia de la América meridional (Cordillera Andina), África, India e Indonesia. La concentración de droga obtenida de una planta única sería en proporción inversa a su ritmo de crecimiento: Los ejemplares más ricos en alcaloides son aquellos de menores dimensiones o bien aquellos que han crecido más allá de los 500 metros de altitud.

La acción psicoestimulante de la cocaína era ya conocida y utilizada por los antiguos incas que por otro lado hicieron un uso rígidamente circunscrito a la esfera ritual (ceremonias religiosas): las hojas se masticaban junto a una cierta cantidad de álcali (cal o ceniza) que liberaban el alcaloide (básico) haciéndolo fácilmente absorbible a través de la cavidad oral. Los conquistadores españoles difundieron ampliamente el consumo de la droga distribuyéndola entre los esclavos que podían de este modo trabajar durante más de un día sin alimento ni descanso, también en actitudes elevadas.

La Erythroxilon coca fue importada en Europa en el pasado siglo y el químico alemán Niemann aisló el principal alcaloide, denominándolo "cocaína". Las drogas, recogidas de ejemplares de al menos dos años de edad, son generalmente sometidas a desecación, y transformadas en un homogeneizado (pasta de coca).

Bajo esta forma, la cocaína llega a ser pronto popular como droga de efecto anorexígeno, tónico y euforizante; es sometida sucesivamente a la atención del mundo científico por Sigmund Freud, que la utilizó como alternativa desafortunada en la de deshabituación de los morfinómanos. El principio activo también es utilizado varias preparaciones comerciales: entre las más difundidas, recordemos el "Vin Mariani" (vino de coca) y el prototipo de la Coca-Cola (cocaína y cafeína en vehículo almibarado), originariamente empleado como remedio contra el dolor de cabeza(12)

La cocaína puede ser ingerida por varias vías: inhalada ('snorting') inyectada por vía intravenosa (habitualmente mezclada con heroína), o bien fumada. La venta se hace generalmente bajo forma de nitrocloruro salino, un polvo blanquecino que contiene cerca del 25% de principio activo habitualmente 'cortada' con azúcares (manitol, lactosa, sucrosa), sustancias psicotrópicas (cafeína, efedrina), anestésicos (lidocaína, procaína).

El llamado 'crack' es un producto de la precipitación de la sustancia activa después del calentamiento del cloruro de cocaína en presencia de bicarbonato o amoníaco; la droga se coagula en 'ladrillos' que pueden ser desmenuzados en cristales y fumados. La combustión produce un característico crujido (cracking), que da el nombre a la preparación. El rápido y enérgico efecto euforizante es la base del abuso de la cocaína, que se extiende con rapidez vertiginosa(13)

En los Estados Unidos, la población de consumidores es evaluada en 4-6 millones de individuos, comprendiendo prácticamente todas las clases sociales; la limitación del consumo impuesta por el elevado costo de la droga purificada es en efecto venida a menos desde que hay disponibles preparaciones más potentes y económicas(14)

### **2.3.1.1 FARMACOLOGIA DE LA COCAINA**

La cocaína es un derivado del ácido benzoico (éster benzoico del aminoalcohol ecgonina). Químicamente tiene la estructura de una base azoada, análoga a la atropina, presentando efectos farmacológicos completamente distintos. En la base del potencial efecto anestésico, obtenible



mediante suministro a dosis bajas, es el bloqueo del flujo de sodio a través de la membrana neuronal, con la consiguiente elevación del umbral de excitación celular(15)

Los efectos principales son, sin embargo, la estimulación de la liberación de adrenalina y noradrenalina y el bloqueo de su recaptura postsináptica; después de la toma de la droga, se observa en efecto un cuadro de estímulo adrenérgico, con midriasis, vasoconstricción y taquicardia. Paralelamente se manifiesta un efecto subjetivamente euforizante, con aumento del tono psíquico y consecuentemente de la estima de sí mismo, tendencia a la hiperactividad, hiperestimulación sexual. A la fase de estimulación central, la sustituye sin embargo rápidamente un rebote depresivo de la actividad cortical; el deseo de prevenir estos efectos indeseables desencadena en el cocainómano la espiral de automantenimiento con la ingestión de la sustancia. La intoxicación por cocaína es clínicamente indistinguible de la de amfetamina(16).

Pueden manifestarse alucinaciones sensoriales, temblores, irritabilidad, sudoración, confusión mental; objetivamente es frecuente la elevación del ritmo cardiaco e hipertensión. La dosis mínima letal es evaluada en torno a los 1 a 2 gramos en sujetos no habituados. También se dan intoxicaciones mortales a veces por absorción mucosa de cantidades mucho menores (alrededor de 30 mg); en estos casos raros, la sintomatología está impresa de un estado agudo, con fiebre elevada, convulsiones, shock.

El consumidor crónico está frecuentemente sujeto a temblores, sudoración y disturbios psíquicos con alteración de la percepción subjetiva; si la droga es habitualmente inhalada, se observa comúnmente rinitis crónica, con posibles perforaciones del tabique nasal. En un cuadro de consumo habitual una dosis excesiva provoca a veces rotura de vasos pequeños, convulsiones epileptiformes, descompensación cardiocirculatoria en sujetos predispuestos. El efecto anorexígeno y excitante de la droga lleva a la larga a malnutrición y decaimiento orgánico, exponiendo al sujeto al riesgo de infecciones.

### **2.3.1.2 METABOLISMO DE LA COCAINA**

Tres principales metabolitos de la cocaína son la benzoilecgonina, la metilecgonina éster y la norcocaína (cuyo nitrato tiene acción hepatotóxica). Los enzimas (esterificados) que catalizan la escisión del compuesto son preponderantemente difundidos en el plasma y en el hígado; los enzimas parecen tener menor afinidad por la cocaína, pero más rápida cinética de reacción.

Según la modalidad de consumo (en el 60% de los casos la droga es insuflada en la cavidad nasal -'snorting'- cerca del 20% fumada y otro 20% por vía intravenosa), la droga presenta características farmacocinéticas diferentes.

Las curvas de absorción y eliminación son muy semejantes después de la ingestión con humo o por vía endovenosa, dado que en ambos casos las concentraciones en sangre alcanzan la fase estacionaria después de cerca de 5 minutos; sin embargo, la biodisponibilidad de la sustancia fumada es solamente del 57% y esto explica por qué los fumadores de cocaína toman la droga en dosis mucho mayores que las habituales para los consumidores por vía endovenosa. Después del consumo intranasal, la máxima concentración plasmática es alcanzada sólo después de 45 minutos.

Estos datos se han verificado también indirectamente, midiendo el metabolito benzoil-ecgonina en el suero: después de la administración intranasal, el 'plateau' hemático se alcanza con más retraso y se mantiene estable durante cerca de 4 horas, mientras que en el caso de la administración endovenosa o mediante el humo, la cinética de formación de metabolitos es mucho más rápida. Las concentraciones encefálicas de noradrenalina y dopamina parecen aumentar muy rápidamente después de una dosis elevada de cocaína; sin embargo este aumento es de breve duración siendo pronto seguido de un descenso por debajo de los valores normales.

En el plano del comportamiento, estas modificaciones biomoleculares corresponden a una fase psicológica que los autores anglosajones han definido con el término de "cokecd out": los procesos de las ideas se hacen difícil y el individuo se vuelve receloso, agresivo, a menudo afectado por ideas paranoicas. También se contrae una verdadera dependencia física que ha sido rápidamente observada en 'síndrome' de suspensión de la droga, que se manifiesta con irritabilidad, estado depresivo, debilidad e hiporreactividad sexual; tales síntomas no pueden ser interpretados exclusivamente por su base psicopatológica y tenemos que asumir su efecto sinérgico siendo el deshabitamiento de la cocaína extremadamente arduo.

### **2.3.2. ANFETAMINAS**

La anfetamina fue sintetizada en 1887 por Eldeleano; sin embargo muchos años después llegó a ser descubierta la principal actividad farmacológica de esta molécula. En 1932 fue

comercializada por primera vez como descongestionante nasal y en 1937 se registraron nuevos compuestos de anfetamina como fármacos broncodilatadores, anorexígenos y antidepresivos. Paralelamente a la difusión de su empleo terapéutico, se hicieron evidentes los efectos indeseables de esta sustancia y su alto potencial de abuso. A pesar de las repetidas muestras de advertencia de la peligrosidad de esta molécula, sólo en 1971 fue retirado del comercio en los Estados Unidos el último descongestionante basado en anfetamina que podía ser adquirido sin receta médica.

Hay que hacer notar que por sus propiedades estimulantes, la anfetamina se usa típicamente por estudiantes, camioneros, y atletas que quieren mejorar su rendimiento y resistencia a la fatiga. La disponibilidad de fármacos nuevos y más seguros ha deslegitimado el uso de la anfetamina para el tratamiento de la obesidad y de la depresión. Por lo tanto, la venta de anfetaminas está hoy mantenida sobre todo por millares de laboratorios clandestinos, que producen ilegalmente esta sustancia ayudados por la relativa simplicidad de síntesis de las mismas.

La anfetamina y la metanfetamina se presentan generalmente como sales de azufre y cloro, teniendo el aspecto de polvos blancos e inodoros de sabor amargo, y solubles en agua y alcohol relacionados con estos dos compuestos, toda una serie de sustancias químicamente relacionadas con la beta-feniletilamina van a constituir el heterogéneo grupo de los 'anfetamínicos'. Entre estos figuran sustancias usadas durante años en terapia (fentermina), así como otras sin ningún interés clínico destinadas al uso y abuso voluntario Metilen Dioxi-anfetamina, metilen dioximetanfetamina (MDA, MDMA)(17).

Es preciso además recordar aquellas aminas biogéneas, que no siendo consideradas 'anfetamínicos', están en realidad estrechamente relacionadas bajo el perfil estructural y farmacológico (dopamina, norepinefrina...).

### **2.3.2.1 FARMACOLOGÍA DE LA ANFETAMINA.**

La anfetamina es una molécula ópticamente activa, presente en forma racémica en las preparaciones comunes. La acción farmacológica más importante es debida al poder estimulante sobre el Sistema Nervioso Central SNC. Objetivamente es posible advertir un aumento de la

frecuencia cardíaca y de la presión sistólica y diastólica, mientras subjetivamente se advierte una mejoría en el estado de ánimo, de la resistencia a la fatiga física, mental y de la autoestima.

En el momento que el rendimiento físico e intelectual mejora, es fácil comprender el deseo de mantener estos efectos, aparentemente beneficiosos, con tomas repetidas que llevan pronto a un estado de dependencia psíquica y también física. Este efecto auto-reforzante está también ligado al fenómeno 'rebound' que se manifiesta con depresión y astenia al suspender la acción de la droga(15).

En realidad los efectos ejercidos por la anfetamina son debido a la liberación de neurotransmisores al nivel de las sinapsis nerviosas, en particular epinefrina, norepinefrina y dopamina. Algunas manifestaciones psicóticas más frecuentes después de la toma de dosis elevadas de anfetaminas, están probablemente ligadas a la liberación de 5-hidroxi triptamina de las neuronas triptaminérgicas

No obstante los potentes efectos ejercidos, las intoxicaciones mortales por anfetamínicos son más bien raras. La muerte sobreviene de cualquier modo en un cuadro de hiperpirexia, convulsiones, coma y hemorragia cerebral. La dosis letal para el hombre varía grandemente en relación con las características individuales y a la eventual habituación. De cualquier modo está alrededor de 20-25 mg/kg de peso corporal.

### **2.3.2.2 METABOLISMO**

La anfetamina se metaboliza en el hígado, principalmente sufriendo procesos de desaminación como mínimo en un 25% excretándose bajo la forma fenil-acetona, ácido benzoico y ácido hipúrico. Por hidroxilación se obtienen también 4-hidroxinoanfetamina, 4-hidroxi-norepinefrina, en un porcentaje de alrededor del 10% de la dosis.

Normalmente alrededor del 30% de la dosis se excreta sin modificar con la orina; sin embargo este dato está muy influenciado por el pH de la orina(18).

En efecto, mientras en orina alcalina la anfetamina se presenta en forma no ionizada y se reabsorbe en gran cantidad en los túbulos renales, en orina ácida sucede lo contrario y la excreción tiene lugar mucho más rápidamente. En términos numéricos se pasa de un 2-3% de

anfetamina excretada no modificada en orina a pH 8, a un 74% de droga excretada no modificada en la misma orina a pH 5.

El flujo urinario tiene, de cualquier modo, un efecto modesto sobre la velocidad de eliminación de la anfetamina.

La anfetamina es una base relativamente débil (pK 9,7-9,9) y se absorbe mejor a nivel intestinal que gástrico. La absorción se completa normalmente alrededor de 4-6 horas después de la ingesta. La concentración en sangre tras la administración de dosis terapéuticas, es baja a causa de la débil unión a las proteínas plasmáticas (16%) y del gran volumen de distribución (3,2-5,6 l/Kg). No hay una correlación definida entre la concentración plasmática y el efecto psicotrópico.

Está demostrado que la anfetamina también puede encontrarse en la leche humana a concentraciones 7 veces más altas que en el plasma materno; en un caso señalado por Steiner también estaban presentes trazas de una anfetamina en la orina de un neonato amamantado por la madre, narcoléptica, tratada con anfetaminas.

Entre otras ventajas del método recordamos el cut-off ajustable con relación a las exigencias del Laboratorio, la sensibilidad manifestada, la reactividad cruzada despreciable hacia efedrina y fenilpropanolamina.

### **2.3.2.3 INTERFERENTES ANFETAMINAS**

La mayoría de los remedios para el resfriado y los supresores de apetito contienen sustancias que pueden tener reactividad cruzada con los reactivos utilizados para el análisis de anfetaminas. Químicamente, tiene características similares y están consideradas como una familia de drogas llamadas aminas simpatomiméticas. Si las aminas simpatomiméticas dan un resultado presuntivo positivo en la orina. Por lo tanto es de vital importancia realizar la prueba confirmatoria por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas(18).

#### **Aminas Simpatomiméticas**

- Cloroprenalina
- Efedrina
- Etafedrina

- Isoetarina
- Isopenalina
- Metoxifenamina
- Metilefedrina
- Fenilpropalamina

### **Medicamentos de consumo:**

Algunos fármacos que se venden sin receta médica utilizados para auto-medicación pueden interferir en los inmunoensayos ocasionando resultados positivos. A pesar de que los métodos están diseñados para minimizar problemas, algunos métodos reaccionan con un gran número de medicamentos de consumo comunes. Productos tales como antihistamínicos pueden reaccionar con análisis presuntivos de anfetaminas.

### **2.3.3. CANABINOIDES**

La Cannabis Sativa ha sido usada durante siglos por diversas sociedades. Se estima que en el día de hoy aproximadamente 18 millones de americanos son consumidores de marihuana. En los últimos veinte años nuestra comprensión sobre su farmacología y farmacocinética ha mejorado considerablemente, también gracias a la disponibilidad de técnicas analíticas sensibles y específicas para la dosificación del Delta-9-Tetrahidrocannabinol (THC) y de sus metabolitos en los fluidos biológicos.

La Cannabis Sativa se usa en forma de marihuana y de hachís; la primera constituida por hojas e inflorescencias secas, mientras el hachís es la resina obtenida de las inflorescencias mediante diversos procedimientos. El constituyente psicoactivo principal de ambas preparaciones es el THC, presente sin embargo en diversas concentraciones en los dos preparados.

En efecto, mientras la marihuana contiene del 1-7% de THC, el porcentaje medio presente en el hachís es muy superior, pudiendo llegar en el caso del aceite de hachí, hasta el 60% de principio activo. Junto al THC, la Cannabis Sativa contiene aproximadamente otros 400 compuestos, 60 de los cuales conocidos con el nombre de canabinoides, están presentes únicamente en esta especie. Muchas de estas sustancias están contenidas en la marihuana y en el hachís bajo forma de precursores que la pirólisis descompone en forma libre y activa.

La marihuana y el hachís tienen un alto potencial de abuso; la vía de ingestión más común es el humo, aunque está documentada también la ingestión por vía oral. Mediante el humo, la concentración plasmática de THC alcanza el pico entre 15-20 minutos y aparece una sensación subjetiva de euforia.

El uso crónico puede comprometer la memoria en breve tiempo y dañar el sistema inmunitario y reproductivo. De forma similar a lo que sucede en los fumadores de tabaco, también en los fumadores de marihuana aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, aunque no está todavía cuantificado, pero es ciertamente importante, el papel jugado por la marihuana y el hachís en los accidentes de tráfico y de trabajo(19)

### **2.3.3.1 FARMACOLOGIA DE LOS CANNABINOIDES**

En su libro "Hachís y enfermedad mental" publicado en 1845, Moreau daba una clara descripción de los efectos psicológicos de la Cannabis Sativa. El escribe: "El hachís da a todo aquel que se encuentra bajo su influencia el poder de experimentar las desviaciones de la enfermedad mental, o al menos los principales desordenes intelectuales que se originan en toda clase de problemas mentales".

En sus experimentos Moreau probablemente suministraba unas dosis de 50-100 mg de THC por vía oral, mientras la mayoría de las ingeridas hoy son de 1 - 10 mg. Esta diferencia de dosis explica el hecho de que actualmente se describen sus efectos como una sensación de euforia, relajación, somnolencia, moderadas alteraciones de la percepción y un alterado sentido del paso del tiempo más bien que como una desagradable experiencia psicótica.

Las sensaciones que aparecen aproximadamente 20 minutos después de haber empezado a fumar, está influenciada por muchos factores no farmacológicos, como la personalidad del consumidor y de su expectativa.

Como se ha dicho, los efectos agudos de la Cannabis son las alteraciones de la percepción, las ideas y de las funciones psicomotoras. En consecuencia se llevan a cabo notables esfuerzos en la búsqueda de valorar los efectos del THC sobre la conducta(15).

Los efectos fisiológicos de la marihuana como los psicológicos, dependen de la dosis. Los efectos cardiovasculares están entre los más fácilmente medibles; durante el uso de la marihuana la frecuencia cardiaca puede subir hasta 160 pulsaciones por minuto, acompañándose de una disminución de la presión ortostática.

Cabe pensar que la habituación al humo de marihuana pueda producir enfermedades obstructivas y lesiones precancerosas de las vías respiratorias del tipo de las que se observan en los fumadores de cigarrillos.

Parece que se desarrolla una cierta tolerancia a muchos de los efectos del THC; en algunos casos se acompaña también de una moderada dependencia física. Tal dependencia fue observada en voluntarios sanos a los que se suministraba THC. Algunas horas después de la última dosis los voluntarios mostraban señales de irritabilidad, disminución del apetito, alteraciones del sueño, sudoración, vómitos y diarrea. Estos signos y síntomas desaparecen después de la administración de pequeñas dosis orales de marihuana.

#### **2.3.3.2 METABOLISMO DE CANNABINOIDES**

Los Cannabinoides se transforman rápidamente en un gran número de metabolitos, tanto en vivo como in vitro. Entre los primeros metabolitos producidos por el hígado y en particular del citocromo P450, mencionamos los derivados monohidroxilados. Estos son ulteriormente transformados en derivados polihidroxilados y sucesivamente en cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos. Halldin y colaboradores mediante estudios in vitro con hígados humanos y en vivo con voluntarios sanos, han demostrado que el metabolito mayor producido por el hígado humano es el 11-hidroxi-THC. De cualquier modo, el principal metabolito encontrado en el plasma y en la orina es el ácido 11-nor-THC-9-carboxílico.

El factor limitante en la eliminación del THC es el lento retorno de esta sustancia de los tejidos al plasma; en efecto, la mayoría de los trabajos indica vida media de 20 horas o más. A causa de esto el THC se acumula en el plasma de los consumidores habituales. Esto explica presencia de concentraciones medibles de THC muchas horas y también muchos días después de la última ingestión.



Las técnicas inmunoquímicas miden una cantidad de diversos metabolitos de cannabinoides, aún cuando los anticuerpos usados son específicos para el núcleo benzopirámico. Por esta razón concentraciones de carboxi-THC, determinadas por una técnica cromatográfica específica serán más exactas que las concentraciones medidas por análisis inmunoquímico.

La marihuana y el hachís se fuman con frecuencia en situaciones sociales en que no todos los presentes fuman la droga. Algunos Investigadores han presentado la hipótesis de que los no fumadores pueden Inhalar pasivamente THC, determinando la presencia de THC o de sus metabolitos en la sangre, en el plasma y en orina.

Esta tesis puede explicar algunos casos de respuesta positiva en individuos que seguramente no han hecho uso de Cannabis. Sin embargo numerosos estudios subrayado que sólo en situaciones extremas es posible alcanzar valores relevantes con los métodos inmunoquímicos o con la GC/MS. Como ejemplo Law colaboradores han estudiado seis voluntarios que fumaban marihuana en una pequeña estancia (V 27950 litros), en presencia de cuatro no fumadores. estos últimos les fueron extraídas muestras de sangre después de 1, 2, 3 y 6 horas del inicio de la exposición al humo. Las muestras fueron analizadas mediante un método RIA haciendo uso de un 'cut-off' de 2 ng/ml. No se midió ningún cannabinoide en las muestras del plasma de ninguno de estos sujetos. Por el contrario la orina mostraba concentraciones bajas de cannabinoides; la máxima concentración era de 6,6 ng/ml. Ninguno de los no fumadores había advertido los efectos subjetivos al uso de la marihuana.

### **2.3.3.3. INHALACIÓN PASIVA**

La inhalación pasiva del humo de la marihuana de otros fumadores en un área confinada se ha establecido como una razón para un resultado positivo de una prueba de cannabinoides. Se han realizado varios estudios al respecto. En resumen, los estudios no han demostrado que la orina contenga cannabinoides en una concentración superior a 20 ng/ml cuando el sujeto ha estado pasivamente expuesto a fumadores constantes de marihuana por períodos prolongados. También se ha demostrado respuesta psicoactiva a la droga después de una inhalación pasiva pero sólo después de la exposición al humo bajo condiciones muy severas. Los investigadores concluyen que la inhalación pasiva puede dar un resultado positivo de cannabinoides, pero las condiciones de exposición deben ser muy intensas las cuales son poco probables que existan fuera de una cámara de un laboratorio experimental.

La evidencia confirma que el consumo por ingestión de cannabis o hachís puede producir concentraciones detectables de THC en la orina. El consumo de la droga también causará los efectos subjetivos esperados, y una ingestión inadvertida puede ser detectada probablemente por el sujeto. Sin embargo, la ingestión inadvertida puede ser utilizada como defensa en un asunto legal.

## DROGAS DE ABUSO

Sustancia	Nombres comunes	Forma	Uso	Posibles daños	Periodo de detección en orina*	Síntomas de abuso
Alcohol	Whiskey, vino, licor, brandy, vodka, cerveza, etc.	Líquido	Tomado oralmente	Enfermedad del hígado, falla respiratoria, depresión, ansiedad, coma, dependencia psicológica/física	24 horas o menos	Uso frecuente y necesidad de alcohol; deterioro de las capacidades físicas y/o mentales.
Anfetaminas	Dexedrina Bencedrina Desoxyn Methedrina	Cápsulas o tabletas	Oral, inyectado o inhalado	Alta presión sanguínea, pérdida de apetito, apoplejía, fiebre, falla cardíaca, psicosis.	2-4 días o más	Agitación, inquietud, frecuencia cardíaca y presión sanguínea incrementada, insomnio, irritabilidad, posible psicosis.
Barbitúricos	Butizal, Fiorinal, Lotusate, Luminal, Nembutal, Seconal, Amytal	Cápsulas o tabletas	Oral	Falla respiratoria, depresión, ansiedad, convulsiones, insomnio, coma, psicosis, dependencia psicológica/física, muerte	1-21 días o más	Somnolencia, disartria, marcha tambaleante, desorientación.
Benzo-diacepinas (tranquilizantes)	Valium, Clonopin. Ativan. Centrax	Cápsulas o tabletas	Oral	Falla respiratoria, depresión, ansiedad, convulsiones, insomnio, coma, dependencia psicológica/física, muerte	3 días o más	Somnolencia, marcha tambaleante, desorientación.
Canabinoides)	Marihuana Hashish	Hierba seca con semillas y tallos	Fumado o comido	Daño al corto tiempo en la memoria y pulmones, psicosis, dependencia psicológica, defectos congénitos	1-36 días o más	Discurso rápido, fuerte, ligera agitación, posible estupor con discurso lento, las pupilas pueden estar dilatadas.
Cocaína	Coca Crack	Líquido o polvo	Inhalado, inyectado o fumado	Daño en los pasajes nasales, pérdida de peso, alta presión sanguínea, ataque cardíaco, convulsiones, apoplejía, dependencia psicológica/física.	Hasta 72 horas.	Boca y nariz seca, insomnio, euforia, inquietud, irritabilidad, agitación, pupilas dilatadas con altas dosis.
Opiáceos	Heroína y morfina	Cristales, líquido, polvo o tabletas	Oral, inyectada, inhalada o fumada	Náusea, vómito, pérdida de apetito, falla respiratoria, convulsiones, coma, adicción psicológica y física, muerte.	2-5 días o más	Somnolencia, pupilas contraídas, cicatrices de aguja.
Fenciclidina (PCP)	PCP Polvo De Ángel	Cápsulas, líquido, polvo, o tabletas	Tomado oralmente, inyectada o fumada	Sentido y coordinación torpe, depresión, ansiedad, conducta violenta, convulsiones, alta presión sanguínea, falla cardíaca, coma, muerte.	8-55 horas	Posible conducta psicótica, extravagante, respuesta impredecible, posible sedación.

\* Sólo como estimado. El periodo de tiempo en que la droga permanece evidente en una muestra de orina esta afectado por la cantidad ingerida, la frecuencia de uso, la edad, peso, salud y química corporal del individuo.

### 3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En nuestro país ha surgido la necesidad de realizar detección del consumo de drogas de abuso principalmente en ambientes laborales. La seguridad en la operación de maquinaria o la conducción de algún tipo de transporte, además de la portación de armas por diversos elementos de seguridad, ha obligado a que Instituciones públicas y privadas implementen de manera constante el análisis de detección del consumo de drogas de abuso coloquialmente conocido como "antidoping", este análisis evalúa el consumo de un perfil de pruebas que son determinadas por la Institución.

El realizar este tipo de análisis obliga a los laboratorios a emitir un dictamen denominado toxicológico, que trae como consecuencia problemas médicos, químicos y legales, si el laboratorio no avala de una manera sólida sus resultados.

El desconocimiento y el no brindar la importancia a la confirmación de las muestras positivas, ha provocado que muchos laboratorios que realizan este tipo de análisis, se encuentren involucrados en problemas legales, debido al impacto que provocó en la vida laboral, social y familiar de un individuo, el dictaminarlo como positivo sin haber realizado la prueba confirmatoria.

La confirmación por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, es actualmente la prueba que nos otorga, el más alto nivel de confiabilidad con un respaldo legal y científico.

Por lo anterior se considera necesario realizar el esfuerzo de destacar la importancia de la incorporación de la prueba confirmatoria en los esquemas de detección del consumo de drogas de abuso en ambientes laborales.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

1. Destacar la importancia de confirmar por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas los resultados presuntos positivos a metabolitos de cocaína, cannabinoides y anfetaminas, obtenidos por diferentes técnicas inmunoquímicas.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

2. Describir y evaluar cromatogramas y espectros de masas de las tres principales familias de drogas de abuso (Cocaína, Cannabis y Anfetaminas)
3. Calcular el porcentaje de falsos positivos de diferentes métodos inmunoquímicos en la detección de drogas, durante seis meses.

## **5. HIPOTESIS**

Si los laboratorios que están actualmente detectando el consumo de drogas de abuso con pruebas preliminares, incorporaran en su esquema la prueba confirmatoria por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, entonces se garantizarían que cuentan con un resultado con amplio sustento legal y científico, además de que el costo de las confirmaciones realizados a los presuntos positivos, podría ser costeadado por las muestras negativas.

## **6. DISEÑO DE INVESTIGACION**

### **6.1 EQUIPO, MATERIAL Y MÉTODOS.**

Cromatógrafo Varian Star 3400 Cx  
Detector: Espectro de masas Saturno 2000  
Baño María  
Termómetro -10 a 110°C  
Tubos de ensaye 18x150 mm  
Tubos de ensaye 18x100 mm  
Embudo  
Vasos de precipitado 100, 200, 600, 1000ml.  
Gradilla  
Probetas 10,25,50,100ml.

Matraz aforado de 50ml.  
Frascos ambar de 500ml.  
Dispensor de 1 en 10ml.  
Matraz erlenmeyer de 250ml.  
N-heptano grado HPLC  
Alcohol metílico grado HPLC  
Acetato de etilo grado HPLC  
Dicloro metano grado HPLC  
Alcohol etílico grado HPLC  
Cloroformo grado HPLC  
Acetona grado HPLC  
Acido acético glacial grado analítico  
BSTFA ( BIS-TRIMETHYLSILIL-TRIFLUOROACETAMIDA)  
TMCS (TRIMETIL CLOROSILANO)  
Bicarbonato de sodio grado analítico  
Hidróxido de sodio perlas bajo en carbonatos  
Nitrógeno comprimido grado 4.8  
Helio comprimido ultra alta pureza  
Aire comprimido grado extra seco  
Benzoilecgonina 1.0 MG/ML  
Cannabis (THC-COOH) 0.1 MG/ML  
Anfetamina 1.0 MG/ML

## **Técnicas a emplear**

### *Análisis preliminar*

- ⊗ Técnicas inmunocromatograficas presuntivas de campo del tipo placas cualitativas
- ⊗ Técnica de Inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT) con equipo automatizado.

### *Análisis confirmatorio*

- ⊗ Técnica de pretratamiento basada en extracciones liquido-liquido.
- ⊗ Técnica de confirmación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La descripción de estas técnicas se encuentra en la parte experimental de esta tesis.

## **6.2. TIPO DE ESTUDIO**

- Experimental.- Se realizarán experimentos para optimizar las condiciones de operación y los parámetros Cromatográficos y de espectrometría de masas, para los metabolitos de cocaína, cannabis y anfetaminas.
- Prospectivo.- Se evaluarán las muestras presuntas positivas de laboratorios que emplean diversas pruebas preliminares.
- Descriptivo.- Se describirá cada uno de los pasos realizados y como se puede generar un esquema integral optimizado para la detección del consumo de drogas de abuso.

## **6.3. POBLACIÓN**

Se incluirá a toda aquella muestra proveniente de población general cuya única característica inicial sea, el de haber resultado positiva por técnicas presuntivas a alguna de las tres drogas descritas.

## **6.4. CRITERIOS**

- Inclusión.- Toda muestra presunta positiva a algún metabolito de cocaína, cannabis y anfetaminas.
- Exclusión.- Toda muestra que resulte negativa por pruebas preliminares o presuntivas
- Eliminación.- Se eliminará toda aquella muestra presunta positiva que no satisfaga el volumen mínimo para realizar la prueba confirmatoria

## **6.5 VARIABLE**

Toda muestra presunta positiva puede ser confirmada positiva o negativa, por lo que se obtendrá de una manera global el porcentaje de confiabilidad de las pruebas preliminares. Describiendo porcentaje de falsos positivos.

## **7. PARTE EXPERIMENTAL**

Se recibieron de cinco fuentes diferentes muestras presuntas positivas por técnicas preliminares tanto automatizadas, semiautomáticas y placas.

TÉCNICA PRESUNTIVA	COCAINA	CANNABIS	ANFETAMINAS
TÉCNICA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO MULTIPLICADO (EMIT) AUTOMATIZADO	14	26	20
TÉCNICA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO MULTIPLICADO (EMIT) SEMIAUTOMATIZADO	14	3	
TÉCNICA INMUNOQUÍMICA EN PLACA	140	54	
TÉCNICA INMUNOQUÍMICA EN PLACA	214	10	
TÉCNICA INMUNOQUÍMICA EN PLACA	6	6	

Las muestras fueron sometidas a la técnica de confirmación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El procedimiento para la detección de los metabolitos de estas drogas se enumera a continuación.

#### **7.1 PREPARACION DE SOLUCIONES PARA DETERMINACION DE COCAINA:**

##### **ETANOL – CLOROFORMO 20% V/V**

En una probeta medir 20 ml. De etanol, agregar cloroformo hasta la marca de 100 ml., tapar con papel parafilm mezclar bien verter la mezcla en uno de los frascos ámbar etiquetar con nombre, concentración y fecha.

##### **HIDROXIDO DE SODIO 0.01N**

Tomar una alícuota de 2.5 ml. De una solución 1 N de hidróxido de sodio pasarla a un matraz aforado de 250 ml. y adicionar agua destilada hasta el aforo, mezclar bien pasarla a un frasco color ámbar y etiquetarlo con nombre, concentración y fecha.

##### **BIL (TRIMETILSYLIL) TRIFLUOROACETAMIDA CLOROTRIMETILSILANO**

##### **(100:5)**

En un vial adicionar 100mcl. de BSTFA con la ayuda de una micropipeta y 5 mcl. de TMCS, tapar y mezclar etiquetar y mantenerlo en refrigeración.



\*Precaución esta preparación debe ser muy rápida, ya que si el reactivo absorbe humedad provoca que la solución se enturbie ocasionando su degradación.

\*\*Esta solución debe prepararse dentro de la campana de extracción.

## **7.2 PREPARACION DE SOLUCIONES PARA DETERMINACION DE ANFETAMINAS HIDROXIDO DE SODIO 1N.**

Pesar 20 g de NaOH en un matraz aforado de 500 ml., agregar un poco de agua destilada y ponerlo en un baño de hielo, agregar poco a poco el hidróxido de sodio al matraz aforado hasta que se disuelva totalmente, mezclar y permitir que se ponga a temperatura ambiente y aforar con agua destilada. Pasar la solución a un frasco ámbar y etiquetarlo con nombre, concentración y fecha.

### **METANOL – ACIDO CLORHIDRICO (9: 1)**

Tomar una probeta de 25 ml., agregar 9 ml. de metanol y 1 ml. de ácido clorhídrico, tapar con papel parafilm y mezclar.

### **BIS (TRIMETILSILYL) TRIFLUORO ACETAMIDA: CLOROTRIMETIL SILANO (100: 5)**

En un vial adicionar 100 mcl. de BSTFA con la ayuda de una micropipeta y 5 mcl. de TMCS, tapar y mezclar etiquetar y mantenerlo en refrigeración.

\*precaución: esta preparación debe ser muy rápida, ya que si el reactivo absorbe humedad provoca que la solución se enturbie ocasionando su degradación.

\*\*Esta solución debe prepararse dentro de la campana de extracción.

## **7.3 PREPARACION DE SOLUCIONES PARA DETERMINACION DE METABOLITOS DE TETRAHIDROCANABINOIDES**

### **HIDROXIDO DE POTASIO 10 N.**

Pesar 280 g de KOH, en un matraz aforado de 500 ml, agregar un poco de agua destilada y ponerlo en un baño de hielo, agregar poco a poco el hidróxido de potasio a un matraz aforado

hasta que se disuelva totalmente. Mezclar y permitir que se ponga a temperatura ambiente y aforar con agua destilada, pasar la solución a un frasco ámbar y etiquetarlo con nombre, fecha y concentración.

#### **ACIDO CLORHIDRICO 0.01 N**

En un matraz aforado de 500 ml. adicionar 250 ml. de agua destilada, posteriormente agregar 0.42 ml. de ácido clorhídrico, agitar y continuar agregando agua destilada hasta su aforo. Verter en un frasco ámbar, etiquetarlo con nombre, concentración y fecha.

#### **ACETONITRILLO – ACIDO CLORHIDRICO (0.01 N) (60:40)**

En una probeta de 100 ml. medir 60 ml de acetonitrilo y 40 ml de ácido clorhídrico (0.01 n) tapar con papel parafilm y mezclarla.

Pasar a un frasco ámbar y etiquetarlo con nombre, concentración y fecha.

#### **N-HEPTANO – ACETATO DE ETILO (85:15)**

En una probeta de 100 ml. medir 85 ml. de N-HEPTANO y 15 ml. de acetato de etilo, tapar con papel parafilm y mezclar pasar a un frasco ámbar y etiquetarlo con el nombre, concentración y fecha.

#### **BSTFA- TMCS (100: 5)**

En un vial adicionar 100 mcl. de BSTFA con la ayuda de una micropipeta y 5 mcl. de TMCS, tapar y mezclar etiquetar y mantenerlo en refrigeración.

\*precaución: esta preparación debe ser muy rápida, ya que si el reactivo absorbe humedad provoca que la solución se enturbie ocasionando su degradación.

\*\*Esta solución debe prepararse dentro de la campana de extracción.

### **7.4 PREPARACION DE CONTROLES DE CALIDAD**

Para el análisis confirmatorio por GC/MS y para el presuntivo EMIT se emplean controles preparados con las drogas a diferentes concentraciones provenientes de los estándares primarios.

En el laboratorio tenemos los siguientes estándares primarios.

<b>DROGA O METABOLITO</b>	<b>CONC. (MG/ML)</b>
BENZOILECGONINA	1.0

CANNABIS ( THC-COOH) 0.1

ANFETAMINA 1.0

### PREPARACION DE CONTROLES DE CALIDAD

A partir de los estándares primarios, preparar las siguientes diluciones

CLAVE	METABOLITO	CONC.INICIAL (MG/ML)	AFORO	CONC. FINAL (NG/μL)
BEN	BENZOILECGOININA	1.0	50 ML	20
THC	THC-COOH	0.1	10 ML	10
ANF	ANFETAMINA	1.0	25 ML	40

Con las soluciones anteriores se preparan todos los controles que a continuación se detallan, empleando como matriz una orina certificada negativa.

El calculo ha continuación descrito es para **un mililitro**.

CODIGO	ALÍCUOTA (μL)	CONC.FINAL(NG/ML)	EMPLEADO EN
NEG	0	0	NEGATIVO EN EMIT Y GC/MS
CAN200	20μL de THC	200	CONTROL POSITIVO EN EMIT Y GC/MS
COC600	30 μL de BEN	600	CONTROL POSITIVO EN EMIT Y GC/MS
ANF2000	50 μL de ANF	2000	CONTROL POSITIVO EN EMIT Y GC/MS

## **7.5 ANALISIS CONFIRMATORIO GC/MS**

### **A).- ENCENDER EQUIPO**

#### **B) ESTABILIZACION DEL EQUIPO**

Una vez encendido y verificado que el equipo no presenta problemas dejar que alcance el equilibrio térmico aproximadamente cuatro horas.

#### **C) CALIBRACION DEL EQUIPO GC/MS**

Calibrar el equipo antes de empesar los análisis confirmatorios de la siguiente manera.

- (1) Verificar que el equipo haya alcanzado el equilibrio térmico
- (2) Abrir en la computadora "INSTRUMENT CONTROL PROGRAM"
- (3) Seleccionar la opción "AUTO SETUP", el equipo realiza una auto calibración "autotune"

Es conveniente que simultáneamente se verifique el proceso de "tunning", posteriormente aparecerá un mensaje indicando que el autotune esta completo en este momento oprimir "OK"  
Si no aparece ningún mensaje el equipo esta listo para empezar.

## **7.6 ANÁLISIS CONFIRMATORIO DEL METABOLITO BENZOILECGONINA PROCEDENTE DE COCAINA**

### **PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS**

- Ordenar las muestras en lotes para su confirmación e incluir:

1 Control negativo

1. Control que contenga 150 ng/ml de Benzoilecgonina (límite de corte)

1 lote de muestras a analizar

Tomar una alícuota de 3 ml con pipeta graduada de cada una de las muestras del lote y verterla en un tubo de ensayo y rotular

El pretratamiento del lote completo se efectuará como sigue:

- (1) Llevar la muestra a pH entre 8 y 9 mediante la adición de bicarbonato de sodio.
- (2) Agregar 7 ml de una mezcla etanol/cloroformo (20 % V/V)
- (3) Agitar con agitación mecánica ( Vortex Mixer ) por 15 seg.
- (4) Centrifugar durante 10 minutos a 3500 RPM.
- (5) Desechar la fase acuosa (superior).
- (6) Decantar la fase orgánica en otro tubo limpio y etiquetado
- (7) Pasar la fase orgánica a un vial etiquetado y evaporar en un baño maria a 60°C hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno.

## PROCESO DE DERIVACION

a). – Para derivar, colocar cada uno de los viales evaporados en baño maria a 80 C

- (1) Agregar con una micropipeta 40 ul de el agente derivante BSTFA:TMCS (100:5).
- (2) Agitar e incubar durante 30 minutos.
- (3) Dejar el vial a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- (4) La muestra esta lista para inyectar.

## 3) PARAMETROS DE OPERACION GC/MS

Condiciones instrumentales específicas para la confirmación del metabolito de cocaína.

- a) El equipo será estabilizado y calibrado como se describe en el inciso B) y C) de la sección anterior.
- b) La presión de salida del cilindro de helio será ajustada a 60 PSI
- c) La presión de la cabeza de columna a 10 PSI
- d) El modo de inyección será "SPLIT"
- e) La columna que se emplea es DB1 longitud =25 m diámetro interno 0.2 mm. espesor de película 0.33 um
- d) Programa de temperaturas del horno :
  - Temperatura del Horno inicial,  $T_o = 165$  oC.
  - Temperatura del Horno final,  $T_f 250$  oC

- Incremento de temperatura, @ = 30 °C/min.
- Tiempo de equilibrio inicial,  $t_0 = 1$  min.
- Tiempo final,  $t_f = 6$  min.
- e) Temperatura del detector = 265
- f) Temperatura del inyector = 250 °C
- g) Modo de adquisición con un intervalo de masas de 80 a 365 amu.
- h) Todos los parámetros anteriores se encontraran almacenados y son establecidos automáticamente al correr el archivo COCAINA en la estación "SATURN".

#### 4.- INYECCION Y CORRIDA DE MUESTRAS

a). - Una vez que el método COCAINA han sido cargados en su respectivo programa, se requiere la adquisición de datos en la estación "SATURN" de la corrida a efectuarse. Los datos que se accasaran deberán ser:

- (1) Archivo en el que se adquirirán los datos del Cromatógrafo COCAINA.
- (2) Nombre o clave del operador del GC/MS
- (3) Datos de identificación de la muestra a inyectar.

- Ya accasados los datos espera a que se apague el foco en el cromatógrafo " GC not READY ". en este momento es posible inyectar las muestras.
- Se inyecta 1.5 u1 de muestra mediante inyección manual.
- La corrida dura menos de 15 minutos.

Al terminar exhibirá en pantalla el mensaje de terminación de corrida, aceptar el mensaje con "OK" o nos envía a la pantalla principal y proceder a la presentación de resultados.

#### F)ANÁLISIS CONFIRMATORIO DE ANFETAMINA

##### 2) PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS

Ordenar las muestras en lotes para su confirmación e incluir

1 control negativo

1 Control positivo de 500 ng/ml de Anfetamina

1 lote de muestras a analizar

Tomar una alícuota de 2 ml. con pipeta graduada de cada una de las muestras del lote y verterlas en tubos de ensayo rotulados previamente.

El pretratamiento del lote completo se efectuara como sigue

- (1) Centrifugar 10 min.
- (2) Decantar si es necesario
- (3) Agregar 1 ml de hidróxido de sodio (1 N)
- (4) Verificar que el pH sea mayor de 10
- (5) Agregarle 3 ml de cloruro de metileno
- (6) Agitar mecánicamente ( vortex Mixer) durante 15 segundos
- (7) centrifugar durante 10 minutos a 2500 RPM.
- (8) Pasar la fase de cloruro de metileno (capa inferior) a un vial etiquetado
- (9) Adicionar 100 u1 de Metanol : HC1 (9:1)
- (10) Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno
- (11) Derivar 30 minutos a 60 oC, con BSTFA:TMCS (100:5).
- (12) Inyectar en el cromatógrafo

## 2).- PARAMETROS DE OPERACION GC/MS

Condiciones instrumentales específicas para la confirmación de Anfetamina

- a)El equipo será estabilizado y calibrado como se describe en el inciso B) y C) de la sección 7.5
- b)Ajustar la presión de salida del cilindro de helio a 60 PSI
- c)Ajustar la presión de la cabeza de columna a 10 PSI
- d) Modo de inyección será "SPLIT"
- e)Columna empleada DB-1 longitud 25 m diámetro interno 0.2 mm espesor de película = 0.33 um
- f)Programa de temperaturas del horno :
  - Tiempo de equilibrio inicial, to 1 min.
  - Temperatura del horno inicial, To 60 °C.
  - Incremento de temperatura, @1 =20°C/min
  - Temperatura del horno intermedia, T1 = 140 oC

- Incremento de temperatura,  $2 = 15^{\circ}\text{C} / \text{min}$ .
- Temperatura del horno final,  $T_f = 180^{\circ}\text{C}$
- Tiempo final,  $t_f$  O min.

g) La temperatura del detector =  $230^{\circ}\text{C}$

h) La temperatura del inyector =  $210^{\circ}\text{C}$

i) El modo de adquisición con un intervalo de masas de 90 a 215 amu.

j) Todos los parámetros anteriores se encuentran almacenados y son establecidos automáticamente al correr el archivo ANFETAMI en la estación "SATURN".

#### 4.-INYECCION Y CORRIDA DE MUESTRAS

a).- Una vez que el método ANFETAMI ha sido cargado en su respectivo programa, se requiere la adquisición de los datos en la estación "SATURN" de la corrida a efectuarse . Los datos que se accederán serán :

(1) Archivo en el que se adquirirán los datos del Cromatógrafo ANFETAMI.

(2) Nombre o clave del operador del GC/MS

(3) Datos de identificación de la muestra a inyectar.

•Ya accedidos los datos esperar a que se apague el foco en el cromatógrafo " GC not READY ", en este momento es posible inyectar las muestras.

•Inyectar 1.5  $\mu\text{l}$  de muestra mediante inyección manual.

•La corrida dura menos de 15 minutos.

Al terminar exhibirá en pantalla el mensaje de terminación de corrida, aceptar el mensaje con "OK" y envía a la pantalla principal y proceder a la presentación de resultados.

#### 7.7 ANÁLISIS CONFIRMATORIO DEL METABOLITO 9-TETRAHIDRO-CANNABINOL CARBOXILADO PROCEDENTE DE CANNABIS

##### 1) PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS

Ordenar las muestras en lotes para su confirmación e incluir:



1 control negativo

1. Control que contenga 20 ng/ml de THC-COOH (límite de corte GC/MS)

1 lote de muestras a analizar.

Tomar una alícuota de 5 ml con pipeta graduada de cada una de las muestras del lote y vertida en un tubo de ensayo rotulados previamente.

El pretratamiento del lote completo se efectuará como sigue:

(1) A cada uno de los tubos etiquetados que integran el lote adicionar 0.5 ml de KOH (10 N).

(2) Calentar en baño maría a 55 °C, durante 15 minutos

(3) Sacar del baño agitar 5 segundos con agitador mecánico "vortex", enfriar en un recipiente con agua hasta alcanzar la temperatura ambiente.

(4) Adicionarle a cada tubo 1 ml de ácido acético glacial, agitar y posteriormente medirle que el pH esté aproximadamente en 4 con tira indicadora y un intervalo de tolerancia de +/- 0.5 unidades de pH.

(5) Agregarle dos mililitros de una mezcla N-heptano: acetato de etilo (85:15), agitar 15 segundos en un agitador mecánico "vortex".

(6) Centrifugar 10 minutos.

(7) Colectar la fase de N-heptano: acetato de etilo en un tubo de ensayo limpio y etiquetado.

(8) La fase acuosa sobrante se le adicionan dos mililitros de una mezcla Nheptano: acetato de etilo, agitar 15 segundos en un agitador mecánico "vortex".

(9) Centrifugar 10 minutos

(10) Transferir la fase de N-Heptano-Acetato de etilo al tubo donde se encuentra colectada la otra fase de Acetato de etilo "paso (7)".

(11) Centrifugar 10 minutos la fase de N-Heptano-Acetato de etilo

(12) Pasar 3/4 partes del tubo anterior a un vial etiquetado y evaporar en un baño maría a 60 °C hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno.

## 2).- PROCESO DE DERIVACION

a). - El baño maría deberá estar a 60 °C, para derivar cada uno de los viales evaporados se procederá como sigue:

- (1) Agregar con una micropipeta 50  $\mu$ l del agente derivante BSTFA:TMCS (100:5).
- (2) Agitar e incubar durante 20 minutos
- (3) Dejar el vial a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- (4) La muestra esta lista para inyectar.

Lo siguiente provee condiciones instrumentales especificas para la confirmación de metabolitos de cannabis.

- a) El equipo será estabilizado y calibrado como se describe en el inciso B) y C) de ésta sección para cada marca de equipo.
- b) La presión de salida del cilindro de helio será ajustada a 60 PSI
- c) La presión de la cabeza de columna a 10 PSI
- d) El modo de inyección será "SPLIT"
- e) La columna que se emplea pueden ser ULTRA-1, ULTRA-2. DB.-1 y DB-5  
longitud 12m a 25m.  
diámetro interno = 0.2 mm  
espesor de película — 0.33  $\mu$ m
- f) El programa de temperaturas del horno es:
  - Tiempo de equilibrio inicial,  $t_0 = 1$  min.
  - Temperatura del horno inicial,  $t_0 = 150$  oC.
  - Incremento de temperatura,  $@1 = 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .
  - Temperatura del horno final,  $T_f = 280$  oC
  - Tiempo final,  $t_f = 8$  min.
- g) La temperatura del detector = 280 oC
- h) La temperatura del inyector = 260 oC
- i) El modo de adquisición con un intervalo de masas de 370 a 492 amu.
- j) Todos los parámetros anteriores se encuentran almacenados y son establecidos automáticamente al correr el archivo CANNABIS en la estación "SATURN".

#### 4.- INYECCION Y CORRIDA DE MUESTRA

- a) - Una vez que el método CANNABIS han sido cargados en su respectivo programa, se solicita

la adquisición de datos de la corrida a efectuarse. Los datos que se accesarán deberán ser:

(1) Archivo en el que se adquirirán los datos del Cromatógrafo CANNABIS.

(2) Nombre o clave del operador del GC/MS

(3) Datos de identificación de la muestra a inyectar.

- Ya accesados los datos espera a que se apague el foco en el cromatógrafo "GC not READY ", en este momento es posible inyectar las muestras.
- Inyectar 1.5 U1 de muestra mediante inyección manual.
- La corrida dura menos de 15 minutos.
- Al terminar exhibirá en pantalla el mensaje de terminación de corrida, aceptamos el mensaje con "OK" y nos envía a la pantalla principal y procediendo a la presentación de resultados.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS

Los cromatogramas y espectros de masas de las drogas o metabolitos analizados en este trabajo se presentan en el anexo 1

### 8.2. CONFIRMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN GASES MASAS

A continuación se muestran resultados de cinco laboratorios que colaboraron en este proyecto, de los cuales dos emplean técnicas preliminares automatizadas y tres de ellos emplean pruebas de campo. Es importante destacar que no se manejan marcas debido a que el objetivo de este estudio es destacar la importancia de la confirmación de las muestras y no un estudio de comparación de pruebas preliminares.

TABLA # 2

LABORATORIO	ANÁLISIS PRELIMINAR	LIMITE DE CORTE PARA CADA UNA DE LAS DROGAS NG/ML		
		COCAINA	CANNABIS	ANFETAMINAS
A	AUTOMATIZADO	300 NG/ML	50 NG/ML	1000 NG/ML
B	AUTOMATIZADO	300 NG/ML	50 NG/ML	1000 NG/ML

C	PLACA	300 NG/ML	50 NG/ML	1000 NG/ML
D	PLACA	300 NG/ML	50 NG/ML	1000 NG/ML
E	PLACA	300 NG/ML	50 NG/ML	1000 NG/ML

Las placas están basadas en técnicas de inmunoensayo, cuyo fundamento es una reacción antígeno anticuerpo para formar una banda colorida, en este caso el antígeno es la droga presente en la orina que compite un conjugado de droga presente en la prueba. Si no hay presencia de la droga o es menor la concentración de lo que pueda detectar la prueba (límite de corte), en la orina el conjugado de la droga se unirá al anticuerpo formando la banda colorida, si por el contrario la muestra contiene la droga en cantidad superior al límite de corte establecido, la banda no aparecerá.

**TABLA # 3**

Laboratorio	Negativos		Positivos (NG/ML)						Total positivos	Total muestras	Correctos	Incorrectos
			150-300		301-1000		Mayor a 1000					
<b>A</b>	1	7.1%	0	0.0%	6	42.9%	7	50.0%	13	14	92.9%	7.1%
<b>B</b>	3	21.4%	0	0.0%	5	35.7%	6	42.9%	11	14	78.6%	21.4%
<b>C</b>	41	29.3%	8	5.7%	20	14.3%	71	50.7%	99	140	70.7%	29.3%
<b>D</b>	65	31.9%	19	9.3%	45	22.1%	75	36.8%	139	204	68.1%	31.9%
<b>E</b>	3	50.0%	0	0.0%	0	0.0%	3	50.0%	3	6	50.0%	50.0%
<b>TOTAL</b>	113	27.9%	27	3.0%	76	23.0%	162	46.1%	265	378	70.1%	29.9%

**CONFIRMACIÓN A METABOLITO DE COCAINA**

**CONFIRMACIÓN A METABOLITO DE COCAINA**



FIGURA. 1. Confirmaciones realizadas para el metabolito de cocaína, donde se observa que solo el 70 % de las muestras procedentes de 5 laboratorios diferentes resultaron positivas al metabolito con resultado presunto positivo

**COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS DE LA CONFIRMACIÓN A METABOLITO DE COCAINA**

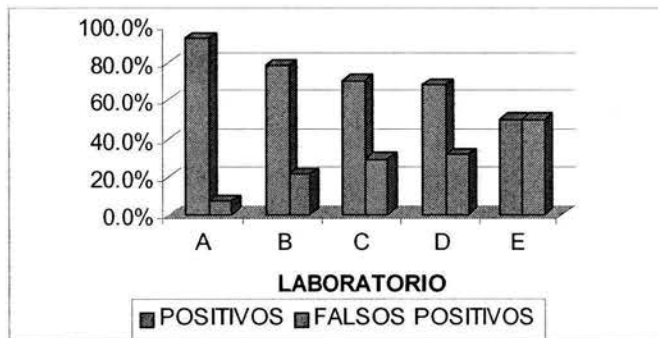


FIGURA. 2. Esta gráfica muestra el porcentaje de falsos positivos y positivos confirmados para el metabolito de cocaína, donde se observa una variabilidad de resultados falsos positivos entre laboratorios que va del 7 al 50 %.

### CONCENTRACIÓN DEL METABOLITO DE COCAINA

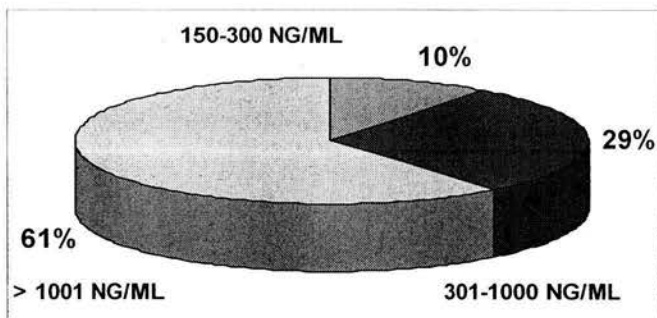


FIGURA. 3. Esta gráfica muestra el porcentaje que representa la división de las muestras confirmadas positivas a metabolito de cocaína, divididas en tres grupos dependiendo de la concentración del metabolito confirmado.

TABLA # 4

Laboratorio	Negativos		Positivos (NG/ML)				Total positivos	Total muestras	Correctos	Incorrectos		
			15-30	31-100	Mayor a 101							
A	4	15.4%	5	19.2%	9	34.6%	8	30.8%	22	26	84.6%	15.4%
B	1	33.3%	1	33.3%	0	0.0%	1	33.3%	2	3	66.7%	33.3%
C	11	20.4%	6	11.1%	15	27.8%	22	40.7%	43	54	79.6%	20.4%
D	4	40.0%	2	20.0%	1	10.0%	3	30.0%	6	10	60.0%	40.0%
E	3	50.0%	0	0.0%	3	50.0%	0	0.0%	3	6	50.0%	50.0%
TOTAL	23	31.8%	14	16.7%	28	24.5%	34	27.0%	76	99	76.8%	23.2%

### CONFIRMACIÓN A METABOLITO DE Cannabis

### CONFIRMACIÓN A METABOLITO DE CANNABIS



FIGURA. 4. Confirmaciones realizadas para el metabolito de cannabis, donde se observa que solo el 77 % de las muestras procedentes de 5 laboratorios diferentes resultaron confirmadas positivas.

### COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS DE LA CONFIRMACIÓN A METABOLITO DE CANNABIS

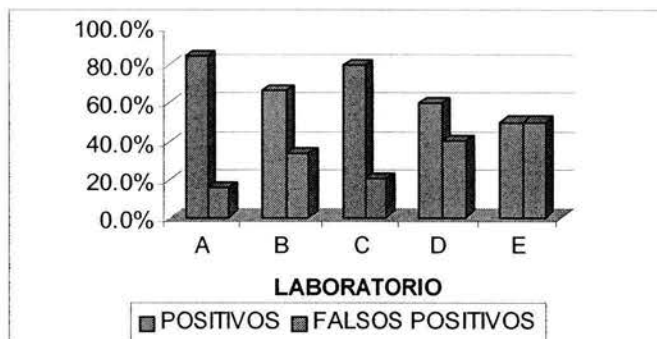


FIGURA. 5. Esta gráfica muestra el porcentaje de falsos positivos y positivos confirmados para el metabolito de cannabis, donde se observa una variabilidad entre laboratorios que va del 15 al 50 % de las muestras procedentes de 5 laboratorios diferentes.

### CONCENTRACIÓN DEL METABOLITO DE CANNABIS

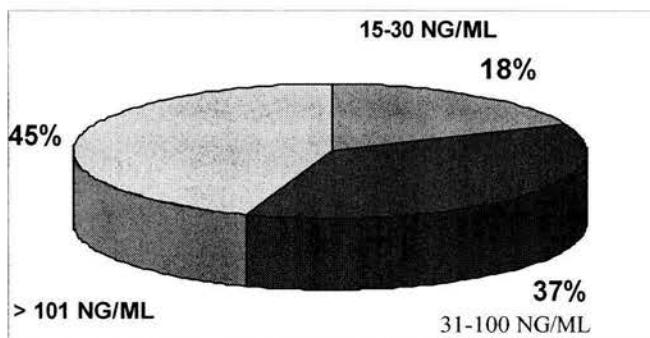


FIGURA. 6. Esta gráfica muestra el porcentaje que representa la división de las muestras confirmadas positivas a metabolito de Cannabis, divididas en tres grupos dependiendo de la concentración del metabolito confirmado.

**TABLA # 5**

Laboratorio	Negativos		Positivos (NG/ML)						Total positivos	Total muestras	Correctos	Incorrectos
			501-1000		1001-3000		Mayor a 3001					
A	3	15.0%	8	40.0%	5	25.0%	4	20.0%	17	20	85.0%	15.0%
B	1	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	1	0.0%	100.0%
C	1	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	1	0.0%	100.0%
D	2	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	2	0.0%	100.0%
E	1	100.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	1	0.0%	100.0%
TOTAL	8	83.0%	8	8.0%	5	5.0%	4	4.0%	17	25	68.0%	32.0%

**CONFIRMACIÓN A ANFETAMINAS**

**CONFIRMACIÓN A ANFETAMINAS**



FIGURA. 7. Confirmaciones realizadas para el metabolito de anfetamina, donde se observa que solo el 68 % de las muestras procedentes de 5 laboratorios diferentes resultaron confirmadas positivas.

**COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS DE LA ONFIRMACIÓN A ANFETAMINAS**

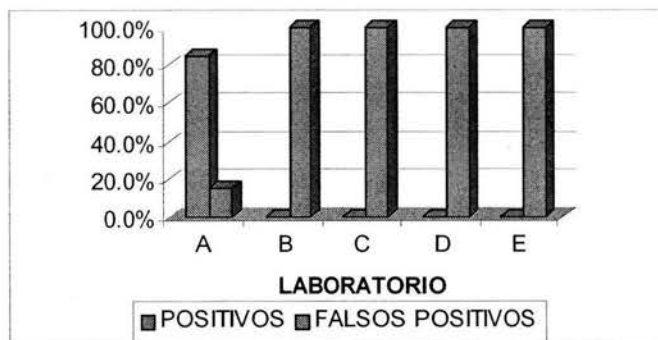


FIGURA. 8. Esta gráfica muestra el porcentaje de falsos positivos y positivos confirmados para anfetaminas, donde se observa que sólo un laboratorio envió muestras que se confirmaron positivas.



### CONCENTRACIÓN DE ANFETAMINAS

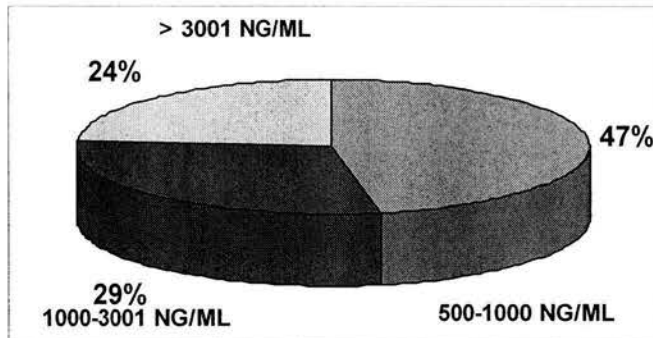


FIGURA. 9. Esta gráfica muestra el porcentaje que representa la división de las muestras confirmadas positivas a anfetaminas, divididas en tres grupos dependiendo de la concentración del metabolito confirmado.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se puede observar del total de muestras enviadas al laboratorio, el resultado positivo por confirmación gases masas fue de 70, 77, 68 % para metabolitos de cocaína, Cannabis y anfetaminas respectivamente, lo que demuestra sin lugar a dudas la importancia de confirmar las muestras presuntas positivas obtenidas por las diversas técnicas preliminares o presuntivas que existen en el mercado. Y que en los casos en donde no se realiza la prueba de confirmación la muestra se dictamina como positiva, con las repercusiones que esto tiene para la vida social, familiar, laboral y legal del individuo dictaminado.

En el caso del metabolito de cocaína como lo demuestra la tabla 3 y figura 1 mostró que el 30 por ciento de las muestras recibidas fueron falsas presuntas positivas. La figura 2 muestra el porcentaje de falsos positivos de cada uno de los laboratorios evaluados, siendo los de más alto porcentaje los que emplean una prueba preliminar de campo, y esto se puede explicar claramente, por el hecho de que este tipo de pruebas emplea una valoración subjetiva del resultado, debido a que es visual la interpretación y depende de la capacidad y entrenamiento del individuo para valorar y dictaminar un resultado positivo, aunque esto no descalifica lo practico que es para muchos laboratorios el contar con este tipo de pruebas. Los dos laboratorios con el menor

porcentaje de positivos emplean equipos automatizados y uno de ellos lleva un programa de control de calidad para la evaluación de las muestras, de hecho este último fue el que obtuvo el menor porcentaje de falsos positivos. La figura 3 nos muestra como se distribuyeron las muestras positivas divididas en tres grupos; el primero cercano al límite de corte (150-300 NG/ML), donde se situaron sólo el 10 % de las muestras positivas, el segundo (301—1000 NG/ML) donde se concentraron el 29 % de las muestras positivas y el tercero con el 61 % de las muestras, como podemos observar si juntamos el segundo y tercer grupo encontramos que el 90% de las muestras están separadas por lo menos al doble del límite de corte. De lo anterior se puede inferir que la preocupación de muchos laboratorios de que den resultados negativos por estar cercanos al límite de corte, no es lo que sucede en la mayoría de las muestras que resultan positivas a metabolito de cocaína.

Para el caso del metabolito de Cannabis cuyos resultados se presentan en la tabla 4 y figura 4 mostró que el 23 por ciento de las muestras recibidas fueron falsas presuntas positivas. La figura 5 muestra el porcentaje de falsos positivos de cada uno de los laboratorios evaluados, siendo los de más alto porcentaje dos que emplean prueba preliminar de campo y uno con equipo automatizado, y esto se puede explicar de manera similar a los casos del metabolito de cocaína, por el hecho de que las pruebas preliminares emplea una valoración subjetiva del resultado. No deja de llamar la atención que uno de los laboratorios automatizados haya dado un porcentaje más alto de falsos positivos que uno de los laboratorios con prueba preliminar de campo, lo anterior puede deberse a la carencia de un adecuado programa de control de calidad, a diferencia del laboratorio A, quien si lo tiene y cuyo porcentaje de falsos positivos es el más bajo, en este caso el contar con equipo automatizado no garantiza resultados más confiables que el que emplea la prueba de campo, pero si da evidencia que es necesario contar con un programa de control de calidad para obtener mejores resultados que las pruebas de campo. La figura 6 nos muestra como se distribuyeron las muestras positivas divididas también en tres grupos; el primero cercano al límite de corte (15-30 NG/ML), donde se situaron el 18 % de las muestras positivas, el segundo (30—100 NG/ML) donde se concentraron el 37 % de las muestras positivas y el tercero con el 45 % de las muestras, como podemos observar si juntamos el segundo y tercer grupo encontramos que el 82% de las muestras están separadas por lo menos al doble del límite de corte. De lo anterior se puede inferir que la preocupación de muchos laboratorios de que den resultados negativos por estar cercanos al límite de corte, se minimiza debido a que la mayoría de las muestras que resultan positivas a metabolito de Cannabis están al doble del límite de corte.

Para Anfetaminas como se presenta en la tabla 5 y figura 7 mostró que el 32 por ciento de las muestras recibidas fueron presuntas positivas falsas. La figura 8 muestra el porcentaje de falsos

positivos de cada uno de los laboratorios evaluados, desafortunadamente el volumen de muestras no fue suficiente para obtener resultados que pudiéramos discutir. La figura 9 nos muestra como se distribuyeron las muestras positivas divididas en tres grupos; el primero cercano al límite de corte (500-1000 NG/ML), donde se situaron el 47 % de las muestras positivas, el segundo (1000—3001 NG/ML) donde se concentraron el 29 % de las muestras positivas y el tercero con el 24 % de las muestras, como podemos observar si juntamos el segundo y tercer grupo encontramos que el 53% de las muestras están separadas por lo menos al doble del límite de corte. De lo anterior se puede inferir que para esta droga el porcentaje cercano al límite de corte alcanza aproximadamente la mitad, lo cual si tendría que ser considerado al seleccionar metodología preliminar, y posiblemente explique parcialmente porque muchas de las muestras pueden ser dictaminadas de manera preliminar como negativas cuando no lo son. Además de que hay que tener en cuenta que esta es la droga que tiene mas cruces de falsos positivos reportados en la literatura para pruebas preliminares.

## **10. CONCLUSIONES**

La detección de drogas de abuso en fluidos biológicos ha cobrado un auge muy importante, sin embargo diversos factores influyen en el resultado integral de este tipo de análisis. Debido a que los resultados de estas pruebas constituyen la evidencia en los procesos legales del uso de una droga por un individuo, se hace necesario contar con un amplio sustento legal, científico y de control de calidad que brinde validez contundente a este tipo de análisis.

El proceso se inicia con la supervisión de la toma de muestra, donde el supervisor articula los mecanismos necesarios para evitar la posible adulteración o sustitución de la muestra, siendo la orina uno de los fluidos más susceptibles a la adulteración. En este mismo paso el supervisor inicia uno de las partes más importantes e integrales del análisis denominada cadena de custodia de la muestra, que garantiza la integridad y documenta cada una de las etapas que transcurren desde la recolección de la muestra hasta su dictamen final.

Posterior a la toma de muestra el proceso continua en el laboratorio con el empleo de metodología analítica específica cuya selección depende de factores como la sensibilidad requerida, la confiabilidad, capacidad técnica e instrumental, tiempo disponible para análisis y costo. Un efectivo protocolo analítico para la detección de drogas consta de un procedimiento inicial sensitivo de filtrado o selección de muestras, que separa las muestras negativas de probables muestras positivas, que posteriormente son confirmadas por una técnica altamente específica.

Aunque existen numerosas técnicas de alta confiabilidad la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) es reconocida internacionalmente como una técnica rigurosa de confirmación para todas las drogas, debido a que provee el mejor nivel de confianza en el resultado.

El ciclo se cierra con el dictamen emitido por un especialista que discrimina basado en evidencia científica, si la droga o metabolito encontrado se asocia al uso ilícito de una droga. Múltiples artículos han hecho patente la necesidad de incorporar este paso puesto que en muchos casos la presencia de la droga en un fluido biológico es el resultado de la exposición pasiva, inconsciente o derivada de un tratamiento farmacológico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Encuesta Nacional de Adicciones. Secretaria de salud, México, 1998.
2. J.B.Henry "diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio", Masson-Salvat, 9ª Edición, 1997.
3. S.D. Ferrara, L. Tedeshi, G. Frison, G. Brusini and F. Castagna, "Drugs of abuse Testing in Urine: Statistical Approach and Experimental Comparison of Immunochemical and Chromatographic Techniques", *Journal of Analytical Toxicology*, 18: 278, 1994.
4. R.H. Liu, "Comparison of common Immunoassay Kits for Effective Application in Workplace Drug Urinalysis", *Forensic Sci. Rev.* 6:19, 1994.
5. J. Yinon, "Forensic Application of Mass spectrometry", CRC Press Inc., 1a Edición, Boca Raton, USA, 1995.
6. Federal Register, "Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs", Department of Health and Human Services. USA, 1994.
7. J.T. Cody, " Specimen Adulteration in drug Urinalysis", *Forensic Sci. Rev.* 2:63, 1990.
8. E.J.Cone, D. Yousefnejad, M.J. Hillsgrave, B.Holicky and D. Darwin, "Passive inhalation of cocaine", *Journal of Analytical Toxicology* 19:399, 1995.
9. J.T. Cody, "Specimen Adulteration in Drug Urinalysis", *Forensic Science Review*, 2:63, 1990.
10. P.J. Baugh, "Gas Chromatography A practical approach", IRL Press, 1a Edición Oxford University, 1993.
11. H.H. Willard, L.L.Merritt, J.A. Dean, F.A. Settle, "Métodos instrumentales de Análisis", Grupo Editorial Ibero América, 1ª Edición, México, 1991.
12. A. Escohotado, "Historia General de las Drogas", ESPASA, España, 2000.
13. National Institute on Drug Abuse, "Crack and Cocaine", Infopaq, NIDA, USA, 1998.
14. National Institute on Drug Abuse, Highlights and executive summary of the community epidemiology workgroup", *Epidemiologic trends in drug abuse*, Vol.1, NIH, Washington D.C.USA, 1997.
15. Goodman and Gilman, "The pharmacological basis of therapeutics", Mac Millan Publishing, New York USA, 1990.
16. Snyder, H. Solomon, "Drugs and the Brain". Scientific American Library, 122, 1996.
17. National Institute on Drug Abuse, "Methamphetamine Abuse and addiction" Research Report, US department of Health and Human Services, National Institutes of health, 1998.
18. J.M. Davis, I.J. Kopin, L. Lemberger "Effects of urinary pH on amphetamine metabolism", *Ann N.Y. Acad Sci.* 179: 473, 1971.
19. National Institute on Drug Abuse, "Marijuana Abuse" Research Report, US department of Health and Human Services, National Institutes of health, 2002.
20. K. Blau and J. Halket, " Handbook of Derivatives for Chromatography" John Wiley & Sons Ltd, 2a Edición, England, 1993.

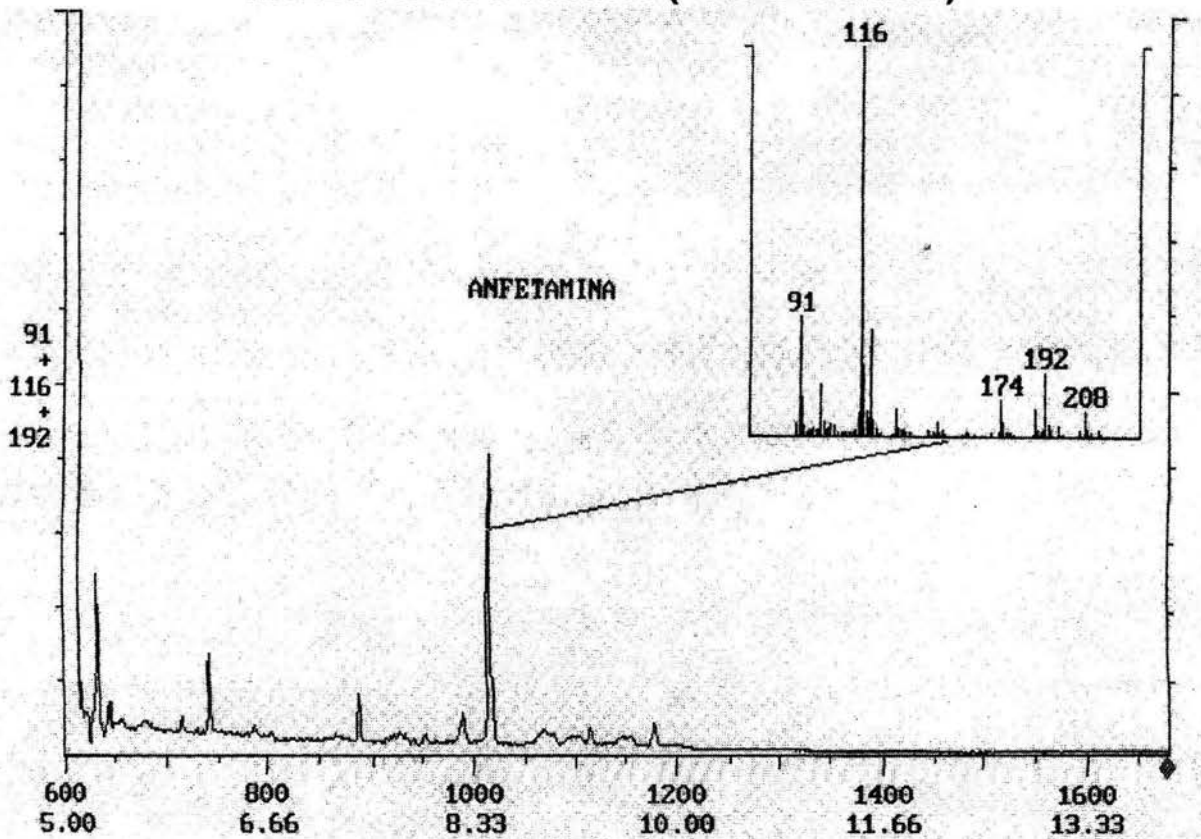
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE COCAÏNA

TIEMPO DE RETENCION: 8.60 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA: CALIBRADOR (500 NG/ML)



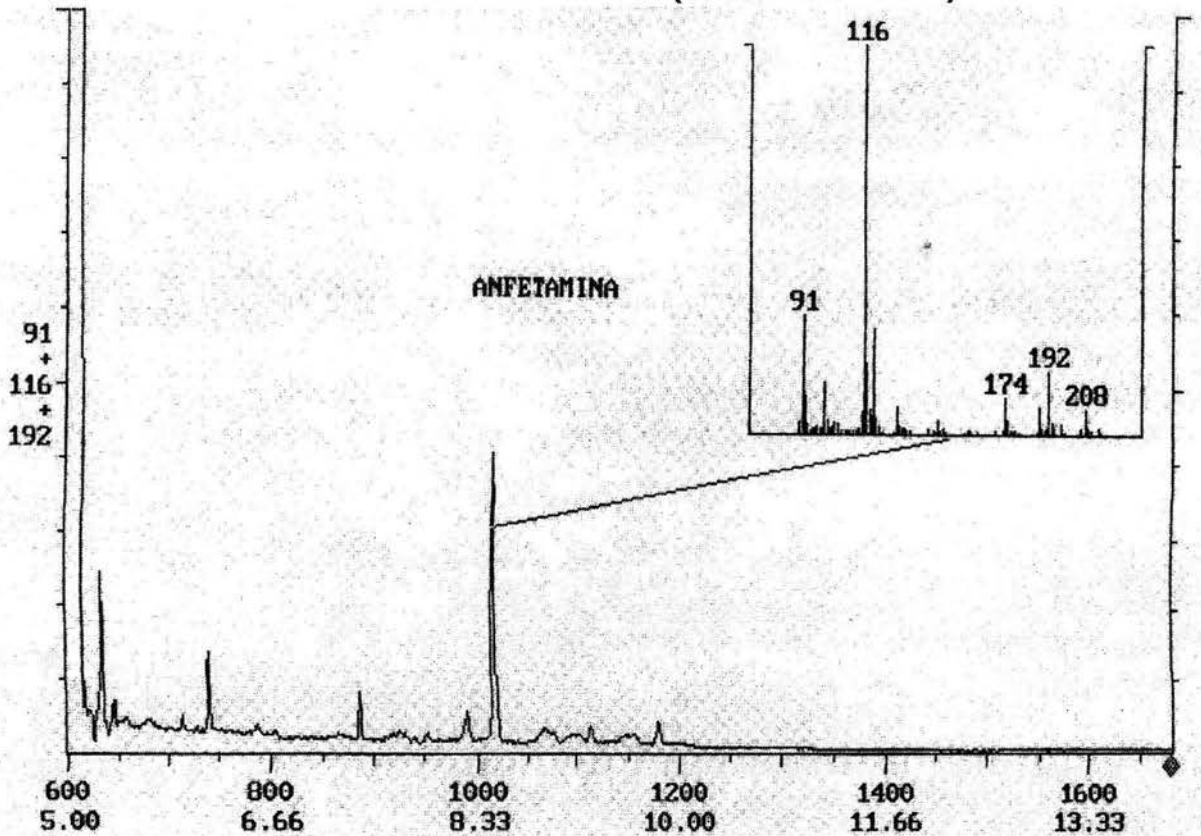
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: ANFETAMINA

TIEMPO DE RETENCION: 8.60 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA NEGATIVA



ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

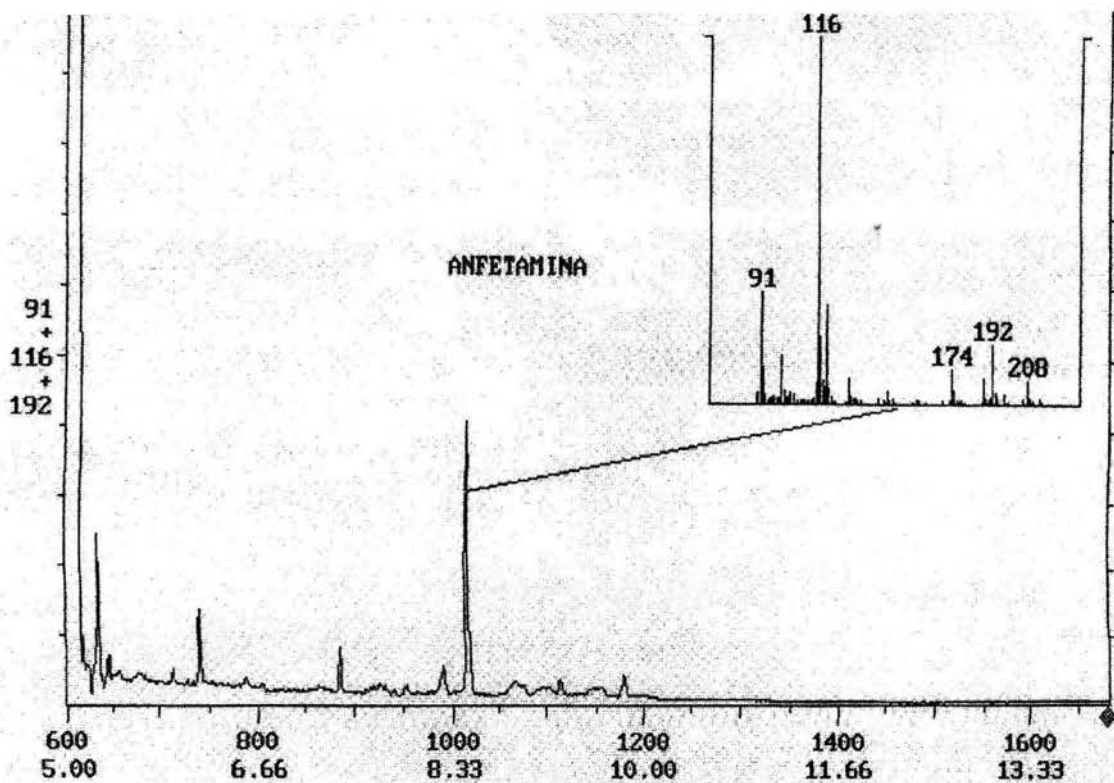
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: ANFETAMINA

TIEMPO DE RETENCION: 8.60 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA POSITIVA (1075 NG/ML)





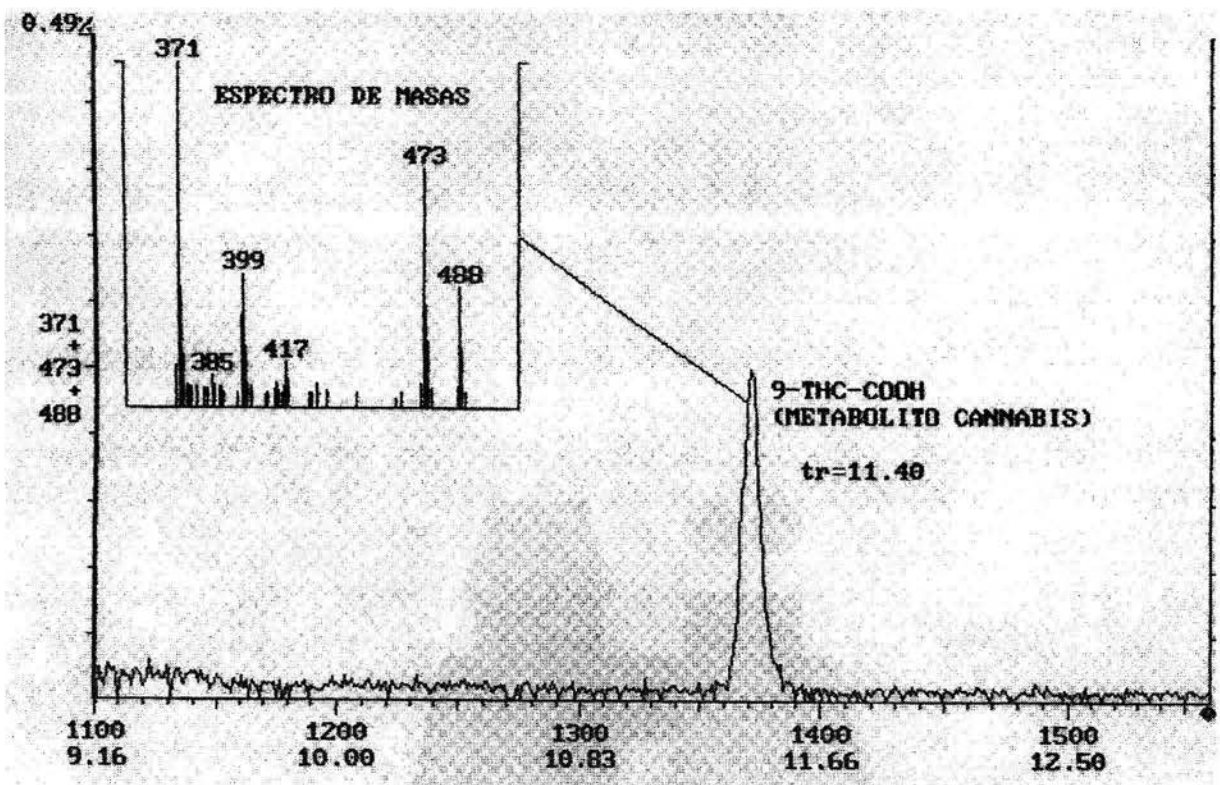
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE CANNABIS

TIEMPO DE RETENCION: 11.40 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA: CALIBRADOR (20 NG/ML)



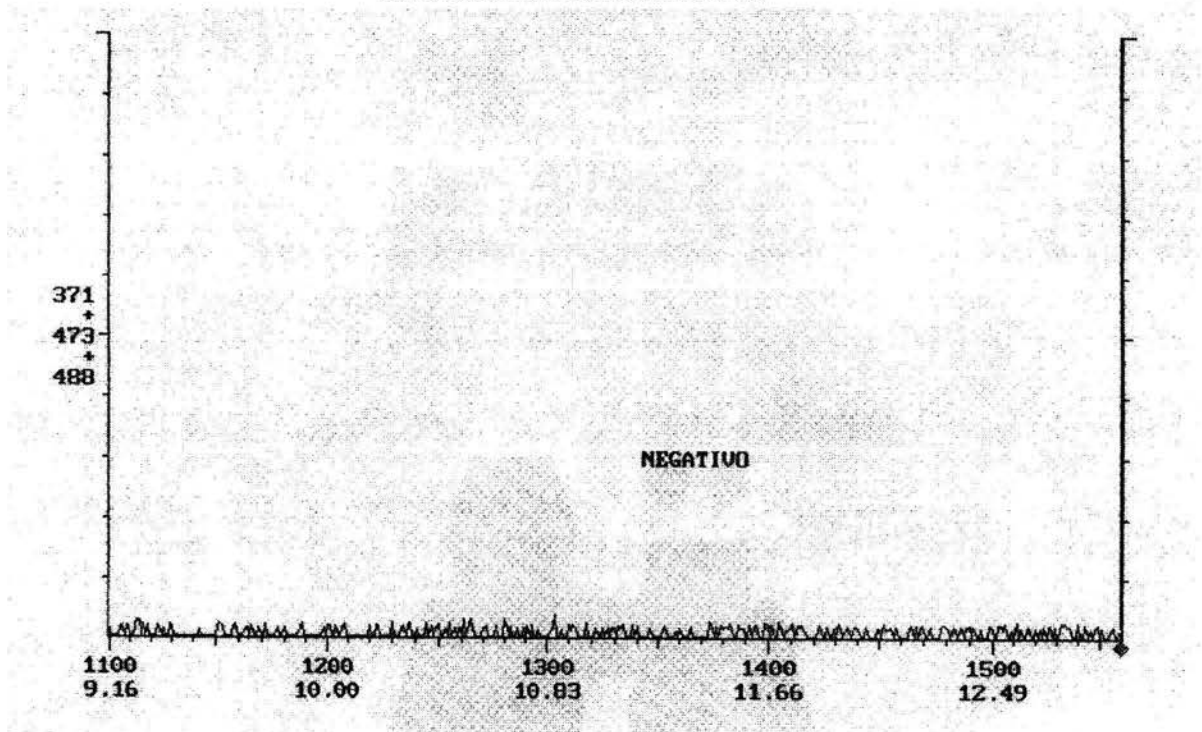
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE CANNABIS

TIEMPO DE RETENCION: 11.40 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA NEGATIVA



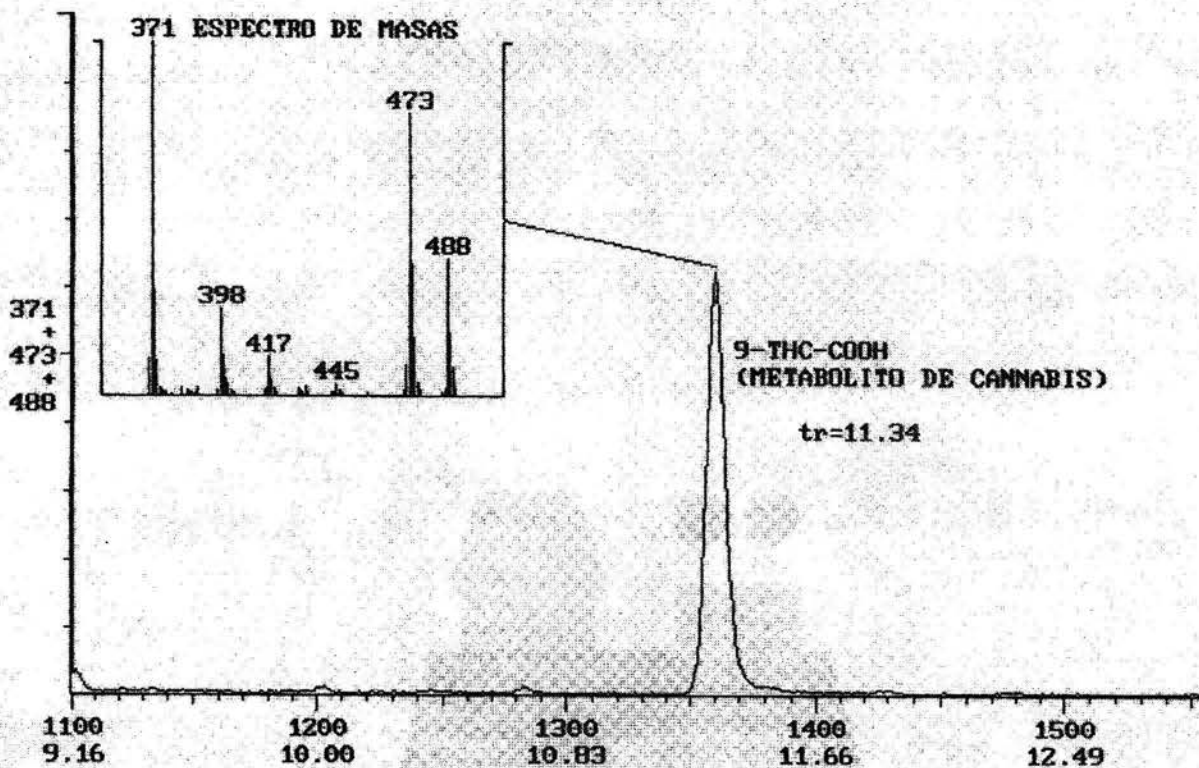
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE CANNABIS

TIEMPO DE RETENCION: 11.40 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA POSITIVA (109 NG/ML)



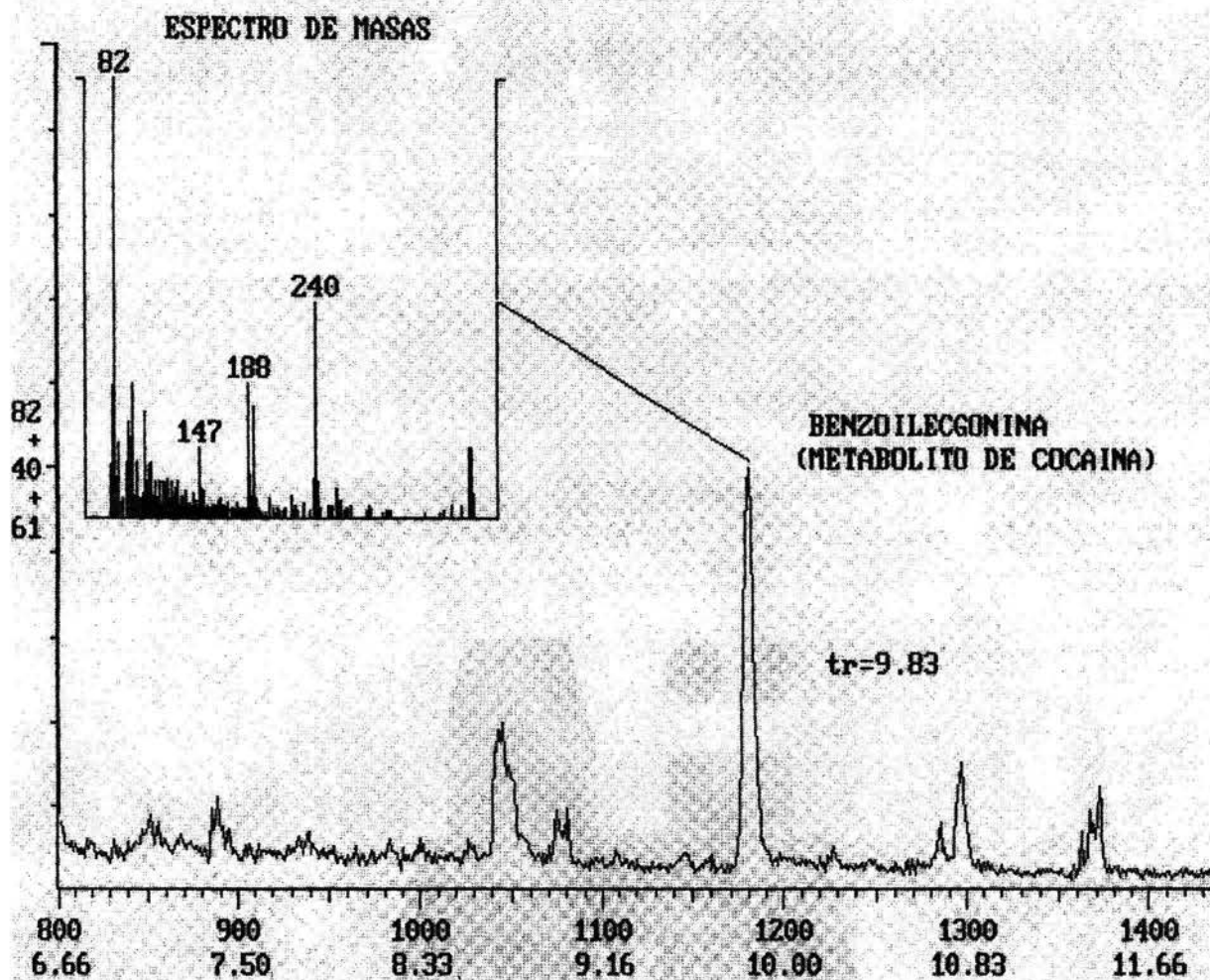
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE COCAÍNA

TIEMPO DE RETENCION: 9.83 min.

RANGO DE MASAS: 80 - 500

MUESTRA CALIBRADOR (150 NG/ML)



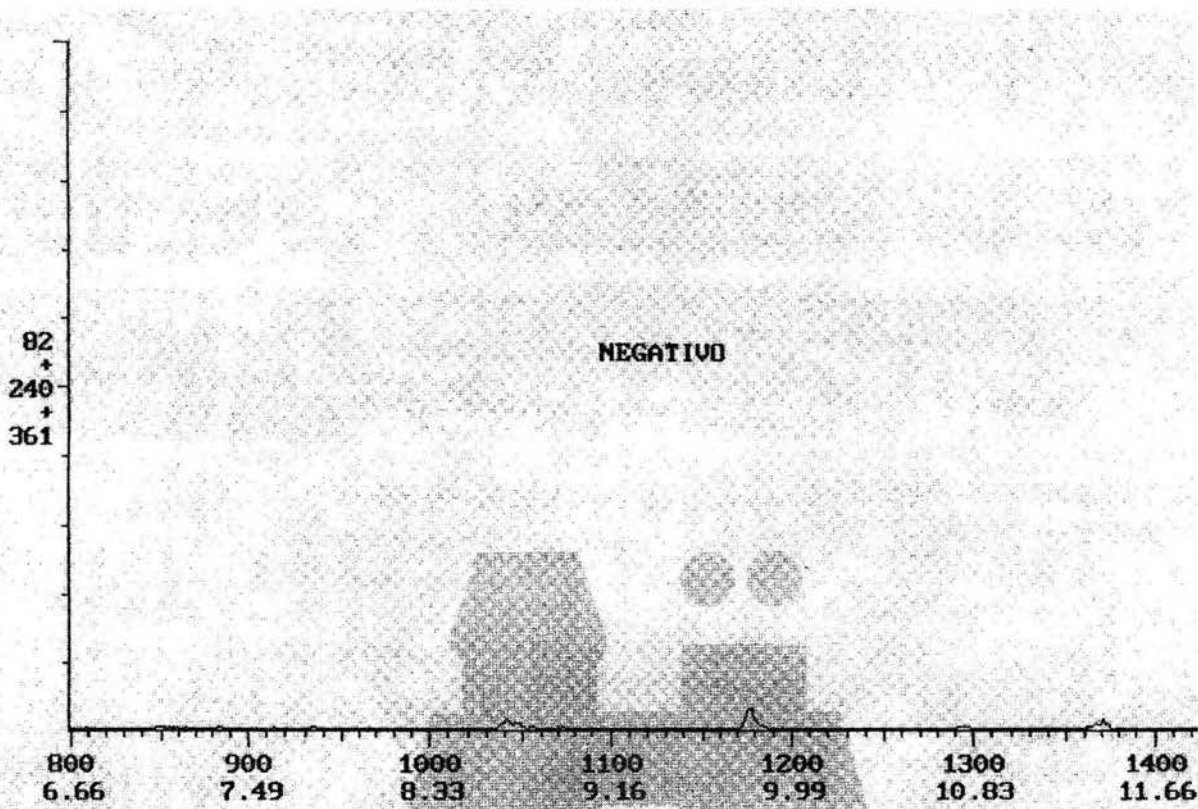
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE COCAÍNA

TIEMPO DE RETENCION: 9.83 min.

RANGO DE MASAS: 90 - 500

MUESTRA NEGATIVA



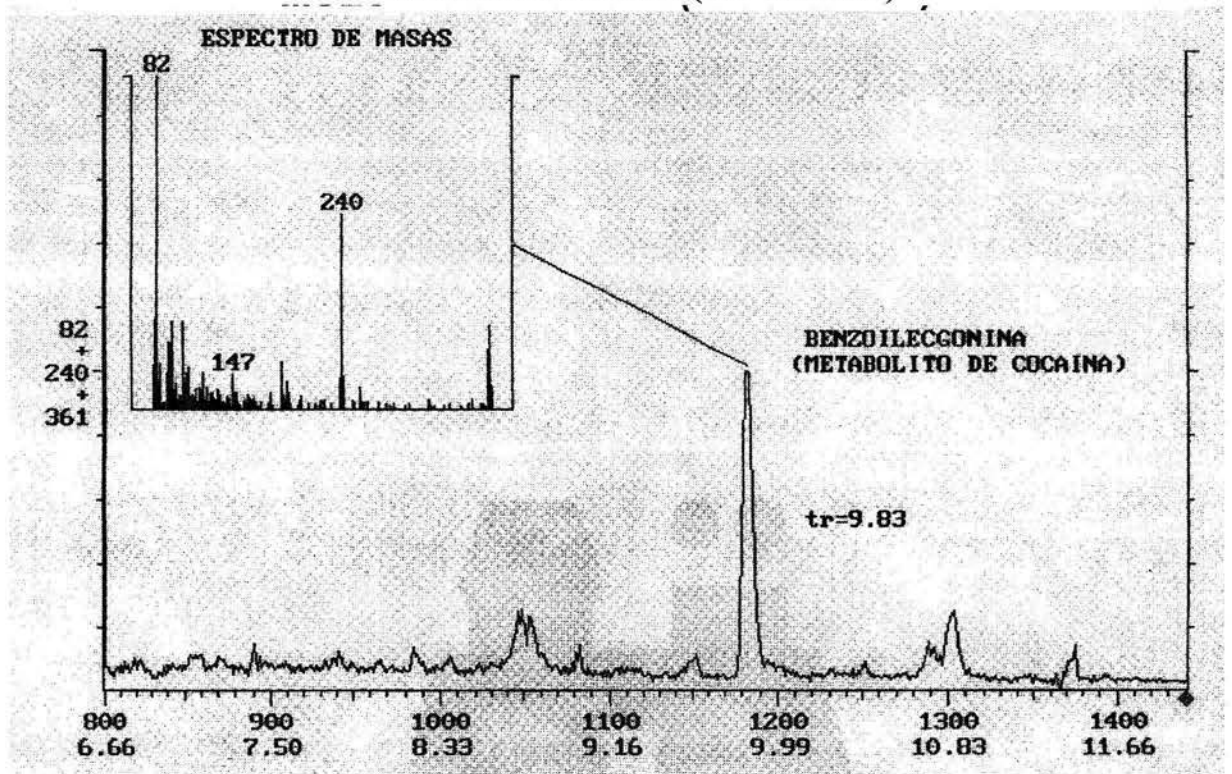
# CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS

DETECCION DE: METABOLITO DE COCAINA

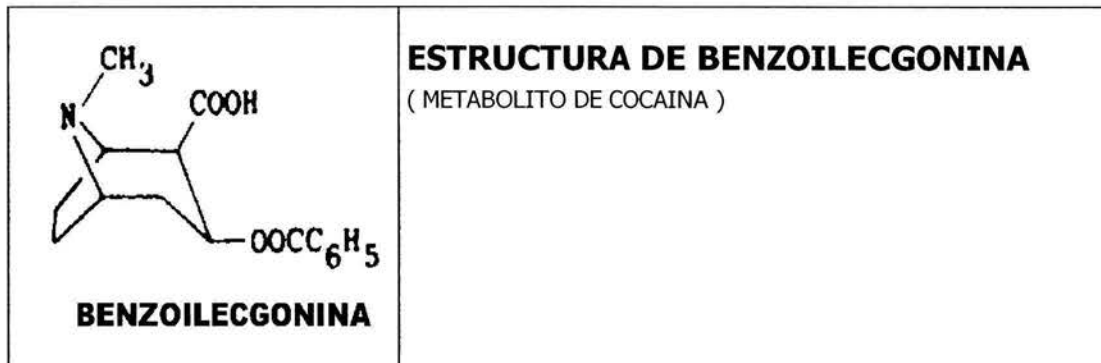
TIEMPO DE RETENCION: 9.83 min.

RANGO DE MASAS: 80 - 500

MUESTRA POSITIVA (767 NG/ML)



CONFIRMACION A : METABOLITO DE COCAINA



CONFIRMACION A : METABOLITO DE CANNABIS



CONFIRMACION A : ANFETAMINAS

