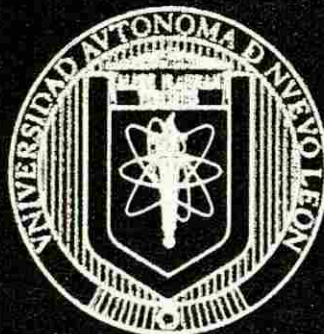


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
PARA LA DETERMINACION DE DROGAS DE
ABUSO EN ORINA POR CLAR ACOPLADA
A ESPECTROMETRIA DE MASAS/MASAS
CON IONIZACION A PRESION
ATMOSFERICA (IES).**

Por

Q.C.B. ELTON SOLIS ESQUIVEL

Como requisito parcial para obtener el Grado
de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Biomédica

AGOSTO 2005

©

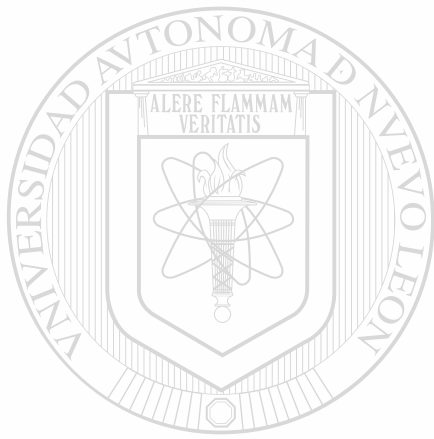
2005

S65

HV5801

TM

ELFTON SOLIS ESQUJIVEL



UANL

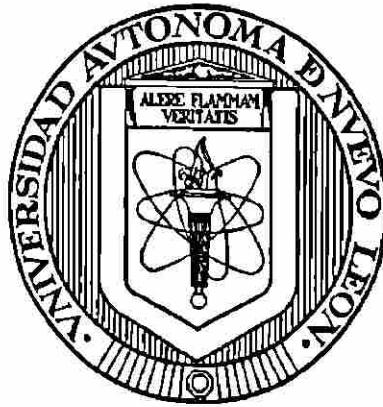
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN ORINA POR CLAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS CON IONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (IES).

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

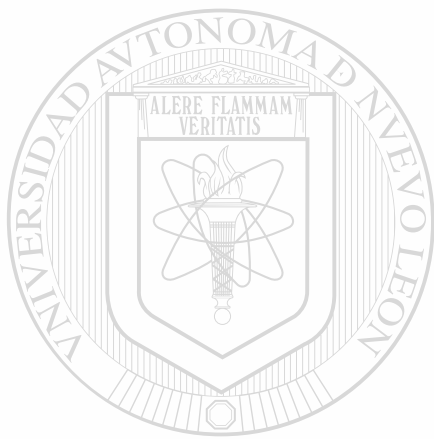
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Q.C.B. ELTON SOLÍS ESQUIVEL

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica

AGOSTO 2005

TN
HV5801
.S65
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

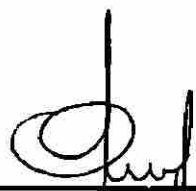
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

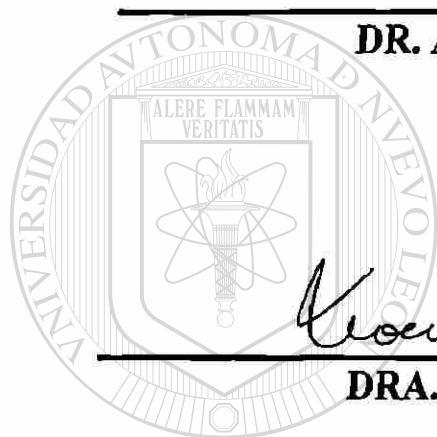


DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN ORINA POR CLAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS CON IONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (IES).

Aprobación de Tesis:



DR. ADOLFO CABALLERO QUINTERO
Director de Tesis



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN
DE DROGAS DE ABUSO EN ORINA POR CLAR ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS CON IONIZACIÓN A PRESIÓN
ATMOSFÉRICA (IES).

Presentado por:

Q.C.B. ELTON SOLÍS ESQUIVEL

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Forense de la Dirección de Criminalística y Servicios Periciales de la Agencia Estatal de Investigaciones de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Nuevo León y en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Adolfo Caballero Quintero y la coasesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Dra. Rocío Castro Ríos.

FIRMAS

DIRECTOR

CO DIRECTOR


Dr. Adolfo Caballero Quintero


Dra. Noemí Waksman de Torres

CO DIRECTOR


Dra. Rocío Castro Ríos

AGRADECIMIENTOS

Sin la intención de distinguir en importancia por el orden seguido a continuación, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

A todos y cada uno de los profesores del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Autónoma de Nuevo León, por la noble e invaluable labor de compartir sus conocimientos en el programa de maestría en el cual obra el presente trabajo, en especial a la comisión de tesis:

Dr. Adolfo Caballero Quintero, por su tiempo, disposición y apoyo incondicional en todo momento.

Dra. Noemí Waksman de Torres, por la oportunidad brindada, su paciencia y su valiosa participación en el presente trabajo.

Dra. Rocío Castro Ríos, por sus valiosas sugerencias e interés en el presente trabajo.

A la Agencia Estatal de Investigaciones de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León, por permitirme el uso de su equipo, invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

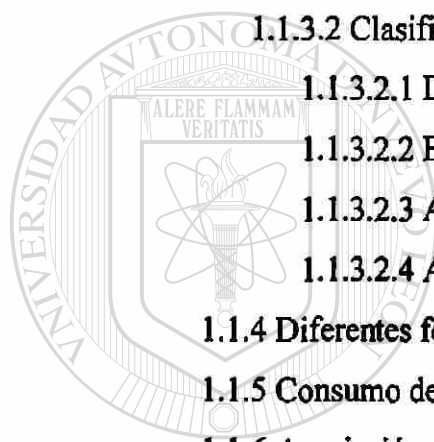
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mi familia por ser mi inspiración en todo momento de todas y cada una de mis actividades.

A Dios por estar conmigo en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Droga.....	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Historia	2
1.1.3 Clasificación	3
1.1.3.1 Clasificación sociológica	3
1.1.3.2 Clasificación farmacológica	4
1.1.3.2.1 Depresores	4
1.1.3.2.2 Estimulantes	5
1.1.3.2.3 Analgésicos	5
1.1.3.2.4 Alucinógenos	5
1.1.4 Diferentes formas de referirse a una droga en particular	5
1.1.5 Consumo de drogas en México	5
1.1.6 Asociación de la droga con el delito	7
1.1.6.1 Delitos cometidos bajo la influencia de la droga	7
1.1.6.2 Aspectos jurídicos en cuanto al consumo de drogas	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Muestras útiles para la determinación de drogas.....	10
2.1.1 Muestra de sangre	10
2.1.2 Muestra de orina	11
2.2 Estudios para determinar el consumo de drogas	12
2.2.1 Estudios presuntivos.....	12
2.2.2 Estudios confirmatorios.....	13
2.2.2.1 Espectrometría de masas.....	14
2.2.2.1.1 Componentes de un espectrómetro de masas.....	14
2.2.2.1.1.1 Fuente de iones	14
2.2.2.1.1.2 Analizador.....	14

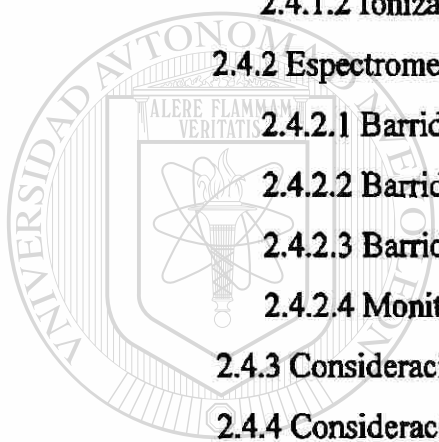


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.2.1.1.3	Detector.....	14
2.2.2.1.2	Representación de la abundancia de iones.....	14
2.2.2.1.2.1	Espectro continuo	15
2.2.2.1.2.2	Espectro de fragmentación.....	15
2.3	Técnicas utilizadas para la confirmación del uso de drogas.....	15
2.4	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas/Masas con Ionización a Presión Atmosférica.....	17
2.4.1	Ionización a Presión Atmosférica.....	18
2.4.1.1	Electrospray	18
2.4.1.2	Ionización Química a Presión Atmosférica	19
2.4.2	Espectrometría de Masas/Masas	20
2.4.2.1	Barrido del ion producto.....	21
2.4.2.2	Barrido del Ion precursor	22
2.4.2.3	Barrido de pérdidas neutras	22
2.4.2.4	Monitoreo de Reacción Múltiple	23
2.4.3	Consideraciones IPA/EM	24
2.4.4	Consideraciones Cromatográficas	25
2.5	Justificación	26
2.6	Drogas en estudio	28
2.6.1	Metanfetamina	28
2.6.2	Clonazepam	29
2.6.3	Cocaína y Benzoilecgonina	30
2.7	Objetivos	31
2.7.1	Objetivo general.....	31
2.7.2	Objetivos particulares.....	31
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1	Equipo, Material y Reactivos.	32
3.1.1	Equipos	32
3.1.2	Materiales	32
3.1.3	Reactivos.....	33



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2 Metodología	34
3.2.1 Optimización de los parámetros espectrométricos	34
3.2.2 Desarrollo del método cromatográfico	36
3.3 Validación	36
3.3.1 Límite de Detección y Límite de Cuantificación	37
3.3.1 Linealidad	38
3.3.3 Precisión y Exactitud	39
3.3.4 Especificidad	40
3.3.5 Robustez	41
3.4 Aplicación del método desarrollado a muestras reales.....	41

4. RESULTADOS

4.1 Condiciones espectrométricas óptimas para la detección	42
4.2 El método cromatográfico	46
4.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación	48
4.4 Linealidad	48
4.5 Precisión y Exactitud	50
4.6 Especificidad	53
4.7 Robustez	54
4.8 Aplicación del método desarrollado a muestras reales	58

5. DISCUSIÓN	59
---------------------------	----

6. CONCLUSIONES	70
------------------------------	----

7. PERSPECTIVAS	71
------------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	72
---------------------------	----

APÉNDICES	77
------------------------	----

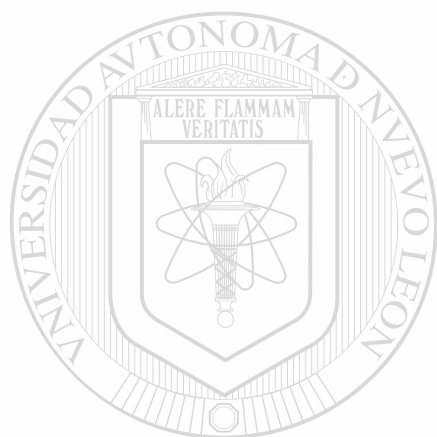
LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Porcentaje de personas que han consumido drogas alguna vez en su vida en la Republica Mexicana.....	6
2. Ionización a Presión Atmosférica por Electrospray.....	19
3. Ionización Química a Presión Atmosférica.....	20
4. Representación del barrido del ion producto	21
5. Representación del barrido del ion precursor.....	22
6. Representación del barrido de perdidas neutras.....	23
7. Representación del Monitoreo de Reacción Múltiple.....	24
8. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la metanfetamina.....	43
9. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la metanfetamina-D5.....	43
10. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la benzoilecgonina.....	44
11. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la benzoilecgonina-D3.....	44
12. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la cocaína.....	45
13. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto del clonazepam	45
14. Fragmentogramas de un estándar de calibración, 500 ng/mL en orina .	47
15. Fragmentogramas de un blanco de orina	53
16. Fragmentogramas de muestra de orina de un sospechoso que resultó positivo para el consumo de cocaína en pruebas presuntivas	58

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Solventes y modificadores empleados en IPA/EM	25
II. Compatibilidad de IPA/EM con varios modos cromatográficos.	27
III. Pareja Ion Precursor-Ion Producto de los diferentes analitos.	34
IV. Parámetros espectrométricos, rango permitido y su importancia	35
V. Valores de voltaje obtenido para cada parámetro de cada uno de los analitos.....	42
VI. Parámetros cromatográficos de separación.	46
VII. Límites de Detección y Cuantificación para cada uno de las sustancias	48
VIII. Rango Lineal, Coeficiente de Correlación y Factor de Respuesta Relativa de la determinación de drogas de abuso por CLAR/IES/EM/EM obtenidos en base a estándar interno.....	49
IX. Rango Lineal, Coeficiente de Correlación y Factor de Respuesta Relativa de la determinación de drogas de abuso por CLAR/IES/EM/EM obtenidos en base a estándar externo	49
X. Precisión y exactitud de los analitos en tres niveles obtenido en base a estándar interno	50
XI. Precisión y exactitud de los analitos en tres niveles obtenido en base a estándar externo.....	50
XII. Resultados de la prueba t al comparar la precisión obtenida en base a estándar interno, con la obtenida en base a estándar externo....	52
XIII. Resultados de la prueba t al comparar la exactitud obtenida en base a estándar interno, con la obtenida en base a estándar externo.	52
XIV. Parámetros cromatográficos obtenidos al variar diversos factores al evaluar la robustez.....	54
XV. Resultados obtenidos de %R al variar diversos factores para evaluar	

la robustez en base a estándar interno	55
XVI. Resultados de %R obtenidos al variar diversos factores para evaluar la robustez en base a estándar externo	56
XVII. Resultados de la prueba F para determinar si existe diferencia entre los %R obtenidos al hacer modificaciones en el flujo.....	57
XVIII. Resultados de la prueba F para determinar si existe diferencia entre los %R obtenidos modificación en la composición inicial de la fase móvil.....	57



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



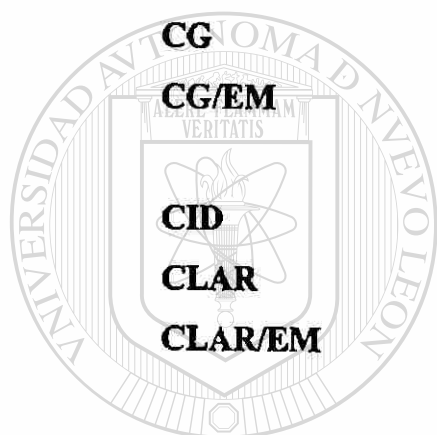
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICES

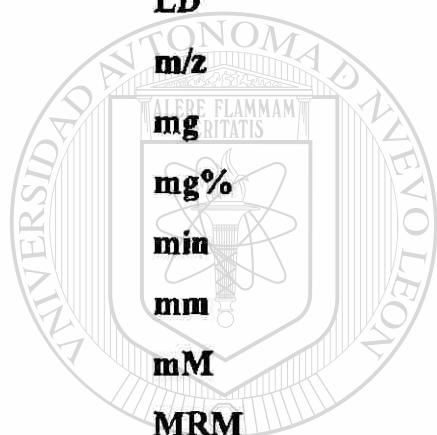
Apéndice	Página
A Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para clonazepam.....	78
B Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para metanfetamina.	79
C Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para metanfetamina-D5.....	80
D Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para cocaína.	81
E Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para benzoilecgonina.....	82
F Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para benzoilecgonina-D3.	83
G Curvas de calibración de cada uno de los analitos obtenidas en base a estándar interno.....	84
H Curvas de calibración de cada uno de los analitos obtenidas en base a estándar externo.....	85

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

AAFS	Asociación Americana de Ciencias Forenses
AEI	Agencia Estatal de Investigaciones.
BSTFA	bis(trimetilsilil)trifluoracetamida.
CAD	Disociación de un ion activado a través de colisión
CE	Energía de Colisión
CEP	Potencial de Entrada a la Celda de Colisión
CG	Cromatografía de Gases
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CID	Disociación Inducida por Colisión
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAR/EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas.
CLAR/IPA	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Ionización a Presión Atmosférica.
CLAR/IPA/EM/EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tándem con Ionización a Presión Atmosférica.
cols	Colaboradores
cps	Cuentas por segundo
CXP	Potencial de Salida de la Celda de Colisión
C₆H₅COO·	Radical benzoato
DP	Potencial de Desagrupamiento
EM	Espectrometría de Masas
EM/IPA	Espectrometría de Masas con Ionización a Presión Atmosférica
EP	Potencial de Entrada
F_{0.05}	Valor de F con 0.05 de significancia



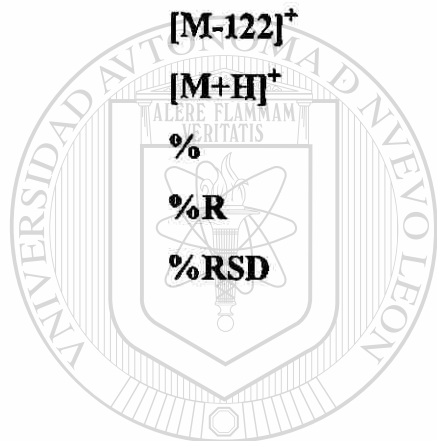
FP	Potencial de Enfoque
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
H	Protón
IES	Ionización por electrospray
IPA	Ionización a Presión Atmosférica
IPA/EM	Espectrometría de Masas con Ionización a Presión Atmosférica.
IQPA	Ionización Química a Presión Atmosférica
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
m/z	Relación masa carga.
mg	Microgramos
mg%	Miligramos por cada cien mililitros de solución
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRM	Monitoreo de Reacción Múltiple
ng/mL	Nanogramos por mililitro
N₂	Nitrógeno
NO₂	Radical nitro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGJE	Procuraduría General de Justicia en el Estado
pH	Potencial de Hidrógeno
Q1	Primer cuadrupolo
Q2	Segundo cuadrupolo
Q3	Tercer cuadrupolo
r²	Coefficiente de correlación
R	Resolución
SNC	Sistema Nervioso Central
SOFT	Sociedad de Toxicología Forense
t_R	Tiempo de retención



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

$0.025t$	Valor de t con 0.025 de significancia
V	Voltios
α	Factor de separación
μL	Microlitros
$\mu\text{L}/\text{min}$	Microlitros por minuto
μM	Micromolar
$[\text{M}]^+$	Ion molecular
$[\text{M}+\text{H}-46]^+$	Ion molecular mas un protón, menos cuarenta y seis unidades de masa
$[\text{M}-122]^+$	Ion molecular menos ciento veintidós unidades de masa
$[\text{M}+\text{H}]^+$	Ion molecular mas un protón
%	Porcentaje
%R	Recuperación
%RSD	Coefficiente de Variación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

QCB Elton Solís Esquivel

Fecha de graduación: Agosto 2005

Título de la Tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN ORINA POR CLAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MASAS CON IONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (IES).

Número de páginas: 85

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.

Área de Estudio: Química Biomédica.

Propósito y Método de Estudio:

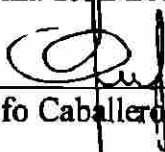
Se desarrolló y validó un método por CLAR/IES/EM/EM sensible y específico para la determinación simultánea, rápida y confiable de benzoilecgonina, metanfetamina, cocaína y clonazepam. La inyección directa de la orina en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución acoplado a un Espectrómetro de Masas en Tandem con ionización por Electrospray (CLAR/IES/EM/EM) redujo sustancialmente los tiempos de análisis. La separación de los analitos se llevó cabo con una columna de fase inversa C-8 y fase móvil compuesta de acetonitrilo y amortiguador de formiato 10 mM de pH 4.5. El tiempo de corrida fue de 18 minutos, logrando valores de resolución entre los analitos > 1.5 . La identificación de los analitos se llevó a cabo por medio del Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM). Se establecieron límites de cuantificación entre 5.30–94.33 ng/mL para las drogas estudiadas, y la linealidad se obtuvo mediante un análisis de regresión lineal en curvas de calibración elaboradas en base a estándar interno y externo hasta 6000 ng/mL con un coeficiente de correlación (r^2) > 0.99 . En las modificaciones en flujo y composición inicial de la fase móvil afectó más la recuperación al evaluarse por estándar externo que por estándar interno. Se evaluó la especificidad del método por medio del análisis de 10 muestras blanco de orina de diferentes orígenes. El método es simple, consume poco tiempo, y fue aplicable al monitoreo de drogas de abuso en el trabajo diario de los Laboratorios de Química Forense de Dirección de Servicios Periciales de la Agencia Estatal de Investigaciones (AEI) de la Procuraduría General de Justicia del estado de Nuevo León (PGJE), en esta institución este tipo de estudios es de suma importancia, ya que los resultados definen la condición civil, laboral o jurídica de las personas a quienes se les practica.

Conclusiones y Contribuciones:

El método desarrollado por CLAR/IPA/EM/EM para el análisis de benzoilecgonina, metanfetamina, cocaína y clonazepam en orina es capaz de identificar a las drogas directamente en la matriz, sin la necesidad de un procedimiento previo de extracción, con sensibilidad y especificidad superior a las pruebas inmunológicas utilizadas como presuntivas en los laboratorios de química forense en el país.

El método desarrollado se estableció como prueba confirmatoria para la determinación de benzoilecgonina, metanfetamina, cocaína y clonazepam en orina, en el Laboratorio de Química Forense de la AEI de la PGJE.

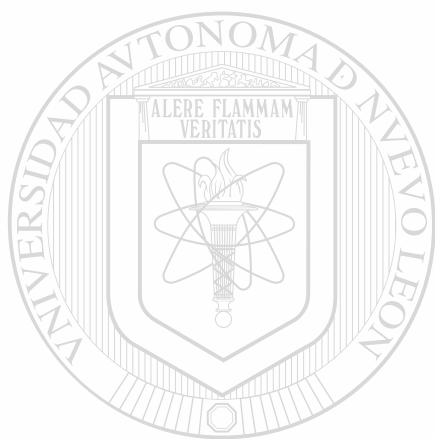
Firma del Director



Dr. Adolfo Caballero Quintero

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



1.1 La droga

1.1.1 Definición

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), droga es toda sustancia que es capaz de actuar sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) del individuo provocando una alteración psíquica o intelectual; esto significa que droga es cualquier sustancia que actúa a nivel del proceso químico de la transmisión sináptica. Dicha sustancia puede ser terapéutica o no, y puede ser introducida al organismo por medio de los mecanismos de administración clásicos: inhalación de vapores o humo, ingestión, fricciones; o por nuevos mecanismos de administración: parental o endovenoso.^[1]

1.1.2 Historia de la interacción del hombre y la droga.

Desde la prehistoria, cuando el hombre hizo su aparición, ya había en la tierra árboles, plantas y hongos que contenían sustancias consideradas como drogas, el hombre en su afán de conocer todo, probó sustancias que lo hacían sentirse bien, aliviaban el dolor e incluso podían provocarle la muerte.

Conforme el hombre fue evolucionando, fue dándole un valor a cada una de estas sustancias, llegando así a mistificar y apreciar las drogas: las que estaban destinadas únicamente a sacerdotes, a cierta clase política o a los guerreros.

Con el paso del tiempo, las sociedades fueron creciendo desmesuradamente y los gobiernos perdieron el control de los gobernados, afectando el abuso de las drogas a todos los integrantes de la sociedad. En el periodo actual esta amplia distribución empezó con los grupos inconformes presentes a mediados del siglo veinte d.C., que dentro de su forma de protesta contra lo establecido y las normas sociales, optaron por vestimentas extravagantes y el abuso de drogas; dentro de este grupo se encontraron muchos artistas de fama mundial como los Beatles y los Rolling Stones, lo que propició que estas actitudes fueran copiadas por millones de seguidores que los admiraban y los seguían en su rebelión juvenil.

Hoy en día la juventud y la rebeldía no es una característica esencial en los grupos consumidores de drogas ya que en ellos hay gente de todas clases sociales, pobres, ricos, negros, blancos, padres de familia, estudiantes, delincuentes, intelectuales, etc. que con gran facilidad hacen uso de estas sustancias, mismas que están prácticamente al alcance de todos. [2, 3]

1.1.3 Clasificación

Existen diferentes formas para clasificar a las drogas, esto debido a su gran diversidad. Cada una de estas clasificaciones se basa en criterios particulares limitándose a un determinado campo de acción. [4, 5]

1.1.3.1 Clasificación sociológica.

En nuestra sociedad, *droga* se considerada una *mala palabra*, sin embargo, en base a la definición de la OMS, podemos considerar como droga a bebidas como el café y el té negro, que para la mayoría de los individuos de nuestra sociedad no comparten el mismo juicio, por ser socialmente aceptadas. [6]

Desde un criterio sociológico las drogas se clasifican en drogas legales y drogas ilegales. Esta clasificación se basa en la incorporación de una determinada sustancia a un listado, norma, reglamento, decreto o ley, que le otorgue un carácter de ilegal. Una vez que la sustancia se incorpora la prohibición rige y su violación esta contemplada en los códigos de Procedimientos Civiles y Penales.

Cada sociedad establece sus propios juicios para definir a una droga como *ilegal* o *legal*, en base al daño que causen a sus integrantes. [4, 6, 7]

En nuestro país, el Código Federal de Procedimientos Penales para la República Mexicana, en lugar de la palabra droga, emplea la denominación narcótico (artículo 193), considerando como tales a los estupefacientes, psicotrópicos y demás sustancias o vegetales que determine la Ley General de Salud (artículos 239, 245, fracciones I, II, III), sin embargo, farmacológicamente, narcótico, sólo se considera a las sustancias que inducen el sueño y calman el dolor, por lo que la forma en que se considera a una sustancia narcótico por el Código Federal de Procedimientos Penales resulta farmacológicamente inadecuada. A pesar del error, esta consideración se emplea con un sentido netamente jurídico otorgándole una definición enumerativa. Por otra parte, la Secretaría de Salud tiene la libertad de introducir en cualquier momento cualquier otra sustancia, en las listas de los artículos 239 y 245 de su Ley General, debiéndose publicar en el Diario Oficial de la Federación (artículo 237 y 246). [4, 6, 8, 9]

1.1.3.2 Clasificación farmacológica.

Farmacológicamente, las drogas se clasifican en diferentes categorías.

1.1.3.2.1 *Depresores*, como los barbitúricos y el etanol. Este tipo de sustancias tienen propiedades sedativas, hipnóticas que inducen a la anestesia, coma y muerte con dosis altas.

1.1.3.2.2 *Estimulantes*. En este tipo de sustancias podemos incluir anfetaminas, cocaína y cafeína, inducen la euforia, un sentido de bienestar, incrementando la actividad mental, y la anorexia en algunos casos.

1.1.3.2.3 *Analgésicos*. En esta clase se encuentran los derivados del opio: En general alivian el dolor, ellos pueden ser narcóticos o no narcóticos y pueden ser altamente adictivos, medianamente adictivos, o no adictivos.

1.1.3.2.4 *Alucinógenos*, crean la percepción de objetos, sonidos, olores o sensaciones que no se basan en la realidad. Esta clase de sustancias se incluye a la marihuana, LSD y mezcalina, entre otros. [4, 6, 10, 11]

1.1.4 Diferentes formas de referirse a una droga en particular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Es común encontrar en la literatura diferentes formas de describir a una droga en particular, por ejemplo: el nombre comercial Asenlix, el nombre genérico Clobenzorex, el nombre químico (+)-N-(o-clorobenzil)- α -metilfenetilamina y el nombre que se le da en la calle Perico, corresponde a mismo componente.

1.1.5 Consumo de drogas en México

Según la encuesta publicada más reciente por el Consejo Nacional Contra las Adicciones, aplicada a la población urbana y rural del país entre los 12 y los 65 años, 5.03 % ha consumido algún tipo de droga sin contar el alcohol y el tabaco; la región norte del país, es la más afectada con un 7.45 %, le siguen las regiones del Centro con un 4.87 % y posteriormente el Sur con un 3.08 %. [12]

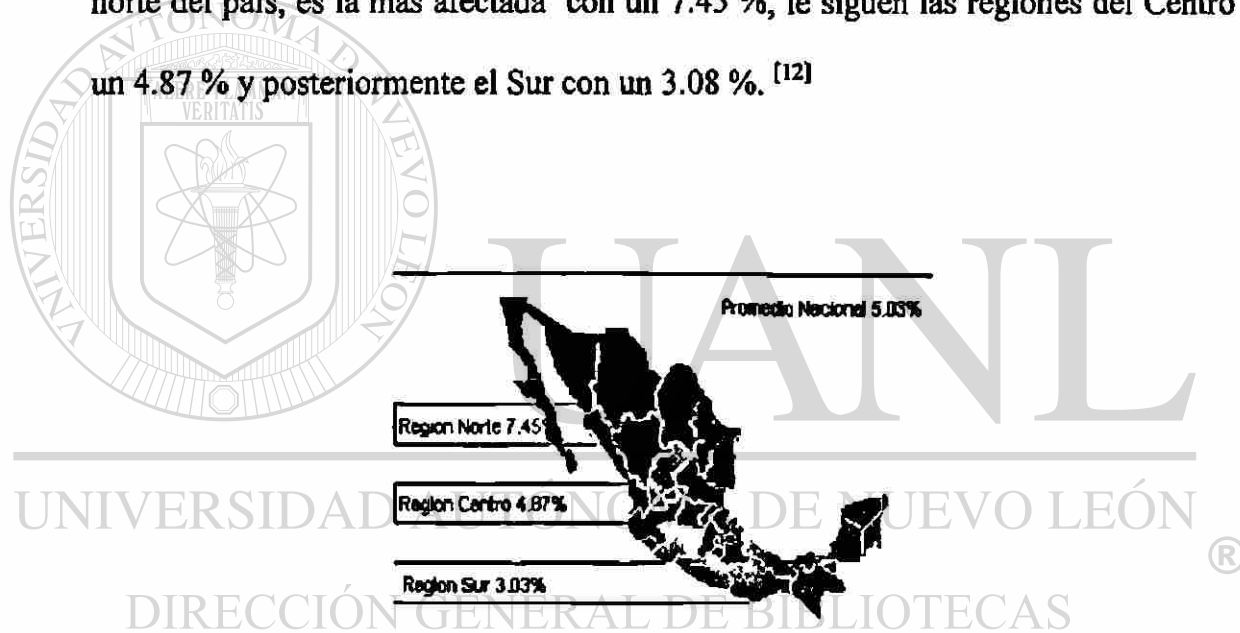


Figura 1. Porcentaje de personas que han consumido drogas alguna vez en su vida en la Republica Mexicana.

En cuanto a variaciones en consumo entre la población urbana y la rural, encontramos que el 5.57 % de la población urbana, que representa 2.9 millones ha usado drogas y en el caso de la población rural, el porcentaje es de 3.34 %, con un total de 563,242 personas. [12]

El número de personas entre 12 y 65 años que han utilizado algún tipo de droga, sin contar al alcohol y al tabaco, es de alrededor de 3.5 millones de los cuales 215 634 son adolescentes entre 12 y 17 años, 1 795 577 son adultos jóvenes entre 18 y 34 años y 1 495 391 son adultos entre 35 y 65 años.

En general el consumo es mayor en varones que en mujeres en una proporción de 4 a 1.

[12]

1.1.6 Asociación de la droga con el delito.

El consumo de drogas es un fenómeno ampliamente distribuido en la sociedad, están presente en diferentes culturas y clases con profundas consecuencias comunitarias y económicas. En particular, una de estas consecuencias comunitarias es el efecto negativo en la seguridad de sus integrantes al tener un lugar privilegiado en la etiología de muchos de los delitos que se cometen y la afectan. [5, 6]

1.1.6.1 Delitos cometidos bajo la influencia de la droga.

Una persona que consume droga, no es, ni debe ser visto como un delincuente por el solo hecho de consumir droga, sin embargo, no se puede negar que tal condición lo enfrentará con más probabilidad y frecuencia con las conductas peligrosas e ilícitas; la alteración causada sobre la estabilidad emocional, la facultad crítica, los mecanismos de autocontrol, el juicio y la atención, tornan a estas personas propensas a verse involucradas, tanto como sujetos activos o pasivos, en conductas antisociales como el

asalto, la riña, la violación, el homicidio, el suicidio y con hechos relacionados con accidentes de tránsito. Las acciones cometidas bajo la influencia de la droga están generalmente relacionadas con la acción tóxica que produce en el sujeto cierta clase de droga, por ejemplo, cuando el sujeto está bajo la influencia de algún estimulante, serán actos violentos, cargados de agresividad, mientras que al estar bajo la influencia de un depresor es poco probable la comisión de delitos violentos; sin embargo, será más propenso a participar en el hecho como sujeto pasivo, es decir, como afectado. Sin embargo, en los delitos relacionados con el consumo de drogas, la droga no lo es todo, también debe considerarse otro elemento criminológico: sus efectos varían en los diferentes individuos, y por lo tanto no es posible la generalización, aunque no por ello deja de ser el consumo de drogas un factor que propicia la comisión de delitos. [5, 6]

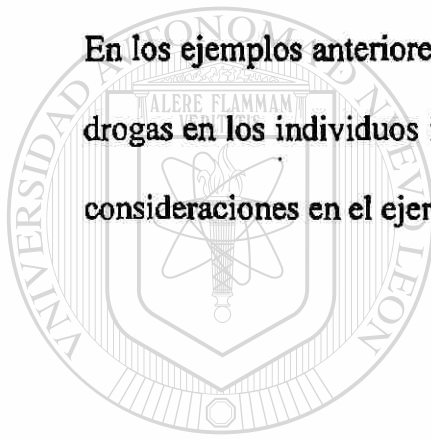
1.1.6.2 Aspectos jurídicos en cuanto al consumo de drogas.

— La importancia jurídica en la determinación de drogas en un individuo se puede inferir en artículos del Código Penal del Estado de Nuevo León. Respecto a los acusados que consumen drogas, el artículo 23 referente al Delito considera como causa inimputable al que en el momento de la acción u omisión, se encuentre en un estado de inconciencia en sus actos, determinado, entre otros, por el empleo de sustancias tóxicas como estupefacientes. Inclusive, a ciertos delitos culposos se le considera la culpa como grave en caso de conducir en estado de voluntaria intoxicación, como lo contempla el artículo 67 referente a la aplicación de sanciones en delitos culposos. [13, 14, 15]

En cuanto a Delitos Contra la Moral Pública, artículo 196, se considera corrupción de menores cuando, debido a los actos de corrupción el menor adquiera los hábitos de uso

de sustancias tóxicas; podemos considerar indudablemente como sustancia tóxica a las drogas. Otro ejemplo se manifiesta en el artículo 267 referente a Delitos Sexuales, en donde se considera como equiparable a violación a la persona que copule con persona que se encuentre sin sentido, el uso expedito de la razón o que por cualquier causa no pudiese resistir la conducta delictuosa. Entre los depresores del SNC se encuentran las benzodiazepinas, las cuales tienen efectos hipnóticos que pueden privar de la conciencia a las personas evitando una defensa ante la agresión. ^[13, 15]

En los ejemplos anteriores queda plasmada la importancia de determinar la presencia de drogas en los individuos involucrados en el delito, ya que de ello dependen en parte las consideraciones en el ejercicio de la acción penal. ^[13, 15]



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES



2.1 Muestras útiles para la determinación de drogas.

El primer paso para determinar el consumo de drogas en un individuo es la obtención de la muestra. En una persona con vida, las muestras útiles para estos fines son la sangre y la orina.

2.1.1 Sangre

La sangre es la muestra idónea para determinar los efectos farmacológicos y de comportamiento del individuo en base a la concentración de una droga.^[11]

Sin embargo, para la obtención de sangre es necesaria una punción intravenosa la cual es una forma totalmente invasiva que puede causar dolor y estrés al donador de la misma.

2.1.2 Orina

Aun y cuando la concentración de una droga en orina es un pobre indicador del comportamiento o influencia de la droga en el individuo, su estudio, al igual que en sangre, es ampliamente utilizado por los Sistemas de Justicia para corroborar otros hallazgos en la investigación en cuanto a la condición del individuo. ^[11]

Algunas drogas y sus metabolitos se pueden encontrar en orina por periodos de tiempo relativamente más largos que en sangre, de uno a tres días después de que han sido ingeridas o administradas, aun cuando sus efectos sobre el consumidor ha desaparecido.

[11]

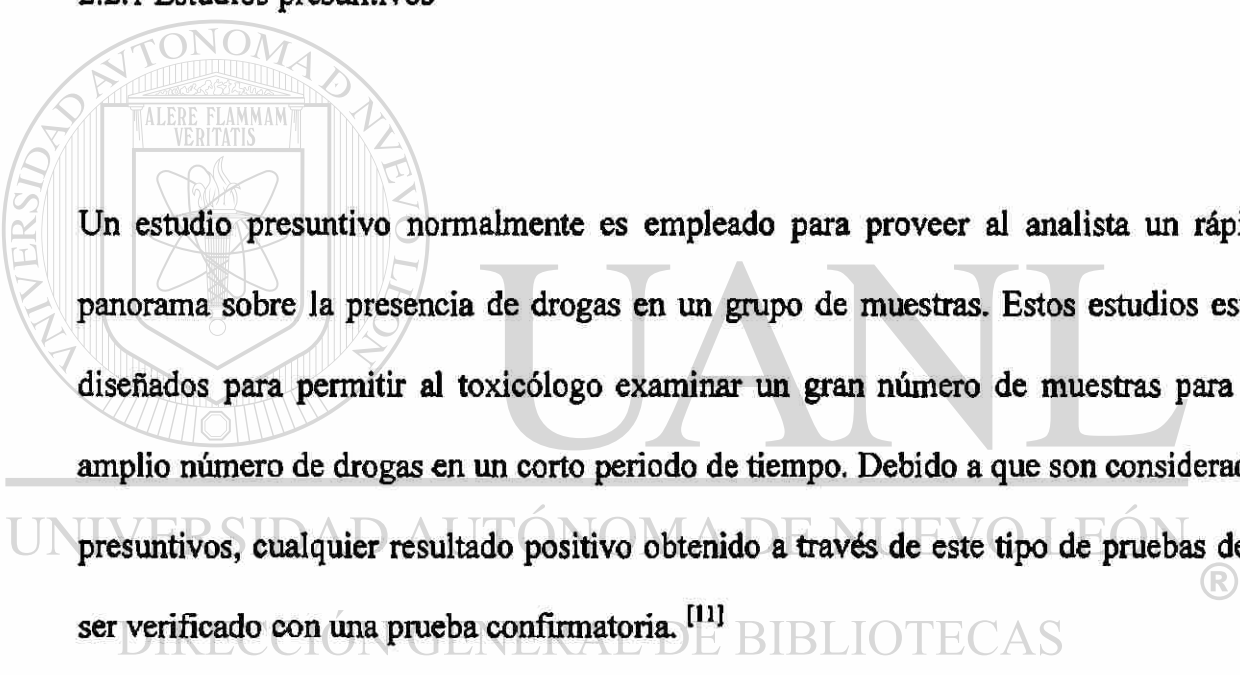
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En contraste con la obtención de sangre, para la obtención de orina no es necesario un procedimiento invasivo debido a que es un fluido que se desecha naturalmente del organismo en cantidad suficiente para los estudios, pudiendo ser depositada voluntariamente por el mismo individuo en el recipiente adecuado para su transporte. ^[11]

2.2 Estudios para determinar el consumo de drogas.

La estrategia que se sigue para la identificación de drogas en la muestra de un individuo consta de dos pasos: un estudio presuntivo y un estudio confirmatorio. ^[11]

2.2.1 Estudios presuntivos



Un estudio presuntivo normalmente es empleado para proveer al analista un rápido panorama sobre la presencia de drogas en un grupo de muestras. Estos estudios están diseñados para permitir al toxicólogo examinar un gran número de muestras para un amplio número de drogas en un corto periodo de tiempo. Debido a que son considerados presuntivos, cualquier resultado positivo obtenido a través de este tipo de pruebas debe ser verificado con una prueba confirmatoria. ^[11]

Las técnicas presuntivas que generalmente se utilizan, son: la Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía de Gases (CG) y los inmunoensayos. Actualmente el Laboratorio de Química Forense de la Dirección de Servicios y Criminalística utiliza los inmunoensayos como pruebas presuntivas. ^[11]

2.2.2 Estudios confirmatorios

Una vez que se obtiene un resultado positivo para el consumo de cierta droga es necesario llevar a cabo un estudio confirmatorio concluyente. La razón de ello es el potencial impacto legal que representa un resultado potencialmente falso para el consumo de drogas. ^[11]

Según la AAFS y la SOFT las características que debe de tener una prueba confirmatoria respecto a una prueba presuntiva son las siguientes: ^[14]

- Un principio físico o químico diferente.
- Mayor grado de especificidad.
- Límite de detección menor.
- Utilización de espectrometría de masas cuando sea posible.
- Puede utilizar un espécimen diferente.
- Puede usar una segunda alícuota del mismo espécimen si es necesario.

2.2.2.1 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (EM) es un método de análisis que se basa en la determinación de masas de especies individuales de la muestra analizada, ya sea atómicas o moleculares, lo que permite recabar información sobre su naturaleza, su composición y estructura. ^[16, 17]

En un espectrómetro de masas, cada analito es convertido en iones (especie cargada positiva o negativamente) y partículas neutras. Debido a que la molécula estudiada es

guiada a través del espectrómetro de masas por campos eléctricos cambiantes, es necesario que la molécula esté cargada y así ser acelerada, desacelerada o atrapada en el sistema. [16, 17, 18, 19]

2.2.2.1.1 Componentes de un espectrómetro de masas.

Los componentes más importantes de un espectrómetro de masas son: Fuente de iones, Analizador y Detector. [16]

2.2.2.1.1.1 Fuente de iones: En esta sección la especie estudiada es ionizada por numerosos procedimientos (ionización a presión atmosférica y a baja presión). En este estado, todo compuesto formado por moléculas produce una mezcla estadística de iones de fragmentación.

2.2.2.1.1.2 Analizador: Los iones son extraídos de la fuente, *focalizados* y *acelerados* por las lentes electrónicas para incrementar su energía cinética. Posteriormente los iones se filtran por el analizador de acuerdo a su relación m/z . Ciertos equipos combinan varios tipos de analizadores dispuestos en serie.

2.2.2.1.1.3 Detector: Después de la separación, los iones terminan su recorrido chocando con un detector que amplifica la muy débil corriente eléctrica originada.

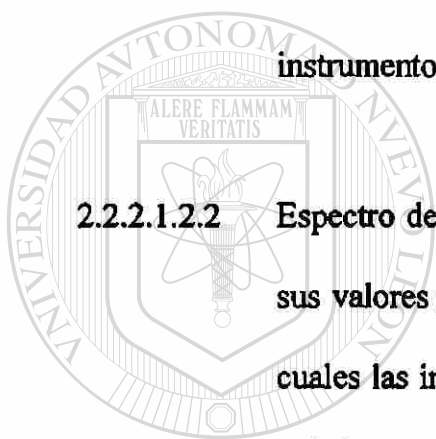
2.2.2.1.2 Representación de la abundancia de iones.

La señal obtenida por el detector se procesa para representar la abundancia de los iones en dos tipos de gráficos.^[16]

2.2.2.1.2.1 Espectro continuo: se representa en un intervalo de masas seleccionado.

Las señales aparecen como picos más o menos anchos según el instrumento.

2.2.2.1.2.2 Espectro de fragmentación: corresponde a un reparto de los iones según sus valores nominales enteros más próximos a sus masas reales y en las cuales las intensidades están expresadas en porcentaje en relación al pico más intenso, denominado pico base.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El acoplamiento en línea de la EM con CG o con Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es un medio de investigación irremplazable de la estructura de los compuestos en una mezcla de sustancias, lo que lo hace un método de aplicación forense adecuado para la determinación de drogas en matrices como los fluidos biológicos.^[11, 20]

2.3 Técnicas utilizadas para la confirmación del uso de drogas

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) ha sido uno de los pilares más grandes en los Laboratorios Forenses. La capacidad de separación e identificación de constituyentes menores en complicadas matrices en un mínimo de tiempo, han hecho que la CG/EM sea ampliamente utilizada en diferentes estudios, tales como la detección de explosivos ocultos y los residuos post-exposición, identificación de acelerantes en extractos contaminados de supuestos escombros de incendios, caracterización y autenticidad de compuestos, en base a la abundancia isotópica, y por supuesto la detección y el análisis de drogas y sus metabolitos en fluidos biológicos.

[11,18]

Tradicionalmente, se ha usado la CG/EM para la confirmación de consumo de drogas.

Sin embargo, a pesar de ser una técnica rápida en cuanto a separación e identificación de componentes, la preparación de la muestra para el análisis consume demasiado tiempo y consiste en procesos generalmente muy extensos, aun y cuando se utilice la extracción en fase sólida; indudablemente la derivatización debe ser llevada a cabo para la mayoría las drogas de abuso siendo esta selectiva para determinado grupo de sustancias ^[3, 18, 20,21].

Hoy en día, en cuanto a la confirmación del uso de drogas, la CG/EM está siendo remplazada rápidamente por la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tandem con Ionización a Presión Atmosférica, (CLAR/IPA/EM/EM) la cual ha sido la solución para algunos problemas con los que se

encuentran los toxicólogos analíticos debido a que permite el análisis confirmatorio de compuestos polares o no volátiles sin la necesidad de derivatización [3].

En comparación con el cuadrupolo simple, la espectrometría de masas con triple cuadrupolo ofrece mayor sensibilidad y selectividad para las especies de interés. Estos instrumentos cuando operan en el modo de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM) son capaces de cuantificar cantidades bajas del compuesto en matrices tan complejas como las biológicas, a veces con menor tiempo de análisis y preparación de la muestra para

CG/EM.

2.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas/Masas con Ionización a Presión Atmosférica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Dentro de las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, CLAR es la más conocida. Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito de la CG, a la que se le añade el análisis de compuestos termoestables o de aquellos con masas moleculares muy grandes o incluso sustancias polares [16].

Con el desarrollo y comercialización del acoplamiento de Espectrometría de Masas con Ionización a Presión Atmosférica (EM/IPA), se ha llevado por primera vez a la Cromatografía de Líquidos de alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR/EM) al ámbito de los procesos de análisis de rutina.

La combinación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Ionización a Presión Atmosférica (CLAR/IPA) ha sido extremadamente exitosa, debido a:

- IPA es capaz de manejar volúmenes de líquido usados comúnmente en CLAR.
- IPA es empleado para el análisis de compuestos típicamente analizados por CLAR, como sustancias volátiles, polares e inestables térmicamente.
- IPA/EM son sistemas sensibles, ofrece límites de detección comparables o mejores que los obtenidos en CG/EM.
- IPA son sistemas muy rudos y relativamente fáciles de usar. ^[16,22,23]

Por estas razones, la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada Espectrometría de Masas con Ionización a Presión Atmosférica (CLAR/IPA/EM) es una técnica encontrada en muchos laboratorios comerciales y de investigación. ^[22]

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4.1 Ionización a Presión Atmosférica.

IPA o API por sus siglas en inglés, es el nombre general para las técnicas de ionización en el que los iones son formados a presión atmosférica. En cuanto a acoplamientos con CLAR se distinguen dos técnicas de ionización suave: Electrospray (IES) e Ionización Química a Presión Atmosférica (IQPA) en donde los iones obtenidos son pseudomoleculares, formados antes de entrar al espectrómetro. ^[16, 22, 23]

2.4.1.1 Electrospray

Con el IES se producen moléculas ionizadas en fase gaseosa provenientes de una solución. Esto es posible gracias a un spray fino de gotas altamente cargadas producidas por un capilar de sílice metalizado superficialmente y llevado con un potencial positivo elevado (si se ha escogido estudiar iones positivos); el intenso campo eléctrico le confiere una importante densidad de carga (m/z).

Las gotas se evaporan progresivamente perdiendo las moléculas del solvente por complejos mecanismos de desolvatación y evaporación, esto con ayuda de un gas seco (N_2), justo antes de entrar al espectrómetro de masas. Conforme las gotas reducen su tamaño, la densidad de carga llega a ser muy grande, explotando y liberando los iones, no fragmentados y protonados, portadores de un número variable de cargas. IES puede ser acoplada con CLAR en un rango de flujo de 2 a 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ [16, 22, 23, 24].

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

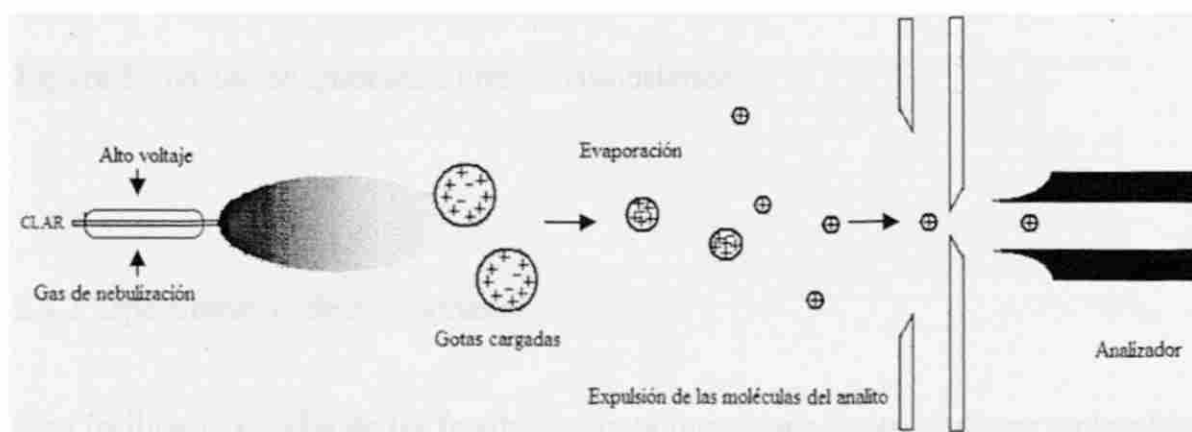


Figura 2. Ionización a Presión Atmosférica por Electro-spray

2.4.1.2 Ionización Química a Presión Atmosférica.

Las microgotas que salen de un conducto se concentran por calor antes de llegar a una zona donde se encuentran con N_2 gas y vapor de agua que han sido previamente ionizados por descargas en “corona” de un electrodo. Se producen numerosas colisiones iones/molécula con transferencia de electrones y de protones. Este proceso de ionización química produce iones pseudomoleculares y multicargados del tipo $(M + nH)^{n+}$ [16, 17, 22, 23, 24]

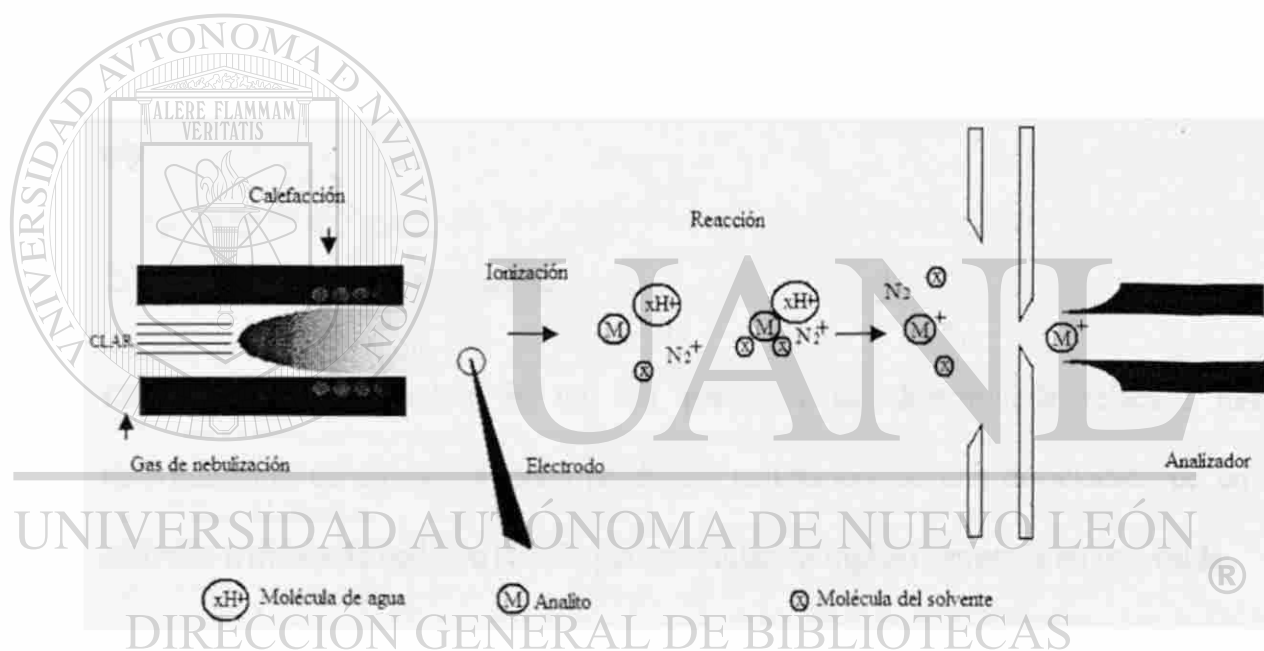


Figura 3. Ionización Química a Presión Atmosférica.

2.4.2 Espectrometría de masas/masas.

Para facilitar el estudio de las fragmentaciones que siguen los compuestos moleculares, se han construido espectrómetros de masas que incorporan dos o tres analizadores en serie situados en el trayecto de los iones entre la fuente y el detector. No se trata, por lo

tanto, de la colocación de un equipo tras otro, sino de la asociación en un equipo, un sector magnético seguido de un cuadrupolo o un Tiempo de Vuelo (TOF, por sus siglas en inglés), dos cuadrupolos, TOF seguido de un cuadrupolo, son ejemplos de estos equipos. [16]

Entre los dos analizadores se encuentra situada una cámara de colisión. La configuración más común de este tipo utiliza cuadrupolos como analizadores. [16].

Los cuatro modos usuales de operación usando EM/EM son: barrido de iones producto, barrido de ion precursor, barrido de pérdidas neutras y monitoreo de reacción múltiple.

[19]

2.4.2.1 Barrido de iones producto.

Consiste en la selección de un ion precursor de determinada relación m/z y determinación de todos los iones productos resultantes de una disociación de un ion activado a través de colisión (CAD, por sus siglas en inglés) generada en una celda.

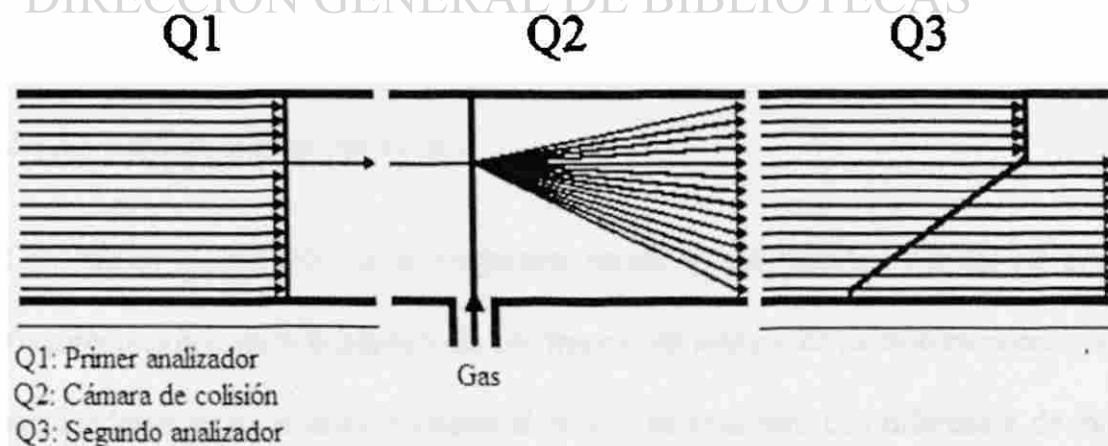


Figura 4. Representación del barrido del ion producto

2.4.2.2 Barrido de ion precursor.

Consiste en la elección de un ion producto determinando su ion precursor. Este método es llamado “barrido del precursor”, debido a que el ion precursor es el que se identifica. Este barrido requiere el enfoque de un ion seleccionado en el segundo analizador, mientras se barre las diferentes m/z usando el primer analizador. Se detectan todos los iones precursores que producen la seleccionada m/z a través de una reacción o fragmentación.

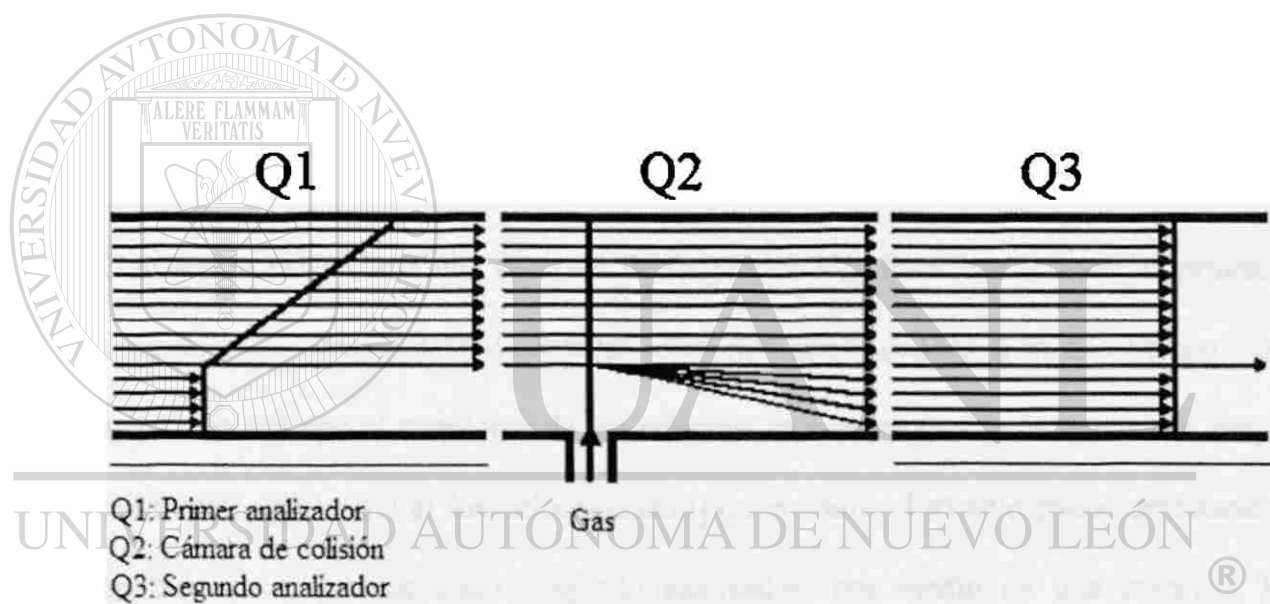


Figura 5. Representación del barrido del ion precursor

2.4.2.3 Barrido de pérdidas neutras

Consiste en la selección de un fragmento neutro y la detección de todas las principales fragmentaciones para la pérdida de ese fragmento neutro. El barrido requiere que ambos analizadores realicen la exploración al mismo tiempo pero con diferencia de m/z entre los dos. Así para una diferencia de m/z a , cuando un ion de m/z m pasa a través del primer cuadrupolo, la detección ocurre si este ion ha producido un fragmento de m/z $m-a$ al dejar la celda de colisión.

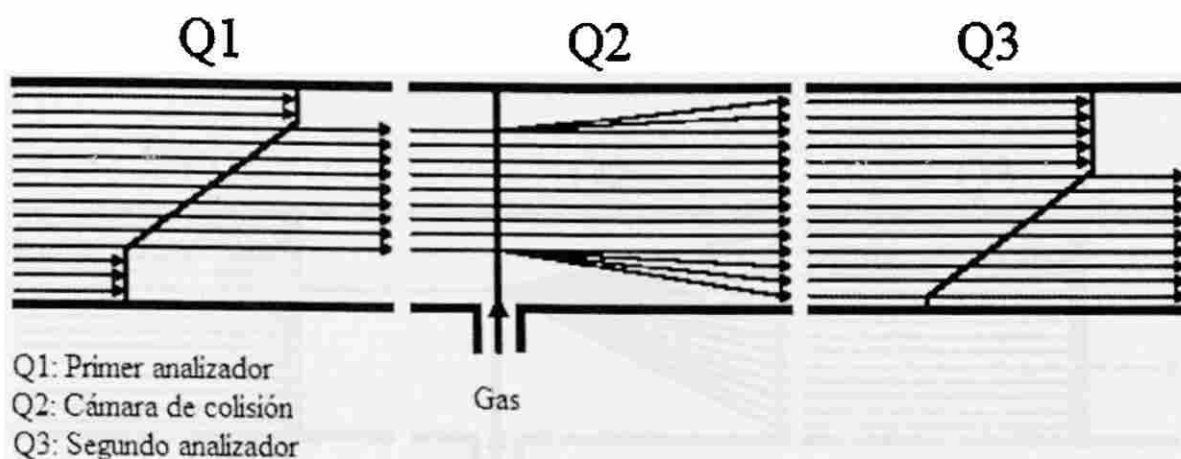


Figura 6. Representación del barrido de pérdidas neutras

2.4.2.4 Monitoreo de Reacción Múltiple.

Consiste en seleccionar una reacción de fragmentación. Para este método, el primer y segundo analizador se debe de enfocar sobre m/z seleccionadas al mismo tiempo. Este método es análogo al monitoreo de ion selectivo en espectrometría de masas con simple

cuadrupolo, pero aquí el ion seleccionado (primer analizador) sólo puede detectarse si produce un fragmento dado (segundo analizador) por medio de una reacción. La ausencia de barrido permite enfocar sobre el precursor y el fragmento en todo momento, incrementando la sensibilidad asociado con un alto incremento en la selectividad. [16, 17,

24]

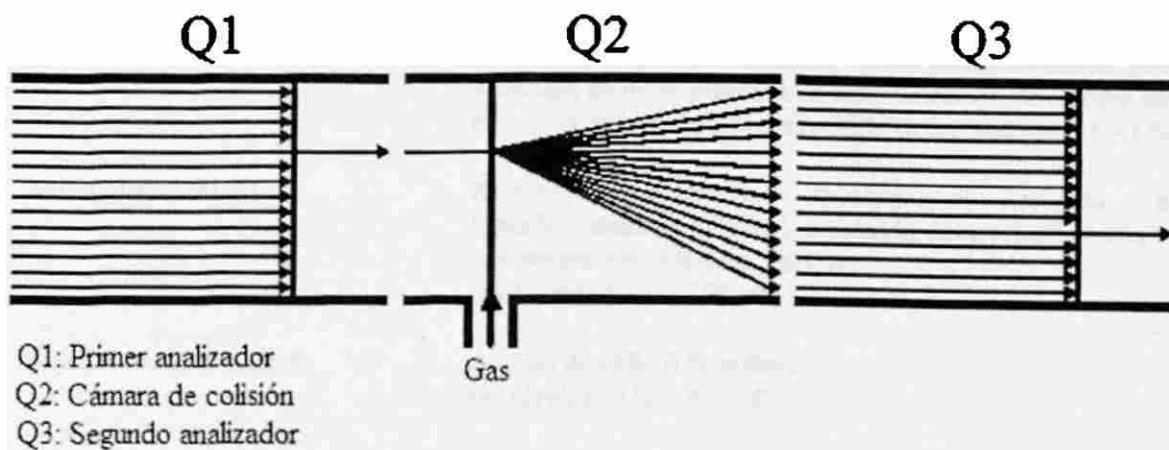


Figura 7. Representación del Monitoreo de Reacción Múltiple.

2.4.3. Consideraciones IPA/EM

CLAR/EM aún está limitado por condiciones referentes a la operación del EM. En el acoplamiento de las técnicas IPA requieren del uso de modificadores para controlar el pH, el cual es un factor sumamente importante en estas técnicas, estos modificadores deben de ser volátiles para prevenir la contaminación de la interfase. [22].

Tabla I. Solventes y modificadores empleados en IPA/EM

pH	Ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético para la detección de iones positivos en IES; hidróxido de amonio para la detección de iones negativos en IES (en un rango de 0.1 – 1 %)
Amortiguador de pH	Acetato de amonio, formiato de amonio, ácido heptafluorobutírico (HFBA), hidróxido de tetrabutilamonio ó de tetraetilamonio (TBAH o TEAH) (en niveles de 10 – 100 mM)
Reactivos cationizantes	Acetato de sodio ó de potasio (en niveles de 20 – 50 µM)
Solventes	Metanol, etanol, propanol, ^b isopropanol, ^b butanol, ^b acetonitrilo, agua, ácido acético, ^a ácido fórmico, ^a acetona, ^a dimetilformamida, ^a dimetilsulfoxido, ^a 2-metoxi etanol, ^b tetrahidrofurano, ^a cloroformo
Solventes solamente para IQPA (no empleados en IES)	Hidrocarburos (hexano, ciclohexano, tolueno), CS ₂ , CCl ₄ .

^a Solventes que han sido usados en rango de 5 – 20 % por la referencia. No han sido evaluados por la referencia porcentajes más altos.

^b Solventes que son mejores en la operación con iones negativos.

2.4.4 Consideraciones Cromatográficas.

Diversas técnicas de separación cromatográfica pueden ser acopladas a IPA/EM, la clave para realizar la separación y mantener un buen funcionamiento de IPA/EM en CLAR/EM es encontrar las condiciones de separación compatible con IPA/EM. [22]

Tabla II. Compatibilidad de IPA/EM con varios modos cromatográficos.

Modo	IES	IQPA	Comentarios
Fase inversa	+++	++	Es posible la formación de iones en solución; usualmente limitada a muestras volátiles.
Fase normal	+	+++	Los iones en solución (visibilidad no acuosa) pueden ser un problema; usualmente la muestra es volátil.
Exclusión molecular	+++	+	Pueden causar problemas los amortiguador de pH para evitar los mecanismos de no exclusión; muchas de las muestras no son volátiles y con un alto peso molecular.
Par iónico	++	++	Los reactivos iónicos pueden competir por el proceso de ion-evaporación; volatilidad de la fase móvil.
Intercambio iónico.	+	+	Las altas fuerzas iónicas pueden ser un problema; la limitada volatilidad de los modificadores en la fase móvil.
Interacción hidrofóbica.	+	+	Uso de gradientes salinos para fluir las moléculas; las sales no son compatibles con IPA/EM
Inmunoafinidad	+++	+	La fase móvil con frecuencia son compatibles con IPA/EM, usualmente las muestras no son volátiles.

En general los siete modos comunes son compatibles con IES debido a que los iones pueden ser creados en solución.

2.5 Justificación

Los estudios referentes a la determinación de drogas en personas vivas, son de los dictámenes más solicitados a los Laboratorios de Química Forense de Dirección de Servicios Periciales de la Agencia Estatal de Investigaciones (AEI) de la Procuraduría General de Justicia del estado de Nuevo León (PGJE). En el año 2003 se elaboraron

cerca de 700 dictámenes relacionados a la determinación de drogas de abuso, y en el año 2004 se realizaron cerca de 900. Este tipo de servicio se da a diversas dependencias de Gobierno como lo son las Agencias del Ministerio Público del fuero común y Federal, además de la Procuraduría de la Defensa del Menor, Poder Judicial y a la Secretaría de Seguridad Pública. Además se apoya a Procuradurías y diversas Secretarías de los Estados de Coahuila y Tamaulipas para confirmar resultados de los estudios elaborados por ellos mismos ^[25].

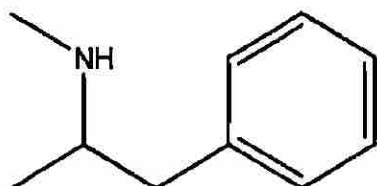
Las dependencias que solicitan estos estudios requieren los resultados con apremio, a fin de definir la condición civil, laboral o jurídica de las personas a quienes se les practican. En el caso de las Agencias del Ministerio Público se cuentan con términos constitucionales para resolver la situación jurídica del sospechoso.

Ante esta situación, se pretende establecer un método capaz de detectar drogas en orina de manera rápida y confiable, que pueda ser utilizado como prueba confirmatoria.

El presente trabajo se enfoca a tres drogas en particular: cocaína, metanfetamina y clonazepam, además de la Benzoilecgonina, metabolito proveniente de la farmacocinética de la cocaína. La selección se hizo en base al número de estudios confirmatorios solicitados a la Dirección de Criminalística y Servicios Periciales ya mencionada.

2.6 Drogas en estudio

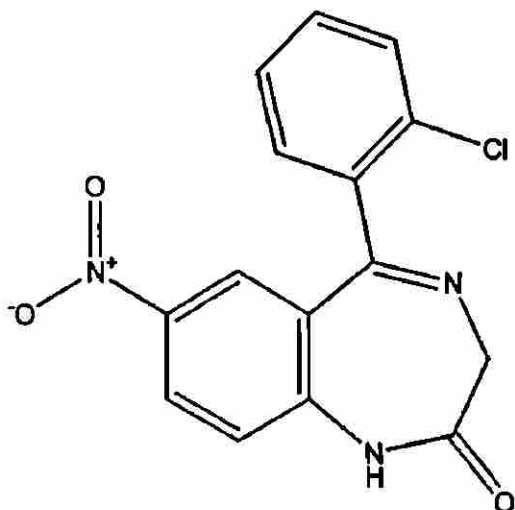
2.6.1 Metanfetamina.



Masa exacta: 149.12
Formula molecular: C₁₀H₁₅N

Se ingiere por vía oral, subcutánea, intramuscular e intravenosa. Se elimina por orina. Es simpatomimética, de acción indirecta, favorece la liberación e impide la reincorporación de catecolaminas; en especial Dopamina y Noradrenalina. Estimulante central; disminuye la sensación de hambre, sueño y fatiga, mejora la asociación superficial de ideas, produce euforia y aumenta la sociabilidad, es analéptica, hipertensora, anorexígena y potencia a los analgésicos. Los síntomas en su consumo son los siguientes: inquietud, temblor, desasosiego, insomnio, confusión, delirios paranoide, psicosis pseudoesquizofrénica, taquicardia, rubicundez facial, midriasis, convulsiones *shock*, arritmias cardiacas. ^[26]

2.6.2 Clonazepam

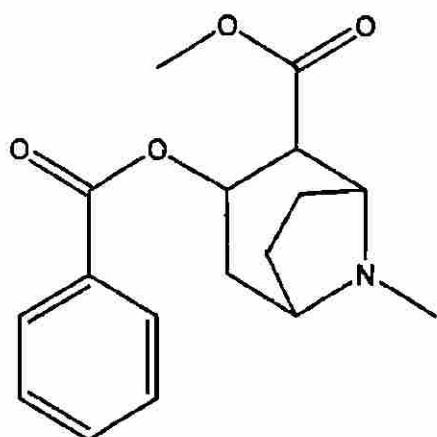


Masa exacta: 315.04

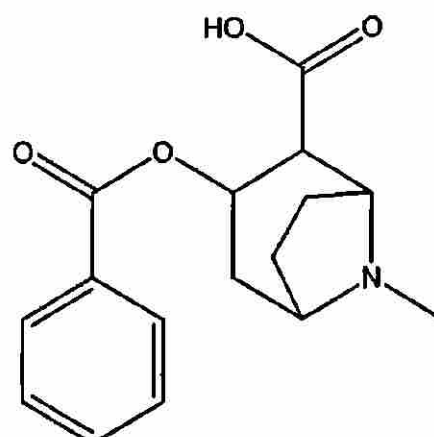
Formula molecular: C₁₅H₁₀ClN₃O₃

El Clonazepam pertenece al grupo de las benzodicepinas, antiguamente llamados tranquilizantes menores. Las benzodicepinas se ingieren por vía oral e intravenosa. Son agonistas directos del Ácido Gama Amino Butírico (GABA, del inglés), se unen a la proteína del receptor GABA, aumentando su afinidad, resultando en una sedación. Al absorberse conduce a un estado de euforia inicial. Producen torpeza motora ataxia y depresión respiratoria. Al aumentar la dosis se llega a estupor hasta llegar a una saturación de receptores de GABA, no se compromete la vida. [26]

2.6.3 Cocaína y Benzoilecgonina



Masa exacta: 303.15
Formula molecular: $C_{17}H_{21}NO_4$



Masa exacta: 289.13
Formula molecular: $C_{16}H_{19}NO_4$

La cocaína se ingiere por vía oral, parenteral y por inhalación a través de la nariz.

Después de la absorción y distribución, la cocaína es metabolizada en el hígado; inicialmente la droga se metaboliza hasta convertirse en metanol y benzoilecgonina. Esta

última a su vez es metabolizada hasta convertirse en ecgonina y ácido benzoico. El ácido benzoico se conjuga con la glicina y se elimina por orina como ácido hipúrico por orina, del mismo modo que la ecgonina y la benzoilecgonina, que lo hacen en una proporción de 35 % y 45 % respectivamente. Se elimina por orina sin cambio alguno en una proporción que varía mucho según el pH. La cocaína es estimulante del SNC. En pequeñas dosis la cocaína actúa sobre la corteza cerebral produciendo estimulación psíquica, con aumento de capacidad de trabajo; produce luego excitación incluso sexual, euforia, insomnio, etc. La euforia inicial pasa a convertirse más tarde en depresión, que comienza en la corteza para proseguir gradualmente en centros nerviosos. En grandes dosis han causado la muerte por depresión respiratoria. [26]

2.7 Objetivos

2.7.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un método para la determinación de drogas en orina por

CLAR/IES/EM/EM.

2.7.2 Objetivos particulares

1. Establecer las condiciones espectrométricas óptimas para la detección y cuantificación de los analitos en forma simultánea por medio de IES/EM/EM.
2. Establecer las condiciones cromatográficas para el análisis de las drogas.
3. Validar el método desarrollado por la determinación de las drogas en orina en forma simultánea.
4. Aplicar el método desarrollado por CLAR/IES/EM/EM en el análisis de muestras de reales.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Equipo, material y reactivos.

3.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, modelo 1100 Series, marca Agilent.
- Espectrómetro de Masas, modelo API 2000 LC/MS/MS System, marca Applied Biosystem/MDS SCIEX, con interfase Turbospray de ionización por Electrospray.
- Potenciómetro Beckman modelo 3500 (F61 pHmeter) con electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl.

3.1.2 Materiales

- Columna C-8 de la serie Zorbax de 25 mm de 4.6 mm de diámetro interno con tamaño de partícula de 5 μm , marca Agilent.
- Pipetas automáticas y puntillas.
- Viales de vidrio de tapa con rosca de 1.5 mL.
- Matraces de aforación de vidrio de 1 mL.
- Filtros de 0.45 μm de poro.
- Equipo para filtración de solventes, Millipore.

3.1.3 Reactivos

Estándares:

- Cocaína, 1.0 mg/mL, en acetonitrilo, RADIANT.
- Benzoilecgonina, 1.0 mg/mL, en metanol, RADIANT
- Benzoilecgonina-D3, 1.0 mg/mL, en metanol, RADIANT.
- Metanfetamina, 1.0 mg/mL, en metanol, RADIANT.
- Metanfetamina-D5, 1.0 mg/mL, en metanol, CERILLIANT.
- Clonazepam, 1.0 mg/mL, en metanol, RADIANT
- Polipropilenglicol, Applied Biosystem

Solventes:

- Agua grado CLAR, Fisher.
- Acetonitrilo grado CLAR, J.T. Baker.
- Ácido Fórmico grado CLAR, J.T.Baker.

Sales:

- Formiato de amonio grado reactivo, Riedel-de Haën.

Material biológico:

- Orina de donadores sanos.

3.2 Metodología

Se prepararon soluciones madre de 100 $\mu\text{g/mL}$ en metanol para todos los analitos a excepción de la cocaína que se preparó en acetonitrilo. Los estándares y las soluciones madre fueron almacenados en oscuridad total a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso.

3.2.1 Optimización de parámetros espectrométricos.

Se prepararon soluciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los analitos en acetonitrilo/Amortiguador de formiatos 10 mM pH 4.5 (50/50). Cada una de las soluciones se colocaron por separado en una jeringa de vidrio de 1 mL y se introdujeron por infusión directa al espectrómetro de masas de forma automática, con un flujo de $5\mu\text{L/min}$. [31]

Se trabajó en modo MRM para cada uno de los analitos, las parejas Ion Precursor–Ion

Producto se describen en la Tabla III.

Tabla III. Pareja Ion Precursor-Ion Producto de los diferentes analitos.

Analito	Q1 m/z Ion precursor (M+1) ⁺	Q3 m/z Ion producto
Benzoilecgonina	290.1	168.1
Benzoilecgonina-D3	293.1	171.1
Metanfetamina	150.1	91.1
Metanfetamina-D5	155.1	92.1
Cocaína	304.1	182.1
Clonazepam	316.1	270.1

[3,21,27,28]

Q1 primer cuadrupolo
Q2 segundo cuadrupolo

La optimización se realizó en base a gráficas buscando la máxima intensidad de señal para cada pareja de iones al hacer barridos en forma cíclica, hasta no encontrar diferencias en los valores obtenidos, Apéndices A al F .

Tabla IV. Parámetros espectrométricos, rango permitido y su importancia

Parámetro	Barrido (V)	Importancia
Potencial de Desagrupamiento (DP)	0 - 200	Controla la energía en la disociación inducida por colisión (CID), Junto con el gas de cortina (N ₂), evita la agrupación de moléculas.
Potencial de Enfoque (FP)	50 - 400	Ambos (EP) y FP) responsables de enfocar a los iones hasta Q1
Potencial de Entrada (EP)	1 - 12	
Potencial de Entrada de la Celda de Colisión (CEP)	0 - 188	Controla la entrada de los iones a la celda de colisión
Energía de Colisión (CE)	0 - 130	Controla la energía en la celda de colisión, los iones chocan con las moléculas del N ₂ convirtiendo la energía de colisión en energía vibracional, rompiendo los enlaces. Proceso de Disociación Activada por Colisión. (CAD)
Potencial de Salida de la Celda de Colisión. (CXP)	0 - 60	Controla la salida de los iones de la celda de colisión

[24]

3.2.2 Desarrollo del método cromatográfico.

Para desarrollar el método cromatográfico, se partió del método descrito por Dams y cols.^[3]

Se realizaron ensayos con diferentes composiciones de fase móvil hasta reducir el tiempo de análisis con parámetros de separación aceptables.

Condiciones Cromatográficas Iniciales ^[3]

- Flujo: 0.3 mL/min.

- Fase móvil

Solvente A: Solución amortiguadora de formiato 10 mM, pH 4.5

Solvente B: Acetonitrilo

- Volumen de inyección: 10 µL

- Gradiente: 0–13 min: 5 % B → 26 % B; 13–22min: 26 % B → 90 % B; 22–24min: 90 % B → 90 % B; 24–27min: 90 % B → 5 % B, y 27–35 min: 5 % B.

- Tiempo de análisis: 35 min.

3.3 Validación

Para la calibración y validación se utilizó una mezcla de 5 orinas, libres de drogas, obtenidas de voluntarios sanos a las cuales se les verificó previamente la ausencia de drogas por medio de pruebas presuntivas.

Para la elaboración de las curvas de calibración se prepararon, por triplicado ocho estándares de 1 mL en orina, en un rango de concentración de cada analito entre 100 y 6000 ng/mL (100; 300; 500; 1000; 2000; 3000; 4000; 6000 ng/mL); se agregó 20 µL de cada estándar interno. Cada una de las diluciones se filtraron con poro de 0.45 µm y se depositaron en un vial de vidrio de tapa con rosca, para su análisis inmediato.

3.3.1 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

Los Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC) para cada uno de los analitos se estimaron a partir de la curva de calibración de cada analito, en base a las áreas de los

picos cromatográficos, con las siguientes fórmulas: ^[29, 30]

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \quad (3.1)$$

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \quad (3.2)$$

Y_{bl}.- Estimación de la respuesta del blanco.

b.- Pendiente de la curva de calibración.

S_{bl}.- Estimación de la desviación estándar del blanco.

3.3.2 Linealidad

A partir de las diluciones de estándar se elaboraron curvas de calibración en base a estándar interno utilizando el Factor de Respuesta Relativo ($k_{I/EI}$) y en base a estándar externo utilizando el Factor de Respuesta (F.R.). Para evaluar la linealidad se calculó la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se expresó por medio del coeficiente de correlación r^2 [16, 21].

Factor de Respuesta Relativo ($k_{I/EI}$).

$$k_{I/EI} = (C_1 A_{EI}) / (C_{EI} A_1) \quad (3.3)$$

$k_{I/EI}$.- Factor de Respuesta Relativo

C_1 .- Concentración del compuesto

C_{EI} .- Concentración del estándar interno

A_1 .- Área del pico de elución del compuesto

A_{EI} .- Área del pico de elución del estándar interno

$$F.R. = A_E / C_E \quad (3.4)$$

F.R.- Factor de Respuesta Relativo

A_E .- Área del pico de elución del compuesto

C_E .- Concentración del compuesto

Coefficiente de correlación r^2

$$r^2 = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}} \quad (3.5)$$

- r^2 .- Coeficiente de correlación.
- X_i .- Valor de la concentración
- Y_i .- Valor medido en el ensayo i
- n .- Número de mediciones

3.3.3 Precisión y Exactitud.

Para evaluar la Precisión y Exactitud se prepararon y analizaron tres réplicas de estándar de 300, 1000 y 3000 ng/mL, mas los estándares internos. La determinación de la concentración se hizo en base al factor de respuesta relativo. [3, 16, 29, 30]

El factor de respuesta relativo (estándar interno) y el factor de respuesta (estándar externo) se obtuvieron al promediar los factores de respuesta individuales obtenidos en cada concentración de analito que conforma y están presentes en los rangos lineales.

Para determinar si existe diferencia significativa entre la precisión y la exactitud evaluadas por estándar interno y las evaluadas por estándar externo se utilizó una prueba t para diferencias de medias.

La precisión se evaluó por medio del Coeficiente de Variación (%RSD).

$$\%RSD = (S / \bar{X}) \cdot 100 \quad (3.5)$$

%RSD Coeficiente de variación

S Desviación estándar de las mediciones.

\bar{X} Promedio

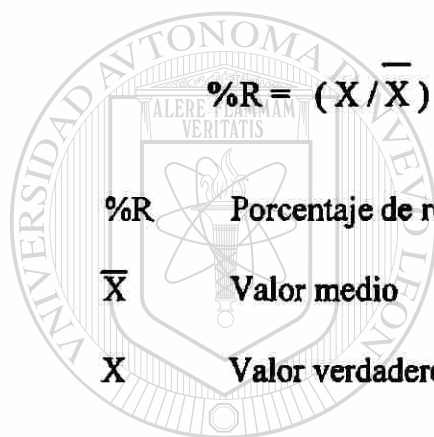
La Exactitud se evaluó por medio de la Recuperación (%R).

$$\%R = (X / \bar{X}) \cdot 100 \quad (3.6)$$

%R Porcentaje de recuperación

\bar{X} Valor medio

X Valor verdadero.



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.3.4 Especificidad

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



La especificidad del método se evaluó buscando posibles interferencias dentro del tiempo de retención en la señal de cada analito al analizar 10 muestras blanco de orina.

[3]

3.3.5. Robustez

Dentro de los ensayos de robustez del método se consideraron los siguientes factores:

- Flujo: se modificó de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Composición de la fase móvil: se realizaron determinaciones de estándares disminuyendo la proporción de acetonitrilo en tiempo cero. Se inició con 80 % de acetonitrilo en lugar de 90 %.

Para determinar si existe diferencia entre las %R, obtenidas al hacer modificaciones en cada uno de los parámetros, se utilizó un análisis de varianza (prueba F).

3.4 Aplicación del método a muestras reales.

Para la aplicación del método a muestras reales se analizaron 46 muestras de orina de personas que resultaron positivas por estudios inmunológicos, para el consumo de las drogas analizadas en el presente estudio. Las muestras provienen de diversas dependencias de Gobierno de los estados de Tamaulipas y Nuevo León, mismas que solicitaron estudios confirmatorios. Las muestras que se analizaron en el presente estudio fueron las mismas que se utilizaron para el estudio presuntivo.

Para el estudio de las muestras, se tomó 1 mL de cada una de ellas y se agregaron 20 μL de cada uno de los estándares internos; posteriormente se filtraron con poro de 0.45 μm . Las muestras ya filtradas se depositaron en un vial de vidrio con tapa con rosca y se analizaron de inmediato.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Condiciones espectrométricas óptimas para la detección.

Los valores de voltaje mostrados en la Tabla V son los que se obtuvieron en los experimentos de optimización de EM/EM, Apéndices A-F. Estos parámetros optimizados se utilizaron para crear un método espectrométrico MRM para detectar tanto al ion precursor como al ion producto de todos los analitos de manera simultánea,

Tabla III. Con esto valores se efectuaron experimentos de barrido de ion productos para cada sustancia, Figura 8 -13.

Tabla V. Valores de voltaje obtenido para cada parámetro de cada uno de los analitos.

Analito	DP	FP	EP	CE	CEP	CXP
	Voltios					
Benzoilecgonina	25	400	10	26	11	2
Benzoilecgonina-D3	30	400	9	29	11	3
Metanfetamina	27	400	8	30	6	15
Metanfetamina-D5	27	400	10	29	6	0
Cocaína	22	400	9	25	11	2
Clonazepam	60	400	34	11	5	

DP Potencial de Desagrupamiento

FP Potencial de Enfoque

EP Potencial de Entrada

CE Energía de Colisión

CEP Potencial de Entrada a la Celda de Colisión

CXP Potencial de Salida de la Celda de Colisión

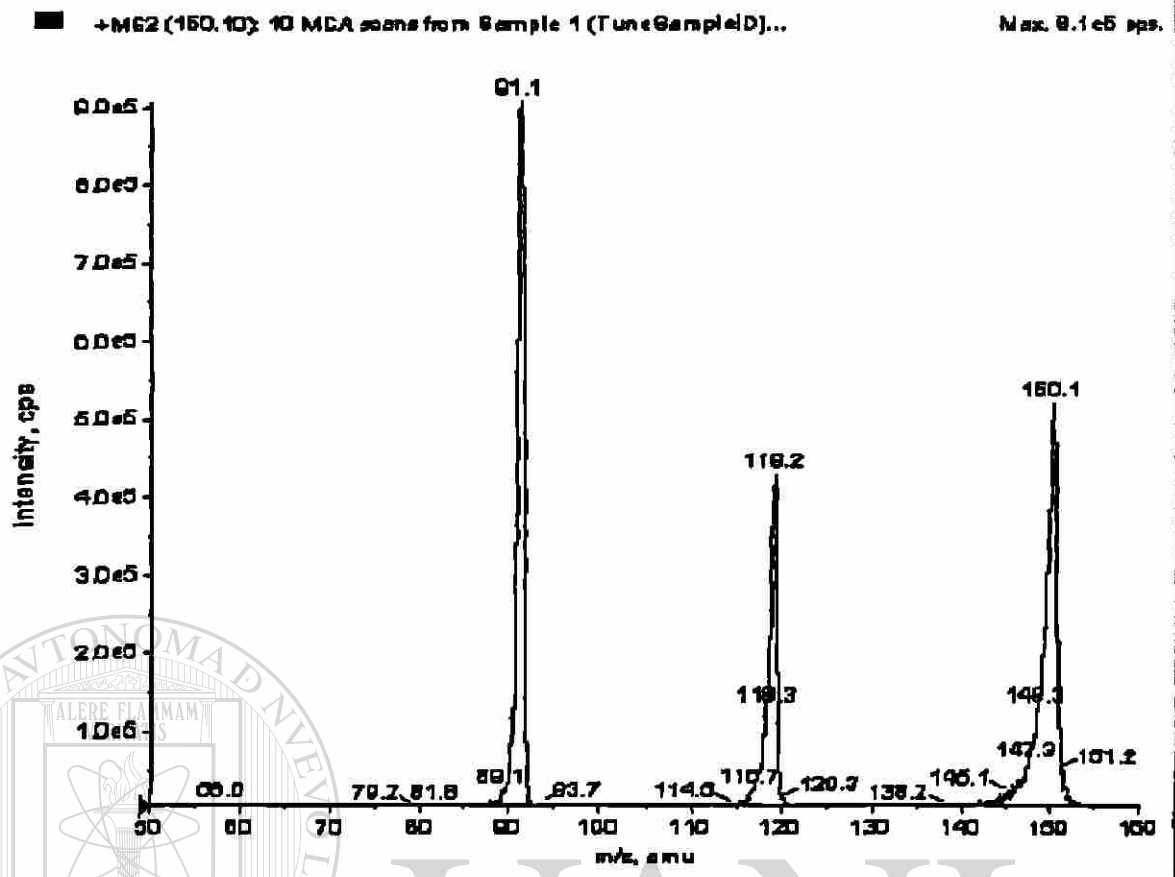


Figura 8. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la metanfetamina.

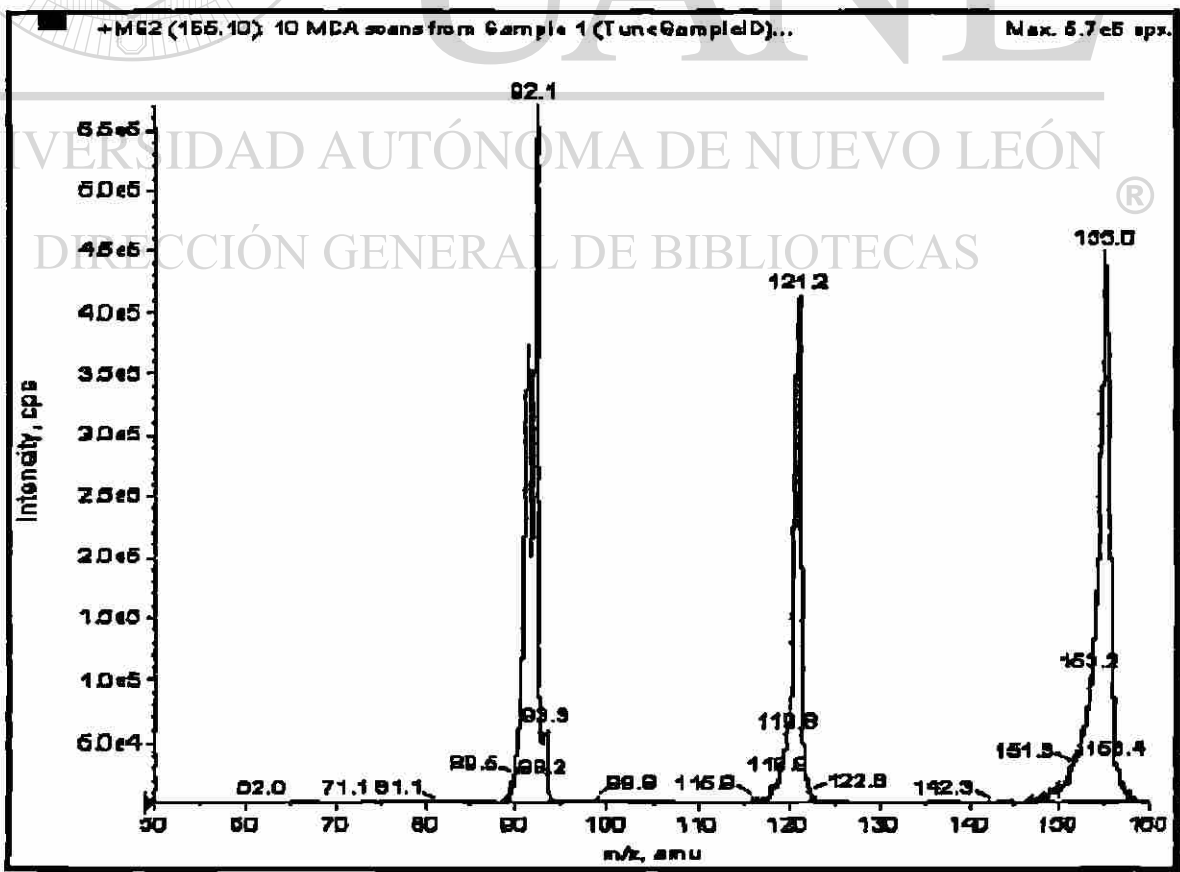


Figura 9. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la metanfetamina-D5.

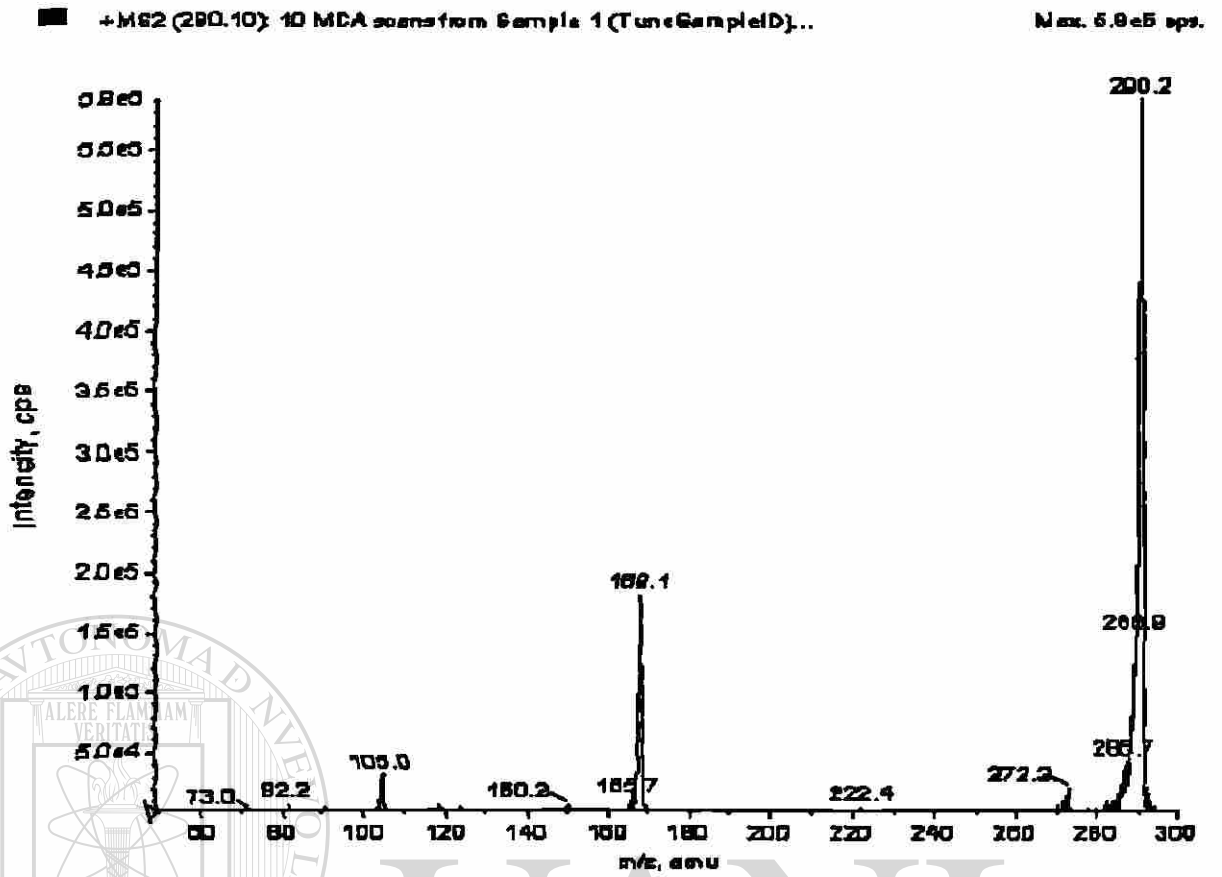


Figura 10. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la benzoilecgonina.

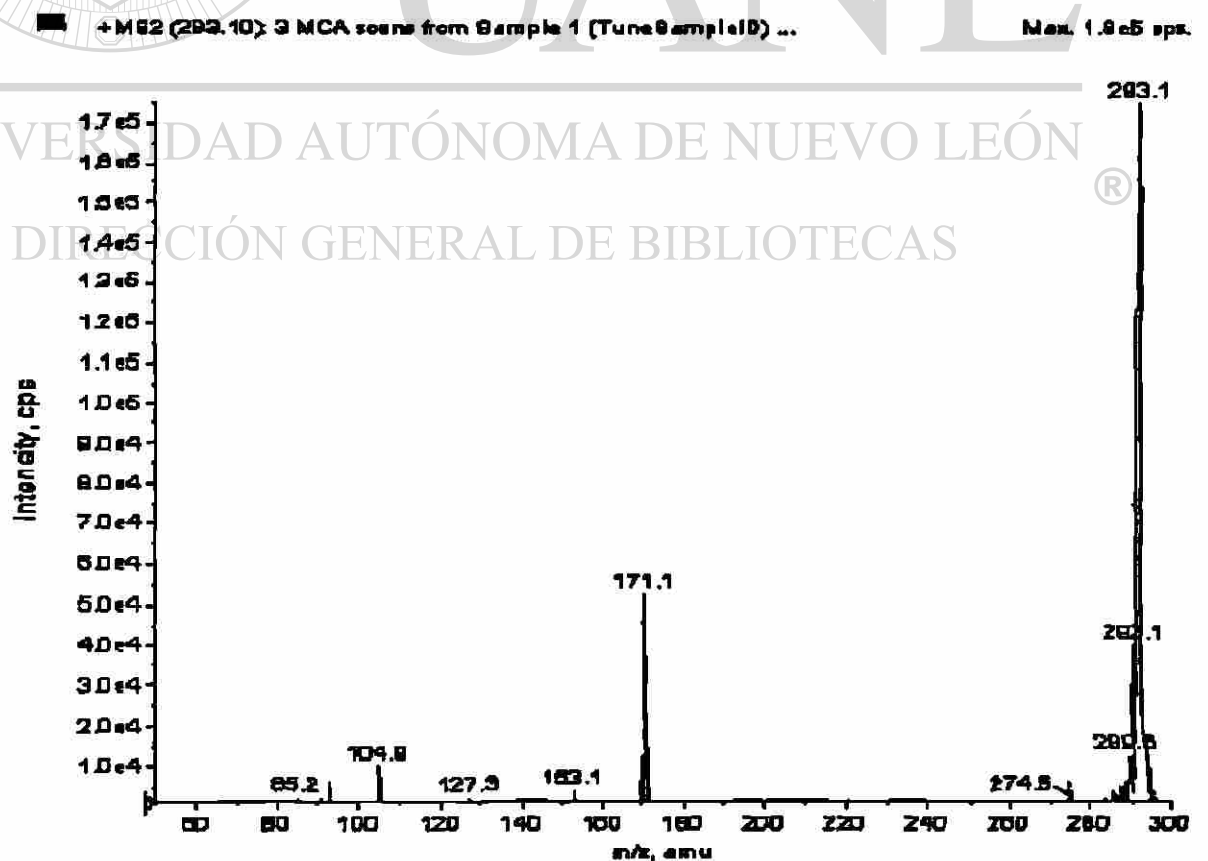


Figura 11. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la benzoilecgonina-D3.

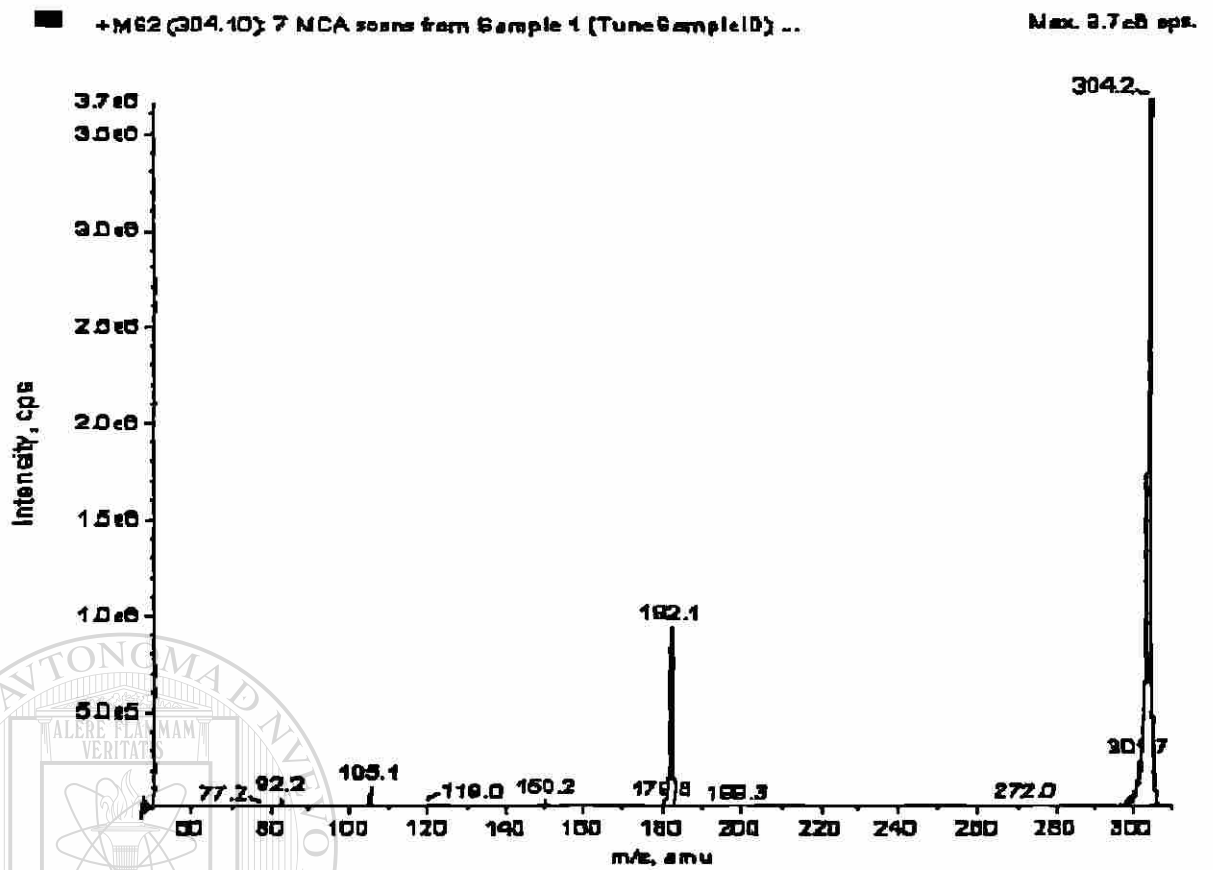


Figura 12. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto de la cocaína.

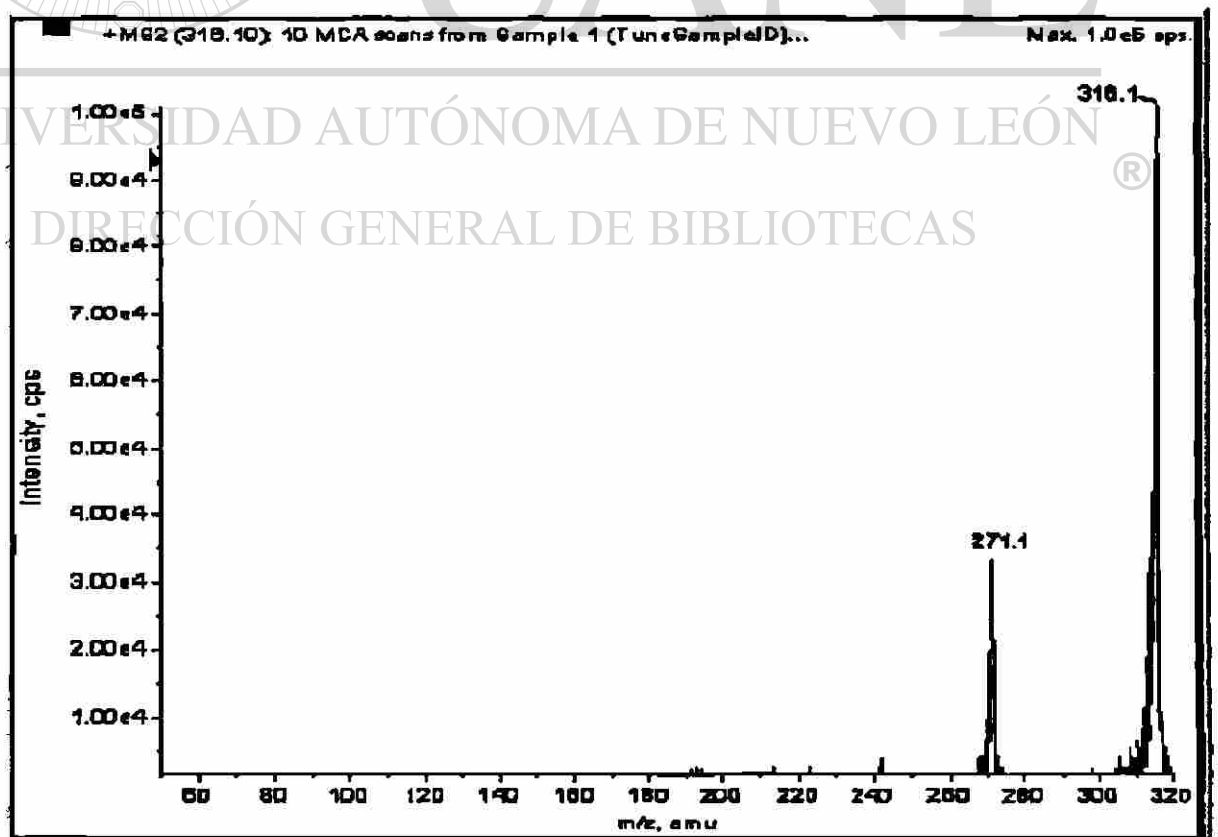


Figura 13. Espectro de masas obtenido del experimento de barrido de los iones producto del clonazepam.

4.2 El método cromatográfico.

Las condiciones cromatográficas finales fueron las siguientes

- Flujo: 0.3 mL/min.

- Fase móvil

Solvente A: Solución amortiguadora de formiatos 10 mM, pH 4.5.

Solvente B: Acetonitrilo

- Volumen de inyección: 10 μ L

- Gradiente: 0–5 min: 90 % B \rightarrow 10 % B; 5–8 min: 90 % B \rightarrow 10 % B y
8–18 min: 10 % B \rightarrow 90 % B.

- Tiempo de análisis: 18 min.

Los parámetros cromatográficos de separación obtenidos se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Parámetros cromatográficos de separación.

Analito	t_R (min)	R	α
Benzoilecgonina	5.7	9.49	1.8
Metanfetamina	10.3	2.96	1.13
Cocaína	11.6	1.75	1.05
Clonazepam	12.2		

R Resolución

α Factor de separación

Los fragmentogramas obtenidos con las condiciones cromatográficas finales se muestra en las Figuras 14.

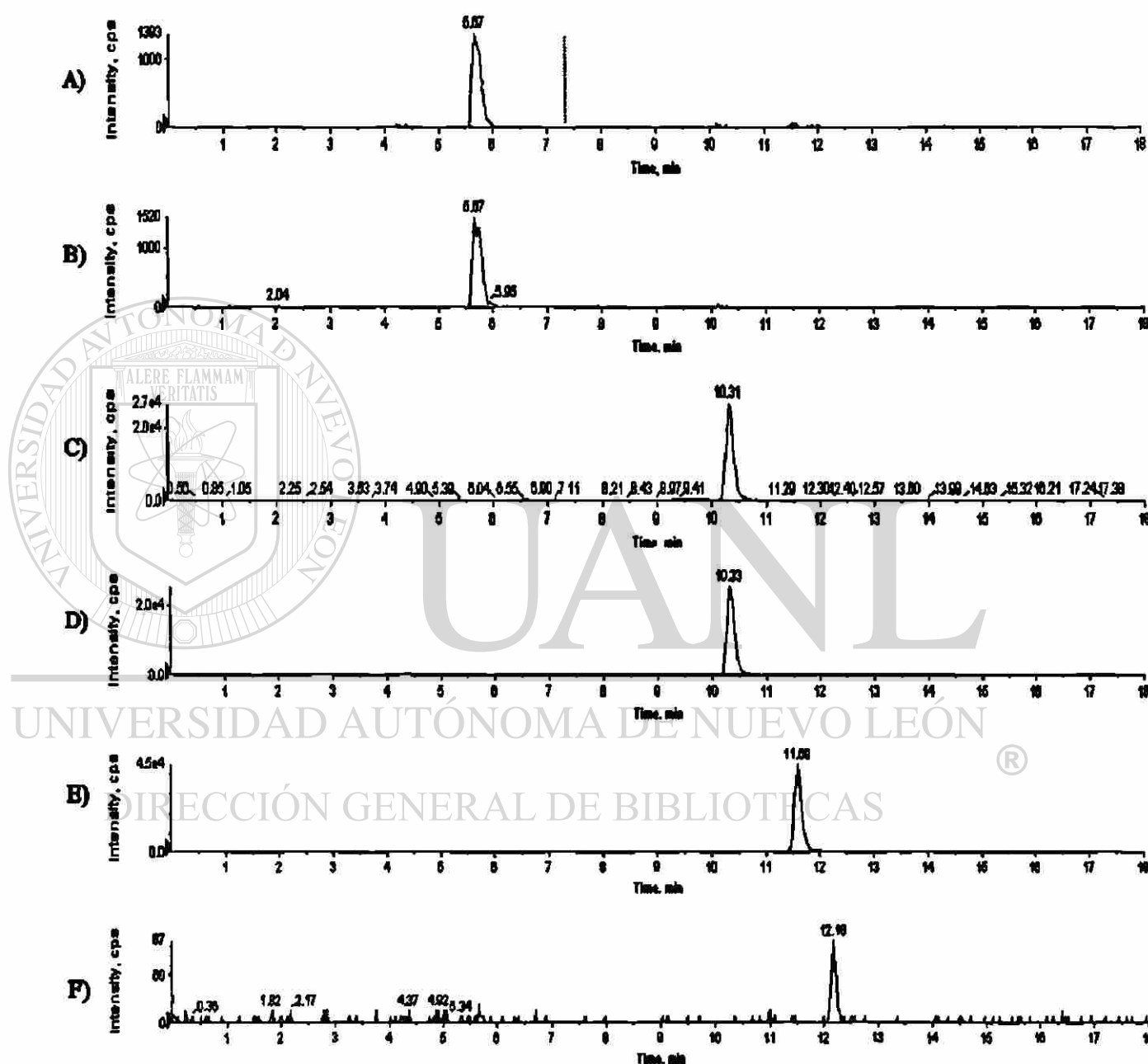


Figura 14. Fragmentogramas de un estándar de calibración, 500 ng/mL en orina más estándares internos.

A) Fragmentograma 293.1/171.1 m/z , benzoilecgonina-D3, t_R 5.7 min.

B) Fragmentograma 290.1/168.1 m/z , benzoilecgonina, t_R 5.7 min.

C) Fragmentograma 155.1/92.1 m/z , metanfetamina-D5, t_R 10.3 min.

D) Fragmentograma 150.1/91.1 m/z , metanfetamina, t_R 10.3 min.

E) Fragmentograma 316.1/271.1 m/z , cocaína, t_R 11.6 min.

F) Fragmentograma 304.1/182.1 m/z , clonazepam, t_R 12.6 min.

4.3 Límites de Detección y de Cuantificación.

Los Límites de Detección y de Cuantificación obtenidos se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII. Límites de Detección y Cuantificación para cada uno de las sustancias

Analito	Límite de Detección	Límite de Cuantificación
	ng/mL	
Benzoilecgonina	13.6	22.88
Metanfetamina	4.99	12.01
Cocaína	1.79	5.30
Clonazepam	8.08	94.33

4.4 Linealidad

En promedio, tanto para estándar interno como para estándar externo, los valores de correlación obtenidos fueron mayores a 0.99, se obtuvieron rangos lineales cortos los cuales corresponden a la cocaína y al clonazepam; los rangos lineales amplios corresponden a la metanfetamina y a la benzoilecgonina, Tablas VIII y IX.

Tabla VIII. Rango lineal, coeficiente de correlación y factor de respuesta relativo de la determinación de drogas de abuso por CLAR/IES/EM/EM obtenidos en base a estándar interno.

Analito	Estándar interno	Rango lineal (ng/mL)	r^2	$k_{1/EI}^*$	%RSD
Benzoilecgonina	Benzoilecgonina-D3	100 - 6000	0.993	0.594	6.72
Metanfetamina	Metanfetamina-D5	100 - 6000	0.995	0.506	7.12
Cocaína	Benzoilecgonina-D3	300 - 3000	0.996	0.021	17.38
	Metanfetamina-D5	100 - 4000	0.998	0.260	11.09
Clonazepam	Benzoilecgonina-D3	300 - 6000	0.992	18.510	11.09
	Metanfetamina-D5	300 - 3000	0.998	220.800	5.05

$k_{1/EI}^*$: Factor de Respuesta Relativa promedio

%RSD: Coeficiente de variación de $k_{1/EI}$

Tabla IX. Rango lineal, coeficiente de correlación y factor de respuesta relativo de la determinación de drogas de abuso por CLAR/IES/EM/EM obtenidos en base a estándar externo.

Analito	Rango lineal (ng/mL)	r^2	F.R.	%RSD
Benzoilecgonina	100 - 6000	0.994	15.917	5.02
Metanfetamina	100 - 6000	0.999	221.947	7.96
Cocaína	300 - 3000	0.999	439.338	14.72
Clonazepam	300 - 6000	0.993	0.510	7.82

F.R. : Factor de Respuesta promedio

%RSD: Coeficiente de variación de F.R.

Las curvas de calibración, obtenidas en el rango lineal establecido al utilizar estándar interno y estándar externo, se muestran en los Apéndices G y H.

4.5 Precisión y Exactitud.

La precisión y exactitud se evaluaron en tres niveles de concentración: bajo, medio y alto, para todos los analitos. Los resultados obtenidos en base a estándar interno y a estándar externo se muestran en las Tablas X y XI, respectivamente.

Tabla X. Precisión y exactitud de los analitos en tres niveles obtenidos en base a estándar interno.

Analito	Estándar interno	Valor verdadero ng/mL	%RSD	%R
Benzoilecgonina	Benzoilecgonina-D3	300	9.92	83.22
		1000	13.52	84.58
		3000	11.75	79.88
Metanfetamina	Metanfetamina-D5	300	3.53	92.10
		1000	9.21	88.35
		3000	10.56	88.13
Cocaína	Benzoilecgonina-D3	300	11.14	89.39
		1000	5.74	76.58
		3000	2.43	61.48
	Metanfetamina-D5	300	2.94	105.33
		1000	2.76	94.59
		3000	1.72	84.18
Clonazepam	Benzoilecgonina-D3	300	14.11	93.37
		1000	10.87	97.73
		3000	11.68	96.77
	Metanfetamina-D5	300	15.18	104.9
		1000	10.67	118.57
		3000	13.97	130.37

%RSD Coeficiente de variación

%R Recuperación

Tabla XI. Precisión y exactitud de los analitos en tres niveles obtenidos en base a estándar externo.

Analito	Valor verdadero ng/mL	%RSD	%R
Benzoilecgonina	300	12.68	91.44
	1000	11.43	102.04
	3000	11.07	107.08
Metanfetamina	300	6.06	78.03
	1000	8.88	76.18
	3000	10.44	72.75
Cocaína	300	9.71	87.98
	1000	2.44	80.24
	3000	3.54	68.39
Clonazepam	300	11.44	81.61
	1000	6.38	87.80
	3000	11.46	88.32

%RSD Coeficiente de variación

%R Recuperación

Tabla XII. Resultados de la prueba t al comparar la precisión obtenida en base a estándar interno, con la obtenida en base a estándar externo.

Analito	%RSD <i>media</i>		t	
	Estandar Interno	Estandar Externo		
Benzoilecgonina	Becg-D3	11.73	11.73	0.001
Metanfetamina	mAMP-D5	7.77	8.46	0.138
Cocaína	Becg-D3	6.44	5.23	0.177
	mAMP-D5	2.94	5.23	0.601
Clonazepam	Becg-D3	12.22	9.76	0.630
	mAMP-D5	13.27	9.76	0.813
			0.025t ₄ (tablas)	2.776
%R Recuperación				
Becg-D3 Benzoilecgonina-D3				
mAMP-D5 Metanfetamina-D5				

Tabla XIII. Resultados de la prueba t al comparar la exactitud obtenida en base a estándar interno, con la obtenida en base a estándar externo.

Analito	%R <i>media</i>		t	
	Estandar Interno	Estandar Externo		
Benzoilecgonina	Becg-D3	82.56	100.19	1.830
Metanfetamina	mAMP-D5	89.53	75.65	3.446
Cocaína	Becg-D3	75.82	78.87	0.155
	mAMP-D5	105.33	78.87	0.948
Clonazepam	Becg-D3	95.96	85.91	1.986
	mAMP-D5	117.95	85.91	2.089
			0.025t ₄ (tablas)	2.776
%R Recuperación				
Becg-D3 Benzoilecgonina-D3				
mAMP-D5 Metanfetamina-D5				

4.6 Especificidad

Al analizar muestras blanco de orina no se detectaron señales a los t_R de los analitos con los diferentes iones, Figura 15.

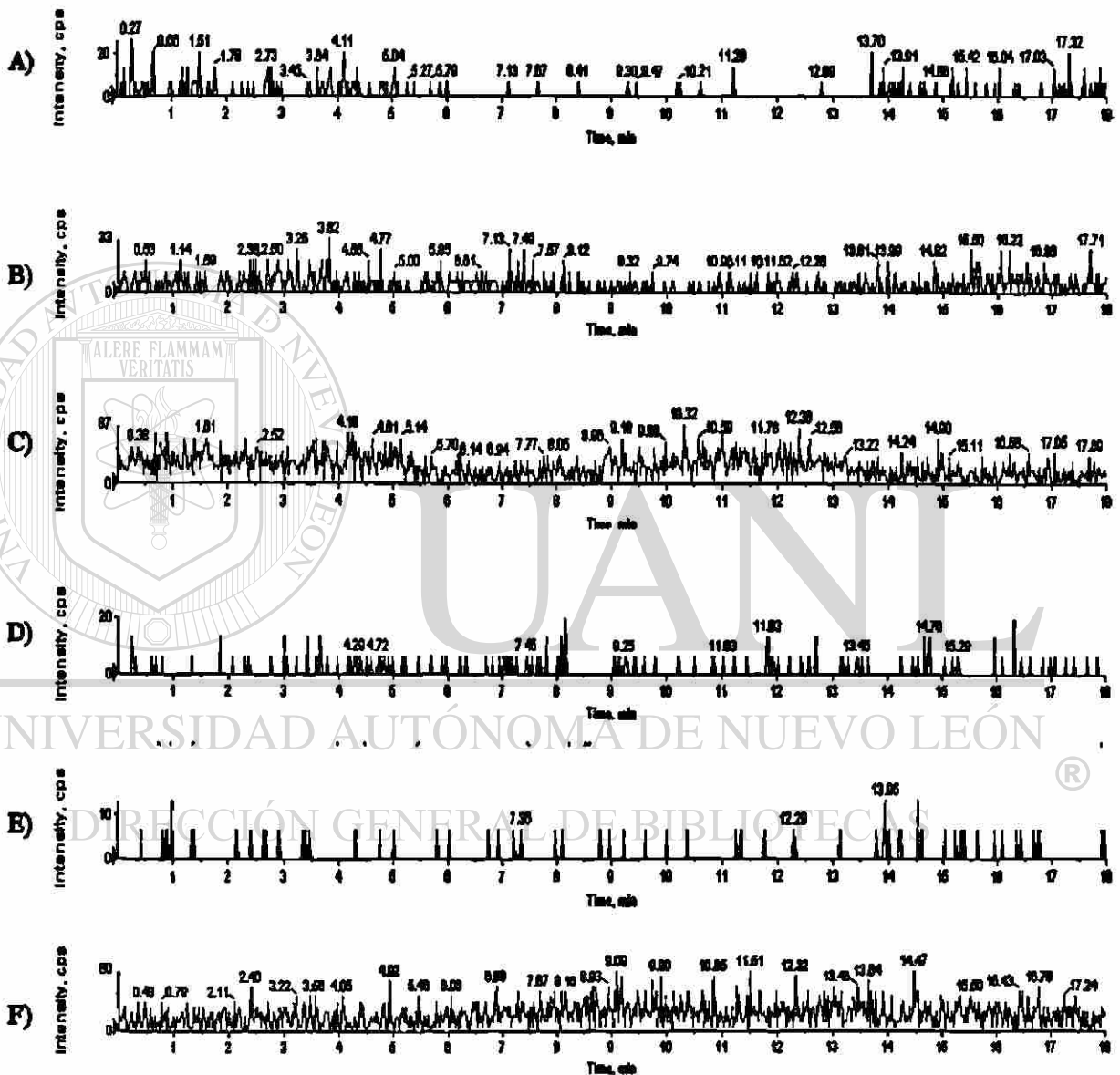


Figura 15. Fragmentogramas de un blanco de orina.

- A) Fragmentograma 293.1/171.1 m/z , benzoilecgonina-D3
- B) Fragmentograma 155.1/92.1 m/z , metanfetamina-D5
- C) Fragmentograma 150.1/91.1 m/z , metanfetamina
- D) Fragmentograma 290.1/168.1 m/z , benzoilecgonina
- E) Fragmentograma 316.1/271.1 m/z , clonazepam
- F) Fragmentograma 304.1/182.1 m/z , cocaína

4.7 Robustez.

Tabla XIV Parámetros cromatográficos obtenidos al variar diversos factores al evaluar la robustez.

Analito	Factor	Modificación	t _R	R
Benzoilecgonina	Flujo	400 µl/min	4.40	12.23
		200 µl/min	9.04	7.29
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	5.73	7.68
Metanfetamina	Flujo	400 µl/min	8.07	3.23
		200 µl/min	14.87	2.40
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	9.57	3.06
Cocaína	Flujo	400 µl/min	9.12	2.80
		200 µl/min	17.03	-0.43
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	10.87	3.12
Clonazepam	Flujo	400 µl/min	9.89	
		200 µl/min	16.78	
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	11.65	

t_R Tiempo de retención

R Resolución

Tabla XV. Resultados de %R obtenidos en base a estándar interno al variar el flujo y la composición inicial.

Analito	Factor	Modificación	%R	
			Benzoilecgonina-D3	Metanfetamina-D5
Benzoilecgonina	Flujo	400 μ /min	108.11	
		200 μ /min	95.01	
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	90.46	
Metanfetamina	Flujo	400 μ /min		89.51
		200 μ /min		88.04
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20		90.29
Cocaína	Flujo	400 μ /min	116.64	107.65
		200 μ /min	85.67	91.57
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	54.81	80.68
Clonazepam	Flujo	400 μ /min	100.47	89.34
		200 μ /min	160.68	165.46
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	71.09	100.83

%R Recuperación

Tabla XVI. Resultados de %R obtenidos en base a estándar externo al variar el flujo y la composición inicial.

Analito	Factor	Modificación	%R
Benzoilecgonina	Flujo	400 ml/min	224.67
		200 ml/min	55.52
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	102.96
Metanfetamina	Flujo	400 ml/min	210.10
		200 ml/min	50.17
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	72.77
Cocaína	Flujo	400 ml/min	248.42
		200 ml/min	51.30
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	63.93
Clonazepam	Flujo	400 ml/min	208.91
		200 ml/min	93.94
	Fase (inicial)	Acetonitrilo/amortiguador 80/20	80.96
%R	Recuperación		

Tabla XVII. Resultados de la prueba F para determinar si existe diferencia entre los % obtenidos al hacer modificaciones en el flujo.

Análito		Flujo $\mu\text{L}/\text{min}$			F
		200	300	400	
Benzoilecgonina	Est. Interno (Becg-D3)	95.01 %R	84.58 %R	108.11 %R	4.04
	Est. Externo	55.54 %R	87.80 %R	224.67 %R	529.48
Metanfetamina	Est. Interno (mAMP-D5)	89.51 %R	88.35 %R	88.04 %R	0.03
	Est. Externo	50.17 %R	76.18 %R	210.10 %R	398.04
Cocaína	Est. Interno (Becg-D3)	85.67 %R	76.58 %R	116.64 %R	81.29
	Est. Interno (mAMP-D5)	91.57 %R	94.59 %R	107.65 %R	35.7
	Est. Externo	51.30 %R	80.24 %R	248.42 %R	2547.53
Clonazepam	Est. Interno (Becg-D3)	100.47 %R	97.73 %R	160.68 %R	17.52
	Est. Interno (mAMP-D5)	89.34 %R	118.57 %R	165.46 %R	21.09
	Est. Externo	93.94 %R	102.04 %R	208.91 %R	101.97
Becg-D3 Benzoilecgonina-D3 mAMP-D5 Metanfetamina-D5				$F_{0.05}$ (tablas)	19.33

Tabla XVIII. Resultados de la prueba F para determinar si existe diferencia entre los %R obtenidos modificación en la composición inicial de la fase móvil.

Análito		Composición inicial de la fase móvil		F	
		90/10 Acr/Amor	80/20 Acr/Amor		
Benzoilecgonina	Est. Interno (Becg-D3)	84.58 %R	90.46 %R	0.67	
	Est. Externo	87.8 %R	102.96 %R	10.58	
Metanfetamina	Est. Interno (mAMP-D5)	88.35 %R	90.29 %R	0.095	
	Est. Externo	76.18 %R	72.77 %R	0.49	
Cocaína	Est. Interno (Becg-D3)	76.58 %R	54.81 %R	54.72	
	Est. Interno (mAMP-D5)	94.59 %R	80.68 %R	53.72	
	Est. Externo	80.24 %R	63.93 %R	137.04	
Clonazepam	Est. Interno (Becg-D3)	97.73 %R	71.09 %R	11.67	
	Est. Interno (mAMP-D5)	118.57 %R	100.83 %R	3.65	
	Est. Externo	102.04 %R	80.96 %R	6.44	
Becg-D3 Benzoilecgonina-D3 mAMP-D5 Metanfetamina-D5 Acr/amor Acetonitrilo/amortiguador				$F_{0.05}$ (tablas)	19.00

4.8 Aplicación del método a muestras reales.

De las muestras de orina analizadas, mismas que habían resultado positivas para cocaína y sus metabolitos, todas resultaron positivas por el método de CLAR/IES/EM/EM. La Figura 16 es un ejemplo de una muestra que resultó positiva.

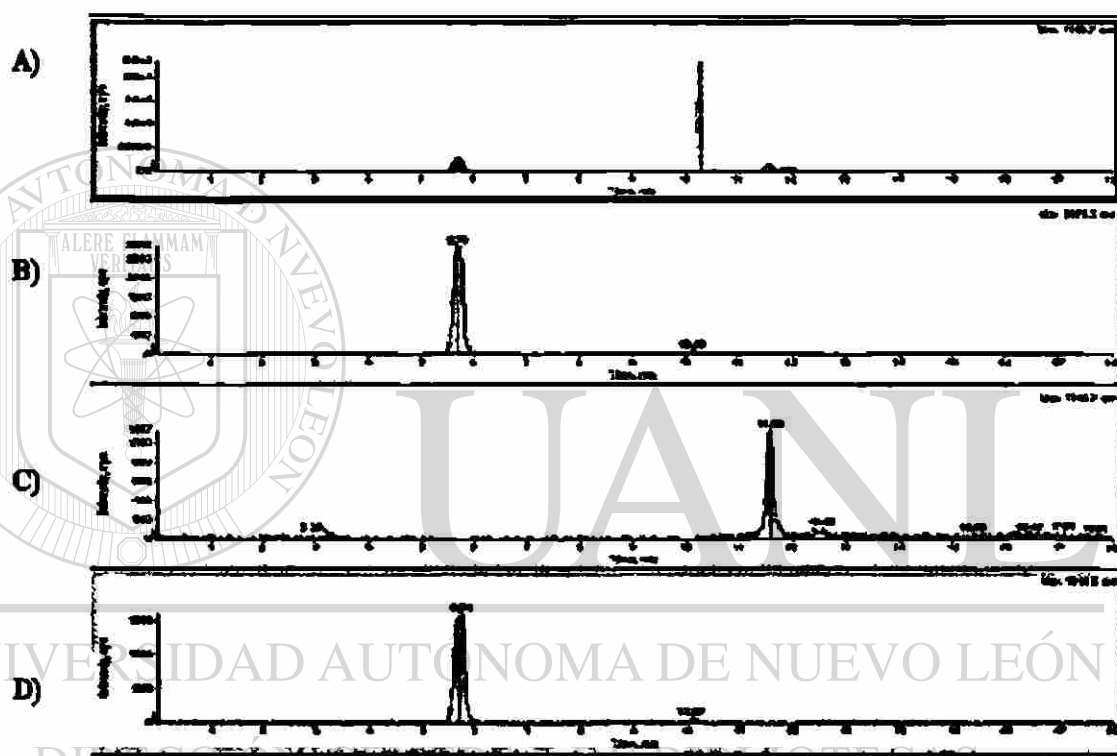
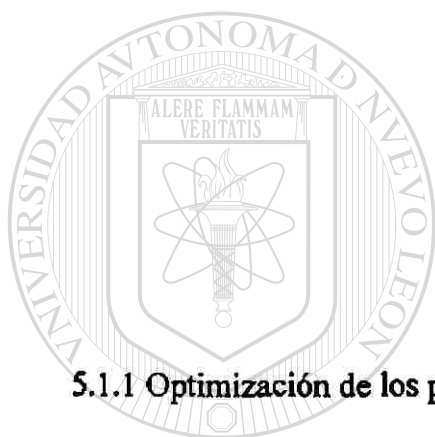


Figura 16. Fragmentogramas de orina de un sospechoso que resultó positivo para consumo de cocaína en pruebas presuntivas.

- A) Cromatograma de señales superpuestas (visible la señal 155.1/92.1 m/z , metanfetamina-D5)
- B) Fragmentograma 293.1/171.1 m/z , benzoilecgonina-D3
- C) Fragmentograma 304.1/182.1 m/z , cocaína
- D) Fragmentograma 290.1/168.1 m/z , benzoilecgonina

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN



5.1 Desarrollo del método.

5.1.1 Optimización de los parámetros espectrométricos

Hasta hoy se han reportados diversos estudios diseñados para determinar la presencia de drogas y sus metabolitos en muestras biológicas, por medio del uso[®] de CLAR/IES/EM/EM, ya sea con fines forenses o clínicos. En base a trabajos realizados por Schreiber, Fitzgerald y Sawyers se hizo la selección de los pares Ion Precursor–Ion Producto, los valores coinciden nominalmente con los obtenidos en el presente trabajo. [21, 27, 28, 38]

Los factores de EM/EM optimizados para el modo de MRM son los que afectan la selección de un ion de cierta m/z , llevarlo hasta la cámara de ionización, fragmentarlo y, seleccionar y trasladar hasta el detector un fragmento de m/z determinado proveniente de esa fragmentación. De estos factores, dos de ellos influyen directamente en cuanto a

la obtención de los iones seleccionados en Q1 y Q3: el Potencial de Desagrupamiento y la Energía de Colisión. El Potencial de Desagrupamiento (DP, por sus siglas en inglés), controla junto con un flujo de N₂ gas, la aglomeración de las moléculas del analito con otras como las de agua ó de solvente provenientes de la interfase de IPA, esto tiene lugar en un área localizada entre la interfase de IES y la entrada al espectrómetro de masas. El DP, además, induce a la disociación de moléculas inducidas por colisión (CID, por sus siglas en inglés). La Energía de Colisión, controla junto con un flujo de N₂ gas la fragmentación en Q2 de los iones seleccionados en Q1, mediante un proceso de disociación activado por colisión (CAD, por sus siglas en inglés), en donde energía de colisión se transforma en energía vibracional, rompiendo los enlaces de los iones. [19, 24]

En los espectros de masas obtenidos mediante el experimento de barrido de los iones producto de cada uno de los analitos, el pico base corresponde al ion pseudomolecular [M+H]⁺ a excepción de la metanfetamina y la metanfetamina-D5, en las cuales corresponden a los iones 91.1 y 92.1 m/z respectivamente, Figura 8–13.

En el experimento MRM de las cuatro analitos y los dos análogos deuterados, el ion [M+H]⁺ fue elegido como ion precursor y el ion producto fue su fragmento de mayor intensidad, Figura 8–13.

5.1.1.1 Iones producto

Para la cocaína y la benzoilecgonina, el ion [M-122]⁺ es ampliamente utilizado como ion característico de la fragmentación de estas dos sustancias, esta pérdida corresponde a la

eliminación del protón y $C_6H_5COO^*$, lo que resulta en los iones 182 y 168 m/z, respectivamente.

En el clonazepam, el ion utilizado fue el $[M + H - 46]^+$ que corresponde a la eliminación de un radical NO_2 . En el método desarrollado se utilizó el ion 270 m/z, debido a que este retiene al protón proveniente de la ionización por IES.

En la metanfetamina, el ion utilizado fue el 91 m/z (tropolio); este ion es característico de los compuestos aromáticos con una alquil-sustitución como la metanfetamina.

5.1.2 Determinación de las condiciones cromatográficas de trabajo

Los solventes utilizados en el trabajo son los recomendados para la ionización por electrospray, debido a que: son solventes volátiles y evitan la contaminación de la interfase. El amortiguador de pH empleado en el presente trabajo fue el compuesto por formiato/ácido fórmico 10 mM de pH 4.5, a pesar de que los analitos evaluados son compuestos básicos, que para su estudio por cromatografía de fase inversa se recomienda valores de pH superiores a 7-8 para evitar picos con fuerte asimetría; el amortiguador formiato/ácido fórmico 10 mM, fue utilizado ya que es uno de los que se recomienda en IES para la detección de iones positivos, debido a que su presencia incrementa la intensidad de los iones positivos por la alta concentración de protones.

Aun y cuando la optimización de los parámetros de separación cromatográfica del método desarrollado no fue uno de los objetivos del presente trabajo, se buscó obtener valores de resolución aceptables con el propósito de evitar fenómenos de coelución entre los analitos, esto con el fin de utilizar los tiempos de retención como criterio de

identificación y especificidad del método. La resolución entre los cuatro analitos fue mayor a 1.5 en un tiempo total de elución de 18 minutos, 17 menos que el tiempo de corrida del que se partió, lo que se traduce al análisis de mayor número de muestras en un menor tiempo, con un consumo menor de solventes.

5.2 Validación del método desarrollado.

5.2.1 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación para todos los analitos se establecieron entre 1.79-13.6 ng/mL y entre 5.3-94.33 ng/mL, respectivamente.

La sensibilidad de las pruebas presuntivas utilizadas en el Laboratorio de Química Forense de la PGJE para determinar la presencia de drogas de abuso en muestras de orina es de 1000 ng/mL para metanfetamina, 300 ng/mL para cocaína y metabolitos, y 781 ng/mL para el clonazepam. En el método desarrollado, estas concentraciones se encuentran dentro del rango lineal establecido para cada sustancia, con límites de detección menores, de al menos dos órdenes de magnitud por debajo del de las pruebas basadas en principios inmunológicos, Tabla VII. El método desarrollado en el presente trabajo permite ampliar el tiempo de búsqueda de drogas en orina de personas que se presume que las hayan consumido, ya que la concentración de éstas disminuye con el tiempo hasta no ser detectadas por las pruebas presuntivas. ^[31, 32, 33]

En el análisis de sustancias por CG/EM Gan y cols., obtuvieron un límite de detección para metanfetamina de 50 ng/mL, al extraerla de orina con extracción en fase sólida y derivatizarla con anhídrido tricloroacético, utilizando un monitoreo de ion selectivo,

Cárdenas y cols. obtuvieron límites de detección para cocaína de 1 ng/mL y para benzoilecgonina de 20 ng/mL, al extraerlas de orina con extracción en fase sólida y derivatizarlas con BSTFA (*bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida*) y su análisis por CG/EM. Fitzgerald y cols. obtuvieron un límite de detección de 50 ng/mL para el 7-aminoclonazepam, al realizar una extracción líquido-líquido de orina, formando su derivado trimetilsilil para analizarlo posteriormente con CG/EM, éste compuesto es el principal metabolito del clonazepam. Por otra parte, Edeibroek y De Wolf obtuvieron un límite de detección para clonazepam de 1ng/mL, al realizar una extracción líquido-líquido del suero y su análisis posterior por Cromatografía de Gases con detector de captura de electrones. [35, 36, 37, 38, 39]

El método de análisis de drogas por CLAR/IES/EM/EM desarrollado en este trabajo, en comparación con aquellos donde se utiliza la cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas o de captura de electrones, presentó límites de detección más bajos para benzoilecgonina y metanfetamina, y límites de detección más altos para clonazepam y cocaína, aunque estos últimos son del mismo orden de magnitud. Sin embargo, los métodos de CG requirieron procedimientos tardados de extracción, concentración y derivatización de los analitos, lo que contribuye en parte a la sensibilidad que reportaron.

5.2.2 Linealidad

La linealidad se evaluó en base a los métodos de estándar interno y estándar externo para los cuatro analitos.

En CLAR el uso de estándar interno no es común, incluso podría no ser aconsejable, sin embargo, puede serlo al acoplarse con EM. Algunos de los errores en EM se deben a la variación y a las condiciones de la fuente, además de la inestabilidad en la escala de masas.

Los estándares internos con los que se trabajó fueron la metanfetamina-D5 y la benzoilecgonina-D3, análogos deuterados de la metanfetamina y la benzoilecgonina. La metanfetamina-D5 y la benzoilecgonina-D3 comparten las mismas características químicas de sus análogos y una estructura molecular exactamente igual, por lo que presentan el mismo comportamiento cromatográfico. La masa de los compuestos deuterados difiere respecto a la de sus análogos, por lo que pueden ser utilizados como estándar interno, ya que presentan características espectrométricamente diferentes.

Los estándares internos utilizados para metanfetamina y la benzoilecgonina en el método desarrollado fueron la metanfetamina-D5 y la benzoilecgonina-D3 respectivamente, proporcionando rangos lineales entre 100–6000 ng/mL con coeficientes de correlación r^2 mayores a 0.99, Tabla VIII.

Por otra parte, el análogo deuterado de la benzoilecgonina es ampliamente utilizado como estándar interno para la cocaína, ya que existe una gran similitud estructural y de fragmentación entre ambas sustancias. Además, se evaluó el uso de la metanfetamina-D5 como estándar interno, ya que eluyó muy próxima a la cocaína. Al evaluar la linealidad en base a ambos estándares internos, los coeficientes de correlación r^2 fueron mayores a 0.99 en los rangos de concentración utilizados, siendo éste menor al utilizar la benzoilecgonina-D3 como estándar interno, Tabla VIII.

En cuanto al clonazepam, se evaluó el uso de la metanfetamina-D5 y la benzoilecgonina-D3, se obtuvieron mejores resultados con la metanfetamina-D5, la cual tiene un tiempo de retención más cercano al clonazepam que la benzoilecgonina-D3.

Los rangos lineales que se establecieron con estándar interno para la cocaína y el clonazepam fueron más estrechos que los obtenidos para la metanfetamina y la benzoilecgonina, Tabla VIII.

Al evaluarse la linealidad en base al método de estándar externo se obtuvo, al igual que por medio de estándar interno, coeficientes de correlación r^2 mayores a 0.99 para los cuatro analitos, con rangos lineales establecidos entre 100–6000 ng/mL para metanfetamina y benzoilecgonina y con rangos más estrechos para clonazepam y cocaína, Tabla IX.

5.2.3 Precisión y exactitud.

La precisión y la exactitud se evaluó en tres niveles de las curvas de calibración obtenidas por estándar interno y estándar externo (300, 1000, 3000 ng/mL).

En general, los coeficientes de variación %RSD obtenidos fueron aceptables para las cuatro sustancias, tanto por estándar interno (1.72–15.18 %), como por estándar externo (2.44–12.68 %), Tablas X y XI.

Los %R obtenidos en base a estándar interno para la metanfetamina y la benzoilecgonina fueron aceptables (79.88–92.10 %). En cuanto al %R para la cocaína, se obtuvieron mejores resultados al utilizar la metanfetamina-D5 como estándar interno (84.18 –

105.33 %), por otra parte, para el clonazepam fue mejor al utilizar la benzoilecgonina-D3 como estándar interno (93.37 – 97.73 %), Tabla X.

Por otra parte, los %R obtenidos en base a estándar externo solo fueron inaceptables para la metanfetamina, (72.75-78.03 %), Tabla XI.

En base a la prueba t se determinó que no existen diferencias significativas entre la precisión obtenida por estándar interno y la obtenida por estándar externo ($t < t_{\text{tablas}}$), Tabla XII. En cuanto a la exactitud, solo en la metanfetamina existe diferencia significativa entre la obtenida por estándar interno y la obtenida por estándar externo ($t > t_{\text{tablas}}$), Tabla XIII.

5.2.4 Especificidad

Aun y cuando a la orina no se sometió a procesos de extracción de los analitos, al analizar orinas blanco no se detectaron interferencias en los tiempos de retención de las señales obtenidas de la pareja ion-precursor e ion-producto de cada uno de los analitos.

En corridas cromatográficas relativamente cortas de muestras tan complejas como lo es la orina, el Monitoreo de Reacción Múltiple llevado a cabo en el espectrómetro de masa triple cuádruplo es más selectivo que su análogo el modo de Monitoreo de Ion Selectivo. La razón de lo anterior es que solo se selecciona de la fuente de iones un solo ion para ser fragmentado, lo que da como resultado un espectro de masas de una sola sustancia y no un espectro proveniente de todas las sustancias que se encuentren presentes en ese

mismo tiempo de retención, cuya fragmentación pueda producir los iones que se rastrean en el Monitoreo de Ion selectivo.

La gran especificidad observada se debe a la combinación única del tiempo de retención y del espectro MRM de cada analito.

5.2.5 Robustez

Al aumentar el flujo se observó la disminución de los tiempos de retención, lo inverso ocurrió al disminuir el flujo. En ambas condiciones, la resolución obtenida fue aceptable (valores superiores a 1.5), excepto para la cocaína y el clonazepam que mostraron una resolución de 0.4 a flujo bajo (200 $\mu\text{L}/\text{min}$), Tabla XIV. Aun y cuando los tiempos de retención disminuyeron al utilizar flujo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, el uso de flujos altos no se recomienda debido a que puede presentarse condensación de la fase móvil en el orificio de entrada del Espectrómetro de Masas, lo que favorecería su contaminación.

Al variar la proporción inicial de acetonitrilo/amortiguador en la fase móvil (de 90/10 a 80/20), se observó un aumento en los tiempos de retención de los analitos a excepción de la benzoilecgonina que mantuvo el mismo t_R . Con este cambio en la fase móvil, la resolución entre los cuatro analitos aumentó.

Se utilizó la prueba F para determinar si existen diferencias significativas en los %R que se obtuvieron en los experimentos en los que se variaron los parámetros de flujo y composición inicial de la fase móvil, Tablas XV y XVI.

Al aumentar y disminuir el flujo, (400 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente), se determinó que existen diferencias significativas en %R de los cuatro analitos al ser

evaluados por estándar externo ($F > F_{\text{tablas}}$). En los %R obtenidos en base a estándar interno, solo existen diferencias significativas para la cocaína al utilizar la metanfetamina-D5 y la benzoilecgonina-D3, y para el clonazepam al utilizar la metanfetamina-D5, Tabla XVII.

En cuanto al cambio en la composición inicial de acetonitrilo/amortiguador en la fase móvil de 90/10 a 80/20, solo se observaron diferencias significativas en los %R obtenidos para la cocaína al evaluarse tanto por estándar interno como por estándar externo, Tabla XVIII.

5.2.6 Preparación de la muestra.

Comúnmente para el análisis de drogas en orina, los procedimientos de preparación de la muestra son tediosos y tardados, además de ser totalmente indispensables para la mayoría de las técnicas. En el presente trabajo se demostró que para la determinación de drogas de abuso en orina por medio de CLAR/IES/EM/EM, es posible la inyección directa de la muestra con tan solo filtrar previamente la orina, lo que reduce en gran medida los tiempos y procesos de preparación de muestra, además, se eliminan las posibles pérdidas de analito por el tratamiento de muestra.

En comparación con los procesos de extracción en fase sólida, la inyección directa de la orina ofrece grandes ventajas. En la extracción en fase sólida se requiere el uso de solventes y sales, y una vez que son utilizados en el proceso se consideran desechos, por lo que deben de disponerse en forma apropiada, lo que trae consigo un gasto extra que se suma al costo de los solventes y de los cartuchos de extracción. Al utilizar una técnica de inyección directamente de la orina, estos costos se eliminan.

5.2.7 Aplicación del método a muestras reales.

El tiempo total entre la preparación de muestra y la corrida cromatográfica no fue mayor de 30 minutos, tiempo muy aceptable por la premura en que son requeridos los resultados por quienes solicitan los estudios confirmatorios.

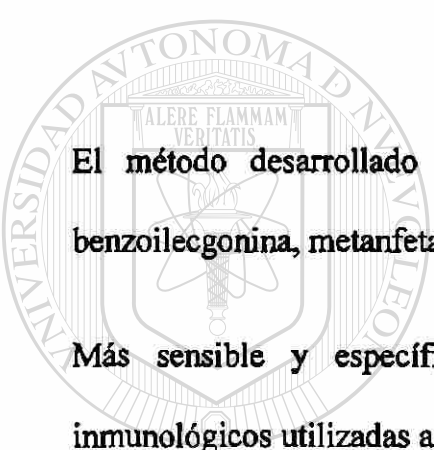
Se analizaron 47 muestras que previamente habían resultado positivas para cocaína por medio de pruebas presuntivas, en todas ellas se encontraron concentraciones mayores de benzoilecgonina que de cocaína. En algunas de las muestras se encontró que la cocaína presentaba concentraciones tan bajas que no pudieron cuantificarse. A diferencia de las pruebas inmunológicas que determinan la presencia de cocaína al encontrar en orina una cantidad tal de ésta y de sus metabolitos que sumada o en forma individual sobrepasen la concentración de corte, sin definir cual de las sustancias produjo el resultado positivo. El método desarrollado permite obtener resultados positivos para el consumo de cocaína,

ya que determina la presencia y la concentración de ésta y de su principal metabolito por separado.

Por otra parte, se analizó una orina proveniente de un sospechoso de posible consumo de cocaína que había resultado negativo por medio de pruebas presuntivas, al analizarla por el método CLAR/IES/MS/MS desarrollado en el presente trabajo resultó positivo para benzoilecgonina. Este tipo de resultados le dan al método la característica de ser confirmatorio, de no tan solo resultados presuntivos positivos, sino también de algunos resultados presuntamente negativos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES



El método desarrollado y validado por CLAR/IES/EM/EM para el análisis de benzoilecgonina, metanfetamina, cocaína y clonazepam en orina, resultó ser:

Más sensible y específico que las pruebas presuntivas basadas en principios inmunológicos utilizadas actualmente en los laboratorios de química forense del país.

Capaz de identificar a las drogas directamente en la matriz, inyectándola directamente al equipo, sin la necesidad de un procedimiento previo de extracción.

Menos susceptible a las variaciones en el porcentaje de recuperación al utilizar estándar interno que al utilizar estándar externo.

El método establecido puede ser utilizado como prueba confirmatoria para la determinación de metanfetamina, clonazepam, cocaína y benzoilecgonina en orina.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS



Se sugiere:

- Ampliar el estudio de rastreo a otras drogas de abuso usadas en el Estado de Nuevo León.
- Desarrollar un método para la determinación de drogas en forma simultánea en otros fluidos biológicos, como lo es la sangre.
- Utilizar otras técnicas de ionización para tratar de mejorar los Límites de Detección y Cuantificación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- OMS, Drogas que Producen Adicción, 1982, Suiza.
- 2- García Ramírez, Efraín. Análisis Jurídico del Delito Contra la Salud, 1989, 4ª. Edición, Editorial Sista, México. pag. 86-94.
- 3- Dams R., Murphy C. M., Lambert W. E. and Huestis M. A. Urine Drugs Testing for Opioids, Cocaine, and Metabolites by Direct Injection Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, 2003, Rapid Commun. Mass Spectrom; 17: pag. 1665-1670.
- 4- Jiménez Navarro, Raúl. Materia de Toxicología Forense, 1980, 1ª. Edición, Editorial Porrúa. México, pag. 56-57.
- 5- Astolfi, Emilio. Toxicomanías, 1989, Reimpresión, Editorial Universidad, Argentina, pag. 199-208.
- 6- Escobar Tomás, Raúl. El Crimen de la Droga, 1995, 2ª. Edición, Editorial Universidad, Argentina. pag. 25-28, 33-39, 189-196, 217-218.
- 7- Caro, Patricia M. Drogas de Abuso. 1997, Editorial La Rocca, Argentina. pag. 15-18.
- 8- Código Penal Federal de la República Mexicana, Enero del 2000, Editorial Berbera Editores. México
- 9- Ley General de Salud de la República Mexicana, Febrero 2003, Editorial Sista, México.

- 10-Smith, Frederick P. Handbook of Forensic Drug Analysis, 2005, Editorial Elsevier. Estados Unidos de Norteamérica. pag. 15-35
- 11-Saferstein, Richard. Criminalistics, 1995, New Jersey, Pretice-Hall, Estados Unidos de Norteamérica. pag. 278-307.
- 12-Consejo Nacional Contra las Adicciones, Encuesta Nacional de Adicciones, 2002, Secretaria de Salud, México.
- 13-Código Penal de Nuevo León y Código de Procedimientos Penales de Nuevo León, 2002, Editorial Anaya, México.
- 14-SOFT/AAFS. Forensic Toxicology Laboratory Guidelines, 2002, Estados Unidos de Norteamérica.
- 15-Agencias del Ministerio Público Especializadas en Delitos Viales de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Nuevo León. 2005
- 16-Rouessac, Francis. Rouessac, Annick. Análisis Químico, 2003. McGRAW-HILL, España. pag. 57, 94-95, 325-328, 301-304.
- 17-Introduction to Mass Spectrometry, Student Guide. 2002. Applied Biosystem.
- 18-Yinon, Jehuda. Forensic Applications of Mass Spectrometry. 1995. CRC. Estados Unidos de Norteamérica. pag 2-17.
- 19-De Hoffmann, Edmond. Stroobant Vincent, Mass Spectrometry Principles and Applications, 2002, John Wiley & Sons, England. pag 133-139

20-De Boeck. Recent Applications of LC-MS in Forensics Sciences, Recent Applications in LC-MS. 2002. Belgica. pag. 2-8

21-Fitzgerad, Robert. Broad Spectrum Drug Identification Directly from Urine, Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, 1999, Drug Monitoring and Toxicology, Clinical Chemistry; 45:8. pag. 1224-1234

22-Cole, Richard. Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 1997. John Wiley & Sons. Canada. pag. 323

23-Lamière, Filip. Interfaces for LC-MS, 2001, Guide to LC-MS, Bruker Daltonik. pag 2-8

24- API 4000 Operator Course, Applied Biosystem.

25- Estadísticas de Laboratorio de Química Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Nuevo León. 2004-2005

26-Uribe Nájera, C. Manual de toxicología clínica. 19 89, Editorial Temis, Colombia.

27- Schreiber, André. Multi Target Screening (MTS) for the systematic toxicological analysis of drugs, pharmaceuticals and toxic substances using High Pressure Liquid Chromatography and linear ion trap Mass Spectrometry. 2001. Applied Biosystems. Alemania

- 28- Sawyers, William G. Quantitative Analysis of Benzphetamine in Human Plasma
Quantitative Analysis of Benzphetamine in Human Plasma using LC-MS/MS
MS/MS, 2003, BASi – Clinical Research Unit, Estados Unidos de Norteamérica
- 29- Quattrocchi, Óscar. Introducción a la HPLC, 1992, Argentina.
- 30- Torres, Víctor. Determinación Simultánea de Anticonvulsivantes y sus
Principales Metabolitos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución,
1997, UANL.
- 31- Multi-Drug ®, Coc/AMPs/THC/Benz, Panel de prueba par sustancias de abuso,
Instructivo de uso e información del producto. 2002, Estado Unidos de
Norteamérica.
- 32- RapidTest d.a.u. ® 4 THC/Coc/OPI/mAMPs, Panel de prueba par sustancias de
abuso, Instructivo de uso e información del producto. Dade Behring. 1998,
Estados Unidos de Norteamérica.
- 33- DrugCheck 4 ® Coc/AMPs/mAMPs/Opi/THC/Benz, Panel de prueba par
sustancias de abuso, Instructivo de uso e información del producto. Amedica
Biotech, Estados Unidos de Norteamérica.
- 34- Ludwig, Huber. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. 2001
Agilent Technologies.
- 35- Gan B.K. Simultaneous Analysis of Amphetamine, Methamphetamine, and 3,4-
Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Urine Samples by Solid-Phase

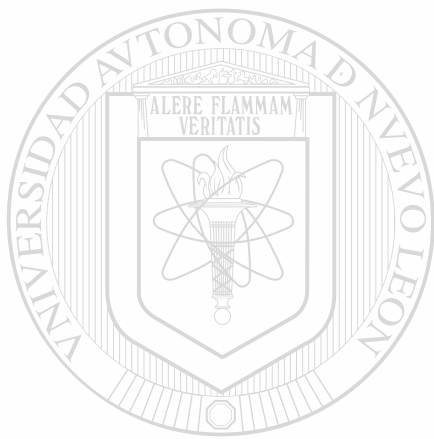
Extraction, Derivatization, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 1991,
Journal of Forensic Sciences; 36: pag. 1198-2009

36-Hensley, D. and Cody, J.T. Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. J. Anal. Toxicol; 23: pag 518-523.

37-Cárdenas, S., Gallego, M., Valcarcel M. An automated preconcentration derivatization system for the determination of cocaine and its metabolites in urine and illicit cocaine samples by gas chromatography-mass spectrometry., 1996 Rapid Commu -Mass Spectrom., 10, pag 631.

38-Fitzgerald R. L. Detecting Benzodiazepines: Immunoassays Compared with Negative Chemical Ionization Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 1994,
Clinical Chemistry, 40/3, pag 373-380

39-Edeibroek, P.M. and De Wolff, F.A. Improved Micromethod for Determination of Underivatized Clonazepam in Serum by Gas Chromatography, 1978, Clinical Chemistry, 20/10, pag 1774-1777



APÉNDICES

UANL

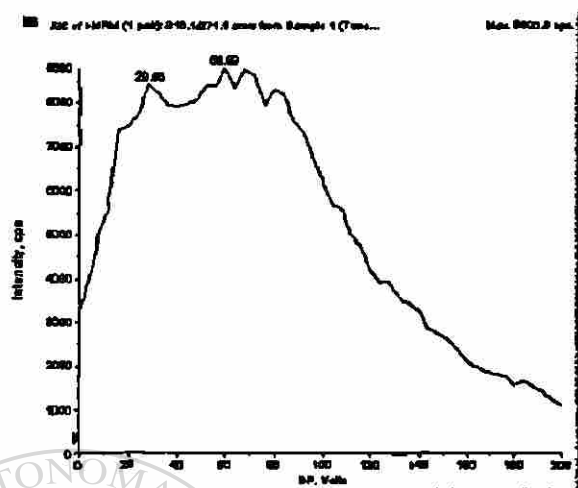
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

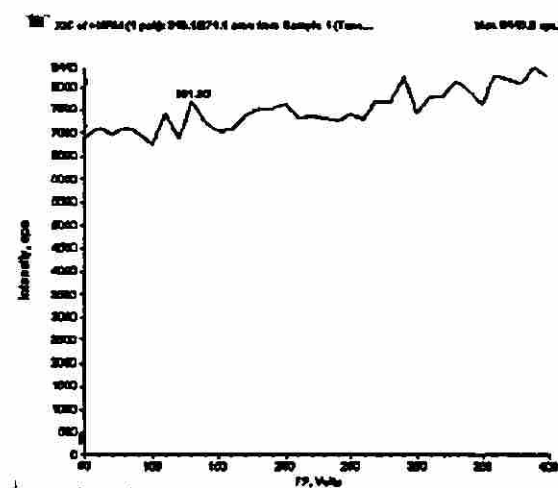
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Apéndice A

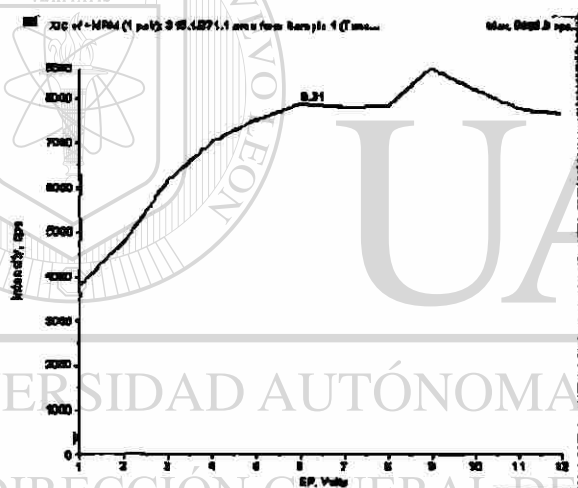
Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para clonazepam.



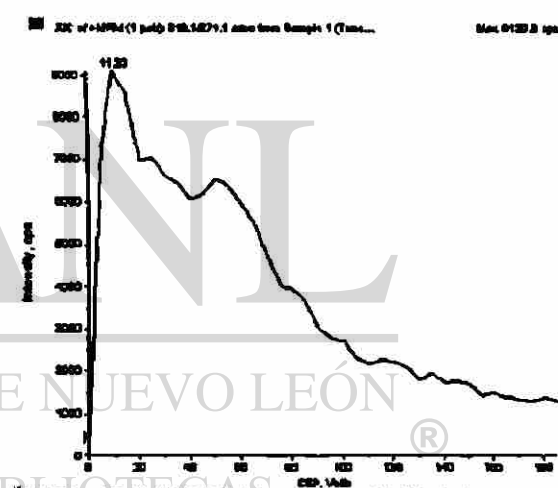
DP 0 – 200 V.



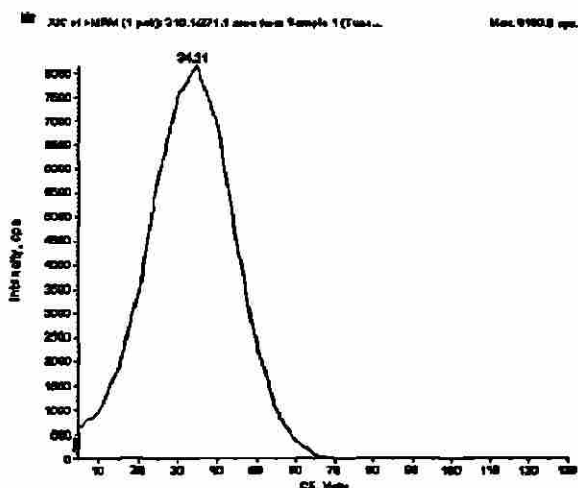
FP 50 – 400 V.



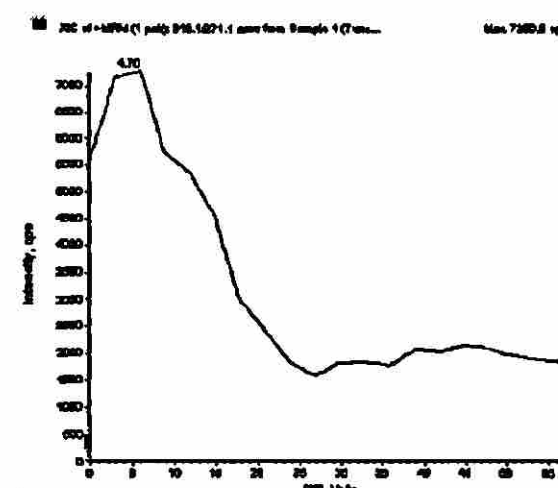
EP 1 – 12 V.



CEP 0 – 188 V



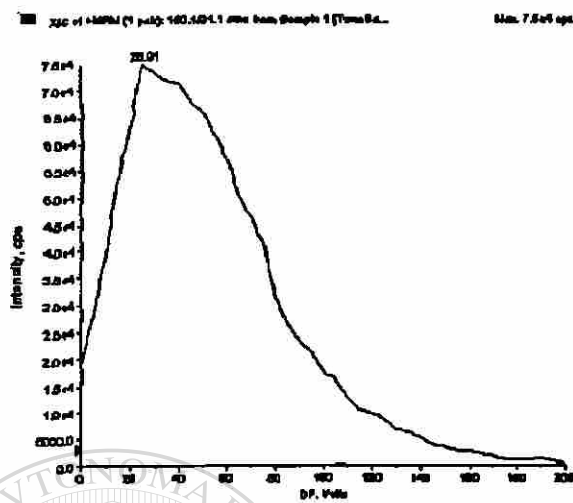
CE 0 – 130 V



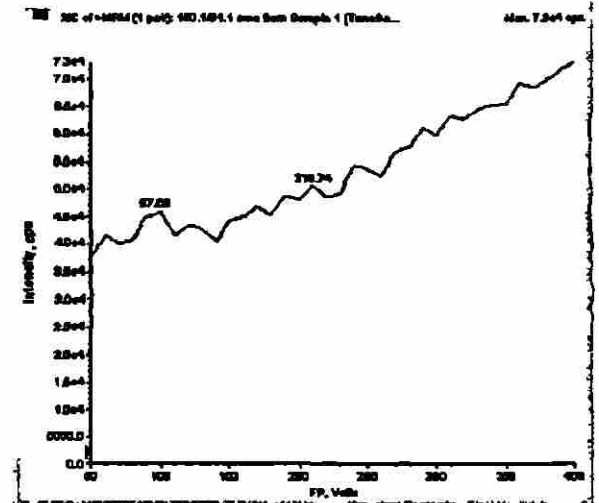
CXP 0 – 60 V

Apéndice B

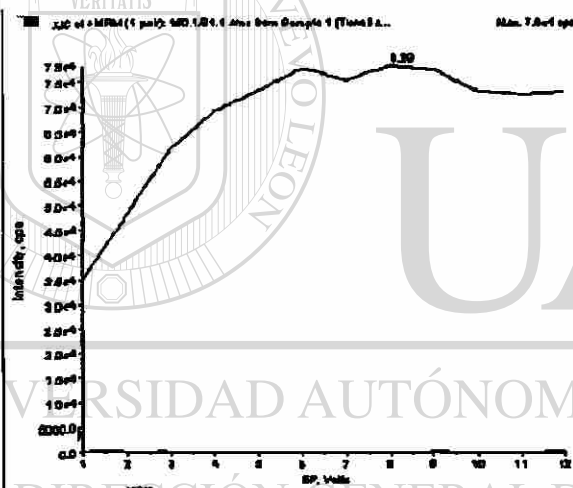
Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para metanfetamina.



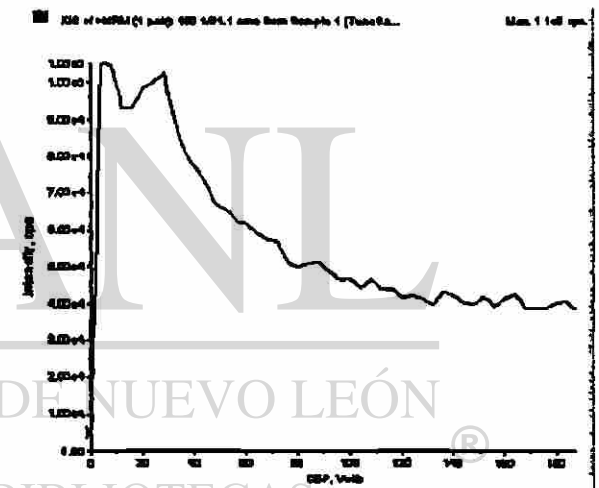
DP 0 – 200 V.



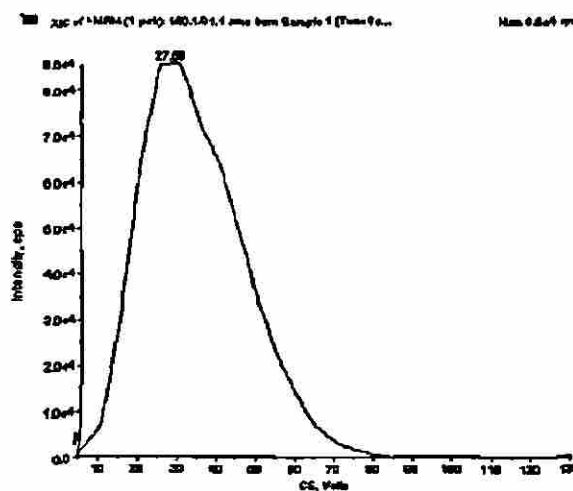
FP 50 – 400 V.



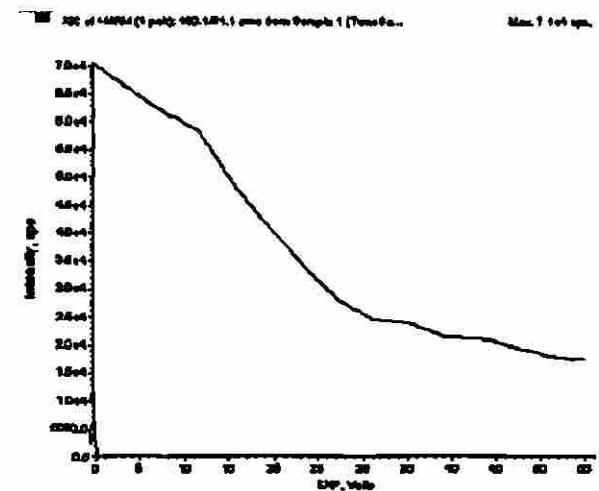
EP 1 – 12 V.



CEP 0 – 188 V



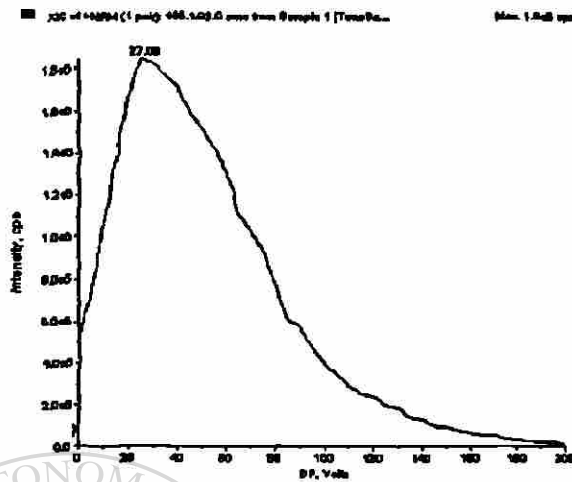
CE 0 – 130 V



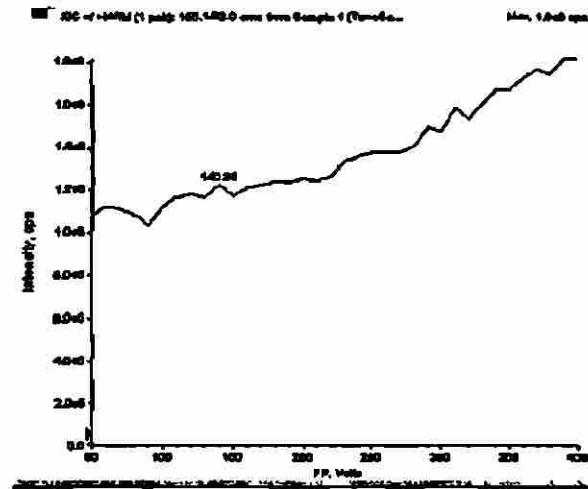
CXP 0 – 60 V

Apéndice C

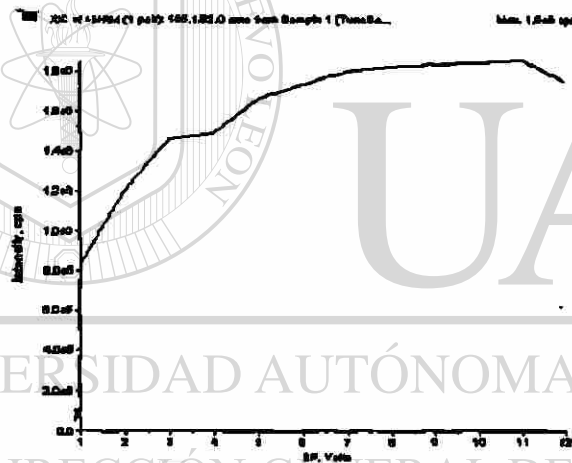
Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para metanfetamina-D5.



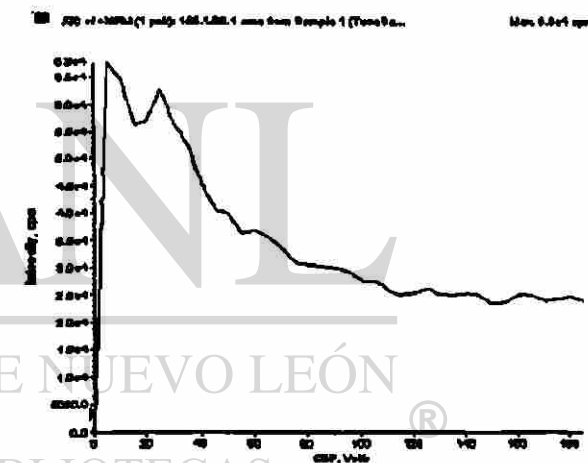
DP 0 – 200 V.



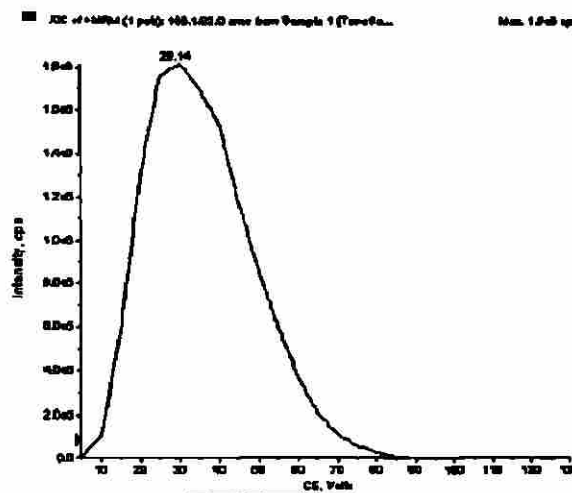
FP 50 – 400 V.



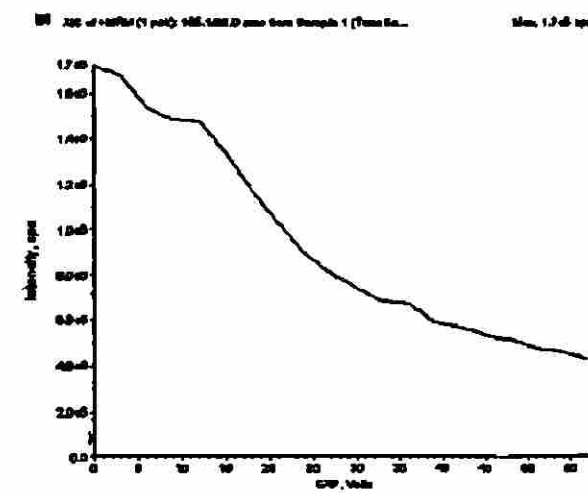
EP 1 – 12 V.



CEP 0 – 188 V



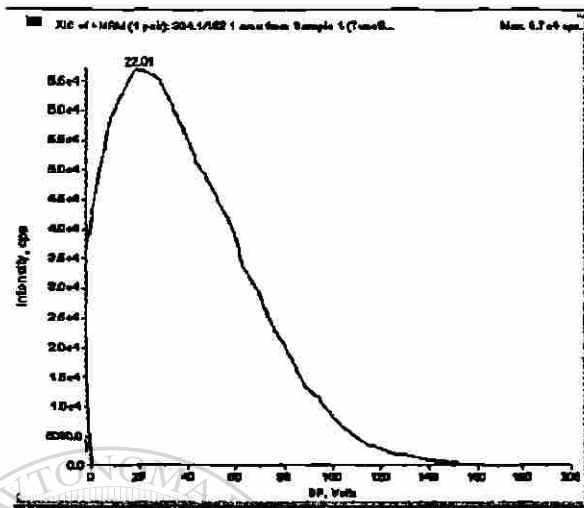
CE 0 – 130 V



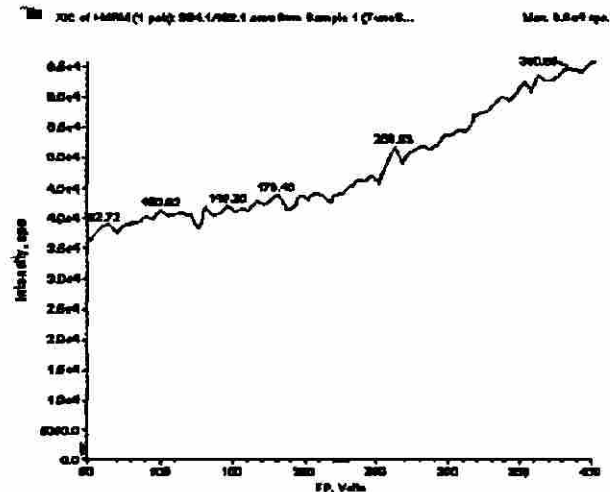
CXP 0 – 60 V

Apéndice D

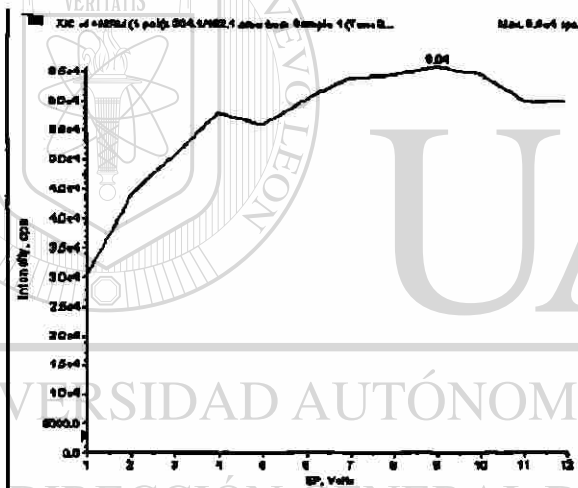
Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para cocaína.



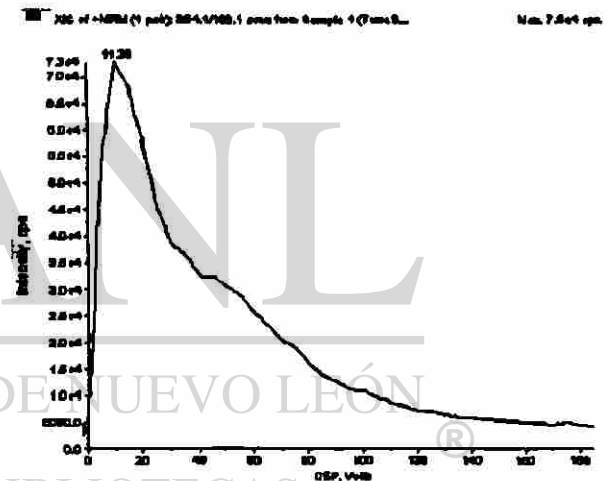
DP 0-200 V.



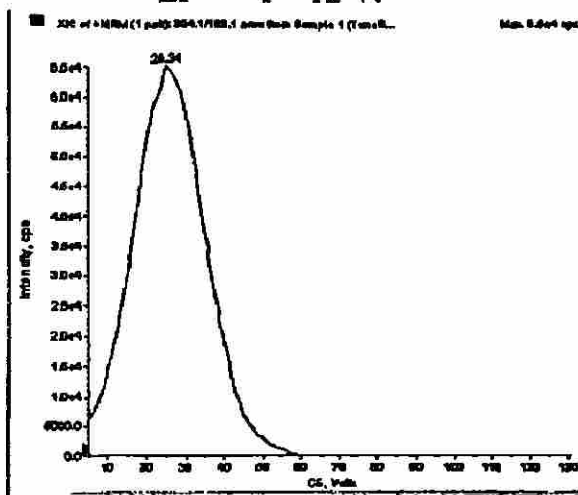
FP 50-400 V.



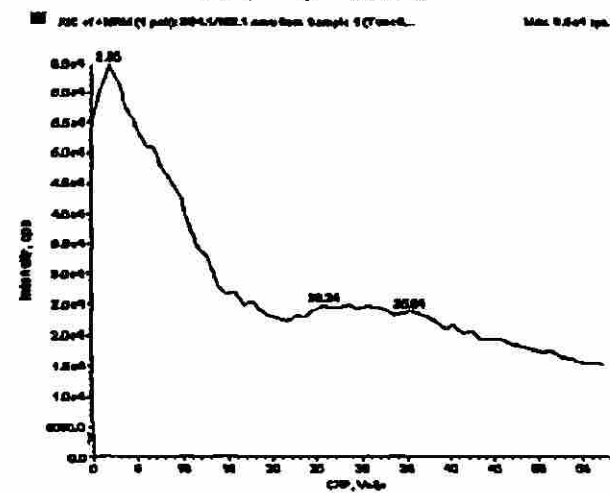
EP 1-12 V.



CEP 0-188 V



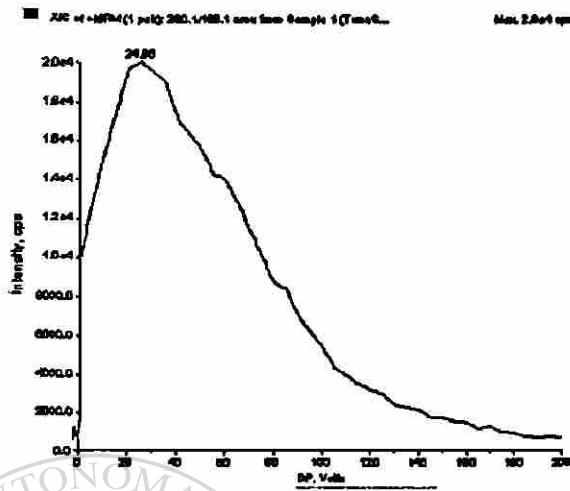
CE 0-130 V



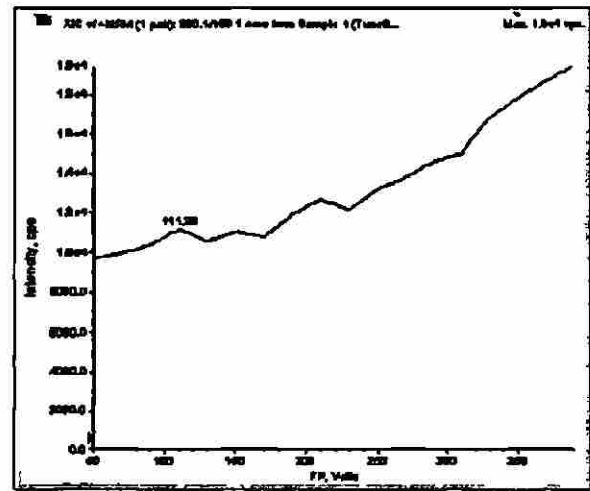
CXP 0-60 V

Apéndice E

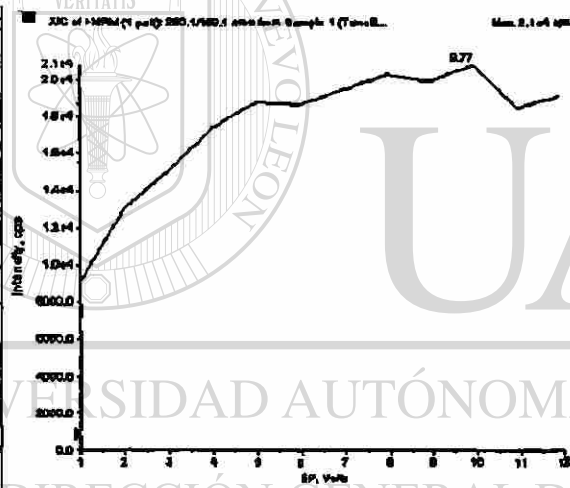
Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para benzoilecgonina.



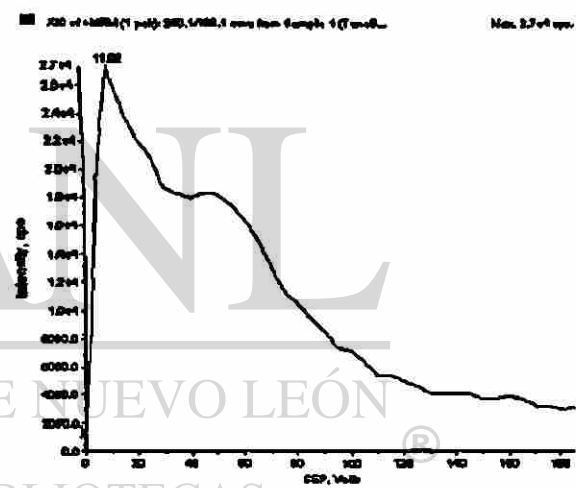
DP 0 - 200 V.



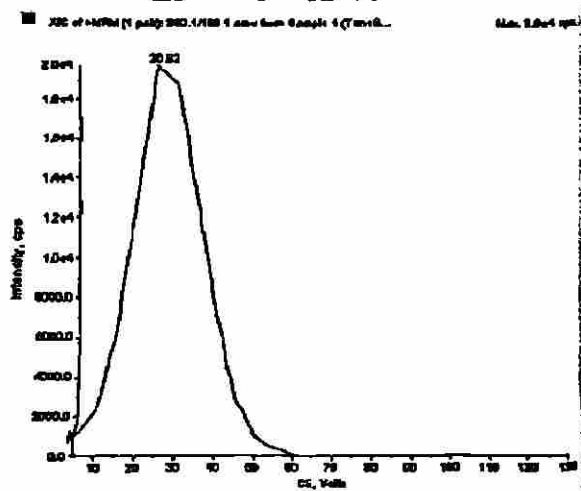
FP 50 - 400 V.



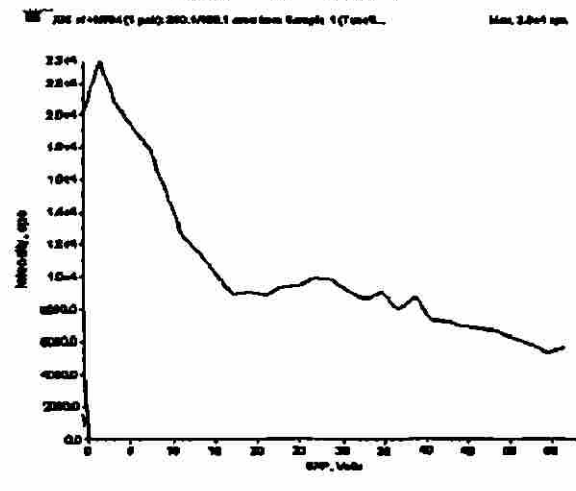
EP 1 - 12 V.



CEP 0 - 188 V



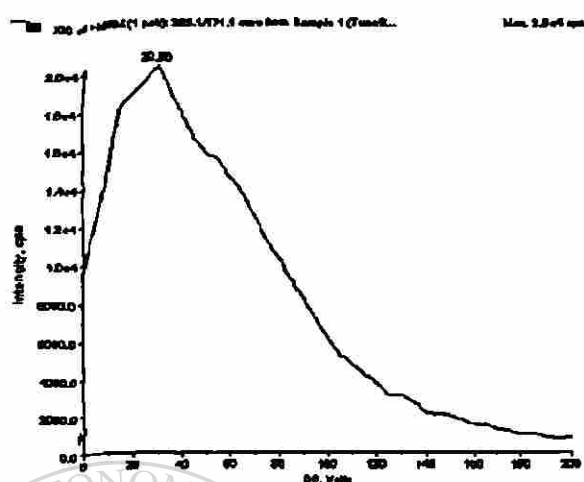
CE 0 - 130 V



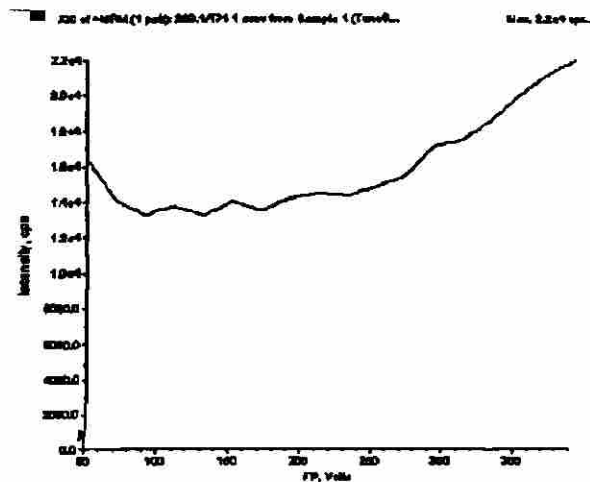
CXP 0 - 60 V

Apéndice F

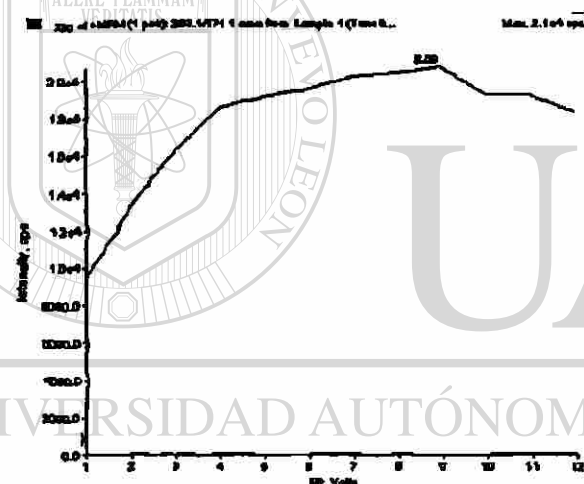
Gráficas de voltaje en función de cps de los barridos efectuados en los parámetros optimizados para benzoilecgonina-D3.



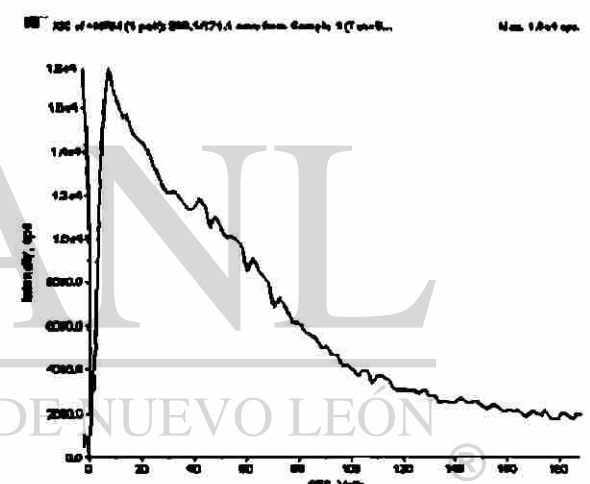
DP 0-200 V.



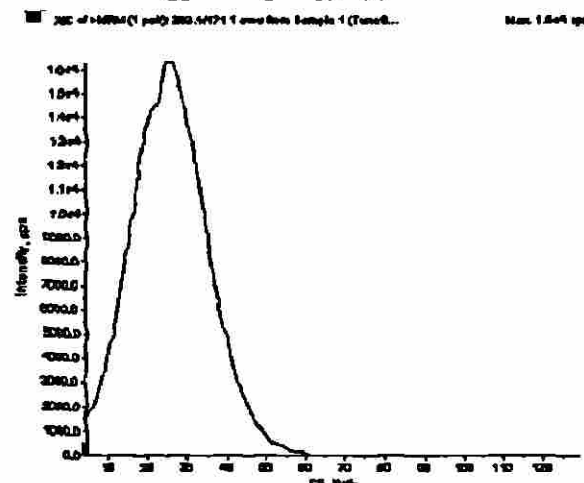
FP 50-400 V.



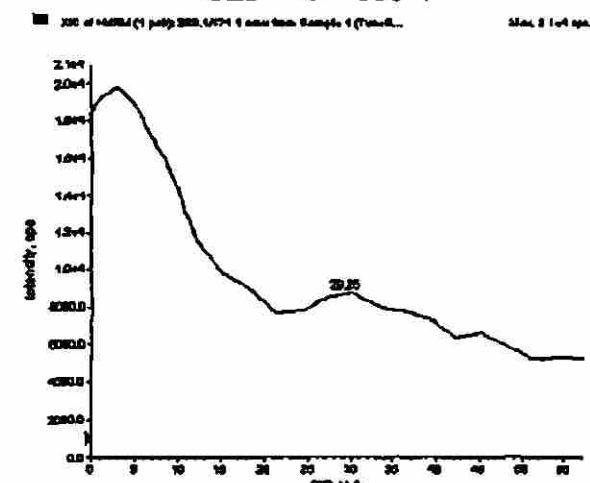
EP 1-12 V.



CEP 0-188 V

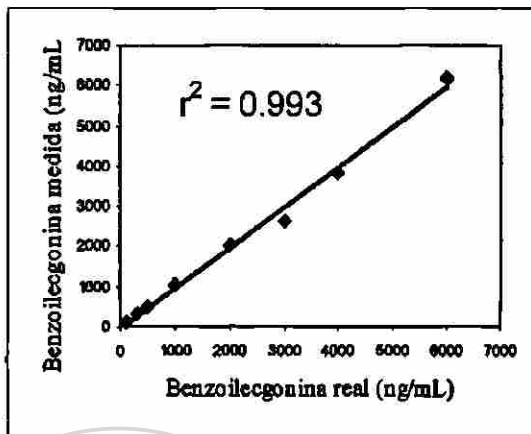


CE 0-130 V

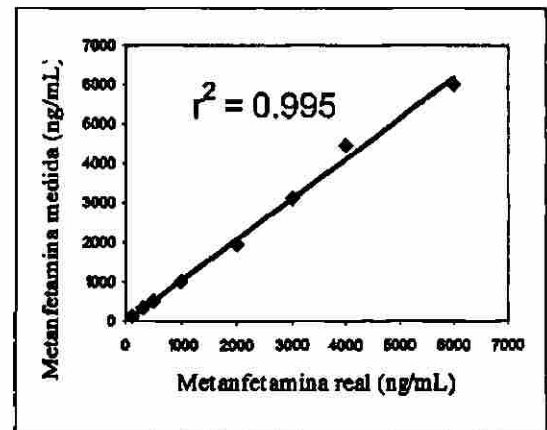


CXP 0-60 V

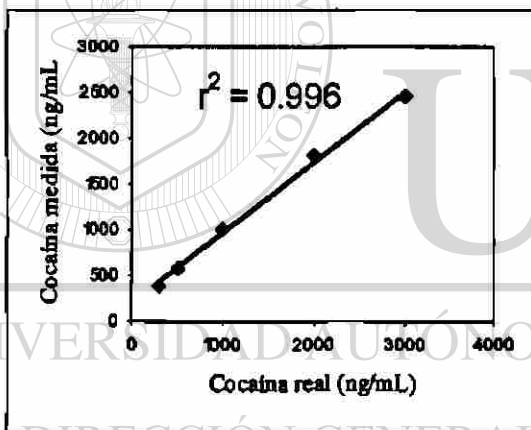
Apéndice G Curvas de calibración obtenidas por el método de estándar interno en el rango lineal establecido para cada uno de los analitos.



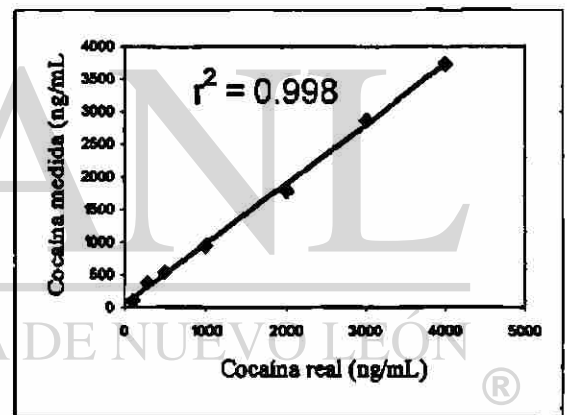
Linealidad de benzoilecgonina
Estándar interno benzoilecgonina-D3



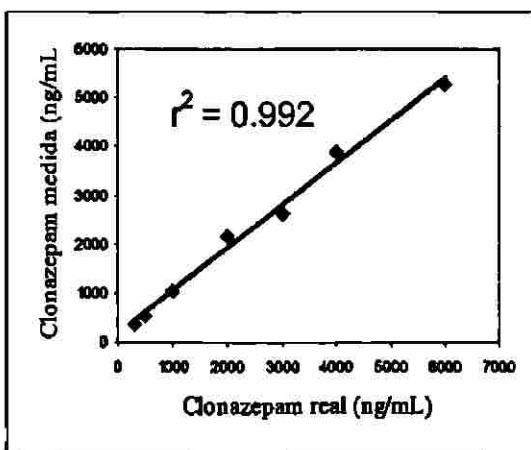
Linealidad de metanfetamina
Estándar interno metanfetamina-D5



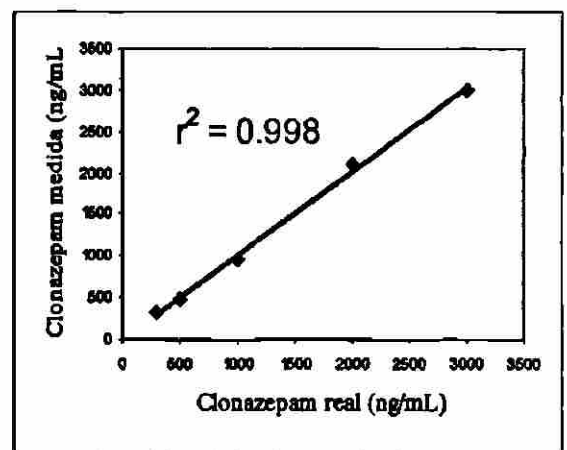
Linealidad de cocaína
Estándar interno benzoilecgonina-D3



Linealidad de cocaína
Estándar interno metanfetamina-D5



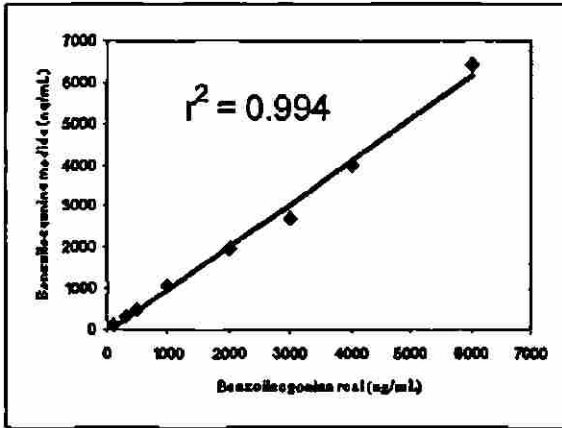
Linealidad de clonazepam
Estándar interno benzoilecgonina-D3



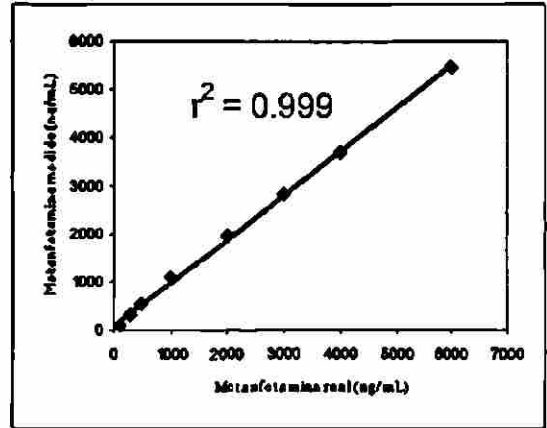
Linealidad de clonazepam
Estándar interno metanfetamina-D5

Apéndice H

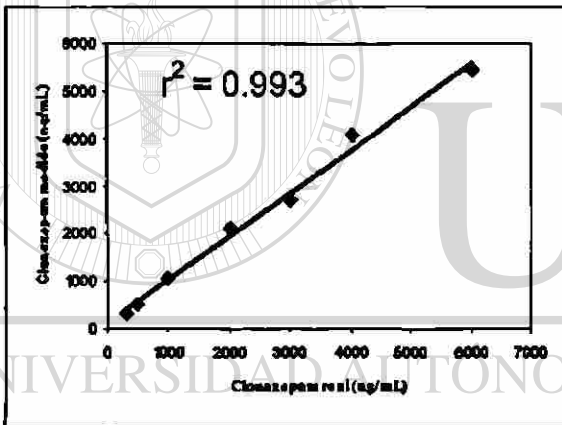
Curvas de calibración obtenidas por el método de estándar externo en el rango lineal establecido para cada uno de los analitos.



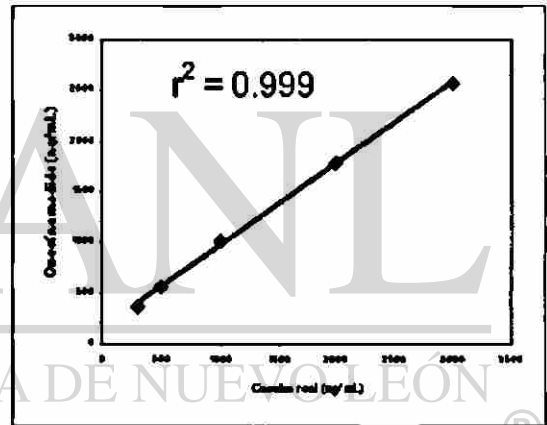
Linealidad de benzoilecgonina



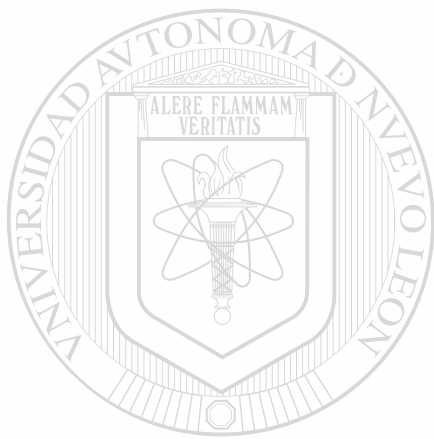
Linealidad de metamfetamina



Linealidad de cocaína



Linealidad de clonazepam



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



