

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA.  
INSTITUTO DE INGENIERIA  
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA.



DESARROLLO, IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO  
PARA LA DETECCIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN MUESTRA DE ORINA POR  
CROMATOGRFIA DE LÍQUIDOS ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

MAESTRO EN CIENCIAS.

PRESENTA:

ANGÉLICA MARÍA ASCENCIO SILVA.

DIRECTORA:

DRA. MÓNICA CARRILLO BELTRÁN.

MEXICALI B.C.

DICIEMBRE, 2013

## RESUMEN:

El presente trabajo propone el desarrollo de un método mediante el uso de técnicas de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas, encaminado al análisis confirmatorio de drogas de abuso como son: cocaína, marihuana, anfetaminas, metanfetaminas, opiáceos y benzodiazepinas, en muestras de orina.

Con base en la bibliografía se han seleccionado los principales metabolitos de drogas presentes en la orina de consumidores.

Se seleccionaron los estándares de estos metabolitos de las diferentes drogas a confirmar para su estudio, así como también las principales transiciones Q1-Q3 a optimizar para su detección.

Se desarrolló un método experimental en el cual se alcanzaron las condiciones óptimas de los parámetros dependientes de compuesto en el espectrómetro de masas y de los parámetros dependientes de flujo en el cromatografo de líquidos.

La validación del método analítico se realizó según los criterios de linealidad, repetibilidad y límite de detección.

## ÍNDICE

RESUMEN:.....	1
AGRADECIMIENTOS:.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	12
CAPÍTULO 1.....	13
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	14
1.3. DELINEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	15
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
CAPÍTULO 2.....	17
FUNDAMENTO TEÓRICO. ....	17
2.1. GENERALIDADES DEL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO: .....	17
2.1.1. ABSORCIÓN.....	18
2.1.2 DISTRIBUCIÓN.....	19
2.1.3. EXCRECIÓN: .....	19
2.2. DEPENDENCIA Y ABUSO DE DROGAS.....	20
2.3. PRINCIPALES DROGAS DE ABUSO. ....	20
2.3.1 COCAINA. ....	20
2.3.3 ANFETAMINA.....	23
2.3.4 METANFETAMINAS:.....	25
2.3.5 BENZODIACEPINAS:.....	26
2.3.6 OPIACEOS:.....	28
CAPÍTULO 3.....	32
3.1. EXAMEN TOXICOLÓGICO DE ESCRUTINIO EN MUESTRAS DE ORINA.....	32
Periodos de detección: .....	32
3.2 CROMATOGRAFIA.....	34

3.3. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA:.....	35
3.3.1. INSTRUMENTACIÓN PARA COMATOGRAFIA DE LIQUIDOS. ....	36
3.3.1.1 Recipiente para la fase móvil y sistema para el tratamiento de solventes. ....	38
3.3.1.2 Sistema de bombeo. ....	38
3.3.1.3 Sistema de inyección de muestra.....	39
3.3.1.4 Columnas para cromatografía de líquidos.....	40
3.3.1.6 Tipos de rellenos.....	41
3.4. ESPECTROMETRIA DE MASAS. ....	42
3.4.1. INSTRUMENTACIÓN.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.4.1.1. Fuente de lones: .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.4.1.2. Interface de vacío: .....	43
3.4.1.3. Analizador de masas.....	44
3.4.1.4. El detector:.....	46
3.4.1.5. Análisis de los datos: .....	47
3.5. VENTAJAS DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS SOBRE CROMATOGRAFIA GASAS.....	48
3.6. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE COMPUESTOS POR HPLC/MS. ....	50
CAPITULO 4.....	51
4.1. DESARROLLLO EXPERIMETAL.....	51
4.1.1. MUESTRA REQUERIDA: .....	51
4.1.2. PROCEDIMIENTO PARA EXAMEN TOXICOLÓGICO DE ESCRUTINIO EN MUESTRAS DE ORINA.....	52
4.1.3. PROCEDIMIENTO PARA EXAMEN TOXICOLÓGICO MEDIANTE HPLC/MS EN MUESTRAS DE ORINA .....	54
4.1.4. PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR PARAMETROS DEPENDIENTES DEL COMPUESTO EN EL ESPECTROMETRO DE MASAS.....	55
4.1.5. PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR PARAMETROS DEPENDIENTES DE FLUJO EN EL CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS. ....	62
4.1.6. PROCEDIMIENTO PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS POR HPLC/MS. ....	63
CAPÍTULO 5.....	64
RESULTADOS. ....	64
5.1. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS. ....	64
5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DEPENDIENTES DEL COMPUESTO.....	65

5.2. RESULTADOS DE LOS ESPECTROS DE PRIMER ORDEN: .....	66
5.3 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA DETECCIÓN DE DROGAS DE ABUSO POR HPLC/MS. ....	67
5.3.1 Determinación de Linealidad y Sensibilidad. ....	67
5.3.2 Límites de detección y cuantificación. ....	110
CONCLUSIONES: .....	124
BIBLIOGRAFIA: .....	125

## **AGRADECIMIENTOS:**

A DIOS POR MULTIPLICAR MI TIEMPO Y MI ENERGIA.

A MI ESPOSO POR ALENTARME A CADA MOMENTO.

A MARINTIA Y ABRIL POR SU AMOR Y COMPRENSIÓN.

A MI DIRECTORA DE TESIS, DOCTORA MÓNICA CARRILLO BELTRÁN POR  
COMPARTIR TAN GENEROSAMENTE SUS CONOCIMIENTOS.

**COMPRA LA VERDAD Y NO LA VENDAS; LA SABIDURIA, LA INSTRUCCIÓN Y LA INTELIGENCIA.**

PROVERBIOS 23:23.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Cartucho de pruebas inmuno enzimáticas.....	20
Figura 2.- Esquema de un equipo HPLC.....	24
Figura 3.- Fotografía del equipo HPLC/MS Prominence de Shimatzu.....	25
Figura 4.- Fotografía del sistema de solventes.....	26
Figura 5.- Fotografía del sistema de bombeo.....	27
Figura 6.- Fotografía del contenedor para dispensación de muestras.....	28
Figura 7.- Fotografía de la columna cromatográfica.....	29
Figura 8.- Fotografía de una precolumna cromatográfica.....	30
Figura 9.- Fotografía de la fuente de ionización.....	33
Figura 10.- Fotografía de la entrada a la interface.....	34
Figura 11.- Sistema de cuadrupolo.....	35
Figura 12.- Fotografía de un espectrómetro de masas .....	36
Figura 13.- Esquema de fraccionamiento Q1-Q3.....	37
Figura 14.-Cromatograma.....	38
Figura 15.- Pruebas inmuno enzimáticas.....	44
Figura 16.- Escaneo Q1 MsQ1 para Cocaína .....	47
Figura 17.- Rampeo DP para cocaína.....	48
Figura 18.- Rampeo EP para cocaína .....	49
Figura 19.- Escaneo Multiple Ion para cocaína .....	49
Figura 20.- Escaneo del ion producto para cocaína .....	50
Figura 21.- Escaneo del ion precursor para cocaína .....	51
Figura 22.- Escaneo de perdida neutra para cocaína .....	52
Figura 23.- Escaneo MRM para cocaína .....	53
Figura 24.- Curva de calibración para Marihuana.....	69

Figura 25.- Cromatograma de Marihuana a 1 ng/ml.....	61
Figura 26.- Cromatograma de Marihuana a 50 ng/ml.....	61
Figura 27.- Cromatograma de Marihuana a 100 ng/ml.....	62
Figura 28.- Cromatograma de Marihuana a 200 ng/ml.....	62
Figura 29.- Cromatograma de Marihuana a 300 ng/ml.....	63
Figura 30.- Cromatograma de Marihuana a 400 ng/ml.....	63
Figura 31.- Cromatograma de Marihuana a 500 ng/ml.....	64
Figura 32.- Cromatograma de Marihuana a 600 ng/ml.....	64
Figura 33.- Cromatograma de Marihuana a 700 ng/ml.....	65
Figura 34.- Cromatograma de Marihuana a 800 ng/ml.....	65
Figura 35.- Cromatograma de Marihuana a 900 ng/ml.....	66
Figura 36.- Cromatograma de Marihuana a 1000 ng/ml.....	66
Figura 37.- Curva de calibración para Cocaína.....	67
Figura 38.- Cromatograma de cocaína a 1 ng/ml.....	67
Figura 39.- Cromatograma de cocaína a 50 ng/ml.....	69
Figura 40.- Cromatograma de cocaína a 100 ng/ml.....	69
Figura 41.- Cromatograma de cocaína a 200 ng/ml.....	70
Figura 42.- Cromatograma de cocaína a 300 ng/ml.....	70
Figura 43.- Cromatograma de cocaína a 400 ng/ml.....	71
Figura 44.- Cromatograma de cocaína a 500 ng/ml.....	71
Figura 45.- Cromatograma de cocaína a 600 ng/ml.....	72
Figura 46.- Cromatograma de cocaína a 700 ng/ml.....	72
Figura 47.- Cromatograma de cocaína a 800 ng/ml.....	73
Figura 48.- Cromatograma de cocaína a 900 ng/ml.....	73
Figura 49.- Cromatograma de cocaína a 1000 ng/ml.....	74

Figura 50.- Curva de calibración para Metanfetaminas.....	76
Figura 51.- Cromatograma de Metanfetaminas a 1 ng/ml.....	76
Figura 52.- Cromatograma de Metanfetaminas a 50 ng/ml.....	77
Figura 53.- Cromatograma de Metanfetaminas a 100 ng/ml.....	77
Figura 54.- Cromatograma de Metanfetaminas a 200 ng/ml.....	78
Figura 55.- Cromatograma de Metanfetaminas a 300 ng/ml.....	78
Figura 56.- Cromatograma de Metanfetaminas a 400 ng/ml.....	79
Figura 57.- Cromatograma de Metanfetaminas a 500 ng/ml.....	79
Figura 58.- Cromatograma de Metanfetaminas a 600 ng/ml.....	80
Figura 59.- Cromatograma de Metanfetaminas a 700ng/ml.....	80
Figura 60.- Cromatograma de Metanfetaminas a 800 ng/ml.....	81
Figura 61.- Cromatograma de Metanfetaminas a 900ng/ml.....	81
Figura 62.- Cromatograma de Metanfetaminas a 1000 ng/ml.....	82
Figura 63.- Curva de calibración para Anfetaminas.....	83
Figura 64.- Cromatograma de Anfetamina a 1 ng/ml.....	83
Figura 65.- Cromatograma de Anfetaminas a 50 ng/ml.....	84
Figura 66.- Cromatograma de Anfetaminas a 100 ng/ml.....	84
Figura 67.- Cromatograma de Anfetaminas a 200 ng/ml.....	85
Figura 68.- Cromatograma de Anfetaminas a 300 ng/ml.....	85
Figura 69.- Cromatograma de Anfetaminas a 400 ng/ml.....	86
Figura 70.- Cromatograma de Anfetaminas a 500 ng/ml.....	86
Figura 71.- Cromatograma de Anfetaminas a 600 ng/ml.....	87
Figura 72.- Cromatograma de Anfetaminas a 700 ng/ml.....	87
Figura 73.- Cromatograma de Anfetaminas a 800 ng/ml.....	88
Figura 74.- Cromatograma de Anfetaminas a 900 ng/ml.....	88
Figura 75.- Cromatograma de Anfetaminas a 1000 ng/ml.....	89

Figura 76.- Curva de calibración para opiáceos.....	90
Figura 77.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 1 ng/ml.....	90
Figura 78.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 50 ng/ml.....	91
Figura 79.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 100 ng/ml.....	91
Figura 80.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 200 ng/ml.....	92
Figura 81.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 300 ng/ml.....	92
Figura 82.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 400 ng/ml.....	93
Figura 83.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 500 ng/ml.....	93
Figura 84.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 600 ng/ml.....	94
Figura 85.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 700 ng/ml.....	94
Figura 86.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 800 ng/ml.....	95
Figura 87.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 900 ng/ml.....	95
Figura 88.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 1000 ng/ml.....	96
Figura 89.- Curva de calibración para Benzodiazepinas.....	97
Figura 90.- Cromatograma de Alprazolam 1 ng/ml.....	97
Figura 91.- Cromatograma de Alprazolam 50 ng/ml.....	98
Figura 92.- Cromatograma de Alprazolam 100 ng/ml.....	98
Figura 93.- Cromatograma de Alprazolam 200 ng/ml.....	99
Figura 94.- Cromatograma de Alprazolam 300 ng/ml.....	99
Figura 95.- Cromatograma de Alprazolam 400 ng/ml.....	100
Figura 96.- Cromatograma de Alprazolam 500 ng/ml.....	100
Figura 97.- Cromatograma de Alprazolam 600 ng/ml.....	101
Figura 98.- Cromatograma de Alprazolam 700 ng/ml.....	101
Figura 99.- Cromatograma de Alprazolam 80 0ng/ml.....	102
Figura 100.- Cromatograma de Alprazolam 900 ng/ml.....	102
Figura 101.- Cromatograma de Alprazolam 1000ng/ml.....	103

Figura 102.- Cromatograma de cocaína a 1 pg/ml.....	104
Figura 103.- Cromatograma de cocaína a 5 pg/ml.....	105
Figura 104.- Cromatograma de cocaína a 10 pg/ml.....	105
Figura 105.- Cromatograma de cocaína a 20 pg/ml.....	106
Figura 106.- Cromatograma de cocaína a 30 pg/ml.....	106
Figura 107.- Cromatograma de Marihuana a 1 ng/ml.....	107
Figura 108.- Cromatograma de Marihuana a 50 pg/ml.....	108
Figura 109.- Cromatograma de Marihuana a 100 pg/ml.....	108
Figura 110.- Cromatograma de Marihuana a 200 pg/ml.....	109
Figura 111.- Cromatograma de Metanfetaminas a 100 pg/ml.....	110
Figura 112.- Cromatograma de Metanfetaminas a 150 pg/ml.....	110
Figura 113.- Cromatograma de Metanfetaminas a 200 pg/ml.....	111
Figura 114.- Cromatograma de Metanfetaminas a 300 pg/ml.....	111
Figura 115.- Cromatograma de Anfetaminas a 250 pg/ml.....	112
Figura 116.- Cromatograma de Anfetaminas a 500 pg/ml.....	113
Figura 117.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 100 pg/ml.....	114
Figura 118.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 250 pg/ml.....	114
Figura 119.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 500 pg/ml.....	115
Figura 120.- Cromatograma de Diacetilmorfina a 750 pg/ml.....	115
Figura 121.- Cromatograma de Alprazolam a 50 pg/ml.....	116
Figura 122.- Cromatograma de Alprazolam a 100 pg/ml.....	117
Figura 123.- Cromatograma de Alprazolam a 500 pg/ml.....	117

## LISTA DE TABLAS.

Tabla no.1.- Encuesta nacional de adicciones.....	4
Tabla no.2.- Estructura química y peso molecular de drogas de abuso.....	19
Tabla no. 3.- Propiedades farmacológicas de drogas de abuso.....	20
Tabla no. 4.- Periodos de detección de drogas de abuso en pruebas de escrutinio.....	22
Tabla no.5.- Limite de detección de drogas de abuso en pruebas de escrutinio.....	23
Tabla no.6.- Optimización de parámetros de flujo.....	64
Tabla no.7.- Optimización de parámetros de compuestos.....	65
Tabla no.8.- Peso molecular y relación m/z de los espectros de primer orden.....	66
Tabla no.9.-Espectros de primer orden y pérdida neutra.....	67
Tabla no.10.- Curva de calibración de Marihuana.....	68
Tabla no.11.- Curva de calibración de Cocaína.....	70
Tabla no.12.- Curva de calibración de Metanfetaminas.....	78
Tabla no.13.- Curva de calibración de Anfetaminas.....	85
Tabla no.14.- Curva de calibración de Opiáceas.....	92
Tabla no.15.- Curva de calibración de Benzodiazepinas.....	100
Tabla no. 16.-Límite de detección para Cocaína.....	108
Tabla no. 17.-Límite de detección para Marihuana.....	111
Tabla no. 18.-Límite de detección para Metanfetaminas.....	114
Tabla no. 19.-Límite de detección para Anfetaminas.....	117
Tabla no. 20.-Límite de detección para Diacetilmorfina.....	119
Tabla no. 21.-Límite de detección para Alprazolam .....	121

# CAPÍTULO 1.

## INTRODUCCIÓN:

El análisis toxicológico se aplica para la detección, identificación y cuantificación de drogas y sus metabolitos en muestras biológicas, juega un papel importante en el diagnóstico, tratamiento, sobredosificación y prevención de envenenamiento, en toxicología clínica y forense así como para prevenir riesgos contra la salud, accidentes de trabajo e importantes problemas sociales.

Aunque el método de ELISA y los inmunoensayos son técnicas sensibles para detección de drogas, existe la posibilidad de falsos positivos debido a reacciones cruzadas, la confirmación de estas drogas requiere de un método más específico y sensible.

Durante mucho tiempo la combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC/MS) ha sido la técnica usada para la identificación y cuantificación de estos analitos en mezclas complejas. Debido a su utilidad se hacen grandes esfuerzos en la etapa de preparación de la muestra, ya que en la cromatografía de gases es necesario que los compuestos sean volátiles y que no se descompongan con la temperatura requerida para realizar el análisis.

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, es el siguiente paso en la combinación de las técnicas de cromatografía y espectrometría, ya que puede aplicarse a una amplia variedad de compuestos orgánicos, especialmente los metabolitos de drogas y ofrece la mejor sensibilidad, con un mínimo de preparación de muestra.

## 1.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, implementar y validar de un método analítico para la determinación cualitativa y cuantitativa de drogas de abuso en muestras de orina, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1.-Obtener los espectros de masa de primer orden (Ion padre o ion precursor) y patrones de fragmentación (Ion hijo o ion producto) para los estándares de drogas como son:

- Metabolitos de Cocaína (Benzoilecgonina, Ecgoninametiléster)
- Metabolitos de Marihuana ( $\Delta^9$  Tetrahidrocanabinol, 11 nor  $\Delta^9$  Tetrahidrocanabinol ácido carboxílico)
- Metabolitos de Opiáceos (Morfina 3 beta glucoronide, Diacetilmorfina)
- Anfetamina
- Metanfetamina.
- Principales Benzodiacepinas (Alprazolam, Lorazepam, Oxazepam, Temazepam.)

2.-Seleccionar los fragmentos más abundantes para optimizar un método de identificación MRM (Multiple reaction Monitoring).

3.-Desarrollar un método cromatográfico y el acoplamiento a espectrometría de masas HPLC/MS, para la identificación de los metabolitos de drogas mencionados anteriormente.

4.-Validar el método confirmatorio para la identificación y cuantificación en muestras de orina.

### **1.3. DELINEAMIENTO DEL ESTUDIO.**

Desarrollar un método analítico que nos permita resolver el problema que representa la confirmación del examen toxicológico para drogas de abuso como son: Cocaína, marihuana, anfetaminas, metanfetaminas, opiáceos y benzodiazepinas, mediante una técnica altamente confiable como es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas.

### **1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Debido a que el consumo de drogas se ha intensificado en los últimos años, así como la accesibilidad a sustancias de abuso, es de fundamental importancia para empresas e instituciones realizar exámenes toxicológicos con una alta confiabilidad, con lo cual se previenen importantes problemas sociales.

Algunas situaciones en las que se requiere de la realización de exámenes toxicológicos confirmatorios son:

- 1) En el control antidopaje en asociaciones deportivas.
- 2) En el reclutamiento de personal para empresas.
- 3) Como una herramienta de evaluación de control de confianza en instituciones.
- 4) Para delimitar responsabilidades jurídicas.
- 5) Para esclarecer causas de fallecimiento.

Generalmente se utilizan inmunoensayos para realizar los primeros análisis en hospitales, centros de rehabilitación y laboratorios, pero estos ensayos solo permiten detectar un número limitado de sustancias a bajas concentraciones.

Es por ello que se hace necesaria la implementación de técnicas más confiables como lo es la cromatografía de líquidos en combinación con la espectrometría de masas, la cual se puede utilizar para el análisis general de escrutinio, confirmación y cuantificación de drogas de abuso.

Tabla 1. Tendencia de consumo de drogas en el último año, población total de 12 a 65 años.

	2002%	2008%	2011%	2011, IC 95%
<b>TOTAL</b>				
Mariguana	0.6	1.0	1.2	0.95-1.46
Cocaína	0.0	0.4	0.5	0.35-640
Crack	***	0.1	0.1	0.03-0.19
Alucinógenos	***	0.1	0.1	0.03-0.19
Inhalables	0.1	0.1	0.1	0.04-0.19
Anfetaminas	***	0.1	0.2	0.06-0.23
Cualquier droga ilegal	0.8	1.4	1.5	1.22-1.78
Cualquier droga	1.3	1.6	1.8	1.52-2.21
<b>HOMBRES</b>				
Marihuana	1.2	1.7	2.22	1.71-2.56
Cocaína	0.7	0.8	0.9	0.63-1.21
Crack	***	0.2	0.2	0.05-0.37
Alucinógenos	***	0.1	0.1	0.005-0.27
Inhalables	0.2	0.2	0.2	0.066-0.33
Anfetaminas	0.1	0.2	0.2	0.10-0.34
Cualquier droga ilegal	1.7	2.3	2.6	2.12-3.14
Cualquier droga	2.2	2.5	3.0	2.43-3.51
<b>MUJERES</b>				
Marihuana	0.1	0.4	0.3	0.008-0.502
Cocaína	***	0.1	0.1	0.027-0.169
Crack	---	***	***	-----
Alucinógenos	***	***	***	-----
Inhalables	***	***	***	-----
Anfetaminas	***	0.1	0.1	-----
Cualquier droga ilegal	0.1	0.5	0.4	0.200-0.692
Cualquier droga	1.5	0.8	0.7	0.470-1.023

Fuente: Encuestas nacionales de adicciones 2002, 2008 y 2011.

\*\*Cocaína también incluye crack. \*\*\*El porcentaje obtenido es menor de 0.

## CAPÍTULO 2

### FUNDAMENTO TEÓRICO.

#### 2.1. GENERALIDADES DEL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO:

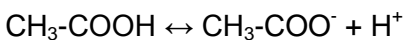
La toxicología se define como el estudio de los efectos adversos de las sustancias químicas.

Una sustancia química tiene actividad biológica, cuando en pequeñas dosis, inicia cambios celulares y es selectiva al presentar efecto en algunas células y no en otras.

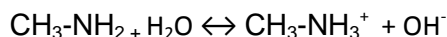
Muchas sustancias químicas poseen actividad selectiva útil en el tratamiento de enfermedades, éstas sustancias se denominan medicamentos o drogas y forman parte de la terapéutica.

Una vez que una droga es administrada, es absorbida por la corriente sanguínea y distribuida por todo el organismo, para finalmente ser eliminada ya sea por conversión a otro compuesto (metabolito) o por excreción. Estos fenómenos son importantes porque controlan la cantidad de droga que llega al sitio de acción y el periodo en el que ejercen su efecto.

El desplazamiento activo de un fármaco por el organismo depende de su polaridad y de sus características iónicas. La ionización de un fármaco es el resultado de las reacciones ácido base de los compuestos orgánicos. Un ácido orgánico es un electrolito débil que se puede ionizar para formar un ion hidrógeno y la base conjugada.



En forma análoga, una base orgánica, es un electrolito débil que se ioniza al aceptar un protón.



Cuando los compuestos orgánicos se ionizan, son más solubles en soluciones acuosas. En su forma neutra, estos compuestos son más liposolubles.

La polaridad de una molécula orgánica es una medida de su capacidad de disolverse en agua y depende del número de grupos polares que posee (OH, NH<sub>2</sub>, COOH).

El movimiento o desplazamiento de las moléculas de un fármaco por todo el organismo depende de su capacidad para atravesar las membranas que separan los diversos compartimientos tisulares.

### **2.1.1. ABSORCIÓN.**

Comúnmente los fármacos se introducen en un organismo en un sitio alejado a su lugar de acción, y salvo que la administración sea intravenosa debe entrar al sistema circulatorio. La velocidad de absorción depende del pH en el sitio de absorción y la vía de administración.

#### Efecto del pH:

Cuando hay una diferencia de pH considerable entre el sitio de absorción y la sangre, como sucede entre el estómago (pH 1) y la sangre (pH 7.4) la velocidad de absorción de los electrolitos débiles se alteran considerablemente. Los fármacos neutros y ácidos se absorben rápidamente en el estómago. El pH bajo del estómago impide la absorción importante de fármacos básicos, estos son mejor absorbidos en cavidad bucal (pH 6.0) e intestino (pH 5.0.)

#### Efecto de la vías de administración de fármacos

- 1.- Inyección por vía intravenosa: La cual tiene la ventaja de la rapidez y la absorción completa.
- 2.- Intramuscular, subcutánea e inhalado: En tales vías la absorción dependerá de la vascularización local del tejido.
- 3.- Vía sublingual: La membrana mucosa de la cavidad bucal tiene un epitelio delgado y está ricamente vascularizada. Esto permite una rápida absorción y los fármacos pueden administrarse por vía sublingual o vestibular, la ventaja de esta vía de entrada es que una vez absorbido el fármaco, entra a circulación general sin pasar por el hígado. Cuando se absorbe desde el estómago o los intestinos, el fármaco debe pasar por sistema hepático antes de alcanzar circulación general. El hígado es el sitio principal del metabolismo de los fármacos.
- 4.- Vía rectal: La función fisiológica del intestino es la de absorber los productos finales de la digestión de los alimentos, su extensión, alto riego sanguíneo, pH neutro, son factores que favorecen la absorción de fármacos.

### **2.1.2 DISTRIBUCIÓN.**

Al entrar un fármaco a circulación sanguínea se distribuye por todo el organismo, incluyendo en lugares no importantes para su acción farmacológica. El fármaco puede ligarse reversiblemente a sitios de acción, proteínas del plasma y con tejidos que no participan en su actividad farmacológica.

La facilidad de distribución de un fármaco en órgano depende del órgano y las características del fármaco, ciertos tejidos son menos permeables. Por ejemplo, las células endoteliales de los capilares cerebrales tienen uniones muy cerradas y de hecho forman una capa esencialmente continua siendo la base morfológica de la barrera hematoencefálica, la cual está separada de la circulación general y una barrera similar separa la circulación materna de la fetal.

Esta barrera impide o restringe la entrada o la salida de moléculas iónicas polares, por esta razón la mayor parte de los fármacos que tienen efecto en el sistema nervioso central, son compuestos lipófilos no polares.

### **2.1.3. EXCRECIÓN:**

La más importante vía de excreción de los fármacos es el riñón. La orina se forma a partir del plasma por procesos de filtración glomerular, absorción y secreción, que se llevan a cabo en la nefrona. La filtración es un proceso físico en el cual la sangre se fracciona con base en el tamaño molecular de sus componentes. La mayor parte de los fármacos tienen pesos moleculares menores de 500 uma y por ello filtran fácilmente a menos que estén unidos a proteínas plasmáticas. Cuando el fármaco es un electrolito débil su resorción depende del pH de la orina. Un fármaco básico será mayor en orina ácida, mientras que la excreción de un fármaco ácido aumentara en orina alcalina.

El pH de la orina puede variar de ácido a alcalino dependiendo de la dieta y de los fármacos que se administren. Por ejemplo cantidades elevadas de ácido ascórbico disminuyen el pH de la orina mientras que el bicarbonato lo aumenta. Esto se aprovecha por ejemplo para facilitar la desintoxicación con barbitúricos los cuales son ácidos débiles con un pKa de 7.0 al ingerir bicarbonato de sodio para alcalinizar la orina.

## 2.2. DEPENDENCIA Y ABUSO DE DROGAS.

En los últimos años en nuestro país se ha visto un incremento en el consumo de drogas así como una mayor accesibilidad a éstas.

El uso reiterado de ciertos fármacos puede dar lugar a:

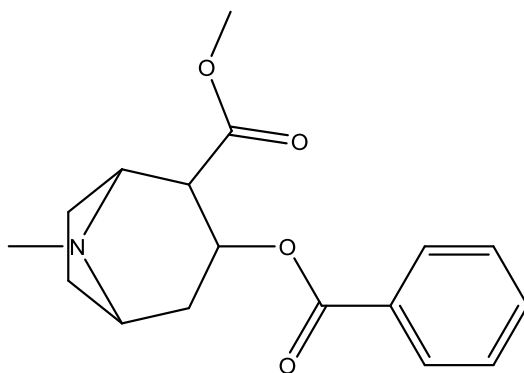
- La dependencia física, que surge cuando hay una adaptación farmacológica progresiva, lo que da origen a la tolerancia.
- En el estado de tolerancia, la repetición de la misma dosis de un fármaco produce un efecto menor. Al interrumpir súbitamente la dosis se produce un síndrome de abstinencia.
- La adicción, es el uso compulsivo y sin control de un fármaco, el poder adictivo de un fármaco depender de las propiedades del fármaco mismo, el individuo, el entorno y la vía de administración.

## 2.3. PRINCIPALES DROGAS DE ABUSO.

### 2.3.1 COCAÍNA.

Clorhidrato de Cocaína  $C_{17}H_{22}ClNO_4$ . Cristal granulado o polvo, sabor salado ligeramente amargo, adormece lengua y labios. Punto de fusión cercano a  $195^{\circ}C$ . Es soluble en agua, alcohol y cloroformo e insoluble en éter.

La cocaína habitualmente consumida es el clorhidrato de benzoilecgonina, que se comporta como una base débil (pka 8.6) lo que le permite fácil absorción a través de las mucosas.



Las primeras referencias sobre el uso de la hoja de coca masticada, con fines estimulantes se remontan a 2000 A.C. Los médicos Españoles utilizaron por primera vez las hojas de coca con fines terapéuticos en 1596. Fue sintetizada por primera vez en 1858 por Albert Newman.

La cocaína se considera como estupefaciente, según la Ley General de Salud. Título décimo segundo. Control Sanitario de productos y servicios de su Importación y Exportación. Capítulo V, Estupefacientes. Artículo 234.

Es un alcaloide que se obtiene de la hoja de coca, procedente de un arbusto, *Erythroxylum coca*, que se cultiva en América del sur o bien por síntesis a partir de ecgonina y sus derivados. Desde el punto de vista químico es una 2-metil-3-bencilecgonina, que presenta un grupo amino hidrofílico, conectado por un grupo intermediario a un residuo aromático lipofílico.

La acción farmacológica de la cocaína puede ser local y general. Aplicada localmente, paraliza las terminaciones periféricas de los nervios sensoriales y en grado menor, de los nervios motores, y estimula la capa muscular de los vasos sanguíneos. Como resultado, blanquea la región donde se aplica y disminuye la sensibilidad; en boca disminuye la sensación del sabor y en nariz del olor.

Es estimulante del sistema nervioso central, provoca exaltación de las facultades intelectuales, tiene un efecto estimulante sobre el cordón espinal, aumentando al principio los reflejos y produciendo luego convulsiones. Los efectos sobre los centros medulares se notan por un aumento en la frecuencia y profundidad de respiración. Después de la dosis tóxica la estimulación es seguida por depresión del centro de respiratorio. Eleva la presión sanguínea como resultado de la constricción arterial, hay estímulo vaso motor central y aumento en la frecuencia cardíaca.

Por vía pulmonar o intravenosa la cocaína se detecta de inmediato en plasma, alcanzando el pico máximo de concentración a los 5 minutos. Al ser liposoluble atraviesa la barrera hematoencefálica lo que le permite alcanzar rápidamente el Sistema Nervioso Central.

La semivida plasmática de cocaína es de 50 minutos pero los consumidores de forma inhalable, desean de manera característica más dosis después de 10 a 20 minutos. La cocaína aparece en orina por sólo pocas horas después de su consumo, su metabolito en orina es benzoilecgonina producido por degradación hidrolítica de la cocaína, su detección en orina es de 2 a 5 días después de la última dosis de cocaína, por lo que la detección de este metabolito es comúnmente usado para la determinación del abuso de cocaína.

## EXCRESIÓN:

La vía metabólica principal de la cocaína consiste en la hidrólisis de cada uno de sus grupos éster. La benzoilecgonina producida al perderse el grupo metilo, expresa el metabolito urinario principal y se presenta en orina hasta 5 días después de la última dosis de cocaína. Como consecuencia las pruebas de benzoilecgonina permiten identificar el consumo de cocaína; los grandes consumidores de cocaína presentan cantidades detectables del metabolito en la orina por 10 días. Cuando se ingiere cocaína y alcohol parte de la cocaína se transesterificará a cocaetileno.

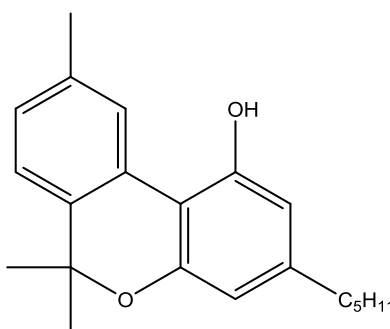
La adicción es la complicación más frecuente del consumo de cocaína. Algunos consumidores, en especial los que se la administran por vía intranasal, pueden proseguir con el uso intermitente por años. Otros se vuelven usuarios compulsivos a pesar de métodos complejos para conservar el control.

### 2.3.2 MARIHUANA.

$C_{12}H_{30}O_2$ . Peso molecular 312, punto de ebullición  $200^{\circ}C$ . Propiedades terapéuticas: antiemético.

Como derivados de cannabis se incluyen a los productos procedentes de la planta *Cannabis sativa*, variedad indica marihuana. Los principios activos se encuentran en las resinas de las plantas, siendo las sumidades florares femeninas de la planta las partes más ricas en ellas. La composición de las resinas comprende cannabinoles. El principio activo más importante es el 3,4 trans-1-THC (Tetra Hidro Cannabinol). La forma habitual de consumo es la fumada, también se puede consumir por vía oral.

El Tetrahidrocannabinol, es una sustancia lipofílica, insoluble en agua, se inactiva en medio ácido, por lo que al consumirse por vía oral queda reducida su acción farmacológica al 5 %. Se degrada por acción de la luz y el calor, presenta pKa de 10.6.



Cannabinol

Se clasifica como una sustancia psicotrópica, según la Ley general de salud. Título décimo segundo, Capítulo IV, Artículo 234. Sección I.- las que tienen valor terapéutico escaso o nulo y que, por ser susceptibles a uso indebido o abuso, constituyen un problema especialmente grave para la salud pública.

Los efectos farmacológicos varían con la dosis, la vía de administración, la experiencia del consumidor, su vulnerabilidad a los psicoactivos y el sitio en que se realiza el consumo. La intoxicación con marihuana origina cambios en el estado de ánimo, la percepción y la motivación. La duración del efecto varía según la dosis, pero el fumador clásico tiene un efecto de 2 horas. Durante ese tiempo se alteran las funciones cognitivas, la percepción, el tiempo de reacción, el aprendizaje y la memoria. La marihuana produce cambios conductuales complejos como ansiedad y mayor hambre, pánico, alucinaciones y psicosis aguda.

Se han descrito diversos usos medicinales de la marihuana. Entre ellos están sus efectos contra las náuseas, que se han aplicado al alivio de reacciones adversas a la quimioterapia, efecto relajantes musculares y anticonvulsivos. Estos beneficios se producen al costo de los efectos psicoactivos, por lo tanto no hay ventaja evidente de la marihuana sobre los tratamientos ordinarios. Una cápsula de  $\Delta$ -9-THC (Dronabinol) se ha aprobado para el tratamiento de anorexia asociada a pacientes con HIV.

Después de unas cuantas dosis puede presentarse tolerancia a la mayoría de los efectos de la marihuana, no es común observar síntomas de abstinencia.

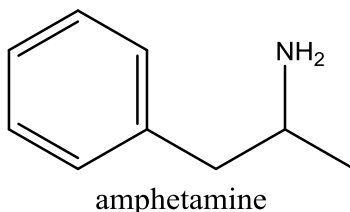
El abuso y adicción a la marihuana no tiene un tratamiento específico. Los consumidores habituales pueden presentar depresión concurrente, y por lo tanto, reaccionar al tratamiento antidepresivo.

El consumo habitual constituye 0.5 a 2.5 mg diarios de THC. Se metaboliza vía hepática. La vida media en los tejidos es de 7 días eliminándose por las heces en un 80% y por orina en un 20%, su eliminación es muy lenta detectándose metabolitos en orina hasta 30 días posteriores a su consumo.

### 2.3.3 ANFETAMINA.

## PROPIEDADES FÍSICAS:

$C_9H_{13}N$ , Peso Molecular 135.20, líquido móvil, olor a amina, sabor quemante, volatilidad lenta a temperatura ambiente, densidad 0.913, punto de ebullición  $200^{\circ}C$ . Ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol éter, fácilmente soluble en ácidos.



La dosis letal en adultos es de 1 gramo y 5 mg/kg de peso en niños. Estimulante del sistema nervioso central, anoréxico.

Se clasifica como sustancia psicotrópica, según la Ley General de Salud, Título décimo segunda, capítulo VI. Artículo; 245, sección II.- las que tienen algún valor terapéutico, pero constituyen un problema grave para la salud pública.

El principio activo de la anfetamina es obtenido por síntesis química.

La difusión del uso de estas sustancias tuvo lugar durante la segunda guerra mundial, en donde fueron utilizadas por los combatientes por sus propiedades estimulantes, la ausencia de restricciones en la década de 1960 provocó un aumento en su consumo.

Sus propiedades estimulantes fueron aprovechadas por los estudiantes y sus propiedades anoréxicas, para tratar obesidad, pasan de ser un consumo ocasional a un consumo habitual, en un 10% de los casos.

Actualmente, se han tomado políticas sanitarias que restringen las posibilidades de adquisición de estos medicamentos, como son requerir para su venta o suministro al público, receta médica que contenga el número de cedula profesional del médico que la expide, la que deberá surtirse por una sola vez y retenerse en la farmacia que la surte. Aunque persiste el mercado ilícito a partir de preparados en laboratorios clandestinos.

Las vías de administración son: oral y parenteral, presentan la característica de absorberse rápidamente, es metabolizada por oxidación en el hígado.

Tiene una actividad estimulante central, afectando el centro hipotalámico del sueño y afectando el regulador del hambre. Los efectos son: excitación, disminución del sueño, de la sensación de fatiga y del apetito. La anfetamina se ha usado como tratamiento contra obesidad, pero es cuestionable, ya que, la pérdida ponderable de obesos tratados

con anfetaminas se debe casi por completo a la disminución del alimento, y sólo una pequeña proporción al incremento del metabolismo.

Los efectos tóxicos agudos de la anfetamina, suelen ser extensiones de sus acciones terapéuticas, por lo general consecuencia de sobredosis. Los efectos en el SNC incluyen: inquietud, mareos, temblores, hiperactividad de reflejo, tensión irritabilidad, debilidad, insomnio, fiebre y euforia. Aparecen sobre todo en individuos con trastornos psíquicos, confusión, irritabilidad, delirio y alucinaciones. Tales efectos pueden ser desencadenados en cualquier persona al consumir altas dosis de anfetaminas o por periodos prolongados y suele surgir dependencia.

La tolerancia surge en forma invariable por el efecto anoréxico, a menudo se observa la necesidad de aumentar la dosis para mantener el ánimo en los pacientes psiquiátricos, esta tolerancia puede propiciar que se llegue a consumir hasta 1.7 gramos, sin efectos adversos lo que provoca una fuerte dependencia física.

La detección de anfetaminas en orina ha sido mayormente usada para evaluar su abuso. El uso prolongado puede provocar, daño permanente en el Sistema Nervioso Central. La anfetamina aparece en orina después de 3 horas de su administración, sin importar la vía, y está presente en la orina de 24 a 72 horas después de su última dosis.

#### 2.3.4 METANFETAMINAS:

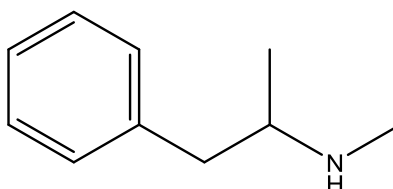
La metanfetamina guarda una relación química cercana con la anfetamina. En el cerebro libera dopamina.

Se produce de manera ilícita en laboratorios clandestinos a partir de efedrina.

#### ACCIÓN FARMACOLÓGICA:

La sobredosis de metanfetamina causa síntomas como; inquietud, confusión, ansiedad, alucinaciones, hipertensión, arritmia cardiaca, colapso circulatorio, convulsiones y coma. Los adictos crónicos pueden desarrollar psicosis paranoica.

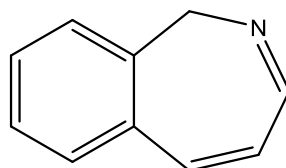
La metanfetamina es consumida por vía oral, nasal o intravenosa. Presenta sus efectos con una duración de 2 a 4 horas. Se excreta por vía renal, apareciendo en orina después de 3 horas de su consumo y se encuentra presente en orina hasta por 5 días después de su administración. El metabolito de la metanfetamina es la N-anfetamina.



methamphetamine

### 2.3.5 BENZODIAZEPINAS:

El término benzodiazepina, se refiere a la porción en la estructura química de estos medicamentos, compuesto por el anillo de benceno unido a otro anillo de siete miembros heterocíclicos llamado diazepina.

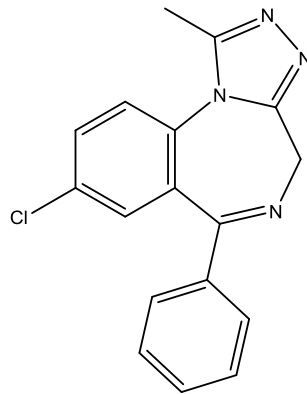


benzodiazepine

Se clasifican como sustancia psicotrópica, según la Ley General de Salud. Título décimo segundo. Capítulo VI, Artículo 234, Sección III.- Las que tienen valor terapéutico, pero constituyen un problema para la salud pública.

Las benzodiazepinas son medicamentos psicotrópicos que actúan sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y miorelajantes. Por ello se usan las benzodiazepinas en medicina para la terapia de la ansiedad, insomnio y otros estados afectivos, así como las epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos musculares. También se usan en ciertos procedimientos invasivos como la endoscopia o dentales cuando el paciente presenta ansiedad o para inducir sedación y anestesia. Los individuos que abusan de drogas estimulantes con frecuencia se administran benzodiazepinas para calmar su estado anímico. A menudo se usan benzodiazepinas para tratar los estados de pánico causados en las intoxicaciones por alucinógenos.

A pesar de que en el uso clínico las benzodiazepinas ejercen efectos cualitativos muy similares uno del otro, existen importantes diferencias cuantitativas en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, las cuales han sido la base de sus variados patrones de aplicación terapéutica. Las benzodiazepinas pueden causar tolerancia, dependencia y adicción. Aunque relativamente pocos pacientes que reciben benzodiazepinas por indicación médica abusan de ellas, hay individuos que buscan de modo específico estas sustancias por sus efectos psicoactivos, siendo las más solicitadas aquellas que tienen pronto inicio de acción como Alprazolam y diazepam. El uso no supervisado da lugar a la sobre dosificación llegando a ingerir hasta 1000 mg por día.



alprazolam

Las benzodiazepinas se pueden administrar por vía oral y algunas de ellas por vía intramuscular e intravenosa. La semivida de estos fármacos varía de 2 horas, como el midazolam y clorazepam o hasta 74 horas como el flurazepam. Basado en su semivida, las benzodiazepinas se dividen en cuatro grupos:

1. Compuestos de duración ultra-corta, con una semivida menor de 6 horas.
2. Compuestos de duración corta, tienen una semivida menor de 12 horas y tienen pocos efectos residuales al tomarse antes de acostarse en la noche, aunque su uso regular puede conducir a insomnio de rebote y ansiedad al despertar.
3. Compuestos intermedios, tienen una semivida entre 12 y 24 horas, pueden tener efectos residuales durante la primera mitad del día y el insomnio de rebote tiende a ser más frecuente al discontinuar su uso. Se presentan también síntomas de abstinencia durante el día con el uso prolongado de esta clase de benzodiazepinas.
4. Compuestos de acción larga, tienen una semivida mayor de 24 horas. Los fuertes efectos sedativos tienden a perdurar durante el día siguiente si se usan con el fin de tratar el insomnio.

Las benzodiazepinas pueden acumularse en el cuerpo. La semivida de eliminación varía grandemente entre un individuo y el otro, especialmente entre pacientes de la tercera edad. Los compuestos de acción corta tienen mejores resultados como hipnóticos, mientras que los de larga duración se prefieren por sus efectos ansiolíticos.

Las benzodiazepinas son agentes depresores del sistema nervioso más selectivos que otras drogas como los barbitúricos, actuando, en particular, sobre el sistema límbico.

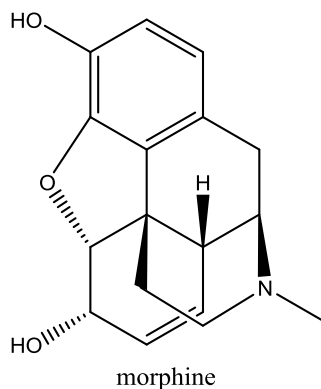
Las benzodiazepinas son potentes anticonvulsivos y tienen propiedades que salvan la vida durante el manejo de un estatus epiléptico. Las benzodiazepinas más frecuentemente usadas para controlar un estatus epiléptico son el diazepam y lorazepam.

### 2.3.6 OPIACEOS:

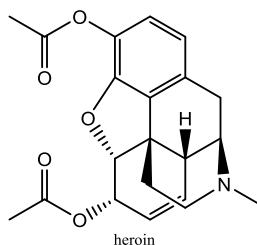
Los opiáceos son una serie de sustancias derivadas de la planta del opio. Es una de las drogas que se tienen referencias más antiguas mayormente en el área del mediterráneo.

El opio ha disminuido su preferencia como droga, dando paso a sus derivados: morfina y heroína.

La morfina apareció en el siglo XIX recibió su nombre debido a su capacidad de producir sueño del dios griego Morfeo. Tuvo gran éxito como medicamento por su capacidad analgésica, pero también se comprobó su gran adicción y se observó que con su uso de manera constante aparecían fenómenos de tolerancia, dependencia y síndrome de abstinencia en los individuos.



En busca de un medicamento que no tuviera los efectos de la morfina se llegó al descubrimiento de la heroína por Bayer. Pero resultó ser más tóxica y adictiva.



El opio puede ser administrado de diversas formas: Fumado, bebido como infusión, ingerido en forma de pasta. La morfina se administra de dos formas: oral y parenteral.

Todos los opiáceos tienen una gran acción analgésica y depresora del Sistema Nervioso Central, produciendo efectos inmediatos tras su consumo y efectos a largo plazo por consumo crónico.

El opio produce un aumento en la imaginación y el estímulo de hablar, continua con una depresión a nivel central donde la respiración se hace más lenta y hay confusión mental.

Su administración de forma crónica provoca cuadro de: anorexia, estreñimiento, hipotensión, sensación constante de frío y aislamiento social.

La morfina, ha sido relegada a uso clínico, produciendo un potente efecto analgésico, presenta efectos secundarios como son: náuseas, vómito, estreñimiento y alteraciones del estado de ánimo.

La heroína, tras una ligera sensación desagradable al inicio, el consumidor refiere un intenso placer, seguido de sedación y alivio de cualquier dolor, posteriormente se acompaña de los efectos secundarios como son: Pérdida de peso, estreñimiento, amenorrea, infección de piel, lesiones hepáticas y alteraciones cardíacas, respiratorias, psiquiátricas.

Algunos de los mecanismos del SNC que bloquean el dolor causan también cambios en el estado de bienestar y euforia. Por tanto los opiáceos son consumidos fuera del ámbito médico para lograr efectos agradables. La inyección de una solución de heroína da lugar de inmediato a diversas sensaciones, que se describen como dolor, sabor o un placer profundo e intenso.

La heroína es liposoluble, cruza la barrera hematoencefálica y se desacetila en los metabolitos activos 6-monoacetilmorfina y morfina. Después de la euforia intensa que dura 45 segundos a varios minutos sobreviene un periodo de sedación y tranquilidad que dura hasta 1 hora, los efectos se disipan en 3 a 5 horas, según la dosis. Los adictos a opiáceos pueden inyectarse dos a 4 veces al día, con fluctuaciones de sentirse eufórico y enfermo a causa del inicio de abstinencia.

En la tabla no. 2 se muestra la estructura química y peso molecular de las principales drogas de abuso, mientras que en la tabla 3 se enuncian sus propiedades farmacológicas.

Tabla 2. Peso molecular y estructura química de las principales drogas de abuso

**FORMULA Y PESO MOLECULAR DE LAS PRINCIPALES DROGAS DE ABUSO**

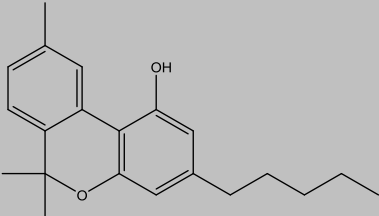
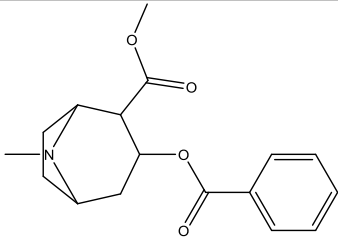
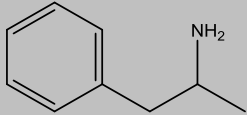
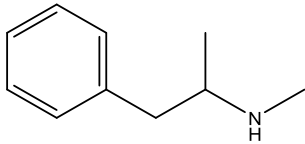
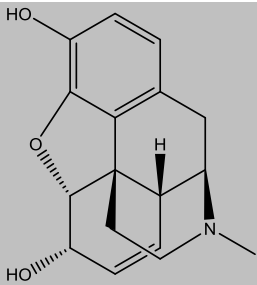
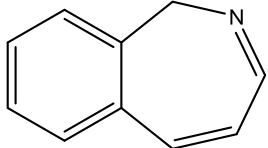
<b>Droga</b>	<b>Formula condensada</b>	<b>Formula química</b>	<b>Peso molecular gr/mol.</b>
<b>Marihuana</b>	$C_{21}H_{30}O_2$		314
<b>Cocaína</b>	$C_{17}H_{21}NO_4$		303
<b>Anfetamina</b>	$C_9H_{13}N$		135
<b>Metanfetamina</b>	$C_{10}H_{15}N$		149
<b>opiáceos</b>	$C_{17}H_{19}NO_3$		285
<b>benzodiazepinas</b>	$C_{11}H_{13}N$		159

Tabla no. 3 propiedades farmacológicas de las principales drogas de abuso.

<b>Droga</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Efecto farmacológico</b>	<b>Usos terapéuticos</b>	<b>Dosis terapéutica</b>	<b>Dosis letal.</b>
<b>Marihuana</b>	inhalación	Psicoactivo Alucinógeno	Anorexia analgésico	0.5 a 2.5 mg/día	-
<b>Cocaína</b>	Inhalación Absorción mucosa V.O. V.I.	Estimulante del SNC	-	-	0.5 -1 gr
<b>Anfetamina</b>	Inhalación V.O. V.I.	Estimulante del SNC	Obesidad Narcolepsia Déficit de atención	10-30 mg/8hras	1 gr
<b>Metanfetamina</b>	Inhalación V.O. V.I.	Estimulante del SNC	-	-	1 gr
<b>opiáceos</b>	Inhalación V.O. V.I.	Narcoléptico Analgésico	Terapia del dolor	15 mg/dia	350 mg
<b>Benzodiacepinas</b>	V.O. V.I. I.M.	Sedante Ansiolítico Hipnótica Anticonvulsivo	Ansiedad Insomnio Epilepsia	5-20 mg/día	>1 gr

## CAPITULO 3.

### 3.1. EXAMEN TOXICOLOGICO DE ESCRUTINIO EN MUESTRAS DE ORINA

Para la detección de las principales drogas de abuso se pueden utilizar diferentes muestras biológicas la más comúnmente usada es la orina, por su fácil obtención y volumen disponible.

Existen en el mercado diferentes ensayos para la determinación de las principales drogas de abuso, La velocidad y sensibilidad de estos inmunoensayos cromatográficos para la detección cualitativa de drogas de abuso ha hecho este método uno de los más aceptados mundialmente no obstante la confirmación debe hacerse mediante métodos instrumentales especializados.

#### Periodos de detección:

La tabla 4 muestra los periodos de detección de sustancias, en diferentes fluidos corporales. Los rangos dependen de la cantidad, la frecuencia de uso, el metabolismo del individuo, masa corporal, edad, salud del individuo y el pH en el caso de la orina.

**Tabla 4. PERIODO DE DETECCION DE DROGAS POR PRUEBAS DE ESCRUTINIO.**

<b>Sustancia</b>	<b>Orina</b>	<b>Sangre</b>
Anfetaminas	2 a 3 días	12 horas
Metanfetaminas	2 a 5 días	24 horas
Marihuana	28 a 49 días (1 a 3 días dosis única)	2 días
Cocaína	1 a 3 días	24 horas
Codeína	2 a 3 días	12 horas
Morfina	2 a 3 días	6 horas
Heroína	2 a 3 días	6 horas
Benzodiacepinas	2 a 3 horas	12 horas

Este es un Inmunoensayo basado en el principio de enlace competitivo. Las drogas que pudieran estar presentes en la muestra de orina compiten contra su respectiva droga conjugada para unirse a su anticuerpo específico. Durante el examen la muestra migra hacia arriba por acción capilar. Si una droga no está presente o por debajo de la concentración requerida en la prueba, no saturará el sitio de unión específico del anticuerpo. El anticuerpo entonces reaccionará con el conjugado droga-proteína y una línea coloreada aparecerá en el área de prueba "T" en la placa inmunoenzimática. La presencia de droga por encima del nivel preestablecido saturará todos los sitios de unión del anticuerpo por lo que no aparecerá la línea coloreada en el área de prueba "T" la línea coloreada no se formará en la región de prueba debido a que los metabolitos de la droga saturarán todos los sitios de unión de anticuerpos por la competencia de los analitos de la droga específica para cada prueba dando un resultado positivo. El control de calidad interno del procedimiento, es una línea coloreada que siempre debe aparecer en la región del control ("C") indicando que el volumen adecuado de la muestra ha sido agregado.



Figura no.1 Cartucho de prueba de inmunoenzimático para detección de drogas

Los límites de detección por Inmunoensayo enzimático se muestran en la tabla no 5.

**Tabla no. 5 LIMITES DE DETECCION DE DROGAS EN PRUEBAS DE ESCRUTINIO.**

<b>Metabolito</b>	<b>Límite de detección en ng/ml</b>
<b>THC</b>	50
<b>Cocaína</b>	300
<b>Metanfetamina</b>	1000
<b>Anfetamina</b>	1000
<b>Opiáceos</b>	2000
<b>Benzodiacepinas</b>	300

### **3.2 CROMATOGRAFIA.**

La cromatografía fue inventada por el botánico ruso Mijail Tsuet (1872-1919). Es un método para la separación analítica de componentes estrechamente ligados en mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia, es una técnica basada en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y cuantificar dicho componente.

Las técnicas cromatográficas son muy variables, pero tienen en común, una fase móvil que consiste en un fluido, que transporta a la muestra a través de una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido fijado a un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan en distintas formas en la fase estacionaria. Por lo tanto se transportan por la fase estacionaria a diferentes velocidades logrando con esto su separación.

Diferencias en el coeficiente de partición de los componentes de la mezcla dan como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por lo tanto una separación en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.

En la cromatografía los componentes que se desea separar deben ser solubles en la fase móvil. Deben ser también capaces de interactuar con la fase estacionaria, ya sea disolviéndose en ella, adsorbiéndose o reaccionando en forma química. Como consecuencia los componentes se distribuyen entre ambas fases.

La cromatografía puede clasificarse dependiendo del tipo de contacto en: cromatografía en columna o cromatografía en superficie plana, y dependiendo del tipo de fase móvil y estacionaria en: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

La efectividad de separación depende de la velocidad con la que eluyan las dos especies. La velocidad de elución está determinada por la constante de los equilibrios de las dos fases (móvil y estacionaria).

El tiempo de retención ( $t_R$ ), es el tiempo que transcurre a partir de inyección de la muestra hasta que el pico del soluto aparece en el extremo de una columna cromatográfica.

El tiempo para que una especie no retenida alcance el detector se le llama tiempo muerto ( $t_M$ ). La velocidad de retención de las especies no retenidas coincide con la velocidad media de las moléculas de la fase móvil.

El proceso por el cual el soluto es lavado por la columna añadiendo nuevo disolvente se llama elución.

Considerando que una columna cromatográfica, está compuesta por una serie de estrechas capas horizontales y contiguas separadas, denominadas platos teóricos. Se supone que en cada plato tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto y del disolvente, se consideran entonces como una serie de transferencias sucesivas de un plato al siguiente. La eficiencia de una columna cromatográfica mejora a medida que aumenta el número de equilibrio es decir a medida que aumenta el número de platos teóricos.

La forma típica Gaussiana de un cromatograma, se atribuye a los movimientos al azar de los miles de partículas de soluto en la banda o zona cromatográfica. En consecuencia el ancho de la zona está directamente relacionado con el tiempo de residencia de la columna e inversamente relacionado con la velocidad a la cual fluya la fase móvil.

El ensanchamiento de bandas en los picos cromatográficos se pueden controlar por las variables tales como: el flujo, el tamaño de partícula del material de empaque de la columna, las velocidades de difusión y el espesor de la fase estacionaria.

### **3.3. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA:**

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC), es la técnica de separación más ampliamente usada. Las

razones son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y termolábiles y sobre todo, la gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, para la ciencia y la sociedad. Algunos ejemplos de estos materiales incluye: aminoácidos, proteínas, drogas, carbohidratos, plaguicidas, esteroides, antibióticos, y cierta variedad de sustancias inorgánicas. Algunas variantes de importancia en cromatografías son:

1. Tamaño de partícula del relleno.
2. Ensanchamiento de banda extra columna.
3. Efecto del tamaño de la muestra.

1.- EL coeficiente de transferencia de masa, de la fase móvil es función inversa del diámetro de las partículas que contribuyen el relleno. Como consecuencia de ello, la eficiencia de una columna de HPLC debe mejorar al reducir el tamaño de partícula.

2.- En HPLC en ocasiones hay un ensanchamiento de banda significativo fuera de la columna, tiene lugar cuando se transporta el soluto a través de tubos, como los que se utilizan en los distintos componentes del sistema, el ensanchamiento proviene de las diferentes velocidades de flujo que hay entre las capas de líquido adyacente a las paredes del tubo y las del centro. Como consecuencia, la parte central de una banda de soluto se mueve con mayor rapidez que la periférica. En cromatografía de gases la difusión compensa la dispersión extra columna, sin embargo la difusión en los líquidos es significativamente menor y con frecuencia este tipo de ensanchamiento de banda se hace evidente.

Cuando se usan columnas de pequeño diámetro, el ensanchamiento extra columna puede hacerse bastante importante, en este caso todos los esfuerzos han de orientarse a la reducción del radio de los tubos del sistema externo a la columna.

3.- La cantidad de muestra ( $\mu\text{g}$  de muestra/gr de relleno) también afecta a la eficiencia de la columna, la eficiencia decrece con el aumento de la cantidad de muestra.

### **3.3.1. INSTRUMENTACION PARA COMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.**

Con el objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable, con relleno con tamaño de partícula de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , se requieren altas presiones por centímetro cuadrado, el equipo requerido para HPLC tiende a ser más sofisticado. La figura no.2 representa el esquema de los componentes de un HPLC. Y la figura no. 3 muestra la fotografía del equipo HPLC prominence de shimatzu.

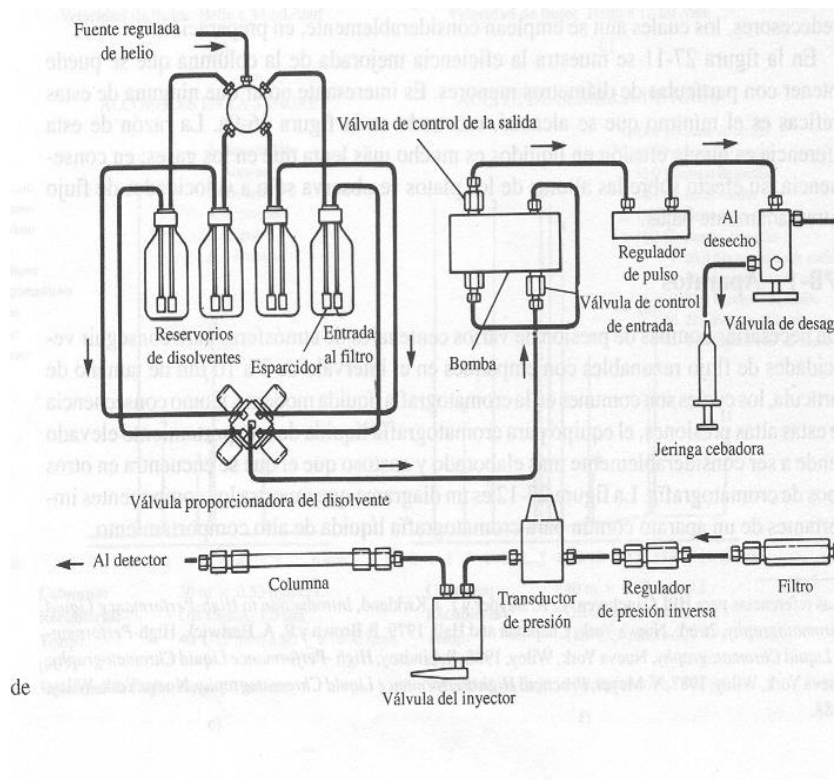


Figura no. 2 Esquema de un equipo HPLC



Figura no. 3 Equipo HPLC Prominence de Shimadzu.

### 3.3.1.1 Recipiente para la fase móvil y sistema para el tratamiento de solventes.

Un equipo de HPLC cuenta con recipientes de vidrio cada uno de los cuales con capacidad de 500 ml. Los recipientes se equipan para eliminar los gases disueltos por lo general oxígeno y nitrógeno, que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. Estos sistemas también cuentan con dispositivos para la filtración del polvo y partículas sólidas en suspensión.

Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se le llama elución isocrática. Con frecuencia. La eficiencia de una separación aumenta por la elución por gradientes. En este casos se utilizan dos y a veces más disolventes con polaridad distinta. Una vez que empieza la elución se varía la relación de los disolventes de forma programada. En la figura no. 4 se puede observar un sistema de contenedores de solventes.



Figura no. 4 Sistema de tratamiento de solventes.

### 3.3.1.2 Sistema de bombeo.

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC requieren: la generación de presión por encima de 400kg/cm cuadrado, un flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de 0.1 a 10 ml/min, el control y reproducibilidad del caudal de 0.5% relativo, y componentes resistentes a la corrosión. Las altas presiones que generan las bombas de HPLC no representan riesgo de explosión, debido a que los líquidos no son muy compresibles. De este modo la rotura de un componente del sistema solo supone pérdida del disolvente, la cual puede representar riesgo de incendio.



Figura no. 5 sistemas de bombeo HPLC.

### 3.3.1.3 Sistema de inyección de muestra.

A menudo el factor limitante en la precisión de las medidas en la cromatografía de líquidos es la reproductibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. Los volúmenes que se emplean deben ser muy pequeños (decimas de microlitro). Además en cromatografía de líquidos se debe introducir la muestra sin despresurizar el sistema. Usan dispositivos de bucles de muestra los cuales están integrados al equipo y permiten la elección del tamaño de la muestra que van desde 5 a 500 microlitros o micro muestras de 0.5 a 5 microlitros. En la figura no. 6 se observan las gradillas de muestreo del equipo HPLC.



Figura no. 6 Gradillas de muestreo del equipo HPLC.

### 3.3.1.4 Columnas para cromatografía de líquidos.

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 centímetros con un diámetro interno de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos son de 3,5 y 10 micras.

En la figura no. 7 podemos apreciar la fotografía de la columna usada en el proyecto con las siguientes características: 25 cm de longitud y 4.5 mm de diámetro interno, y empaque con partículas de 5  $\mu\text{m}$ . Estas columnas tienen de 40,000 a 60,000 platos/metro.



Figura no. 7 Columna utilizada para los ensayos por HPLC

### 3.3.1.5 Precolumnas.

En muchas ocasiones para aumentar la vida de la columna analítica se coloca delante una precolumna, que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Además en cromatografía líquidos-líquidos, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de esta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debe ser igual a la de la columna, sin embargo el tamaño de partícula de la precolumna es por lo general mayor para minimizar la caída de la presión.

En la figura no. 8 tenemos la fotografía de la precolumna usada en el desarrollo del proyecto.



Figura no. 8 Fotografía de la precolumna

### 3.3.1.6 Tipos de rellenos

En cromatografía de líquidos se han utilizado dos tipos básicos de rellenos, pelicular y de partículas porosas. El primero consiste en bolas de vidrio o de polímeros, no porosas y esféricas con diámetros característicos de 30 a 40  $\mu\text{m}$ . en la superficie de estas esferas se deposita una capa delgada y porosa de sílice, alúmina o de una resina de intercambio iónico. Para algunas aplicaciones se añade una recubierta adicional, constituida por la fase estacionaria líquida que se mantiene unida por adsorción. Las bolas también pueden tratarse para añadir una capa superficial orgánica. Por lo general los rellenos peliculares se usan en las pre columnas.

Los tipos de rellenos de partículas porosas de cromatografía de líquidos están formadas por micro partículas porosas con diámetros de entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ . y con la mejor dispersión posible para un tamaño determinado. Siendo las de sílice las más comunes.

En la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas, HPLC/MS, la muestra se separa primero mediante HPLC, y posteriormente se utiliza la espectrometría de masas para la detección.

### 3.4. ESPECTROMETRIA DE MASAS.

El trabajo de Sir Joseph Thomson (1856 – 1940) y Francis W. Aston (1877-1945) ambos premios nobel, Thomson por el descubrimiento del electrón y Aston por su trabajo en espectrometría de masas, fueron pioneros en el desarrollo de un espectrómetro de masas. Al mismo tiempo Arthur J. Dempster (1856-1950) en la universidad de Chicago, desarrollo un instrumento de sector magnético con dirección focal. El también desarrollo la primera fuente de ionización de electrones.

Manchester produjo en 1960 el MS-2 el primer espectrómetro de masas comercial, con limitada resolución y un máximo de detección de masa de 300u.

Se obtiene un espectro de masas convirtiendo los compuestos que integran una muestra en iones que se mueven rápidamente, por lo general de carga positiva y resolviéndolos en base a su relación de masa a carga. La utilidad de la espectrometría de masas proviene del hecho de que el proceso de ionización produce por lo general una familia de partículas positivas, cuya distribución según la masa es característica de la especie que le dio origen. En consecuencia, un espectro de masas proporciona información útil para elucidar estructuras químicas.

En muchos aspectos los datos de espectrometría de masas resultan más fáciles de interpretar que los espectros de infrarrojo o RMN, ya que proporcionan información relacionada con la masa molecular de los componentes estructurales de muestra. Además es posible obtener en la mayoría de los casos, una medida precisa del peso molecular del analito a partir de los datos de espectrometría de masas.

Los espectros de masa también pueden usarse para análisis cuantitativo de mezclas complejas. En este caso la magnitud de las corrientes iónicas a diferentes masas se relaciona con la concentración. El campo de la espectrometría de masas se desarrolla rápidamente por lo que se requiere de referencias del fabricante y literatura científica reciente para mantenerse actualizado.

La espectrometría de masas surgió de estudios realizados en 1900, relacionados con el comportamiento de iones positivos en campos magnéticos y electrostáticos. La primera aplicación analítica verdadera de la espectrometría de masas fue en 1940, cuando pudieron obtenerse en el mercado equipos prácticos. En 1960, fue reconocido como un poderoso y avanzado instrumento para este objetivo, tan importante como la espectroscopia infrarroja o la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

La Espectrometría de masas está relacionada con separación de la fase gaseosa de la ionización atómica y molecular de las especies de acuerdo a su masa molecular y carga (m/z).

Cuando un analito es ionizado un característico ion representa el átomo o molécula intacta y el grupo de iones de diferentes masas que representan fragmentos de la especie ionizada. Estos iones al ser separados para manipulación del campo magnético y electrónico a alta presión comúnmente  $10^{-5}$  Pa, y en la medida de su relativa abundancia versus su relación  $m/z$  de cada uno de los iones constituye una espectrometría de masas. La resolución de la masa es dependiente del instrumento disponible, idealmente menos de una unidad atómica.

Las ventajas de la Espectrometría de masas son, que puede darnos más información acerca de un analito utilizando menos muestra que otras técnicas.

La identificación de moléculas usando espectrometría de masas es más fácil que utilizando otras técnicas de espectrometría. Especialmente con el uso de bases de datos. Es también la técnica más segura para mediciones precisas.

Las desventajas de la espectrometría de masas, comparada con otras técnicas son, que la muestra es consumida durante el análisis y la inversión en equipo y personal capacitado que se requiere. Aunque con los equipos la tecnología disponible actualmente y el soporte de bases de datos hacen actualmente relativamente fácil la operación de equipos de espectrometría de masas.

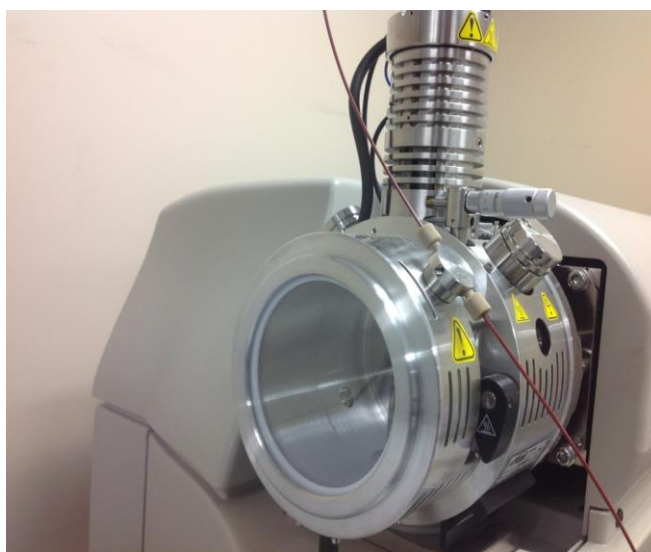


Figura no. 9 Fuente de ionización de equipo Prominence de Shimadzu.

#### **.4.1.2. Interfase de vacío:**

La interfase de vacío asegura la transición de los iones desde la fuente API al analizador de masas que se encuentra al vacío. La interface al vacío cuenta con una cortina de gas que protege de contaminación y mejora la productividad del espectrómetro de masas, soplando un flujo inverso al flujo de iones de nitrógeno, creando una cortina que impide

que los iones sean neutralizados. La figura no. 10 muestra el orificio de entrada de iones hacia la interface al vacío en la fuente de ionización.



Figura no. 10 Entrada hacia la interface al vacío en una fuente de ionización.

### 3.4.1.3. Analizador de masas:

Desde, la fuente iones, los iones son transferido al analizador de masas donde éstos son separados de acuerdo con sus valores de masa-carga ( $m/z$ ). El analizador de masas opera bajo condiciones de vacío para asegurar que los iones viajen con la máxima eficiencia.

El analizador de masas de tipo cuádruplo, utilizan cuatro electrodos en forma de barras paralelas en un arreglo en forma de cuadrado para generar los campos eléctricos que filtran iones en base a su relación masa-carga, mientras viajan a través de las barras. Solamente los iones de una masa seleccionada, alcanzaran el detector y originará un espectro de masas.

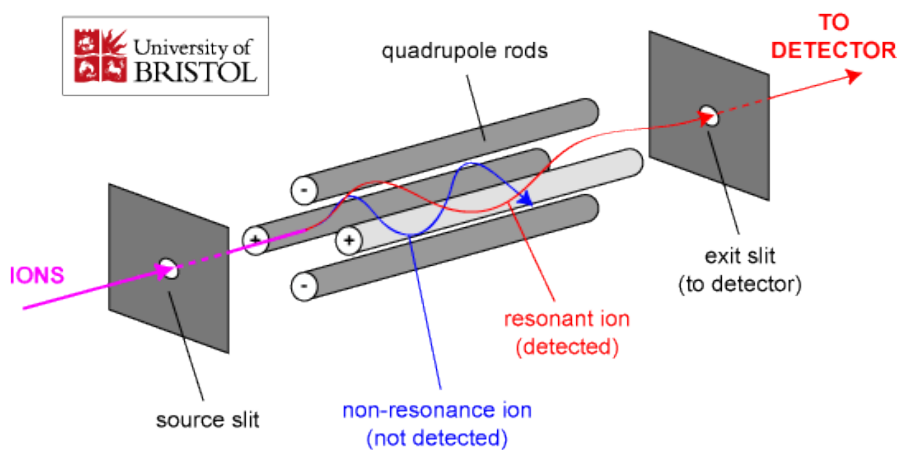


Figura no. 11 Sistemas cuádrupolo.

El sistema de trampa de iones utiliza un electrodo esférico para producir un campo eléctrico que captura los iones conforme van entrando. Los iones atrapados son procesados en un campo tridimensional que oscila desde el cual, pueden ser liberados selectivamente, con estos se incrementa considerablemente la capacidad de atrapar iones y aumenta dramáticamente la sensibilidad.

La espectrometría de masas LC/MS/MS en Tándem o de múltiples etapas (MS/MS), es una técnica en la cual el analizador de masas se utilizan en serie para obtener información estructural.

La figura no. 12 muestra la fotografía del espectrómetro de masas QTrap 3200 de AB Sciex.



Figura no.12 Espectrómetro de masas QTrap 3200

#### TIPOS DE ESCANEOS.

En la operación LC/MS/MS, es posible utilizar diferentes modos de escaneo para obtener información complementaria sobre la muestra.

Escaneo de los iones producto: Proporciona información estructural y de identificación de los fragmentos de iones.

Escaneo de los iones Precursor: Determina el origen de los iones producto en particular, creando en la celda de colisión y se utiliza frecuentemente para la identificación de metabolitos de medicamentos.

Escaneo de pérdida neutral constante: Indica cuales iones pierden una especie neutral igual a la diferencia de Q1 – Q3.

Escaneo de Monitoreo de reacciones múltiples (MRM): se utiliza principalmente para estudios de cuantificación, éste escaneo permite monitorear múltiples pares de iones precursor a producto y es la mejor forma de maximizar la producción señal/ruido de los compuestos.

#### 3.4.1.4. El detector:

El detector mide la abundancia de los electrones generados desde los iones par cada relación masa/carga. Utiliza un multiplicador de electrones en combinación con un amplificador de señal. El registro de todas las cargas detectadas durante el escaneo, constituye el espectro de masas. El detector es un contador de pulsos, este modo de detección asegura que el flujo de iones verdaderos sea colectado como datos crudos. En contraste, muchos otros son detectores análogos que requieren de eliminación de ruido ya sea mediante software o modo electrónico.

La figura no. 123 cromatograma obtenido por el detector, en donde en el eje de las “X” se muestra el tiempo de retención y en el eje de las “Y” las la intensidad relativa del ico cromatográfico en cuentas por segundo.

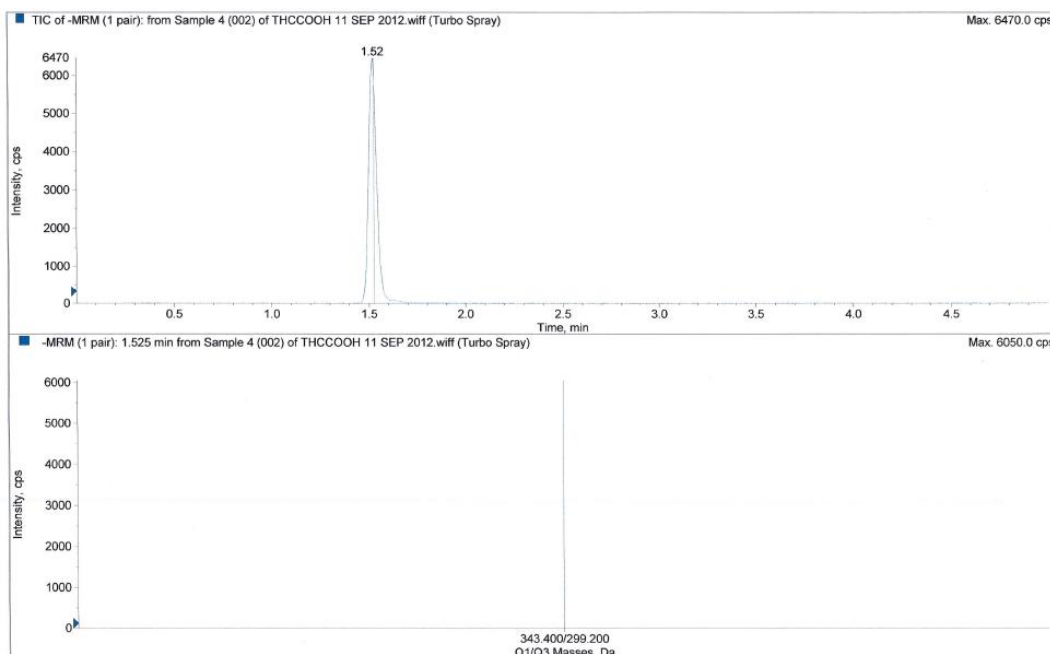


Figura no. 13 Imagen de un Cromatograma.

#### 3.4.1.5. Análisis de los datos:

El sistema de análisis de datos provee un solo punto de control para la instrumentación, adquisición de los datos, análisis, archivo y búsqueda de los espectros.

Automatiza la identificación de metabolitos, la adquisición y procesamiento de información relevante para perfiles de metabolitos. Herramienta primordial para regular la búsqueda de datos y trazabilidad.

#### INSTRUMENTO DE CUADRUPOLO.

Como su nombre lo describe el analizador de masas cuadrupolo, consiste en cuatro barras paralelas que fijan la corriente directa (DC) y alternativamente radio frecuencia (RF). El rango de masa detectable y la relación está dada por la longitud y diámetro de las barras. Mayor diámetro de las barras produce un incremento de sensibilidad, menor o mayor longitud en las barras incrementan el poder de resolución. En un corto plazo e ion es localizado y pasado a lo largo de en medio del espacio entre las barras. Su movilidad dependerá del campo eléctrico. Pero solo iones con valor de  $m/z$ , podrán estar en resonancia y así pasar por el detector. Todos otros valores de  $m/z$  sin resonancia golpearan las barras y no serán detectados.

El Cuadrupolo no requiere todos los electrones que entran al instrumento para tener la misma energía cinética por lo tanto la sensibilidad es inherente a la alta energía magnética en el instrumento.

La radio frecuencia puede variar dando al ion diferente  $m/z$  en el detector a diferentes tiempos. Usualmente para las más bajas y más altas  $m/z$  y así obtener un espectro de masas.

#### CONTROL DE FRAGMENTACIÓN:

El poder de un espectrómetro de masas incrementa dramáticamente por enlaces en series del analizador de masas, (multiestaciones de masas) en algunos espectrómetros de masas con analizador de cuadrupolo es enlazado en series, en triple cuadrupolo, por ejemplo, tres analizadores son usados, estos instrumentos producen generalmente iones pseudomoléculares por ionización.

El primer cuadrupolo (Q1) es donde se establece la aceleración del ion de determinada  $m/z$  hacia el segundo analizador (Q2) donde son fragmentados por alta energía de colisión con nitrógeno u otro gas de colisión. El ion seleccionado que paso a través de Q1 es llamado ion precursor o ion padre, el ion formado por la fragmentación del ion precursor es llamado ion producto o ion hijo. En tal caso la fragmentación realizada es muy reproducible. El tercer cuadrupolo (Q3) se usa para escanear al ion producto o permitir selectivamente el paso del ion producto hacia el detector.

La fragmentación puede variar dependiendo de la naturaleza del gas de colisión que se utilice (argón, helio, nitrógeno, o xenón), de la energía del ion emitida por Q1, de la temperatura y la presión.

En la figura no.14 muestra el proceso de fragmentación de moléculas Q1-Q3.

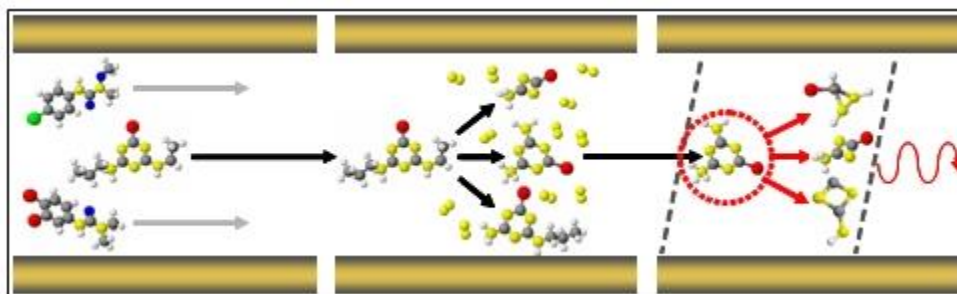


Figura no. 14 Fragmentación Q1-Q3.

### 3.5. VENTAJAS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS SOBRE CROMATOGRAFIA MASAS.

Durante mucho tiempo la combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC/MS) ha sido la técnica usada para la identificación y cuantificación de estos analitos en mezclas complejas. Debido a su utilidad se hacen grandes esfuerzos en la etapa de preparación de la muestra, ya que en la cromatografía de gases es necesario que los compuestos sean volátiles y que no se descompongan con la temperatura requerida para realizar el análisis.

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, es el siguiente paso en la combinación de las técnicas de cromatografía y espectrometría, ya que a diferencia de la cromatografía de gases, que no es aplicable a moléculas no volátiles o termo sensibles, la cromatografía de líquidos puede aplicarse a una amplia variedad de compuestos orgánicos, especialmente los metabolitos de drogas. De hecho la cromatografía de líquidos permite el análisis de cualquier especie molecular. Más aún, la cromatografía de gases se interfasa a analizadores de masa de cuadrupolo sencillo, mientras que la interface más común para cromatografía de líquidos es la espectrometría en Tándem o MS/MS. El uso de MS/MS añade una gran especificidad y selectividad al análisis de compuestos debido a la capacidad del sistema de aislar un analito específico eliminado de esta manera la posibilidad de que llegue al detector un ion de una interferencia. Esta capacidad aumenta aún más en el sistema híbrido cuadrupolo-trampa de iones con lo cual se pueden realizar experimentos MS/MS/MS. Lo que permite obtener resultados cualitativos y cuantitativos en una sola corrida.

El uso del equipo QTRAP 3200 LC/MS/MS, que ofrece el empleo de un triple cuadrupolo con trampa de iones, proporcionando la mejor sensibilidad en la detección de estos compuestos, requiere de una mínima preparación de la muestra y ningún tipo de derivatización con resultados en menor tiempo, lo que ofrece una solución que proporciona la más alta sensibilidad en el análisis toxicológico.

Debido a lo anterior el cambio de ensayo de GC/MS a LC/MS/MS permite superar varios límites de la primera técnica como son:

- La necesidad de que las muestras sean volátiles.
- La necesidad de derivatización para mejorar la volatilidad y la estabilidad térmica.
- La interferencia de otras especies químicas presentes en matrices complejas.

La técnica de HPLC/MS nos proporciona los siguientes beneficios:

- Permite realizar análisis con menos preparación de la muestra.
- Obteniendo resultados en menor tiempo.
- Constituye un método de detección directo para el análisis de todo tipo de sustancias incluyendo sustancias polares y termolábiles.
- Cuenta con una amplia selectividad conferida por el poder de fragmentación de moléculas.
- Tiene la capacidad de detección de moléculas con peso molecular de 50 hasta 1700 unidades de masa atómica.
- Con sensibilidad de medición en picogramos de la droga presente.

### 3.6. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE COMPUESTOS POR HPLC/MS.

Es importante tener en cuenta que la mayoría de las veces no se sabe qué tipo de compuesto químico está presente en una muestra. Sin embargo, se debe realizar los análisis correspondientes para llegar a una evidencia clara de la presencia de un compuesto.

Se deben establecer reglas básicas en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados para la validación de la confirmación de drogas.

La identificación de una molécula basada en su espectro de masas, se hace realizando en una misma corrida el análisis del compuesto de referencia correspondiente o estándar, un blanco y la muestra problema. Los cuales deben pasar a través del mismo procedimiento analítico e instrumental, posteriormente mediante la comparación de los datos llegar a una conclusión de resultados.

El orden de retención para la inyección en el análisis instrumental para la confirmación de drogas debe ser:

- a) Blanco de reactivo.
- b) Control negativo de orina
- c) Muestra problema
- d) Control negativo de orina
- e) Control positivo o estándar.

El tiempo de retención de la muestra debe coincidir con el del estándar con una tolerancia de más - menos 5 segundos. El tiempo de retención para una cromatografía de líquidos debe ser de entre 3 a 30 minutos.

Se requiere como mínimo dos iones diagnóstico en cada espectro de masas (ion padre y ion hijo).

La relación señal- ruido (S/N) del pico cromatográfico de los iones de diagnóstico debe ser superior de 3 a 1.

El espectro obtenido de la muestra problema debe coincidir visualmente con el espectro del estándar.

## CAPITULO 4

### 4.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

La metodología a seguir para la resolución del problema fue la siguiente:

- 1.- Se definió que drogas y metabolitos de drogas se deseaba confirmar.
- 2.- Se realizó la investigación bibliográfica sobre cada una de las drogas que se desea analizar:
  - Principales metabolitos de la droga de interés.
  - Peso molecular.
  - Propiedades físicas y químicas.
  - Principales transiciones Q1-Q3.
- 3.- Se analizaron mediante espectrometría de masas cada uno de los estándares de las diferentes metabolitos de drogas con la finalidad de obtener los parámetros óptimos para su identificación.
- 4.- Se analizaron mediante técnica de líquidos acoplado a espectrometría de masas con la finalidad de optimizar los parámetros lujo para cada uno de los estándares.
- 5.- se implementaron las técnicas mediante la creación de métodos analítico para la detección de drogas de abuso en el cromatografo de líquidos acoplado a espectrometría de masas.
- 6.-Se determinó la linealidad del método mediante la realización de una curva de calibración.
- 7.- Se delimitaron los límites de detección para cada uno de los metabolitos.

#### 4.1.1. MUESTRA REQUERIDA:

20 ml de orina, en un recipiente estéril, el cual se etiqueto con número de control y fecha para almacenamiento, siendo conservado en refrigeración a 6°C, hasta realizar examen de escrutinio de drogas. Las muestras que resultaron positivas al escrutinio de drogas se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su procesamiento.

#### 4.1.2. PROCEDIMIENTO PARA EXAMEN TOXICOLOGICO DE ESCRUTINIO EN MUESTRAS DE ORINA

Muestra requerida.

Muestra de orina depositada en recipiente hermético seco y estéril. Se puede usar orina de cualquier hora del día, pero es recomendable recolectar la primera orina de la mañana. Las muestras turbias de orina deben ser centrifugadas y filtradas para obtener una muestra clara para la prueba.

Material.

Guantes látex desechables

Cronometro

Reactivos.

Tarjetas inmunoenzimáticas multiparámetros Instant View.

Procedimiento.

Nota: La tarjetas inmunoenzimáticas y muestras de orina deben estar a temperatura ambiente (15 a 30 °C) para su procesamiento.

Todas las muestras deben ser consideradas peligrosas y deben ser manejadas como productos biológicamente infecciosos

Se utiliza una placa Inmunoenzimática, para cada una de las muestras de orina en estudio.

Se rotula la placa en los espacios correspondientes con el número de identificación, estos datos deben ser tomados directamente del recipiente que contiene la muestra en proceso de análisis.

Se procede a destapar la muestra y a retirar la cubierta protectora de las puntas absorbentes de la placa inmunoenzimática.

Posteriormente se sumerge la placa inmunoenzimática en la orina hasta la marca indicada en el extremo donde se encuentran las puntas absorbentes y se mantiene sumergida hasta que se observa un color rosa/púrpura migrar por la punta absorbente (aproximadamente 10 a 15 segundos).

Se retira la placa inmunoenzimática de la orina y se le coloca nuevamente la tapa en el extremo donde se encuentran las puntas absorbentes, colocar la placa sobre una superficie seca, plana y horizontal.

Se activa el cronometro y se observa el desarrollo de la prueba.

El resultado deberá observarse transcurridos cuatro minutos. No.15 se deben interpretar resultados después de siete minutos de realizada la prueba.



Figura no. 15 Prueba inmunoenzimáticas para detección de drogas.

#### Interpretación de Resultados.

**Negativo:** Las dos líneas de color aparecen en la zona de lectura de la placa inmunoenzimática. (Adyacentes, a la letra "C" y "T" por debajo del nombre de cada droga). La letra "C" muestra el área de control de calidad de la placa siempre debe marcarse una línea de color lo que indica que la prueba se desarrolló correctamente. La letra "T" corresponde al área del examen problema.

**Positivo:** Una línea de color aparece en la región del control "C". pero no aparece ninguna línea de color en la región "T", esto indica un resultado positivo y que la concentración de la droga está por encima de los valores detectables.

### 4.1.3. PROCEDIMIENTO PARA EXAMEN TOXICOLOGICO MEDIANTE HPLC/MS EN MUESTRAS DE ORINA

#### EQUIPO EMPLEADO:

- Cromatografo: Shimadzu Prominence
- Espectrómetro: AB SCIEX LC /MS/MS 3200 Q TRAP
- Generador de gases: Peak Científica
- Microcentrifuga: Eppendorf centrifuge 5417R
- Vortex-Geniez, Daigger
- Micropipetas : Eppendorf
- Baño ultrasónico, Branson 3510
- Balanza granataria, Ohaus.
- Refrigerador 2 a 8 °C.
- Congelador -20 a 0°C.

#### MATERIAL:

- Tubos para micro centrifuga graduados de 1,7 ml Eppendorf.
- Viales de cristal con tapa para cromatografía de 1.5 ml Shimadzu.
- Puntas para micro pipeta de: 10, 100, 200, 1000 µl.
- Guantes de nitrilo, libres de talco.
- Columna Allure propyl, Restek. 50 x 2.1 mm, 5.0 µm, 60Å.
- Precolumna Allure pfp propyl, Restek, 10 x 2.1 mm.

#### REACTIVOS:

- Acetonitrilo grado HPLC Fermont.
- Acido Fórmico 95% Fermont
- Agua grado HPLC Fermont.
- Formato de amonio Aldrich.
- Metanol grado HPLC Fermont.
- Cocaína solución estándar Lipomed.
- Benzoilecgonina solución estándar Lipomed.
- Ecgoninametilester solución estándar Lipomed.
- Anfetaminas solución estándar Lipomed.
- Metanfetamina solución estándar Lipomed.

- Oxazepam solución estándar Lipomed.
- Lorazepam solución estándar Lipomed.
- Alprazolam solución estándar Lipomed.
- Temazepam solución estándar Lipomed.
- Morfina 3 beta glucoronidasa solución estándar Lipomed.
- Diacetil morfina solución estándar Lipomed.

#### PREPARACION DE LAS FASES MOVILES:

- Preparación de Formato de Amonio 1M.  
Disolver 63 gramos de Formato de Amonio en 1 litro de agua grado HPLC.
- Preparación de la fase móvil A.  
2 ml de Formato de Amonio 1M.  
Adicionar 2 ml de Acido Fórmico.  
Aforar a 1000 ml con agua grado HPLC
- Preparación de la fase móvil B.  
2 ml de Formato de Amonio 1M.  
Adicionar 2 ml de Acido Fórmico.  
Aforar a 1000 ml con Acetonitrilo grado HPLC.
- Preparación del estándar:  
Partiendo de un estándar con una concentración de 1 mg por ml.  
Preparar un estándar de 1000ng por ml. (Pipetear 1  $\mu$ L disolver en 1000  $\mu$ L de metanol)  
Pipetear 150  $\mu$ L de la solución estándar preparada anteriormente.  
Disolver en 750  $\mu$ L de agua grado HPLC

#### **4.1.4. PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR PARAMETROS DEPENDIENTES DEL COMPUESTO EN EL ESPECTROMETRO DE MASAS.**

Se realiza para cada estándar realizando la inyección directa en el espectrómetro de masas.

- Crear un nuevo proyecto: En el menú principal seleccionar tools, Project, create Project.
- Seleccionar manual Tuning.

- Pulsar el icono scan type para seleccionar el tipo de escaneo que se desea realizar.

Escaneo Q1 Ms Q1: se utiliza para hacer un barrido de la muestra, blanco y fases móviles y conocer el contenido de estas.

- Este escaneo se hace con inyección de la muestra ajustando a 10 ul/min. Con un diámetro de 4.6 milímetros.
- Se selecciona el rango de masas que se desea analizar que va desde 0 a 1700 uma. Cada 3 segundos, por un periodo de 5 minutos.
- Verificar que inicie la jeringa de inyección, pulsar star.
- masa/carga que se va a analizar (presencia de aductos los más frecuentes Na y H<sub>2</sub>O).

En la figura no. 16 Se puede observar el escaneo Q1 Ms Q1 para el estándar de cocaína caracterizado por la presencia de la señal correspondiente a la relación m/z igual a 304.1 umas

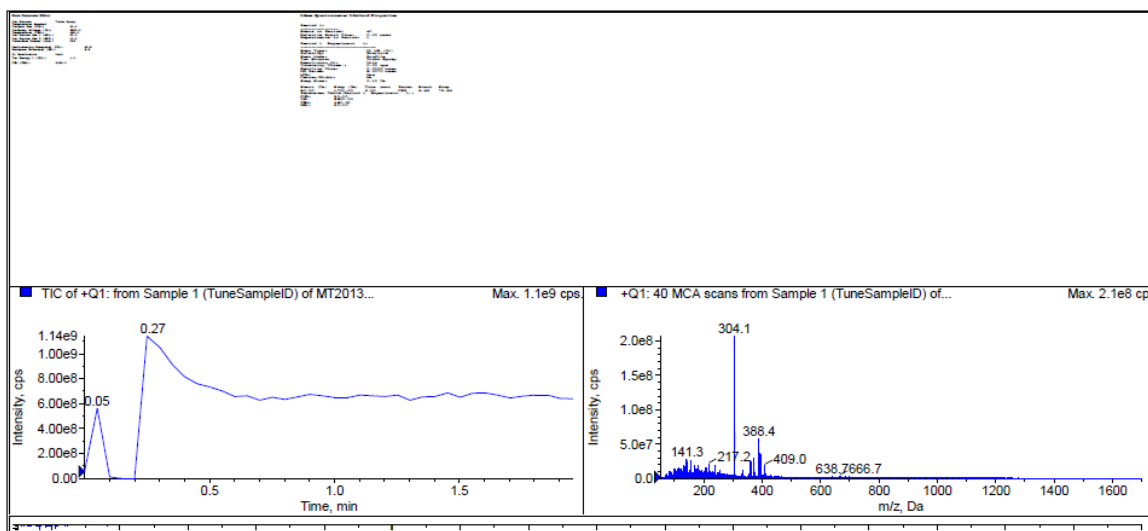


Figura no.16 escaneo Q1 Ms Q1 para Cocaína.

Escaneo Q1 Multiple Ion (Q1 MS): Se utiliza para optimizar los parámetros dependientes del analito, el equipo se ajusta para detectar solo las masas de interés.

- Escribir en Q1 la masa que se desea analizar, con un tiempo de 200 milisegundos
- Seleccionar polaridad negativa o positiva de acuerdo al analito.
- Presionar start.

- Optimizar los voltajes de energía de entrada y salida. Para lo cual es necesario realizar un rampeo automático de dichos valores, para que el equipo detecte los valores más adecuados para los distintos analitos.
- Pulsar edit ramp y seleccionar declustering potencial (DP) igual para entrante potencial. (EP)
- Anotar los valores obtenidos para cada parámetro en la tabla de compound.
- Volver a realizar el escaneo con los parámetros optimizados ajustando el tiempo a 5 minutos.
- Registrar las cuentas por segundo obtenidas durante el escaneo.

En la figura no. 17 se muestra el escaneo de un rampeo de DP para Cocaína, donde se obtuvo un valor de DP igual a 50.09.

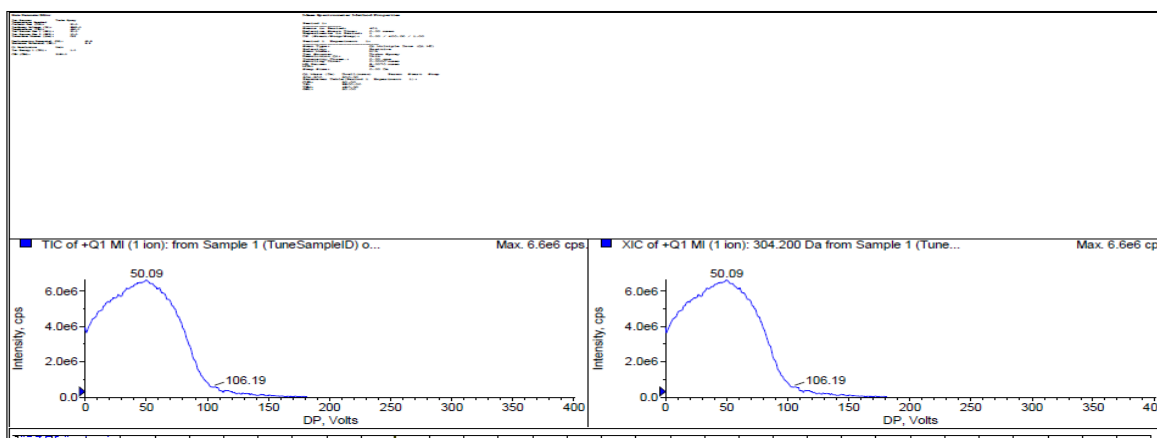


Figura no. 17 Rampeo de DP para Cocaína.

En la figura no. 18 se muestra el rampeo de EP para cocaína en donde se obtuvo un valor óptimo igual a 4.48

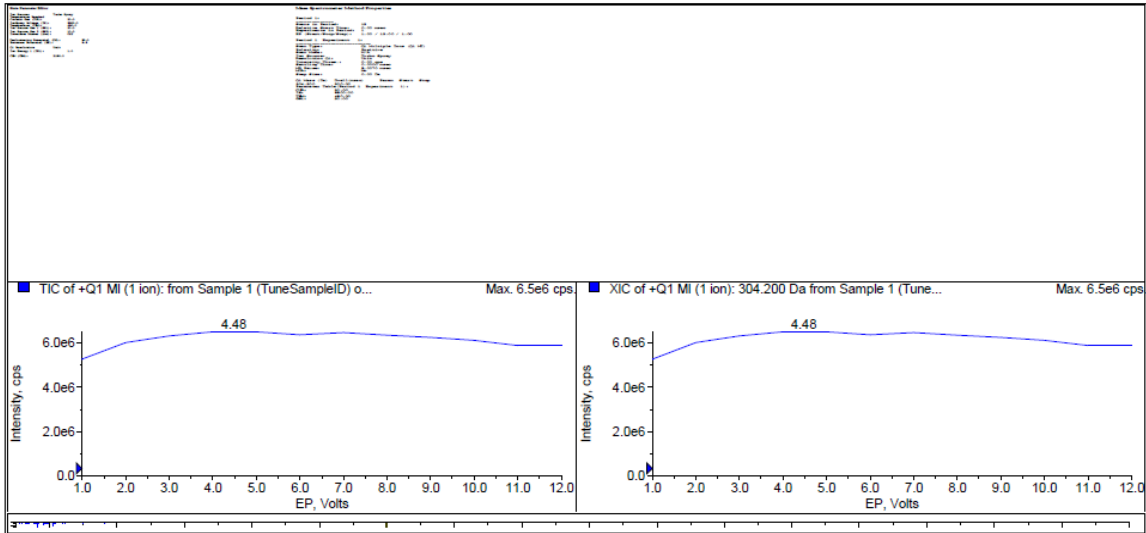


Figura 18 Rampeo de EP para cocaína

En la figura no.19 se muestra la intensidad en cps igual a  $6.06 \times 10^6$  del escaneo Q1 multiple ion obtenido para cocaína.

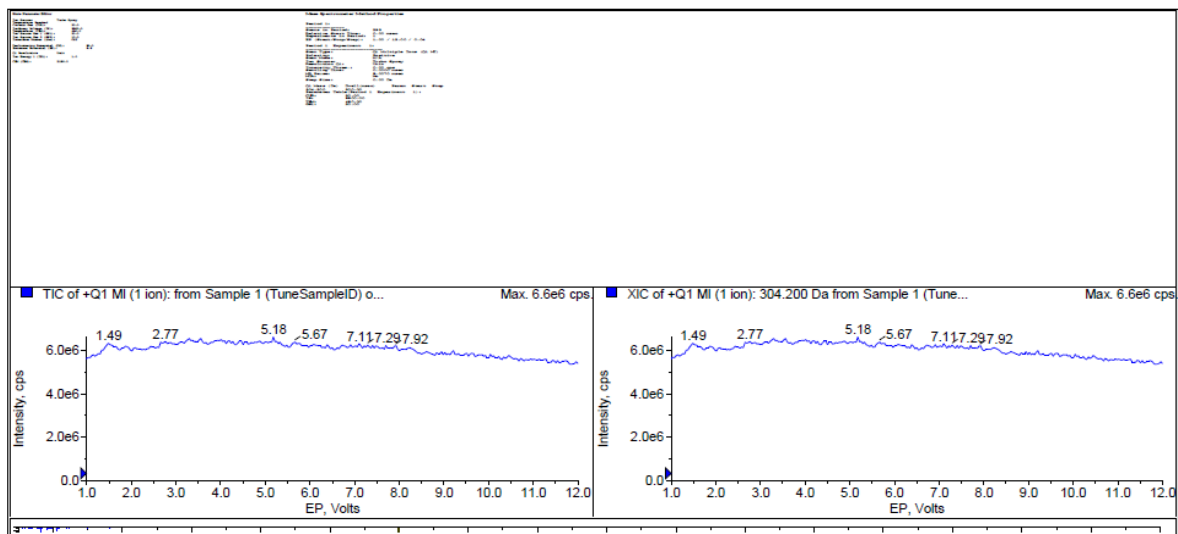


Figura no.19 Escaneo Q1 Multiple ion para cocaína.

Escaneo product ion (MS2): se utiliza para obtener el patrón de fragmentación del analito con el fin de obtener la familia o los iones producto. Para este escaneo es necesario utilizar diferentes energías de colisión.

- En scan type selecciones product ion.
- Llenar la tabla Q1 con un valor de 50 y una masa por arriba del analito que se va a fragmentar. Con un tiempo de 3 segundos. En product of escribir el valor de la masa del analito a fragmentar.
- Observar el patrón de fragmentación obtenido y seleccionar el ion producto que más convenga para el análisis. (debe ser la mitad de la masa del ion producto y estar en una abundancia del doble que este).

En la figura no. 20 se muestra el escaneo product ion (MS2) para cocaína en donde podemos observar las señales correspondientes a la fragmentación de la molécula de cocaína, la cual presenta la señal más abundante en 182.2 uma, el cual es considerado el ion producto.

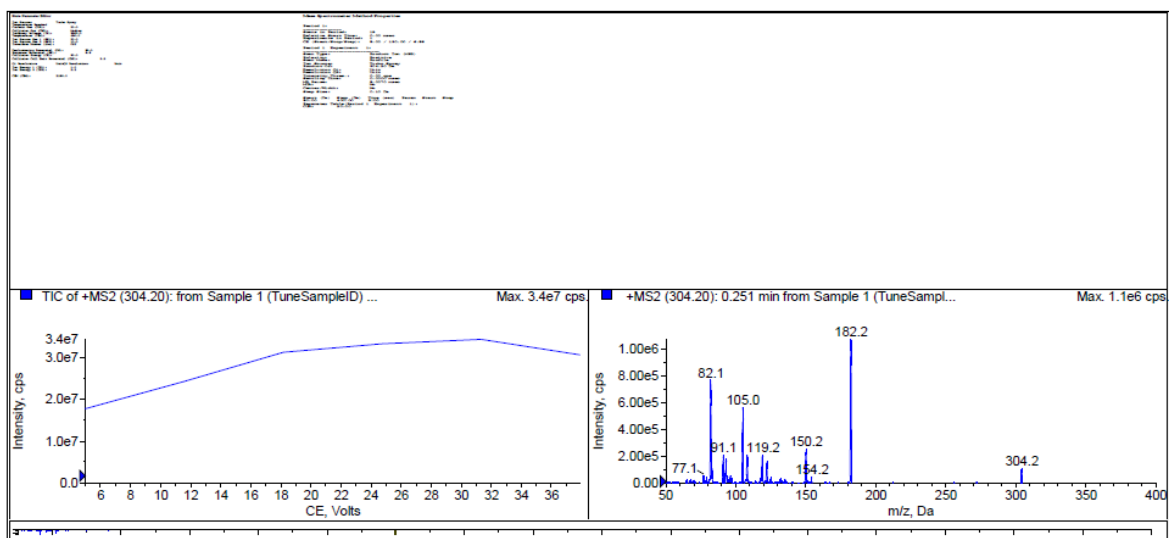


Figura no. 20 se muestra el escaneo product ion (MS2) para cocaína

Escaneo precursor ion: se utiliza para confirmar los iones precursores a partir de los cuales provienen los iones producto del escaneo anterior.

- En scan type seleccionar precursor ion.
- Llenar en Q1 con una masa mayor a la del ion producto del cual se quiere confirmar su presencia. Y en stop una masa de 1700 uma.
- Ajustar escaneo a 5 minutos y presionar star.
- Verificar que en el escaneo resultante se observa el ion precursor esperado.

En la figura no. 21 se muestra el escaneo precursor ion para cocaína en donde podemos observar la señal de 304.7 uma.

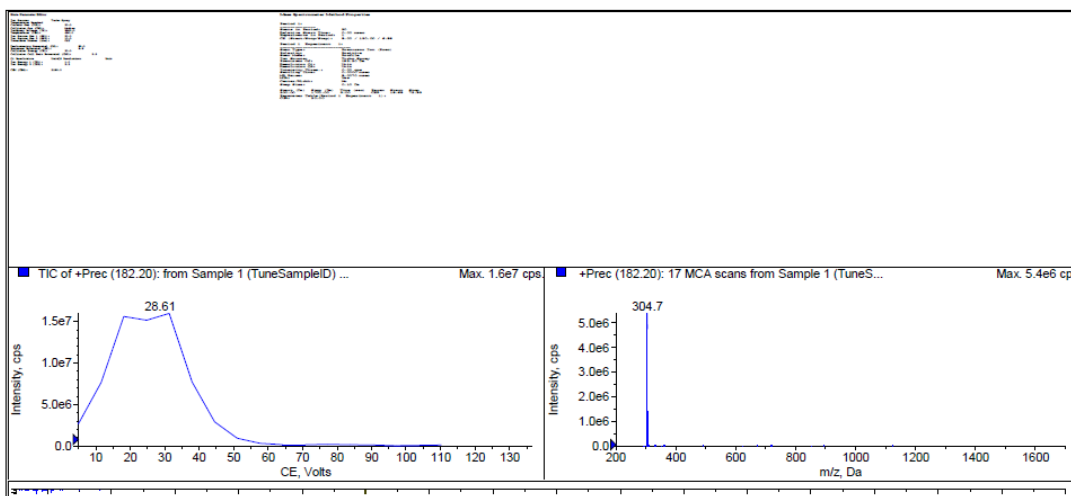


Figura no. 21 se muestra el escaneo precursor ion

Escaneo de pérdida neutra: se utiliza para detectar el fragmento no cargado de los iones precursores.

- En scan type seleccionar el escaneo neutral loss.
- Llenar en la tabla el valor de Q1 un valor mayor a la masa de la perdida neutra. Y stop en 1700.
- En loss off escribir la masa del fragmento no cargada del precursor. (Diferencia entre produc aion y precursor ion)
- Ajustar el tiempo a una duración de 5 minutos.
- Confirmar que en el escaneo resultante se encuentra el ion precursor esperado.

En la figura no. 22 se observa el escaneo perdida neutra en donde se encuentra una señal de 122 umas correspondiente a la fracción que se pierde en la fragmentación.

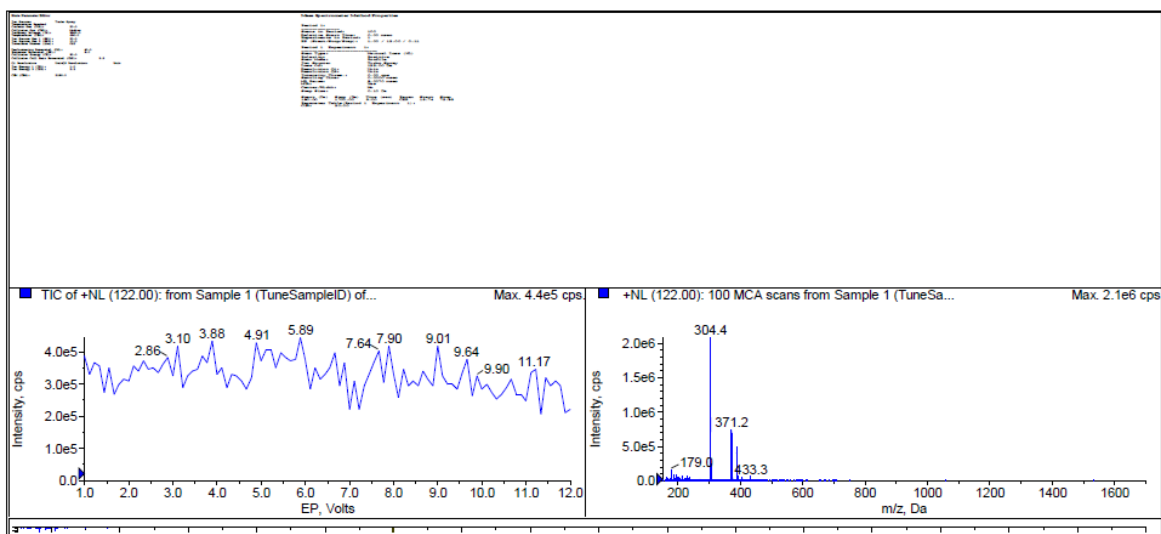


Figura no. 22 se observa el escaneo pardina neutra

Escaneo multiple reaction minitoring (MRM): es el escaneo más utilizado, se genera cuando se detecta un ion precursor en Q1 y un ion producto en Q3. Generando lo que se denomina una transición, la cual es única y específica para una molécula en particular.

- En scan type seleccione escaneo MRM.
- Llenar la tabla en Q1 con la relación masa/carga del ion precursor y en Q3 la masa del ion producto.
- Durante este escaneo se optimiza la energía de colision para la transición elegida, para lo cual es necesario realizar un rampeo.
- Presionar Edit Ramp y seleccione ollision energy, el tiempo se ajustara de manera automática. Anotar este valor en la tabla de coumpound.
- Una vez optimizados los valores de energía de colisión realizar el escaneo MSM ajustando el tiempo a 2 minutos.

En la figura no. 23 se muestra un escaneo MRM en donde se presenta la señal para la transición Q1-Q3 para cocaína

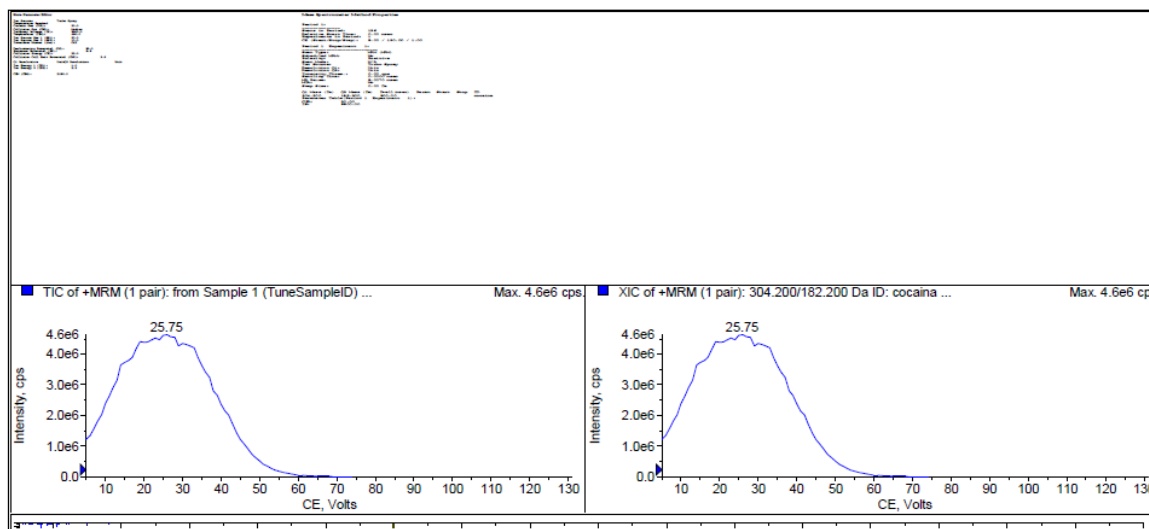


Figura no. 23: Escaneo multiple reaction monitoring (MRM) para Cocaína.

#### 4.1.5. PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR PARAMETROS DEPENDIENTES DE FLUJO EN EL CROMATOGRFO DE LIQUIDOS.

Es necesario llevar a cabo la optimización de los parámetros dependientes de flujo utilizando el sistema de espectrometría de masas acoplado al cromatografo de líquidos para lo cual se deben activar ambos sistemas.

- Se debe crear un método en donde se especifica el volumen que se hará pasar por el HPLC, esto depende de la columna que se está utilizando.
- Deben colocarse las fases móviles que se utilizaran en el análisis.
- Cuando ya se tiene el flujo pasando hacia el espectrómetro de masas abrir manual tuning y trabajar con los parámetros de la fuente de gas mientras se hace un escaneo Q1 MS.
- Variar y ajustar los parámetros en incrementos de 5 y de manera combinada hasta lograr que la señal sea estable.

Elaborar un método de adquisición para HPLC.

- Seleccionar el proyecto en donde se va a trabajar.
- Abrir el hardware profile que incluye el HPLC.
- Pulsar en Build Acquisition Method.
- Establecer las condiciones par a las bombas del HPLC

- Establecer el flujo y tiempo de corrida.
- Establecer las condiciones del inyector con las condiciones de lavado respectivas.
- Establecer las condiciones para el horno de la columna.
- Guardar el método.

#### **4.1.6. PROCEDIMIENTO PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS POR HPLC/MS.**

Preparación de la muestra de orina:

- 200 µL de Acetonitrilo.
- Agregar 100 µL de muestra de orina.
- Mezclar por 5 minutos con vortex.
- Centrifugar por 10 minutos a 12,000 rpm.
- Remover el sobrenadante.
- Diluir con 700 µL de agua grado HPLC.

Elaborar una lista de inyección de muestras:

- Con el método de adquisición creado, se deben enviar a equilibrar los equipos 15 minutos antes.
- En submenú acquire, seleccione Build Acquisition batch.
- En la pestaña sample set, nombrar el set de muestras.
- Presione el botón adit set
- Adit simple, seleccione el número de muestras.
- En la table, se nombran cada una de las muestras.
- Para inicial la inyección de las muestras presione submit y star.

## CAPITULO 5.

### RESULTADOS.

#### 5.1. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACION DE CONDICIONES DEL ESPECTROMETRO DE MASAS.

##### 5.1.1. OPTIMIZACION DE PARAMETROS DEPENDIENTES DE FLUJO.

Tabla no. 6 muestra los valores óptimos para los analitos con respecto a gas cortina, gas de colisión, voltaje de ionización, temperatura del horno, gas de la fuente de ionización1, y 2.

##### OPTOMIZACION DE PARAMETROS DE FLUJO

Analito	Gas cortina	Gas de colisión	Voltaje de ionización	Temperatura del horno	Gas de ionización 1	Gas de ionización 2
<b>Cocaína</b>	40	Medio	5500	500	40	40
<b>Metanfetaminas</b>	40	Medio	4000	450	20	20
<b>Anfetaminas</b>	40	Medio	5500	450	20	20
<b>THC</b>	40	Medio	5500	500	40	40
<b>THCCOOH</b>	40	Medio	5500	400	20	20
<b>Diacetilmorfina</b>	50	Medio	5500	450	61	62
<b>Morfina glucoronide</b>	50	Medio	5500	450	20	20
<b>Alprazolam</b>	50	Medio	5500	450	30	30
<b>Lorazepam</b>	40	Medio	5500	450	20	20
<b>Oxazepam</b>	40	Medio	4000	450	20	20
<b>Temazepam</b>	40	Medio	5500	450	20	30

Tabla no. 6 optimización de parámetros de flujo.

### 5.1.2. OPTIMIZACION DE PARAMETROS DEPENDIENTES DEL COMPUESTO.

Tabla no. 7 Valores óptimos para los analitos con respecto a; energía de salida, energía de entrada, energía de colisión, energía de colisión de salida.

Tabla 7. OPTOMIZACION DE PARAMETROS DE COMPUESTOS

<b>Analito</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
<b>Cocaína</b>	42	5.0	25	3.0
<b>Metanfetaminas</b>	34	4.0	27	3.0
<b>Anfetaminas</b>	22	6.0	24	3.4
<b>THC</b>	43	4.2	28	3.3
<b>THCCOOH</b>	-58	-8.0	-32	-3.0
<b>Diacetilmorfina</b>	60	10	70	3.3
<b>Morfina glucoronide</b>	75	5.0	40	4.5
<b>Alprazolam</b>	63	6.0	28	4.5
<b>Lorazepam</b>	47	3.2	24	4.3
<b>Oxazepam</b>	40	4.0	30	4.0
<b>Temazepam</b>	40	6.0	7	4.0

Tabla no. 7 optimización de parámetros del compuesto.

## 5.2. RESULTADOS DE LOS ESPECTROS DE PRIMER ORDEN:

En la tabla no. 8 se presentan los resultados de los espectros de primer orden obtenidos para cada analito, tanto en modo positivo, como en modo negativo de ionización. Así como los pesos moleculares y la relación m/z encontrados para cada uno de ellos.

### ESPECTROS DE PRIMER ORDEN

Estándar	Formula condensada	Peso molecular (gr/mol)	Ion padre (m/z)	Modo de Ionización
Cocaína	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303	304.200	Positivo
Ecgonina metil ester	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	186	200.200	Positivo
Benzoilecgonina	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	289	290.100	Positivo
THC	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314	315.300	Positivo
THC COOH	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	344	343.400	Negativo
Metanfetamina	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N	149	150.700	Positivo
Anfetamina	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N	135	136.300	Positivo
3,6 Diacetil Morfina	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	369	370.165	Positivo
Morfina 3 β glucoronide	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>9</sub>	461	462.200	Positivo
Alprazolam	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	308	309.000	Positivo
Lorazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	320	320.900	Positivo
Oxazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	286	287.400	Positivo
Temazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	309	301.100	Positivo

Tabla no. 8 Pesos moleculares y relación m/z obtenida en los espectros de primer orden.

Se observa aquí que los analitos estudiados en modo de ionización positivo, presentan la ganancia de una unidad de masa de protón respecto de su peso molecular, mientras que el THCCOOH estudiado en modo de ionización negativo observo una pérdida de un protón con respecto a su peso molecular.

## RESULTADOS DE LOS ESPECTROS DE PRIMER ORDEN:

En la tabla no. 9 se presentan los resultados de los espectros de primer orden obtenidos (ion precursor, ion producto y perdida neutra) para cada analito.

Tabla 9. ESPECTROS DE PRIMER ORDEN Y PÉRDIDA NEUTRA

Estándar	Peso molecular (gr/mol)	Ion padre (m/z)	Ion hijo (m/z)	Perdida neutra
<b>Cocaína</b>	303	304.2	182.2	122
<b>Ecgonina metil ester</b>	186	200.2	182.1	18.1
<b>Benzoilecgonina</b>	289	290.1	168.2	121.9
<b>THC</b>	314	315.3	193.1	122.2
<b>THC COOH</b>	344	343.4	299.2	44.2
<b>Metanfetamina</b>	149	150.7	91.2	59.5
<b>Anfetamina</b>	135	136.3	91.3	45.0
<b>3,6 Diacetil Morfina</b>	369	370.1	286.2	83.9
<b>Morfina 3 β glucoronide</b>	461	462.2	165.0	297.2
<b>Alprazolam</b>	308	309.0	280.9	28.1
<b>Lorazepam</b>	320	320.9	275.0	45.9
<b>Oxazepam</b>	286	287.4	241.1	46.3
<b>Temazepam</b>	309	301.1	255.1	46.0

Tabla No.9 relación m/z de los espectros de primer orden (transición Q1-Q3) y perdida neutra.

## 5.3 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA DETECCIÓN DE DROGAS DE ABUSO POR HPLC/MS.

### 5.3.1 Determinación de Linealidad y Sensibilidad.

Se realizan las curvas de calibración por triplicado, a concentraciones de: 1 a 1000 ng/ml , para cada uno de los analitos con el propósito de evaluar el comportamiento lineal de éstas.

Los resultados Obtenidos en cuentas por segundo a las diferentes concentraciones del estándar de marihuana se muestran en la tabla no.10. Así como también la figura no. 23 muestra la gráfica obtenida, donde se aprecia un comportamiento lineal sin cambios significativos en la pendiente en un rango de 1 a 1000 ng/ml.

**Tabla 10. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA MARIHUANA.**

St de THC (ng/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	60	63	60
50	2,166	2,136	1,946
100	4,136	4,266	4,216
200	8,093	8,616	7,710
300	13,000	13,000	13,000
400	17,000	16,643	16,000
500	20,000	20,553	20,000
600	24,000	25,000	25,000
700	29,000	28,000	27,430
800	32,000	32,000	33,000
900	39,000	35,483	36,446
1000	41,000	39,066	41,000

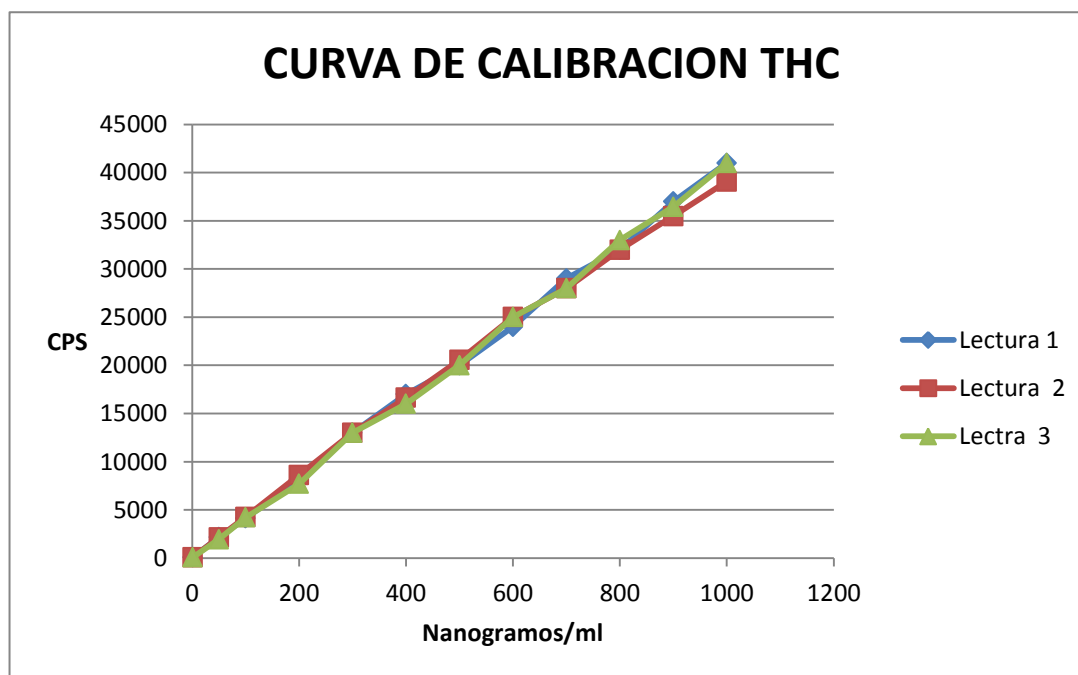


Figura no. 24 curva de calibración para THC.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas a diferentes concentraciones para marihuana.

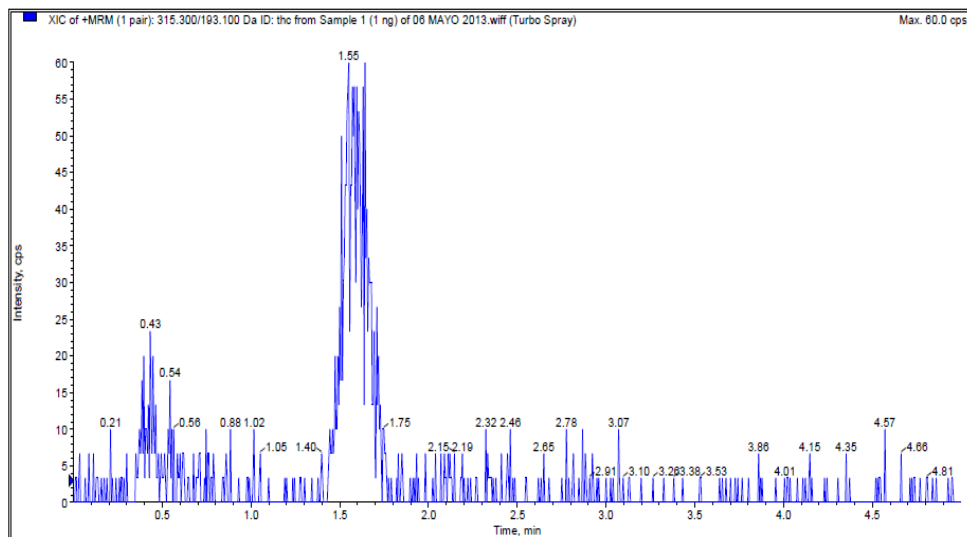


Figura no.25 cromatograma de THC a concentración de 1 ng/

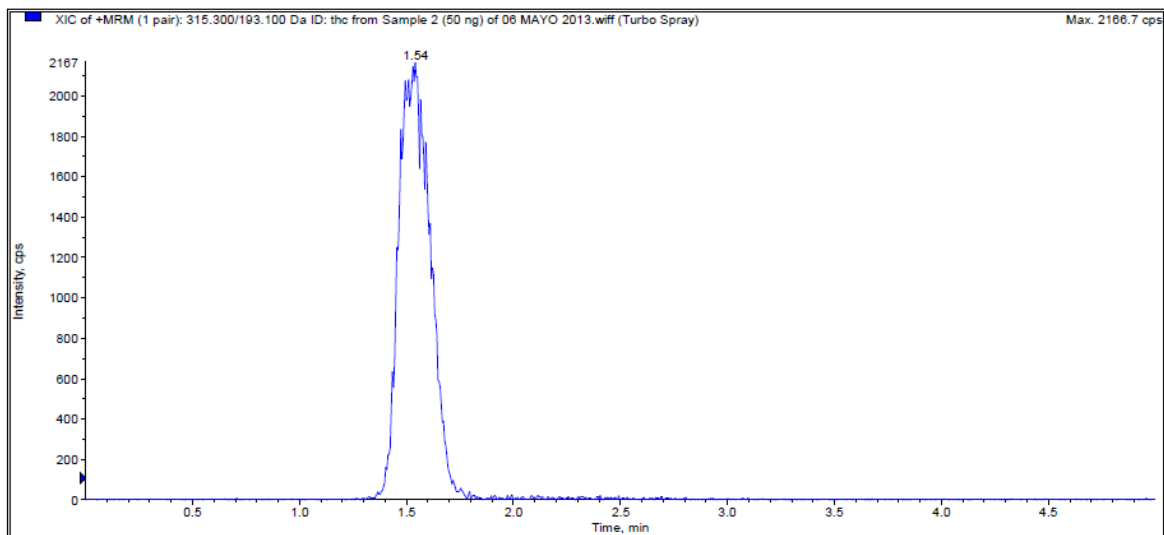


Figura no. 26 cromatograma de THC a concentración de 50 ng/ml

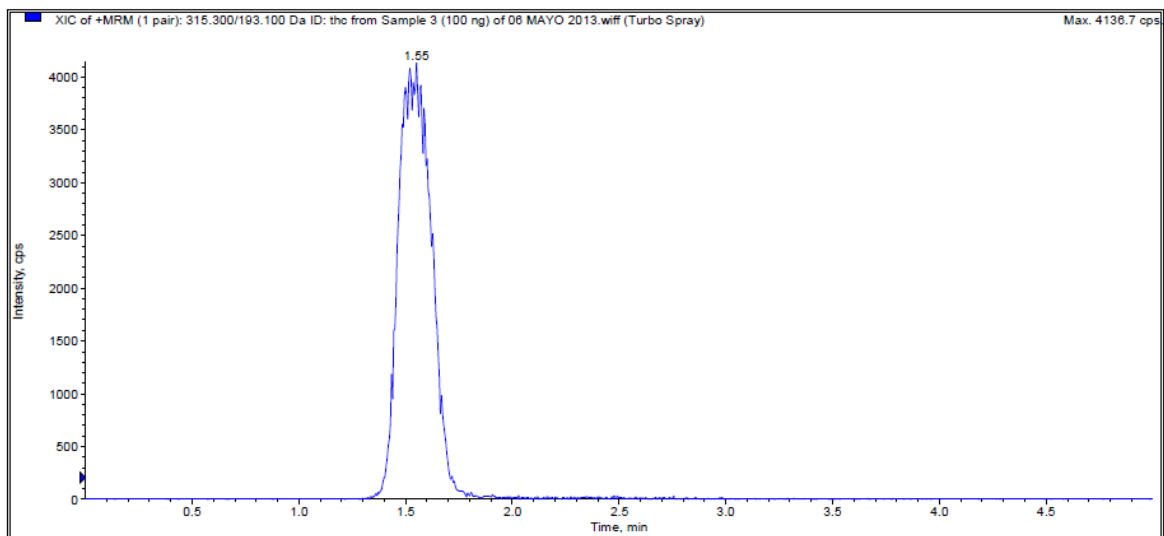


Figura no. 27 cromatograma de THC a concentración de 100 ng/ml

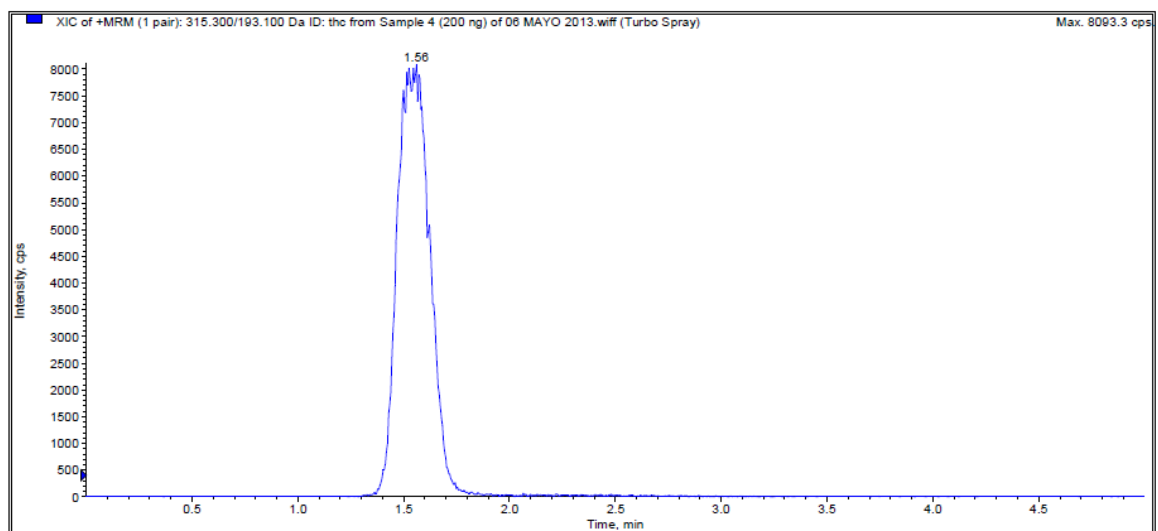


Figura no. 28 cromatograma de THC a concentración de 200 ng/ml

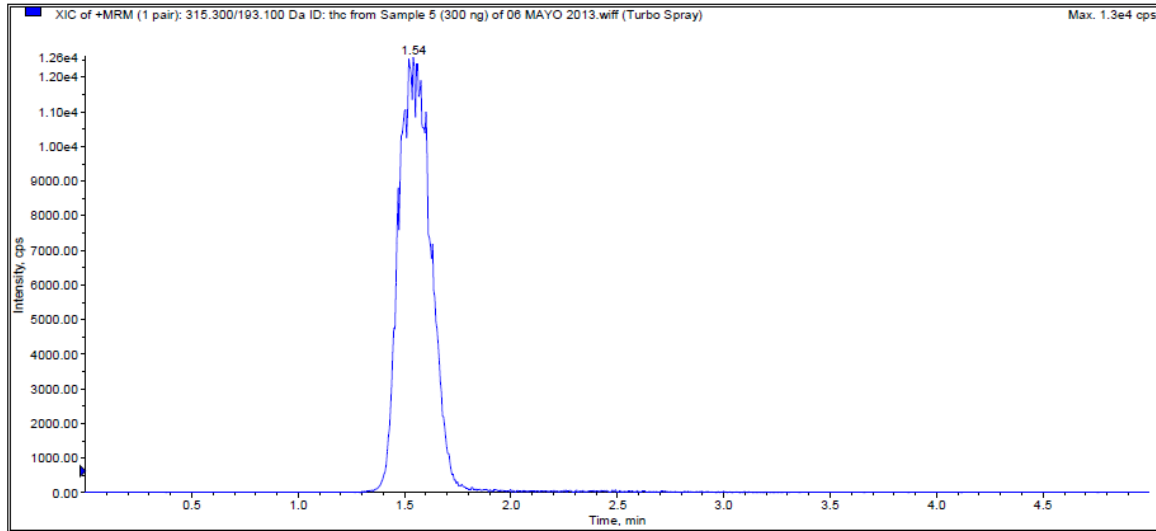


Figura no.29 cromatograma de THC a concentración de 300 ng/ml

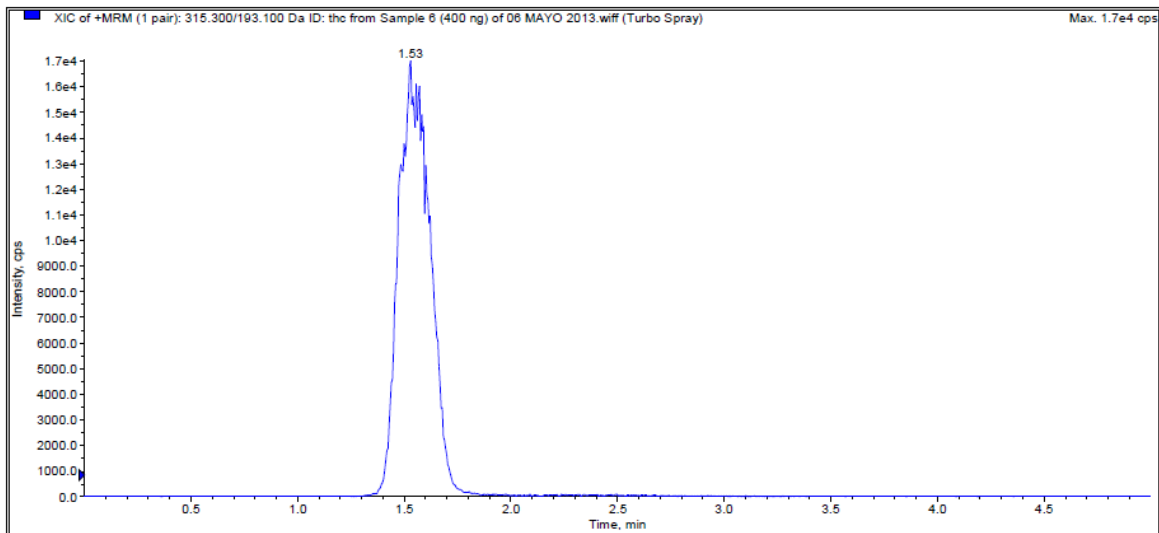


Figura no.30 cromatograma de THC a concentración de 400 ng/ml

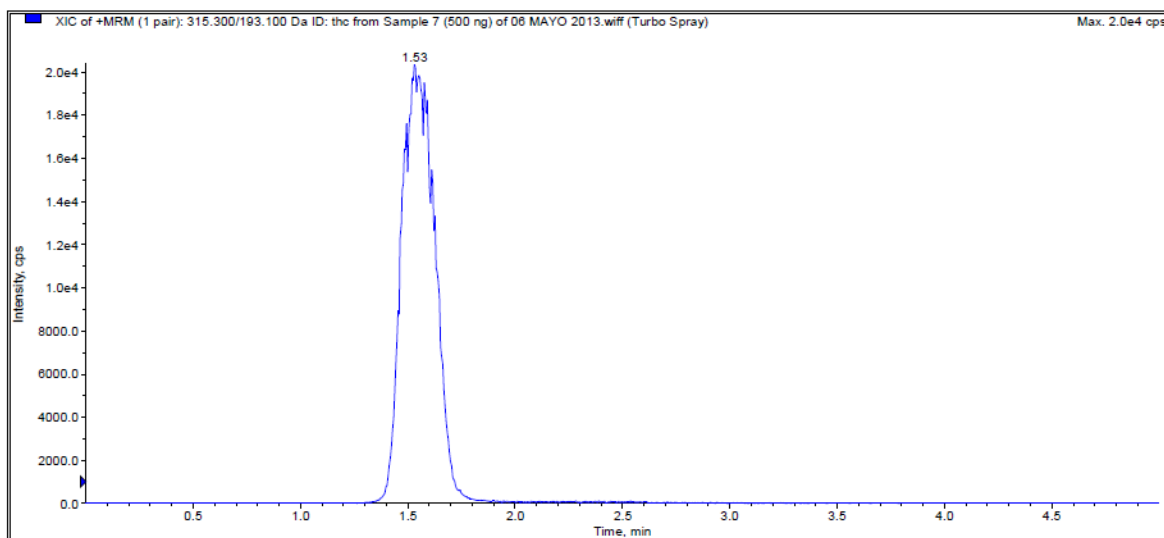


Figura no.31 cromatograma de THC a concentración de 500 ng/ml

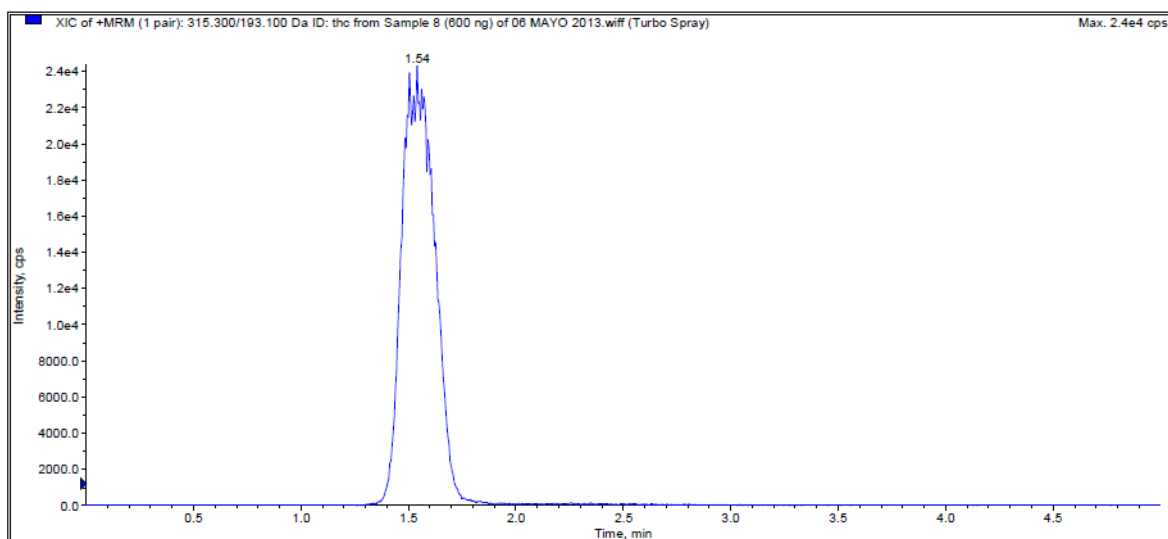


Figura no. 32 cromatograma de THC a concentración de 600 ng/ml

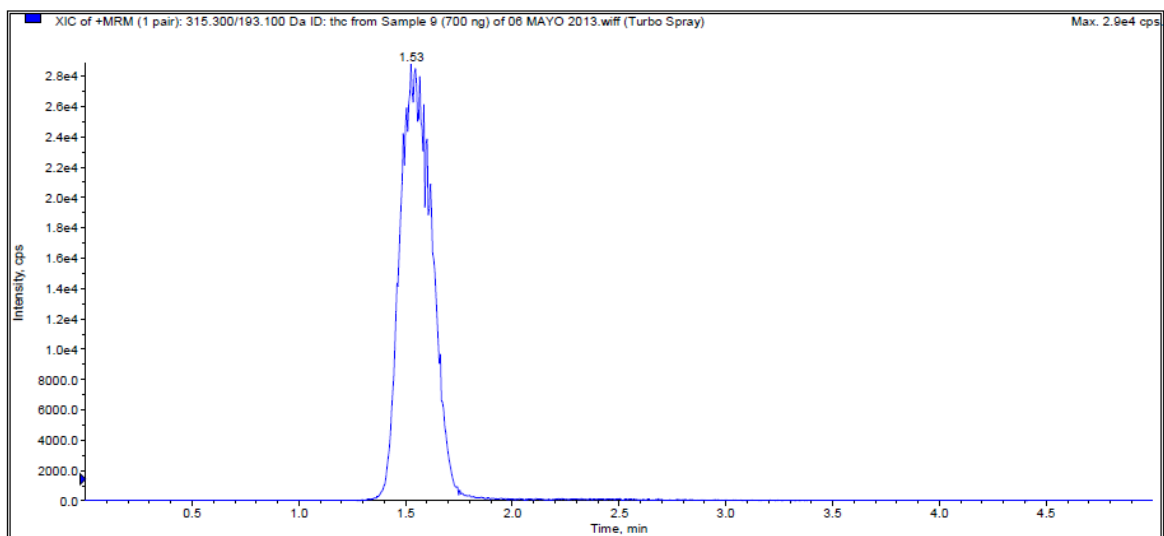


Figura no.33 cromatograma de THC a concentración de 700 ng/ml

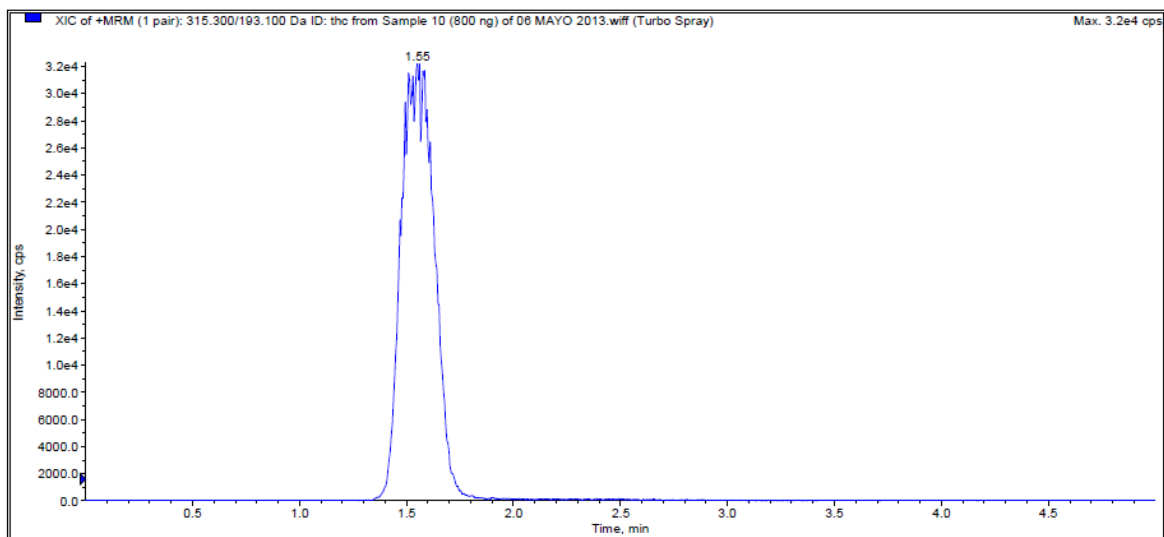


Figura no.34 cromatograma de THC a concentración de 800 ng/ml

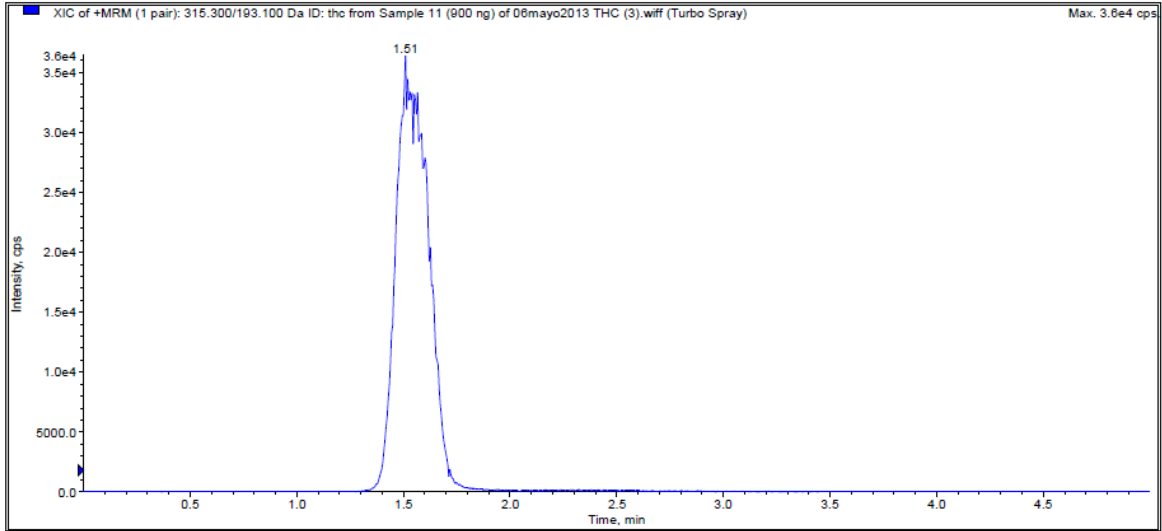


Figura no. 35 cromatograma de THC a concentración de 900 ng/ml

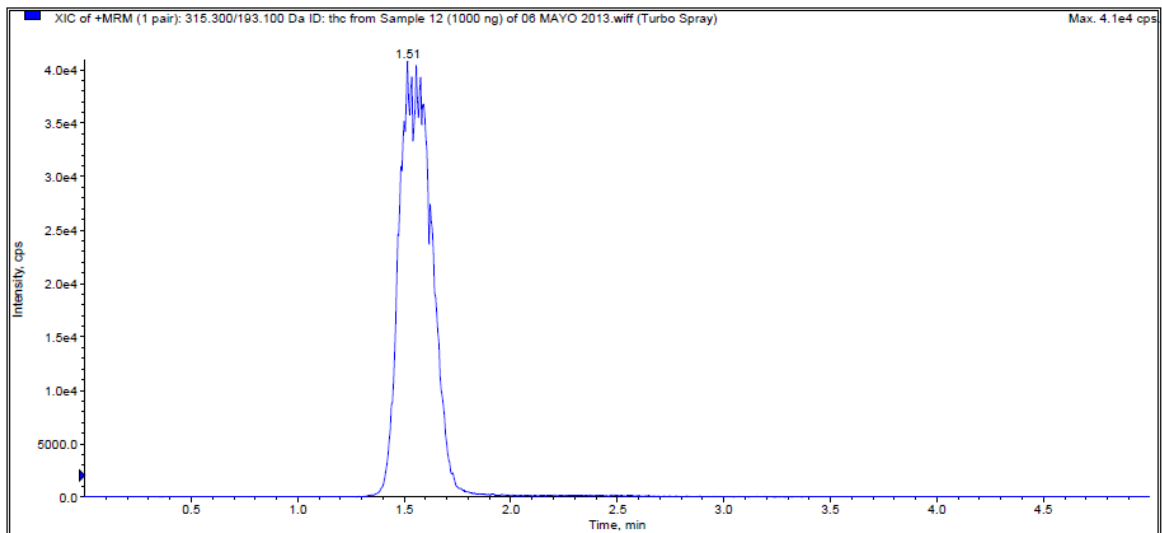


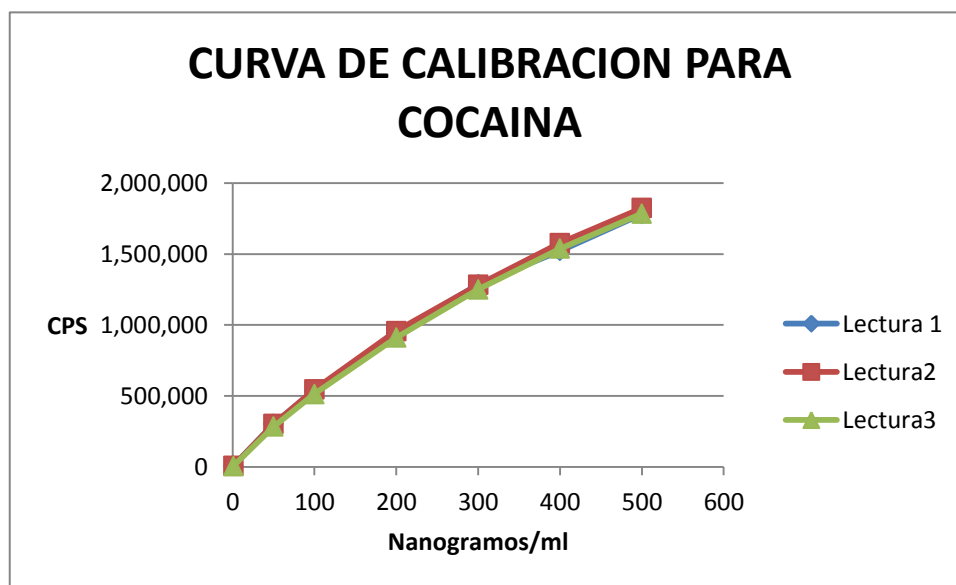
Figura no.36 cromatograma de THC a concentración de 1000 ng/ml.

Los resultados Obtenidos en cuentas por segundo a las diferentes concentraciones del estándar de cocaína se muestran en la tabla no 11. Así como también la figura no. 37 muestra la gráfica obtenida, donde se aprecia un comportamiento lineal sin cambios significativos en la Pendiente en un rango de 1 a 500 ng/ml.

### CURVA DE CALIBRACIÓN PARA COCAÍNA.

St de Cocaína (ng/ml)	Lectura 1	Lectura2	Lectura3
1	6,866	7,960	5,996
50	303,096	302,290	28,4440
100	538,423	545,936	51,3426
200	947,526	956,960	91,1056
300	1,284,946	1,282,586	1,250,833
400	1,521,740	1,576,993	1,537,973
500	1,781,430	1,823,890	1,685,086
600	1,993,453	2,099,350	1,925,233
700	2,105,506	2,213,283	2,064,843
800	2,263,623	2,450,170	2,222,233
900	2,442,823	2,523,360	2,324,420
1000	2,582,290	2,718,026	2,426,540

Tabla no.11 Curva de calibración de Cocaína.



En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas a distintas concentraciones para cocaína.

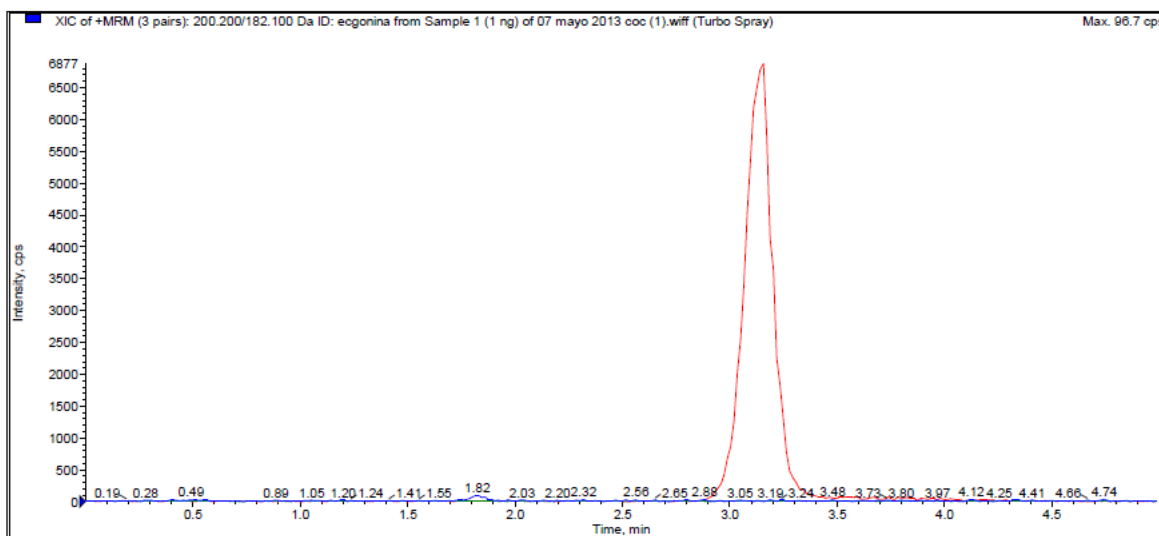


Figura no. 38 cromatograma de cocaína a concentración de 1 ng/ml

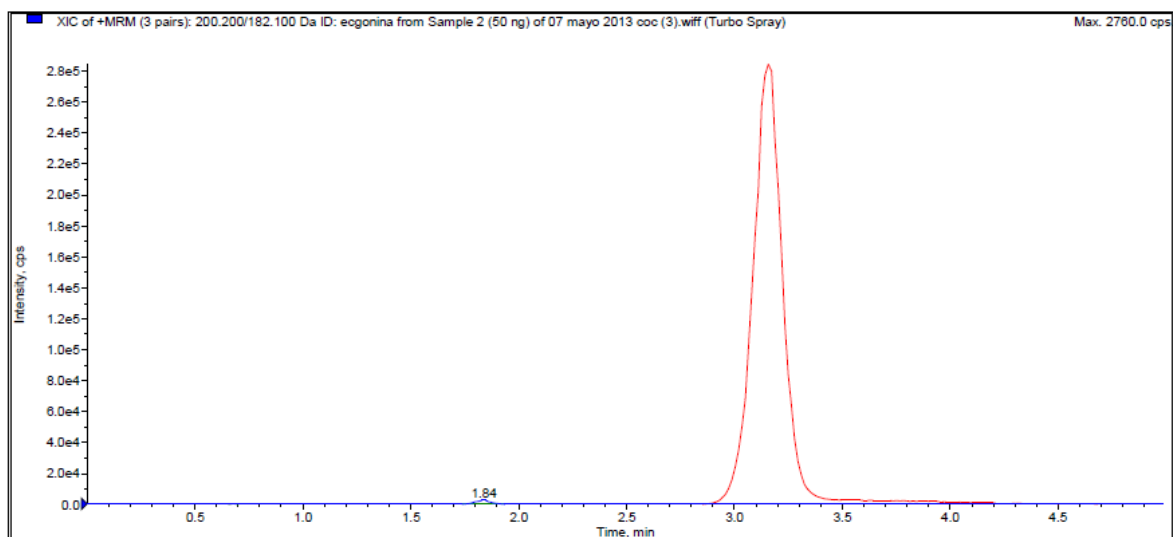


Figura no. 39 cromatograma de cocaína a concentración de 50 ng/ml

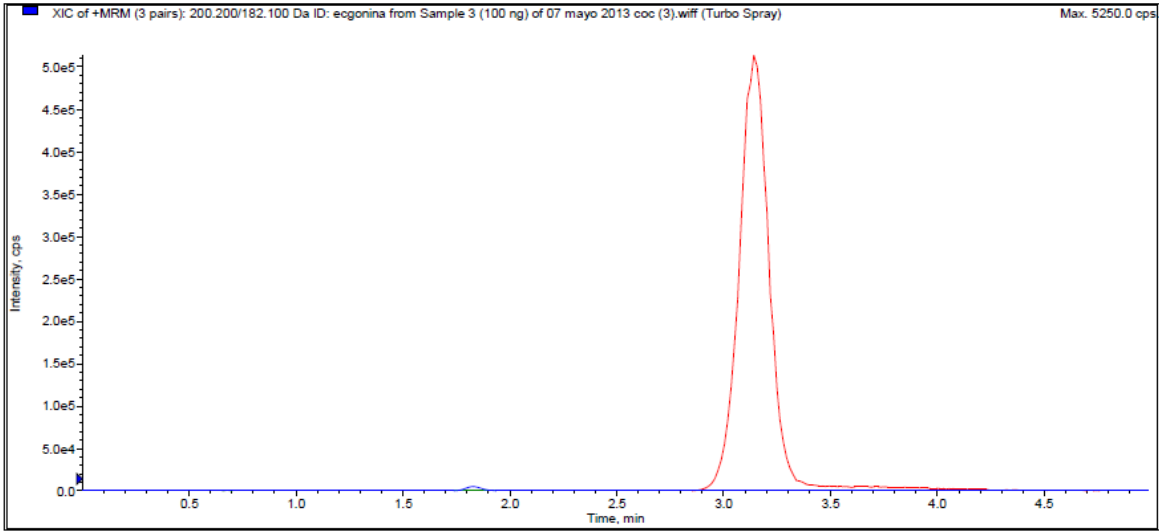


Figura no. 40 cromatograma de cocaína a concentración de 100 ng/ml

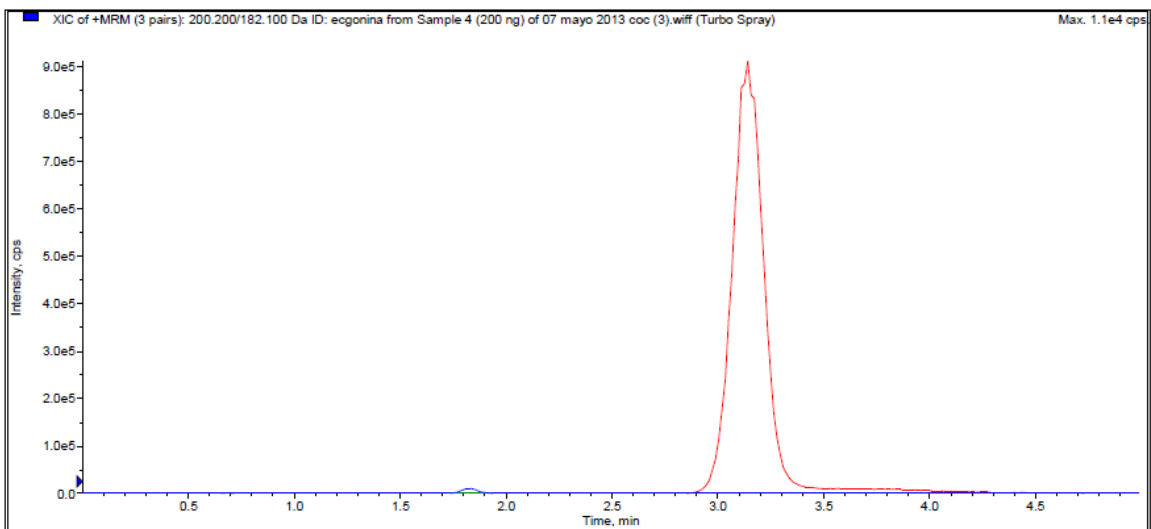


Figura no. 41 cromatograma de cocaína a concentración de 200 ng/ml

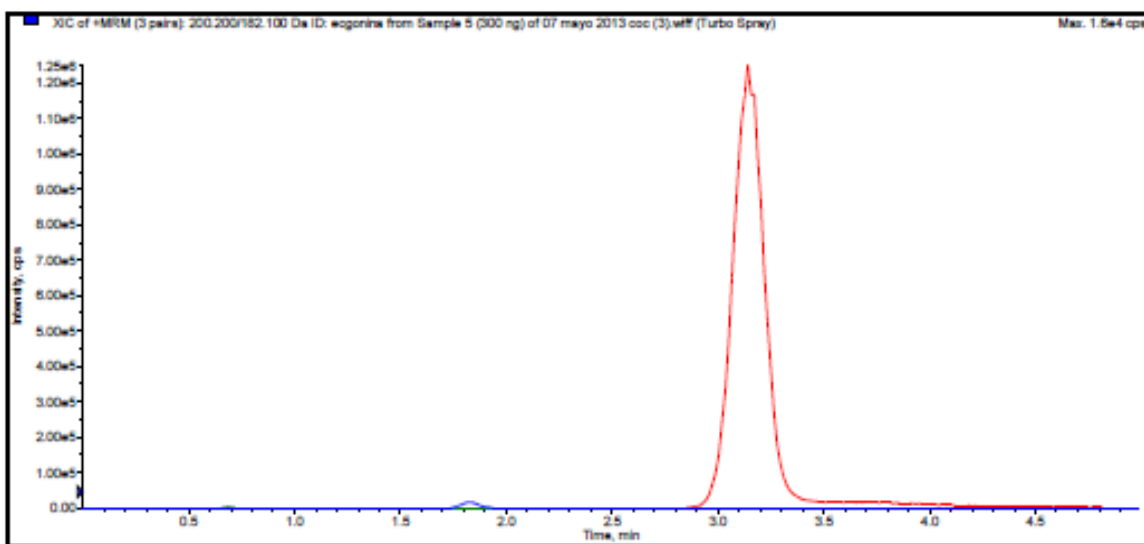


Figura no. 42 cromatograma de cocaína a concentración de 300 ng/ml

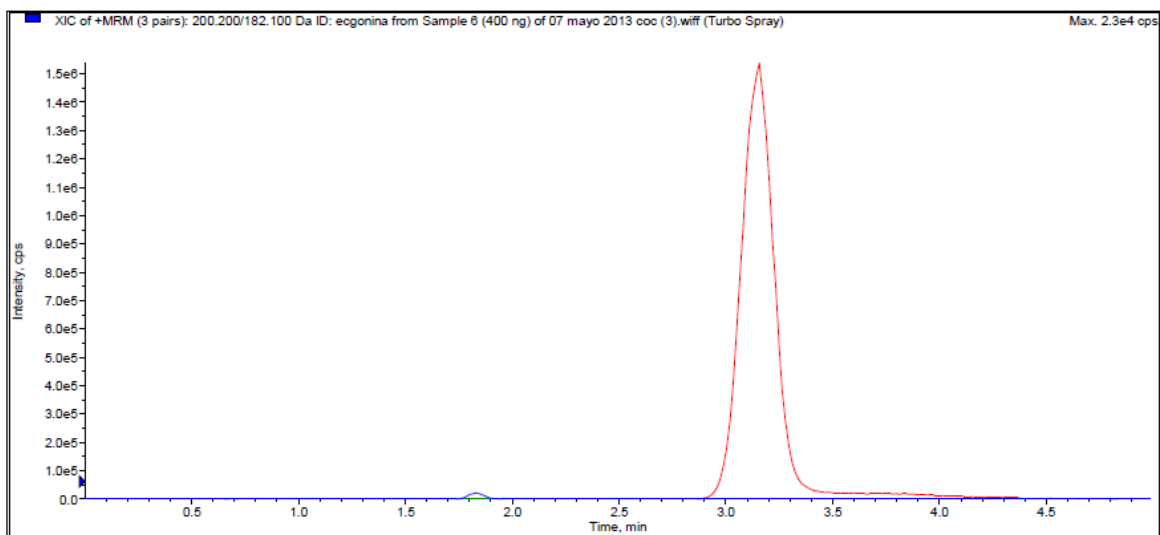


Figura no. 43 cromatograma de cocaína a concentración de 400 ng/ml

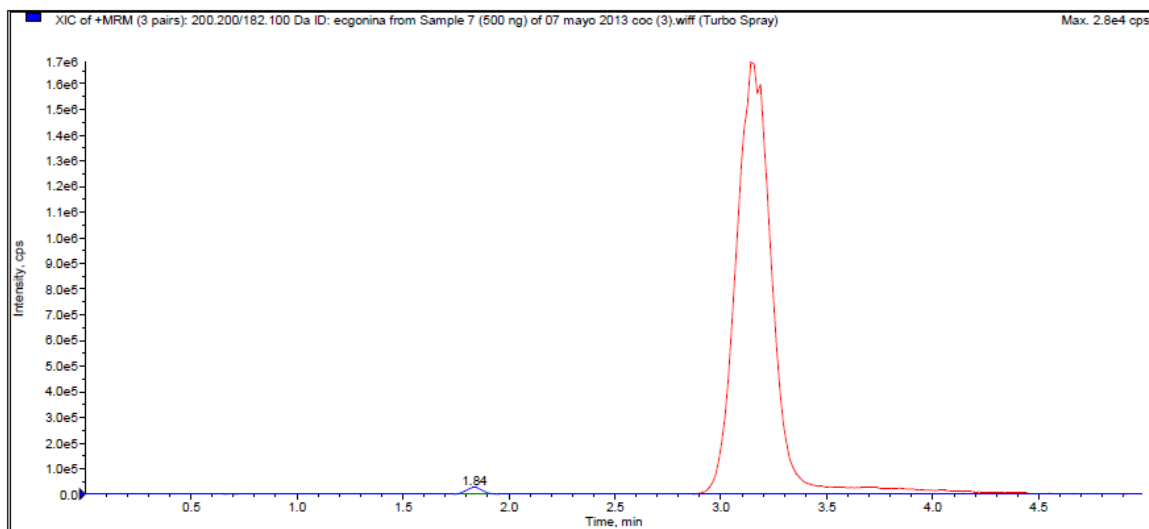


Figura no. 44 cromatograma de cocaína a concentración de 500 ng/ml

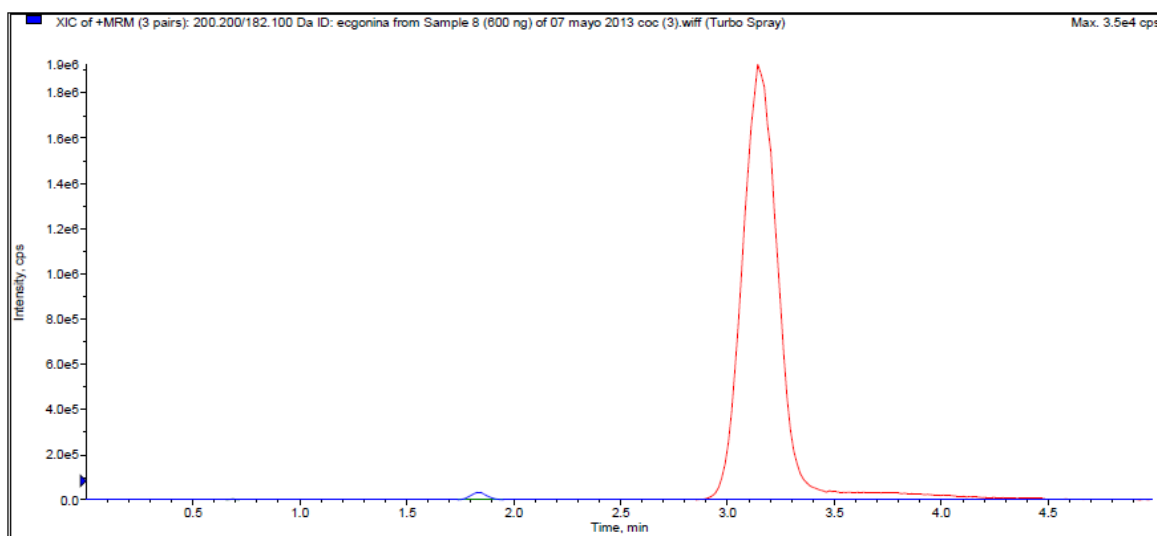


Figura no. 45 cromatograma de cocaína a concentración de 600 ng/ml

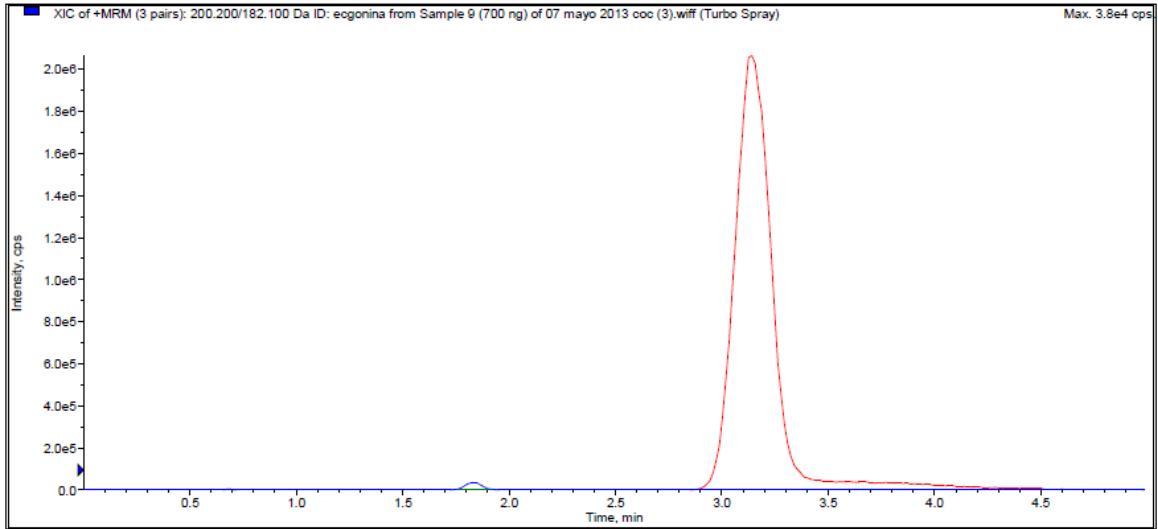


Figura no. 46 cromatograma de cocaína a concentración de 700 ng/ml

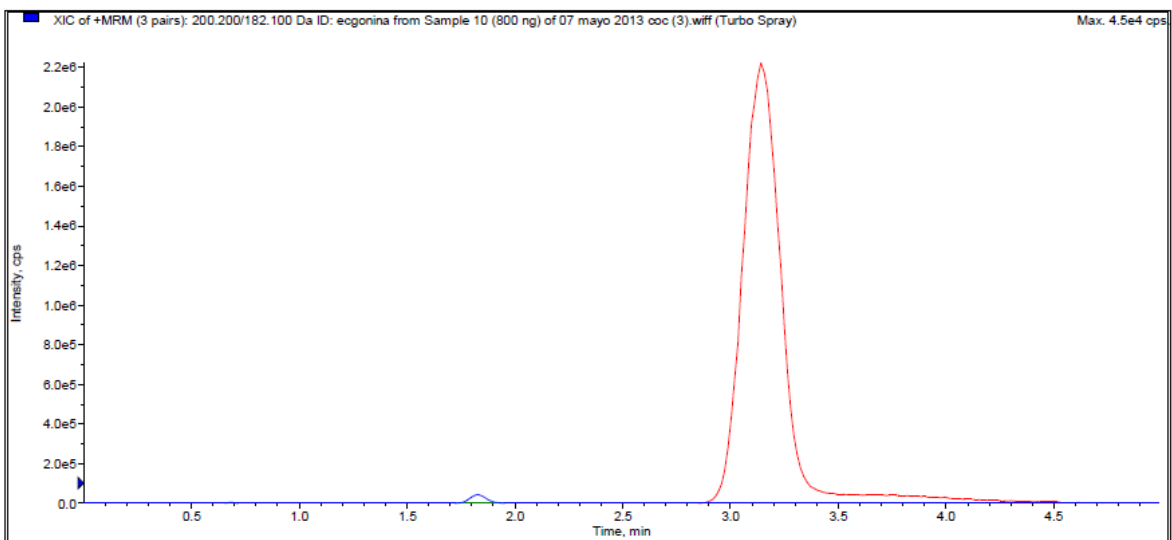


Figura no. 47 cromatograma de cocaína a concentración de 800 ng/ml

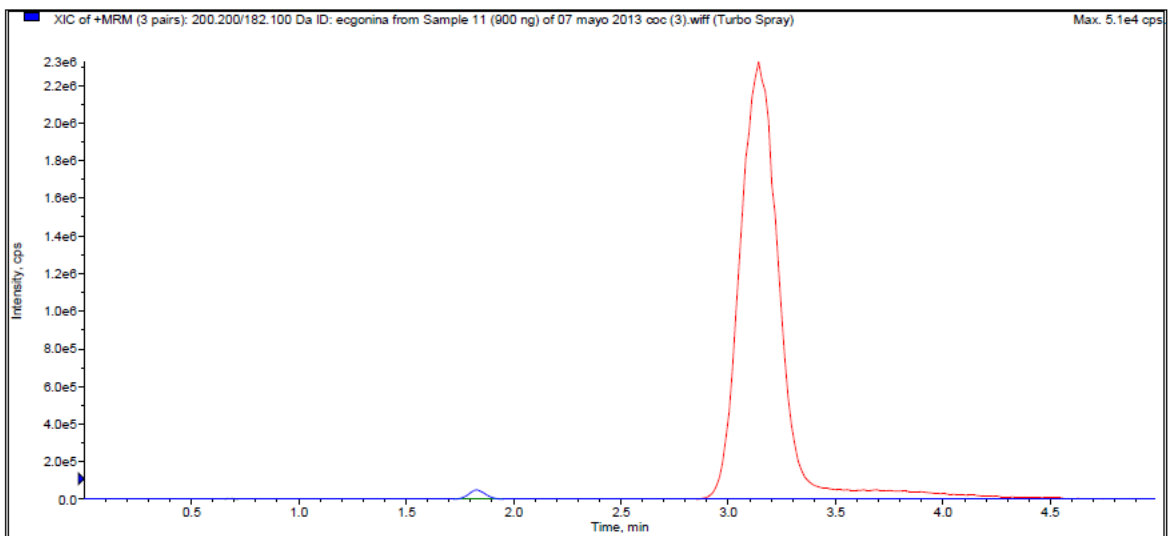


Figura no. 48 cromatograma de cocaína a concentración de 900 ng/ml

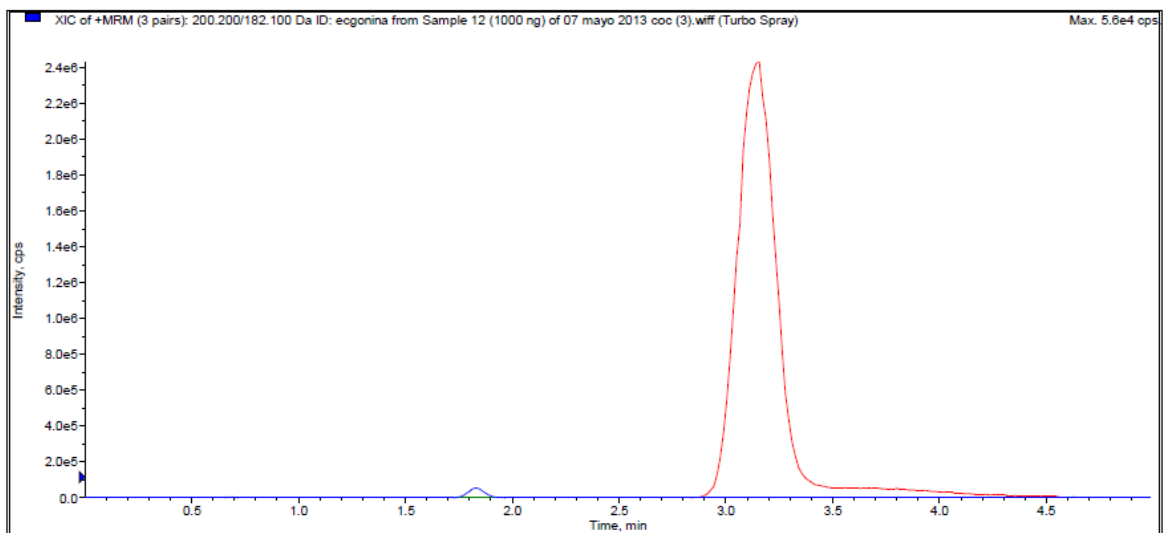


Figura no. 49 cromatograma de cocaína a concentración de 1000 ng/ml

En la tabla no. 12 Se puede observar las lecturas en cuentas por segundo obtenida de las diferentes concentraciones del estándar de Metanfetaminas. Se observa linealidad entre 1 a 500 ng/ml.

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA METANFETAMINAS.

Std de Metanfetamina (ng/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	563	560	476
50	17,376	15,750	12926
100	27,180	24,456	20,433
200	42,506	39,983	34,000
300	55,436	49,060	44,313
400	62,603	58,556	52,000
500	68,026	63086	58,000
600	71,243	68216	62,153
700	74,816	75,166	68,410
800	79,566	76,369	71,106
900	81,429	80,053	74,000
1000	82,476	81,223	78,000

Tabla no.12 Curva de calibración para Metanfetamina.

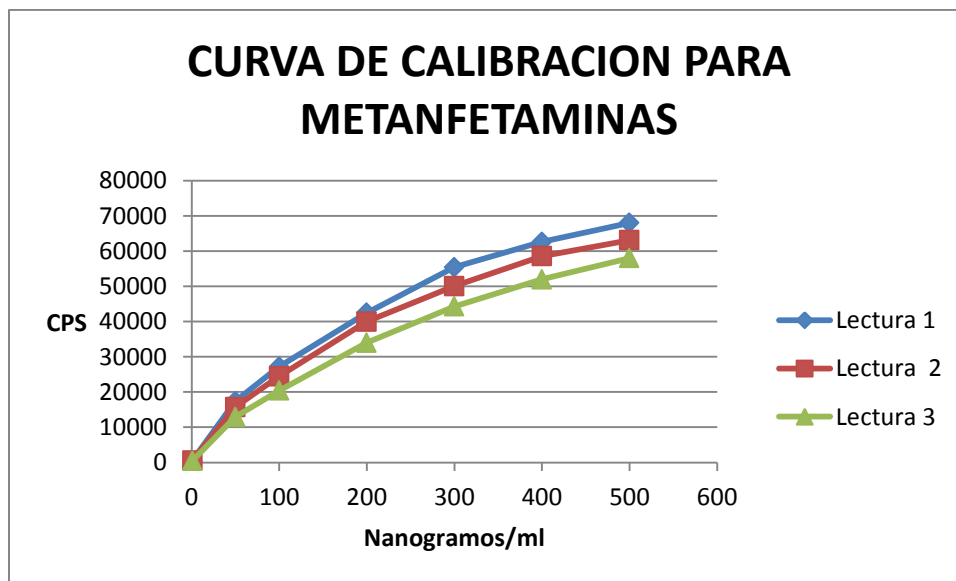


Figura no. 50 Curva de calibración de metanfetaminas.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas a distintas concentraciones para metanfetaminas.

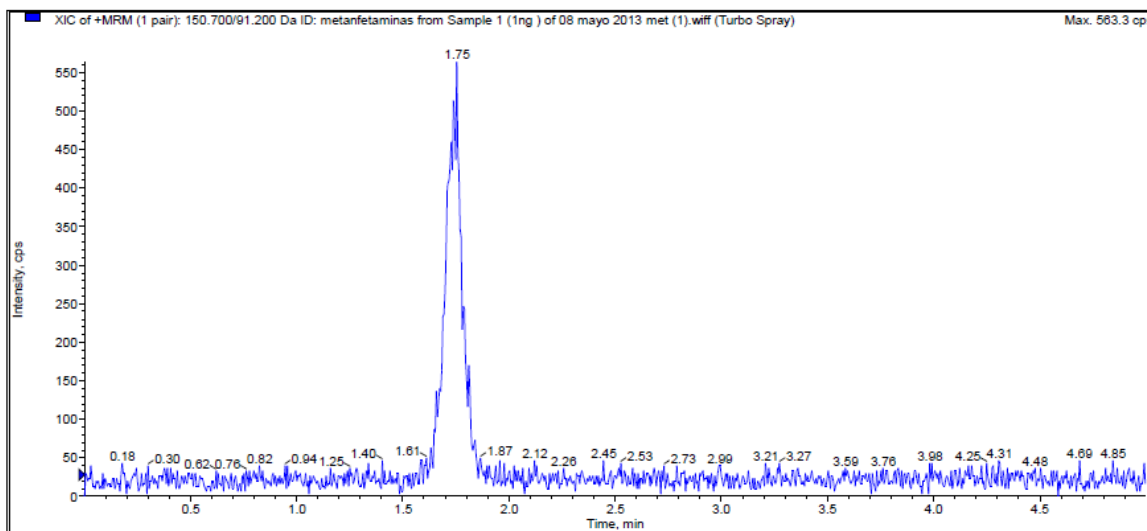


Figura no. 51 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 1 ng/ml.

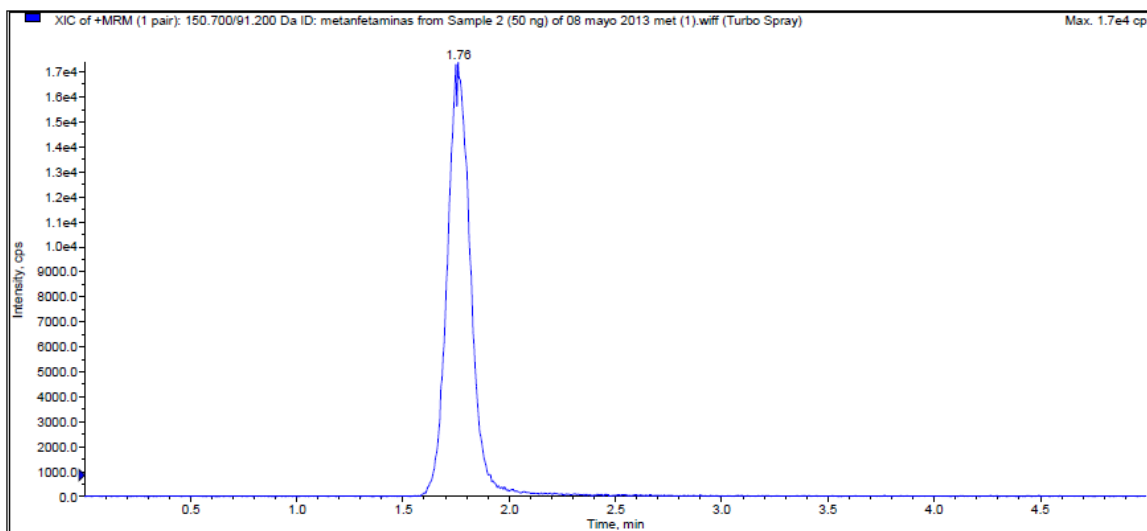


Figura no. 52 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 50 ng/ml.

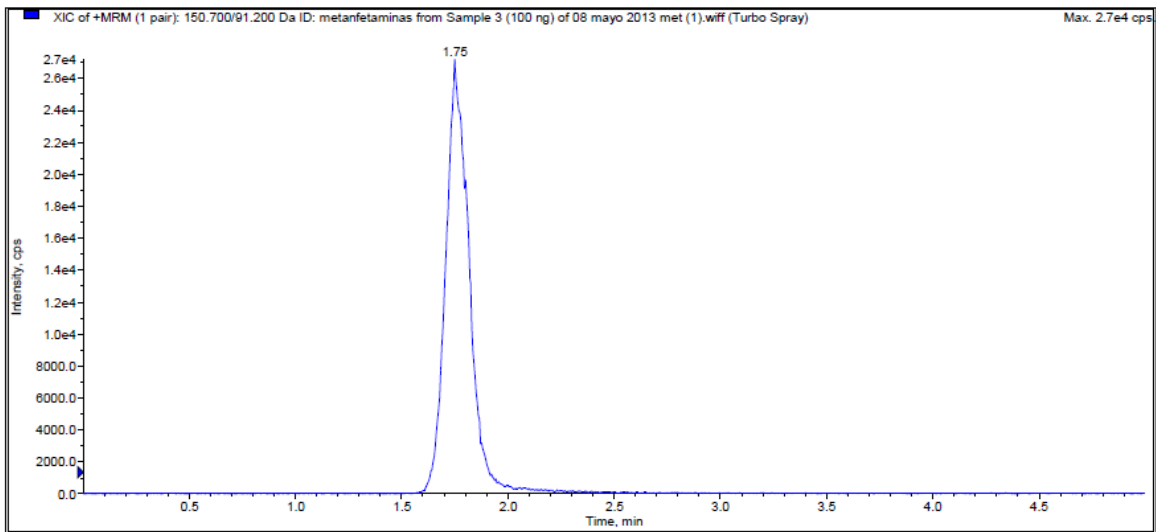


Figura no. 53 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 100 ng/ml.

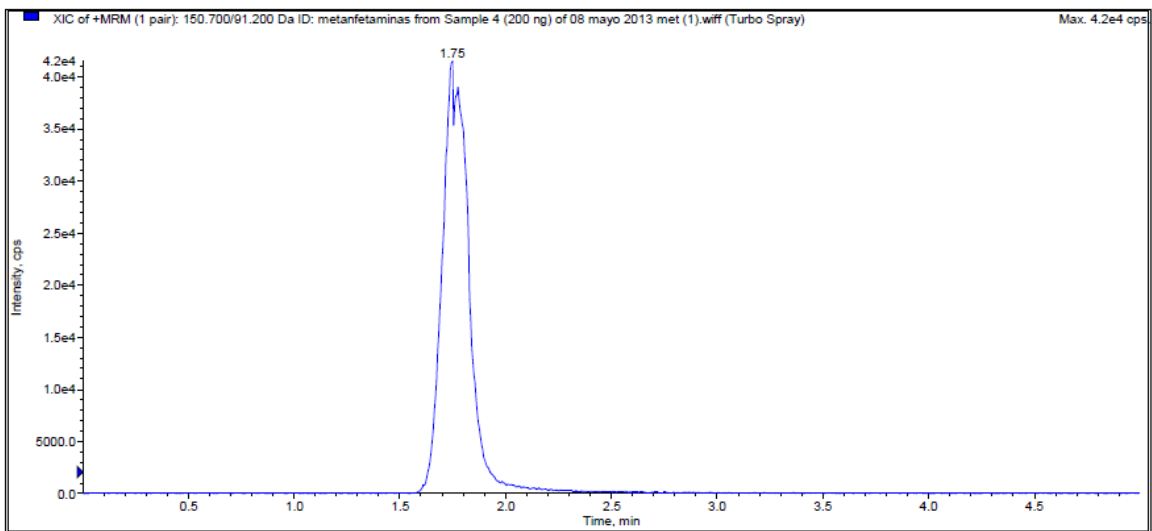


Figura no. 54 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 200 ng/ml.

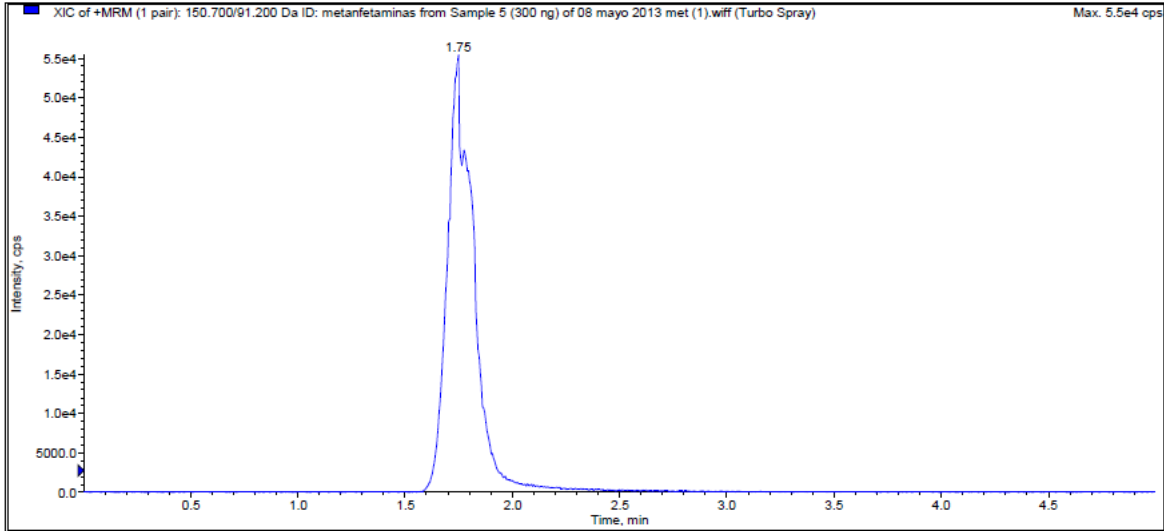


Figura no. 55 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 300 ng/ml.

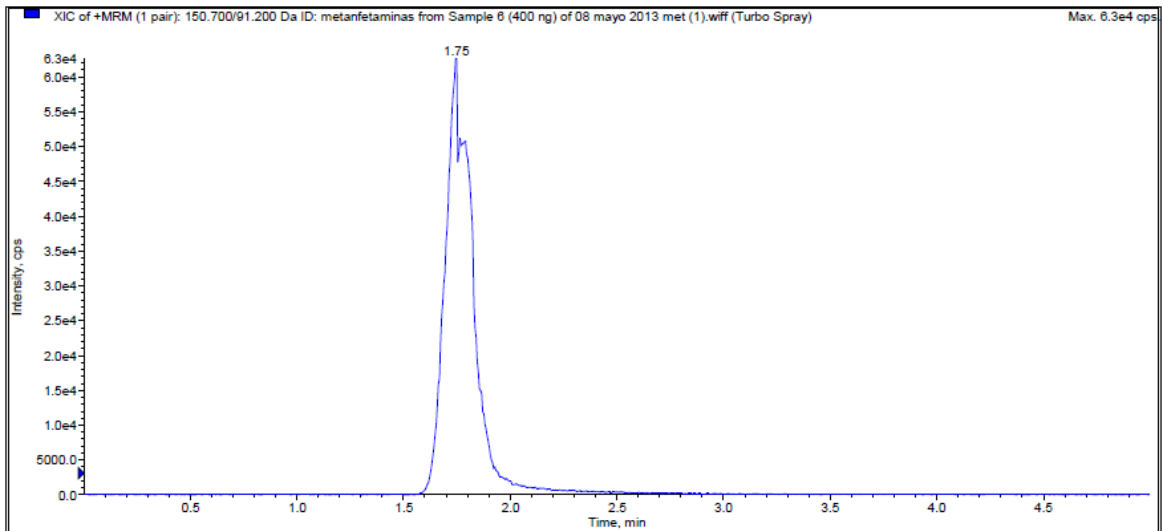


Figura no. 56 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 400 ng/ml.

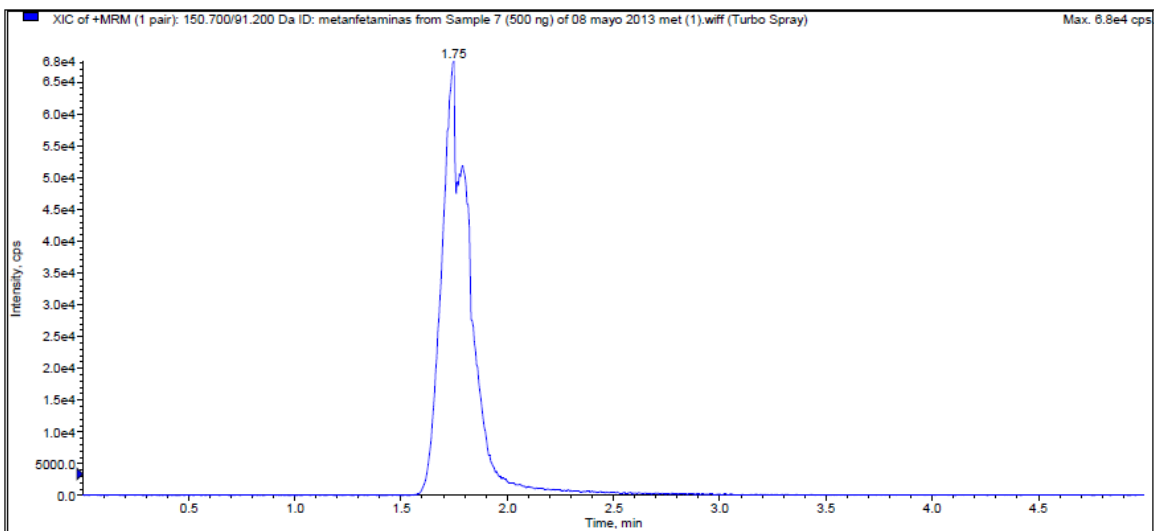


Figura no. 587 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 500 ng/ml.

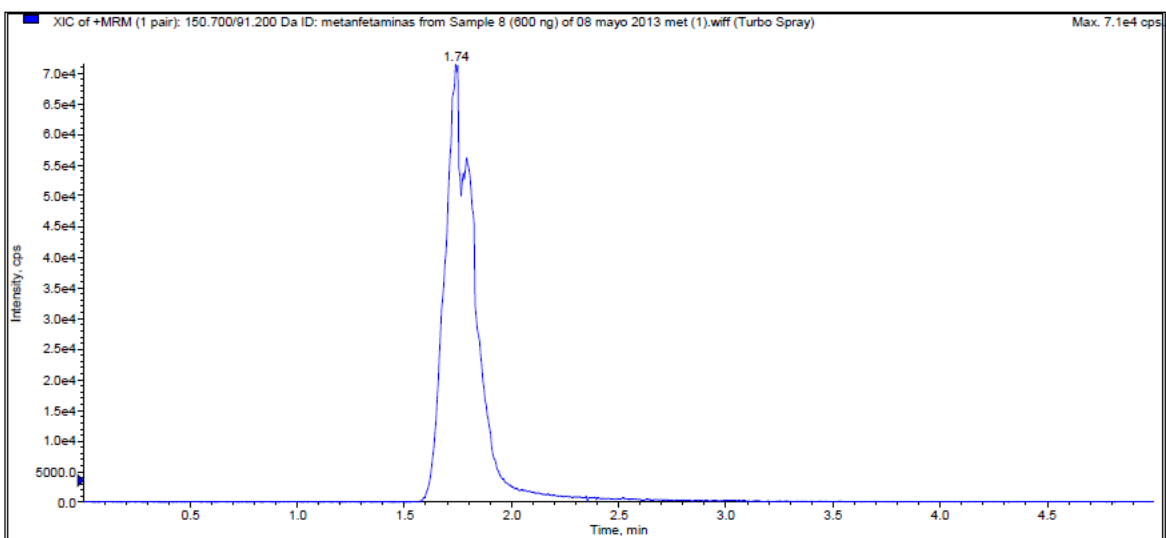


Figura no. 58 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 600 ng/ml.

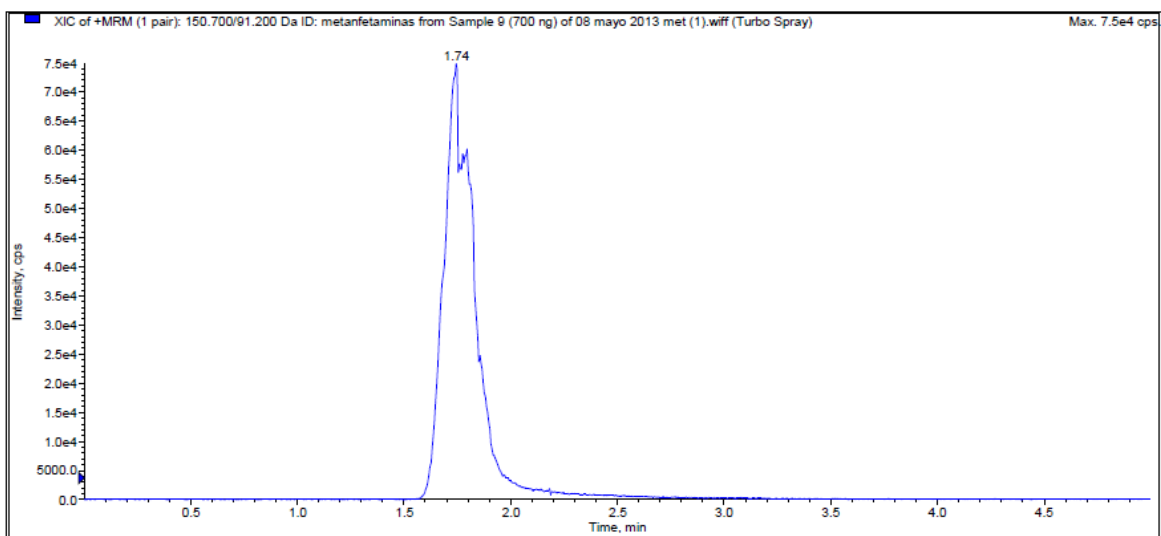


Figura no. 59 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 700 ng/ml.

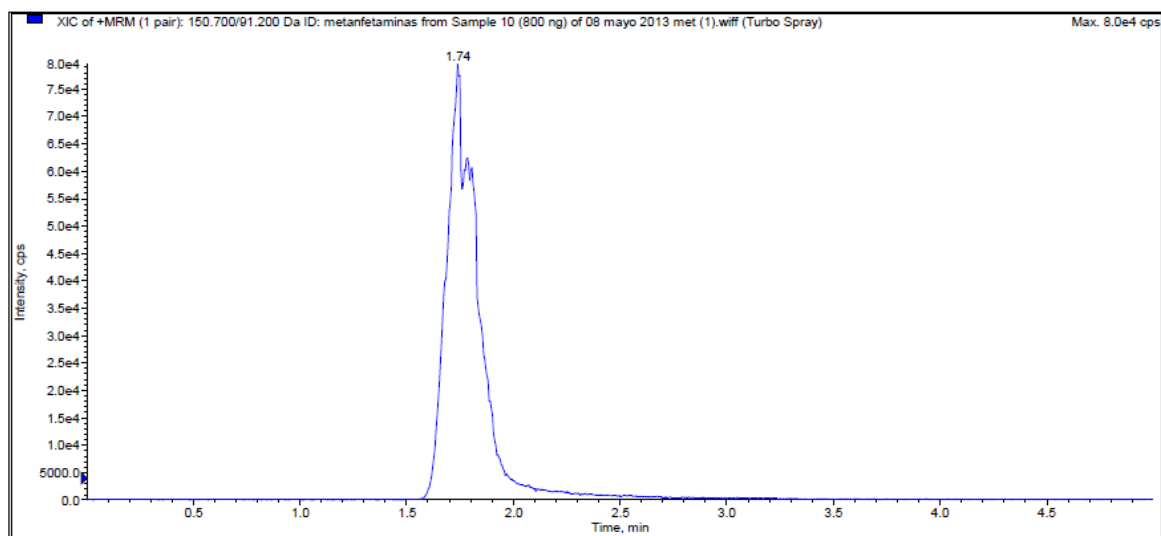


Figura no. 60 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 800 ng/ml.

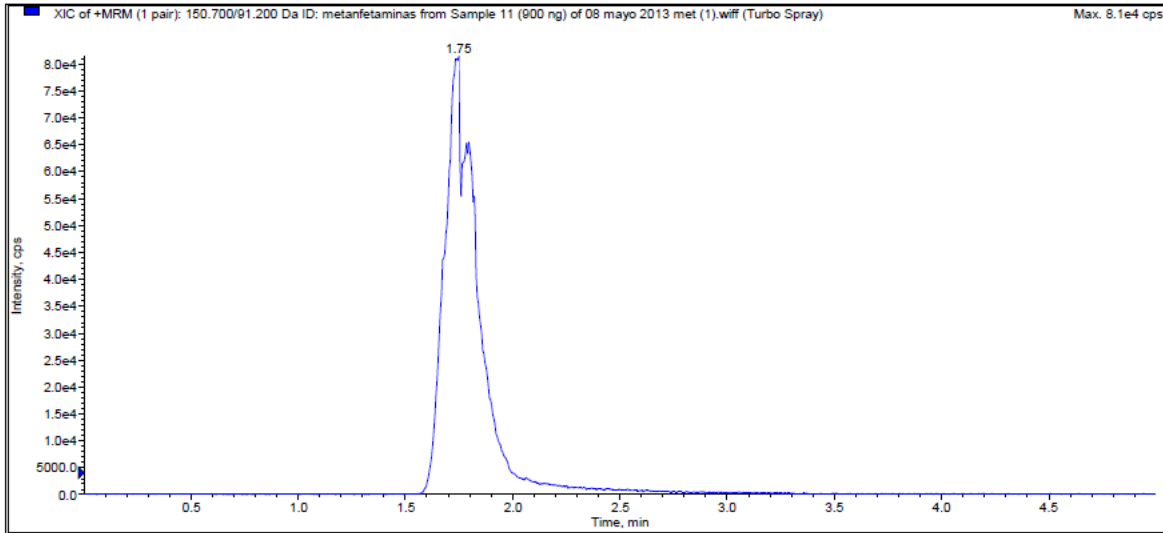


Figura no. 61 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 900 ng/ml.

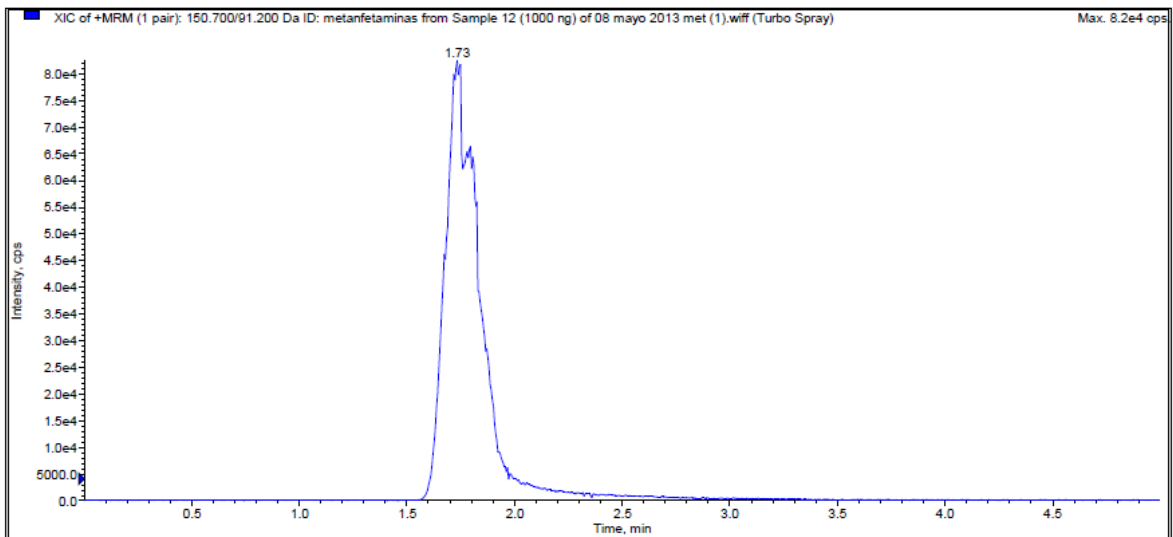


Figura no. 62 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 1000 ng/ml.

En la tabla no.13 Se puede observar las lecturas en cuentas por segundo obtenida de las diferentes concentraciones del estándar de Anfetaminas. Se observa linealidad de 1 a 500 ng/ml.

### CURVA DE CALIBRACION DE ANFETAMINAS.

Std de anfetamina ng/ml	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	1,050	1440	1315
50	39,536	45,525	44,220
100	69,160	75,095	80,740
200	133,385	146,635	143,150
300	174,485	205,515	208,490
400	230,420	246,905	246,975
500	266,765	296,930	304,525
600	330,495	360,150	342,575
700	361,125	380,000	378,960
800	404,415	414,125	420,000
900	445,810	459,205	455,600
1000	500,000	490,485	498,210

Tabla no. 13 Curva de calibración para Anfetaminas.

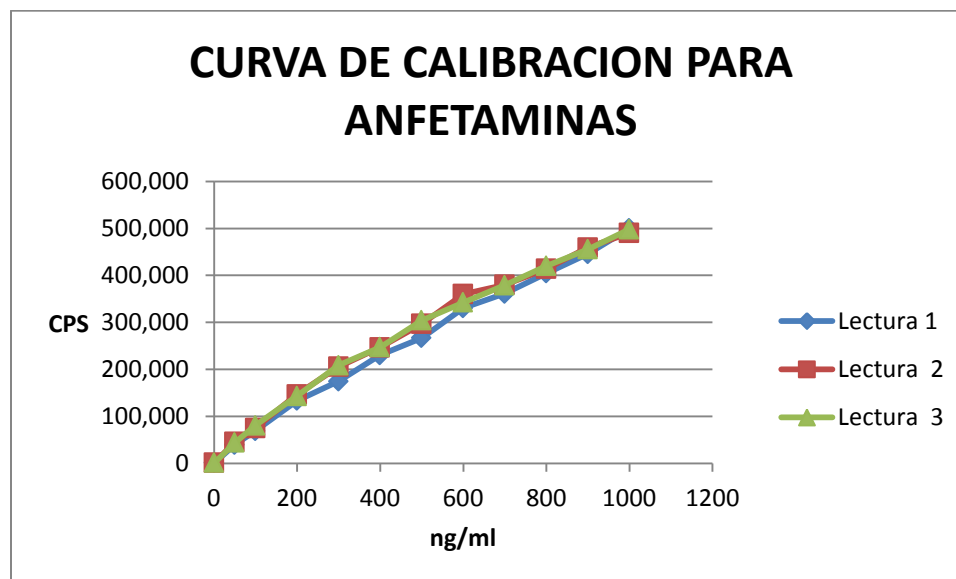


Figura no.63 Curva de calibración de Anfetaminas.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas a distintas concentraciones para anfetamina.

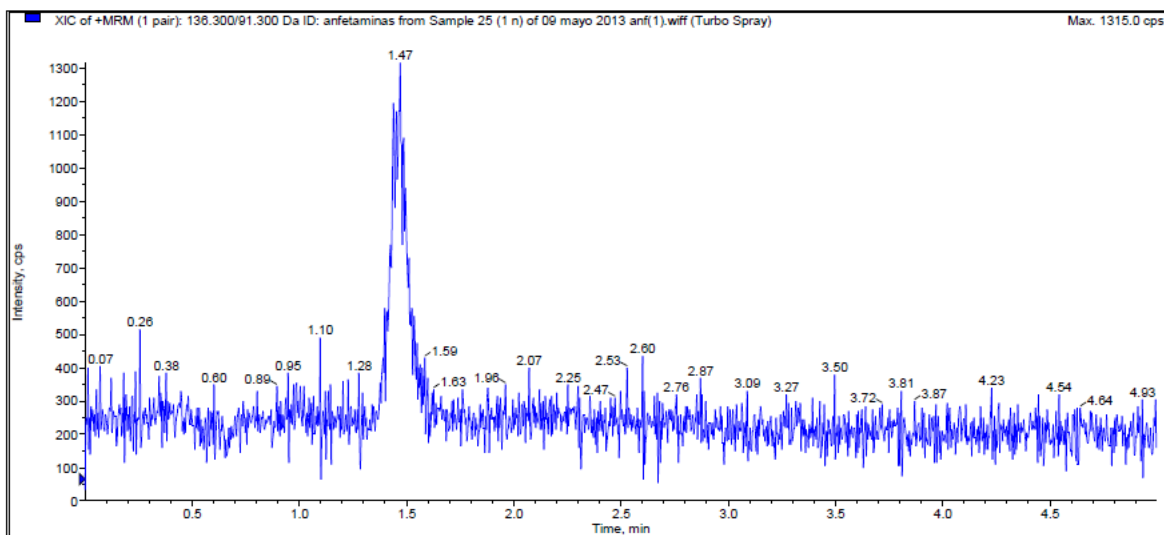


Figura no. 64 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 1 ng/ml.

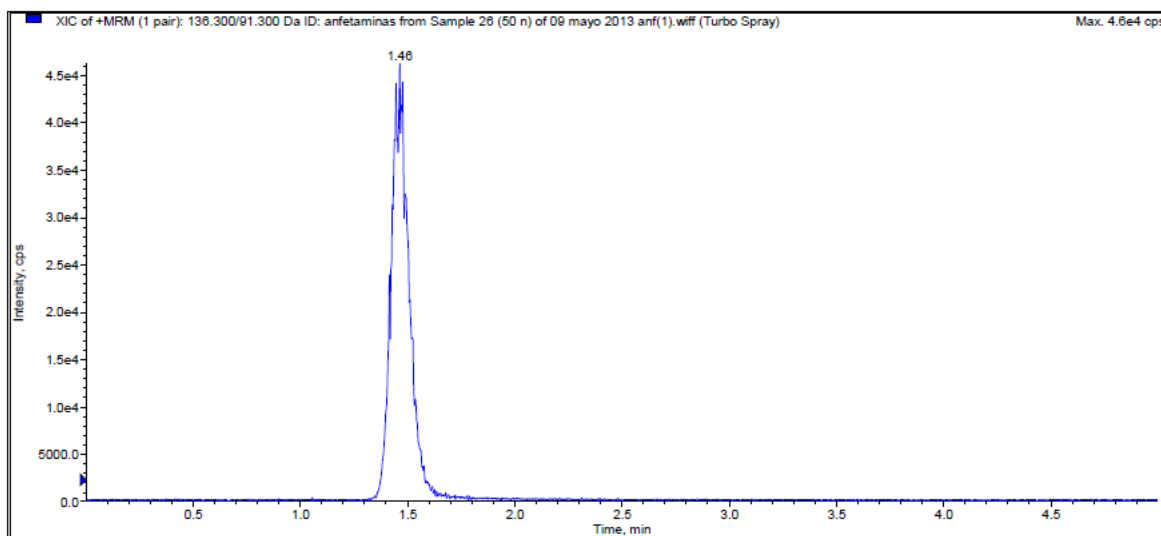


Figura no. 65 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 50 ng/ml.

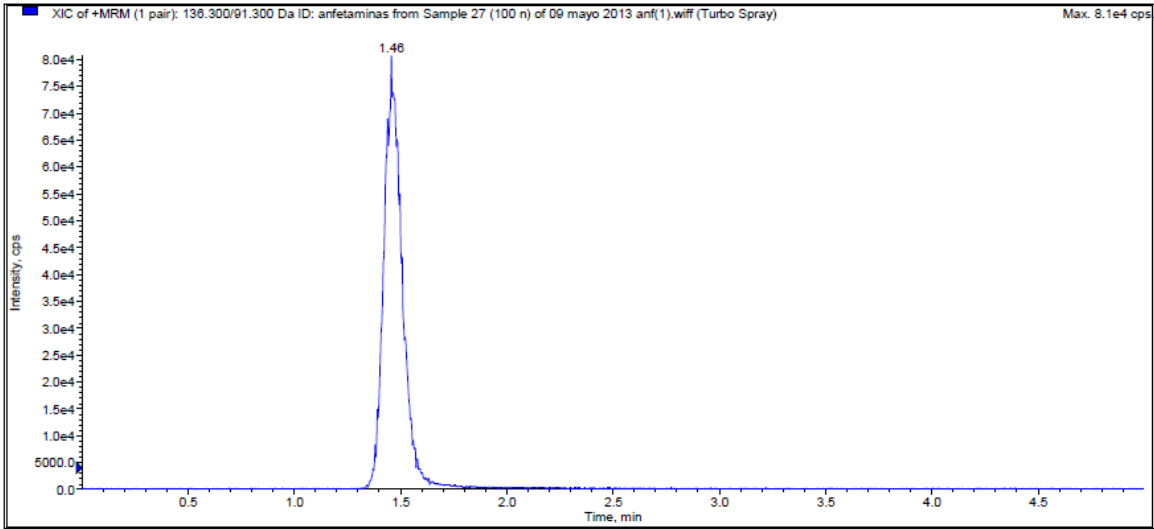


Figura no. 66 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 100 ng/ml.

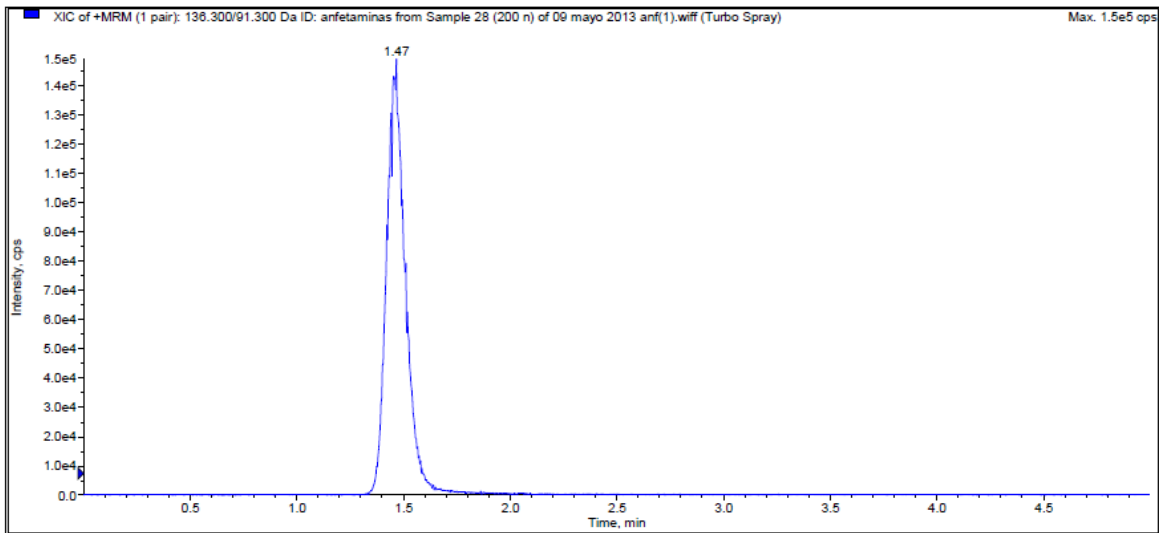


Figura no. 67 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 200 ng/ml.

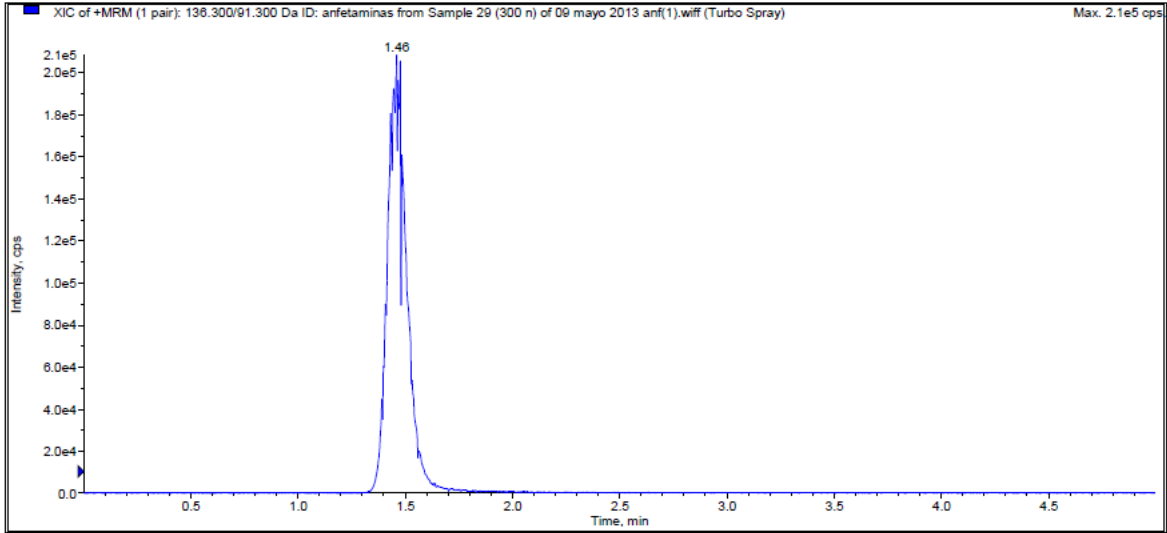


Figura no. 68 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 300 ng/ml.

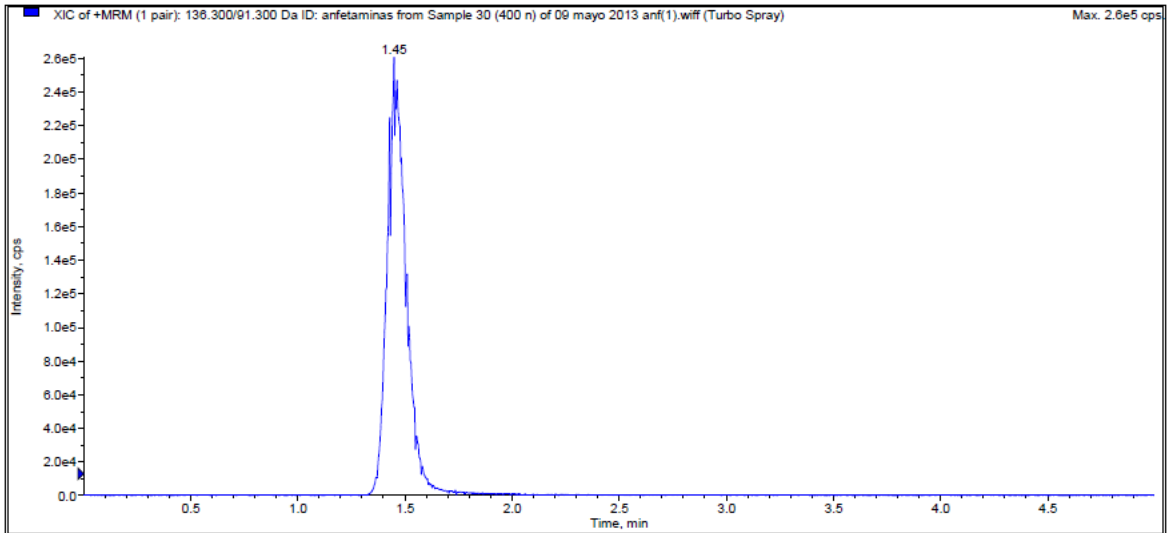


Figura no. 69 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 400 ng/ml.

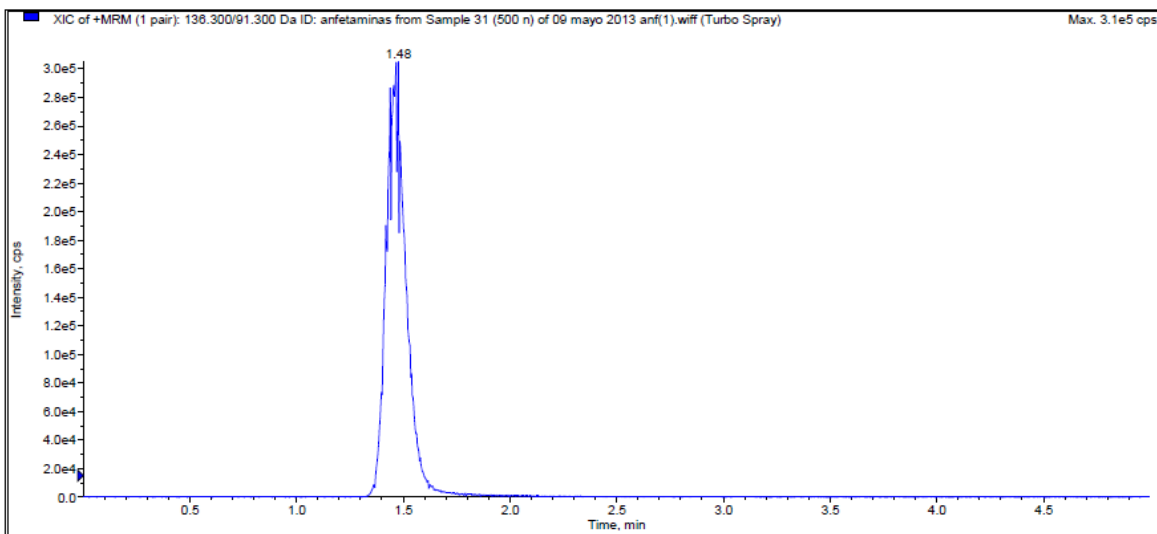


Figura no. 70 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 500 ng/ml.

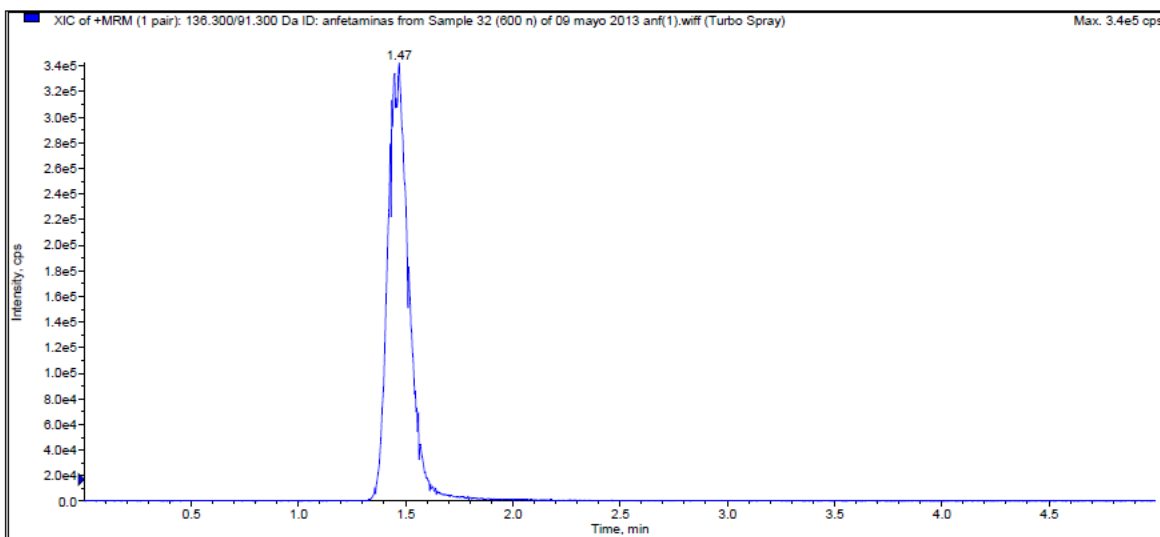


Figura no. 71 Cromatograma para metanfetaminas a concentración de 600 ng/ml.

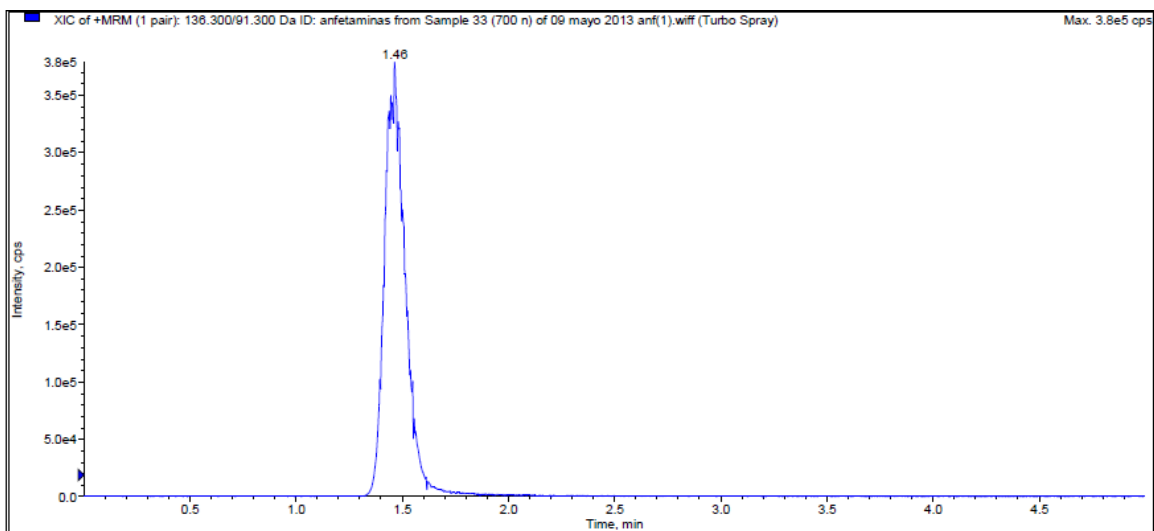


Figura no. 72 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 700 ng/ml.

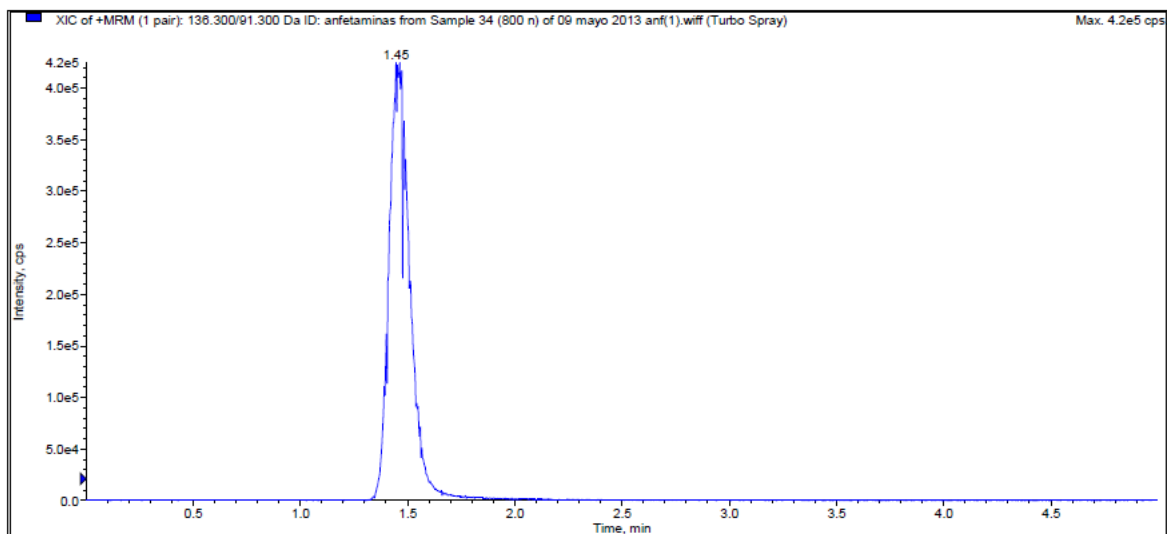


Figura no. 73 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 800 ng/ml.

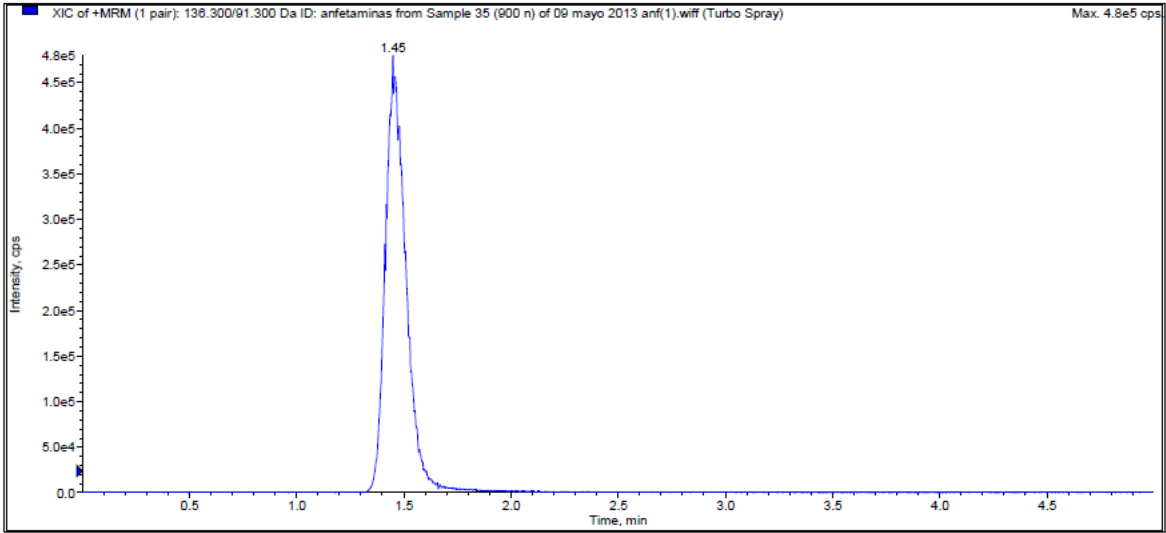


Figura no. 74 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 900 ng/ml.

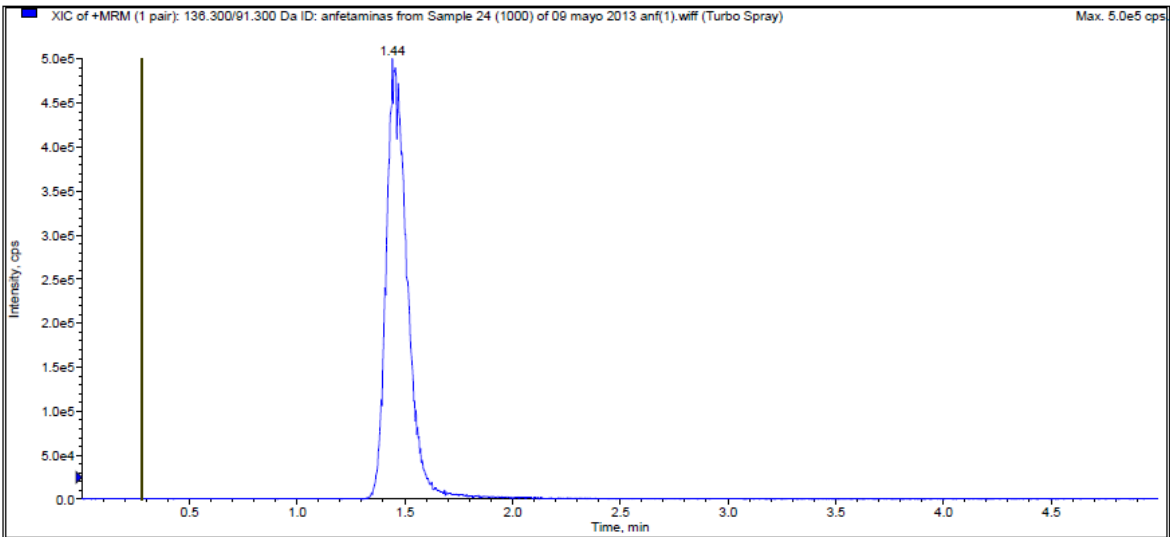


Figura no. 75 Cromatograma para anfetaminas a concentración de 1000 ng/ml.

Se trabajó con Diacetimorfina para validar el procedimiento de validación de opiáceos. En la tabla no.14 Se puede observar las lecturas obtenidas de las diferentes concentraciones del estándar de Diacetimorfina.

### CURVA DE CALIBRACION DE OPIACEOS

St de Diacetil morfina (ng/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	255	215	195
50	6,850	7,100	7,550
100	14,000	15,000	16,000
200	30,000	29,000	33,000
300	42,000	46,000	50,390
400	58,720	60,195	69,324
500	72,880	74,495	83,552
600	90,000	91,000	100,000
700	103,725	110,000	120,000
800	120,530	130,000	130,000
900	133,960	140,000	150,000
1000	146,365	154,190	160,000

Tabla no.14 Curva de calibración para Diacetimorfina.

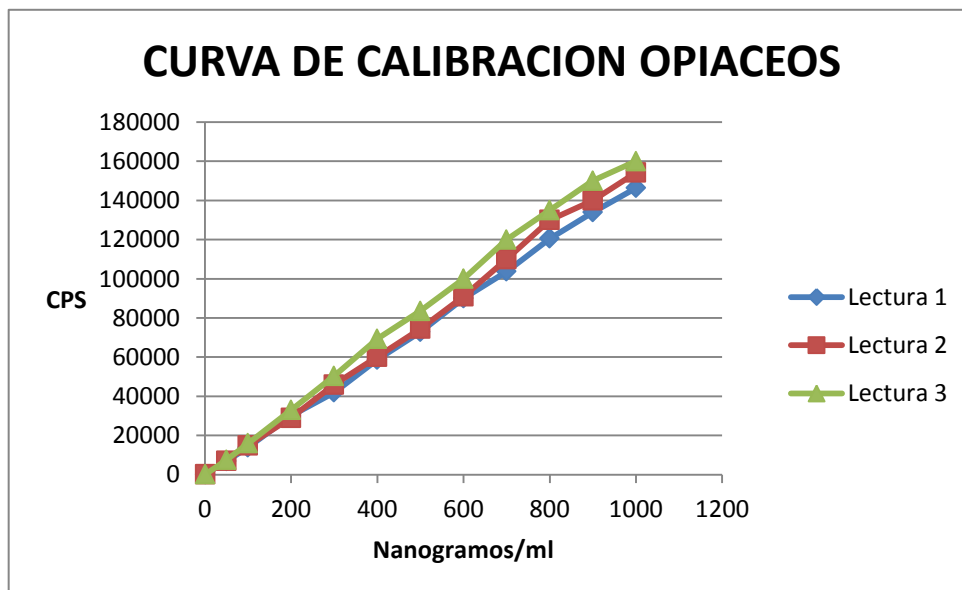


Figura no.76 Curva de calibración para Diacetimorfina.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas a distintas concentraciones para Diacetilmorfina.

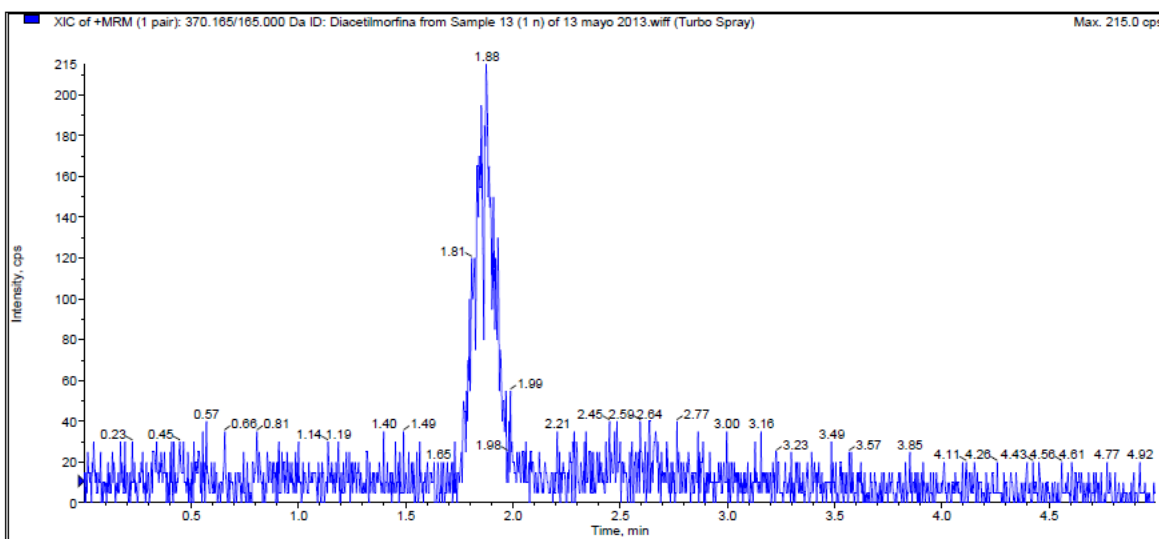


Figura no. 77 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 1 ng/ml.

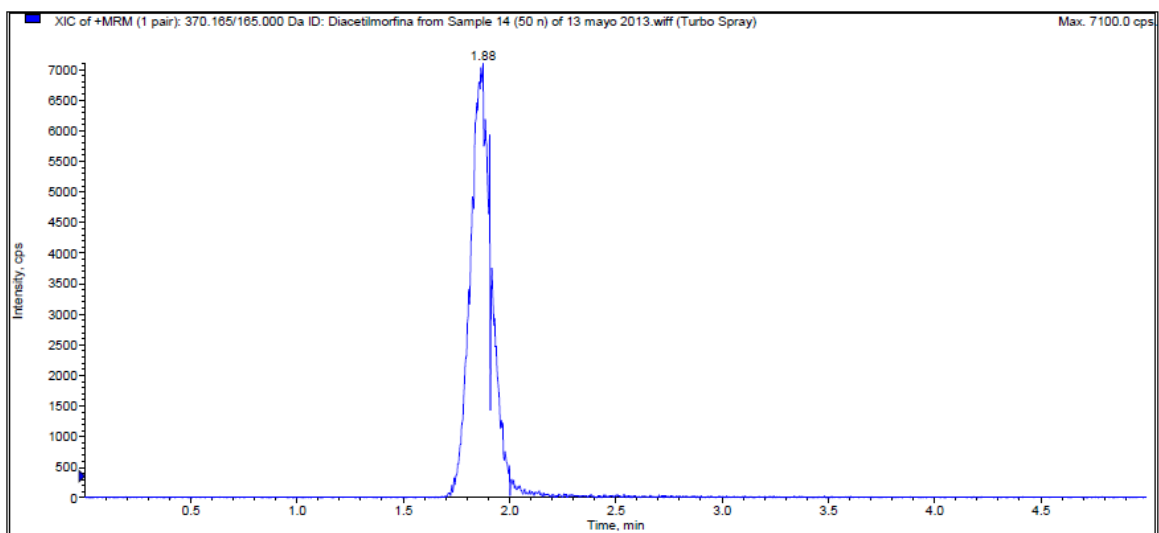


Figura no. 78 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 50 ng/ml.

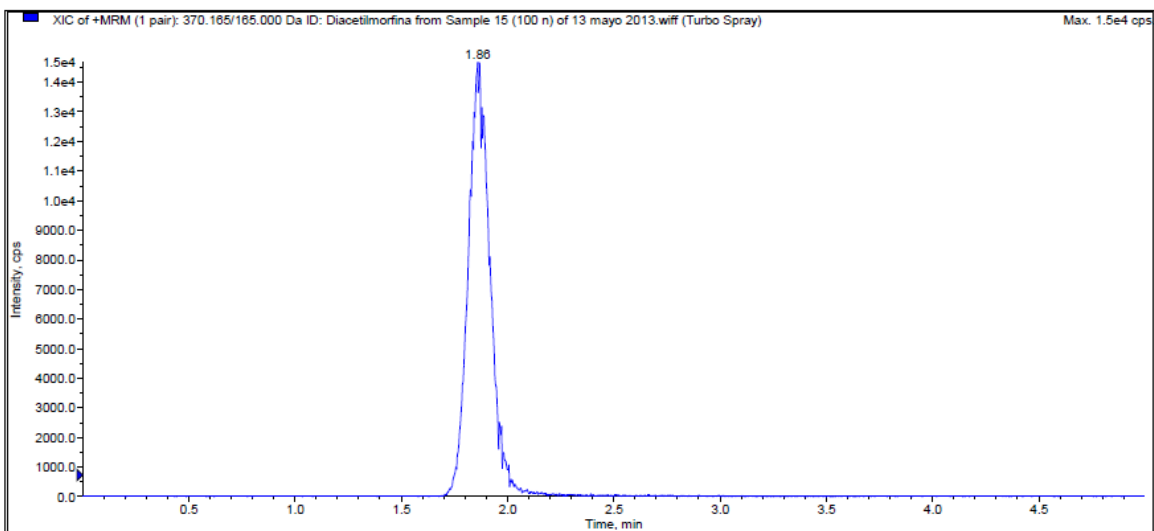


Figura no. 79 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 100 ng/ml.

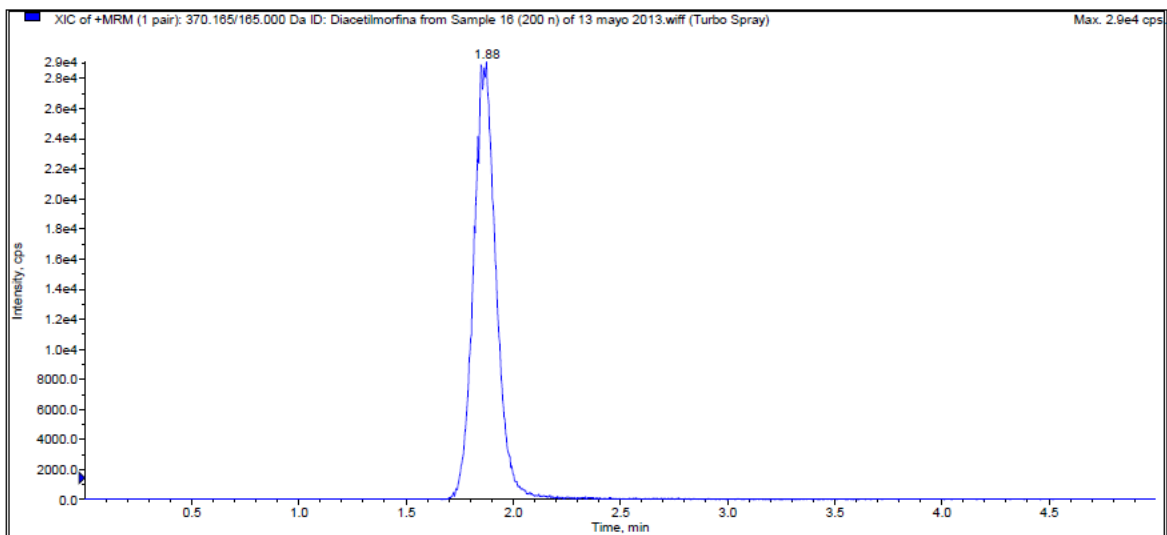


Figura no. 80 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 200 ng/ml.

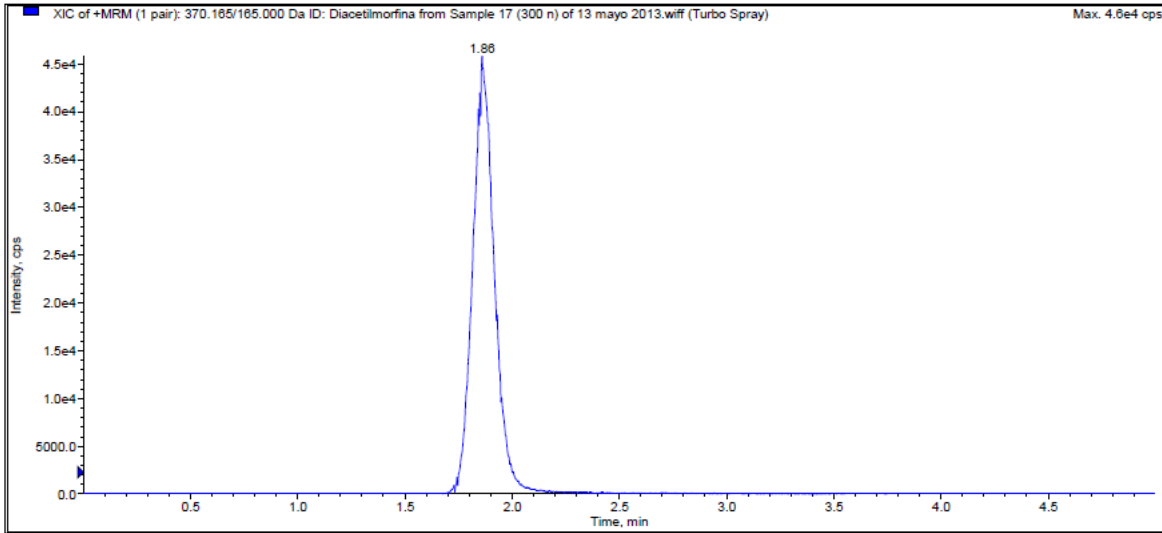


Figura no. 81 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 300 ng/ml.

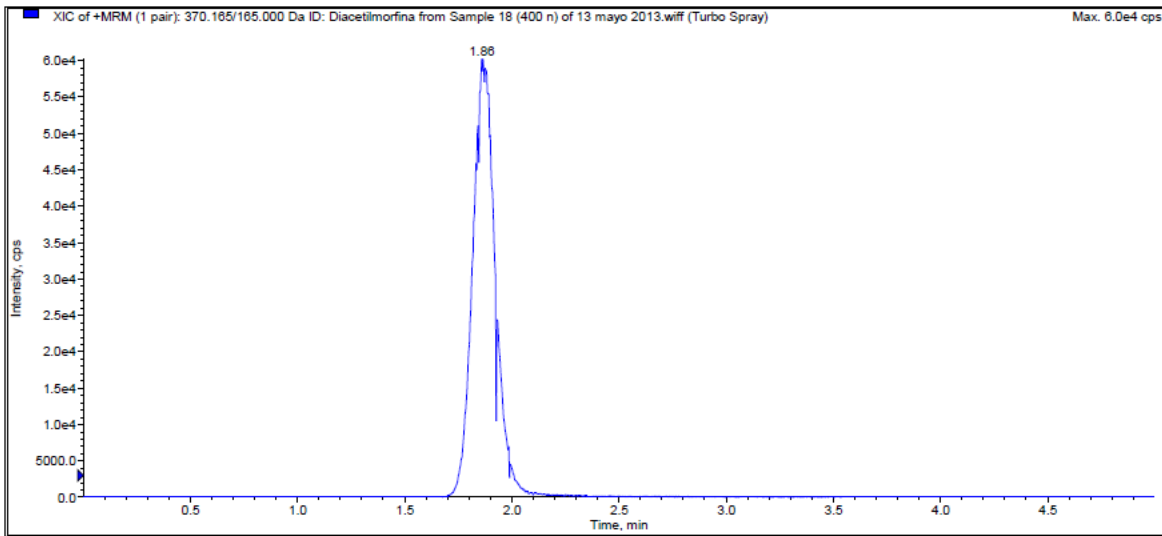


Figura no. 82 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 400 ng/ml.

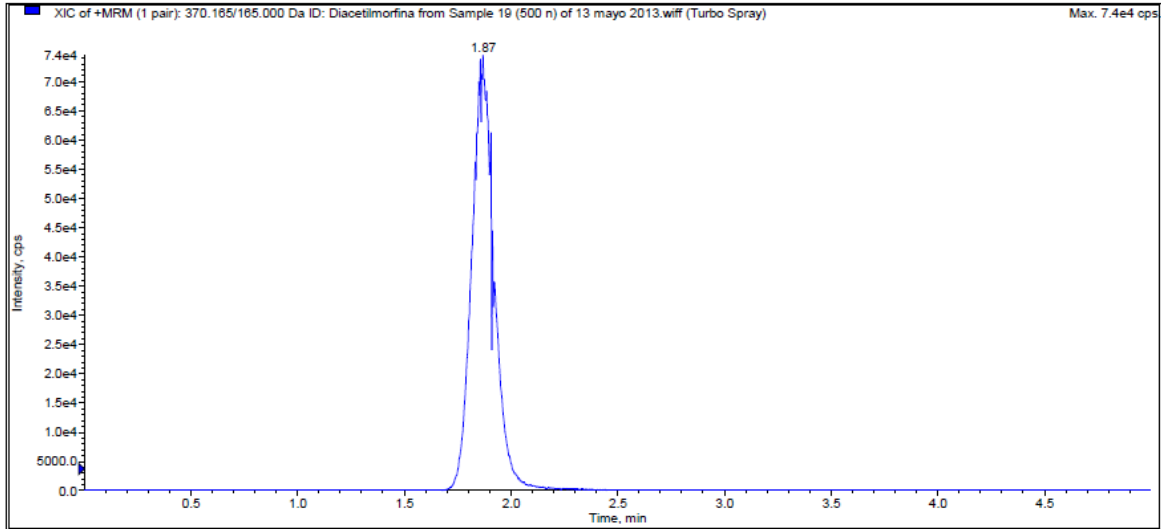


Figura no. 83 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 500 ng/ml.

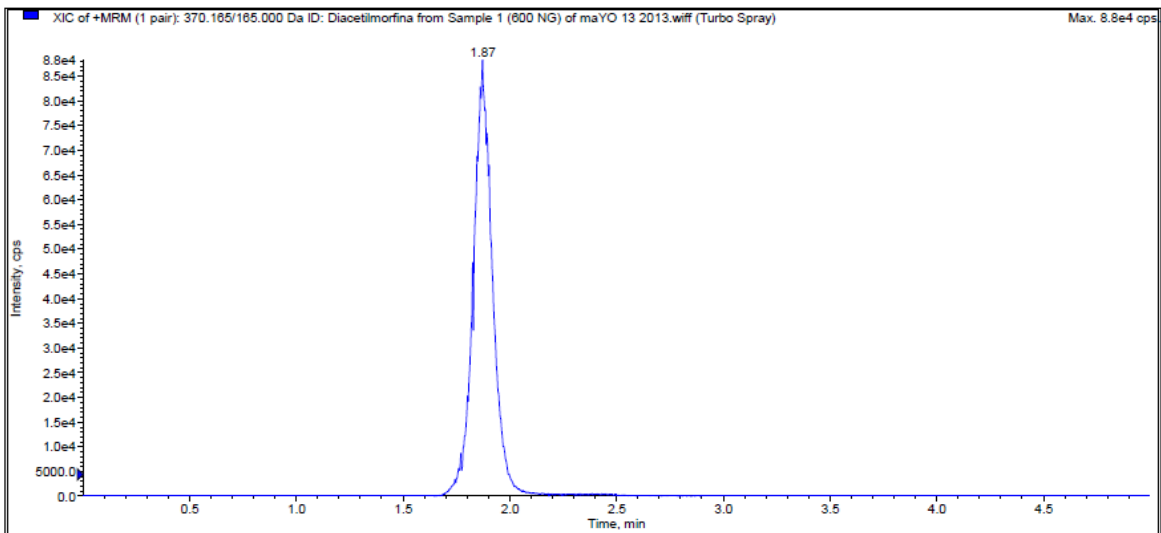


Figura no. 84 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 600 ng/ml.

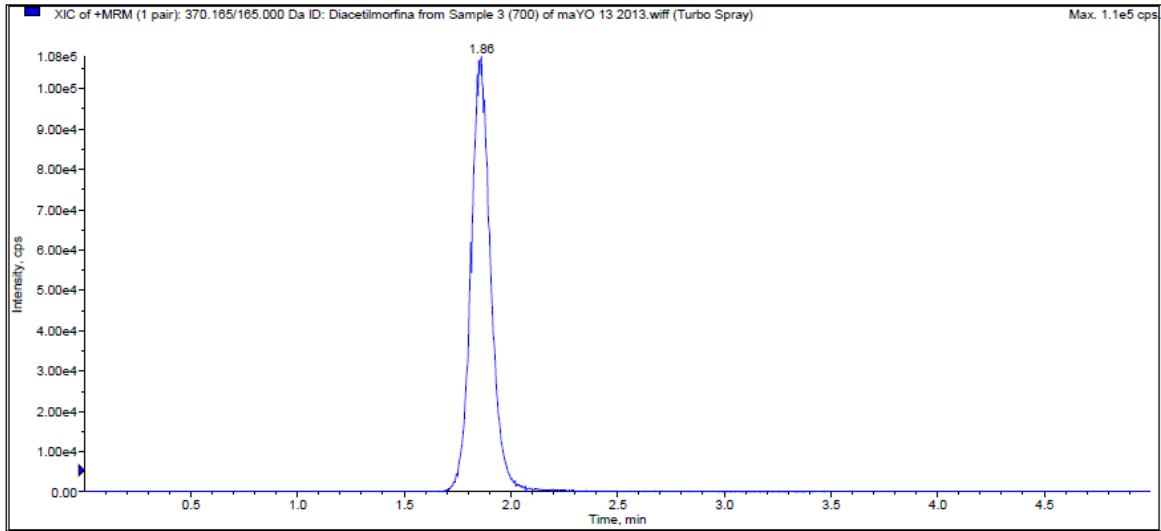


Figura no. 85 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 700 ng/ml.

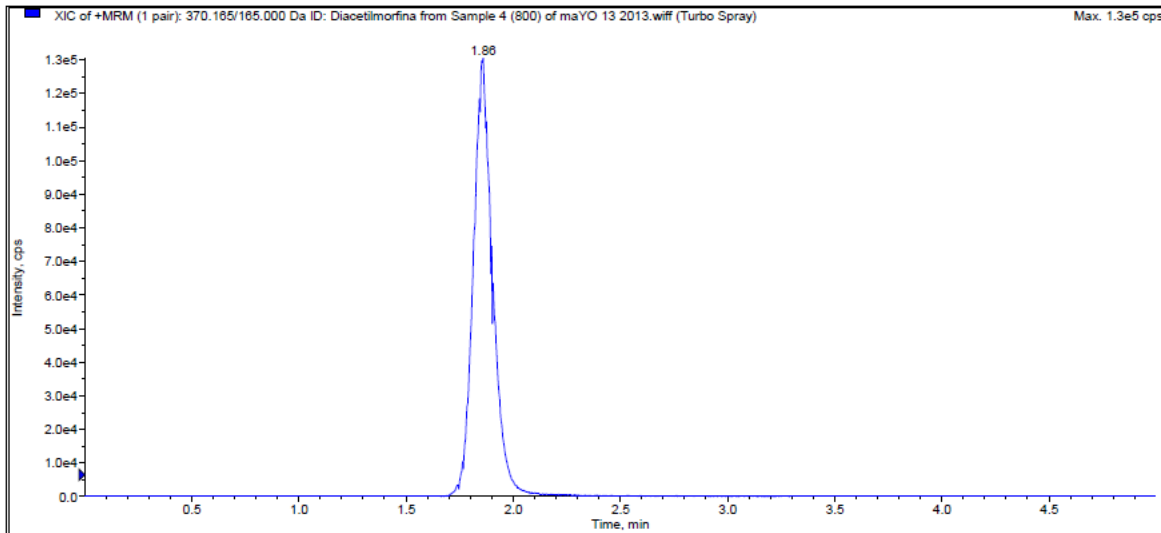


Figura no. 86 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 800 ng/ml.

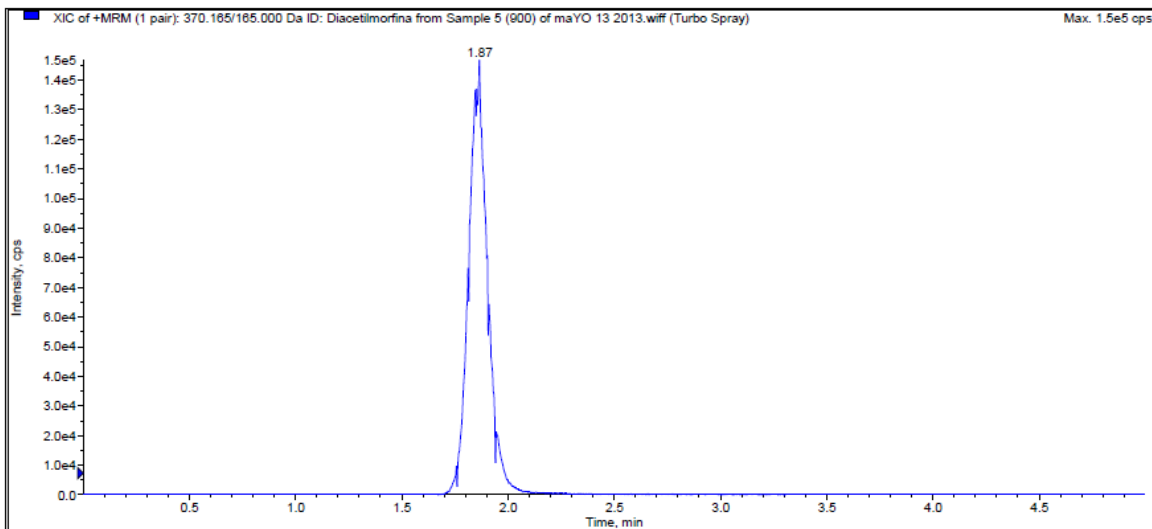


Figura no. 87 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 900 ng/ml.

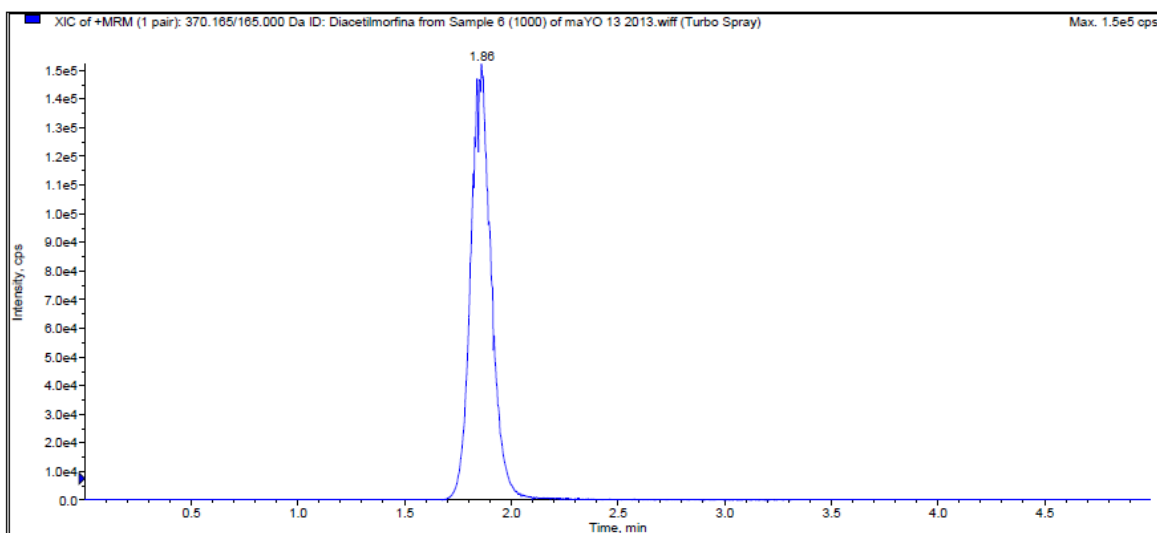


Figura no. 88 Cromatograma para Diacetylmorfina a concentración de 1000 ng/ml.

Se usó el estándar de Alprazolam para validar el procedimiento de detección de benzodiazepinas, en la tabla no.15 Se muestran los resultados en cuentas por segundo de las lecturas de este metabolito a las distintas concentraciones.

### CURVA DE CALIBRACION DE BENZOCIACEPINAS

Std de Alprazolam (ng/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	350	515	530
50	17,000	20,000	16,000
100	28,000	30,000	32,000
200	58,380	60,000	62,000
300	98,000	83,000	95,000
400	110,000	110,000	126,670
500	140,000	140,000	140,000
600	170,000	160,000	160,000
700	190,000	180,000	190,000
800	210,000	210,000	210,000
900	240,000	240,000	240,000
1000	260,000	250,000	

Tabla no. 15 Curva de calibración para Benzodiazepinas.

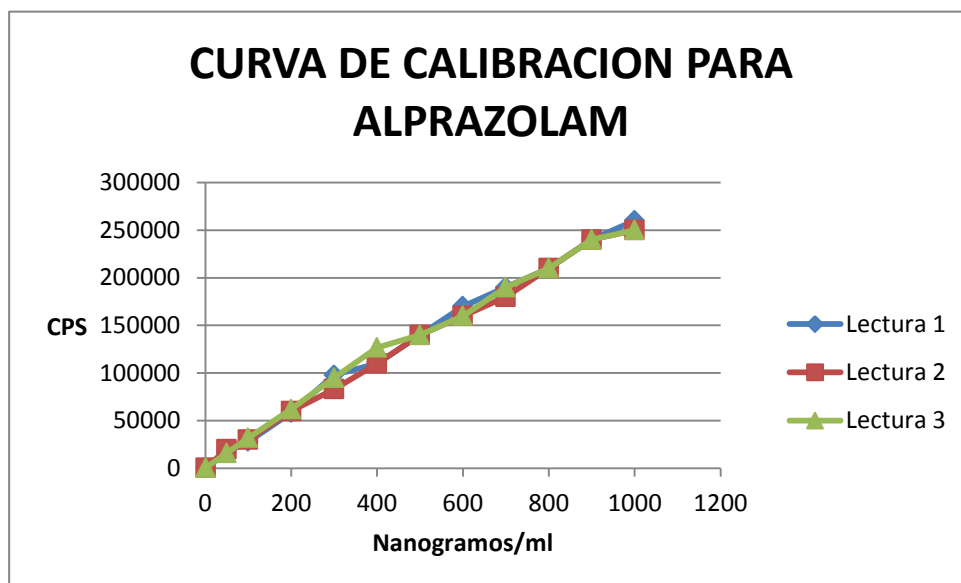


Figura no. 89 Curva de detección para Alprazolam.

En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas a distintas concentraciones para Alprazolam.

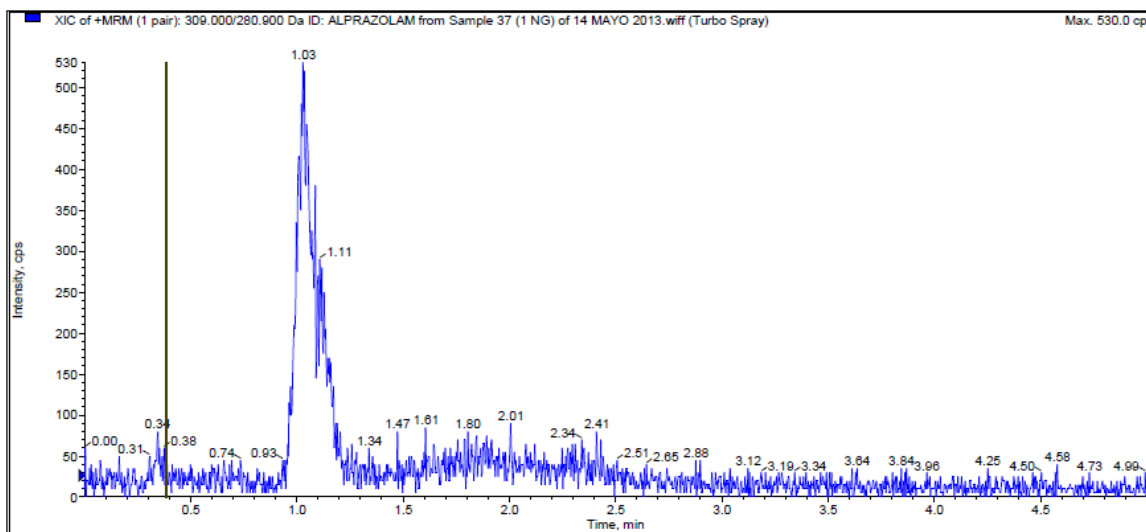


Figura no. 90 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 1 ng/ml

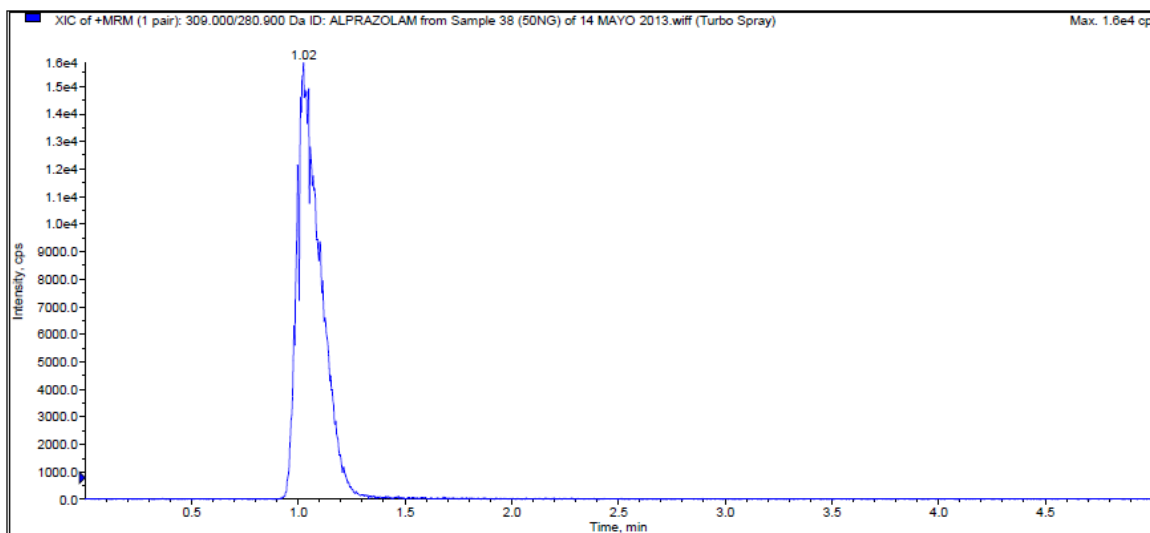


Figura no. 91 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 50 ng/ml

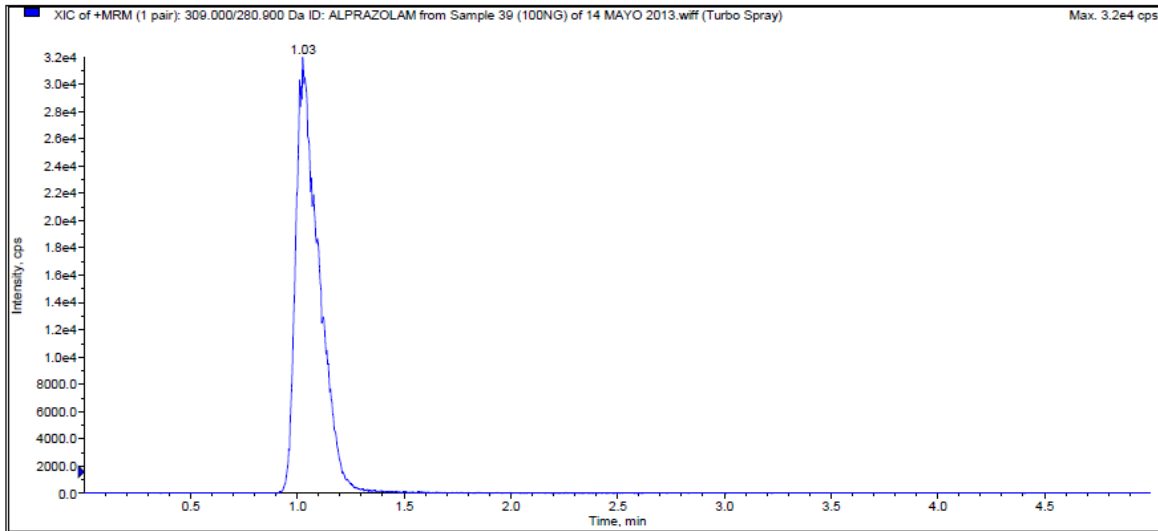


Figura no. 92 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 100 ng/ml

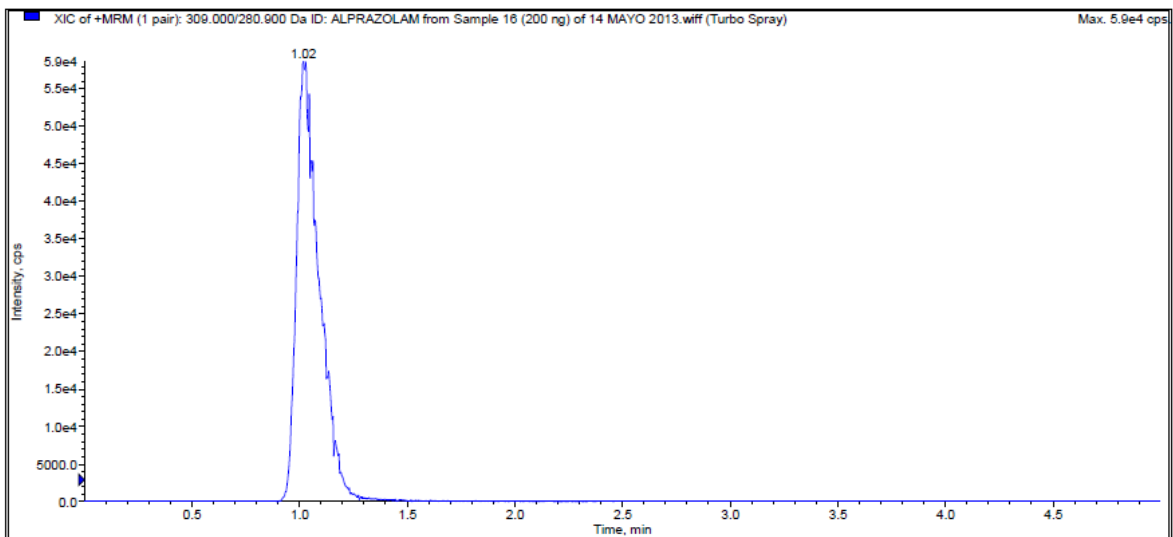


Figura no. 93 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 200 ng/ml

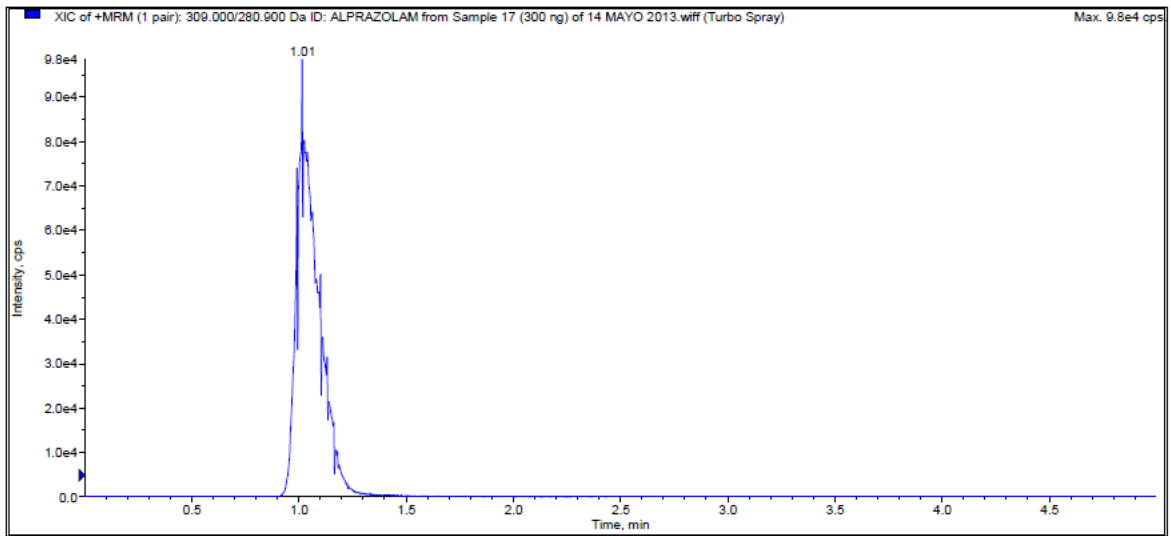


Figura no. 94 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 300 ng/ml

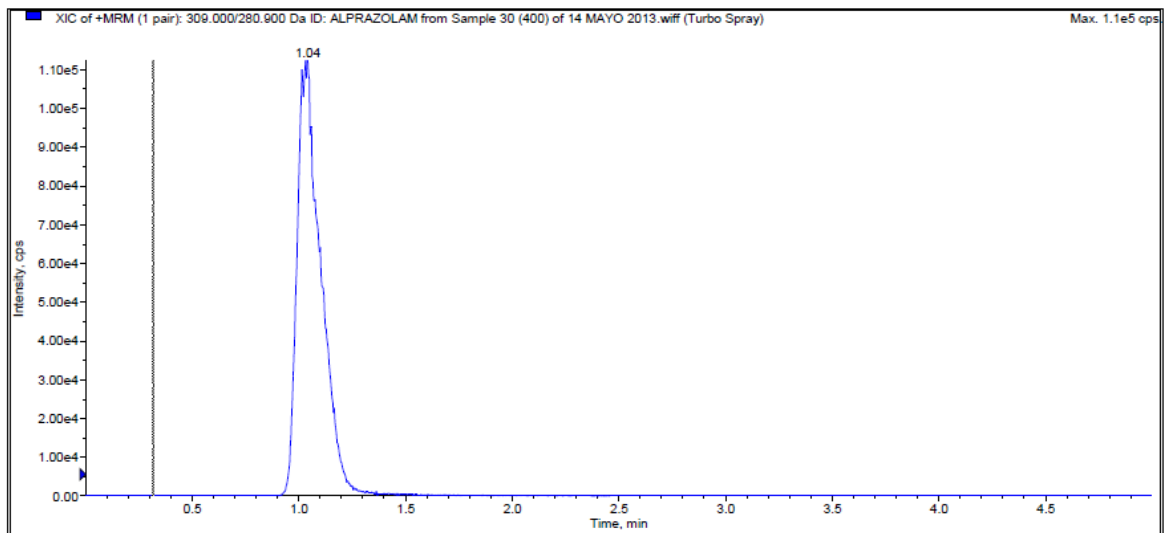


Figura no. 95 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 400 ng/ml

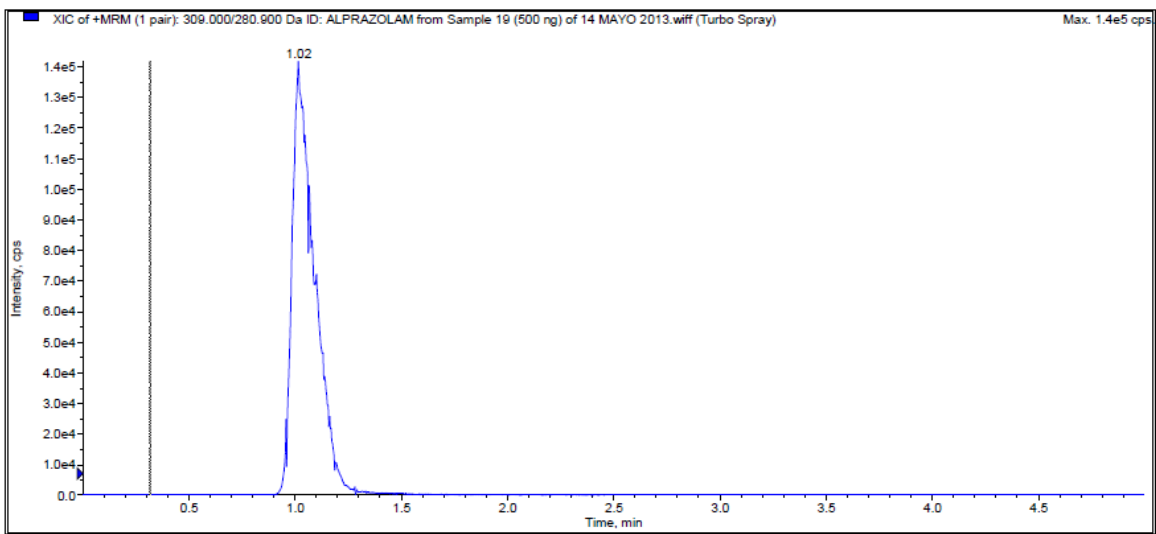


Figura no. 96 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 500 ng/ml

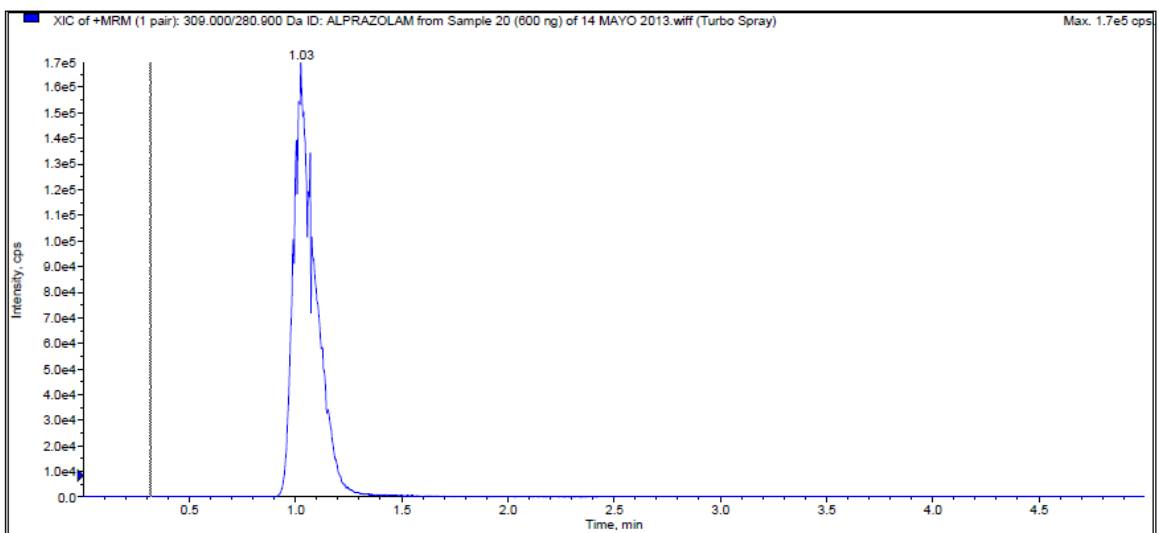


Figura no. 97 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 600 ng/ml

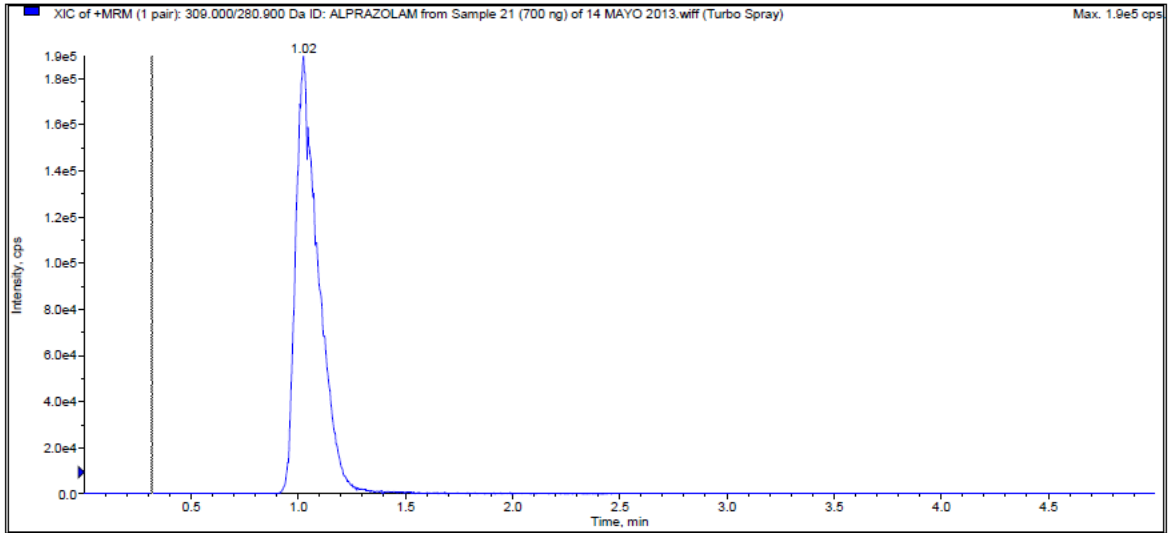


Figura no. 98 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 700 ng/ml

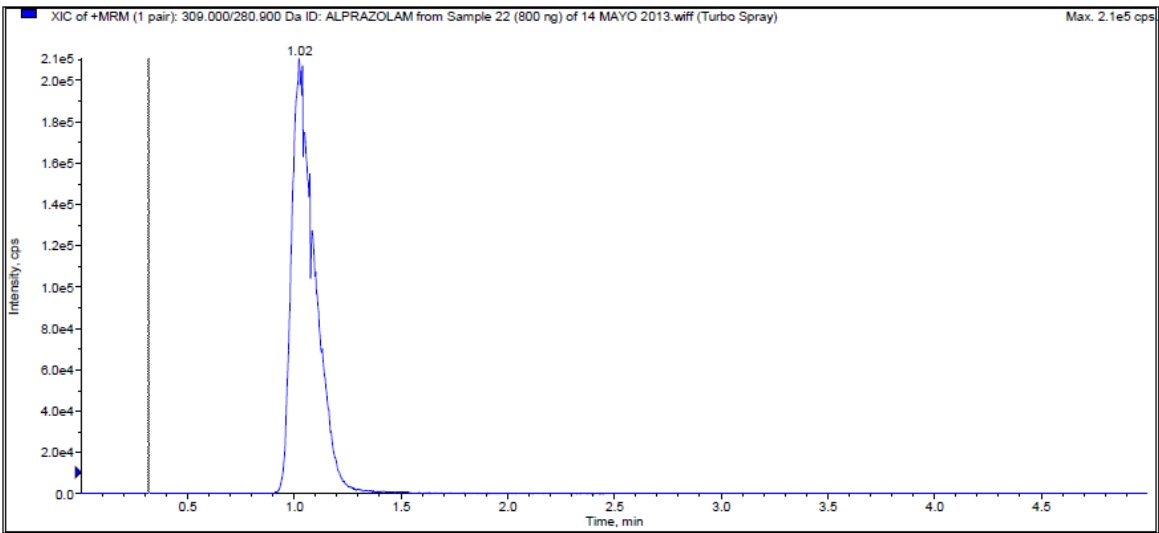


Figura no. 99 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 800 ng/ml

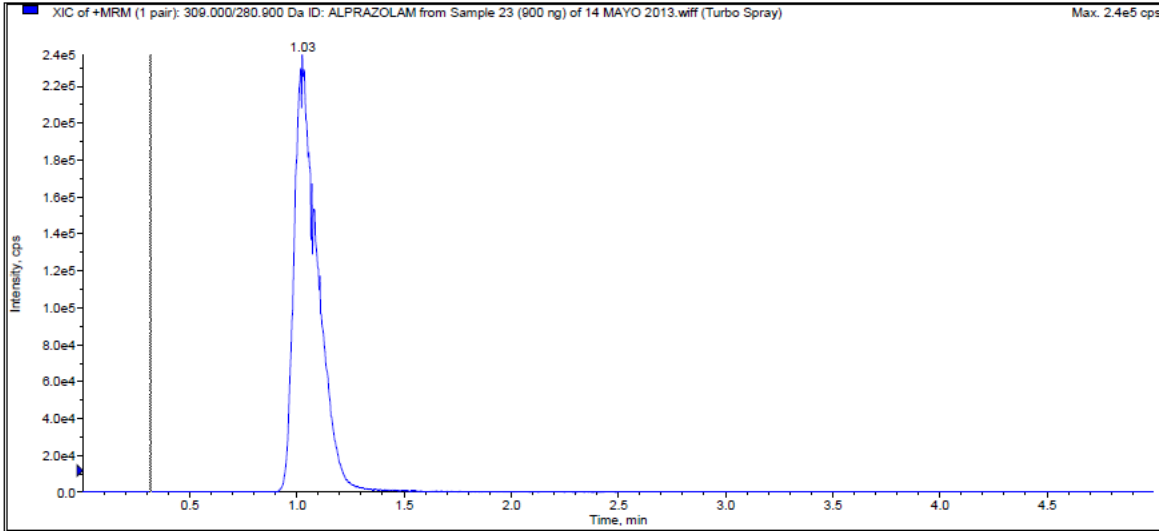


Figura no. 100 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 900 ng/ml

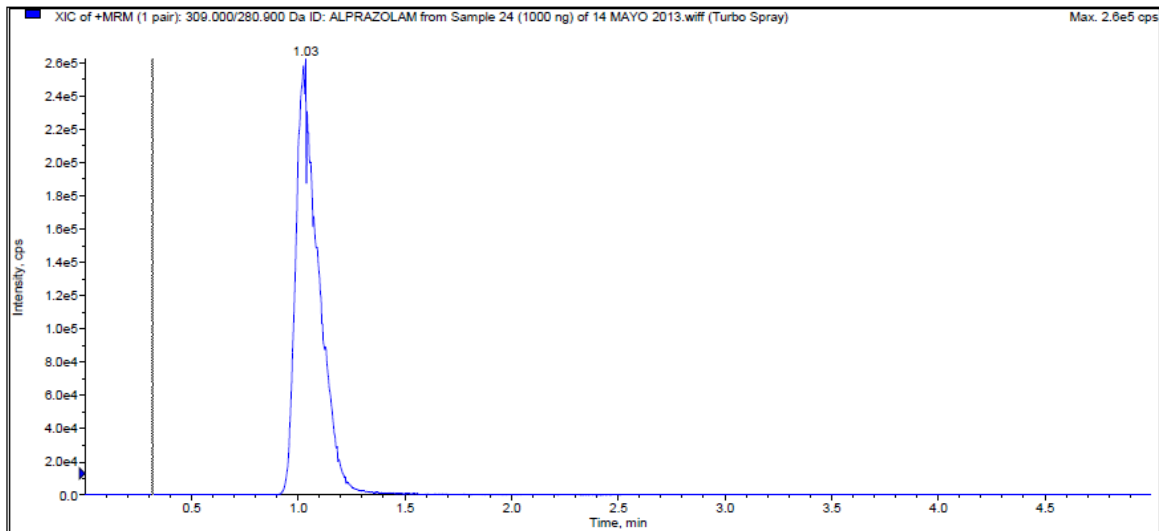


Figura no. 101 Cromatograma para Alprazolam a concentración de 1000 ng/ml

### 5.3.2 Límites de detección y cuantificación.

Para la obtención de los límites de detección se trabajó con concentraciones de los estándares de drogas que se encuentran en la parte inferior del rango lineal de la curva de calibración esto es por debajo de 1 ng/ml, para lo cual se prepararon soluciones de 1 a 30 picogramos por mililitro para los metabolitos de Cocaína, los resultados obtenidos se muestran en la tabla no.16.

#### LIMITE DE DETECCION DE COCAINA.

Estandar de Cocaína (pg/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	75	75	70
5	270	300	270
10	580	597	517
20	1,090	1,173	1,100
30	1,600	1,650	1,450

Tabla no.16 Se observa los límites de detección para los metabolitos de Cocaína.

En la figura no. 102 de puede observar el pico mínima detectable para cocaína con una relación señal ruido menor de 3.

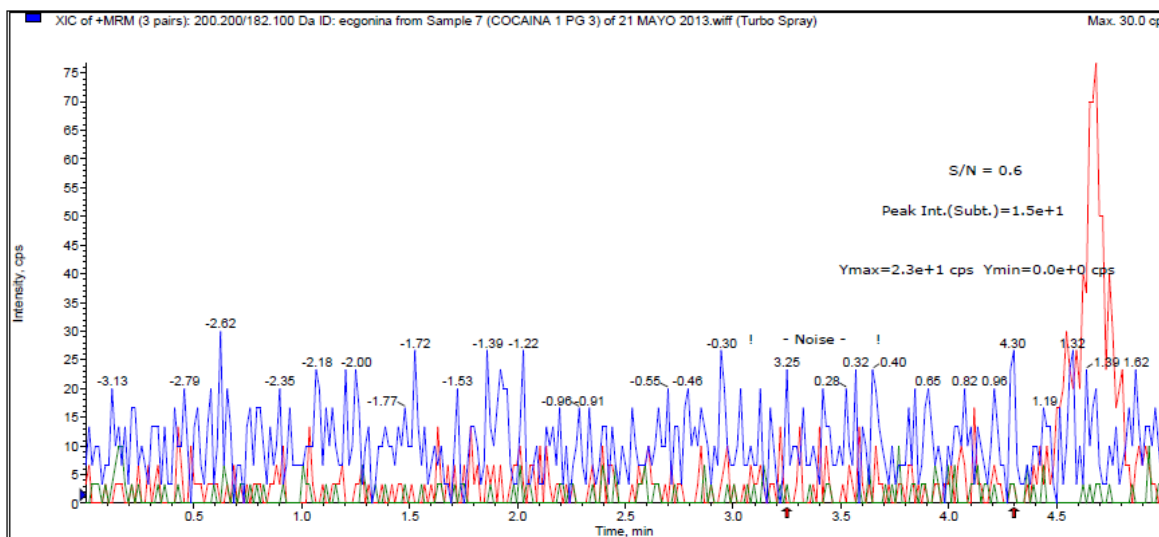


Figura no.102 Cromatograma de Cocaína 1 pg/ml

En la figura no. 103 se observa el cromatograma para la concentración de 5 pg/ml de cocaína cumpliendo la relación señal ruido igual o mayor a 3 por lo que se considera el límite de detección para cocaína.

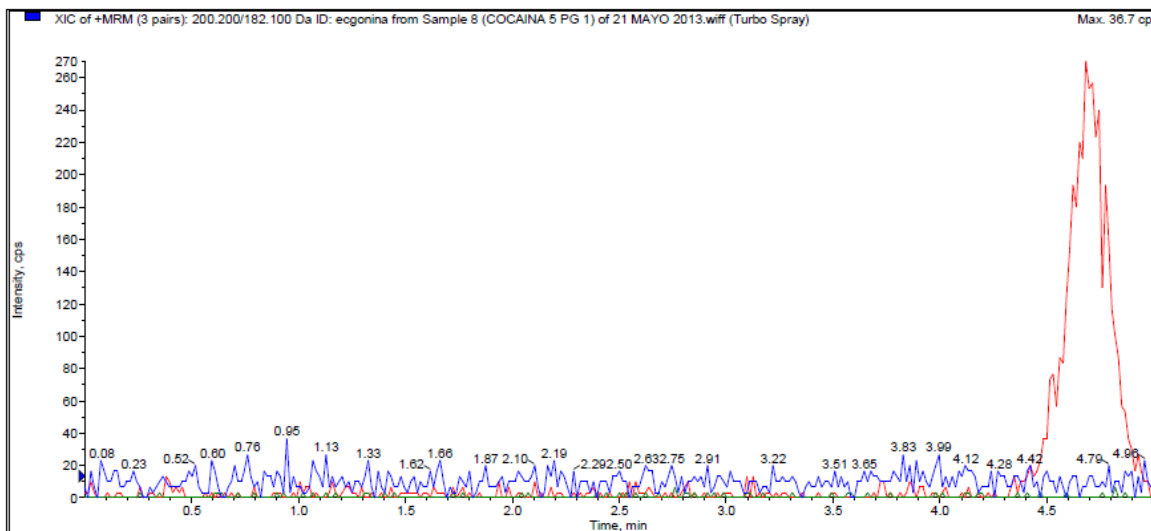


Figura no.103 Cromatograma de Cocaína 5 pg/ml.

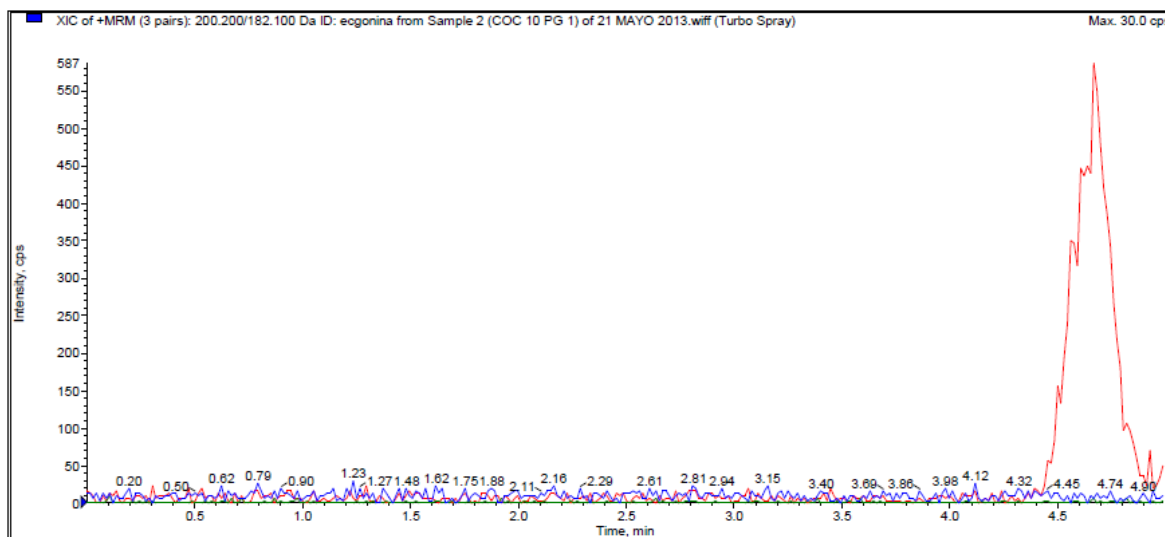


Figura no.104 Cromatograma de Cocaína 10 pg/ml.

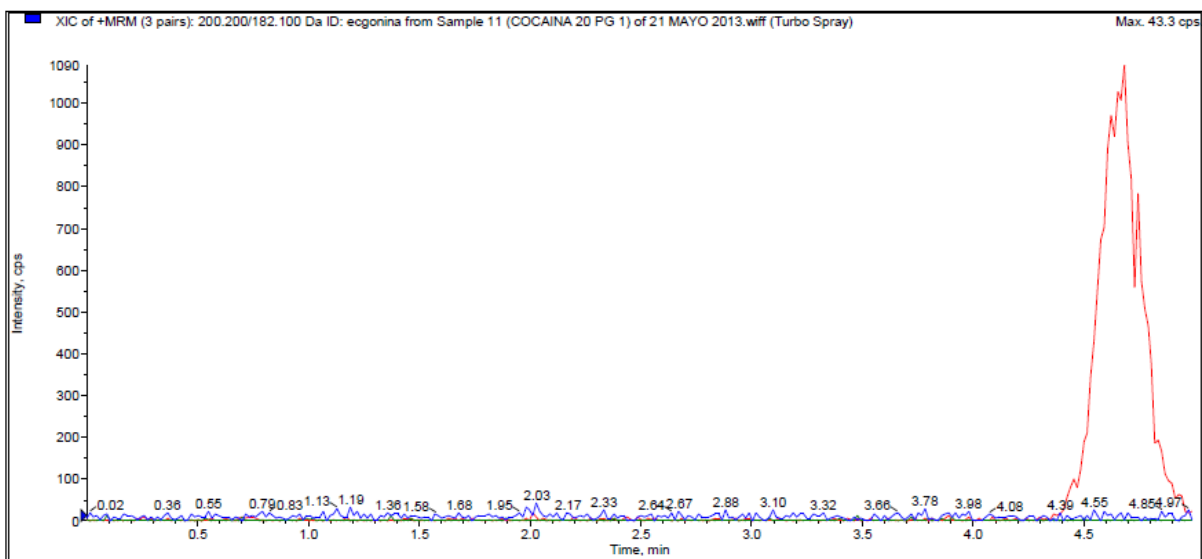


Figura no.105 Cromatograma de Cocaína 20 pg/ml.

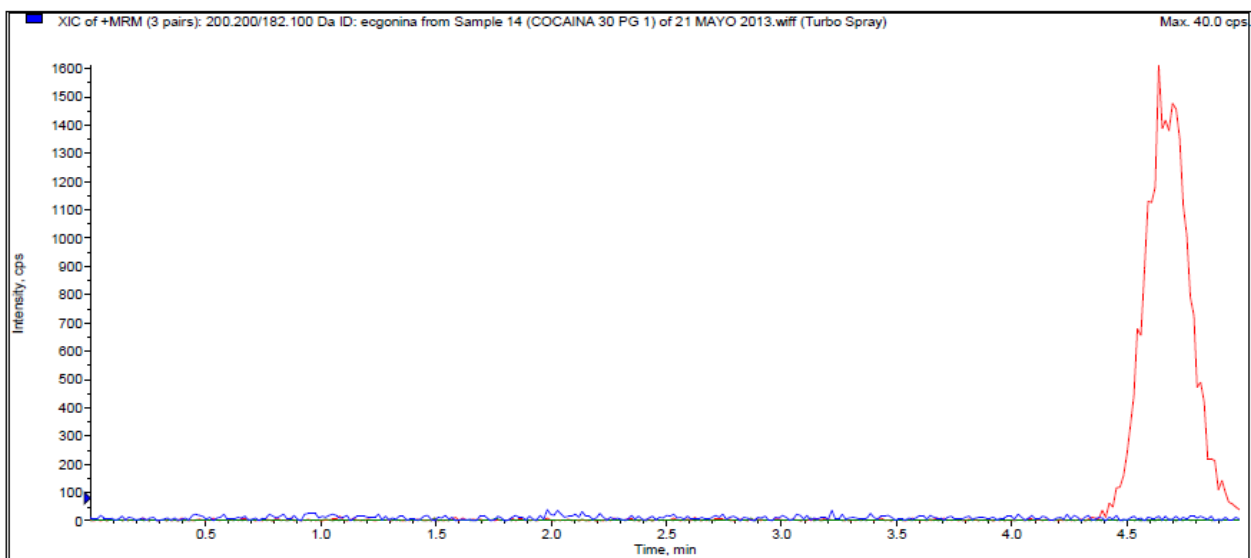


Figura no.106 Cromatograma de Cocaína 30 pg/ml

Para encontrar el límite de detección de Marihuana se usó el estándar de THC, se hicieron lecturas a concentraciones de: 1, 50,100 y 200 ng/ml con los siguientes resultados.

### LIMITES DE DETECCIÓN DE MARIHUANA.

Estandar de THC (ng/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	60	63	60
50	2,166	2,136	1,946
100	4,136	4,266	4,216
200	8,093	8,616	7,710

Tabla no.17 límites de detección para Marihuana.

En la figura no. 107 se muestra el pico cromatográfico para Marihuana a concentración de 1 ng/ ml, con una relación señal ruido igual a 3 por lo que se define como el límite de detección para marihuana 1 ng/ml.

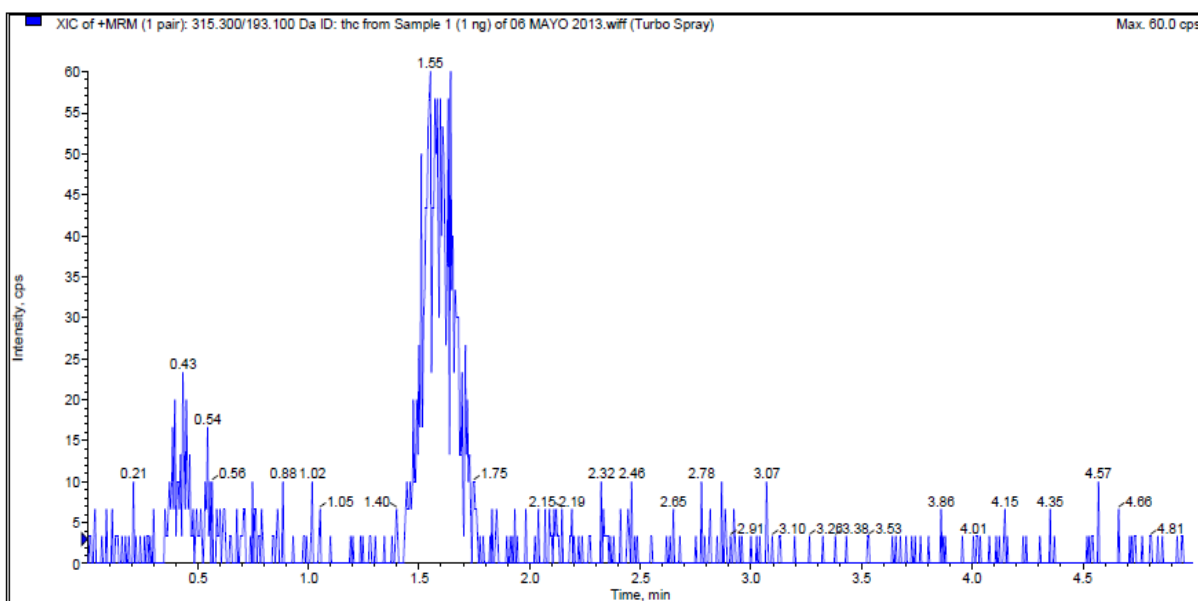


Figura no.107 Cromatograma de THC 1 ng/ml.

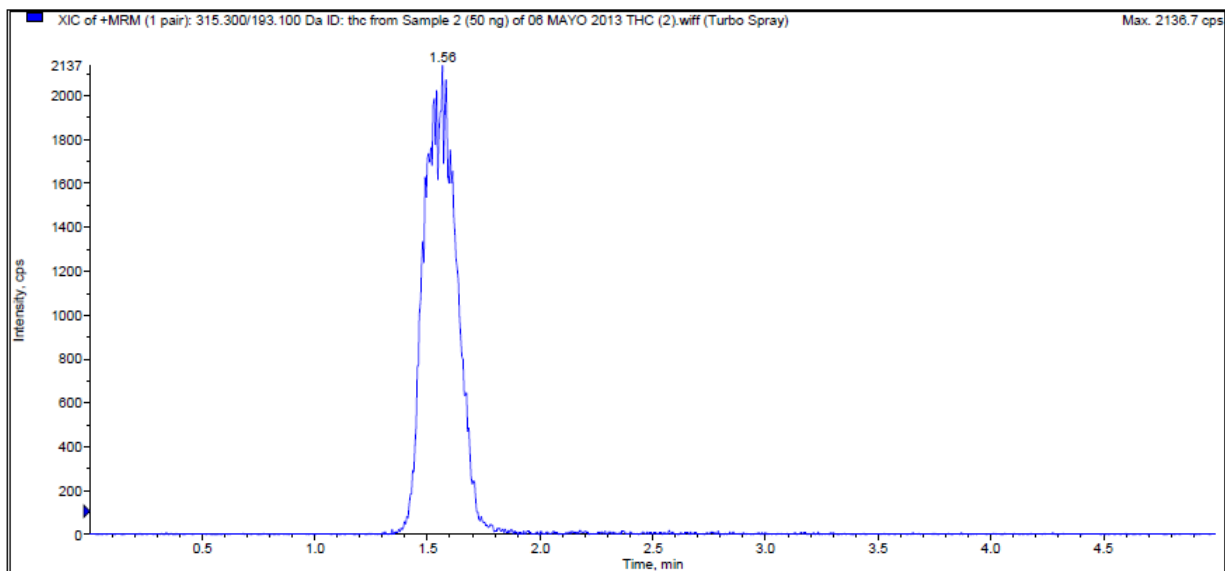


Figura no.108 Cromatograma de THC 50 ng/ml.

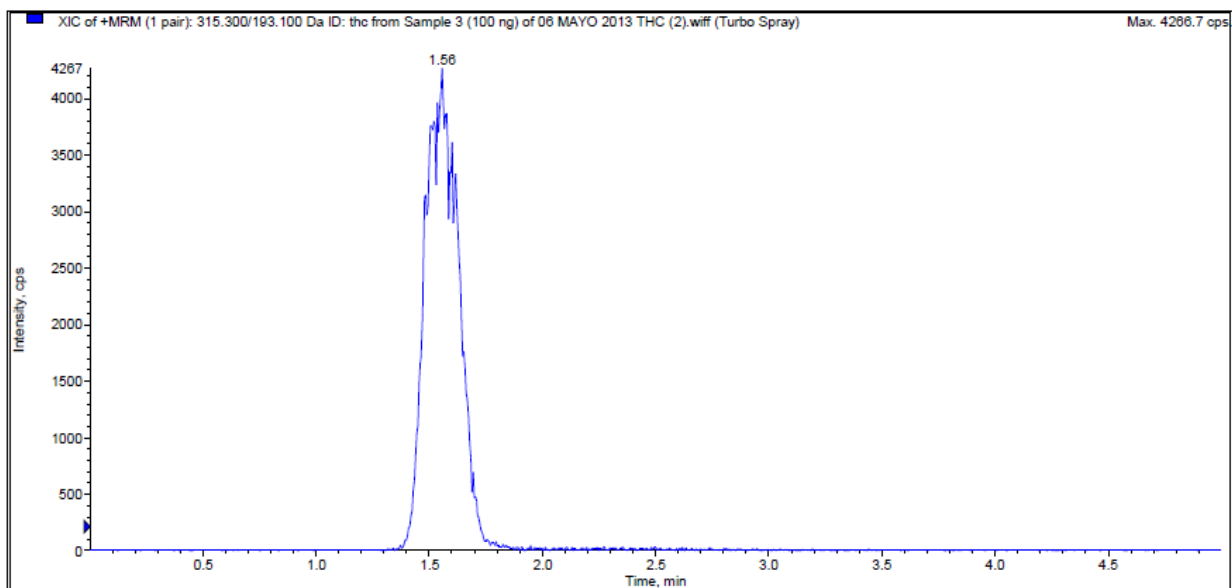


Figura no.109 Cromatograma de THC 100 ng/ml.

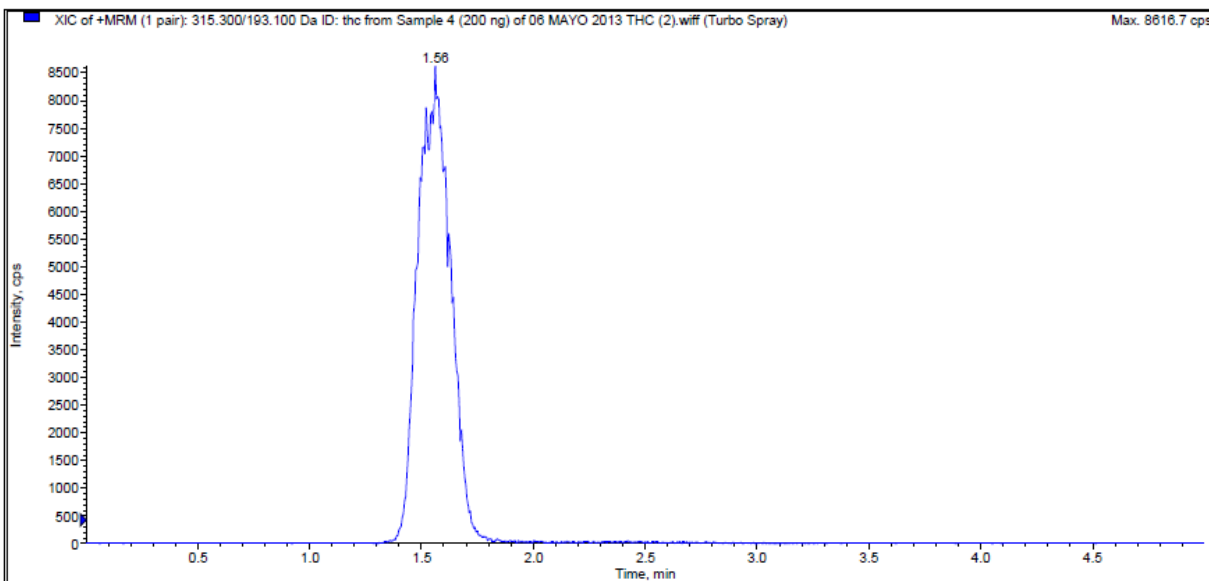


Figura no.110 Cromatograma de THC 200 ng/ml.

Para encontrar los límites de detección de Metanfetaminas se realizaron lecturas a concentración de: 100, 150, 200 y 300 pg/ml. En la tabla no16. Se muestran las lecturas obtenidas.

**LIMITE DE DETECCIÓN DE METANFETAMINA.**

<b>Estandar de Metanfetaminas (pg/ml)</b>	<b>Lectura 1</b>	<b>Lectura 2</b>	<b>Lectura 3</b>
<b>100</b>	110	113	130
<b>150</b>	160	166	166
<b>200</b>	170	173	173
<b>300</b>	266	253	266

Tabla no.18 Limite de detección para Metanfetaminas.

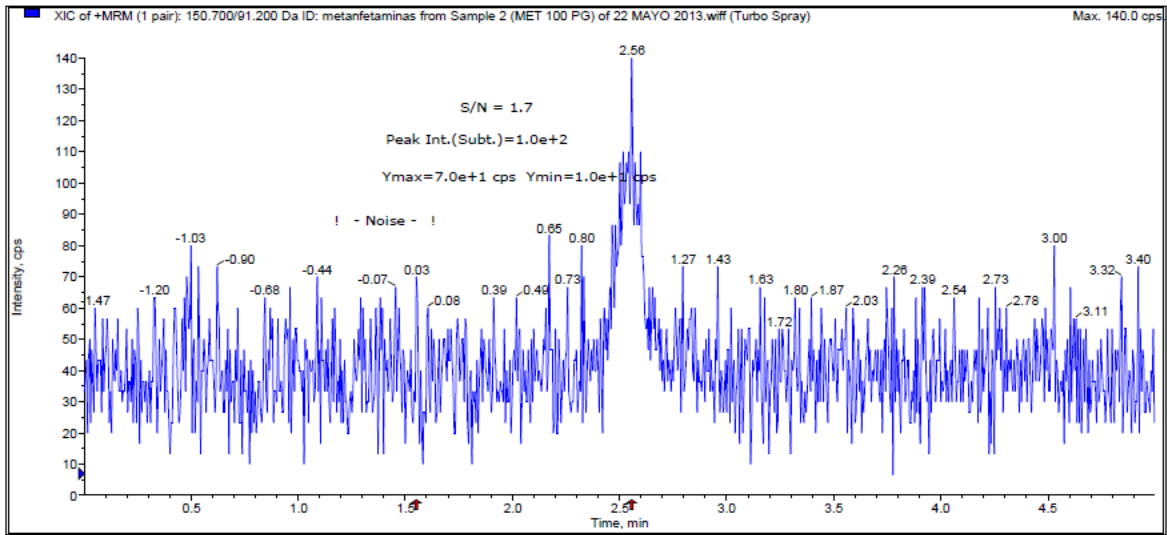


Figura no.111 Cromatograma de Metanfetamina 100 pg/ml.

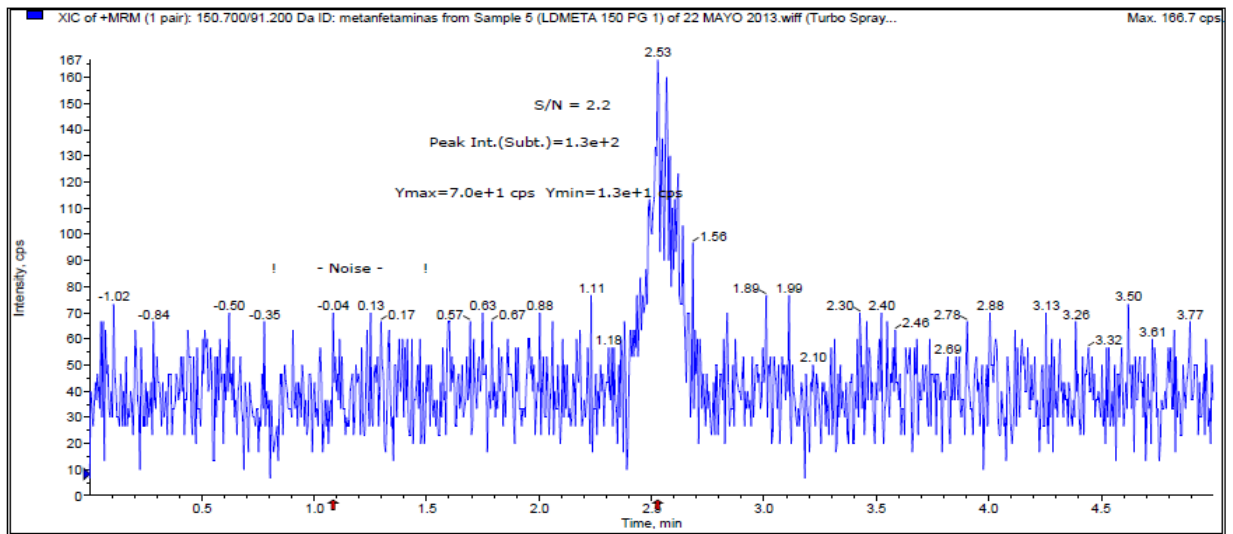


Figura no.112 Cromatograma de Metanfetamina 150 Pg/ml.

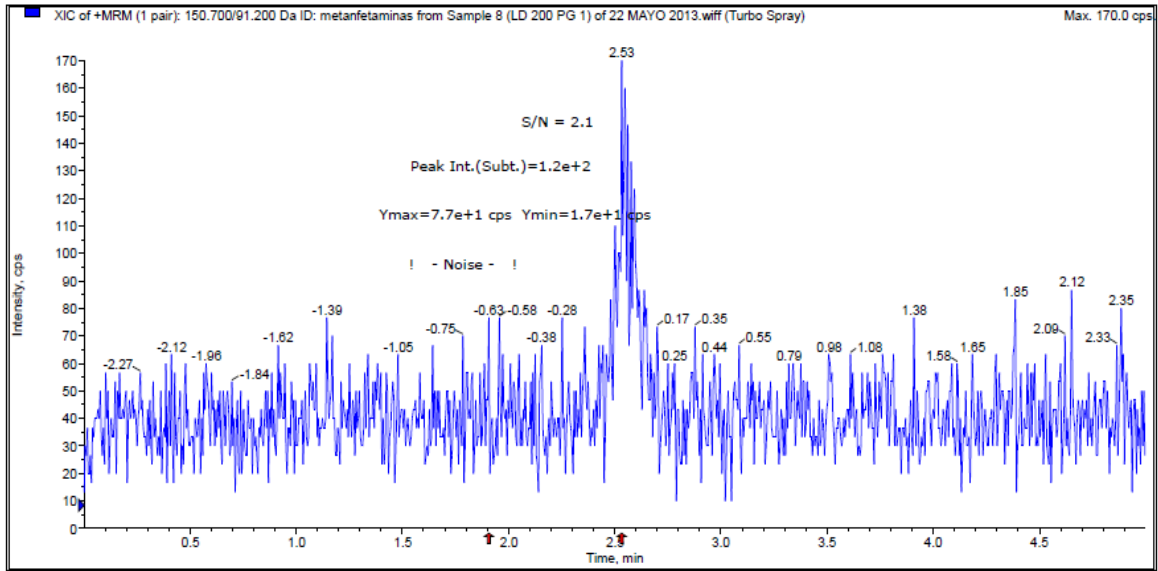


Figura no.113 Cromatograma de Metanfetamina 200 Pg/ml.

En la figura no. 114 se observa el cromatograma con el pico de detección para metanfetaminas con el valor señal ruido igual a 3 por lo que se considera el límite de detección para metanfetaminas.

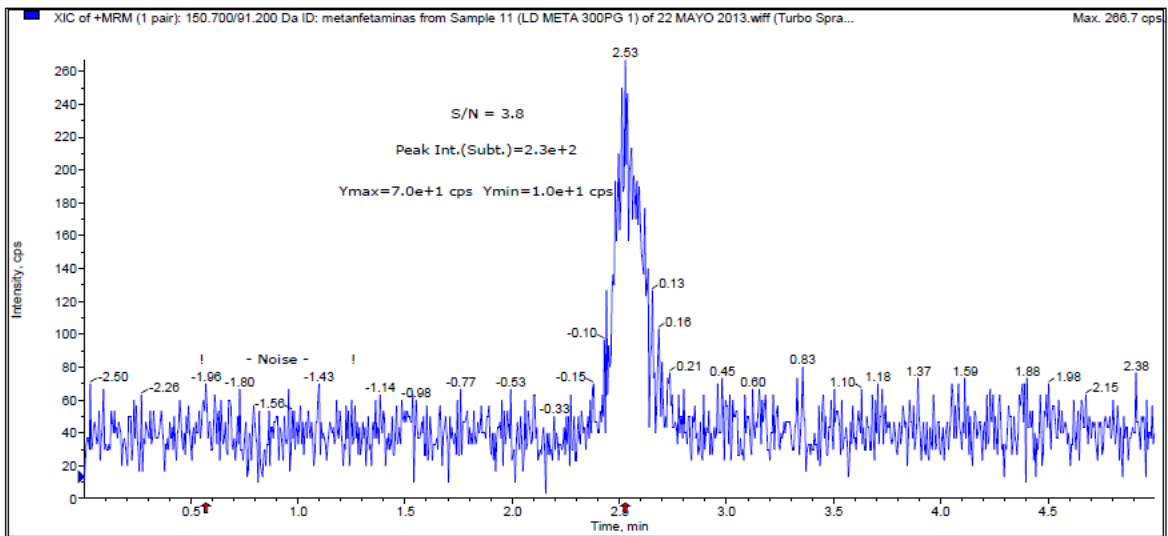


Figura no.114 Cromatograma de Metanfetamina 300 Pg/ml.

Para los límites de detección de anfetaminas se hicieron lecturas a concentraciones de: 100,250, 5000 y 1000 pg/ml los resultados se muestran en la tabla no17.

### LIMITE DE DETECCIÓN DE ANFETAMINAS.

Estandar de Anfetaminas (pg/ml)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
100	ND	ND	ND
250	230	240	220
500	510	510	470
1000	1,010	1,050	1,351

Tabla no.19 Limite de detección para Anfetaminas.

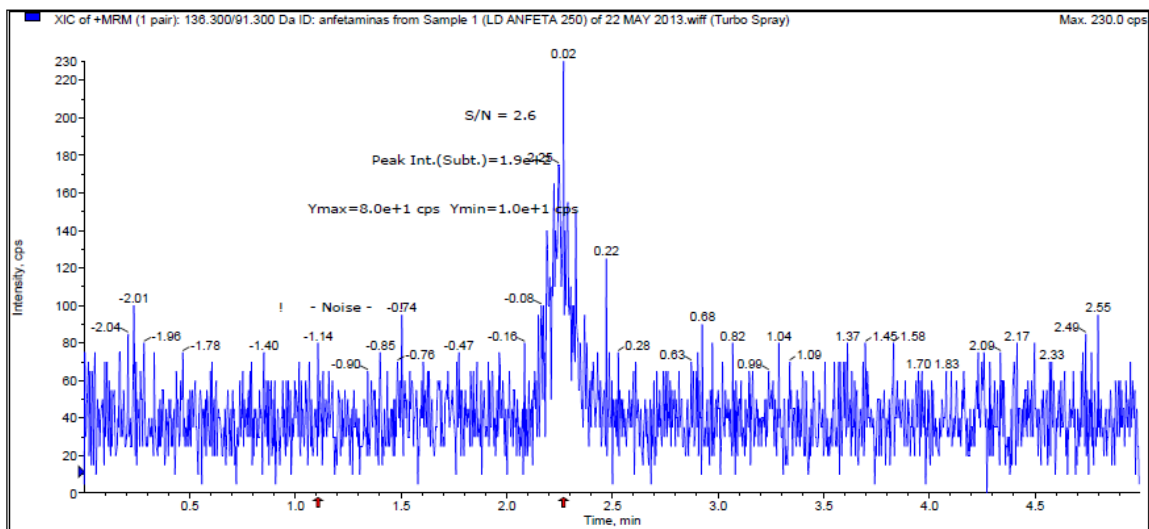


Figura no.115 cromatograma de Anfetamina a 250pg/ml

En la figura no. 116 se observa el límite de detección para Anfetamina 500 pg/ml.

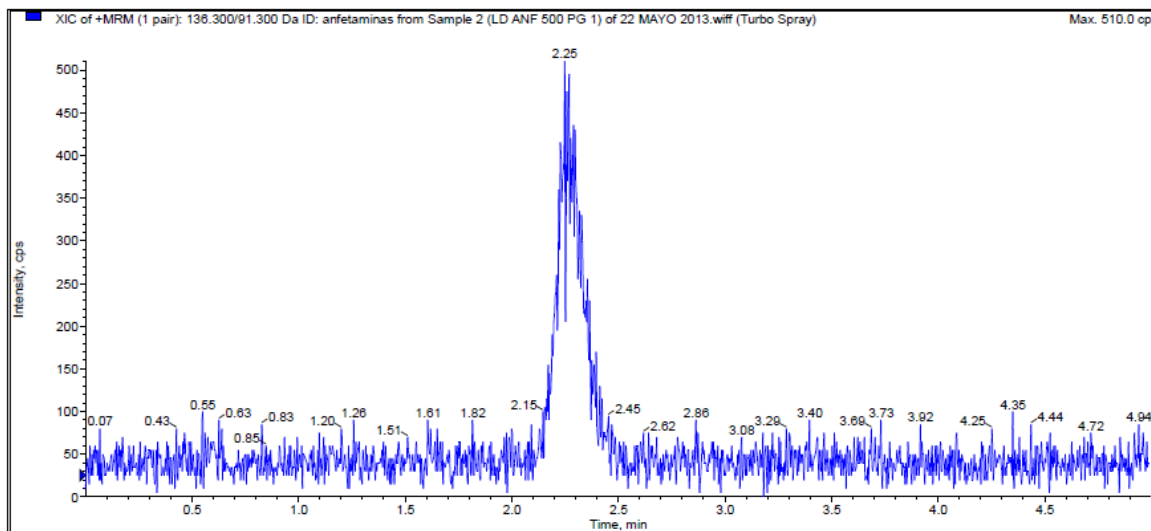


Figura no. 116 cromatograma de Anfetamina a 500 pg/ml.

Para encontrar el límite de detección de opiáceos se realizaron diluciones del metabolito Diacilmorfina a concentraciones de: 100, 250, 500 y 750 pg/ml.

#### LIMITE DE DETECCIÓN PARA DIACETILMORFINA.

Estandar de Diacetil morfina (pg/ml)	Lectura 1 CPS	Lectura 2 CPS	Lectura 3 CPS
100	ND	ND	ND
250	45	45	45
500	95	90	95
750	115	130	130

Tabla no.20 Limite de detección para Diacilmorfina.

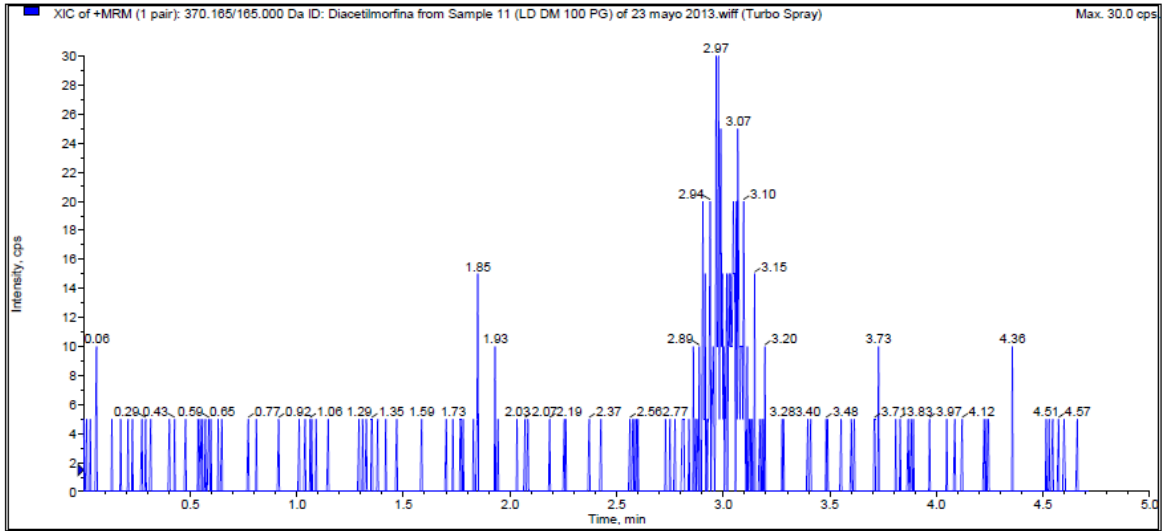


Figura no. 117 cromatograma para Diacetylmorfina 100 pg/ml.

En la figura no. 119 se observa el límite de detección de Diacetylmorfina igual a 250 pg/ml.

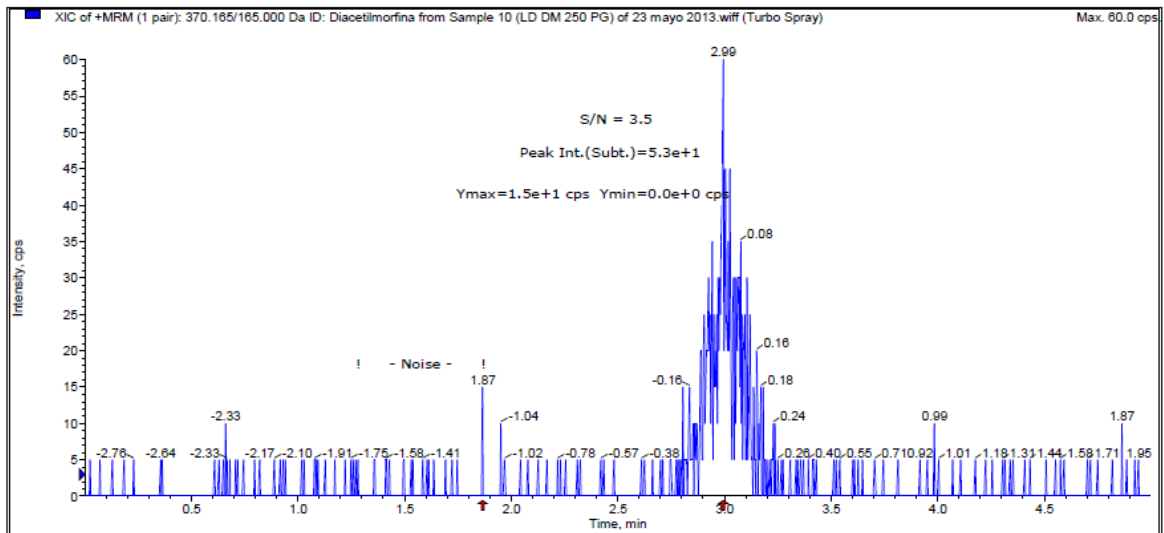


Figura no. 118 cromatograma para Diacetylmorfina 250 pg/ml.

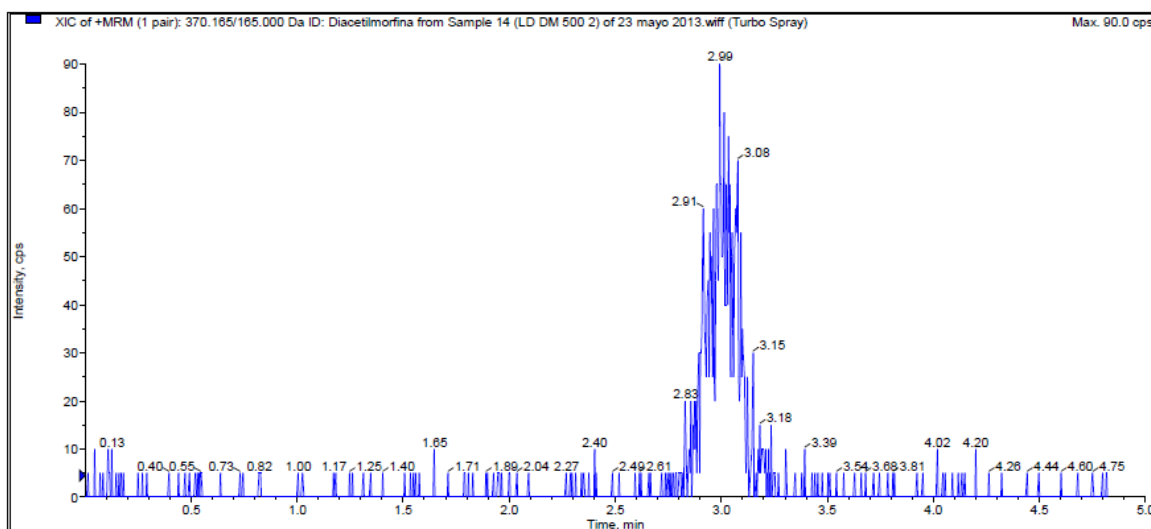


Figura no. 119 cromatograma para Diacetilmorfina 500 pg/ml

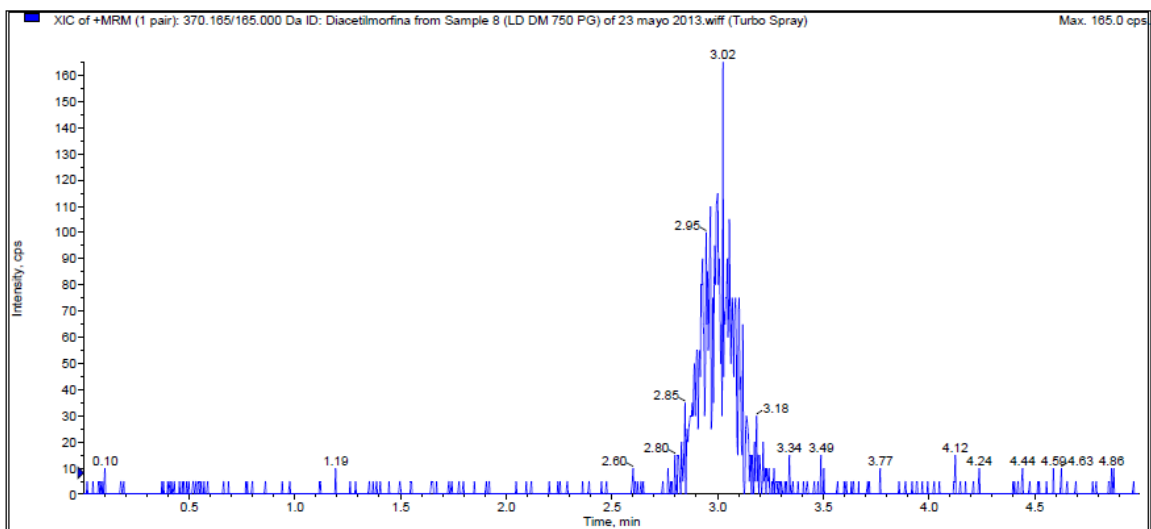


Figura no. 120 cromatograma para Diacetilmorfina 750 pg/ml.

Para encontrar los límites de detección de Benzodiazepinas se trabajó con el estándar de Alprazolam a concentraciones de 50,100,500 y 1000 pg/ml

## LIMITE DE DETECCIÓN DE ALPRAZOLAM

Estándar de Alprazolam (pg/ml)	Lectura 1 cps	Lectura 2 cps	Lectura 3 cps
<b>50</b>	ND	ND	ND
<b>100</b>	50	50	50
<b>500</b>	235	235	230
<b>1000</b>	420	400	418

Tabla no.21 Limite de detección para Alprazolam.

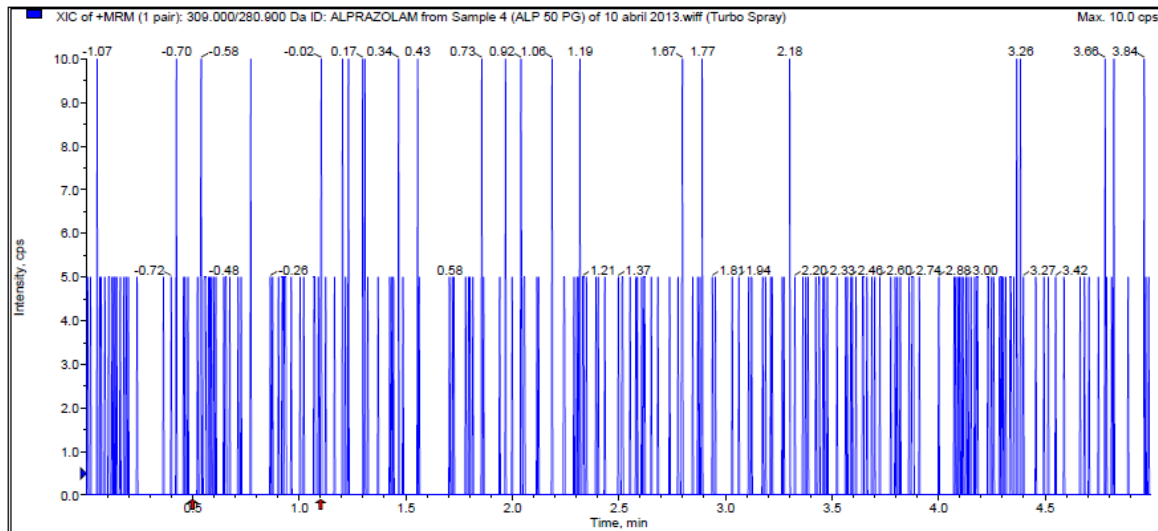


Figura no.121 Cromatograma para Alprazolam a 50 pg/ml

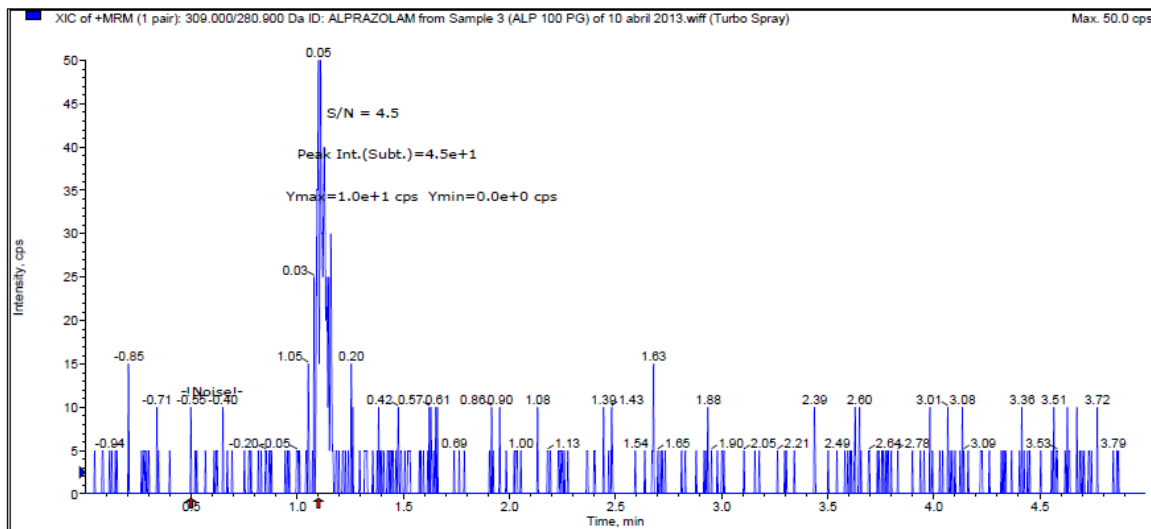


Figura no. 122 cromatograma para Alprazolam a 100 pg/ml.

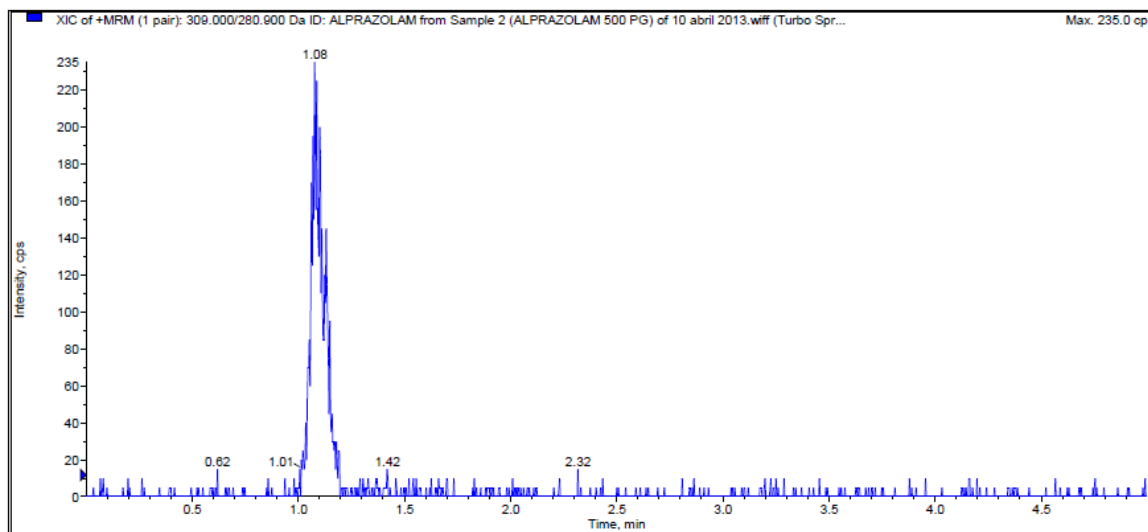


Figura no. 123 cromatograma para Alprazolam a 500 pg/ml.

## **CONCLUSIONES:**

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Las transiciones Q1-Q3, así como cada uno de los parámetros de voltaje y las energías de colisión optimizadas son adecuadas para la determinación de cocaína, anfetaminas, metanfetaminas, opiáceos, marihuana y benzodiazepinas.
- En general se encontró que el método para cada uno de los metabolitos de drogas se mantiene lineal en el rango de 1 a 1000 ng/ml
- El límite de detección para marihuana encontrado fue de 1 ng/ml:
- El límite de detección para: Cocaína, metanfetaminas, anfetaminas, opiáceos y benzodiazepinas encontrado fueron a concentraciones de pico gramos.
- Se probó que, mediante la aplicación del método de HPLC/MS se reduce significativamente el límite de detección, por lo cual se trata de una técnica altamente sensible apropiada para realizar pruebas confirmatorias para drogas de abuso.

## **BIBLIOGRAFIA:**

- 1.- John A. Bevan. Fundamentos de farmacología, 2da edición. Ed. Harla. Paginas: 3,10-17.
- 2.- Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 12va edición. Ed Mc Graw Hill. Paginas: 229, 297-299, 473-484, 661-663.
- 3.- The Merck Index. 11va edición. Editorial Centennial. Páginas: 63, 5872 .
- 4.- Skoog and Leary. Analisis instrumental,4ta edición. Ed. Mc Graw Hill. Paginas:493-536, 674-680, 730 –746.
- 5.- Robert J. Flanagan. Fundamentals of Analytical Toxicology. Ed Wiley. Paginas. 249-278.