

**ESTUDIO COMPARATIVO Y ANÁLISIS SIMULTÁNEO POR GC-MS, GC-MS/MS
Y LC-MS/MS DE DROGAS RELACIONADAS CON DELITOS SEXUALES Y
HURTOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS FORENSE**

LUZ ADRIANA MONSALVE SALAMANCA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

**ESTUDIO COMPARATIVO Y ANÁLISIS SIMULTÁNEO POR GC-MS, GC-MS/MS
Y LC-MS/MS DE DROGAS RELACIONADAS CON DELITOS SEXUALES Y
HURTOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS FORENSE**

LUZ ADRIANA MONSALVE SALAMANCA

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Química

Directora:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D

Co-director

JAIRO R. MARTÍNEZ, Químico, Ph.D

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. MARCO TEÓRICO.....	19
1.1. DROGAS DE ABUSO	19
1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO	21
1.2.1 Drogas depresoras.....	21
1.2.2 Drogas estimulantes.....	21
1.2.3 Drogas psicomiméticas.	22
1.3. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO FORENSE DE DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	22
1.3.1 Obtención y selección de las muestras biológicas.	22
1.3.2 Métodos analíticos empleados para la detección de drogas.	23
1.3.2.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	24
1.3.2.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.	28
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	34
3.1.1 Reactivos, materiales y equipos.....	34
3.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	35
3.2.1 Muestras de orina.....	35
3.2.2 Muestra de sangre.....	35
3.3 EXTRACCIÓN DE LAS DROGAS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	36
3.3.1 Verificación de las condiciones de extracción.	36
3.3.2 Preparación de las muestras.....	36
3.4 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	37
3.4.1 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas. ...	37
3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo.....	38

3.4.3	Cromatografía líquida con espectrómetro de masas y analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo.	40
3.5	DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.....	41
3.5.1	Evaluación de la precisión.	41
3.5.2	Evaluación de la exactitud.	41
3.5.3	Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.	42
3.5.4	Determinación de los límites de detección y de cuantificación para los compuestos analizados.	42
3.6	EVALUACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE CASOS FORENSES	43
4.1	ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.....	44
4.1.1	Evaluación de la precisión.	45
4.1.2	Evaluación de la exactitud.	47
4.1.3	Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.	50
4.1.4	Determinación de los límites de detección y de cuantificación para los compuestos analizados.	51
4.2	ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS, CON ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO.....	53
4.2.1	Monitoreo de reacciones múltiples (MRM).	54
4.2.1.1	Aplicación del método a casos forenses.	58
4.3	ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y ANALIZADOR CUADRUPOLO-TIEMPO DE VUELO. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.	59
4.3.1	Evaluación de la precisión.	60
4.3.2	Evaluación de la exactitud.	63
4.3.3	Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.	65
4.3.4	Determinación de los límites de detección y de cuantificación para los compuestos analizados.	67
4.4	EVALUACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE CASOS FORENSES.	69

5. CONCLUSIONES.....	72
6. RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	82

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, MS/QqQ, operado en el modo de monitoreo de reacciones múltiples, MRM [32].	28
Figura 2. Mecanismo de ionización ESI [41].	29
Figura 3. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 7890 Series GC System</i> , acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5975</i> , equipado con un puerto de inyección <i>Split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7683 Series</i> . Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de instrumentación, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Bucaramanga, el 12 de febrero de 2015.	38
Figura 4. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 7890 Series GC System</i> , acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 7000</i> con analizador de cuadrupolo triple, equipado con un puerto de inyección <i>Split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7683 Series</i> . Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 16 de abril de 2015.	39
Figura 5. Cromatógrafo líquido <i>Agilent Technologies 1260</i> acoplado a espectrómetro de masas <i>Agilent Technologies 6530</i> con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo, equipado con un inyector automático <i>Agilent G1367E</i> y una bomba binaria <i>Agilent G1312B</i> . Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de instrumentación, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Bucaramanga, el 12 de febrero de 2015.	40
Figura 6. Perfil cromatográfico típico de una mezcla de estándares de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, concentración 100 mg/L, columna DB-5 (30 m). <i>Pulsed splitless</i> . MSD (EI, 70 eV).	44
Figura 7. Perfil cromatográfico típico de una mezcla de estándares de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, concentración 100 mg/L, columna DB-5 (60 m). <i>Pulsed splitless</i> . MSD (EI, 70 eV). Modo de adquisición <i>full scan</i>	54
Figura 8. Variaciones en las abundancias para las drogas analizadas por GC-QqQ-MS, al emplear 4 energías de colisión.	56
Figura 9. Cromatograma de iones extraído de una mezcla de estándares de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, concentración 1 µg/mL, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS.	59

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de las drogas de abuso según la DEA.....	20
Tabla 2. Sustancias encontradas en casos relacionados con DFSA.....	32
Tabla 3. Drogas terapéuticas no sedativas identificadas por Scott-Ham y Burton [49].....	33
Tabla 4. Reactivos, materiales y equipos usados.....	34
Tabla 5. Condiciones de extracción usadas para el aislamiento de las drogas y sus productos de biotransformación.....	36
Tabla 6. Gradiente de elución empleado para el análisis por LC-MS/MS.....	40
Tabla 7. Concentraciones por nivel de las drogas analizadas por GC-MS y LC-MS/MS.....	42
Tabla 8. Tiempos de retención y principales iones característicos de las drogas objeto de estudio, analizadas por GC-MS.....	45
Tabla 9. Repetibilidad y reproducibilidad de los t_R de las drogas analizadas por GC-MS a tres concentraciones diferentes en una mezcla patrón.....	46
Tabla 10. Exactitud, expresada en porcentaje de recuperación, de las drogas analizadas por GC-MS a tres concentraciones diferentes, en muestras de sangre y orina.....	48
Tabla 11. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.....	50
Tabla 12. Límites de detección y cuantificación de las 23 drogas analizadas por GC-MS, en las matrices sangre y orina.....	51
Tabla 13. Tiempos de retención de las drogas analizadas por GC-QqQ-MS.....	54
Tabla 14. Monitoreo de reacciones de transición para el análisis por GC-QqQ-MS de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos.....	55
Tabla 15. Energías de colisión que proporcionaron la mayor abundancia para las reacciones de transición de los iones (precursor y producto) de las drogas analizadas por GC-QqQ-MS.....	56
Tabla 16. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.....	57
Tabla 17. Análisis, identificación y cuantificación de clozapina, ketamina y clorpromazina en muestras de orina, por GC-QqQ-MS.....	58
Tabla 18. Tiempos de retención, fórmulas moleculares condensadas, e iones moleculares protonados, $[M+H]^+$, de las drogas objeto de estudio, analizadas por LC-QTOF-MS.....	59
Tabla 19. Repetibilidad y reproducibilidad de los t_R de las drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS a tres concentraciones diferentes en una mezcla patrón.....	61
Tabla 20. Exactitud, expresada en porcentaje de recuperación, de las drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS a tres concentraciones diferentes, en muestras de orina y sangre.....	63
Tabla 21. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.....	66

Tabla 22. Límites de detección y cuantificación de las 22 drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS, en las matrices orina y sangre.....67

Tabla 23. Muestras de orina analizadas por GC-MS y LC-QTOF-MS, de casos forenses recibidos en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Nororiente.69

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Espectros de masas, obtenidos por ionización con electrones (EI, 70 eV) de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas por GC-MS.	83
Anexo B. Curvas de calibración de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas en sangre y orina por GC-MS.	96
Anexo C. Curvas de calibración de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas por GC-QqQ-MS.	120
Anexo D. Espectros de masas obtenidos por LC-ESI(+)-QToF-MS de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos.	126
Anexo E. Curvas de calibración de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas en orina y sangre por LC-ESI(+)-QTOF-MS.	135

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> (ionización química a presión atmosférica)
Ca.	Circa (aproximadamente)
CI	<i>Chemical Ionization</i> (ionización química)
CSA	<i>Controlled Substance Act</i> (Ley de Sustancias Controladas)
CV	Coefficiente de variación
Da	Dalton
DEA	<i>Drug Enforcement Administration</i> (Administración para el control de drogas)
DFSA	<i>Drug Facilitated Sexual Assault</i> (Drogas que facilitan los asaltos sexuales)
D _f	Espesor de la fase estacionaria
D.I.	Diámetro interno
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo)
EI	<i>Electron Impact</i> (impacto de electrones)
ESI	<i>Electrospray</i> (electronebulización)
<i>Et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
Ev	Electrón-Voltio
f.e.	Fase estacionaria
GC	Cromatografía de gases
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> (es decir, esto es)
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)
LSD	<i>Lysergic Acid Diethylamide</i> (dietilamida del ácido lisérgico)
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i> (monitoreo de reacción múltiple)

MS	<i>Mass Spectrometry</i> (espectrometría de masas)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (detector selectivo de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
QQQ o QqQ	Triple cuadrupolo
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> (monitoreo de iones seleccionados)
SNC	Sistema nervioso central
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (tiempo de vuelo)
t_R	Tiempo de retención
UIS	Universidad Industrial de Santander
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> (oficina de naciones unidas contra la droga y el delito)

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO Y ANÁLISIS SIMULTÁNEO POR GC-MS, GC-MS/MS Y LC-MS/MS DE DROGAS RELACIONADAS CON DELITOS SEXUALES Y HURTOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE INTERÉS FORENSE*

AUTOR: LUZ ADRIANA MONSALVE SALAMANCA**

PALABRAS CLAVE: DELITOS SEXUALES, HURTOS, GC-MS, GC-MS-QqQ, LC-MS-QToF.

DESCRIPCIÓN:

Los hechos ilícitos relacionados con el uso de drogas no son fenómenos recientes y son comunes en muchos países. Actualmente, dentro de los hechos ilícitos de mayor impacto se encuentran los delitos sexuales y hurtos, donde las drogas involucradas, son, en muchas ocasiones, las que se emplean en el área farmacéutica, tales como benzodiazepinas, sedativos, anestésicos, así como también algunos hipnóticos.

Esta situación crea una necesidad en la búsqueda e implementación de métodos analíticos selectivos, sensibles y rápidos, que permitan la detección simultánea de un gran número de drogas en muestras biológicas.

Por lo anterior, en el presente trabajo, se implementó un método analítico que permitió la detección simultánea de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, en muestras de sangre y orina, empleando tres técnicas cromatográficas a saber: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y analizador de triple cuadrupolo (GC-MS-QqQ) y cromatografía líquida con detector selectivo de masas y analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-MS-QTOF).

Se encontró que la técnica LC-MS-QTOF presenta ventajas destacadas con relación a las técnicas GC-MS y GC-MS/MS, tales como rapidez y facilidad en la preparación de las muestras, menor tiempo de análisis y menores límites de detección y cuantificación.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el 9° Congreso Regional Latinoamericano de Toxicología Forense de TIAFT, llevado a cabo del 4 al 8 de Noviembre de 2013 en Montevideo, Uruguay.

*Trabajo de investigación

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Maestría en Química. Directora: Elena E. Stashenko. Co-director: Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: A COMPARATIVE STUDY AND SIMULTANEOUS ANALYSIS BY GC-MS, GC-MS/MS AND LC-MS/MS OF DRUG FACILITATED SEXUAL ASSAULT AND ROBBERY IN BIOLOGICAL SAMPLES OF FORENSIC INTEREST*

AUTHOR: LUZ ADRIANA MONSALVE SALAMANCA**

KEY WORDS: SEXUAL CRIMES, THEFTS, GC-MS, GC-QQQ-MS, LC-MS-QTOF.

DESCRIPTION:

The wrongful acts related to drug use are not recent phenomena and are common in many countries. Currently, within the wrongful acts of greater impact are sexual assault and robbery, where the drugs involved are, in many cases, those used in pharmaceuticals such as benzodiazepines, sedatives, anesthetics, as well as some hypnotics.

This creates a need in the search and implementation of selective, sensitive and rapid analytical methods, allowing the simultaneous detection of a large number of drugs in biological samples.

Therefore, in this study, an analytical method which enabled simultaneous detection of 23 drug facilitated sexual assault and robbery, in blood and urine was implemented using three chromatographic techniques: gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (GC-QQQ-MS) and liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-MS-QTOF).

It was found that the LC-MS-QTOF technique has significant advantages in relation to GC-MS and GC-MS/MS techniques, such as speed and ease of sample preparation, shorter analysis and lower detection limits and quantification.

The results of this work were presented at the 9th Latinamerican Regional Congress of Forensic Toxicology TIAFT, from 4 to 8 November 2013 in Montevideo, Uruguay.

*Research work.

** Faculty Sciences, School in chemistry, Master in Chemistry. Director: Elena E. Stashenko. Co-director: R. Jairo Martinez.

INTRODUCCIÓN

Los hechos ilícitos (e.g., delitos sexuales, hurtos) relacionados con el uso de drogas no son fenómenos recientes y son comunes en muchos países, situación, que ha causado alarma en el público en general. Las drogas involucradas, son, en muchas ocasiones, las que se emplean en el área farmacéutica, tales como benzodiazepinas (e.g., flunitrazepam, lorazepam), sedativos (e.g., neurolepticos), anestésicos (e.g., γ -hidroxibutirato o GHB, ketamina), drogas de abuso (e.g., cocaína, cannabis, Éxtasis, LSD), así como también algunos hipnóticos (e.g., zopiclona, zaleplon, zolpidem). Estas sustancias se utilizan con el fin de poner en estado de incapacidad o indefensión a una persona, para poder llevar a cabo su objetivo criminal (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011; Hall y Moore, 2008 y Hurley *et al.*, 2006).

En un escenario típico, el agresor o victimario adiciona clandestinamente la droga a una bebida, bien sea alcohólica o no, de tal manera, que la persona pueda ser abusada o hurtada bajo la influencia de esta sustancia. Muy a menudo, poco tiempo después de la administración de la sustancia, la persona presenta amnesia, principal característica que exhiben este grupo de sustancias, y por lo cual se presume son las elegidas para cometer este tipo de delitos; también se caracterizan por ser efectivas a bajas dosis, de rápida acción y, generalmente, presentan tiempos de vida media cortos (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011; Kintz *et al.*, 2005a y Negrusz y Gaensslen, 2003).

Los síntomas reportados por las víctimas incluyen confusión, mareo y letargia, pérdida de la memoria, pérdida de la función motora, náuseas e inhibición de la actividad física. Todos estos síntomas son sinérgicamente potenciados, si la droga usada presenta propiedades depresoras del sistema nervioso central y se mezcla con otra, de iguales características farmacológicas, como el etanol, situación, que es muy común en nuestro país (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011; Negrusz y Gaensslen, 2003; Lebau *et al.*, 1999 y Bechtel y Holstege, 2007).

De los casos recibidos en los Laboratorios de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, relacionados con delitos sexuales o hurtos, los cuales representan cerca del 40% de las solicitudes, se ha encontrado que las sustancias de mayor preferencia empleadas por los delincuentes o agresores son las benzodiazepinas (e.g., lorazepam, flunitrazepam). Sin embargo, en los últimos meses se ha encontrado que, adicional a estas sustancias, también son empleadas drogas de abuso, especialmente, cocaína y marihuana, así como

también algunos antidepresivos tricíclicos (e.g., nortriptilina) y fenotiacinas (e.g., levomepromazina).

Adicionalmente, existe un gran número de denuncias relacionadas con este tipo de delitos, en los cuales no se detecta ninguna sustancia, a pesar de que las víctimas durante su reconocimiento médico-legal relatan, que presentaron síntomas como los que se describieron anteriormente (amnesia, confusión, afectación de la actividad motora, entre otras). Esto podría atribuirse a múltiples factores dentro de los cuales se puede destacar el hecho de que muchas víctimas no denuncian el incidente, sino hasta varios días después, y en algunos casos, no presentan toda la situación. El largo tiempo transcurrido entre los hechos y la valoración médico-legal facilita la eliminación de las drogas y conduce a resultados negativos. Otra razón puede obedecer, probablemente, a las bajas concentraciones presentes en los fluidos biológicos, y que no se encuentran dentro de los límites de detección de los métodos empleados por el Laboratorio.

Esta situación crea una necesidad en la búsqueda e implementación de métodos analíticos, selectivos, sensibles y rápidos, que permitan la detección simultánea de un gran número de drogas y, en algunos casos, sus productos de biotransformación, en muestras biológicas recolectadas de las víctimas, tales como sangre y orina.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo, se implementó un método analítico que permitió la detección simultánea de drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos en muestras biológicas de interés forense (sangre y orina), empleando tres técnicas cromatográficas a saber: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de gases con detector selectivo de masas y analizador triple cuadrupolo (GC-MS-QqQ) y cromatografía líquida con detector selectivo de masas y analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-MS-QToF).

De igual forma, se evaluaron y compararon aspectos tales como tiempo de análisis, costo, ventajas y desventajas de cada una de las técnicas empleadas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. DROGAS DE ABUSO

Según la Organización Mundial de la Salud, droga es toda sustancia que, introducida en el organismo, por cualquier vía de administración, produce alteración de algún modo, del natural funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) de una persona y es, además, susceptible de crear dependencia, ya sea psicológica, física o las dos al mismo tiempo (Organización Mundial de la Salud, 1994).

Por otra parte, Calabuig, 2004 define el término droga como aquella sustancia que produce dependencia y, que se emplea voluntariamente para provocar determinadas sensaciones o estados psíquicos no justificados terapéuticamente. Esta definición abarca a las sustancias psicoactivas consideradas como “drogas de abuso”, tanto legales (e.g., alcohol y tabaco) como ilegales (e.g., cannabis, cocaína, opioides y anfetaminas, entre otros).

Desde el punto de vista legal, droga de abuso hace referencia a un tipo de sustancias que administradas en un organismo vivo, son capaces de producir cambios en el estado de la percepción y en el comportamiento, creando hábitos de consumo, presentando una sintomatología psíquica, y en algunos casos, dependencia. Su venta o distribución está regulada por normas internacionales o por la legislación de cada país, y en algunos casos, su consumo es penalizado, por esta razón también son conocidas como “sustancias controladas” (Menéndez y Repetto, 2009; Del Peso, 2009 y Uribe, 2001).

En Estados Unidos existe una amplia normatividad relacionada con drogas de abuso, desarrollada desde la década de 1960, la cual es actualizada periódicamente por la administración para el consumo de drogas (DEA, *Drug Enforcement Administration*, por sus siglas en inglés). La DEA contempla una clasificación que incluye drogas, sustancias y ciertos compuestos químicos empleados para la fabricación de las drogas de abuso. Se han propuesto cinco categorías o *schedules*, dependiendo del uso médico legalmente aceptado para la droga y, el abuso o potencial dependencia de la misma (Drug Enforcement Administration).

La frecuencia de abuso es un factor determinante en la clasificación de las drogas, siendo las más peligrosas las incluidas en la *schedule I* y las menos peligrosas las incluidas en la *schedule V*. En el primer caso, las drogas se caracterizan por presentar un alto potencial de abuso y dependencia física o psicológica.

Por otra parte, en la Ley de Sustancias Controladas (CSA, *Controlled Substance Act*, por sus siglas en inglés) se encuentra un listado de drogas y su clasificación. Esta lista describe la química básica, pero no incluye las sales, isómeros, ésteres, éteres ni derivados que también pueden ser clasificados como sustancias controladas. Estas listas se consideran de referencia, sin embargo, no incluyen todas las sustancias controladas.

En la **Tabla 1** se presenta la clasificación de las drogas según la DEA y sus principales características.

Tabla 1. Clasificación de las drogas de abuso según la DEA.

Schedule	Principales características	Drogas incluidas
I	Son las drogas más peligrosas, generan dependencia psicológica o física potencialmente grave.	Heroína, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), marihuana, 3,4-metilendioximetanfetamina (éxtasis), metacualona y el peyote.
II	Presentan un alto potencial de abuso, pero menor en comparación con el caso anterior; su uso puede ocasionar dependencia psicológica o física y también son consideradas como drogas peligrosas.	Cocaína, codeína, morfina, metanfetamina, metadona, hidromorfona, meperidina, oxycodona, fentanilo.
III	Pertenece a este grupo las drogas con un moderado a bajo potencial de dependencia física y psicológica.	Combinación de productos con menos de 15 mg de hidrocodona por unidad de dosificación, productos que contengan menos de 90 mg de codeína por unidad de dosificación, ketamina, esteroides anabolizantes, testosterona.
IV	Se caracterizan por presentar bajo potencial de abuso y bajo riesgo de crear dependencia.	Alprazolam, diazepam, lorazepam, zolpidem.
V	Son drogas que presentan menor potencial de abuso que las incluidas en la lista IV y consisten en preparaciones que contienen cantidades limitadas de ciertos narcóticos. Presentan propiedades medicinales tales como: antidiarreicos, antitusígeno, y efectos analgésicos.	Preparaciones para la tos con menos de 200 mg de codeína, lomotil, motofen.

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO

Dentro de las drogas de abuso se puede incluir una larga lista de sustancias químicas de diverso origen, que van desde las más conocidas (e.g., alcohol, opiáceos, cocaína) hasta todos los psicofármacos que pueden ser susceptibles de consumo con fines no terapéuticos.

Se ha propuesto un gran número de clasificaciones según su origen, su estructura química, sus efectos, entre otros, sin embargo, hasta el momento no existe una clasificación que permita incluir todas las sustancias. La dificultad radica en el amplio número de sustancias químicas, la diversidad de sus efectos y mecanismos de acción. Así, por ejemplo, es posible encontrar efectos semejantes en sustancias muy diferentes desde el punto de vista de la estructura química y, para una misma sustancia, el simple hecho de modificar la vía de administración, puede ocasionar la aparición de diferentes efectos (Calabuig, 2004 y Drug Enforcement Administration).

Una clasificación mixta, sobre la base de los efectos y la naturaleza de las sustancias, podría ser la siguiente: 1. Alcohol, 2. Opiáceos, 3. Inhalantes, 4. Cocaína, 5. Fenciclidina (PCP), 6. Anfetaminas, 7. Otros estimulantes (e.g., cafeína), 8. Derivados de la *Cannabis sativa* (e.g., hachís, marihuana), 9. Alucinógenos, 10. Hipnóticos y ansiolíticos (e.g., benzodiazepinas, barbitúricos) y 11. Tabaco (Calabuig, 2004 y Smith, 2005).

Teniendo en cuenta el efecto farmacológico que producen las drogas, éstas se podrían clasificar en:

1.2.1 Drogas depresoras. Provocan disminución del funcionamiento cerebral, pudiendo ocasionar desde desinhibición hasta coma, en un proceso progresivo de inducción al sueño, sensación de bienestar, analgesia y disminución de la capacidad motora. Se caracterizan por presentar propiedades hipnóticas y sedativas, disminución de la presión arterial y del ritmo cardíaco. Las más consumidas son el etanol, los opiáceos, los tranquilizantes como las benzodiazepinas, y los hipnóticos como los barbitúricos. También son empleados los hipnóticos no benzodiazepínicos (drogas "Z"), antidepresivos tricíclicos y fenotiacinas (Córdoba, 2001; Repetto *et al.*, 2009 y National Institute on Drug Abuse).

1.2.2 Drogas estimulantes. Aceleran el funcionamiento cerebral, activando el estado de alerta y vigilia; se caracterizan por generar aumento de la presión arterial y del ritmo cardíaco, insomnio, verborrea, euforia, aumento de la actividad mental y en algunos casos, pueden producir anorexia. Estas drogas a su vez se dividen en dos grupos, a saber: estimulantes mayores (e.g., cocaína, anfetaminas) y estimulantes menores (e.g., nicotina, cafeína) (Smith, 2005; Garro Vargas, 2011 y Calipari y Farris, 2013).

1.2.3 Drogas psicomiméticas. Crean una percepción irreal de los objetos, sonidos, olores o sensaciones. Este grupo incluye marihuana, dietilamida del ácido lisérgico (LSD, *Lysergic Acid Diethylamide*, por sus siglas en inglés) y otros alucinógenos (Smith, 2005; Substance Abuse and Mental Health Services Administration y Halberstadt y Geyer, 2013).

1.3. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO FORENSE DE DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.3.1 Obtención y selección de las muestras biológicas. Existen diferentes aspectos a considerar a la hora de seleccionar la muestra adecuada para un análisis toxicológico forense y obtener la información requerida. Esto dependerá del tipo de caso que se desee estudiar (*e.g.*, homicidios, suicidios, accidentes de tránsito, hurto, delitos sexuales, entre otros) y del contexto judicial del mismo, del tiempo que haya transcurrido desde que se presentó un hecho ilícito hasta el momento de la recolección de la muestra, así como también, de la disponibilidad de las muestras biológicas (Olano Gibouin *et al.*, 2009).

En general, la muestra de orina es el espécimen de preferencia para las investigaciones toxicológicas por varias razones, a saber: es fácil de obtener y en suficiente cantidad, no es un método invasivo y en esta muestra es posible detectar una mayor concentración de las sustancias o sus metabolitos durante un período mayor que en la sangre (Lebau, 1999; Olano Gibouin *et al.*, 2009 y Giannuzzi y Ferrari, 2006).

Cuando la muestra de orina puede obtenerse en un corto tiempo, posterior a la ocurrencia de los hechos, la probabilidad de detectar las drogas, en especial aquellas que se eliminan rápidamente del organismo, es mayor. Sin embargo, la muestra de orina pierde valor si no se obtiene entre los 4 días posteriores al delito, debido a que la mayoría de las drogas empleadas en estos casos presentan un tiempo de vida media corto (Lebau, 1999; Olano Gibouin *et al.*, 2009 y Wade, 2003).

Un resultado positivo en una muestra de orina es normalmente una prueba suficiente para demostrar que una persona estuvo expuesta a la droga en un período de 1 a 4 días antes de recolectar la muestra. Sin embargo, cabe señalar, que un análisis, bien sea cualitativo o cuantitativo, en una muestra de orina no permite realizar una evaluación del efecto de la droga sobre el comportamiento humano (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011).

En relación con el período de detección, este depende de la sustancia, así como también de la dosis empleada. Se recomienda, que cualquier droga o compuesto identificado en orina, debe ser analizado y cuantificado simultáneamente en una muestra de sangre, siempre y cuando haya disponibilidad de este espécimen

(United Nations Office on Drugs and Crime, 2011; Negrusz y Gaensslen, 2003 y Laboratory Guidelines Committee of the Society of Forensic Toxicologist, 2006).

Por otra parte, la muestra de sangre es un espécimen de gran utilidad en casos cuando el tiempo transcurrido después de los hechos es corto (máximo 8 horas). La muestra de sangre debe recolectarse en recipientes, que contengan preservantes y anticoagulantes, con el fin de evitar que la muestra se degrade o coagule; por convención internacional, el recipiente adecuado es un tubo tapa gris, el cual contiene fluoruro de sodio y oxalato de potasio como preservante y anticoagulante, respectivamente. Se recomienda recolectar mínimo 15 mL de muestra de sangre, sin embargo, generalmente en los Laboratorios de Toxicología se reciben pequeños volúmenes de muestra, por lo cual se hace necesario desarrollar y emplear métodos que permitan realizar un adecuado *screening* y confirmación con volúmenes de muestra que no superen los 5 mL (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Laboratory Guidelines Committee of the Society of Forensic Toxicologist, 2006).

Un resultado positivo en una muestra de sangre puede proveer información acerca del posible efecto farmacológico presentado en el momento en que ocurrieron los hechos. Una concentración de una droga detectada en sangre, relacionada con la información farmacocinética de la misma, sirve para predecir y correlacionar los síntomas descritos por la víctima (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Olano Gibouin *et al.*, 2009).

Finalmente, es importante señalar que un resultado toxicológico negativo en cualquier espécimen biológico no excluye el posible uso de una droga. Los resultados negativos pueden obedecer, entre otros factores a los siguientes: demora en la toma y recolección de la muestra, que conduce a concentraciones muy bajas (inferiores a los límites de detección de los métodos empleados por el Laboratorio) de la droga o sus metabolitos; el uso de sustancias desconocidas por el laboratorio y que están más allá de la capacidad analítica del mismo (*e.g.*, nuevas drogas de diseño o sustancias que presentan una alta efectividad a muy bajas concentraciones) o a la descomposición de las drogas durante el almacenamiento de las muestras (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011).

1.3.2 Métodos analíticos empleados para la detección de drogas. Como en todos los ámbitos forenses, el sesgo hacia cualquiera de las partes (*e.g.*, víctima, presunto autor o agresor) debe ser evitado. Por lo tanto, la confiabilidad de los resultados analíticos, tanto cualitativos como cuantitativos, es un requisito esencial para la correcta interpretación toxicológica. Por tal motivo, los métodos adoptados en los laboratorios forenses deben garantizar un alto nivel de confiabilidad, además deben ser sometidos a programas de control de calidad (Wood *et al.*, 2006).

Únicamente los métodos validados y aquellos, que demuestren una adecuada sensibilidad, selectividad y especificidad, deben ser empleados para las investigaciones toxicológicas. Dentro de las técnicas más usadas y reconocidas por la comunidad científica internacional forense se destacan: GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS y LC-MS/MS (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Laboratory Guidelines Committee of the Society of Forensic Toxicologist, 2006).

1.3.2.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las técnicas de cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS), unidas en un poderoso tándem, GC-MS y GC-MS/MS, son herramientas imprescindibles en los análisis toxicológicos, forenses y en muchas más áreas de investigación. Las ventajas comparativas de las técnicas se destacan fundamentalmente en el campo del análisis de compuestos volátiles y volatilizables, los cuales se caracterizan por poseer alta presión de vapor (temperaturas de ebullición relativamente bajas, generalmente, menores de 200-250°C), peso molecular no mayor de 250-300 Da; son sustancias que pueden tener diversos grupos funcionales, *e.g.*, grupos aldehído, alcohol, amino, sulfuro, entre otros, de polaridad media, algunos, parcialmente o muy solubles en agua (Stashenko y Martínez, 2010a, 2010c y 2011).

Sin embargo, la técnica GC-MS presenta ciertas limitaciones dentro de las cuales se pueden encontrar: no es aplicable a compuestos muy polares, termolábiles y con altos pesos moleculares; adicionalmente, la preparación de la muestra involucra largo tiempo, así como también, procedimientos de extracción tediosos, algunas veces, es necesario llevar a cabo la derivatización del analito (Wood *et al.*, 2006).

Por lo que se refiere a la GC, esta técnica tiene su más grande fortaleza en la determinación de cuántos componentes y en qué proporción se encuentran en una mezcla. Sin embargo, la capacidad de establecer la naturaleza y la estructura química de estos compuestos separados y cuantificados, es bastante ambigua y reducida, y requiere de detectores espectroscópicos. Entre ellos, el más usado es el detector espectrométrico de masas (MS), el cual permite obtener la “huella digital” de la molécula, *i.e.* su espectro de masas, que proporciona la información sobre la masa molecular, composición elemental (si se usan espectrómetros de masas de alta resolución), grupos funcionales presentes y, en algunos casos, la geometría e isomería espacial de la molécula (Stashenko y Martínez, 2009).

Un espectrómetro de masas consta de una cámara de ionización (fuente de iones o volumen iónico): en el método GC-MS fundamentalmente se usa la ionización con electrones o impacto con electrones (EI, *Electron Impact*, por sus siglas en inglés), pero también se emplea la ionización química (CI, *Chemical Ionization*, por sus siglas en inglés) de iones positivos o de iones negativos, como un método de ionización “complementario”, “suave”.

Los iones formados en la cámara de ionización se extraen de ésta por medio de una serie de electrodos, que permiten colimar (enfocar) y acelerar el haz iónico, y dirigirlo a un analizador de masas, cuya función es separar los iones de acuerdo con su relación masa/carga (*i.e.*, m/z) (Stashenko y Martínez, 2010b y 2010c).

Existen varios tipos de analizadores de masas que se usan en los equipos GC-MS, entre los más frecuentes figuran cuadrupolo (Q) y trampa de iones (IT, *Ion Trap*, por sus siglas en inglés); también hoy en día, es frecuente el uso de los analizadores de tiempo de vuelo (TOF, *Time-of-Flight*, por sus siglas en inglés) y, últimamente, los analizadores de resonancia ion-ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR, *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés); sin embargo, el uso de analizadores de masas de deflexión magnética como detectores GC es mucho menos frecuente (Stashenko y Martínez, 2010b).

Se destacan distintas ventajas que hacen del cuadrupolo el analizador de masas preferido en la técnica de GC-MS, entre éstas, se encuentran las siguientes: (a) su tamaño compacto y precios relativamente bajos; (b) el barrido (*scanning*) de masas es rápido y con buen rango dinámico (10^5); (c) la simplicidad de construcción y la operación computacional; (d) la robustez y la facilidad de manejo y limpieza, acoplamiento fácil con diferentes sistemas de entrada de muestra (cromatografía de gases, líquida); (e) mayores similitudes entre los espectros de masas adquiridos en cuadrupolos con los obtenidos en analizadores de deflexión magnética, *i.e.*, aquellos que fundamentalmente conforman las bases de datos (bibliotecas) de espectros de masas comerciales. Si un cuadrupolo opera únicamente en el modo de radiofrecuencia, sin la aplicación de voltajes de corriente directa, los iones no se separarán, ya que solo se llevará a cabo su guía o transmisión; en este caso, el cuadrupolo puede ser usado como una celda de colisiones ion-moleculares, lo que se aprovecha ampliamente en el estudio de iones metaestables y, sobre todo, en los llamados sistemas *tándem* (Stashenko y Martínez, 2010b).

- **Sistemas *tándem* (MS/MS). Triple cuadrupolo (QqQ).** Similar a un sistema cromatográfico unidimensional que puede alcanzar los límites de capacidad para separar los componentes de una mezcla muy compleja, la espectrometría de masas unidimensional también puede alcanzar sus límites de resolución, sensibilidad, rango de masas y, sobre todo, de volumen de información requerida para elucidar la estructura molecular.

Sin embargo, cuando los espectros de masas resultan con muy pocas señales, representadas predominantemente por iones moleculares o iones moleculares protonados (o deprotonados) y algunos iones *clúster*, y no se registran iones-fragmento (iones-producto), resulta muy difícil establecer la estructura química de la molécula de manera confiable. Por el contrario, mediante el uso de la espectrometría de masas multidimensional o sistemas *tándem*, se incrementa la

cantidad y la calidad de la información analítica obtenida relacionada con las estructuras moleculares, composiciones elementales e isobáricas, presencia de compuestos a nivel de trazas, así como también, un incremento de la sensibilidad y la especificidad del método analítico (Stashenko y Martínez, 2010b).

Los sistemas de masas *tándem* se dividen en dos grandes grupos, según los tipos de analizadores de masas involucrados en la configuración MS/MS. El primer grupo, lo conforman los espectrómetros de masas *tándem* en tiempo. Entre éstos, figuran trampas de iones lineales y cudrupolares, trampas orbitales (*orbitrap*) y FT-ICR-MS. El segundo grupo, lo conforman los llamados espectrómetros de masas *tándem* en espacio. A este grupo de analizadores en *tándem*, pertenece el triple cuadrupolo, designado por sus siglas como QQQ o QqQ, el cual es adecuado para el análisis de compuestos *target* a nivel de trazas (rango ppt-ppb), en matrices muy complejas, con presencia de interferencias, tal como sucede en muestras de alimentos, fluidos biológicos, tejidos animales y vegetales, suelos, aguas residuales y otras muestras ambientales, etc.

La configuración de triple cuadrupolo proporciona una gama de experimentos analíticos y modos de adquisición de corrientes iónicas, cada uno de los cuales suministra una determinada información. A continuación, se describe cada uno de los posibles modos de adquisición del equipo QQQ (QqQ) (Stashenko y Martínez, 2010b).

- a) **Barrido completo (*full scan*).** En este caso, en el equipo QQQ (QqQ), el primer analizador MS1 (Q1) hace un barrido completo y registra espectros de masas de cada uno de los analitos que emergen de la columna GC o LC, se ionizan y se fragmentan en iones moleculares y sus diferentes iones-producto. Los cuadrupolos Q2 (q) y Q3 (analizador de masas MS2) operan sólo en modo de transmisión de iones.
- b) **Barrido de ion(es) seleccionado(s) (SIM, *Selected Ion Monitoring*).** En este caso, el primer analizador, MS1 (Q1) solo deja pasar un ion o varios iones seleccionados (usualmente, 2-3), típicos o característicos del analito-*target*, que se busca selectivamente en una mezcla compleja. Los otros cuadrupolos, Q2 y Q3 (MS2), sólo transmiten estos iones filtrados por el MS1 (Q1).
- c) **Barrido de ion-fragmento (*Product ion scan*).** Este modo de adquisición consiste en la selección de un ion precursor o un ion-padre en el primer analizador o filtro de masas (MS1, Q1), que opera en modo de monitoreo de ion seleccionado, SIM. El ion-padre escogido (m_s^+) por el MS1 (Q1) se dirige luego a la cámara de colisiones activadas (o celda de colisiones), cuyo rol –en el triple cuadrupolo–, lo cumple el segundo cuadrupolo, Q2 o “q”. El analizador Q2 opera sólo con la radiofrecuencia aplicada, que permite transmitir los iones desde Q1 al analizador MS2 (Q3). El gas de

colisión, suministrado a la celda (generalmente, He, Ar o N₂), por medio de choques con los iones seleccionados en el MS1 (Q1), les proporciona la energía adicional; un potencial aplicado en el Q2 (q) permite acelerar los iones y convertir parte de su energía cinética en la energía interna adicional. El incremento de la energía interna de los iones, conduce a su disociación y a la formación de diversos iones-fragmento (iones-producto), que se dirigen luego al segundo analizador de masas (MS2, Q3). En este analizador, se hace el barrido (*scan*) de los componentes U y V de las corrientes directa y alterna, en el rango de masas (*m/z*) menores que la masa del ion-padre seleccionado, ya que los iones-producto, evidentemente, pesan menos que sus precursores. En un espectro de masas de iones-producto, las señales observadas carecerán de sus acompañantes isotópicos.

- d) **Barrido de ion-precursor (*Parent ion scan*)**. En este caso, el primer cuadrupolo (MS1, Q1) opera en el modo de barrido completo (*scan*), mientras que el tercer cuadrupolo (MS2, Q3) trabaja en el régimen de monitoreo de ion seleccionado (SIM). Este ion seleccionado, es el ion-producto (*daughter ion*) cuyos precursores precisamente se buscan.

Técnicamente, esto se lleva a cabo así: en el analizador MS2 (Q3) solo se filtran iones-producto con una masa determinada, mientras que en el primer analizador, MS1 (Q1), se hace el barrido de todos los iones (*scan*) desde la masa superior a la del ion-producto seleccionado; estos iones, provenientes del analizador de masas MS1 (Q1), atraviesan la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), donde se fragmentan, generando, entre otros, los iones-producto de interés, que se filtran luego en el analizador MS2 (Q3) operado en el modo (SIM).

El analizador de masas QqQ, operado en modo de barrido de iones precursores, se convierte en un analizador cromatográfico selectivo.

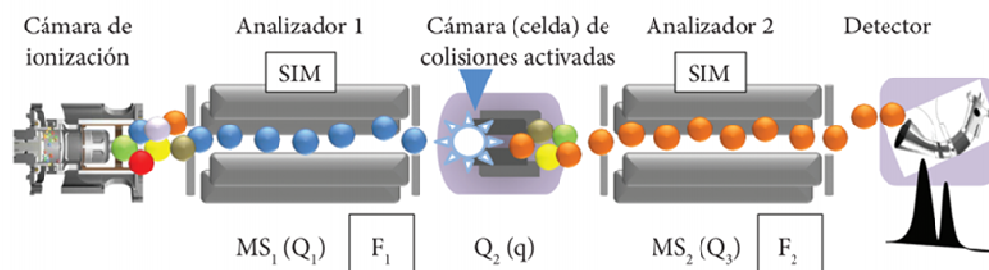
- e) **Barrido de fragmento neutro (*Constant neutral loss scan*)**. En este modo de adquisición, ambos analizadores de masas, MS1 (Q1) y MS2 (Q3) operan en modo de barrido (*scan*) simultáneo, enlazado (*linked*). Sin embargo, el barrido de masas en MS1 (Q1) y MS2 (Q3) se hace para iones con una diferencia (desplazamiento) fija, correspondiente a la masa de un fragmento neutro seleccionado. Si los iones f_1 , f_2 , f_3 , f_4 , etc., pasan por el primer analizador MS1 (Q1) y luego atraviesan la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), y experimentan fragmentaciones, por el analizador MS2 (Q3) solo pasarán aquellos iones con la diferencia másica Δm preestablecida fija, es decir, $(f_1 - \Delta m)$, $(f_2 - \Delta m)$, $(f_3 - \Delta m)$, $(f_4 - \Delta m)$, etc.
- f) **Monitoreo de reacción múltiple (*Multiple reaction monitoring*)**. En este caso, en el primer analizador MS1 (Q1), se filtran los iones precursores

seleccionados F_1 (operación en modo SIM), mientras que en el segundo analizador MS2 (Q3), se dejan pasar solo los iones-producto F_2 de la transición o reacción de disociación $F_1 \rightarrow F_2$ (el analizador MS2 o Q3 opera en modo SIM). Ambos iones, F_1 y F_2 , deben ser estables y, por lo general, abundantes en el espectro de masas del analito. En la **Figura 1** se presenta un esquema de operación del triple cuadrupolo (QqQ) en el modo monitoreo de reacciones múltiples, MRM.

El monitoreo de la reacción de transición de iones precursor e hijo (ion-producto) anula casi completamente la probabilidad de coincidencias de señales del analito con los del fondo (*Chemical Background*) y, además, eleva el valor de S/N. Típicamente, el registro de dos transiciones independientes, junto con la retención cromatográfica (t_R), permiten confirmar, inequívocamente, la ocurrencia de un analito-*target* en una mezcla compleja.

Por tanto, este modo de adquisición permite convertir el detector de masas de GC en específico, altamente selectivo y sensible.

Figura 1. Diagrama del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, MS/QqQ, operado en el modo de monitoreo de reacciones múltiples, MRM (Stashenko y Martínez, 2012).



1.3.2.2 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Con el uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) o espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS), con la cual se ha logrado importantes avances y mejoras en el diseño instrumental durante las últimas dos décadas, ha sido posible solventar aquellos inconvenientes analíticos, que se presentan con la técnica GC-MS. Particularmente, ha sido notoria la introducción exitosa de robustas interfaces tales como aquellas que se basan en las técnicas de ionización a presión atmosférica, e.g., Ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, por sus siglas en inglés) y

Electronebulización (ESI, *Electrospray*, por sus siglas en inglés) (Wood *et al.*, 2006; Stashenko y Martínez, 2012; Marquet y Lachâtre, 1999; Smyth, 2005 y Peters, 2011).

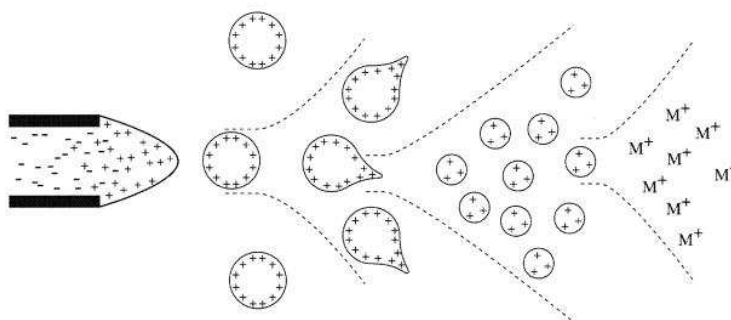
Dentro de las múltiples aplicaciones, que presenta la LC-MS y LC-MS/MS, se destacan el análisis de trazas, el uso de especímenes alternativos para el monitoreo de drogas de abuso (*e.g.*, anfetaminas, cocaína, marihuana, opiáceos) incluyendo su detección y cuantificación, análisis de drogas terapéuticas y tóxicos orgánicos en fluidos biológicos y tejidos, entre otros (Kim *et al.*, 2011; Maurer, 2005; Thieme y Sachs, 2003; Smyth *et al.*, 2004 y Chéze *et al.*, 2005).

En relación con la ionización ESI, durante la última década, ha emergido como una importante herramienta en los laboratorios clínicos y forenses, gracias a su sensibilidad y robustez, permitiendo el análisis de moléculas no volátiles, termolábiles, de polaridad alta a moderada, con pesos moleculares hasta 100.000 Da y que no son analizables por otras técnicas convencionales, tales como GC-MS. Se caracteriza por ionizar moléculas directamente desde fase líquida, es compatible con técnicas cromatográficas tradicionales y es el método de ionización universalmente más empleado (Ho *et al.*, 2003 y Wilm, 2011).

ESI emplea energía eléctrica para favorecer la transferencia de los iones en solución a fase gaseosa, antes de ser analizados por el espectrómetro de masas. Así pues, especies iónicas en solución pueden ser analizadas por ESI-MS, con aumento de la sensibilidad. También, compuestos neutros se pueden convertir en forma iónica, en solución o en fase gaseosa, por protonación o cationización y, por lo tanto, se pueden estudiar por ESI-MS.

La transferencia de las especies iónicas en solución a fase gaseosa involucra tres pasos, a saber: (1) dispersión de un fino *spray* de gotas cargadas, seguido por (2) evaporación del solvente, y (3) salida de los iones de las gotas altamente cargadas del capilar, el cual se mantiene a un alto voltaje (Ca. 2.5 – 6.0 kV), **Figura 2.**

Figura 2. Mecanismo de ionización ESI (Ho *et al.*, 2003).



Después, se genera una nube de gotas altamente cargadas, con la misma polaridad que el voltaje del capilar. La aplicación de un gas nebulizador (e.g., nitrógeno), aumenta la tasa de flujo de la muestra. Las gotas cargadas, pasan por un gradiente de presión y de potencial, hacia la región del analizador del espectrómetro de masas.

Con ayuda de una elevada temperatura en la fuente ESI y una corriente de gas de secado (nitrógeno), las gotas cargadas se reducen continuamente de tamaño, por evaporación del solvente, por lo cual se genera un aumento de la densidad de carga superficial y una disminución del radio de las gotas.

Finalmente, la intensidad del campo eléctrico dentro de la gota cargada alcanza un punto crítico, en el que es cinética y energéticamente posible para los iones que se encuentran en la superficie de la gota, ser expulsados a la fase gaseosa. Los iones emitidos se muestrean por un cono llamado *skimmer*, acto seguido, son acelerados hacia el analizador de masas para su análisis (Ho *et al.*, 2003).

2. ANTECEDENTES

El uso de drogas con el propósito de modificar o alterar el comportamiento de una persona para cometer un acto criminal no es un fenómeno reciente. En las pasadas generaciones, el alcohol y drogas con propiedades sedativas tales como el hidrato de cloral, eran agregadas a las bebidas para poner en estado de incapacidad o indefensión a una persona, y, de esta manera, poder llevar a cabo un hecho ilícito (Kintz *et al.*, 2005a, 2005b y Wells, 2001).

Actualmente, dentro de los hechos ilícitos de mayor impacto se encuentran las violaciones o delitos sexuales y hurtos, los cuales se han tornado en un problema de crecientes proporciones en nuestro país, no solo desde el punto de vista toxicológico, por el efecto en el organismo que pueda causar una droga suministrada sin prescripción médica, sino también desde el punto de vista social y de seguridad ciudadana.

Investigaciones recientes relacionadas con estos hechos demuestran un incremento en el uso de diversos tipos de drogas, con similitud en los efectos farmacológicos que éstas producen, dentro de los cuales se destacan amnesia, dificultad para hablar, pérdida de la conciencia y de la función motora, alteración del estado de percepción, entre otros. Adicionalmente, se caracterizan porque carecen de olor y sabor, lo cual les permite disolverse fácilmente en bebidas, son de rápida acción y, a bajas concentraciones, causan los efectos típicos. Estas drogas son conocidas como “drogas que facilitan los asaltos sexuales” (DFSA, *Drug Facilitated Sexual Assault*, por sus siglas en inglés). En un estudio retrospectivo, se estableció la diferencia entre “DFSA oportunistas”, en las cuales el presunto agresor se aprovecha de una persona que voluntariamente ha consumido drogas y “DFSA proactivas”, cuando el presunto agresor administra intencionalmente drogas a la víctima (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011; Hall y Moore, 2008; Hurley *et al.*, 2006; Negrusz y Gaensslen, 2003; Lebau *et al.*, 1999; Bechtel y Holstege, 2007 y Adamowicz y Kala, 2008).

Dentro de las drogas de mayor incidencia se encuentran el etanol, las benzodiacepinas, sedativos, anestésicos, drogas de abuso, así como también algunos hipnóticos. En la **Tabla 2** se registran las drogas de mayor ocurrencia relacionadas con casos DFSA, reportadas por Naciones Unidas (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011; Hurley *et al.*, 2006; Kintz *et al.*, 2005a y 2005b).

Tabla 2. Sustancias encontradas en casos relacionados con DFSA.

Grupo farmacológico	Droga(s)
Benzodiacepinas	Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Lorazepam, Triazolam, Flunitrazepam
Hipnóticos (Drogas Z)	Zaleplon, Zolpidem, Zopiclona
Antihistamínicos y otros	Cetirizina, Clorfeniramina, Hidroxicina, Amitriptilina, Clonidina, Clozapina, Haloperidol, Ácido valproico
Barbitúricos	Amobarbital, Barbital, Pentobarbital, Secobarbital
<ul style="list-style-type: none">• Cannabinoides• Opiáceos• Cocaína• Anfetaminas	Tetrahidrocannabinol Heroína, Morfina Cocaína y metabolitos (e.g., benzoilecgonina, cocaetileno) MDA, MDMA, MDEA
Otros	Atropina, Ketamina, LSD, Mescalina, Fenciclidina, Poppers, Escopolamina
Alcohol	Etanol
γ-Hidroxibutirato (GHB)	GHB y metabolitos (e.g., γ-butirolactona – GBL)

De igual forma, se han realizado diversos estudios con el fin de evaluar la prevalencia de las drogas empleadas en hechos ilícitos relacionados con delitos sexuales; se encontró, que el alcohol sólo o en combinación con otras drogas se encuentra presente en cerca del 50% de los casos. En un estudio realizado por Elsohly y colaboradores (1999a), identificaron aproximadamente 20 sustancias asociadas con este crimen, siendo el etanol la sustancia más comúnmente empleada, seguida por marihuana, cocaína, benzodiacepinas y γ-hidroxibutirato (GHB).

En otro estudio, elaborado por Slaughter y colaboradores (2000), en el cual evaluaron 2003 muestras de orina, con el propósito de identificar las drogas involucradas en violaciones y delitos sexuales, se encontró que el alcohol estuvo presente en el 63% de los casos, seguido de la marihuana, con un 30%, y, en menor proporción, el GHB y flunitrazepam, (<3%).

Igualmente, Hindmarch y colaboradores (2011), analizaron 3303 muestras de orina de personas, que afirmaron ser víctimas de delitos sexuales, y presumieron, que para esto, se emplearon drogas. Los resultados indicaron que el alcohol solo o en combinación con otras drogas (e.g., cannabinoides) fue la sustancia más comúnmente encontrada estando presente en el 67% de los casos; y el alcohol, empleado simultáneamente con marihuana, se detectó en el 30% de los casos. También, se obtuvieron resultados positivos para benzodiacepinas (4.8%), cocaína (2.8%), anfetaminas (1.9%), opiáceos (0.69%), barbitúricos (0.54%) y propoxifeno (0,30%).

En el año 2005, Scott-Ham y Burton publicaron un trabajo destacando los hallazgos correspondientes a 1014 casos relacionados con DFSA. Los resultados indicaron que el alcohol (solo o en combinación con drogas tanto medicinales como ilícitas) estuvo presente en el 46% de los casos; la marihuana fue detectada en el 26% de los casos, seguida de la cocaína, con un 11%. Pequeñas cantidades de otras drogas ilícitas como éxtasis, anfetaminas, heroína y ketamina también fueron detectadas. De igual forma, se identificaron drogas terapéuticas sedativas y no sedativas en un 16 y 21%, respectivamente. Estos hallazgos se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Drogas terapéuticas no sedativas identificadas por Scott-Ham y Burton (2005).

Grupo	Nombre
Analgésicos	Paracetamol, ibuprofeno, aspirina
Antidepresivos	Fluoxetina, venlafaxina, sertralina, citalopram
Remedios para la tos	Pseudoefedrina, metilefedrina
Anti-migraña / anti-eméticos	Metoclopramida, tramadol, diclofenaco
Anti-virales/bacteriales	Cloroquina, metronidazol, triclosan, trimetoprim
Anti-epilépticos	Fenitoína, lamotrigina, carbamazepina
Cardiovasculares	Propranolol, verapamilo
Anti-psicóticos	Olanzapina, clorpromazina

Por otra parte, Ohshima (2006) reportó un caso relacionado con el uso de un hipnótico sedativo benzodiacepínico, flunitrazepam, de nombre comercial Rohypnol®, en el cual el victimario, o presunto agresor, adicionó esta sustancia al café de la víctima; 40 min después, ella ya había ingerido la mitad de la bebida y comenzó a presentar una sensación de calor por todo el cuerpo, acompañada de una progresiva pérdida de la conciencia, por un período aproximado de 4 horas, después de haber ingerido la bebida; se presume, que fue en este lapso de tiempo cuando ocurrió el delito sexual.

Así mismo, se han reportado otros casos de delitos sexuales, en los cuales se han empleado otras benzodiacepinas tales como lorazepam y alprazolam (Nicoletti, 2009 y Kintz *et al.*, 2004). Cabe señalar, que las benzodiacepinas, después del alcohol, son las sustancias de mayor uso en este tipo de delitos; probablemente por su rápida acción y a la amnesia anterógrada que generan (Kintz *et al.*, 2005a y Lebau *et al.*, 1999).

3. METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos, materiales y equipos. Los reactivos, materiales y equipos empleados en esta investigación, se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Reactivos, materiales y equipos usados.

NOMBRE	ESPECIFICACIONES
Reactivos y solventes	
Metanol	Pureza: 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.).
Diclorometano	Pureza: 99.8%; <i>Merck Millipore</i> (Darmstadt, Alemania).
Acetato de etilo	Pureza: 99.9%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.).
Acetato de sodio	Pureza: 99%; <i>Carlo Erba Reagents</i> (Paris, Francia).
β -Glucuronidasa	976 unidades/mL; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Tetraborato de sodio decahidratado	Pureza: 99.5%; <i>Carlo Erba Reagents</i> (Paris, Francia).
<i>N,O</i> -bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMCS)	Pureza: 99.6% (BSTFA), 99.3% (TMCS); <i>Supelco Analytical</i> (Bellefonte, Pennsylvania, USA).
Alprazolam	Pureza: 98.5%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Benzoilecgonina	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Bromazepam	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Clonazepam	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Clorpromazina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Clozapina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Cocaetileno	Pureza: 99.9%; <i>Lipomed</i> (Arlesheim, Suiza.).
Cocaína	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Codeína	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Diazepam	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Éster metílico de ecgonina	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Ecgonina	Pureza: 99%; <i>Cerilliant</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Escopolamina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Estazolam	Pureza: 99.9%; <i>Lipomed</i> (Arlesheim, Suiza.).
Flunitrazepam	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).

Tabla 4. Continuación.

Fluoxetina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Ketamina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Lorazepam	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Meperidina	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Morfina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Nortriptilina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Oxazepam	Pureza: 99.5%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Trazodona	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Zopiclona	Pureza: 99.5%; <i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
7-Aminoflunitrazepam	Pureza: 99%; <i>Cerilliant</i> (St. Louis, MO, EE.UU.).
Material de laboratorio	
Balones aforados	5, 10, 25, 100 mL; Scott (Texas, EE.UU)
Vasos de precipitados	50, 100, 250 mL; Scott (Texas, EE.UU)
Micropipetas	5-50, 50-200, 100-1000 µL; Brand (Wertheim, Alemania)
Equipos de laboratorio	
Balanza analítica	<i>Ohaus Adventurer Pro AV264C</i> (NJ, USA)
Ultrasonido	<i>Ultrasonik Ney 57H</i> (Yucaipa, USA)
Centrífuga	<i>Universal Centrifuge Z 306, Hermle</i> (Wehingen, Alemania)
Horno	<i>Memmert U40</i> (Shindorim, Korea)
Destilador de agua (Milli-Q)	<i>Millipore Integral 3</i> (Molsheim, Francia)

3.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.2.1 Muestras de orina. Las muestras de orina fueron recolectadas de diez funcionarios del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Nororiente, de quienes se tenía conocimiento de no estar ingiriendo ningún tipo de medicamento.

Las muestras fueron recogidas en frascos plásticos y preservadas por refrigeración.

Este procedimiento se realizó teniendo en cuenta los protocolos establecidos por el Comité de Ética del Instituto.

3.2.2 Muestra de sangre. La muestra de sangre fue proporcionada por el Banco Metropolitano de Sangre, del Hospital Universitario de Santander. Esta muestra fue preservada por refrigeración.

3.3 EXTRACCIÓN DE LAS DROGAS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.3.1 Verificación de las condiciones de extracción. Para el aislamiento de las drogas y sus productos de biotransformación, se empleó la extracción líquido-líquido. Las condiciones de extracción, pH y solvente, se establecieron teniendo en cuenta las características de basicidad de las drogas.

En la **Tabla 5**, se presentan las condiciones de extracción empleadas para el aislamiento de las drogas y sus productos de biotransformación, de las muestras de orina y sangre.

Tabla 5. Condiciones de extracción usadas para el aislamiento de las drogas y sus productos de biotransformación.

CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	
Volumen de la muestra	2 mL
<i>Buffer</i> de extracción	Solución de tetraborato de sodio, pH 10
Volumen de <i>buffer</i>	4 mL
Solvente de extracción y volumen	Diclorometano, 8 mL
Tiempo de extracción	30 min

3.3.2 Preparación de las muestras. Para la preparación de las muestras, según el espécimen biológico, se procedió de la siguiente manera:

Muestras de orina: Teniendo en cuenta que gran parte de las drogas se excretan en forma conjugada con el ácido glucorónico, fue necesario realizar inicialmente una hidrólisis, de tal manera, que la droga quedara en su forma libre para poderla detectar (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Adamowicz y Kala, 2010). Para esto, se realizó una hidrólisis enzimática empleando β -glucoronidasa. Las condiciones para llevar a cabo la hidrólisis fueron las siguientes: a 2 mL de muestra de orina se adicionaron 500 μ L de *buffer* de acetato de sodio (pH 4.5) y 100 μ L de β -glucoronidasa y, posteriormente, la muestra se llevó a calentamiento a 56°C por 2 horas.

Una vez terminada la hidrólisis, se adicionaron 200 μ L de una solución de 2 μ g/mL de estazolam (empleado como estándar interno), el *buffer* y el solvente de extracción. Esta mezcla se llevó a ultrasonido por un tiempo de 30 minutos.

Finalizado el proceso de extracción, la muestra se centrifugó a 4000 revoluciones por 10 minutos. A continuación, se separó la fase orgánica en un vial y se llevó hasta sequedad a temperatura ambiente.

A continuación, se procedió a realizar la derivatización adicionando 100 μ L de una mezcla de acetato de etilo y *N,O*-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 1%

trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMCS), en una relación 1:1. Este proceso se llevo a cabo a 60 °C por 30 minutos. Por último, se tomó una alícuota de 2 µL, para realizar el análisis cromatográfico por GC-MS.

Para el análisis por LC-MS, la preparación de la muestra se realizó de la misma forma como se describió anteriormente, pero sin llevar a cabo el proceso de derivatización. El extracto orgánico obtenido se reconstituyó con 100 µL de una mezcla de metanol agua, en una relación 1:1.

Muestras de sangre: para la preparación de las muestras de sangre se procedió de la misma manera que en el caso anterior, a excepción del proceso de hidrólisis.

3.4 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Para el análisis, identificación y detección de las drogas, objeto de estudio, se emplearon tres técnicas cromatográficas, a saber: GC-MS, GC-MS/MS y LC-MS/MS. Para cada una de las técnicas, se emplearon los siguientes instrumentos y el análisis se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

3.4.1 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas. Se empleó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 7890 (Palo Alto, California, EE. UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* 5975 (**Figura 3**). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna cromatográfica con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli (metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU) de 30 m, L x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, df. Se empleó helio (99.99%, gas AP, Cryogas, Sibaté, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la columna de 20.076 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 27.292 cm/s. La temperatura del inyector fue de 270 °C y la temperatura de la línea de transferencia fue 280 °C; el modo de inyección empleado fue *pulsed splitless* y el volumen de inyección fue de 2 µL. La temperatura del horno durante la corrida cromatográfica se programó de la siguiente manera: se inició en 80 °C por 3 min, luego, se incrementó a razón de 15 °C/min hasta 200 °C, luego, se mantuvo por 5.333 min, finalmente, se realizó un incremento a razón de 10°C/min hasta 300°C, por 12 min. La temperatura de la fuente de ionización se mantuvo en 230 °C, mientras que la del cuadrupolo, a 150 °C. Los iones-fragmento en los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones de energía (EI) de 70 eV, en un rango de masas entre 45 y 450 uma, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia de 5.85 scan/s.

Los espectros de masas experimentales se compararon con los de las bases de datos disponibles (*NIST, Wiley*). Se empleó el software *MSD ChemStation* de *Agilent Technologies* E.02.02.1431.

Figura 3. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*, equipado con un puerto de inyección *Split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7683 Series*.



3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo. Se empleó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890* (Palo Alto, California, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas *Agilent Technologies 7000* con analizador de cuadrupolo triple (**Figura 4**). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna cromatográfica con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli (metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , df. Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la columna de 19.627 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 270°C y la temperatura de la línea de transferencia de 300°C; el modo de inyección empleado fue *pulsed splitless* y el volumen de inyección fue de 2 μL . La temperatura del horno durante la corrida cromatográfica se programó de la siguiente manera: se inició en 80 °C por 5 min, luego, se incrementó a razón de 6 °C/min hasta 200°C, luego, se mantuvo por 12 min, finalmente, se realizó un

incremento a razón de 5 °C/min hasta 300°C, por 30 min. La temperatura de la fuente de ionización se mantuvo en 250 °C, mientras que la del cuadrupolo, a 150 °C. Los iones-fragmento en los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones de energía (EI) de 70 eV, en un rango de masas entre 40 y 350 uma.

El flujo de nitrógeno en la celda de colisiones activadas fue de 2.25 mL/min. La velocidad de adquisición de datos (espectros) fue 6.8 ciclos/s; se empleó un sistema de datos *MassHunter* de *Agilent Technologies* B.07.00.

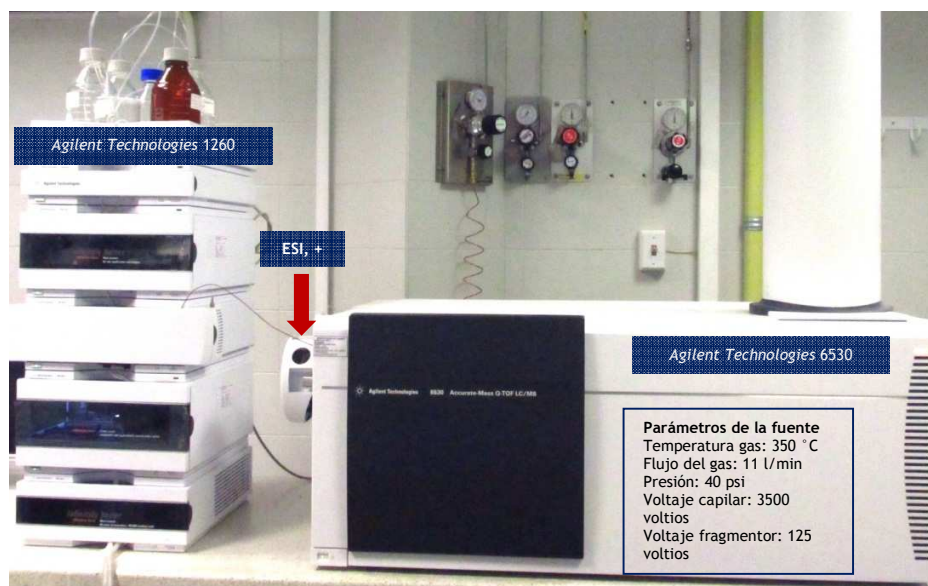
Se empleó el modo de adquisición monitoreo de reacción múltiple (MRM) para el análisis de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos. Para esto, se establecieron las reacciones de transición entre los pares de iones (precursor y producto) para cada compuesto y, se realizaron análisis empleando cuatro energías de colisión, a saber: 0, 5, 10 y 20 eV, con el fin de establecer las condiciones que proporcionarían la mayor sensibilidad.

Figura 4. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890 Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 7000* con analizador de cuadrupolo triple, equipado con un puerto de inyección *Split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7683 Series*.



3.4.3 Cromatografía líquida con espectrómetro de masas y analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo. Se empleó un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies* 1260 (Palo Alto, California, EE. UU.) acoplado a espectrómetro de masas *Agilent Technologies* 6530 con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (**Figura 5**). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna cromatográfica Zorbax Eclipse PlusC8 (4.6 x 50mm, 1.8 μ m).

Figura 5. Cromatógrafo líquido *Agilent Technologies* 1260 acoplado a espectrómetro de masas *Agilent Technologies* 6530 con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo, equipado con un inyector automático *Agilent* G1367E y una bomba binaria *Agilent* G1312B.



La fase móvil A estuvo constituida por una solución acuosa 5 mM de formiato de amonio y 0.01 % ácido fórmico, y la fase móvil B, por una solución 5 mM de formiato de amonio y 0.01 % ácido fórmico en metanol. El flujo fue de 0.5 mL/min. El gradiente de elución empleado se presenta a continuación, **Tabla 6**.

Tabla 6. Gradiente de elución empleado para el análisis por LC-MS/MS.

Tiempo, min	A (%)	B (%)
1.50	70	30
5.50	40	60
8.50	5.0	95
12.0	5.0	95

Se empleó como fuente de ionización electronebulización (ESI) y el sistema fue operado en modo positivo. La temperatura y flujo de gas empleado fueron 350 °C y 11 l/min, respectivamente. Los voltajes del capilar y fragmentor fueron 3500 y 125 voltios, respectivamente.

3.5 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

Se determinaron las figuras analíticas de mérito, tales como precisión (expresada como repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (expresada como porcentaje de recuperación), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad y sensibilidad. Estos parámetros se establecieron teniendo en cuenta la normatividad establecida en el ámbito forense, Naciones Unidas (UNODC, *United Nations Office on Drugs and Crime*, por sus siglas en inglés) y SAMHSA (*Substance Abuse and Mental Health Services Administration*, por sus siglas en inglés) (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Department of Health and Human Services, 2008).

Para la determinación de estos parámetros se realizaron curvas de calibración por el método de estándar interno.

3.5.1 Evaluación de la precisión. Para expresar el grado de concordancia entre los resultados de las réplicas, se determinó la repetibilidad y reproducibilidad, expresadas en términos del coeficiente de variación (**Ecuación 1**).

$$CV, \% = \frac{S}{x} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

S: Desviación estándar de las mediciones

X: Promedio de las mediciones

3.5.2 Evaluación de la exactitud. La determinación de la exactitud se realizó en términos del porcentaje de recuperación empleando la **Ecuación 2**. Para esto, se enriquecieron muestras de orina y sangre, con las drogas objeto de estudio, a las siguientes concentraciones: 50, 400 y 1600 ng/mL. Cada nivel se analizó por quintuplicado.

$$\text{Recuperación, \%} = \frac{C_e - C_o}{C_a} * 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde:

Ce: Concentración de las drogas en las muestras enriquecidas (sangre y orina)

Co: Concentración de las drogas, medida en una muestra sin enriquecer

Ca: Concentración de las drogas adicionadas a las muestras enriquecidas

3.5.3 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método. La linealidad y la sensibilidad se evaluaron mediante curvas de calibración realizadas con 6 y 8 niveles de concentración para el análisis por GC-MS y LC-MS/MS, respectivamente. En la **Tabla 7** se describen las concentraciones de los niveles que se emplearon para construir las curvas de calibración de cada una de las drogas analizadas.

La linealidad del método se reportó como el cuadrado del coeficiente de correlación, y la sensibilidad como la pendiente de la curva de calibración.

Tabla 7. Concentraciones por nivel de las drogas analizadas por GC-MS y LC-MS/MS.

Nivel	Concentración, ng/mL	
	GC-MS	LC-MS/MS
1	50	12.5
2	100	25
3	200	50
4	400	100
5	800	200
6	1600	400
7	-	800
8	-	1600

3.5.4 Determinación de los límites de detección y de cuantificación para los compuestos analizados. El límite de detección se calculó para cada una de las drogas estudiadas por diluciones sucesivas, partiendo del nivel más bajo de la curva de calibración. Se determinó como aquel en el que se detectaron áreas mayores que el ruido, siendo positiva cuando la señal superó la relación señal/ruido (S/N) en un factor de 3.3 al aplicar la fórmula $S/N = 3.3\sigma/m$, en donde σ es la desviación estándar residual resultante del análisis de varianza de la curva, m la pendiente de la curva y **3.3** el factor señal/ruido.

Así mismo, el límite de cuantificación se determinó como aquel en que se detectaron áreas con precisión y exactitud que superaron la relación S/N en un factor de 10, al aplicar la fórmula $S/N = 10\sigma/m$, en donde σ es la desviación estándar residual resultante del análisis de varianza de la curva, m la pendiente de la curva y 10 el factor señal/ruido.

3.6 EVALUACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE CASOS FORENSES

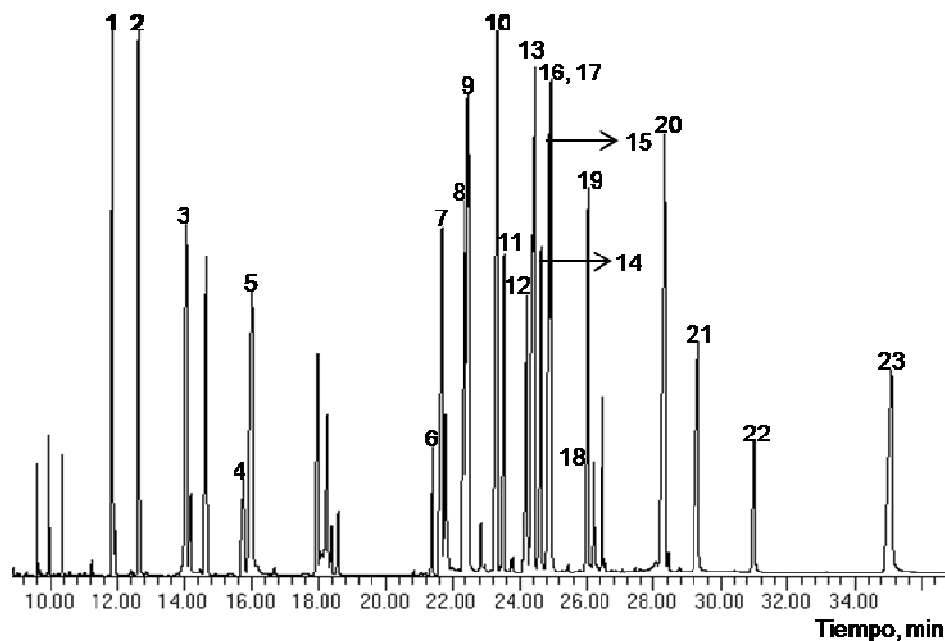
Se realizó la evaluación del método implementado, con cada una de las técnicas cromatográficas. Para esto, se analizaron 17 casos recibidos durante el último trimestre del año 2014, en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Nororiente, cuya casuística estaba relacionada con delitos sexuales o hurtos. Este procedimiento, se realizó garantizando, en todo momento, la normatividad establecida por el Instituto con respecto a la cadena de custodia de los elementos materia de prueba (EMP).

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.

Se realizó el análisis, identificación y detección de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, por GC-MS, en muestras de orina y sangre. En la **Figura 6** se presenta el perfil cromatográfico típico de una mezcla de estándares certificados de las drogas estudiadas, a una concentración de 100 mg/L.

Figura 6. Perfil cromatográfico típico de una mezcla de estándares de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, concentración 100 mg/L, columna DB-5 (30 m). *Pulsed splitless*. MSD (EI, 70 eV).



En la **Tabla 8** aparecen los tiempos de retención (t_R) obtenidos para cada una de las sustancias analizadas, así como también, los principales iones característicos. En el **Anexo A** se presentan los espectros de masas, obtenidos por ionización con electrones (EI, 70 eV) de las 23 drogas analizadas por GC-MS.

Tabla 8. Tiempos de retención y principales iones característicos de las drogas objeto de estudio, analizadas por GC-MS.

No. Pico	Drogas objeto de estudio	t _R , min	CV, % (n=5)	Principales iones característicos (m/z)
1	Éster metílico de ecgonina ^a	11.84	0.03	82, 96, 271
2	Ecgonina ^a	12.60	0.04	82, 96
3	Meperidina	14.01	0.04	71, 172, 247
4	Fluoxetina	15.68	0.02	44, 309
5	Ketamina	15.95	0.07	152, 180, 209
6	Cocaína	21.63	0.03	82, 182, 303
7	Nortriptilina	21.75	0.03	44, 202
8	Cocaetileno	22.35	0.22	82, 196, 317
9	Benzoilecgonina ^a	22.39	0.04	82, 240, 361
10	Escopolamina ^a	23.26	0.00	94, 138, 375
11	Oxazepam ^b	23.49	0.02	401, 415, 429
12	Bromazepam ^a	24.16	0.02	272, 372, 388
13	Codeína ^a	24.33	0.05	178, 234, 371
14	Diazepam	24.42	0.00	221, 256, 283
15	Lorazepam ^b	24.57	0.00	429, 449, 464
16	Morfina ^b	24.80	0.02	236, 414, 429
17	Clorpromazina	24.88	0.00	58, 86, 318
18	Flunitrazepam	25.97	0.03	238, 285, 312
19	Clonazepam ^a	26.18	0.01	352, 372, 387
20	Clozapina	28.27	0.00	243, 256, 326
21	Alprazolam	29.20	0.00	204, 279, 308
22	Zopiclona	30.92	0.00	143, 217, 245
23	Trazodona	34.90	0.00	205, 231, 371
	Estazolam, ISTD	28.90	0.02	259, 205, 294

^a TMS derivado

^b 2TMS derivado

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de las figuras de mérito.

4.1.1 Evaluación de la precisión. Para la evaluación de este parámetro, se determinaron la repetibilidad y reproducibilidad, expresadas en términos del coeficiente de variación. En la **Tabla 9** aparecen los datos de los t_R de las drogas analizadas por GC-MS. Se empleó una mezcla-patrón en tres concentraciones y, cada concentración se analizó cinco veces (n = 5); los análisis se realizaron en tres días diferentes y participaron tres analistas distintos.

Tabla 9. Repetibilidad y reproducibilidad de los t_R de las drogas analizadas por GC-MS a tres concentraciones diferentes en una mezcla patrón.

Droga	Concentración, ng/mL	t_R promedio, min					
		Día 1, Analista 1	CV, % (n = 5)	Día 2, Analista 2	CV, % (n = 5)	Día 3, Analista 3	CV, % (n = 5)
Éster metílico de ecgonina	100	11.84	0.04	11.86	0.02	11.83	0.03
	200	11.84	0.03	11.86	0.07	11.82	0.02
	400	11.84	0.02	11.86	0.02	11.82	0.02
Ecgonina	100	12.60	0.05	12.62	0.01	12.50	0.91
	200	12.61	0.03	12.62	0.04	12.64	2.03
	400	12.61	0.04	12.61	0.02	12.48	0.98
Meperidina	100	14.00	0.05	14.00	0.00	14.01	0.32
	200	14.00	0.06	14.01	0.02	14.05	0.39
	400	14.01	0.04	14.01	0.03	14.04	0.42
Fluoxetina	100	15.60	0.00	15.60	0.00	15.83	0.79
	200	15.69	0.48	15.60	0.00	15.88	0.00
	400	15.73	0.02	15.60	0.00	15.81	0.13
Ketamina	100	15.94	0.06	15.89	0.00	15.95	0.01
	200	15.94	0.06	15.97	0.02	15.95	0.02
	400	15.95	0.07	15.98	0.05	15.95	0.00
Cocaína	100	21.61	0.03	21.61	0.06	21.61	0.02
	200	21.62	0.02	21.62	0.01	21.61	0.02
	400	21.62	0.03	21.62	0.02	21.62	0.01
Nortriptilina	100	21.75	0.09	21.72	0.01	21.72	0.00
	200	21.75	0.03	21.73	0.02	21.72	0.00
	400	21.74	0.03	21.83	0.92	21.79	0.61
Cocaetileno	100	22.38	0.03	22.34	0.25	22.36	0.01
	200	22.39	0.02	22.32	0.25	22.36	0.01
	400	22.35	0.22	22.32	0.24	22.37	0.01
Benzoilecgonina	100	22.38	0.03	22.38	0.01	22.36	0.01
	200	22.39	0.02	22.38	0.01	22.36	0.01
	400	22.40	0.04	22.38	0.01	22.37	0.01
Escopolamina	100	23.25	0.06	23.25	0.01	23.23	0.02
	200	23.26	0.03	23.25	0.01	23.23	0.03
	400	23.26	0.02	23.26	0.01	23.24	0.02
Oxazepam	100	23.47	0.03	23.47	0.01	23.46	0.01
	200	23.48	0.02	23.47	0.01	23.45	0.00
	400	23.48	0.02	23.47	0.02	23.45	0.01
Bromazepam	100	24.15	0.07	24.15	0.02	24.16	0.02
	200	24.15	0.03	24.15	0.04	24.15	0.03
	400	24.16	0.02	24.16	0.03	24.15	0.03
Codeína	100	24.32	0.00	24.32	0.00	24.32	0.00
	200	24.32	0.00	24.32	0.00	24.32	0.00
	400	24.33	0.05	24.32	0.00	24.32	0.00
Diazepam	100	24.42	0.00	24.42	0.00	24.42	0.00
	200	24.42	0.00	24.42	0.00	24.42	0.00
	400	24.42	0.00	24.42	0.00	24.42	0.00
Lorazepam	100	24.55	0.00	24.56	0.01	24.56	0.06
	200	24.55	0.00	24.55	0.00	24.58	0.22
	400	24.56	0.03	24.55	0.00	24.55	0.00
Morfina	100	24.79	0.02	24.78	0.01	24.79	0.02
	200	24.80	0.02	24.79	0.01	24.79	0.01
	400	24.80	0.02	24.79	0.01	24.79	0.01
Clorpromazina	100	24.89	0.00	24.89	0.00	24.88	0.01
	200	24.89	0.00	24.89	0.00	24.89	0.00
	400	24.89	0.00	24.89	0.00	24.89	0.02

Tabla 9. Continuación.

Flunitrazepam	100	25.96	0.01	25.96	0.01	25.99	0.06
	200	25.96	0.02	25.96	0.01	25.99	0.02
	400	25.96	0.03	25.96	0.01	25.98	0.02
Clonazepam	100	26.17	0.02	26.17	0.08	26.16	0.00
	200	26.18	0.01	26.20	0.15	26.19	0.17
	400	26.18	0.01	26.19	0.12	26.19	0.14
Clozapina	100	28.27	0.00	28.27	0.00	28.27	0.00
	200	28.27	0.00	28.27	0.00	28.27	0.00
	400	28.27	0.00	28.27	0.00	28.27	0.00
Alprazolam	100	29.19	0.00	29.19	0.00	29.32	0.07
	200	29.19	0.00	29.19	0.00	29.30	0.09
	400	29.19	0.00	29.19	0.00	29.27	0.05
Zopiclona	100	30.92	0.00	30.92	0.00	30.92	0.00
	200	30.92	0.00	30.92	0.00	30.92	0.00
	400	30.92	0.00	30.92	0.00	30.92	0.00
Trazodona	100	35.04	0.05	34.87	0.00	34.96	0.26
	200	34.93	0.05	34.87	0.00	34.98	0.17
	400	34.87	0.00	34.87	0.00	34.98	0.04

Según la **Tabla 9**, el análisis de varias réplicas, bajo las mismas condiciones, demostró un coeficiente de variación menor que el 3%, lo cual demuestra una repetibilidad del método alta de acuerdo con Naciones Unidas (2010), que establece un valor permisible del 15% para este parámetro. De igual forma, se obtuvieron coeficientes de variación menores que el 3% para los análisis realizados tres días diferentes y por tres analistas distintos, lo cual demuestra una alta reproducibilidad del método.

Adicionalmente, vale la pena mencionar que los coeficientes de variación obtenidos, indican que, a pesar de que el tiempo de retención sea muy sensible a cambios, aún muy pequeños de condiciones cromatográficas (*e.g.*, activación o contaminación de la columna cromatográfica) (Stashenko y Martínez, 2010c), el método empleado para el análisis de las drogas objeto de estudio, presenta una alta precisión, obteniéndose en algunos casos, exactamente el mismo tiempo de retención al realizar las cinco réplicas (CV = 0.00%).

4.1.2 Evaluación de la exactitud. Este parámetro se determinó en términos del porcentaje de recuperación. En la **Tabla 10** aparecen los resultados de la evaluación de los porcentajes de recuperación, obtenidos al analizar los tres niveles de concentración (50, 400 y 1600 ng/mL) en las matrices de sangre y orina.

Tabla 10. Exactitud, expresada en porcentaje de recuperación, de las drogas analizadas por GC-MS a tres concentraciones diferentes, en muestras de sangre y orina.

Droga	Concentración, ng/mL	Recuperación, % (n = 5)	
		Orina	Sangre
Éster metílico de ecgonina	50	115.48	88.41
	400	115.79	105.02
	1600	84.06	97.60
Ecgonina	50	75.74	123.68
	400	104.11	102.23
	1600	95.30	92.69
Meperidina	50	111.91	95.91
	400	97.30	83.06
	1600	85.71	103.94
Fluoxetina	50	88.59	94.40
	400	115.32	96.49
	1600	95.49	88.48
Ketamina	50	77.54	62.44
	400	108.02	102.05
	1600	89.82	85.71
Cocaína	50	99.29	37.92
	400	101.58	89.53
	1600	96.39	83.16
Nortriptilina	50	87.02	82.14
	400	98.71	79.43
	1600	91.02	91.76
Cocaetileno	50	82.82	101.33
	400	89.31	92.16
	1600	94.68	109.25
Benzoilecgonina	50	93.54	91.37
	400	100.09	89.82
	1600	96.28	88.26
Escopolamina	50	107.61	99.74
	400	98.41	85.57
	1600	110.77	109.85
Oxazepam	50	95.11	83.30
	400	95.75	96.32
	1600	96.44	98.13

Tabla 10. Continuación.

Bromazepam	50	90.09	73.64
	400	100.66	87.46
	1600	85.45	75.58
Codeína	50	93.77	97.39
	400	99.21	65.73
	1600	88.37	102.74
Diazepam	50	39.66	90.80
	400	112.67	70.36
	1600	89.61	93.51
Lorazepam	50	76.79	95.59
	400	83.38	51.63
	1600	94.98	84.23
Morfina	50	91.60	98.23
	400	60.24	72.43
	1600	91.67	99.79
Clorpromazina	50	103.62	52.98
	400	83.42	61.69
	1600	76.52	75.86
Flunitrazepam	50	90.33	42.09
	400	83.85	92.30
	1600	83.73	91.14
Clonazepam	50	97.06	42.91
	400	69.60	77.76
	1600	74.17	45.38
Clozapina	50	72.11	76.74
	400	96.45	87.34
	1600	57.19	70.35
Alprazolam	50	98.73	86.83
	400	96.47	72.84
	1600	73.81	81.00
Zopiclona	50	115.56	78.99
	400	97.42	89.15
	1600	81.53	75.98
Trazodona	50	87.50	68.75
	400	100.50	100.16
	1600	80.04	76.66

En general, los valores de exactitud encontrados en este estudio fueron aceptables (70–120%), de acuerdo con Naciones Unidas (2010), excepto para el diazepam y clozapina, en la muestra de orina y, cocaína, lorazepam, clorpromazina, flunitrazepam y clonazepam, en la muestra de sangre (<60%). Sin embargo, los bajos porcentajes de recuperación obtenidos para los compuestos anteriormente mencionados, no se presentaron de forma paralela para los tres niveles de concentración evaluados. Adicionalmente, es importante resaltar que el procedimiento empleado contempló la extracción simultánea de las 23 drogas objeto de estudio, en las muestras de sangre y orina, las cuales, además, presentan diferencias en sus propiedades y características iónicas, de polaridad y de basicidad.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en cada una de las matrices estudiadas (*i.e.*, orina y sangre) se observa que, en la mayoría de los compuestos, a las tres concentraciones evaluadas, los porcentajes de recuperación más altos se obtuvieron en la muestra de orina. Estos resultados indican que la matriz ejerce efecto sobre la eficiencia de la extracción de los compuestos, siendo más notoria en la sangre, la cual está compuesta por un mayor número de sustancias (proteínas, glóbulos rojos y blancos, plasma, plaquetas) que la orina (agua, *ca.* 95%, sales minerales y úrea) que se unen a los compuestos, dificultando de esta manera, la extracción de los mismos.

4.1.3 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método. Los resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad y sensibilidad del método, mediante curvas de calibración, en las matrices de sangre y orina (**Anexo B**), se muestran en la **Tabla 11**. Las curvas de calibración fueron construidas con 5 y 6 niveles de concentración, comprendidas en el rango 50-1600 ng/mL y, cada nivel se analizó por quintuplicado.

Tabla 11. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.

Droga	Rango lineal, ng/mL		Linealidad (r^2)		Sensibilidad, m	
	Sangre	Orina	Sangre	Orina	Sangre	Orina
Éster metílico de ecgonina	50-1600	50-1600	0.9871	0.9953	0.0034	0.0016
Ecgonina	50-800	50-800	0.9913	0.9853	0.0004	0.0022
Meperidina	50-1600	50-1600	0.9968	0.9978	0.0104	0.0100
Fluoxetina	50-1600	50-800	0.9968	0.9952	0,0052	0.0037
Ketamina	50-800	50-1600	0.9943	0.9981	0.0089	0.0039
Cocaína	50-1600	50-1600	0.9991	0.9925	0.0098	0.0048
Nortriptilina	100-1600	50-1600	0.9979	0.9972	0.0009	0.0036
Cocaetileno	50-1600	50-800	0.9923	0.9990	0.0050	0.0082
Benzoilecgonina	50-800	50-800	0.9939	0.9862	0.0041	0.0035

Tabla 11. Continuación.

Escopolamina	50-800	50-800	0.9933	0.9857	0.0087	0.0061
Oxazepam	50-1600	100-1600	0.9799	0.9522	0.0048	0.0019
Bromazepam	50-1600	50-800	0.9824	0.9856	0.0026	0.0056
Codeína	100-1600	100-1600	0.9906	0.9995	0.0019	0.0013
Diazepam	50-1600	100-1600	0.9988	0.9781	0.0014	0.0007
Lorazepam	50-1600	50-1600	0.9918	0.9947	0.0061	0.0040
Morfina	100-1600	50-800	0.9853	0.9891	0.0009	0.0009
Clorpromazina	50-1600	50-800	0.9864	0.9992	0.0045	0.0010
Flunitrazepam	50-1600	50-1600	0.9916	0.9995	0.0011	0.0014
Clonazepam	50-800	50-800	0.9969	0.9973	0.0003	0.0013
Clozapina	50-1600	50-1600	0.9932	0.9970	0.0021	0.0023
Alprazolam	50-1600	50-800	0.9851	0.9988	0.0021	0.0017
Zopiclona	50-1600	100-1600	0.9988	0.9943	0.0303	0.0008
Trazodona	50-1600	50-800	0.9912	0.9993	0.0052	0.0028

r: coeficiente de correlación

m: pendiente de la curva de calibración

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron aceptables de acuerdo con Naciones Unidas (2010), y demostraron la linealidad del método bajo los rangos de concentración evaluados (**Sección 3.5.3**).

4.1.4 Determinación de los límites de detección y de cuantificación para los compuestos analizados. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada droga, en las matrices sangre y orina, se reportan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Límites de detección y cuantificación de las 23 drogas analizadas por GC-MS, en las matrices sangre y orina.

Droga	Límite de detección, ng/mL		Límite de cuantificación, ng/mL	
	Sangre	Orina	Sangre	Orina
Éster metílico de ecgonina	13.17	4.70	39.92	14.24
Ecgonina	21.82	12.36	46.13	37.47
Meperidina	1.74	1.78	5.28	2.69
Fluoxetina	7.80	4.96	23.65	15.03
Ketamina	1.70	4.54	5.17	13.77
Cocaína	2.39	1.41	7.25	4.27
Nortriptilina	7.36	6.62	22.31	20.06
Cocaetileno	2.54	2.90	7.69	8.79
Benzoilecgonina	3.87	0.98	11.74	2.97
Escopolamina	7.21	10.28	21.85	31.15

Tabla 12. Continuación.

Oxazepam	12.61	2.26	38.22	6.86
Bromazepam	6.35	3.29	19.23	9.96
Codeína	5.29	10.55	16.05	31.98
Diazepam	10.88	7.12	32.96	21.59
Lorazepam	8.42	2.84	25.53	8.62
Morfina	7.65	0.89	23.19	2.69
Clorpromazina	12.64	3.39	38.31	10.28
Flunitrazepam	19.73	2.15	59.79	6.51
Clonazepam	19.51	2.67	49.12	8.08
Clozapina	9.09	9.97	27.54	30.22
Alprazolam	19.01	8.55	47.62	25.92
Zopiclona	3.42	4.00	10.37	12.12
Trazodona	10.34	7.23	31.35	23.10

Los límites de detección encontrados, en las matrices sangre y orina, estuvieron comprendidos en los rangos 1.7-21.8 ng/mL y 0.9-12.4 ng/mL, respectivamente. Así mismo, los límites de cuantificación determinados, en las matrices sangre y orina, estuvieron comprendidos en los rangos 5.2-59.8 ng/mL y 2.7-37.5 ng/mL, respectivamente.

Los resultados obtenidos se ajustan a las exigencias forenses establecidas internacionalmente, en relación con los límites de detección máximos (5-50 ng/mL) que debe tener un laboratorio que realiza análisis de drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, en muestras de orina, lo cual disminuye la posibilidad de dar lugar a resultados falsos negativos (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Laboratory Guidelines Committee of the Society of Forensic Toxicologist, 2006).

Con la evaluación de las figuras de mérito, se demuestra que el método implementado es adecuado para el análisis simultáneo de las 23 drogas por GC-MS, y cumple con los requisitos establecidos en el ámbito forense, para el análisis de drogas en muestras biológicas. Además, la técnica GC-MS sigue demostrando su versatilidad y poder en el análisis toxicológico, así como lo reporta Maurer (1992) en una revisión que realizó entre los años 1981-1991, en la cual demostró que mediante el uso de esta técnica fue posible analizar, identificar y detectar de forma simultánea, más de 200 drogas (e.g., barbitúricos, benzodiacepinas, antidepresivos, drogas estimulantes y alucinógenas, entre otras) relacionadas con casos toxicológicos forenses y clínicos en muestras biológicas.

Por otra parte, en comparación con otros estudios realizados empleando la técnica GC-MS, vale la pena mencionar que el método implementado en este trabajo permitió obtener mejores límites de detección y cuantificación, en comparación

con el método desarrollado por P. Adamowicz y colaboradores (2010), quienes en muestras de orina reportaron límites de detección y cuantificación superiores a 30 y 50 ng/mL, respectivamente.

Por el contrario, estudios realizados por Elsohly y colaboradores (1997 y 1999b) en muestras de orina y sangre, en las cuales determinaron flunitrazepam y sus metabolitos, encontraron límites de detección inferiores a 1 y 5 ng/mL, respectivamente. En comparación con los resultados obtenidos en este estudio, para la misma droga, en muestras de orina y sangre, se hallaron límites de detección de 2.15 y 19.73 ng/mL, respectivamente. No obstante, estas concentraciones siguen estando dentro de los rangos permitidos.

En otro estudio realizado por Versace (2012) quienes analizaron 54 drogas en muestras de orina, entre ellas, las siguientes: cocaína, cocaetileno, meperidina, ketamina, alprazolam, clonazepam, lorazepam, bromazepam, morfina, codeína y clozapina, encontraron límites de detección comprendidos en el rango 25-200 ng/mL. Sin embargo, vale la pena resaltar que en este estudio emplearon únicamente 200 µL de muestra de orina y el tiempo total del análisis cromatográfico fue de 10 minutos. En este estudio se emplearon 2 mL de orina y el tiempo total del análisis cromatográfico fue de 38 minutos.

También, Gunnar y colaboradores (2005) analizaron en muestras de sangre, 14 benzodiacepinas y dos agentes hipnóticos por GC-MS, y encontraron límites de detección comprendidos en el rango 0.4-10 ng/mL. De igual forma, evaluaron la eficiencia de extracción y la precisión, las cuales fueron mayores que el 80 y 2%, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio son comparables, en el cual se obtuvo un porcentaje de recuperación comprendido en el rango 70-120% y el método demostró ser altamente preciso, con coeficientes de variación menores que el 3%.

4.2 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS, CON ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO.

Se realizó el análisis, identificación y detección de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, por GC-QqQ-MS. En la **Figura 7** se presenta el perfil cromatográfico típico de una mezcla de estándares certificados de las drogas analizadas, a una concentración de 100 mg/L.

En la **Tabla 13** aparecen los tiempos de retención (t_R) obtenidos para cada una de las drogas analizadas por GC-QqQ-MS.

Figura 7. Perfil cromatográfico típico de una mezcla de estándares de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, concentración 100 mg/L, columna DB-5 (60 m). *Pulsed splitless*. MSD (EI, 70 eV). Modo de adquisición *full scan*.

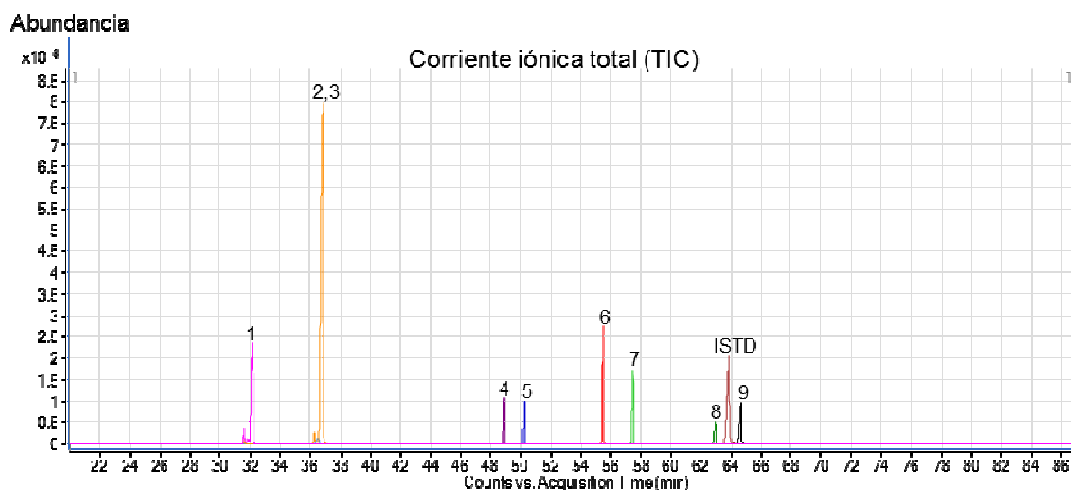


Tabla 13. Tiempos de retención de las drogas analizadas por GC-QqQ-MS.

No. Pico	Droga	t _R , min
1	Meperidina	32.06
2	Fluoxetina	36.38
3	Ketamina	36.69
4	Cocaína	48.85
5	Cocaetileno	50.22
6	Clorpromazina	55.45
7	Flunitrazepam	57.41
8	Clozapina	62.89
9	Alprazolam	64.57
	Estazolam, ISTD	63.90

4.2.1 Monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Además del análisis en modo *full scan* para la identificación de las drogas, se empleó el modo de adquisición monitoreo de reacción múltiple (MRM). Para esto, se establecieron las reacciones de transición entre los pares de iones (precursor y producto) para cada compuesto

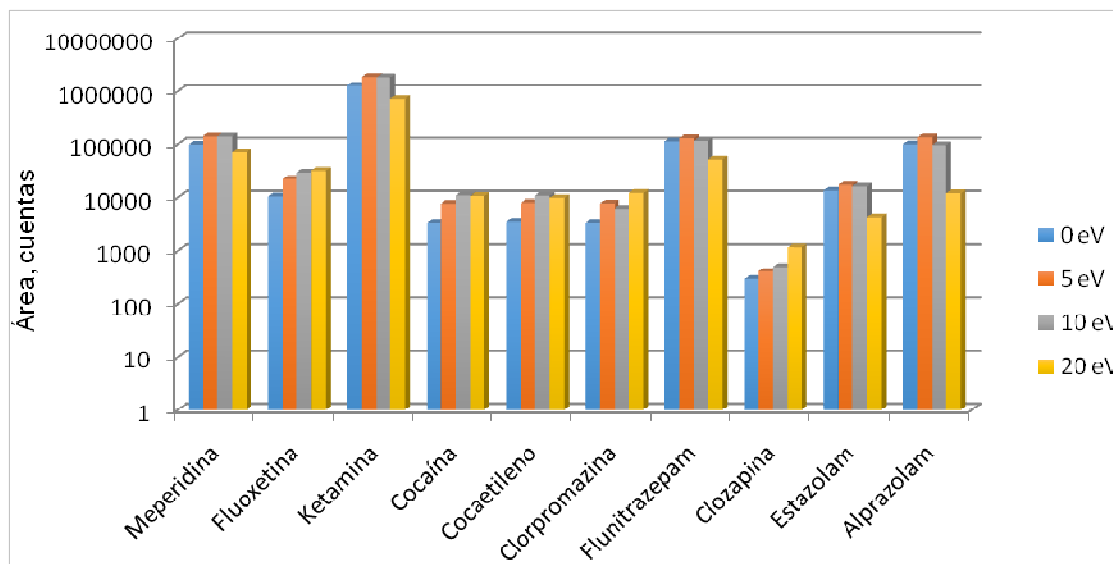
y, se realizaron análisis empleando cuatro energías de colisión, a saber: 0, 5, 10 y 20 eV, con el fin de establecer las condiciones que proporcionaran la mayor sensibilidad. En la **Tabla 14** aparecen las reacciones de transición empleadas para cada uno de los compuestos analizados.

Tabla 14. Monitoreo de reacciones de transición para el análisis por GC-QqQ-MS de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos.

Compuesto	<i>m/z</i> (MRM, EI)
Meperidina	247→218
Fluoxetina	309→44
Ketamina	209→180
Cocaína	303→182
Cocaetileno	317→196
Zopiclona	246→217
Clorpromazina	318→232
Flunitrazepam	313→286
Clozapina	326→227
Estazolam	294→259
Alprazolam	308→273

En la **Figura 8** se presentan las variaciones en las abundancias obtenidas para cada compuesto, al cambiar las energías de colisión. En general, se observaron pequeñas variaciones en las intensidades de los iones-productos y en las abundancias, de todas las drogas analizadas, al cambiar las energías de colisión.

Figura 8. Variaciones en las abundancias para las drogas analizadas por GC-QqQ-MS, al emplear 4 energías de colisión.



De la gráfica se observa que para meperidina, ketamina, flunitrazepam, estazolam y alprazolam, al aumentar la energía de colisión a 20 eV, las abundancias disminuyeron. Para estos mismos compuestos, se observaron pequeñas diferencias al emplear energías de 5 y 10 eV. Así mismo, para el flunitrazepam, estazolam y alprazolam, se presentaron pequeñas diferencias a 0 eV. Por el contrario, al incrementar la energía de colisión, aumentaron las abundancias para la fluoxetina y clozapina.

La cocaína y el cocaetileno, presentaron la mayor abundancia a 10 eV, y la clorpromazina, a 20 eV. En la **Tabla 15** aparecen las energías de colisión que proporcionaron la mayor abundancia, para cada una de las reacciones de transición de los iones (precursor y producto) de las drogas analizadas.

Tabla 15. Energías de colisión que proporcionaron la mayor abundancia para las reacciones de transición de los iones (precursor y producto) de las drogas analizadas por GC-QqQ-MS.

Compuesto	Energía de colisión, eV
Ketamina	
Flunitrazepam	5
Estazolam	
Alprazolam	

Tabla 15. Continuación.

Meperidina	
Cocaína	10
Cocaetileno	
Fluoxetina	
Clorpromazina	20
Clozapina	

De acuerdo con los resultados obtenidos, se usó el método de adquisición por MRM empleando las energías de colisión descritas arriba, y se realizaron curvas de calibración para cada droga, con las siguientes concentraciones: 0.5, 0.9, 1.9, 3.7, 7.5 y 15 mg/L (**Anexo C**). Cada nivel se analizó por quintuplicado. De esta manera, se evaluó la linealidad y la sensibilidad del método, **Tabla 16**.

Tabla 16. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.

Droga	Rango lineal, mg/L	Linealidad (r^2)	Sensibilidad, m
Meperidina	0.5-7.5	0.9918	1.9739
Fluoxetina	0.5-15	0.9987	0.2817
Ketamina	0.5-7.5	0.9994	21.2092
Cocaína	0.5-7.5	0.9903	0.1581
Cocaetileno	0.5-7.5	0.9966	0.1406
Clorpromazina	0.5-7.5	0.9954	0.1364
Flunitrazepam	0.5-7.5	0.9915	0.8950
Clozapina	0.5-7.5	0.9955	0.0082
Alprazolam	0.5-15	0.9779	0.8518

r: coeficiente de correlación

m: pendiente de la curva de calibración

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron aceptables de acuerdo con Naciones Unidas (2010), y demostraron la linealidad del método bajo los rangos de concentración evaluados.

En relación con las pendientes, éstas demostraron una alta sensibilidad del método.

En comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio por GC-MS y GC-MS/MS, se observa un aumento sustancial en la sensibilidad del método. Así, por ejemplo, las sensibilidades obtenidas para los mismos compuestos descritos en la tabla anterior, analizados por GC-MS, estuvieron comprendidas en el rango 0.0008-0.0303, mientras que las sensibilidades obtenidas por GC-MS/MS fueron

mayores que 0.1000 en todos los casos, excepto para la clozapina que presentó una sensibilidad de 0.0082.

De igual forma, en un estudio realizado por Versace (2012), en el cual analizaron 54 drogas por las técnicas GC-MS y GC-MS/MS, encontraron una mejora sustancial en la sensibilidad al emplear la técnica GC-MS/MS.

4.2.1.1 Aplicación del método a casos forenses. Se analizaron tres muestras de orina de casos forenses, recibidos en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, relacionados con delitos sexuales y hurtos. Se realizó el análisis, identificación y cuantificación de tres drogas, con base en el método MRM. En la **Tabla 17** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 17. Análisis, identificación y cuantificación de clozapina, ketamina y clorpromazina en muestras de orina, por GC-QqQ-MS.

Identificación de la muestra	Droga identificada	t _R , min	m/z (MRM, EI)	Concentración, mg/L
A	Clozapina	62.86	326→227	14
B	Ketamina	36.71	209→180	16
C	Clorpromazina	55.44	318→232	10

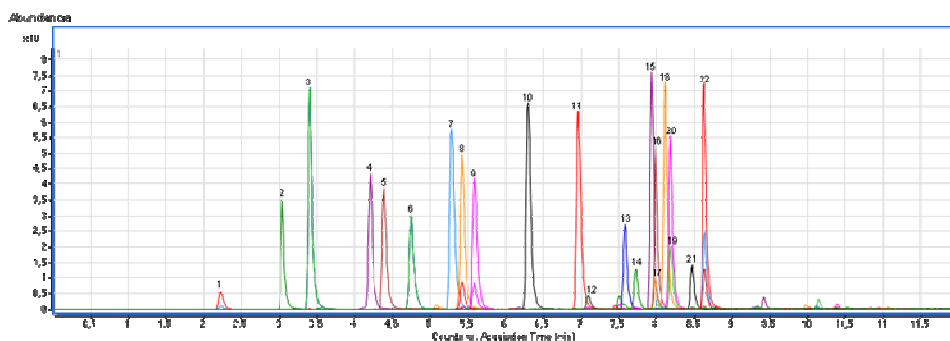
Usando el método de adquisición por MRM y las transiciones iónicas descritas en la tabla anterior, se identificaron y cuantificaron las drogas clozapina, ketamina y clorpromazina en las muestras de orina. Cabe mencionar que estas muestras habían sido previamente analizadas (cualitativamente) empleando el método GC-MS. Los resultados obtenidos fueron los mismos; sin embargo, mediante el uso de este método, se pudo confirmar la presencia inequívoca de los analitos, mediante el registro de las transiciones y los tiempos de retención.

Vale la pena mencionar que el uso del triple cuadrupolo, operado en modo MRM, el cual actúa como un sistema de detección altamente específico, es de particular importancia para el análisis de compuestos presentes a nivel de traza en matrices complejas (e.g., muestras biológicas), convirtiéndose en una herramienta analítica poderosa y de gran utilidad en el área de la toxicología forense (Stashenko y Martínez, 2010b).

4.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y ANALIZADOR CUADRUPOLO-TIEMPO DE VUELO. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.

Se realizó el análisis, identificación y detección de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos por LC-QTOF-MS, en muestras de orina y sangre. En la **Figura 9** se presenta el cromatograma de iones extraído (EIC, *extracted ion chromatogram*, por sus siglas en inglés) de una mezcla de estándares certificados de las drogas analizadas, a una concentración de 1 µg/mL.

Figura 9. Cromatograma de iones extraído de una mezcla de estándares de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, concentración 1 µg/mL, obtenido por LC-ESI(+)-TOF-MS.



En la **Tabla 18** aparecen los tiempos de retención (t_R) obtenidos para cada una de las sustancias analizadas, las fórmulas moleculares condensadas, y los iones moleculares protonados, $[M+H]^+$. En el **Anexo D** se presentan los espectros de masas, obtenidos por LC-ESI(+)-QTOF-MS de las 22 drogas analizadas.

Tabla 18. Tiempos de retención, fórmulas moleculares condensadas, e iones moleculares protonados, $[M+H]^+$, de las drogas objeto de estudio, analizadas por LC-QTOF-MS.

No. Pico	Droga	Fórmula	t_R , min	CV, % (n=5)	$[M+H]^+$
1	Morfina	$C_{17}H_{19}NO_3$	2.19	3.21	286.1427
2	Codeína	$C_{18}H_{21}NO_3$	3.02	4.72	300.1595
3	Escopolamina	$C_{17}H_{21}NO_4$	3.37	7.00	304.1533
4	Benzoilecgonina	$C_{16}H_{19}NO_4$	4.17	0.05	290.1391

Tabla 18. Continuación.

5	Ketamina	C ₁₃ H ₁₆ NCIO	4.35	0.06	238.0985
6	Cocaína	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	4.71	4.08	304.1552
7	Meperidina	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	5.24	0.09	248.1637
8	7-Aminoflunitrazepam	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	5.40	0.08	284.1193
9	Cocaetileno	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	5.56	0.08	318.1696
10	Trazodona	C ₁₉ H ₂₂ CIN ₅ O	6.28	0.05	372.1594
11	Clozapina	C ₁₈ H ₁₉ CIN ₄	6.96	0.08	327.1379
12	Bromazepam	C ₁₄ H ₁₀ N ₃ BrO	7.10	0.06	316.0076
13	Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ N ₃ ClO ₃	7.52	0.06	316.0480
14	Flunitrazepam	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	7.59	0.04	314.0940
15	Nortriptilina	C ₁₉ H ₂₁ N	7.93	0.60	264.1745
16	Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ CIN ₄	7.99	0.04	309.0906
17	Lorazepam	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ Cl ₂ O ₂	8.01	0.09	321.0197
18	Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ ClO ₂	8.02	0.08	287.0564
19	Fluoxetina	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	8.12	0.04	310.1417
20	Clorpromazina	C ₁₇ H ₁₉ CIN ₂ S	8.18	0.06	319.1036
21	Nordiazepam	C ₁₅ H ₁₁ CIN ₂ O	8.47	0.06	271.0631
22	Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ CIN ₂ O	8.64	0.04	285.0788
	Estazolam (ISTD)	C ₁₆ H ₁₁ CIN ₄	7.73	0.05	295.0735

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de las figuras de mérito.

4.3.1 Evaluación de la precisión. Para la evaluación de este parámetro, se determinaron la repetibilidad y reproducibilidad, expresadas en términos del coeficiente de variación. En la **Tabla 19** aparecen los datos de los t_R de las drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS. Se empleó una mezcla-patrón en tres concentraciones y, cada concentración se analizó cinco veces (n = 5); los análisis se realizaron en tres días diferentes y participaron tres analistas distintos.

Tabla 19. Repetibilidad y reproducibilidad de los t_R de las drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS a tres concentraciones diferentes en una mezcla patrón.

Droga	Concentración , ng/mL	t_R promedio, min					
		Día 1 Analista 1	CV, % (n = 5)	Día 2 Analista 2	CV, % (n = 5)	Día 3 Analista 3	CV, % (n = 5)
Morfina	50	2.20	0.19	2.47	0.57	2.22	0.35
	100	2.20	0.23	2.47	0.54	2.21	0.30
	200	2.20	0.13	2.47	0.39	2.22	0.16
Codeína	50	3.03	0.06	3.27	0.34	3.04	0.08
	100	3.03	0.14	3.27	0.35	3.04	0.15
	200	3.03	0.08	3.27	0.13	3.04	0.13
Escopolamina	50	3.38	0.05	3.61	0.18	3.40	0.07
	100	3.39	0.10	3.61	0.16	3.40	0.13
	200	3.38	0.09	3.61	0.24	3.40	0.13
Benzoilecgonina	50	4.29	0.12	4.37	0.15	4.20	6.25
	100	4.29	0.05	4.37	0.20	4.20	0.11
	200	4.29	0.11	4.37	0.12	4.20	0.11
Ketamina	50	4.37	0.06	4.71	0.26	4.39	0.15
	100	4.37	0.06	4.69	0.15	4.39	0.13
	200	4.37	0.06	4.70	0.38	4.39	0.16
Cocaína	50	4.84	0.09	5.10	0.25	4.73	0.13
	100	4.84	0.10	5.09	0.47	4.73	0.08
	200	4.84	0.06	5.10	0.27	4.73	0.13
Meperidina	50	5.26	0.08	5.30	0.24	5.28	0.14
	100	5.26	0.09	5.29	0.07	5.28	0.04
	200	5.26	0.05	5.29	0.22	5.28	0.15
7-Aminoflunitrazepam	50	5.40	0.07	5.57	0.12	5.42	0.15
	100	5.40	0.08	5.57	0.15	5.42	0.14
	200	5.40	0.04	5.57	0.09	5.42	0.14
Cocaetileno	50	5.66	0.08	5.91	0.24	5.59	0.15
	100	5.66	0.08	5.91	0.27	5.58	0.03
	200	5.65	0.09	5.91	0.25	5.58	0.05
Trazodona	50	6.31	0.05	6.49	0.18	6.31	0.03
	100	6.31	0.05	6.48	0.12	6.31	0.07
	200	6.31	0.05	6.48	0.12	6.31	0.02
Clozapina	50	6.96	0.04	7.21	0.39	6.96	0.06
	100	6.96	0.08	7.20	0.30	6.96	0.05
	200	6.96	0.04	7.20	0.27	6.96	0.12

Tabla 19. Continuación.

Bromazepam	50	7.09	0.06	7.16	0.24	7.08	0.14
	100	7.10	0.06	7.15	0.08	7.08	0.06
	200	7.09	0.06	7.16	0.19	7.08	0.10
Clonazepam	50	7.51	0.08	7.51	0.13	7.49	0.44
	100	7.51	0.06	7.51	0.08	7.50	0.06
	200	7.51	0.05	7.51	0.06	7.50	0.21
Flunitrazepam	50	7.59	0.04	7.63	0.22	7.58	0.10
	100	7.59	0.04	7.63	0.15	7.58	0.04
	200	7.59	0.05	7.63	0.08	7.58	0.10
Nortriptilina	50	7.92	0.04	7.93	0.10	7.92	0.04
	100	7.92	0.06	7.93	0.10	7.92	0.04
	200	7.92	0.06	7.93	0.08	7.92	0.04
Alprazolam	50	7.99	0.07	7.99	0.05	7.98	0.09
	100	7.99	0.04	7.99	0.04	7.98	0.07
	200	7.99	0.04	7.99	0.03	7.98	0.06
Lorazepam	50	8.00	0.05	8.03	0.27	-	-
	100	8.00	0.09	8.05	0.25	-	-
	200	8.00	0.07	8.04	0.15	-	-
Oxazepam	50	8.01	0.06	8.03	0.06	8.01	0.07
	100	8.02	0.08	8.02	0.07	8.01	0.09
	200	8.01	0.07	8.02	0.05	8.08	2.08
Fluoxetina	50	8.11	0.03	8.12	0.05	8.11	0.07
	100	8.11	0.03	8.12	0.07	8.11	0.02
	200	8.11	0.04	8.12	0.05	8.11	0.03
Clorpromazina	50	8.17	0.04	8.36	0.11	8.11	5.63
	100	8.17	0.06	8.36	0.15	8.18	0.02
	200	8.17	0.03	8.36	0.13	8.28	2.83
Nordiazepam	50	8.46	0.06	8.51	0.13	8.46	0.06
	100	8.46	0.06	8.51	0.19	8.46	0.02
	200	8.46	0.03	8.51	0.16	8.46	0.06
Diazepam	50	8.63	0.04	8.64	0.03	8.62	0.04
	100	8.63	0.04	8.63	0.04	8.62	0.05
	200	8.63	0.03	8.63	0.02	8.62	0.05

Según la **Tabla 19**, el análisis de varias réplicas, bajo las mismas condiciones, demostró un coeficiente de variación menor que el 7%, lo cual demuestra una repetibilidad del método alta de acuerdo con Naciones Unidas (2010), que establece un valor permisible del 15% para este parámetro. De igual forma, se obtuvieron coeficientes de variación menores que el 7% para los análisis

realizados tres días diferentes y por tres analistas distintos, lo cual demuestra una alta reproducibilidad del método.

Al igual que en el análisis realizado por GC-MS, se observa que aunque los tiempos de retención sean muy sensibles a cambios, aún muy pequeños, de las condiciones cromatográficas, el método empleado para el análisis de las drogas objeto de estudio por LC-ESI(+)-QTOF-MS, presentó una alta precisión.

4.3.2 Evaluación de la exactitud. Este parámetro se determinó en términos del porcentaje de recuperación. En la **Tabla 20** aparecen los resultados de la evaluación de los porcentajes de recuperación, obtenidos al analizar los tres niveles de concentración (12.5, 100 y 800 ng/mL) en las matrices de orina y sangre.

Tabla 20. Exactitud, expresada en porcentaje de recuperación, de las drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS a tres concentraciones diferentes, en muestras de orina y sangre.

Droga	Concentración, ng/mL	Recuperación, % (n = 5)	
		Orina	Sangre
Morfina	12.5	78.95	100.00
	100	30.77	84.62
	800	70.00	67.00
Codeína	12.5	66.67	106.67
	100	85.00	106.00
	800	83.95	125.31
Escopolamina	12.5	83.33	105.00
	100	80.00	96.67
	800	90.52	102.33
Benzoilecgonina	12.5	55.36	37.50
	100	34.04	69.15
	800	85.25	87.75
Ketamina	12.5	82.00	108.00
	100	53.85	105.64
	800	92.72	102.27
Cocaína	12.5	108.46	92.31
	100	69.01	105.63
	800	50.67	82.49

Tabla 20. Continuación.

Meperidina	12.5	57.14	107.14
	100	66.67	95.19
	800	86.22	102.76
7-Aminoflunitrazepam	12.5	38.79	50.00
	100	42.00	82.00
	800	92.44	97.22
Cocaetileno	12.5	55.56	93.33
	100	85.26	106.58
	800	47.28	84.14
Trazodona	12.5	66.67	103.33
	100	72.73	115.91
	800	76.12	96.07
Clozapina	12.5	50.00	83.33
	100	70.45	72.73
	800	103.33	81.61
Bromazepam	12.5	75.87	81.22
	100	66.67	106.67
	800	82.61	93.48
Clonazepam	12.5	100.00	100.00
	100	75.00	100.00
	800	78.26	86.96
Flunitrazepam	12.5	66.67	103.33
	100	77.78	111.11
	800	77.70	94.96
Nortriptilina	12.5	67.27	100.00
	100	92.47	84.42
	800	36.52	87.06
Alprazolam	12.5	100.00	106.00
	100	96.77	108.71
	800	97.73	112.27
Lorazepam	12.5	98.76	-
	100	100.00	-
	800	75.00	-
Oxazepam	12.5	100.00	100.00
	100	100.00	103.33
	800	80.00	113.33

Tabla 20. Continuación.

	12.5	30.00	100.00
Fluoxetina	100	38.10	100.00
	800	87.12	99.79
	12.5	82.46	56.89
Clorpromazina	100	70.20	66.67
	800	108.00	97.30
	12.5	100.00	98.77
Nordiazepam	100	100.00	105.00
	800	92.19	110.94
	12.5	83.33	105.00
Diazepam	100	86.05	125.58
	800	90.37	103.73

Los porcentajes de recuperación encontrados, en las muestras de orina, estuvieron comprendidos en los rangos de 27-108%, 30-100% y 47-108% a concentraciones de 12.5, 100 y 800 ng/mL, respectivamente. De igual forma, los porcentajes de recuperación encontrados, en las muestras de sangre, estuvieron comprendidos en los rangos de 37-108%, 66-111% y 67-125% a concentraciones de 12.5, 100 y 800 ng/mL, respectivamente.

Cabe mencionar que los bajos porcentajes de recuperación obtenidos para algunas drogas (*i.e.*, morfina, benzoilecgonina, ketamina, cocaína, meperidina, 7-aminoflunitrazepam, cocaetileno, clozapina, nortriptilina, fluoxetina y clorpromazina), en las muestras de orina y sangre (<60%), no se presentaron de forma paralela para los tres niveles de concentración evaluados. Adicionalmente, es importante resaltar que el procedimiento empleado contempló la extracción simultánea de las 22 drogas objeto de estudio, en las muestras de sangre y orina.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en cada una de las matrices estudiadas (*i.e.*, orina y sangre) se observa que, en la mayoría de los compuestos, a las tres concentraciones evaluadas, los porcentajes de recuperación más altos se obtuvieron en la muestra de sangre. Estos resultados indican que la matriz ejerce efecto sobre la eficiencia de la extracción de los compuestos, siendo más notoria en la orina que en la sangre. Esto obedece, probablemente, a la presencia de sales en la muestra de orina, que pueden afectar la eficiencia de la ionización (*i.e.*, supresión iónica) produciendo una menor respuesta en el detector.

4.3.3 Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método. Los resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad y sensibilidad del método, mediante curvas de calibración, en las matrices de orina y sangre (**Anexo E**), se muestran en la **Tabla 21**. Las curvas de calibración fueron construidas con 6 y 8 niveles de

concentración, comprendidas en el rango 12.5-1600 ng/mL y, cada nivel se analizó por quintuplicado.

Tabla 21. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.

Droga	Rango lineal, ng/mL		Linealidad (r^2)		Sensibilidad, m	
	Orina	Sangre	Orina	Sangre	Orina	Sangre
Morfina	12.5-1600	12.5-1600	0.9998	0.9994	0.0004	0.0008
Codeína	12.5-1600	12.5-1600	0.9998	0.9985	0.0016	0.0023
Escopolamina	12.5-1600	12.5-1600	0.9997	0.9993	0.0033	0.0040
Benzoilecgonina	50-1600	12.5-1600	0.9950	0.9912	0.0008	0.0043
Ketamina	12.5-1600	12.5-1600	0.9989	0.9994	0.0016	0.0037
Cocaína	12.5-1600	12.5-1600	0.9999	0.9998	0.0037	0.0060
Meperidina	12.5-1600	12.5-1600	0.9928	0.9996	0.0028	0.0052
7-Aminoflunitrazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9995	0.9933	0.0025	0.0007
Cocaetileno	12.5-800	12.5-1600	0.9993	0.9999	0.0039	0.0068
Trazodona	12.5-1600	12.5-1600	0.9999	0.9994	0.0034	0.0040
Clozapina	12.5-1600	12.5-1600	0.9977	0.9994	0.0025	0.0029
Bromazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9988	0.9984	0.0002	0.0004
Clonazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9997	0.9985	0.0002	0.0002
Flunitrazepam	12.5-1600	12.5-1600	1.0000	0.9999	0.0013	0.0016
Nortriptilina	12.5-1600	12.5-1600	0.9973	0.9901	0.0030	0.0047
Alprazolam	12.5-1600	12.5-1600	0.9980	0.9906	0.0024	0.0024
Lorazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9993	-	0.0001	-
Oxazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9996	0.9996	0.0001	0.0002
Fluoxetina	12.5-1600	12.5-1600	0.9996	0.9907	0.0029	0.0046
Clorpromazina	12.5-1600	12.5-800	0.9988	0.9966	0.0023	0.0003
Nordiazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9994	0.9996	0.0007	0.0008
Diazepam	12.5-1600	12.5-1600	0.9987	0.9946	0.0033	0.0034

r: coeficiente de correlación

m: pendiente de la curva de calibración

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron aceptables de acuerdo con Naciones Unidas (2010), y demostraron la linealidad del método bajo los rangos de concentración evaluados (**Sección 3.5.3**).

4.3.4 Determinación de los límites de detección y de cuantificación para los compuestos analizados. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada droga, en las matrices orina y sangre, se reportan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Límites de detección y cuantificación de las 22 drogas analizadas por LC-ESI(+)-QTOF-MS, en las matrices orina y sangre.

Droga	Límite de detección, ng/mL		Límite de cuantificación, ng/mL	
	Orina	Sangre	Orina	Sangre
Morfina	0.35	0.50	1.78	1.51
Codeína	1.40	0.39	4.24	1.19
Escopolamina	0.76	1.10	2.31	3.33
Benzoilecgonina	0.56	1.76	1.71	5.34
Ketamina	2.29	0.23	6.95	0.71
Cocaína	0.53	3.48	1.61	10.56
Meperidina	1.87	0.46	5.66	1.40
7-Aminoflunitrazepam	0.97	1.22	2.93	3.70
Cocaetileno	1.37	0.24	4.16	0.74
Trazodona	0.23	0.03	0.69	0.08
Clozapina	0.38	2.32	1.16	7.02
Bromazepam	1.34	0.17	4.05	0.50
Clonazepam	2.20	2.16	6.66	6.54
Flunitrazepam	1.85	0.51	2.98	1.55
Nortriptilina	0.33	0.63	1.01	1.90
Alprazolam	0.84	0.27	2.55	0.82
Lorazepam	2.56	-	6.34	-
Oxazepam	1.76	3.15	4.57	9.56
Fluoxetina	1.11	2.17	3.38	6.57
Clorpromazina	0.31	3.45	0.95	8.97
Nordiazepam	0.32	0.31	0.97	0.95
Diazepam	0.87	0.08	2.63	0.24

Los límites de detección encontrados, en las matrices orina y sangre, estuvieron comprendidos en los rangos 0.23-2.56 ng/mL y 0.03-3.48 ng/mL, respectivamente. Así mismo, los límites de cuantificación determinados, en las matrices orina y sangre, estuvieron comprendidos en los rangos 0.69-6.95 ng/mL y 0.08-10.56 ng/mL, respectivamente.

Los resultados encontrados en este estudio, se ajustan a las exigencias forenses establecidas internacionalmente, en relación con los límites de detección máximos (5-50 ng/mL) que debe tener un laboratorio que realiza análisis de drogas

relacionadas con delitos sexuales y hurtos, en muestras de orina (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011 y Laboratory Guidelines Committee of the Society of Forensic Toxicologist, 2006).

Con la evaluación de las figuras de mérito, se demuestra que el método implementado es adecuado para el análisis simultáneo de las 22 drogas por LC-ESI(+)-QTOF-MS, y cumple con los requisitos establecidos en el ámbito forense, para el análisis de drogas en muestras biológicas.

En comparación con otros estudios realizados, vale la pena mencionar que el método implementado en este trabajo permitió obtener mejores límites de detección y cuantificación en relación con el estudio realizado por Lee y colaboradores (2013), quienes analizaron 19 drogas en muestras de orina por LC-QqQ-MS, y encontraron límites de detección y cuantificación mayores que 10 y 1000 ng/mL, respectivamente. En el presente estudio, para la muestra de orina se encontraron límites de detección menores de 3 ng/mL.

De igual forma, Kintz y colaboradores (2004), analizaron por LC-QqQ-MS, lorazepam en orina, fluido oral y cabello; los límites de detección obtenidos fueron 0.02 ng/mL, 0.05 ng/mL y 0.5 pg/mg, respectivamente; el método demostró linealidad en el rango de concentraciones evaluadas (1-1000 ng/mL). No obstante, los resultados obtenidos en este estudio para la misma sustancia, analizada en la misma matriz, para la cual se encontró un límite de detección de 2.56 ng/mL y el método demostró linealidad en el rango de concentraciones evaluadas (12.5-1600 ng/mL), se encuentran dentro de los rangos permitidos a nivel internacional forense (< 50 ng/mL).

En otro estudio realizado por Ishida (2009), en el cual desarrollaron un método de screening para 43 benzodiazepinas y sus metabolitos, y dos hipnóticos en muestras de plasma por LC-MS, encontraron porcentajes de recuperación mayores del 70%, y los límites de detección estuvieron comprendidos en el rango 0.2-8 ng/mL. En el presente estudio, para la muestra de sangre, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 37-125% a tres concentraciones evaluadas (*i.e.*, 12.5, 100 y 800 ng/mL) y los límites de detección fueron menores de 4 ng/mL.

Así mismo, en el año 2012, Dupont y colaboradores publicaron un trabajo en el cual presentaron los hallazgos correspondientes al análisis de 46 drogas en sangre por LC-TOF-MS. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron comprendidos en el rango 6-108% y los límites de detección entre 0.04-1 ng/mL.

En una nota de aplicación reportada por la firma *Agilent Technologies* (2013), en la cual presentaron los resultados obtenidos del desarrollo de un método que permitió el análisis de 22 drogas en muestras de orina por LC-QqQ-MS, encontraron que el método es altamente preciso, selectivo, exacto y sensible, con límites de detección mayores que 1 ng/mL. En comparación con los resultados

obtenidos en el presente estudio, también se encontró que el método es preciso, presentó porcentajes de recuperación aceptables, y los límites de detección encontrados fueron menores (0.23-2.56 ng/mL).

4.4 EVALUACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE CASOS FORENSES.

Los métodos implementados, empleando las técnicas cromatográficas GC-MS y LC-QTOF-MS, fueron empleados para analizar 17 muestras de orina recibidas en el Laboratorio de Toxicología, del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, relacionadas con casos forenses cuya casuística correspondía a delitos sexuales y hurtos. En la **Tabla 23** se presentan los resultados obtenidos para cada muestra.

Tabla 23. Muestras de orina analizadas por GC-MS y LC-QTOF-MS, de casos forenses recibidos en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Nororiente.

No. Caso	Información relacionada	Resultados screening, ng/mL				Resultados, técnicas cromatográficas	
		THC	COC	OP	BZ	GC-MS	LC-ESI(+)-QTOF-MS
1	Hechos ocurridos aproximadamente 9 horas atrás	0	4.37	0	19	Dramamine Levomepromazina	Dramamine Levomepromazina
2	Hurto en entidad bancaria	1.3	0	0	21	No detectado	No detectado
3	Le dieron algo en la noche y lo robaron	1.6	>1000	0	0	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina, ecgonina
4	Sin información	0	0	0	23	No detectado	No detectado
5	Le dieron a beber algo y lo robaron	6	>1000	0	106	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina
6	Hurto en entidad bancaria	45.02	0	0	38	No detectado	No detectado
7	En la madrugada del domingo (4:30 a.m) le suministraron algo en un trago, se despertó en su habitación a las 3:00 p.m y le habían robado todo	5.9	99.94	91	66	No detectado	No detectado
8	Paciente víctima de hurto, con periodo amnésico de 8 horas	0	>1000	0	22	Cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno.	Cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina, ecgonina
9	Menor, víctima de hurto en su residencia, refiere no recordar nada de lo sucedido	1.3	0	0	D	No detectado	No detectado
10	Víctima de hurto hace aproximadamente 48 horas	0	0	0	>200	No detectado	No detectado
11	Paciente víctima de robo en su domicilio, refiere amnesia de los hechos	6.5	113.9	98	411	Lorazepam	Lorazepam
12	Hechos 28 horas atrás	0	0	0	0	No detectado	No detectado
13	Presunta víctima de delito sexual	9.3	81.87	0	48	No detectado	No detectado

Tabla 23. Continuación.

14	Abuso sexual	0	8.25	0	18	No detectado	No detectado
15	Abuso sexual	>80	>1000	0	0	Cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina y ácido 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxílico	Cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina, ecgonina
16	Estaban tomando con unos amigos y se estaba besando con uno de ellos, luego fueron al cuarto y tuvieron relaciones. No se acuerda de lo que pasó	0	0	0	61	No detectado	No detectado
17	Al parecer le suministraron algo en posible delito sexual, hechos ocurridos al parecer 82 horas aproximadamente	0	>1000	0	76	4-amino-antipirina	4-amino-antipirina, benzoilecgonina

THC: Cannabinoides, COC: Cocaína, OP: Opiáceos, BZ: Benzodiazepinas.

Puntos de corte (concentración a partir de la cual se considera positivo un resultado), ng/mL. THC: 50, COC: 300, OP: 300, BZ: 200.

De acuerdo con los protocolos institucionales establecidos para el análisis de drogas de abuso en muestras de orina, inicialmente se debe realizar un análisis preliminar o de *screening*. Este análisis se realiza empleando una técnica de inmunoensayo, y contempla el estudio de metabolitos de cocaína, cannabinoides, opiáceos, y benzodiazepinas, entre otros. Una vez realizados estos análisis, y teniendo en cuenta el contexto del caso, se procede a realizar la confirmación de los resultados positivos, así como también, la búsqueda de otras posibles sustancias presentes en las muestras, haciendo uso de otras técnicas tales como GC-MS o LC-MS/MS.

Teniendo en cuenta que los casos anteriormente descritos estaban relacionados con delitos sexuales y hurtos, además de realizar los análisis preliminares y sus correspondientes confirmaciones (en aquellos casos cuyos resultados fueron positivos), se realizó la búsqueda de todas las drogas, objeto de estudio de esta investigación.

Más del 50% de los casos arrojaron resultados negativos, tanto en el análisis preliminar como en el de confirmación. Esto puede obedecer al largo tiempo transcurrido desde el momento en que ocurrieron los hechos hasta que se recolectó la muestra, lo que favorece la eliminación de las posibles sustancias empleadas en la ejecución del delito.

Con respecto a los resultados positivos, se observa una buena correlación entre las dos técnicas cromatográficas, no obstante, al emplear la técnica LC-QTOF-MS, se logra detectar e identificar otros analitos tales como ecgonina, éster metílico de ecgonina y benzoilecgonina (casos 3, 5, 8, 15 y 17). Esto se debe a que la técnica LC-QTOF-MS presenta una mayor sensibilidad con respecto a la técnica GC-MS.

Cabe mencionar que mediante el uso del método implementado en el presente estudio, también fue posible identificar y detectar el antipsicótico

levomepromazina, sustancia que no estaba incluida en las drogas estudiadas en esta investigación.

Por otra parte, el método implementado empleando la técnica LC-QTOF-MS fue empleado para el análisis de un caso forense relacionado con una muerte en estudio. En el laboratorio se recibieron muestras de orina, sangre, frotis nasal y un fragmento de cabello. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en la muestra de sangre se detectó cocaína en una concentración de 2413 ng/mL; en la muestra de orina se detectó cocaína y los metabolitos ecgonina, éster metílico de ecgonina, benzoilecgonina y cocaetileno; en las muestras de pelo y frotis nasal se detectó cocaína.

Con base en lo anterior, se demuestra que el método se puede aplicar de manera exitosa en otras matrices biológicas, y en casos cuyo contexto forense es diferente a hurtos y delitos sexuales.

5. CONCLUSIONES

Se implementó un método que permitió el análisis, identificación y detección de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, en muestras de sangre y orina por GC-MS. Las figuras de mérito evaluadas, demostraron que el método es preciso, exacto y lineal en el rango de concentraciones estudiadas (50-1600 ng/mL), y cumple con los requisitos establecidos por Naciones Unidas, con respecto al desarrollo y validación de métodos.

Se encontraron límites de detección, comprendidos en los rangos 1.7-21.8 ng/mL y 0.9-12.4 ng/mL para las matrices sangre y orina, respectivamente. Así mismo, los límites de cuantificación estuvieron comprendidos en los rangos 5.2-59.8 ng/mL y 2.7-37.5 ng/mL para las matrices sangre y orina, respectivamente.

Por otra parte, se analizaron 9 drogas por GC-QqQ-MS, relacionadas con delitos sexuales y hurtos. Empleando el modo de adquisición monitoreo de reacción múltiple, se establecieron las reacciones de transición entre los pares de iones (precursor y producto) para cada droga, y se realizaron análisis empleando 4 energías de colisión. Se encontró que las energías de colisión que proporcionaron la mayor abundancia para las reacciones de transición de las drogas estudiadas fueron 5 eV para la ketamina, flunitrazepam y alprazolam; 10 eV para la meperidina, cocaína y cocaetileno, y 20 eV para la fluoxetina, clorpromazina y clozapina.

El método implementado se empleó para el análisis, identificación y cuantificación de drogas en muestras de orina, de casos forenses, recibidos en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Se pudo confirmar la presencia inequívoca de clozapina (14 mg/L), ketamina (16 mg/L) y clorpromazina (10 mg/L) mediante el registro de las transiciones y los tiempos de retención.

Finalmente, mediante el uso de la técnica LC-QTOF-MS, se implementó un método que permitió el análisis de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, en muestras de sangre y orina. Los resultados de la evaluación de las figuras de mérito, demostraron la precisión, exactitud y linealidad del método en el rango de concentraciones estudiadas (12.5-1600 ng/mL).

Se encontraron límites de detección, comprendidos en los rangos 0.23-2.56 ng/mL y 0.03-3.48 ng/mL para las matrices orina y sangre, respectivamente. Así mismo, los límites de cuantificación estuvieron comprendidos en los rangos 0.69-6.95 ng/mL y 0.08-10.56 ng/mL para las matrices orina y sangre, respectivamente.

Al realizar una comparación entre los resultados obtenidos, de los métodos implementados empleando las técnicas GC-MS y LC-QTOF-MS, se encontró que esta última presenta ventajas con respecto a la preparación de las muestras, tiempo de análisis y mayor sensibilidad. Sin embargo, dependiendo de la disponibilidad de las herramientas analíticas con que cuente un laboratorio de toxicología, las dos técnicas son adecuadas para el análisis de drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos en muestras biológicas (*i.e.*, sangre y orina).

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda complementar los métodos, incluyendo un mayor número de drogas, teniendo en cuenta que cada día aumenta la cantidad de sustancias involucradas en la ejecución de delitos.

De igual forma, se sugiere evaluar otro tipo de matrices biológicas (*e.g.*, pelo, saliva) que puedan proporcionar información adicional y útil en el desarrollo de una investigación forense.

De ser posible, adquirir patrones en forma conjugada (con el ácido glucorónico), de tal manera, que sea posible analizar las muestras de orina sin tener que realizar la hidrólisis enzimática, disminuyendo el tiempo de análisis. Esto aplica para la técnica LC-QTOF-MS.

Complementar el método implementado para el análisis de drogas por LC-ESI(+)-QTOF-MS, evaluando parámetros tales como voltaje del capilar y del fragmentor, flujo del gas nebulizador y composición de la fase móvil con el fin de optimizar las condiciones que proporcionen una mayor sensibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMOWICZ, Piotr y KALA, Maria. Screening for drug facilitated sexual assault by means of liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry (LC-APCI-MS). En: Problems of Forensic. 2008, vol. 76, p. 403-411.

ADAMOWICZ, Piotr y KALA, Maria. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry. En: Forensic Science International. Mayo, 2010, vol. 198, no. 1-3, p. 39-45.

AGILENT TECHNOLOGIES. Benzodiazepine and z-drug quantitation using Agilent 6430 LC/MS/MS, application note, 2013. Disponible en internet: <<http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2291EN.pdf>>.

BECHTEL, Laura y HOLSTEGE, Christopher. Criminal poisoning: Drug-facilitated sexual assault. En: Emergency Medicine Clinics of North America. Mayo, 2007, vol. 25, no. 2, p. 499-525.

CALABUIG, Gisbert. Medicina legal y toxicología. Barcelona: Ed. Masson, 2004. p. 905-914, 1014-1032. ISBN: 84-458-1415-X.

CALIPARI, Erin y FARRIS, Mark. Amphetamine mechanism and actions at the dopamine terminal revisited. En: The Journal Neuroscience. Mayo, 2013, vol. 33, no. 21, p. 8923-8925.

CHÉZE, Marjorie, et al. Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: Report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris. En: Forensic Science International. Octubre, 2005, vol. 153, no. 1, p. 3-10.

CÓRDOBA, Dario. Toxicología, Bogotá: El Manual Moderno, 2001, p. 339-342, 347-351, 379-385. ISBN: 958-9446-04-3.

DEL PESO, Ana. Análisis toxicológico de drogas de abuso en muestras de alijo. Ampliación de Postgrado en Toxicología. Sevilla, Ilustre Colegio Oficial de Químicos, 2009. p. 2-4, 33-45, 60-69. ISBN: 978-84-692-0358-3.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH ADMINISTRATION. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Program, Federal Register. 25 de Noviembre, 2008, vol. 73, no. 228, p. 71858 - 71907.

DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION. Drug scheduling. Disponible en internet: <<http://www.dea.gov/druginfo/ds.shtml>>.

DUPONT BIRKLER, Rune, et al. Screening analysis for medicinal drugs and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS). Toxicological findings in cases of alleged sexual assault. En: Forensic Science International. Octubre, 2012, vol. 222, no. 1-3, p. 154-161.

ELSOHLY, Mahmoud y SALOMONE, S. Prevalence of drugs in cases of alleged sexual assault. En: Journal of Analytical Toxicology. Junio, 1999a, vol. 23, p. 141-146.

ELSOHLY, Mahmoud, et al. GC-MS determination of flunitrazepam and its major metabolite in whole blood and plasma. En: Journal of Analytical Toxicology. Junio, 1999b, vol. 23, no. 6, p. 486-489.

ELSOHLY, Mahmoud. A sensitive GC-MS procedure for the analysis of flunitrazepam and its metabolites in urine. En: Journal of Analytical Toxicology. Marzo, 1997, vol. 21, no. 5, p. 335-340.

GARRO VARGAS, Karen. Cocaína: actualización médico legal. En: Medicina Legal de Costa Rica. Septiembre, 2011, vol. 28, no. 2, p. 57-62.

GIANNUZZI, Leda y FERRARI, Luis. Manual de técnicas analíticas en el laboratorio de toxicología y química forense. Buenos Aires: Ed. Praia, 2006. p. 1-12. ISBN: 987-05-0147-8.

GUNNAR, Teemu; ARINIEMI, Kari y LILLSUNDE, Pirjo. Determination of 14 benzodiazepines and hydroxyl metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyltrimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. En: Journal of Chromatography B. Abril, 2005, vol. 818, no. 2, p. 175-189.

HALBERSTADT, Adam y GEYER, Mark. Capítulo 61: Neuropharmacology of lysergic acid diethylamide (LSD) and other hallucinogens. USA: Elsevier Academic Press, 2013, p. 625-629. ISBN: 0-12-3-398335-61-3.

HALL, J y MOORE, C. Drug facilitated sexual assault - A review. En: Journal of Forensic and Legal Medicine. Julio, 2008, vol. 15, no. 5, p. 291-297.

HINDMARCH, I, et al. Forensic urinalysis of drug use in cases of alleged sexual assault. En: Journal of Clinical Forensic Medicine. Diciembre, 2011, vol. 8, no. 4, p. 197-205.

HO, C, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. En: The Clinical Biochemist Reviews. Febrero, 2003, vol. 24, no. 1, p. 3-12.

HURLEY, Michael; PARKER, Helen y WELLS, David. The epidemiology of drug facilitated sexual assault. En: Journal of Clinical Forensic Medicine. Mayo, 2006, vol. 13, no. 4, p. 181-185.

ISHIDA, Tomomi. Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column. En: Journal of Chromatography B. Septiembre, 2009, vol. 877, no. 25, p. 2652-2657.

KIM, Jihyun, et al. Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC-MS/MS and its application to human and rat hair. En: Journal of Chromatography B. Abril, 2011, vol. 879, no. 13-14, p. 878-886.

KINTZ, P, et al. Case report: Identification of alprazolam in hair in two cases of drug-facilitated incidents. En: Forensic Science International. Octubre, 2005a, vol. 153, no. 2-3, p. 222-226.

KINTZ, Pascal, et al. Drug-facilitated sexual assault and analytical toxicology: the role of LC-MS/MS. A case involving zolpidem. En: Journal of Clinical Forensic Medicine. Febrero, 2005b, vol. 12, no. 1, p. 36-41.

KINTZ, Pascal, et al. Windows of detection of lorazepam in urine, oral fluid in hair, with a special focus drug-facilitated crimes. En: Forensic Science International. Octubre, 2004, vol. 145, no. 2-3, p. 131-135.

Laboratory Guidelines Committee of the Society of Forensic Toxicologists and the Toxicology Section of the American Academy of Forensic Sciences, SOFT / AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guidelines, 2006 Version. Disponible en internet: <http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf>

LEBAU, Marc, et al. Recomendations for toxicological investigations of drug facilitated sexual assaults. En: Journal of Forensic Science. Febrero, 1999, vol. 44, p. 227-230.

LEE, Yungkang; LAI, Keane y HOSSEIN SADRZADEH, S. Simultaneous detection of 19 drugs of abuse on dried urine spot by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry. En: Clinical Biochemistry. Agosto, 2013, vol. 46, no. 12, p. 1118-1124.

MARQUET, P y LACHÄTRE, G. Review: Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. En: Journal of Chromatography B. Octubre, 1999, vol. 733, no. 1-2, p. 93-118.

MAURER, Hans. Review: Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. En: Clinical Biochemistry. Abril, 2005, vol. 38, no. 4, p. 310-318.

MAURER, Hans. Review: Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. En: Journal of Chromatography B. Septiembre, 1992, vol. 580, no. 1-2, p. 3-41.

MENÉNDEZ, Manuel y REPETTO, Manuel. Química, bioquímica toxicológica y legislación de las principales drogas de abuso. Ampliación de Postgrado en Toxicología. Sevilla, Ilustre Colegio Oficial de Químicos, 2009. p. 4-8, 30-32. ISBN: 978-84-692-0358-3.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. The science of drug abuse and addiction, drugs of abuse. Disponible en internet: <<http://www.drugabuse.gov/drugs-abuse>>.

NEGRUSZ, Adam y GAENSSLEN, R. Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault. En: Analytical and Bioanalytical Chemistry. Abril, 2003, vol. 376, p. 1192-1197.

NICOLETTI, Angela. Teens and drug facilitated sexual assault. En: Journal of Pediatric Adolescent Gynecology. Junio, 2009, vol. 22, no. 3, p. 187.

OFICINA DE LAS NACIONES UNIDAS CONTRA LA DROGA Y EL DELITO. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Nueva York. 2010. Disponible en internet: <https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf>.

OHSHIMA, T. Case report: A case of drug-facilitated sexual assault by the use of flunitrazepam. En: Journal of Clinical Forensic Medicine. Enero, 2006, vol. 13, no. 1, p. 44-45.

OLANO GIBOUIN, David; GARCÍA RODRÍGUEZ, Saul y PRIETO CÁRDENAS, Auxiliadora. Análisis de drogas de abuso en muestras biológicas, Ampliación de Postgrado en Toxicología. Sevilla, Ilustre Colegio Oficial de Químicos, 2009, p. 10-

17, 50-58. ISBN: 978-84-692-0358-3.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Glosario de términos de alcohol y drogas. Madrid. 1994. Disponible en internet: <http://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf>.

PETERS, Frank. Review: Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. En: Clinical Biochemistry. Enero, 2011, vol. 44, no. 1, p. 54-65.

REPETTO, Manuel; GUIJA VILLA, Julio y REPETTO, Guillermo. Toxicología del alcohol etílico, Ampliación de Postgrado en Toxicología. Sevilla, Ilustre Colegio Oficial de Químicos, 2009, p. 1-7. ISBN: 978-84-692-0358-3.

SCOTT-HAM, Michael y BURTON, Fiona. Toxicological findings in cases of alleged drug-facilitated sexual assault in the United Kingdom over a 3-year period. En: Journal of Clinicial Forensic Medicine. Agosto, 2005, vol. 12, no. 4, p. 175-186.

SLAUGHTER, L. Involvement of drugs in sexual assault. En: The Journal of Reproductive Medicine. 2000, vol. 45, no. 5, p. 425-430.

SMITH, Frederick. Handbook of forensic drug analysis. United States of America: Elsevier Academic Press, 2005, p. 24-25. ISBN: 978-004047-28-98.

SMYTH, Franklin, et al. Characterisation of selected hypnotic drugs and their metabolites using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their determination by liquid chromatography-electrospray ionisation-ion trap mass spectrometry. En: Analytica Chimica Acta. Marzo, 2004, vol. 506, no. 2, p. 203-214.

SMYTH, W. Review: Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behavior of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. En: Journal of Chromatography B. Septiembre, 2005, vol. 824, no. 1-2, p. 1-20.

STASHENKO, Elena y MARTÍNEZ, Jairo. ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica. En: Scientia Chromatographica. 2009, vol. 1, no. 2, p. 23-33.

STASHENKO, Elena y MARTÍNEZ, Jairo. GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. En: Scientia Chromatographica. 2010a, vol. 2, no. 3, p. 23-46.

STASHENKO, Elena y MARTÍNEZ, Jairo. GC-MS: más de un analizador de masas,

¿para qué?. En: Scientia Chromatographica. 2010b, vol. 2, no. 4, p. 33-59.

STASHENKO, Elena y MARTÍNEZ, Jairo. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En: Scientia Chromatographica. 2010c, vol. 2, no. 1, p. 29-47.

STASHENKO, Elena y MARTÍNEZ, Jairo. Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. En: Scientia Chromatographica. 2011, vol. 3, no. 3, p. 199-221.

STASHENKO, Elena y MARTÍNEZ, Jairo. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo. En: Scientia Chromatographica. 2012, vol. 4, no. 2, p. 125-138.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION. Cannabis. Disponible en internet:< <http://www.samhsa.gov/atod/cannabis>>.

THIEME, Detlef y SACHS, Hans. Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. En: Analytica Chimica Acta. Septiembre, 2003, vol. 492, no. 1-2, p. 171-186.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. New York. 2011. Disponible en internet:<https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf>.

URIBE GRANJA, Manuel. Neurotoxicología. Asociación Colombiana de Neurología. Bogotá: Ed. Exlibris Editores S.A, 2001. p. 11-40, 63. ISBN: 958-96766-7-7.

VERSACE, François. Rapid sample pre-treatment prior to GC-MS and GC-MS/MS urinary toxicological screening. En: Talanta. Noviembre, 2012, vol. 101, p. 299-306.

WADE, Collen. Handbook of forensic services, US Department of Justice Federal Bureau of Investigation Laboratory Division, Quantico, 2003. p. 126. ISBN: 0-932115-18-7.

WELLS, D. Drug administration and sexual assault: sex in a glass. En: Science and Justice. Abril, 2001, vol. 41, p. 197-199.

WILM, Matthias. Principles of electrospray ionization. En: Molecular & Cellular Proteomics. 2011, p. 1-8.

WOOD, Michelle, et al. Review: Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. En: Journal of Chromatography A. Octobre, 2006, vol. 1130, no. 1, p. 3-15.

ANEXOS

Anexo A. Espectros de masas, obtenidos por ionización con electrones (EI, 70 eV) de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas por GC-MS.

Figura 1.1. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del éster metílico de ecgonina.

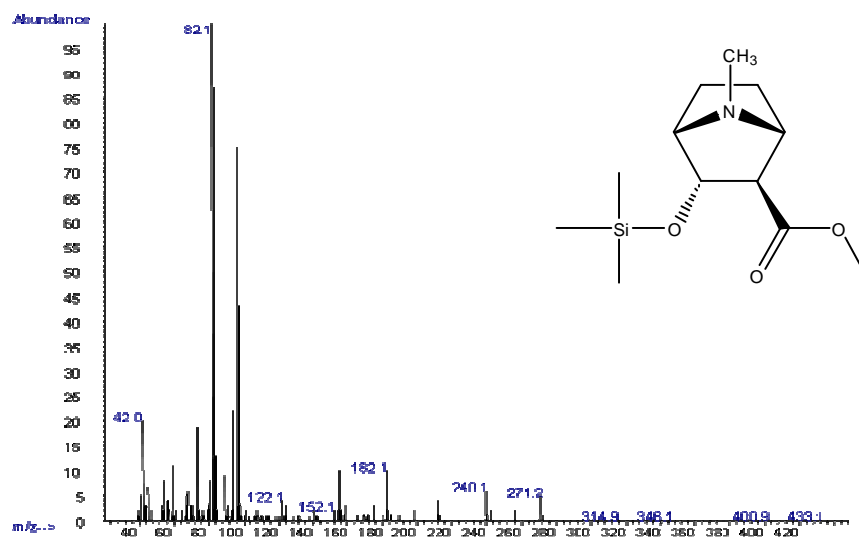


Figura 1.2. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la ecgonina.

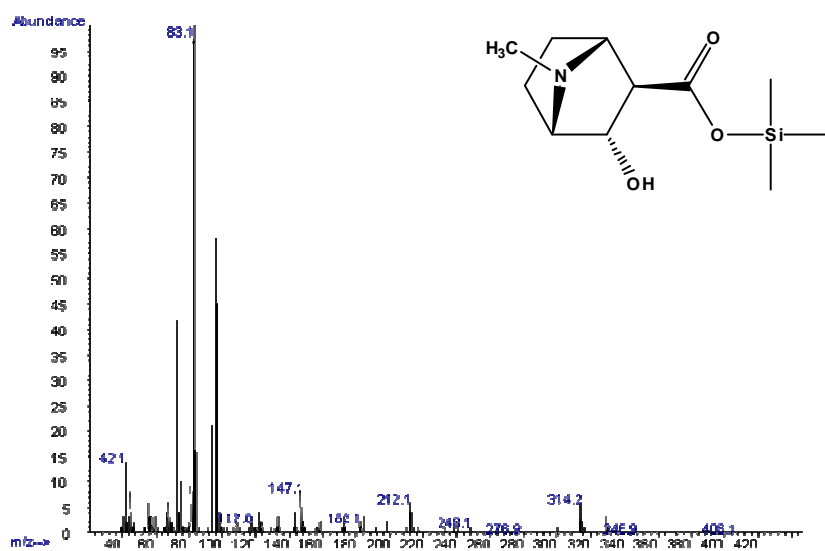


Figura 1.3. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la meperidina, $C_{15}H_{21}NO_2$.

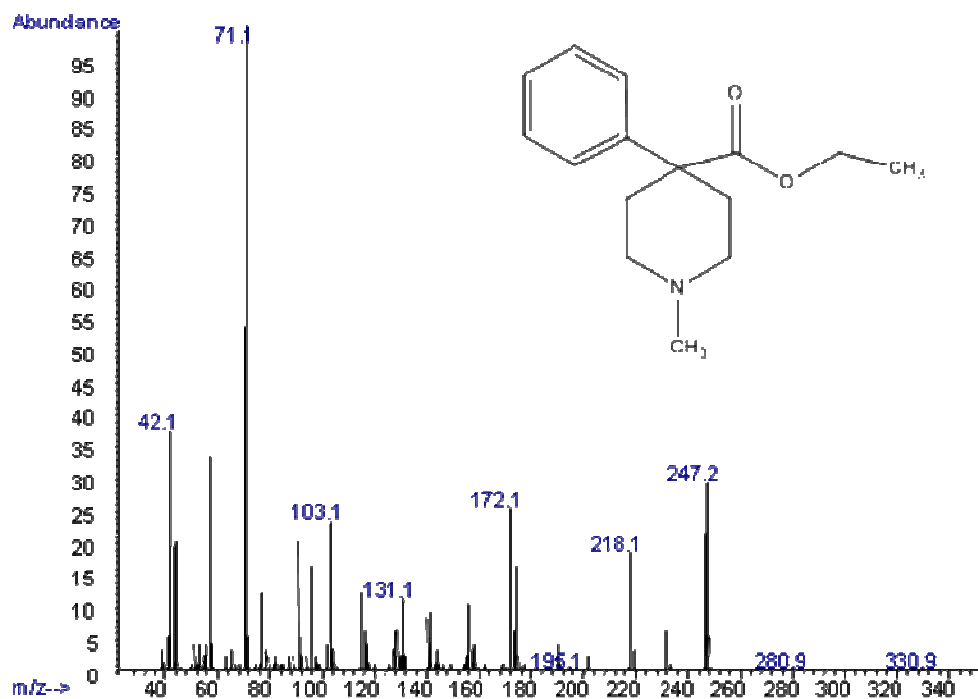


Figura 1.4. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la fluoxetina, $C_{17}H_{18}NF_3O$.

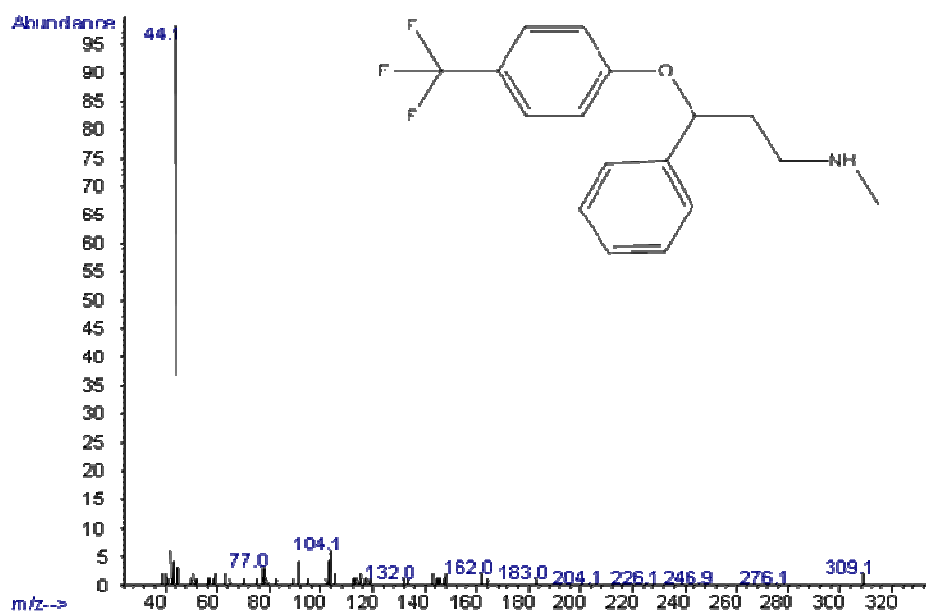


Figura 1.5. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la ketamina, $C_{13}H_{16}ClNO$.

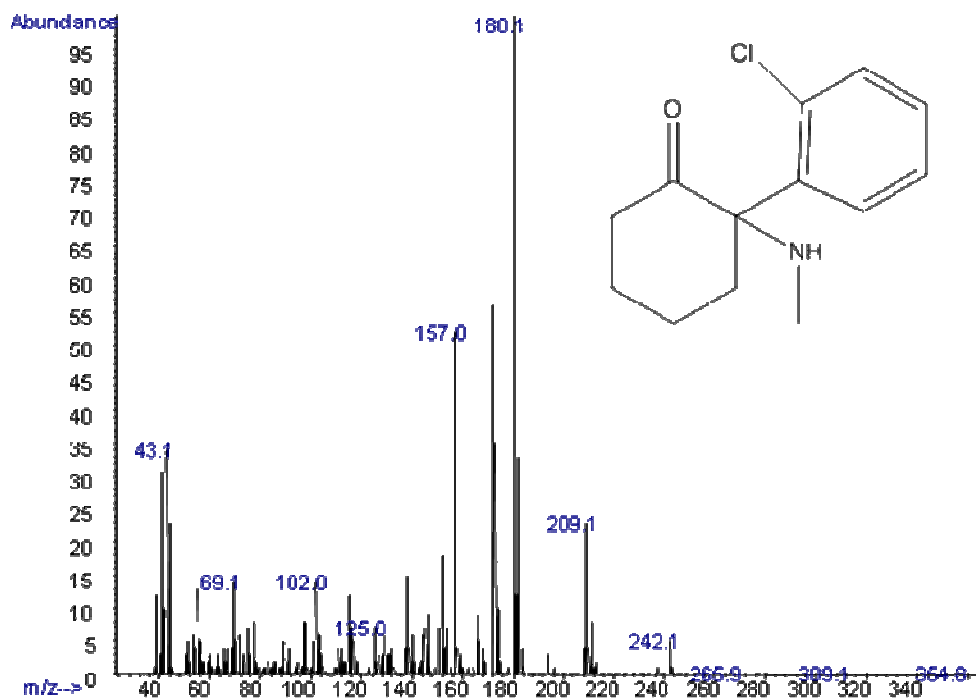


Figura 1.6. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la cocaína, $C_{17}H_{21}NO_4$.

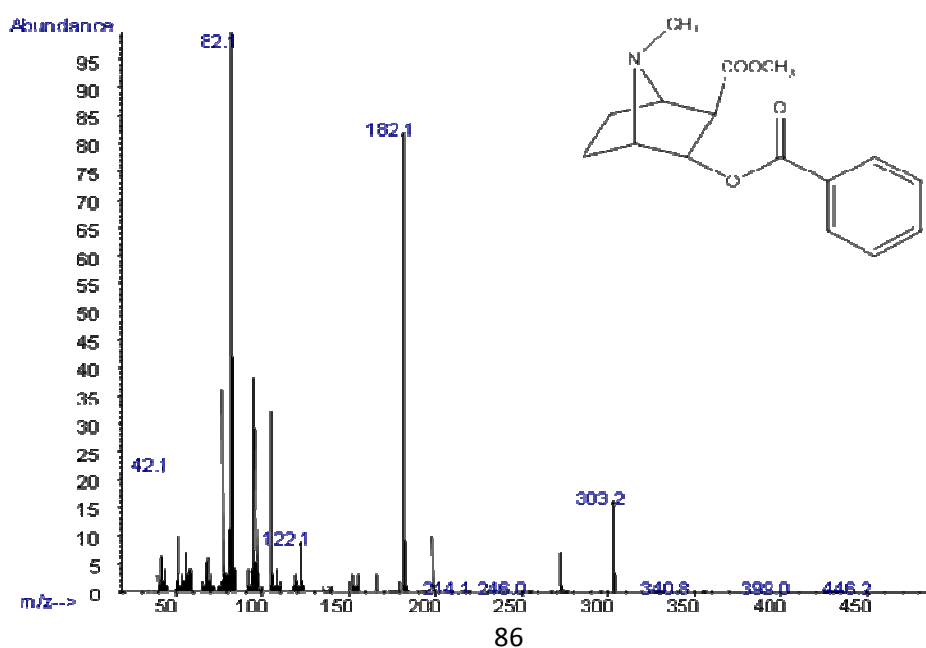


Figura 1.7. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la nortriptilina, C₁₉H₂₁N.

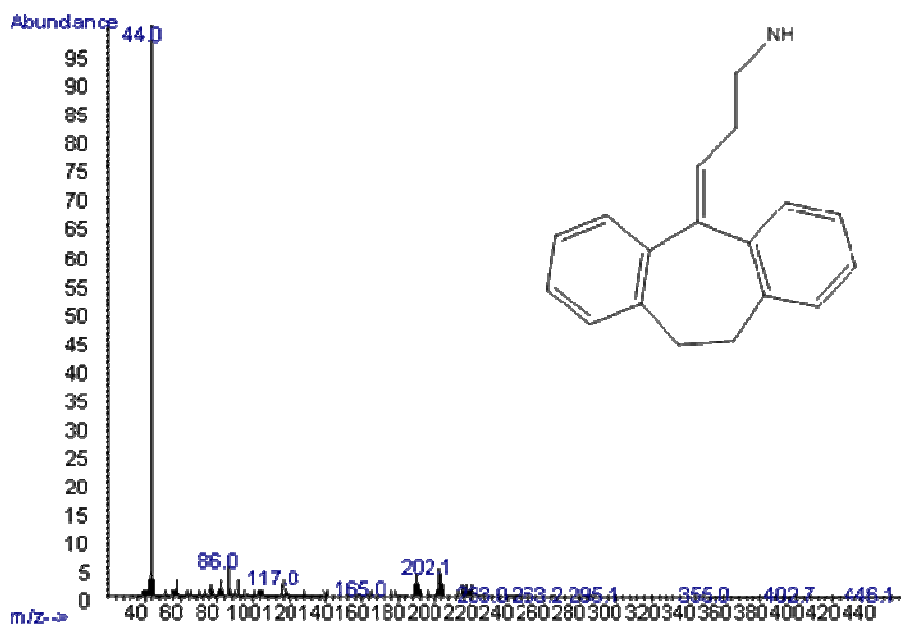


Figura 1.8. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del cocaetileno, C₁₈H₂₃NO₄.

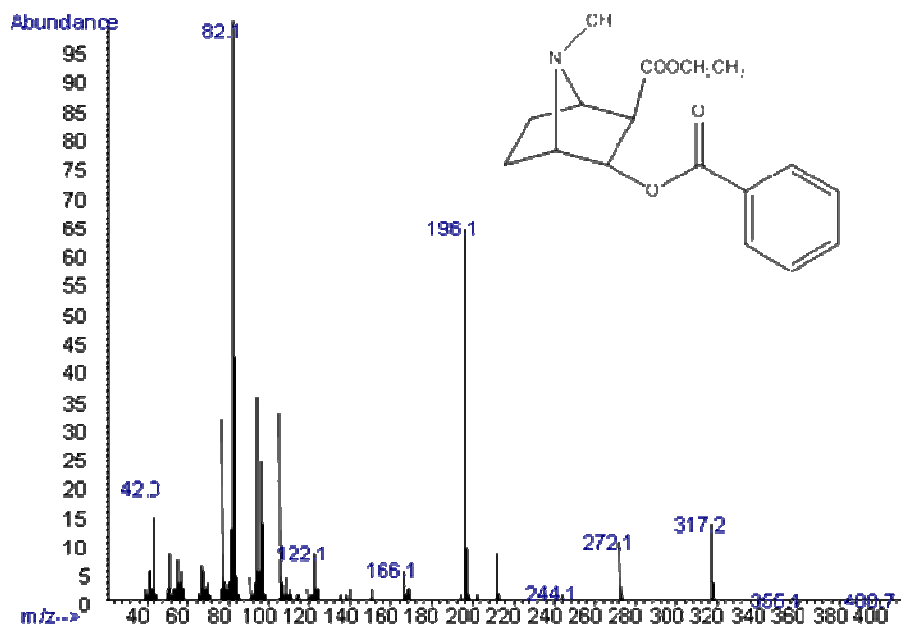


Figura 1.9. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la benzoilecgonina-TMS, $C_{19}H_{27}NO_4Si$.

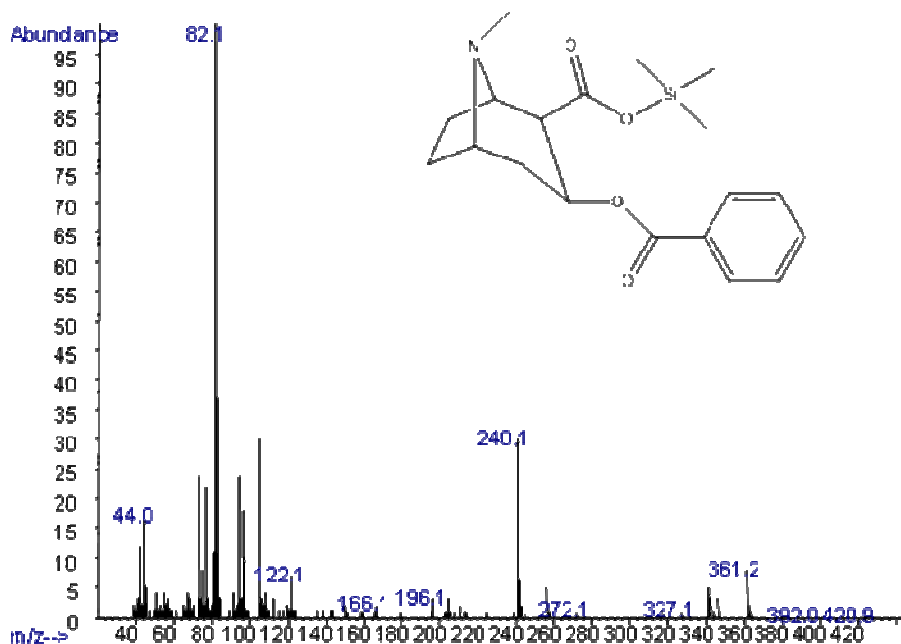


Figura 1.10. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la escopolamina-TMS, $C_{20}H_{29}NO_4Si$.

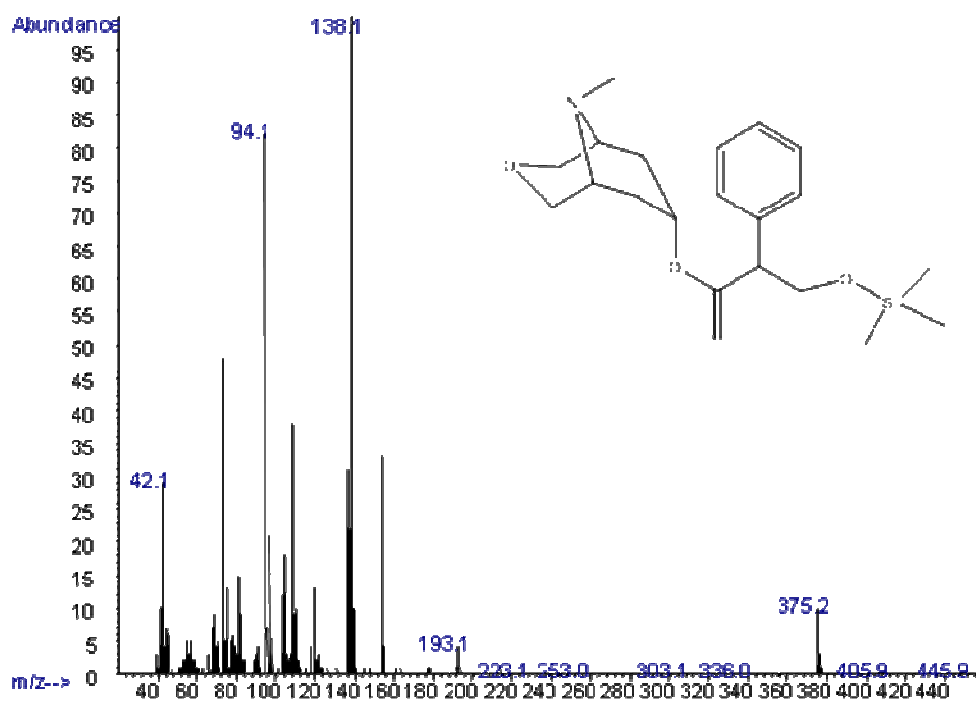


Figura 1.11. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del oxazepam-di-TMS, $C_{21}H_{27}ClN_2O_2Si_2$.

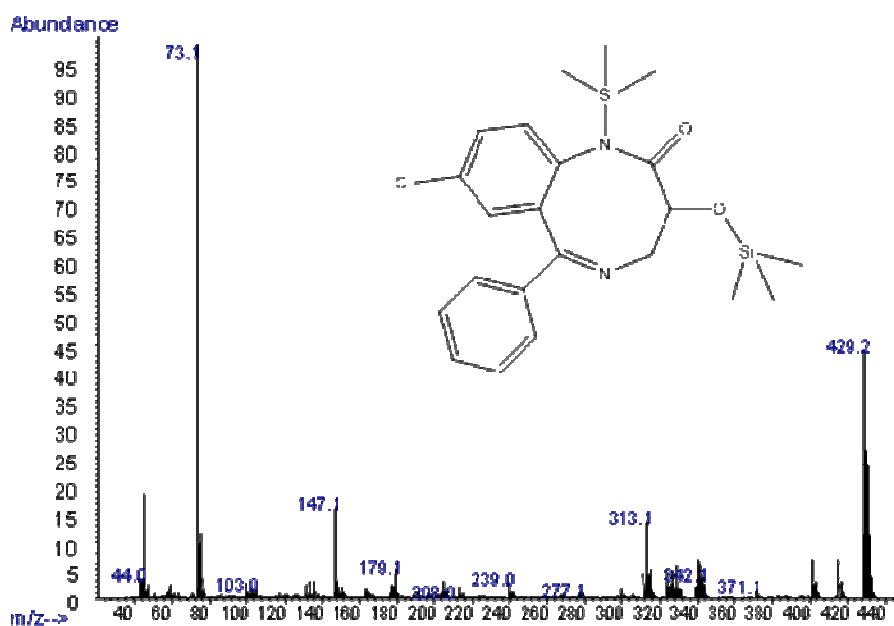


Figura 1.12. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del bromazepam-TMS, $C_{17}H_{18}BrN_3OSi$.

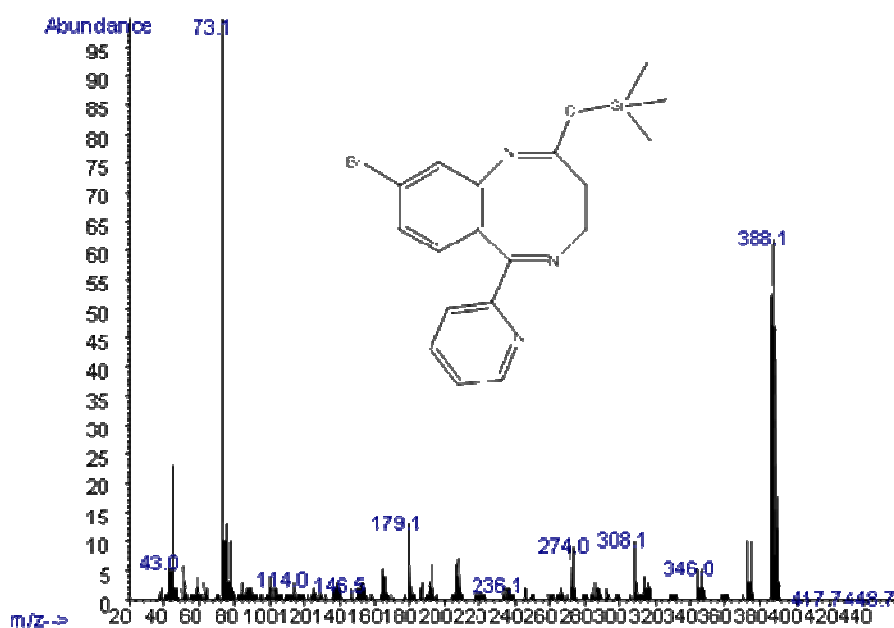


Figura 1.13. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la codeína-TMS, $C_{21}H_{29}NO_3Si$.

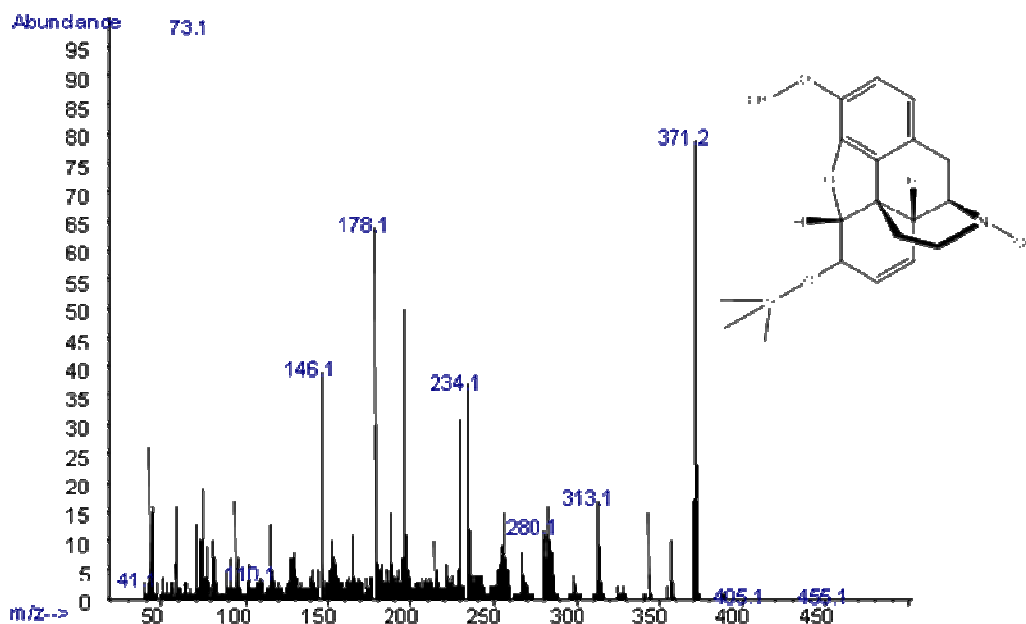


Figura 1.14. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del diazepam, $C_{16}H_{13}ClN_2O$.

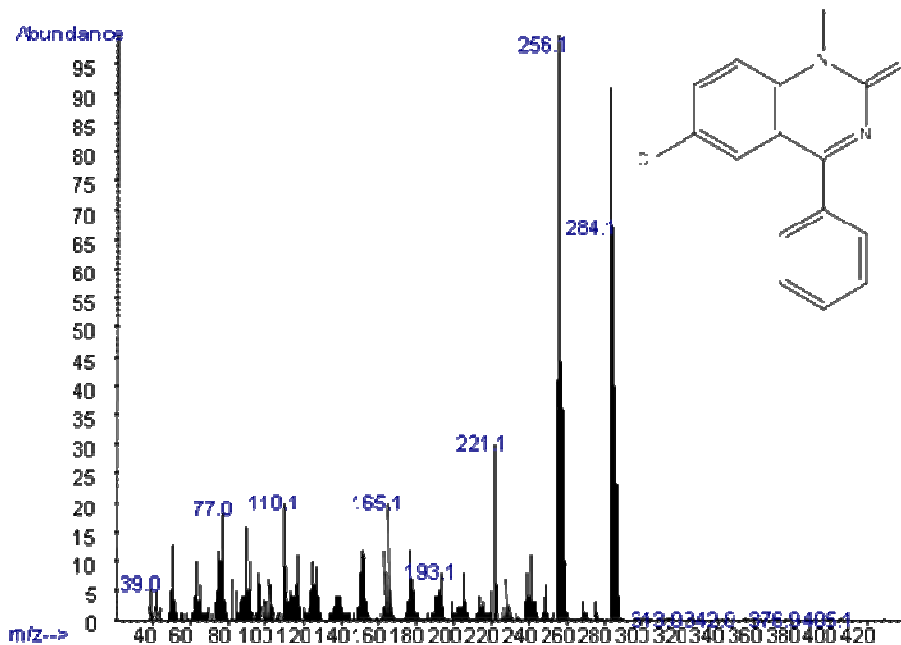


Figura 1.15. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del lorazepam-di-TMS, $C_{21}H_{26}Cl_2N_2O_2Si_2$.

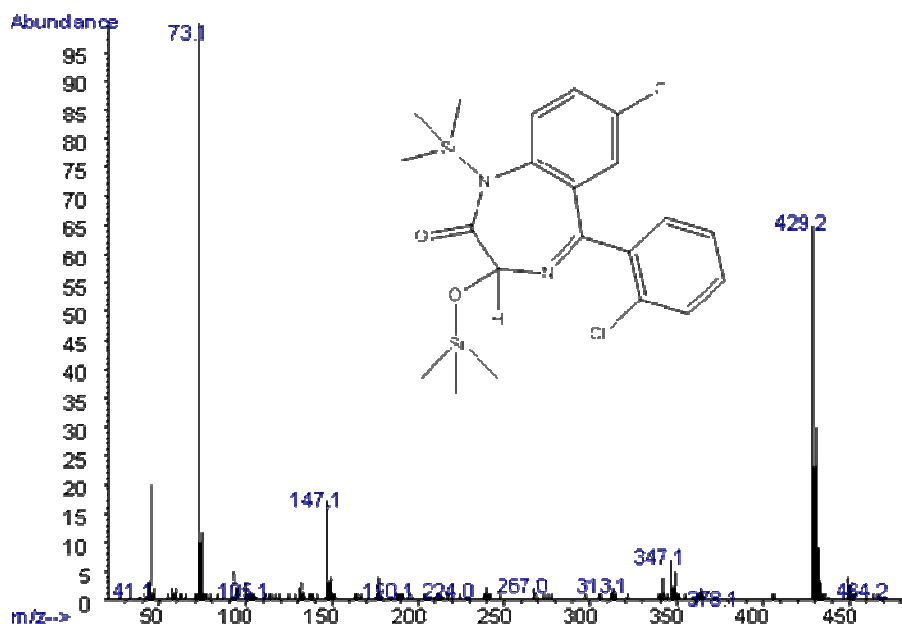


Figura 1.16. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la morfina-di-TMS, $C_{23}H_{35}NO_3Si_2$.

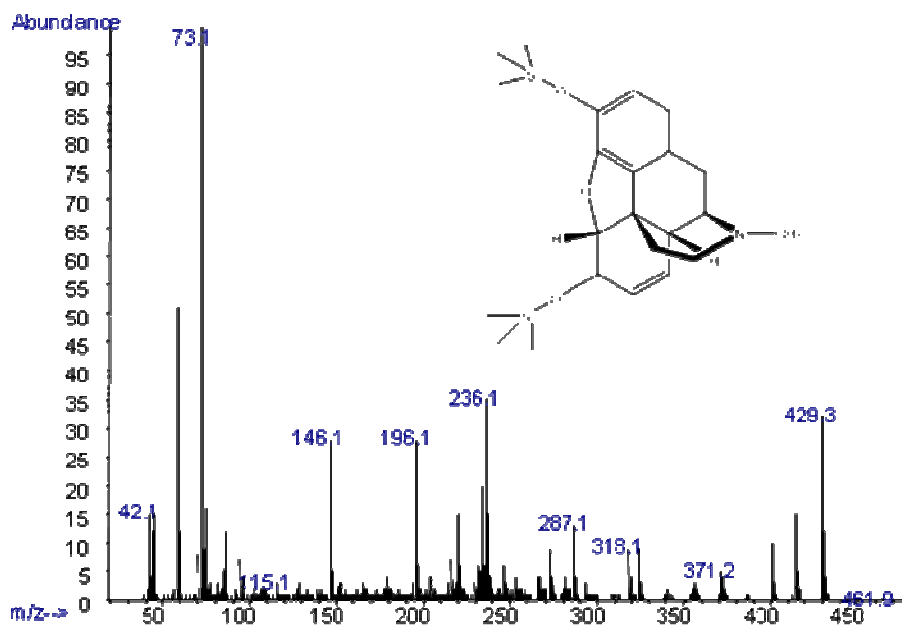


Figura 1.17. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la clorpromazina, $C_{17}H_{19}ClN_2S$.

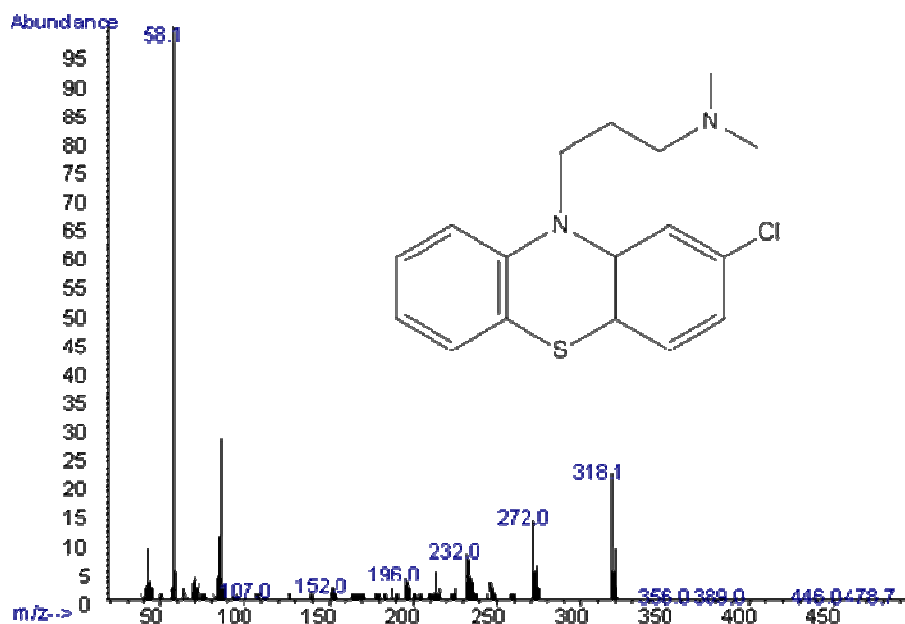


Figura 1.18. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del flunitrazepam, $C_{16}H_{12}FN_3O_3$.

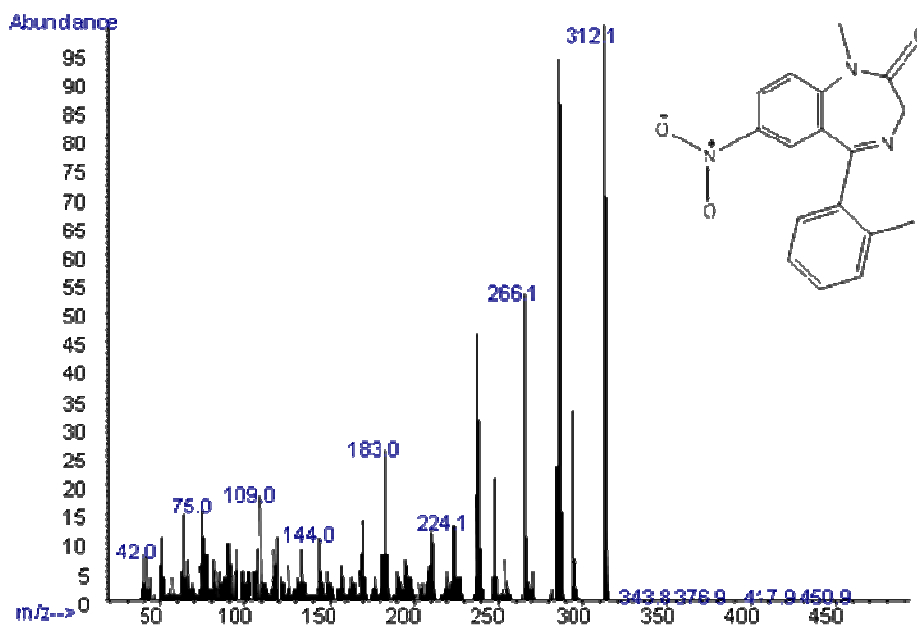


Figura 1.19. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del clonazepam-TMS, $C_{18}H_{18}ClN_3O_3Si$.

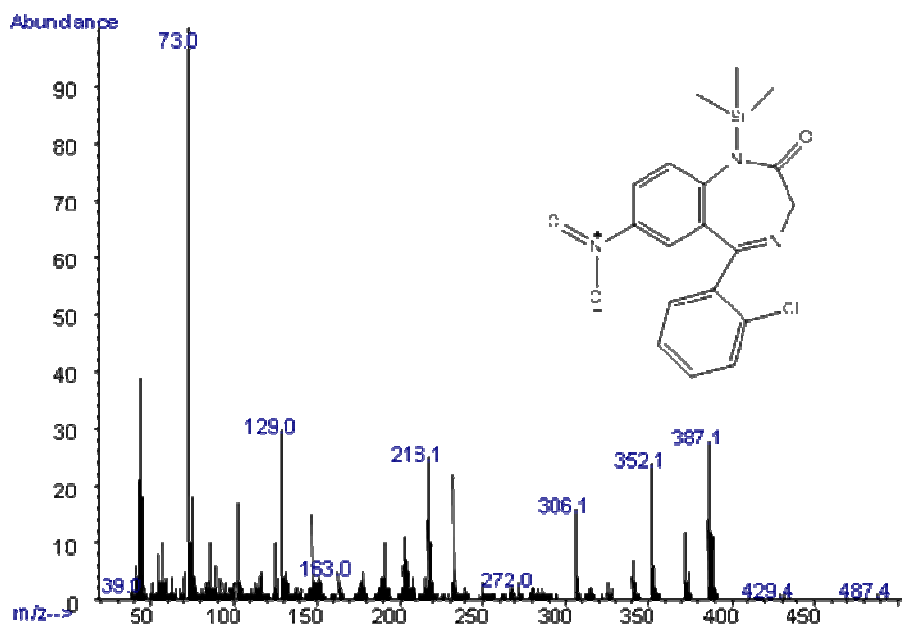


Figura 1.20. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la clozapina, $C_{18}H_{19}ClN_4$.

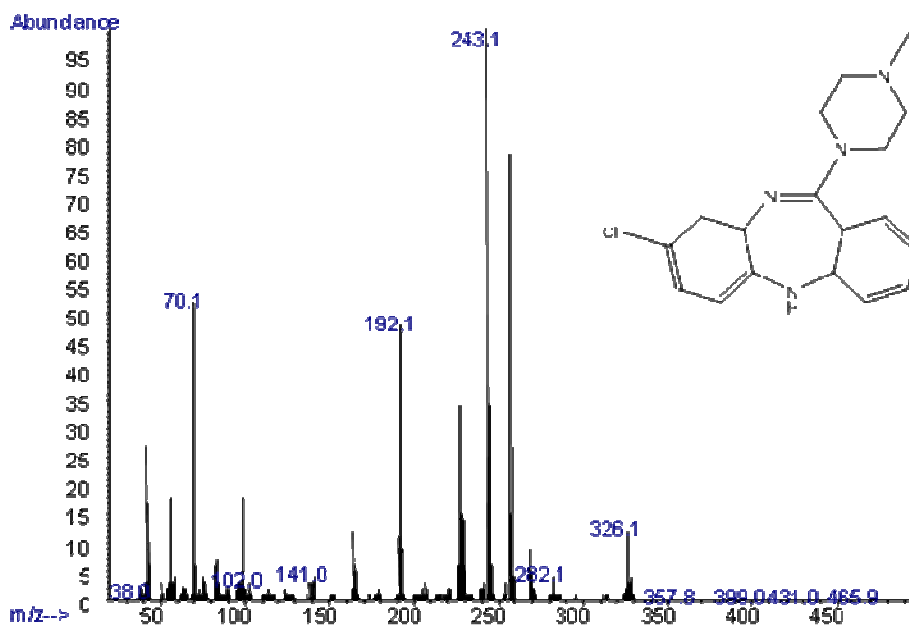


Figura 1.21. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) del alprazolam, $C_{17}H_{13}N_4Cl$.

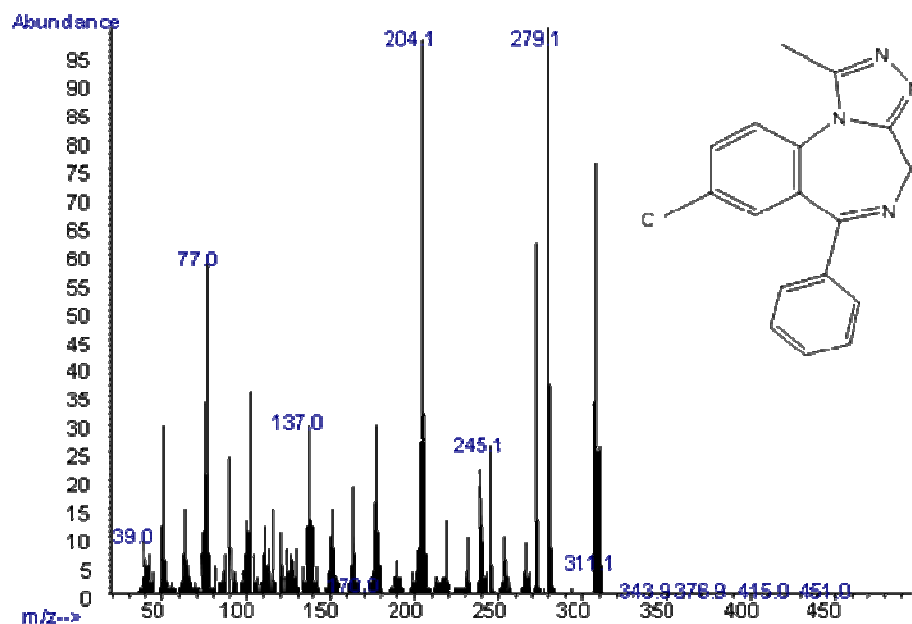


Figura 1.22. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la zopiclona, $C_{17}H_{17}ClN_6O_3$.

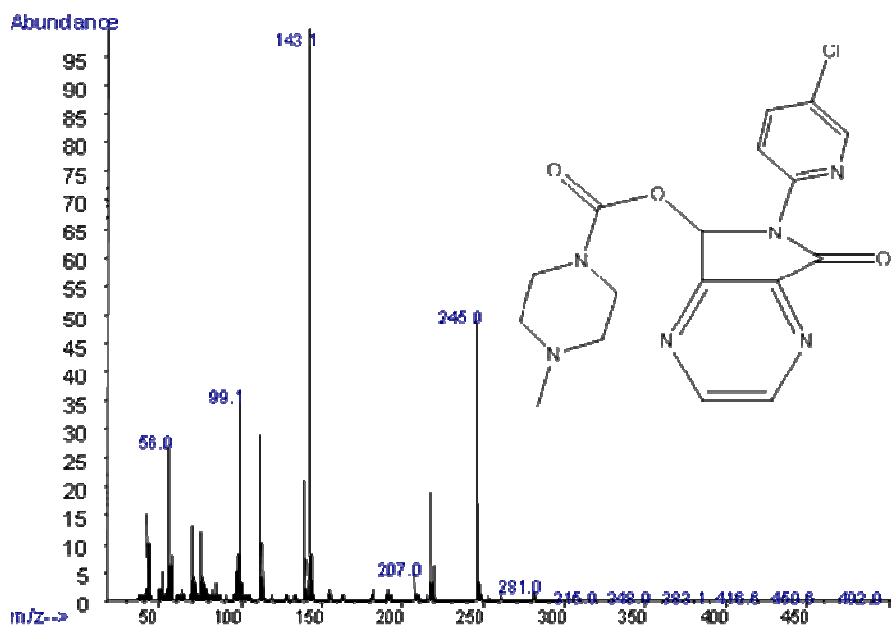
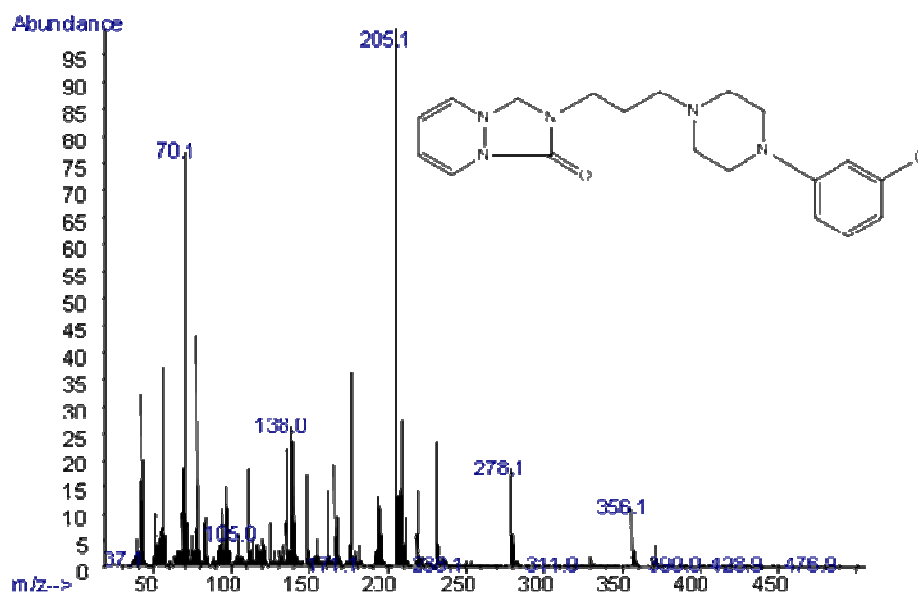


Figura 1.23. Espectro de masas obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV) de la trazodona, C₁₉H₂₂N₅ClO.



Anexo B. Curvas de calibración de 23 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas en sangre y orina por GC-MS.

Figura 2.1. Curva de calibración del éster metílico de ecgonina en: (A) sangre y (B) orina.

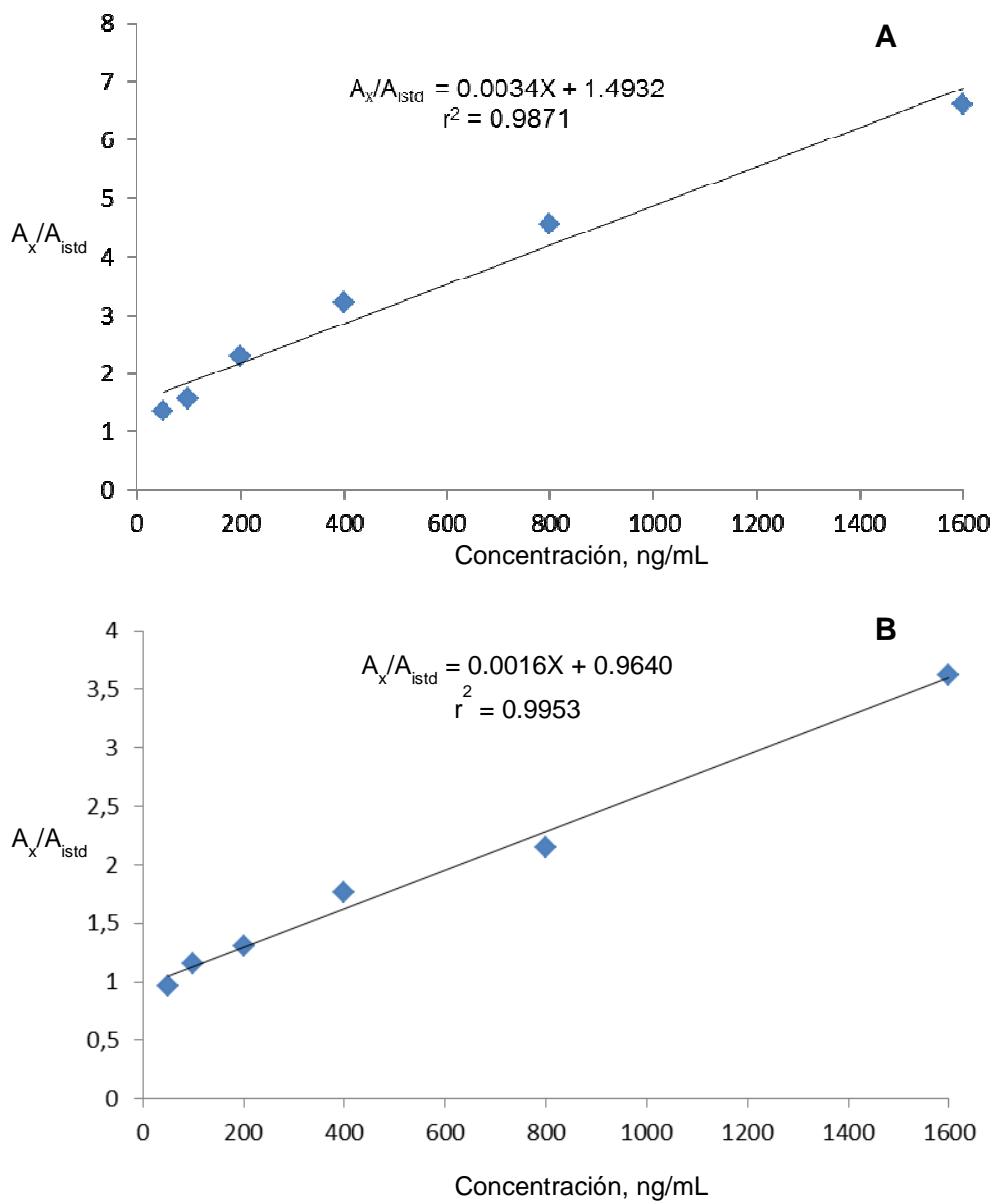


Figura 2.2. Curva de calibración de la ecgonina en: (A) sangre y (B) orina.

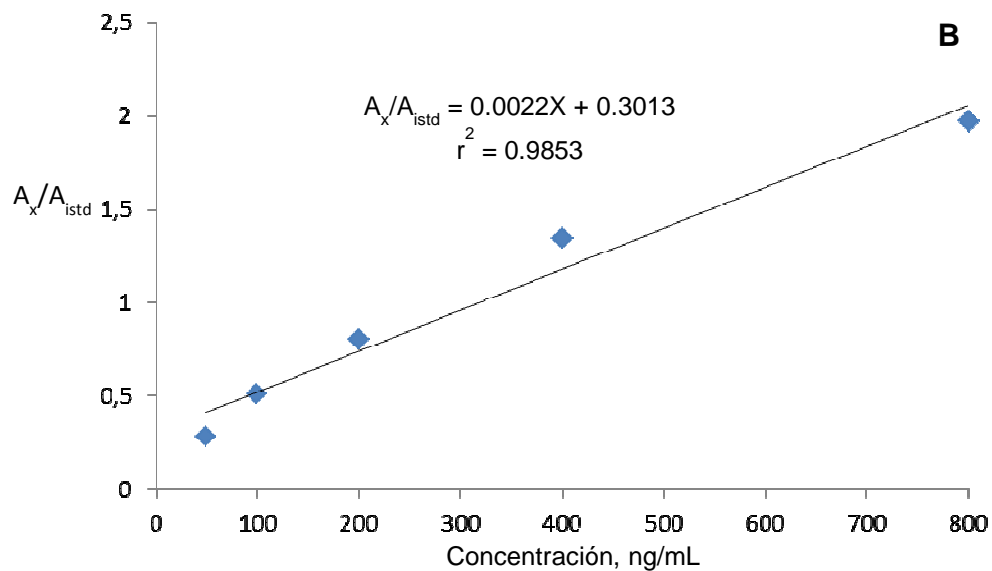
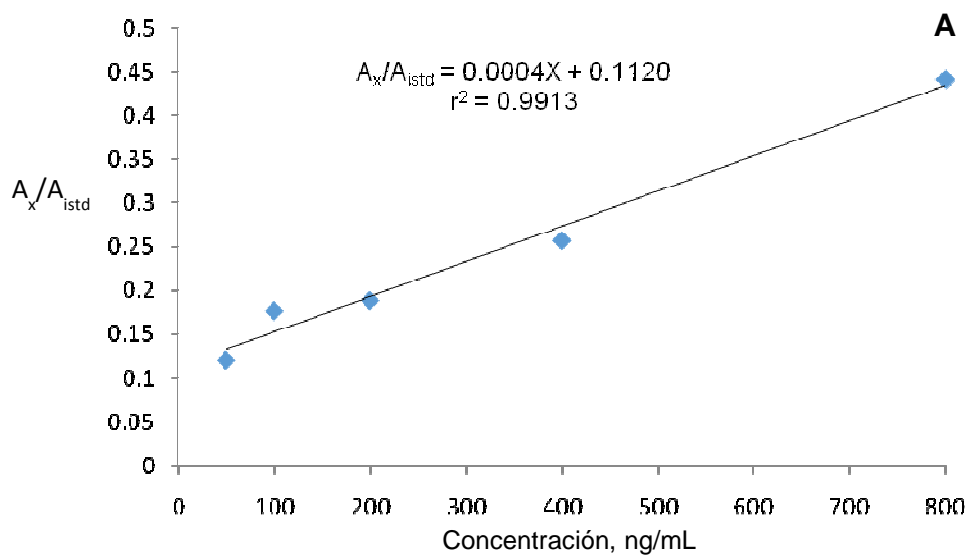


Figura 2.3. Curva de calibración de la meperidina en: (A) sangre y (B) orina.

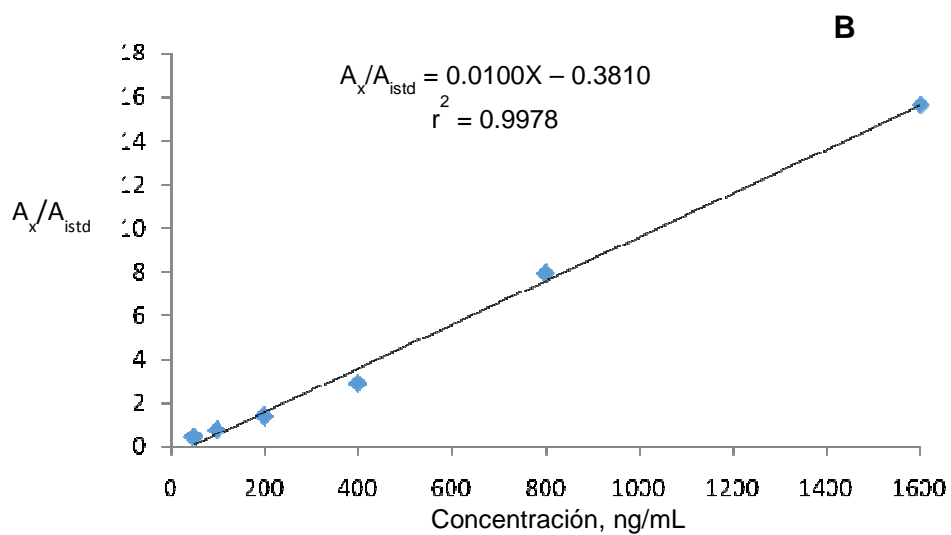
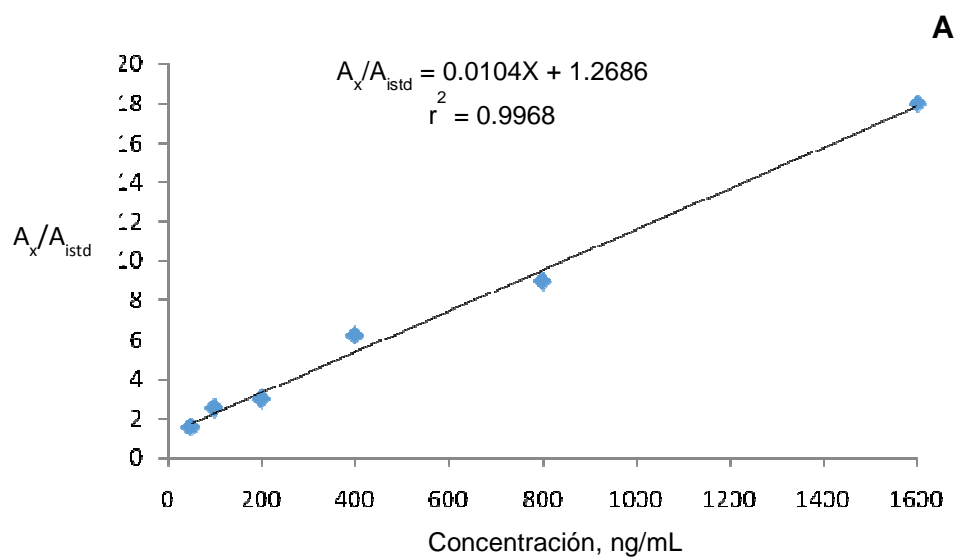


Figura 2.4. Curva de calibración de la fluoxetina en: (A) sangre y (B) orina.

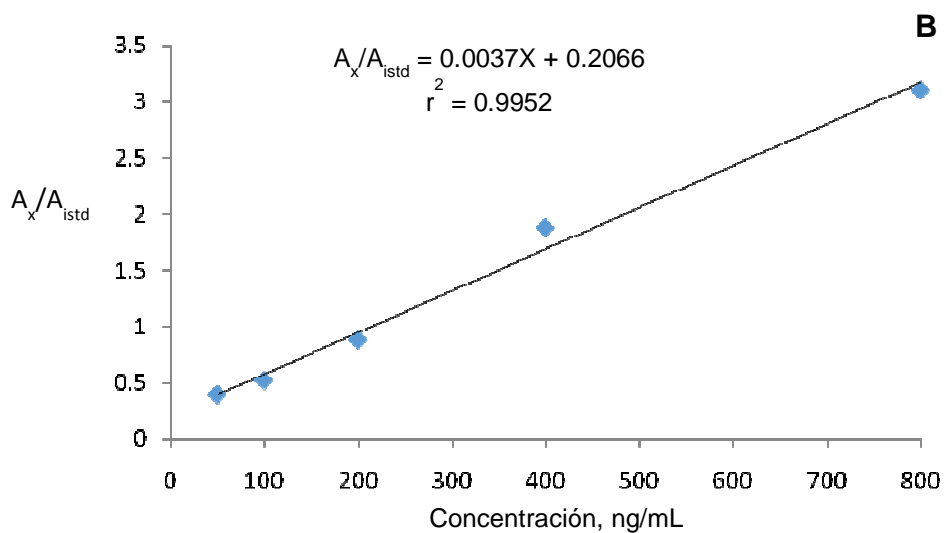
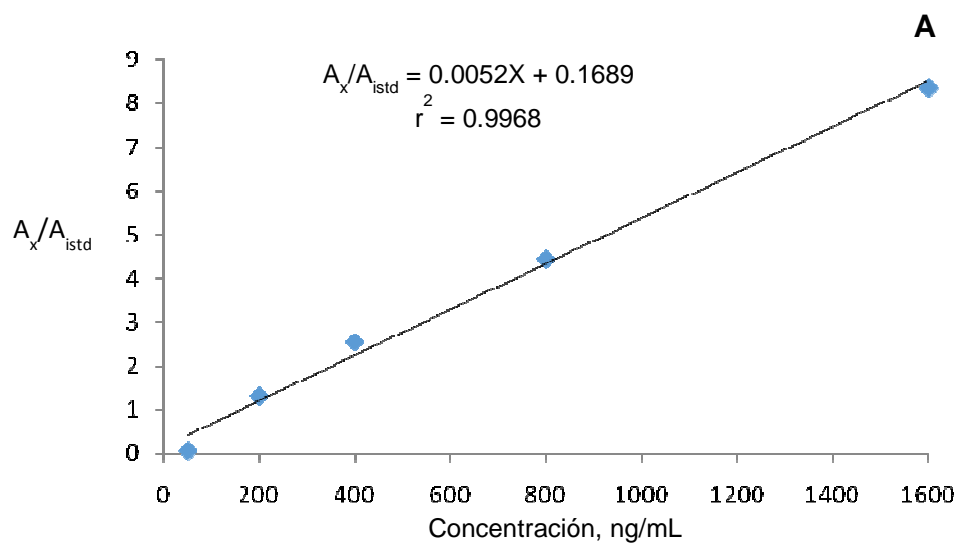


Figura 2.5. Curva de calibración de la ketamina en: (A) sangre y (B) orina.

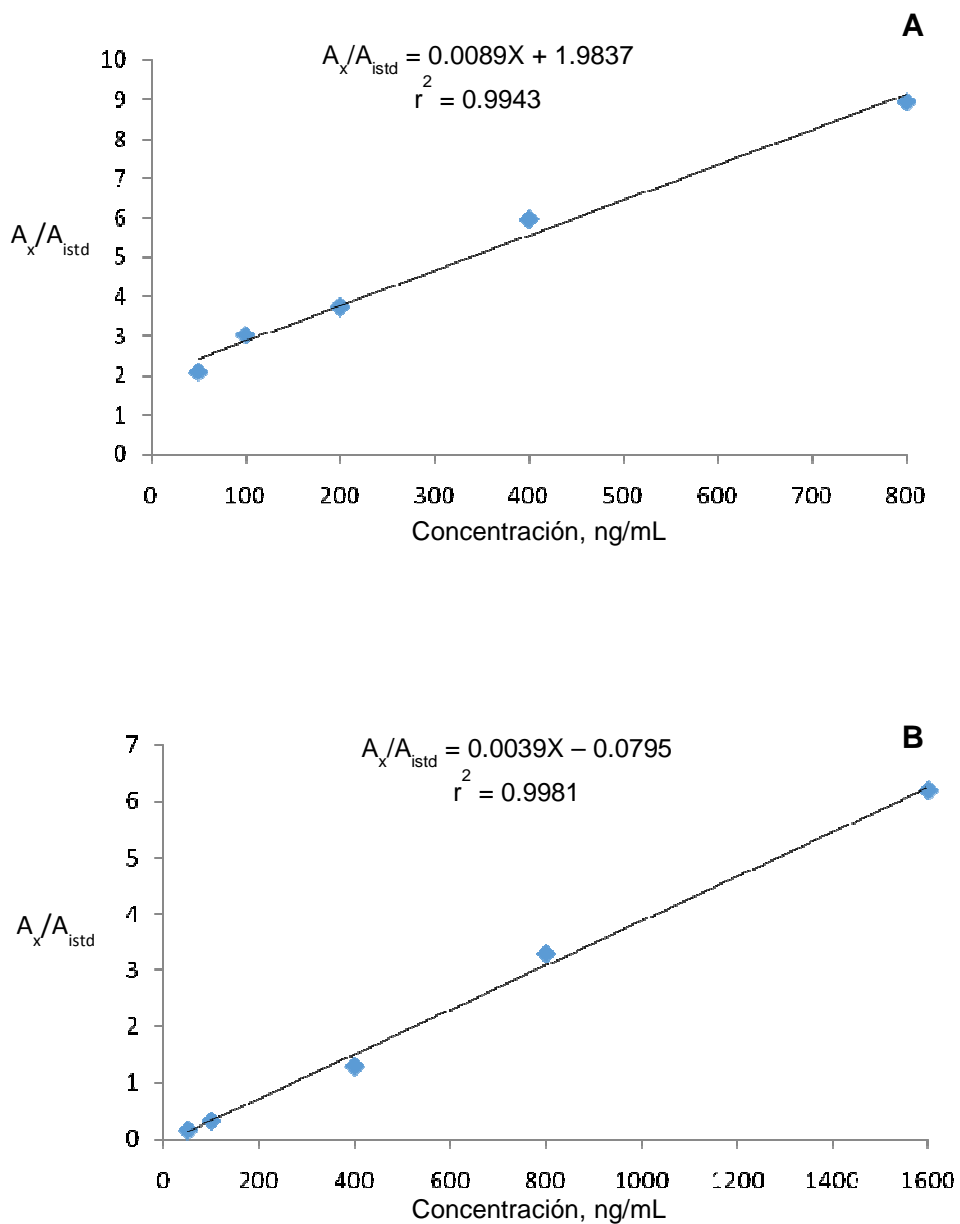


Figura 2.6. Curva de calibración de la cocaína en: (A) sangre y (B) orina.

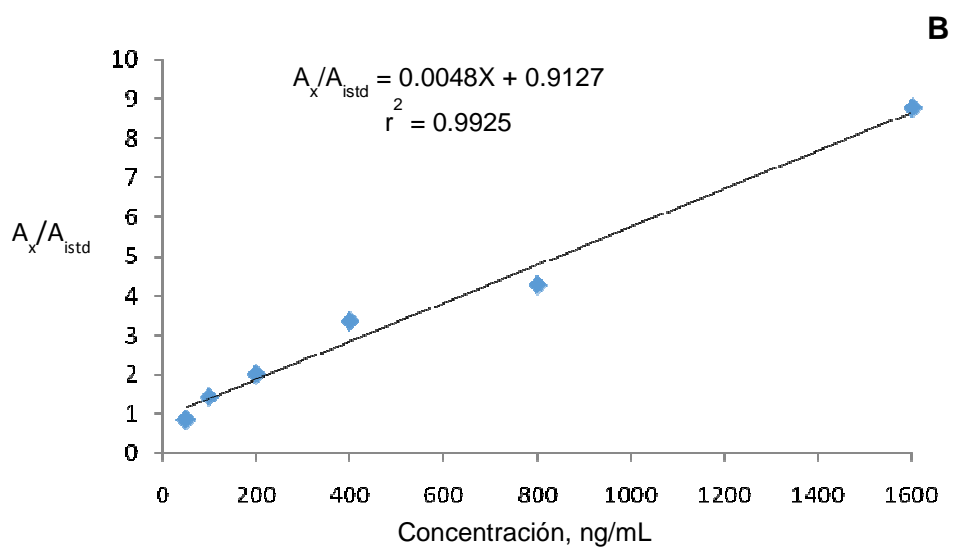
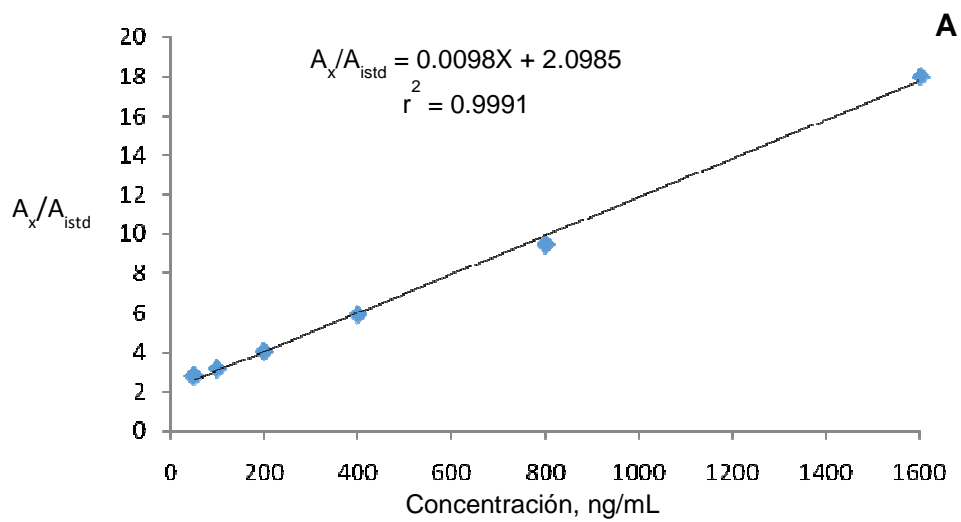


Figura 2.7. Curva de calibración de la nortriptilina en: (A) sangre y (B) orina.

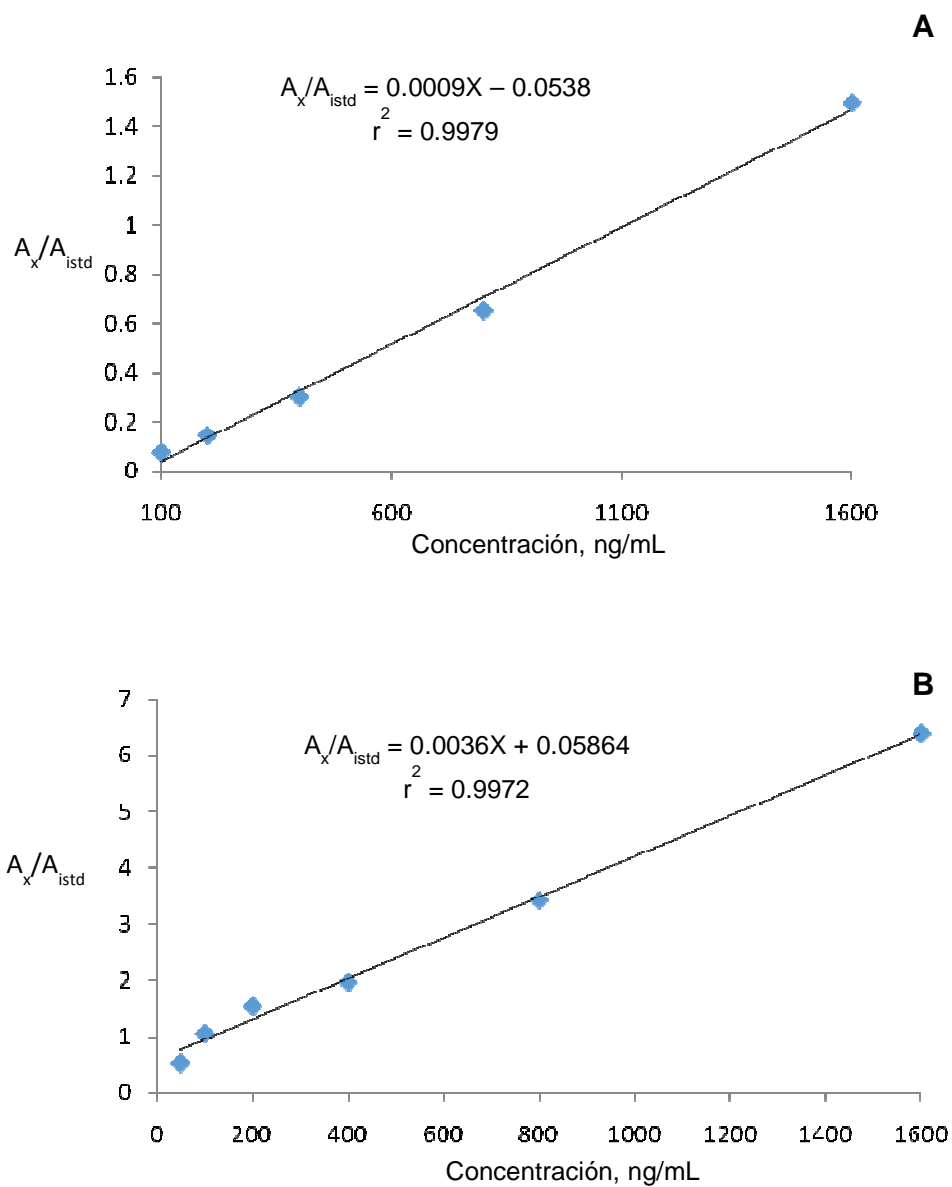


Figura 2.8. Curva de calibración del cocaetileno en: (A) sangre y (B) orina.

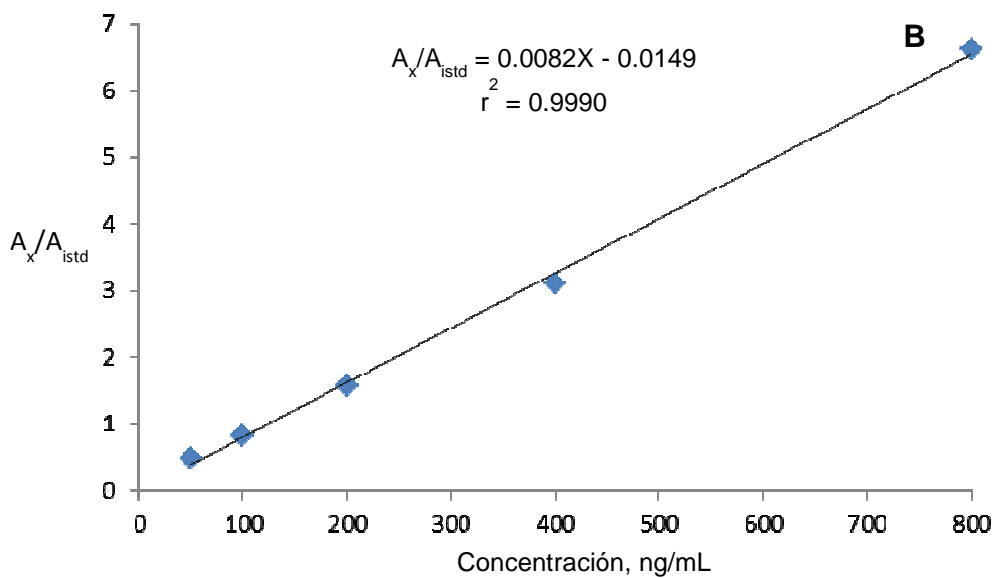
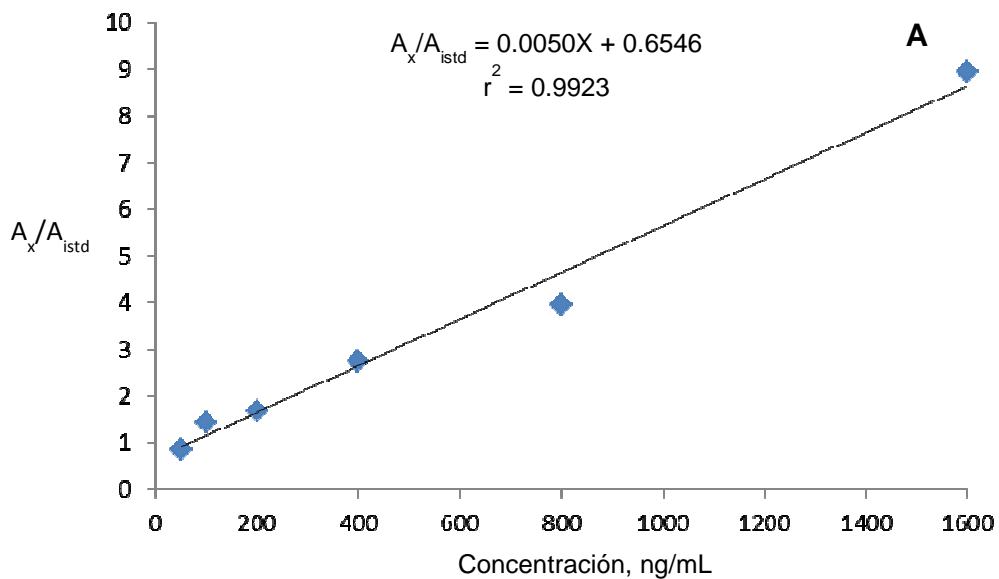


Figura 2.9. Curva de calibración de la benzoilecgonina en: (A) sangre y (B) orina.

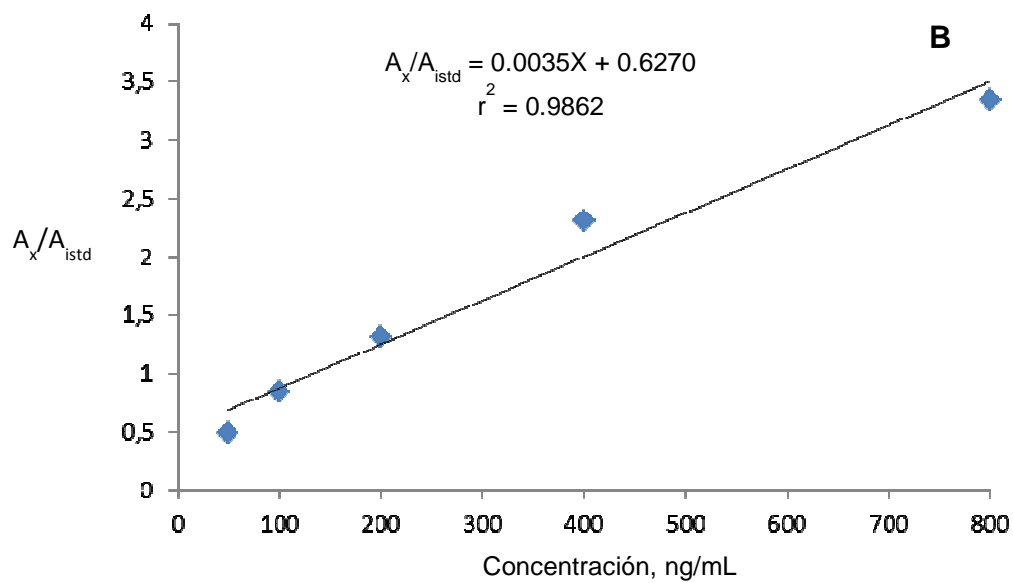
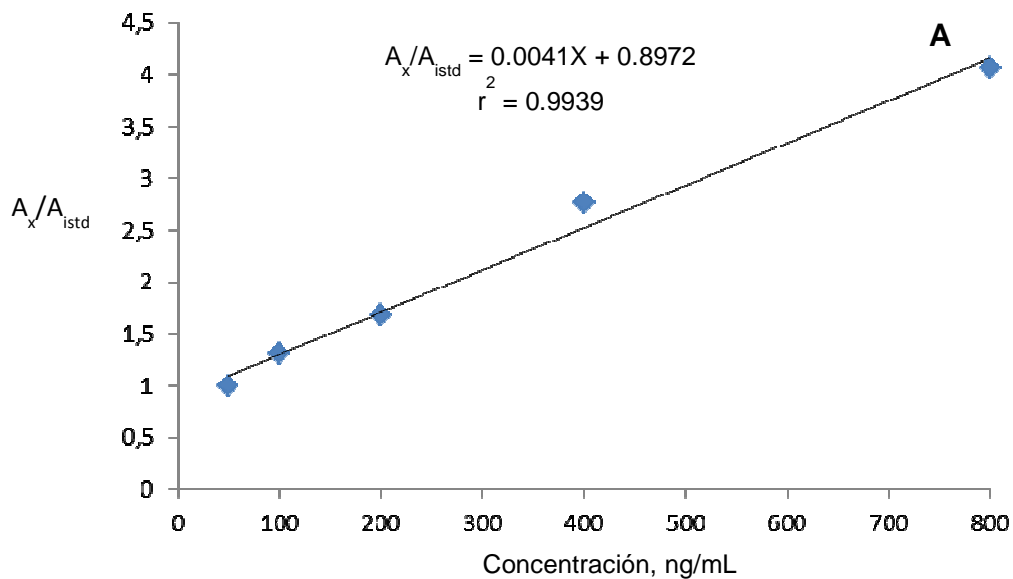


Figura 2.10. Curva de calibración de la escopolamina en: (A) sangre y (B) orina.

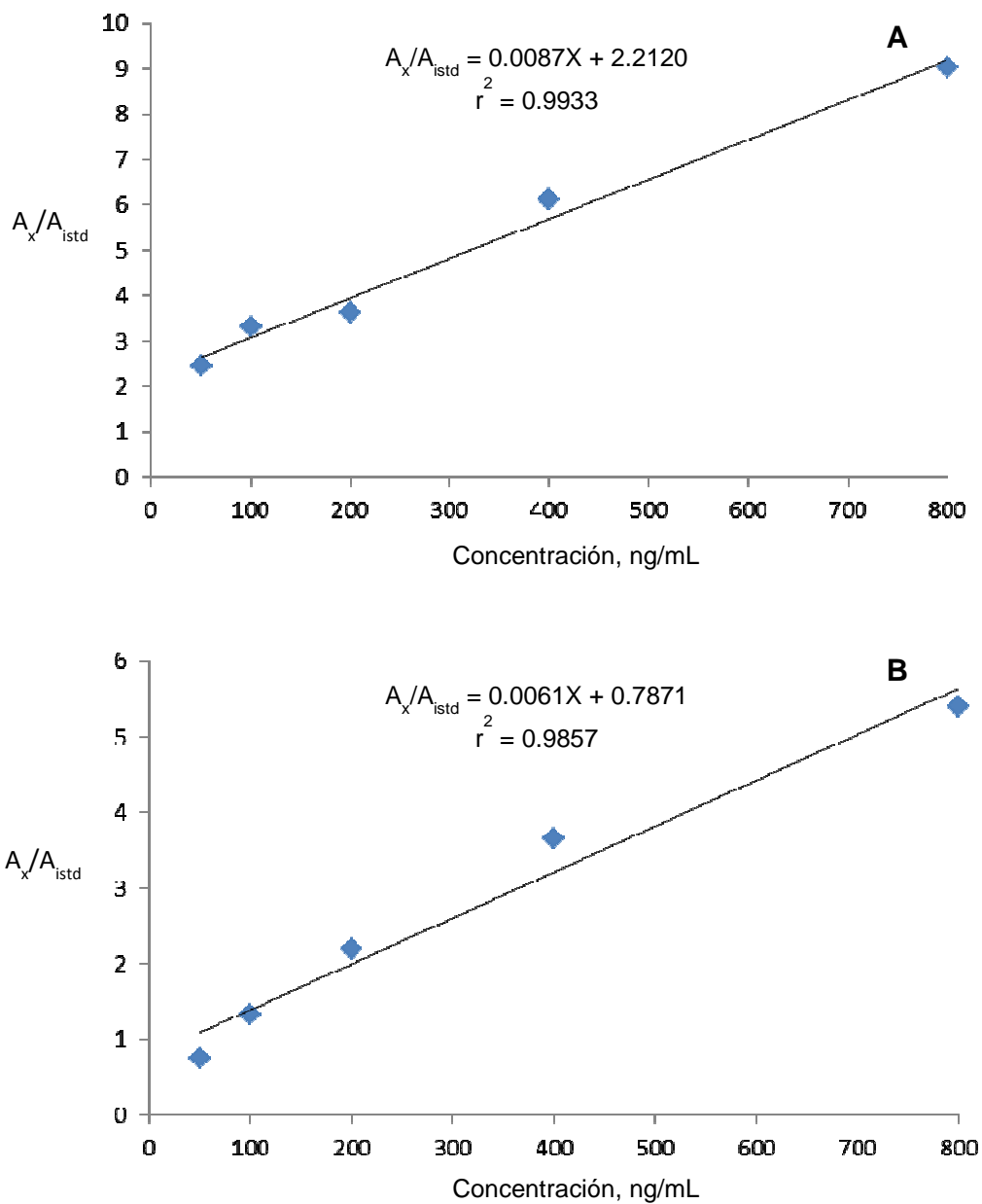


Figura 2.11. Curva de calibración del oxazepam en: (A) sangre y (B) orina.

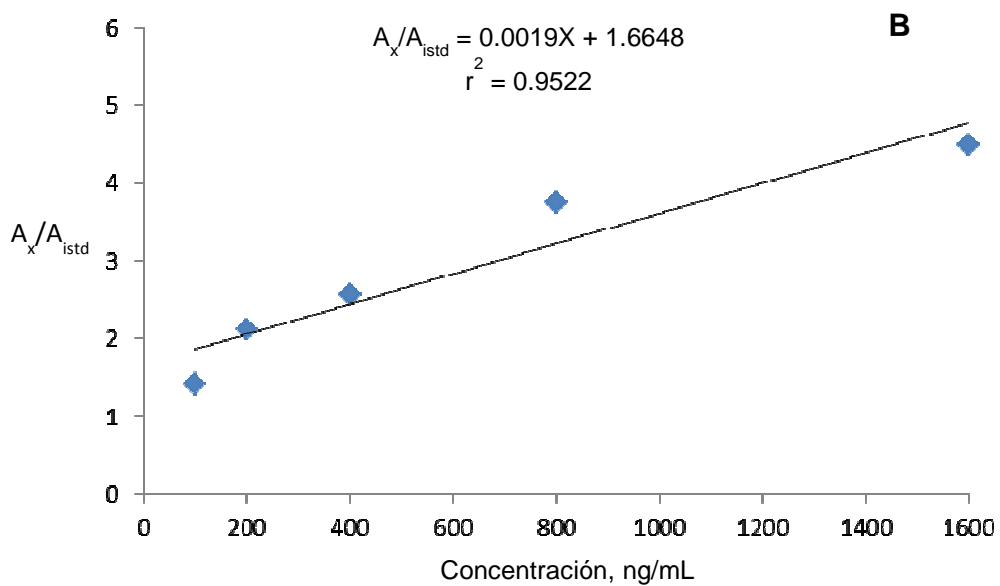
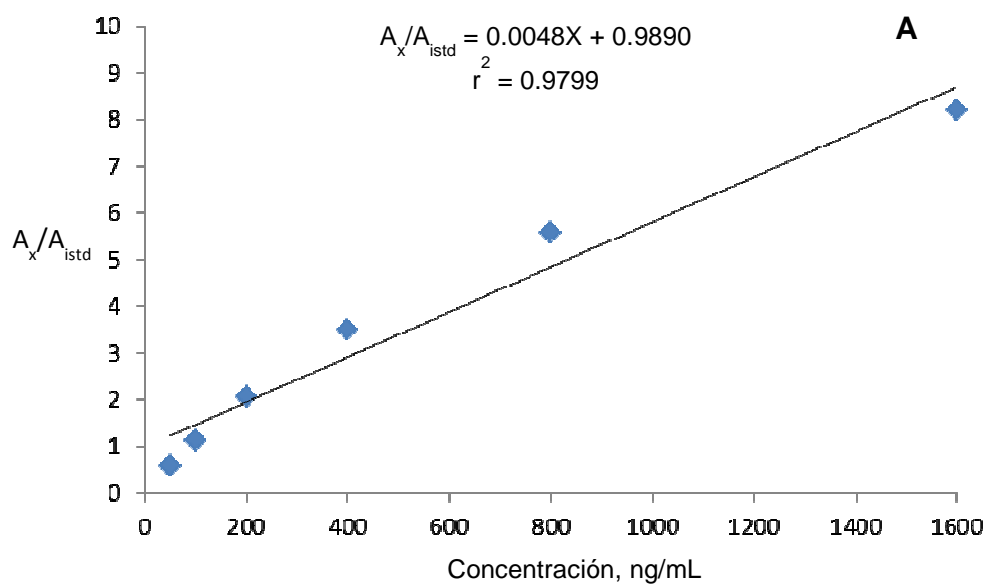


Figura 2.12. Curva de calibración del bromazepam en: (A) sangre y (B) orina.

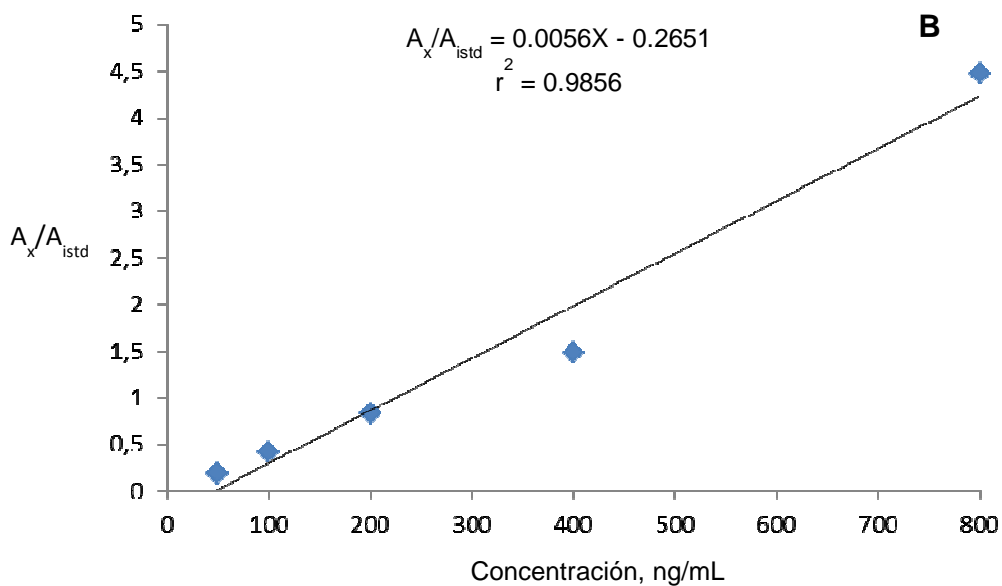
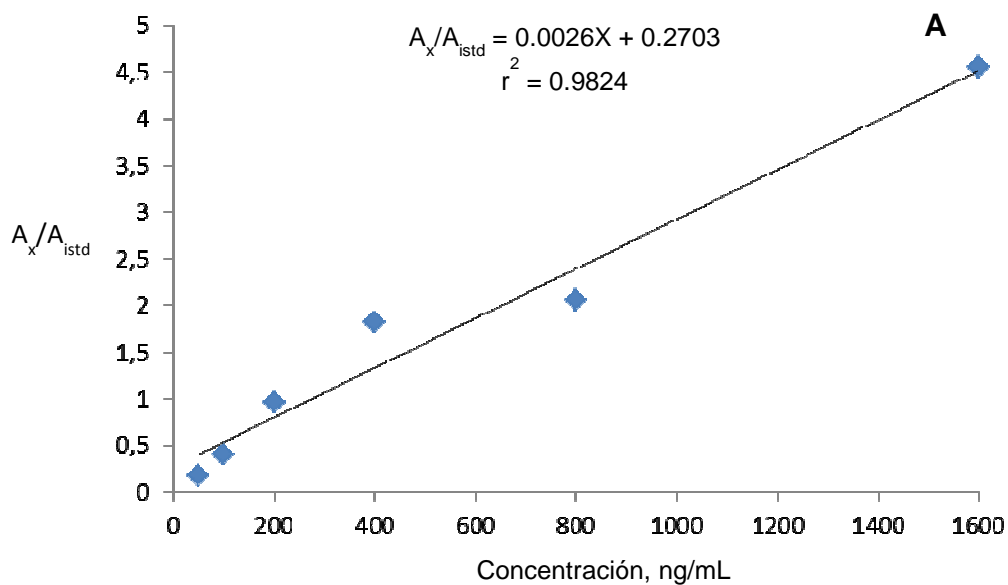


Figura 2.13. Curva de calibración de la codeína en: (A) sangre y (B) orina.

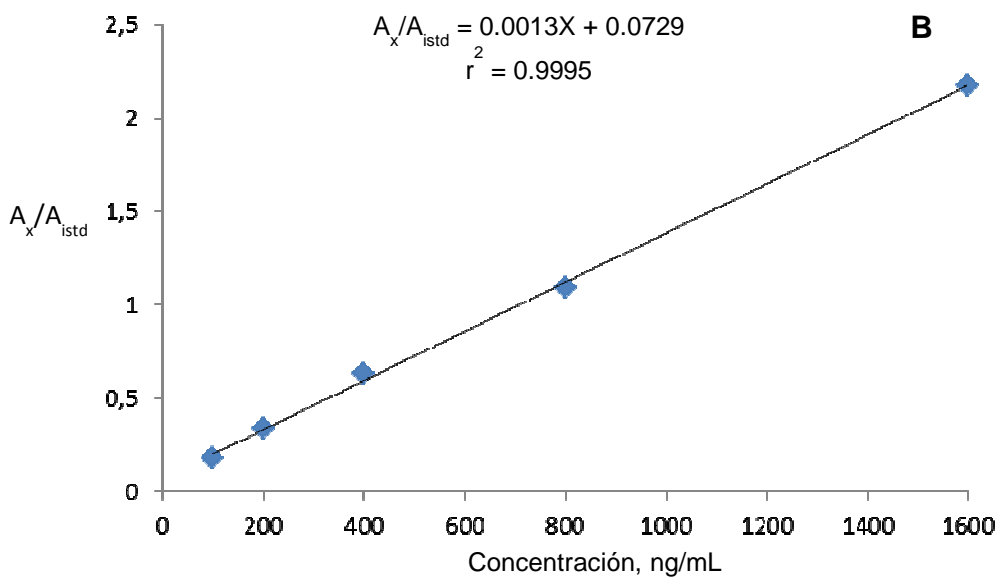
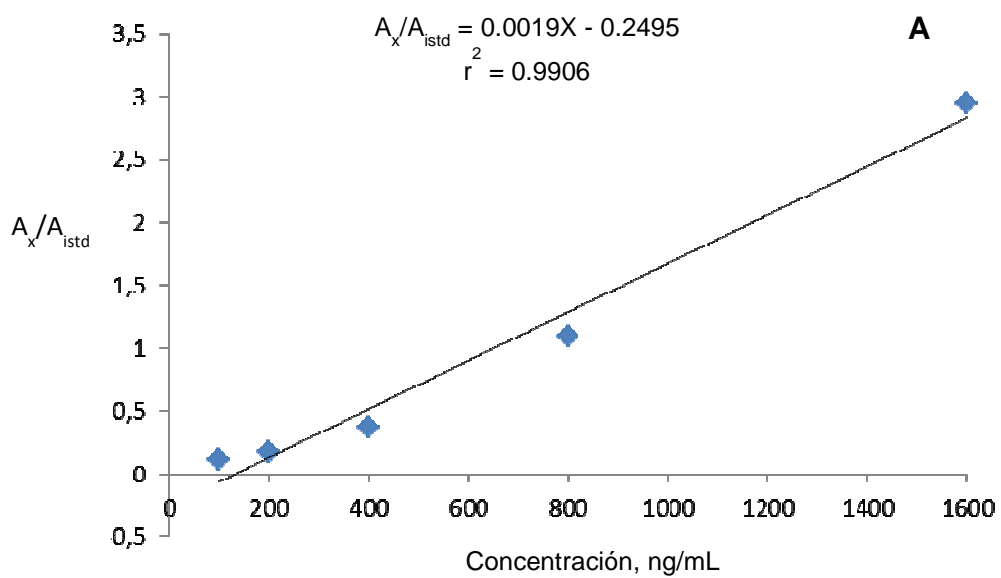


Figura 2.14. Curva de calibración del diazepam en: (A) sangre y (B) orina.

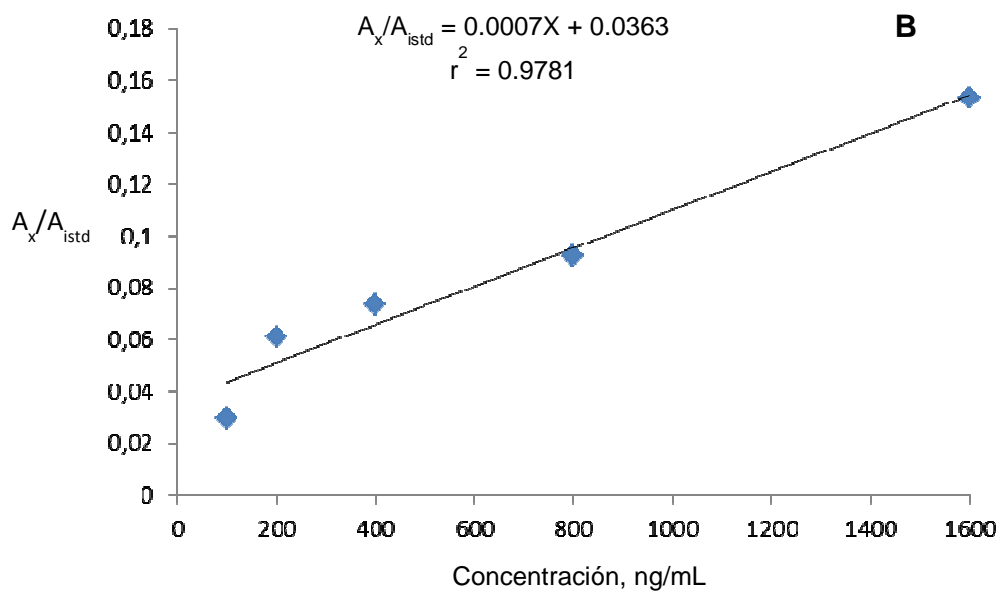
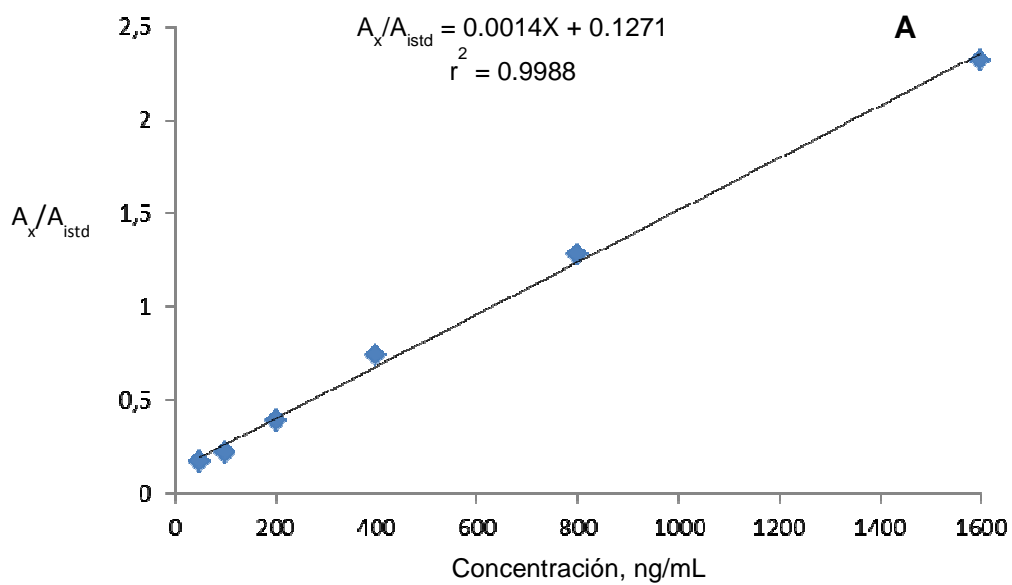


Figura 2.15. Curva de calibración del lorazepam en: (A) sangre y (B) orina.

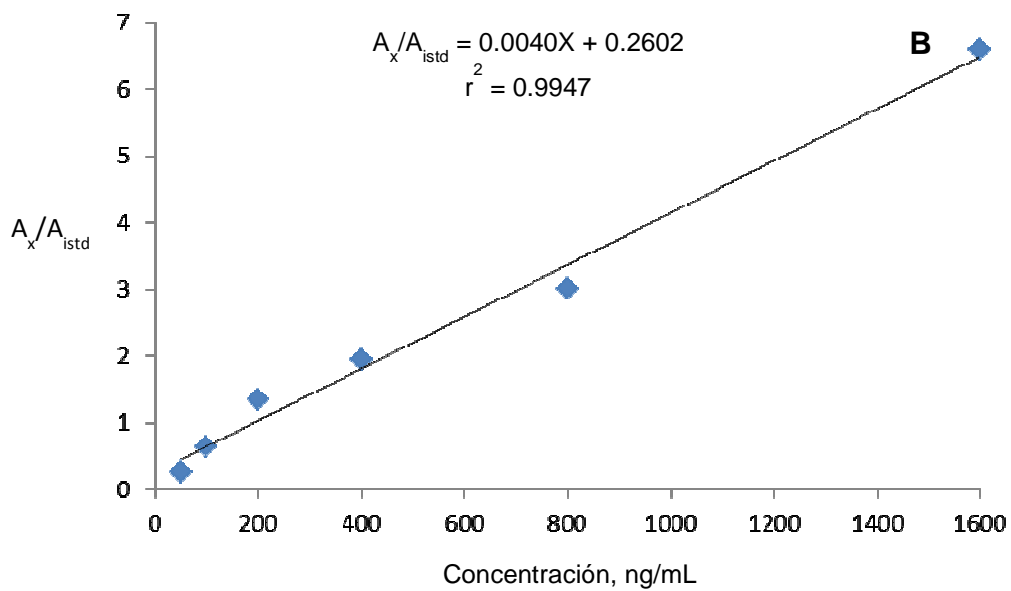
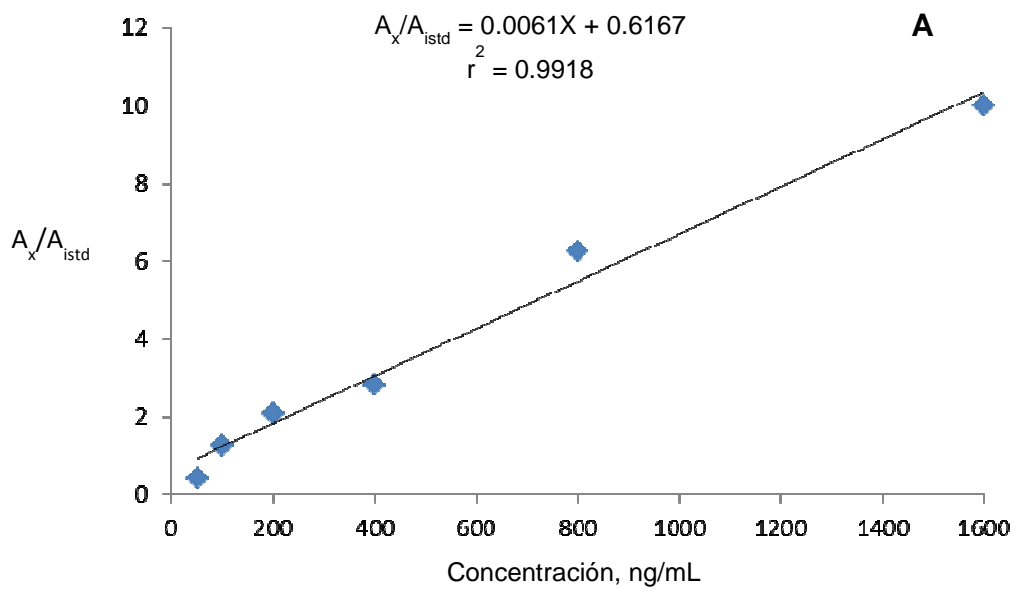


Figura 2.16. Curva de calibración de la morfina en: (A) sangre y (B) orina.

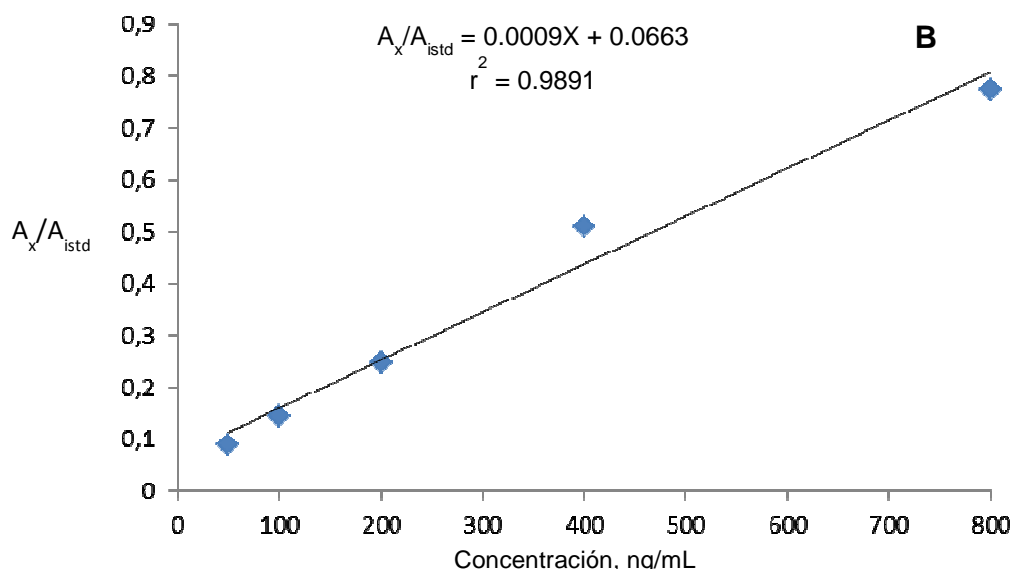
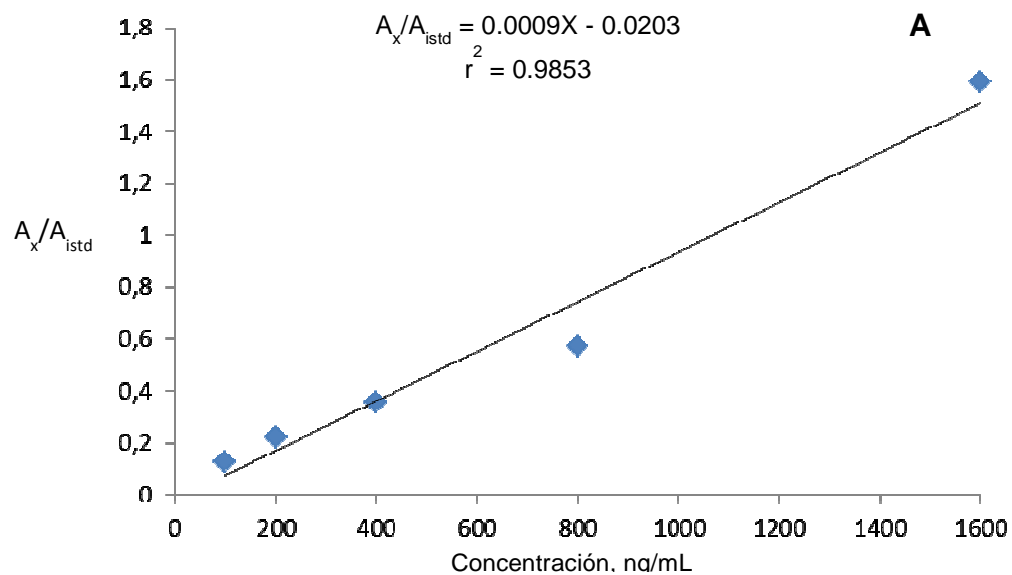


Figura 2.17. Curva de calibración de la clorpromazina en: (A) sangre y (B) orina.

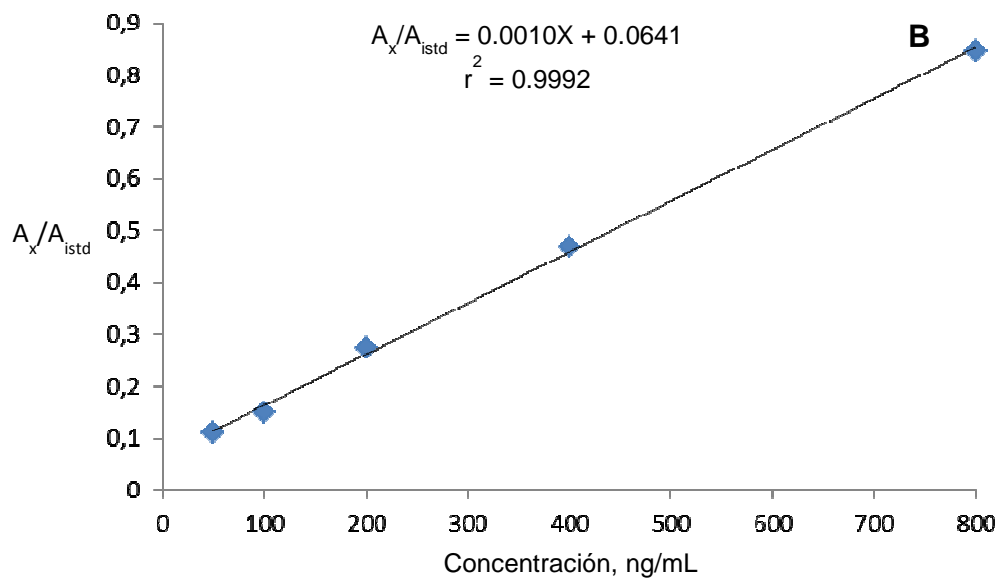
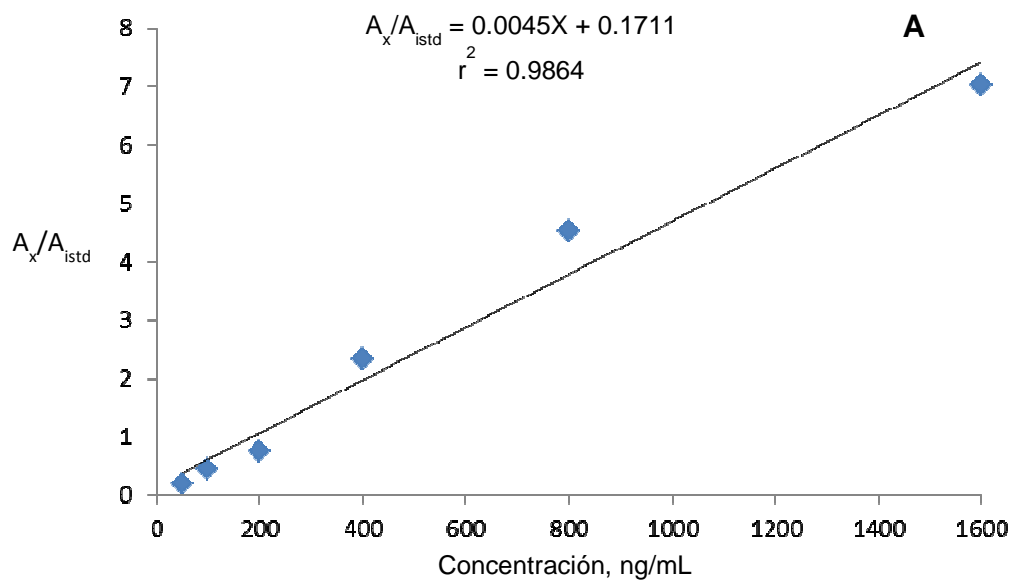


Figura 2.18. Curva de calibración del flunitrazepam en: (A) sangre y (B) orina.

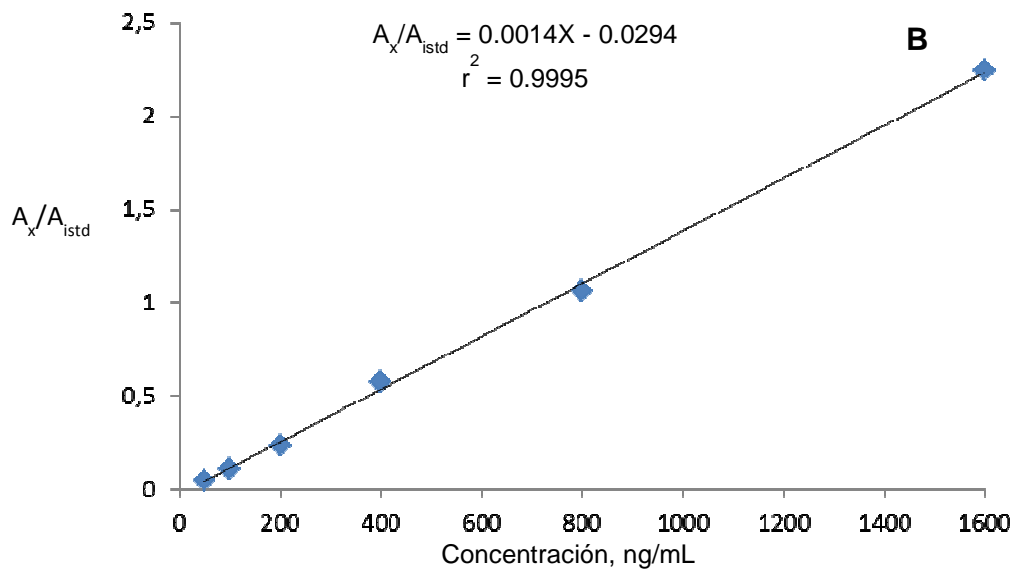
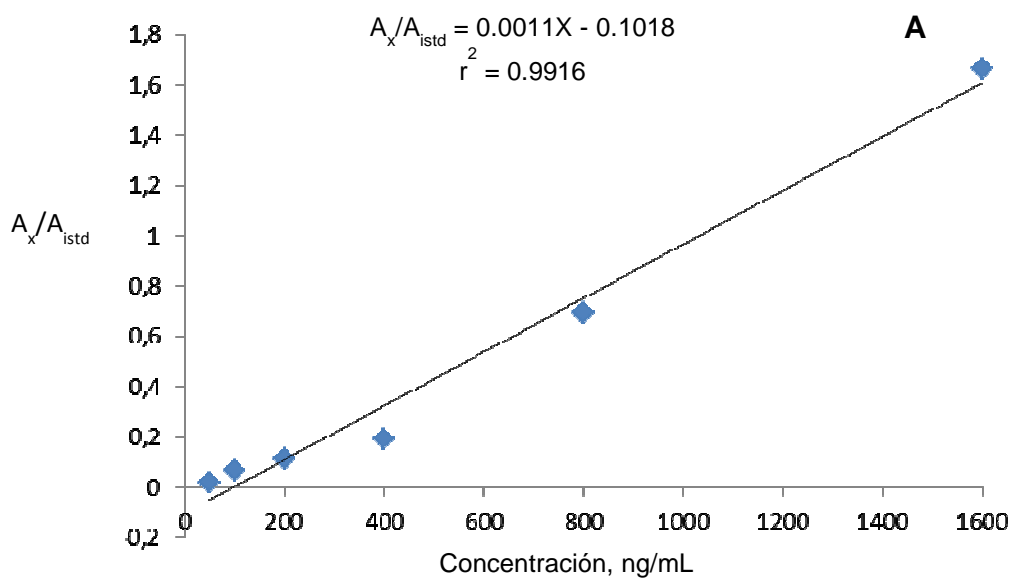


Figura 2.19. Curva de calibración del clonazepam en: (A) sangre y (B) orina.

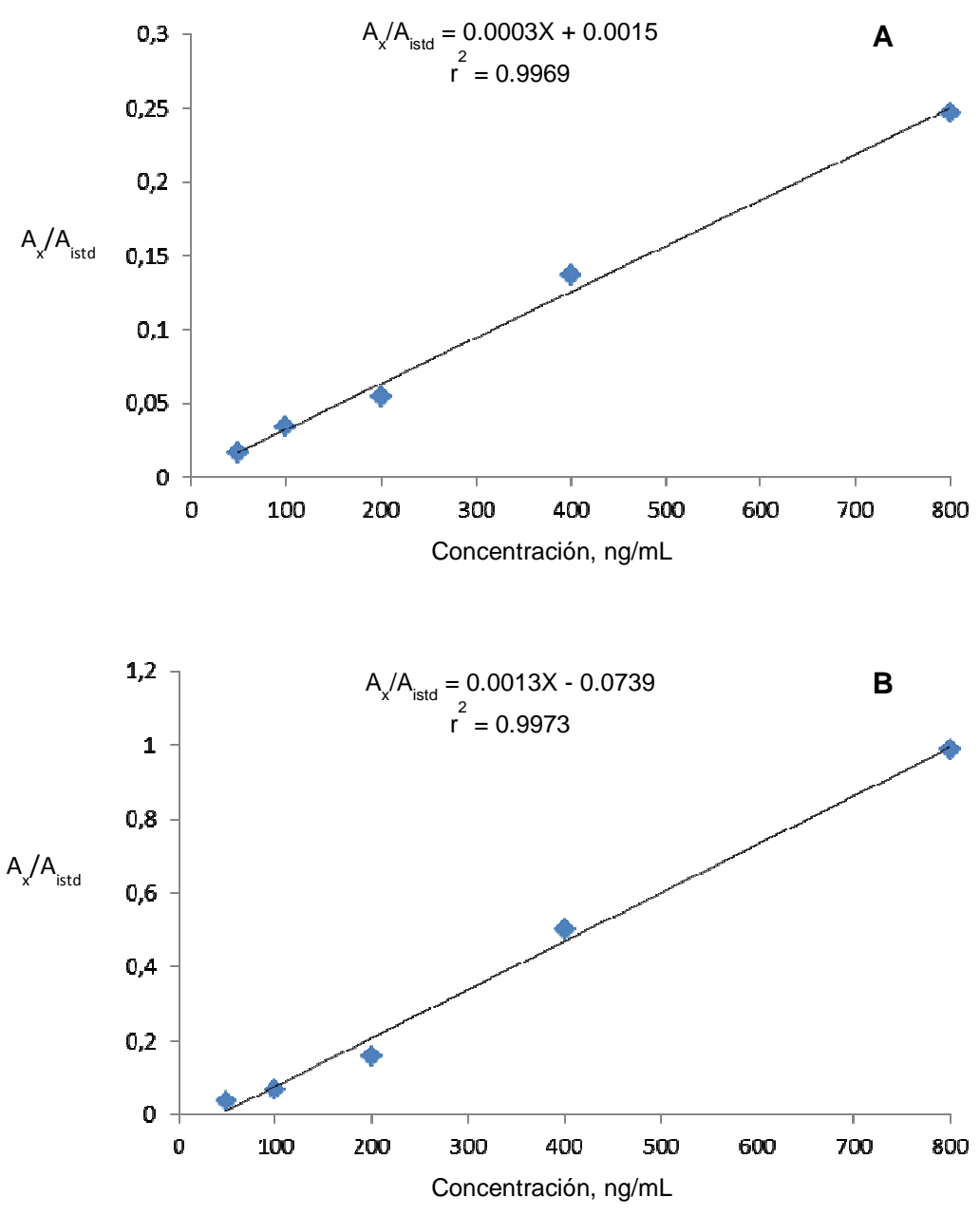


Figura 2.20. Curva de calibración de la clozapina en: (A) sangre y (B) orina.

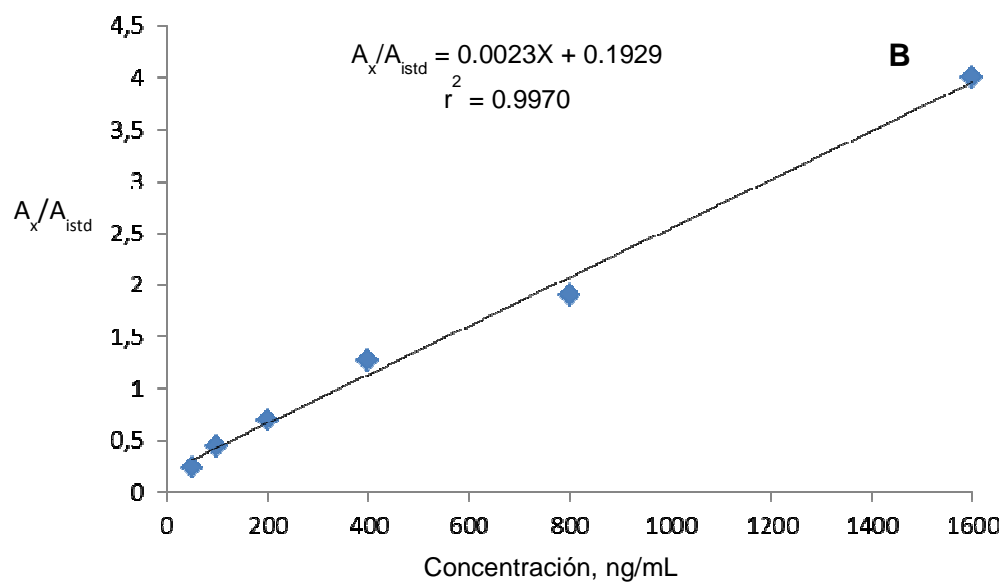
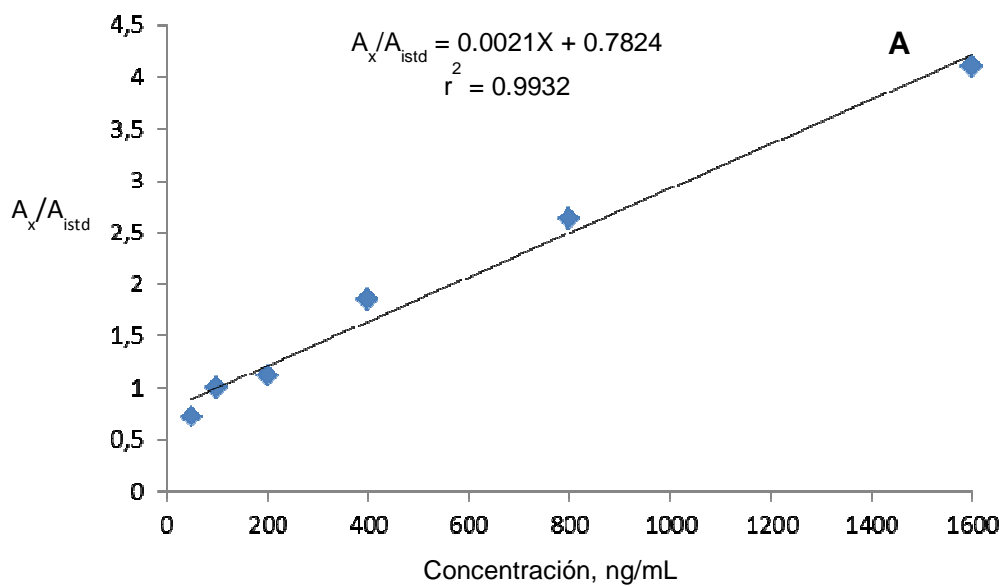


Figura 2.21. Curva de calibración del alprazolam en: (A) sangre y (B) orina.

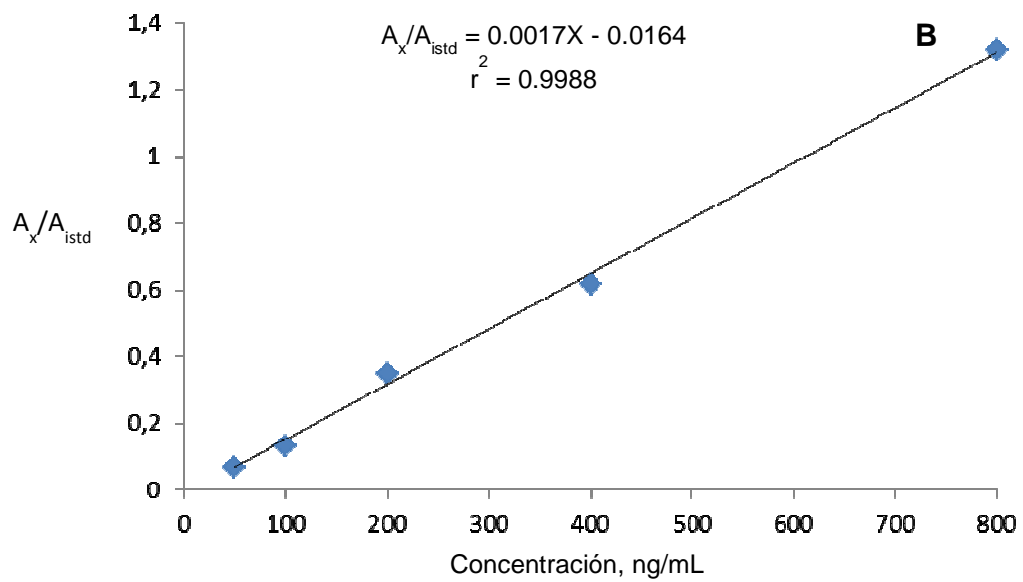
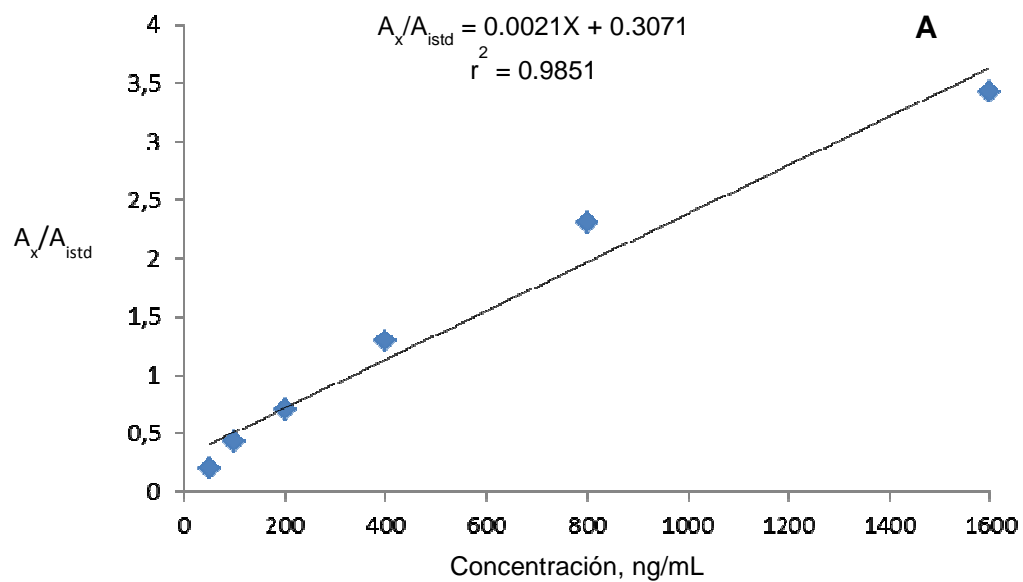


Figura 2.22. Curva de calibración de la zopiclona en: (A) sangre y (B) orina.

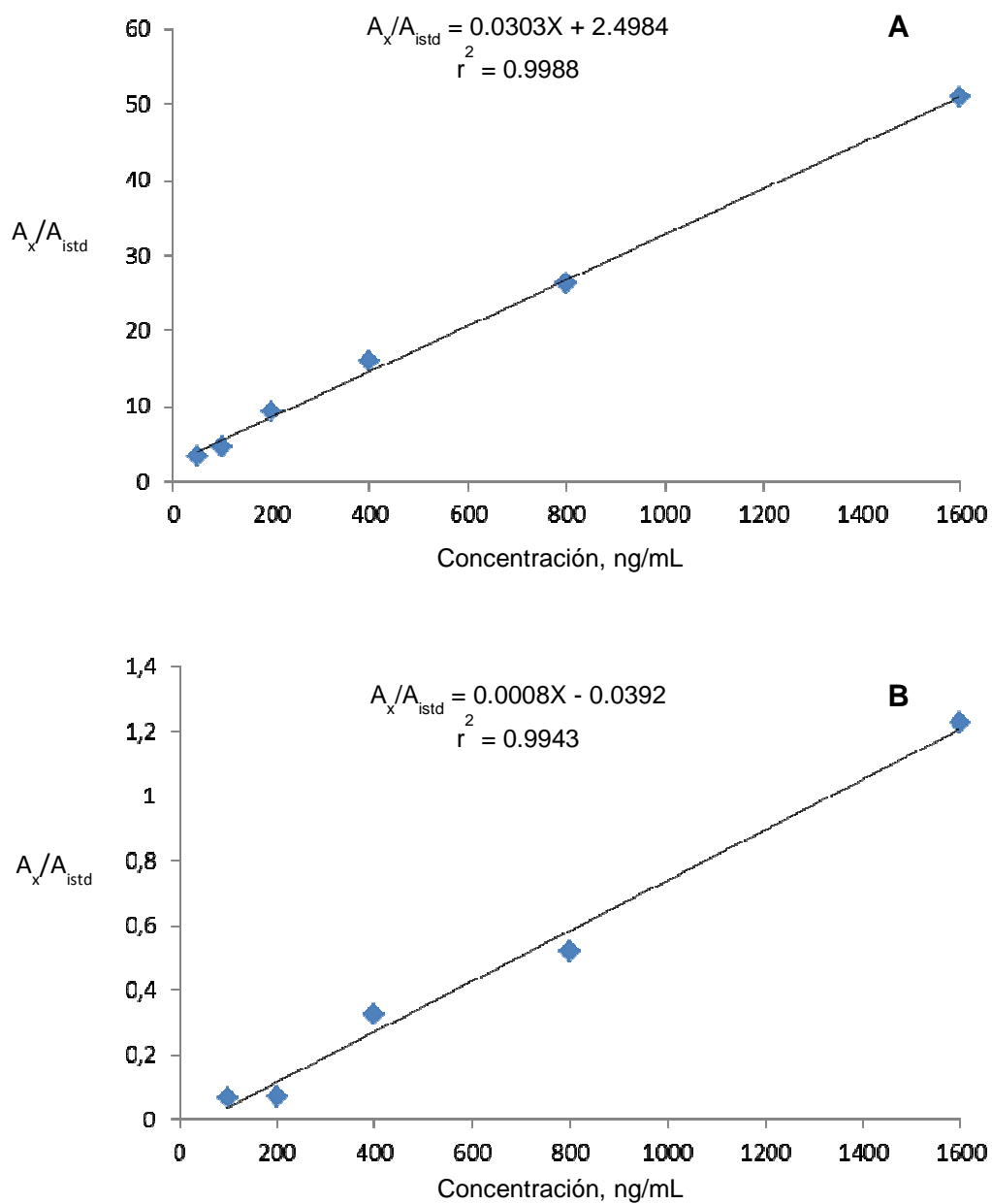
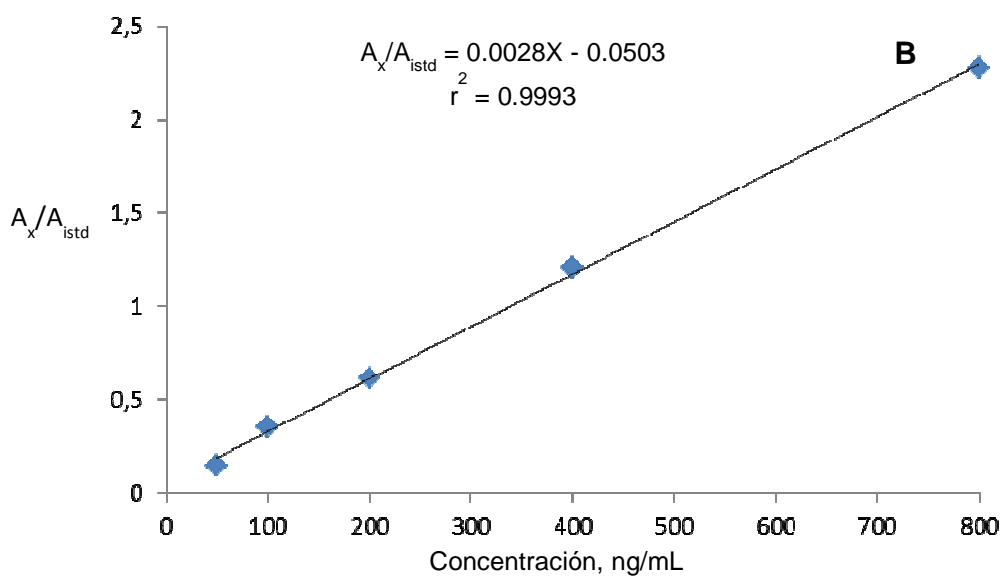
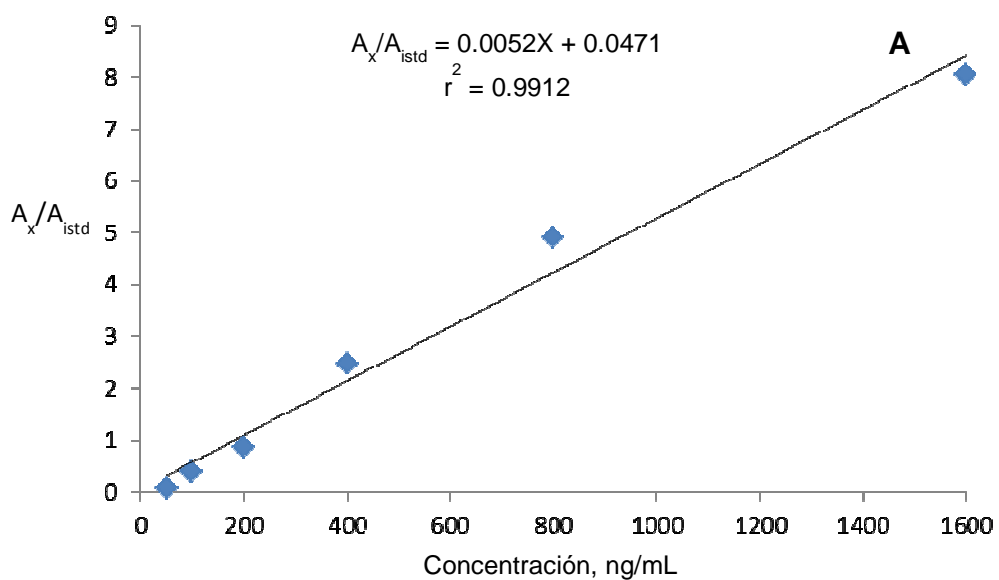


Figura 2.23. Curva de calibración de la trazodona en: (A) sangre y (B) orina.



Anexo C. Curvas de calibración de 9 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas por GC-QqQ-MS.

Figura 3.1. Curva de calibración de la meperidina.

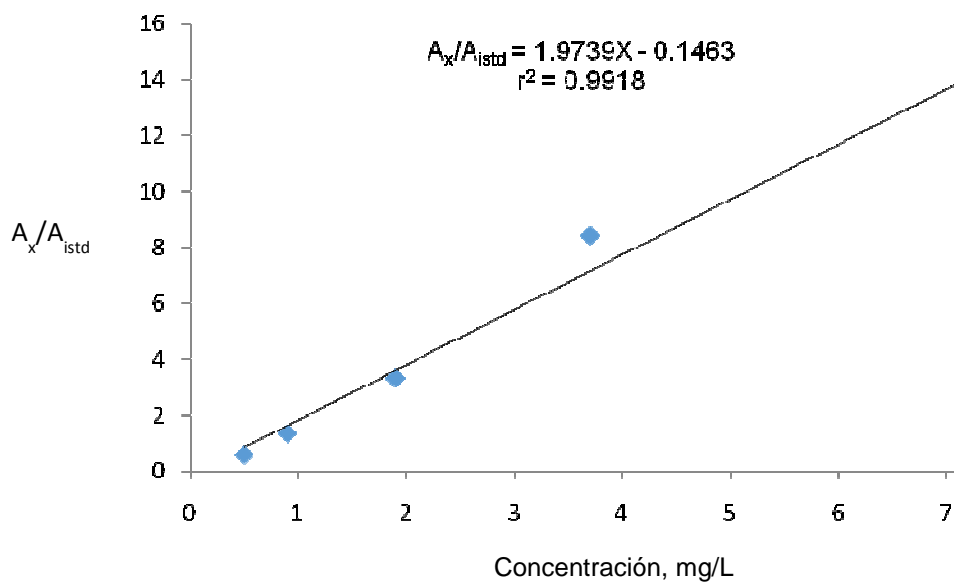


Figura 3.2. Curva de calibración de la fluoxetina.

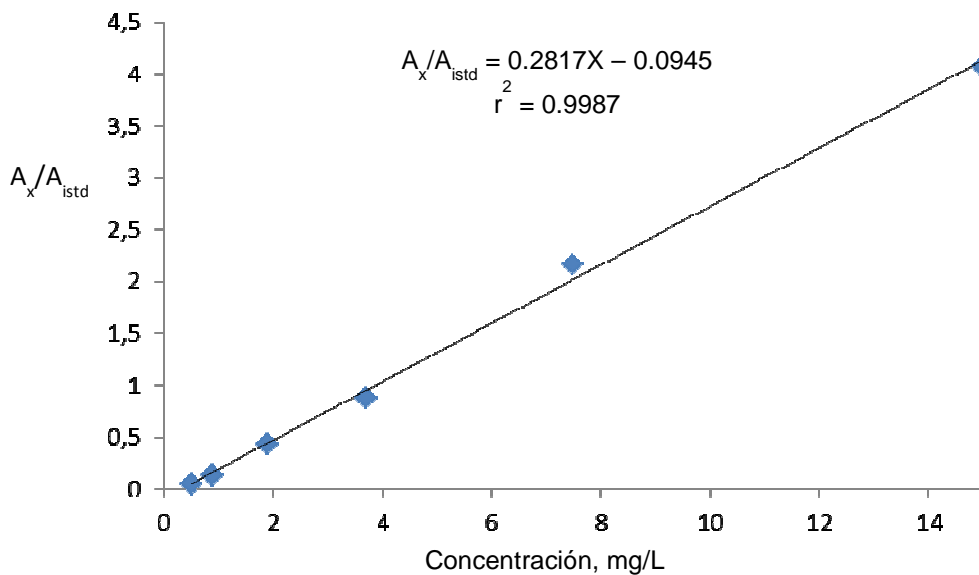


Figura 3.3. Curva de calibración de ketamina.

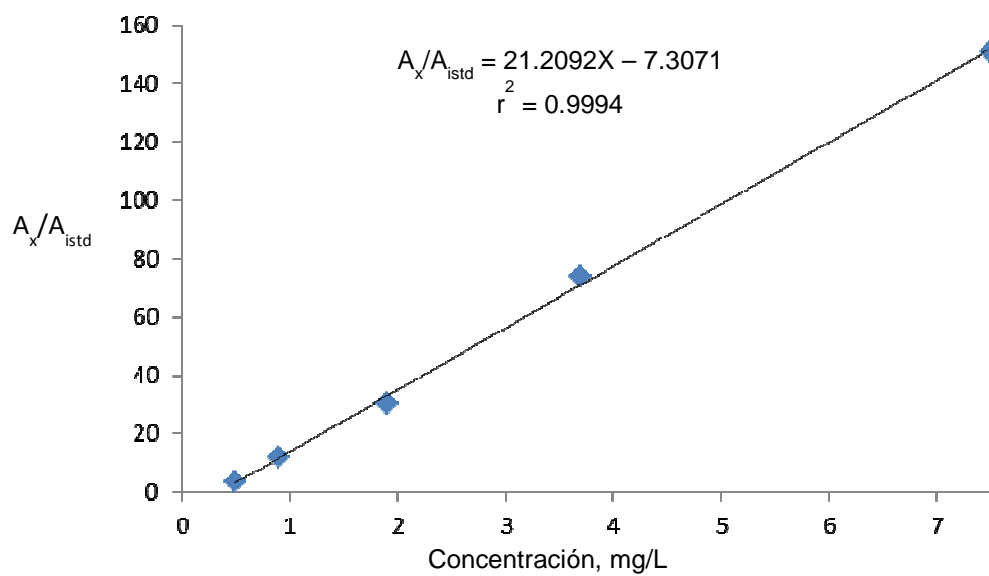


Figura 3.4. Curva de calibración de cocaína.

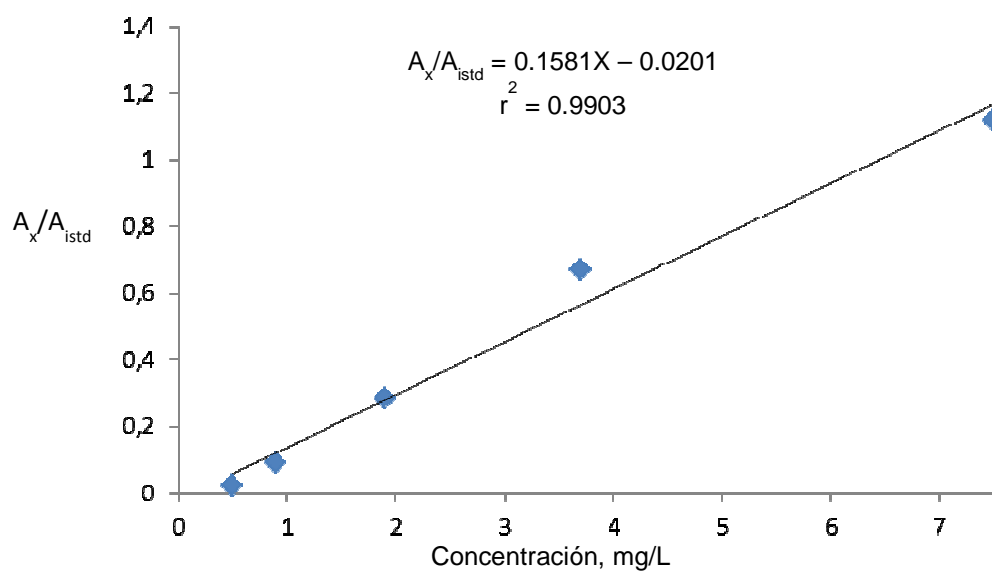


Figura 3.5. Curva de calibración del cocaetileno.

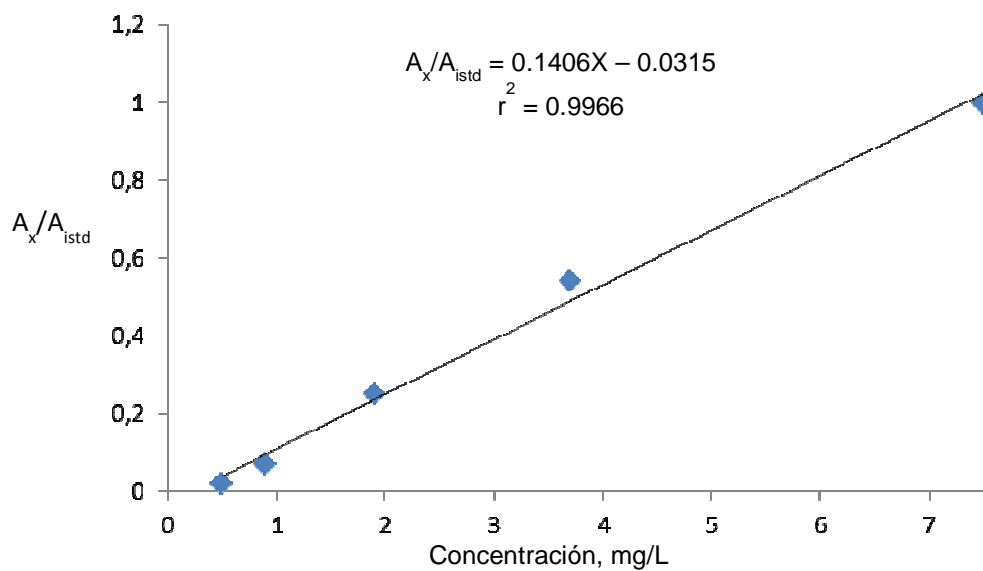


Figura 3.6. Curva de calibración de la clorpromazina.

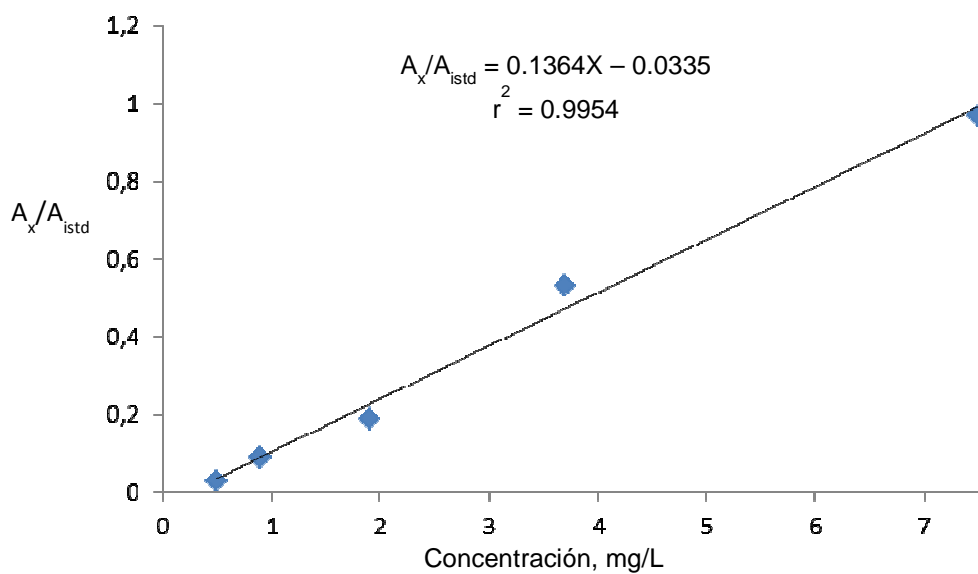


Figura 3.7. Curva de calibración del flunitrazepam.

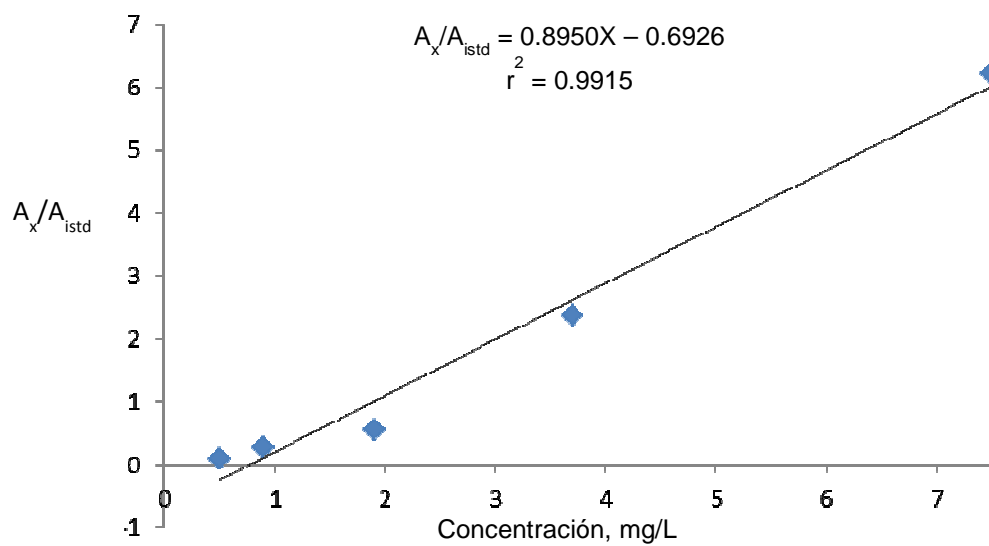


Figura 3.8. Curva de calibración de la clozapina.

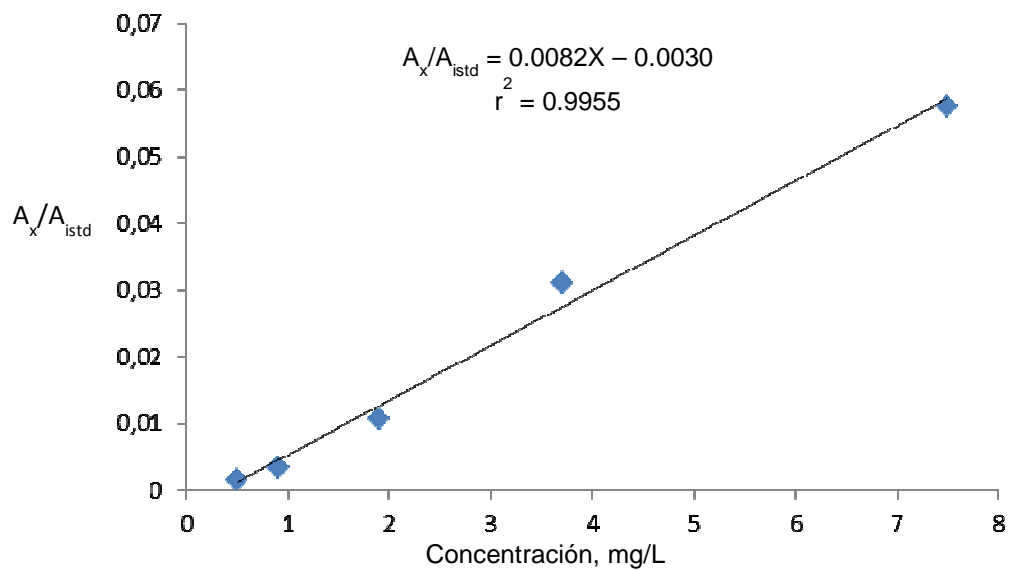
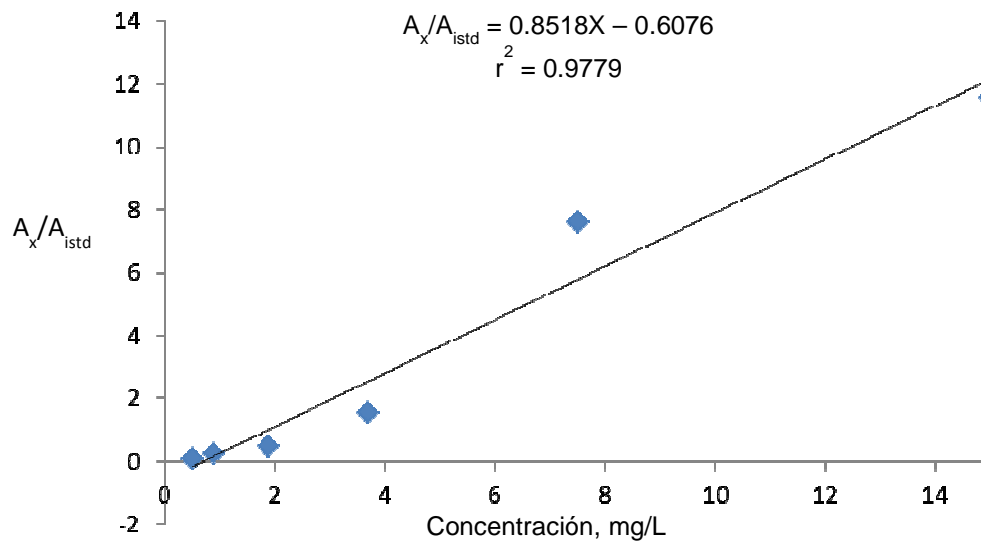


Figura 3.9. Curva de calibración del alprazolam.



Anexo D. Espectros de masas obtenidos por LC-ESI(+)-QToF-MS de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos.

Figura 4.1. Espectro de masas de la morfina.

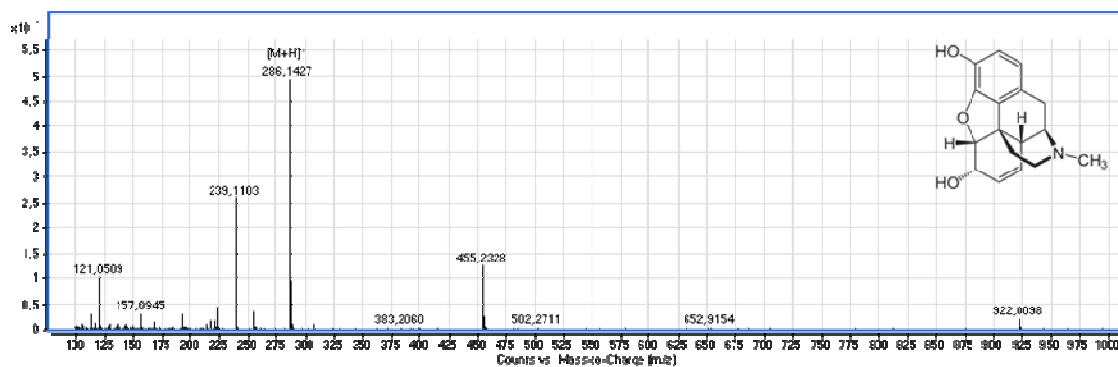


Figura 4.2. Espectro de masas de la codeína.

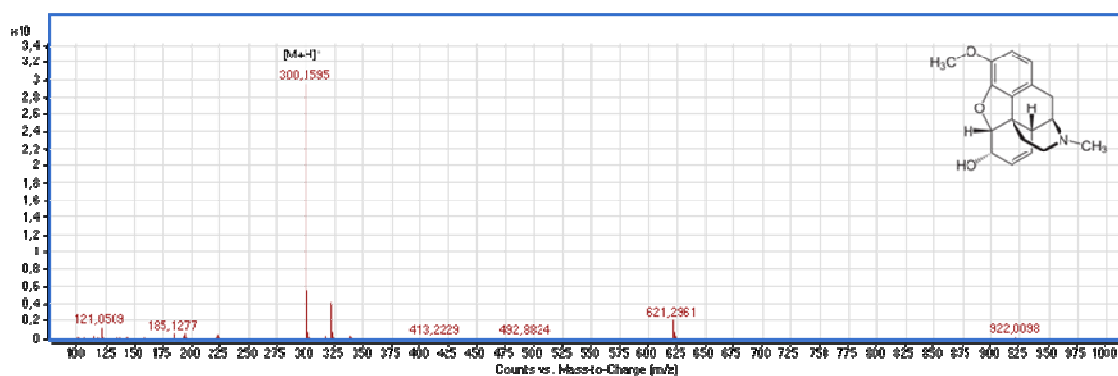


Figura 4.3. Espectro de masas de la escopolamina.

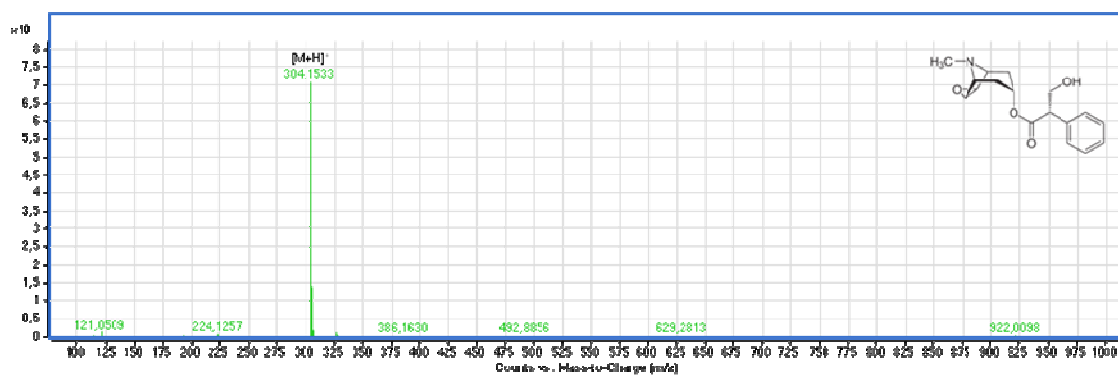


Figura 4.4. Espectro de masas de la benzoilecgonina.

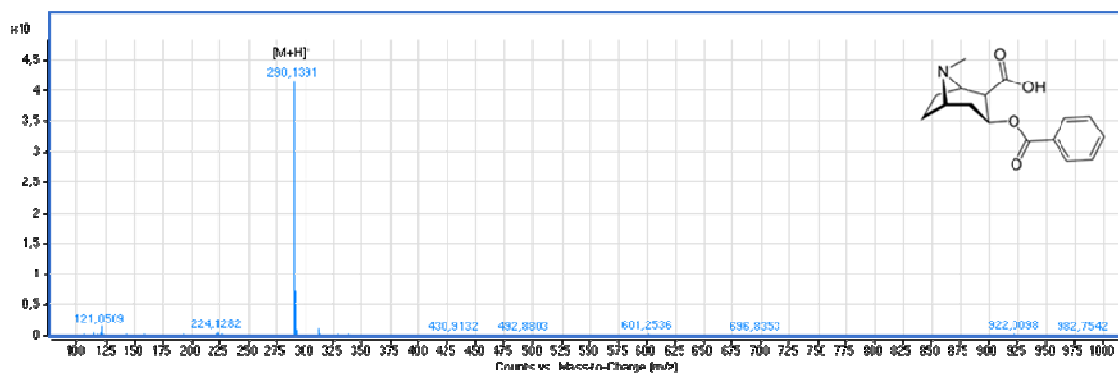


Figura 4.5. Espectro de masas de la ketamina.

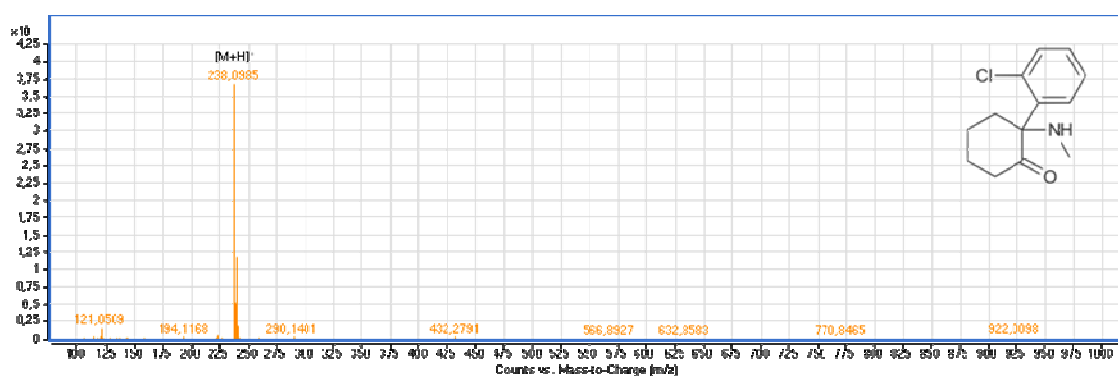


Figura 4.6. Espectro de masas de la cocaína.

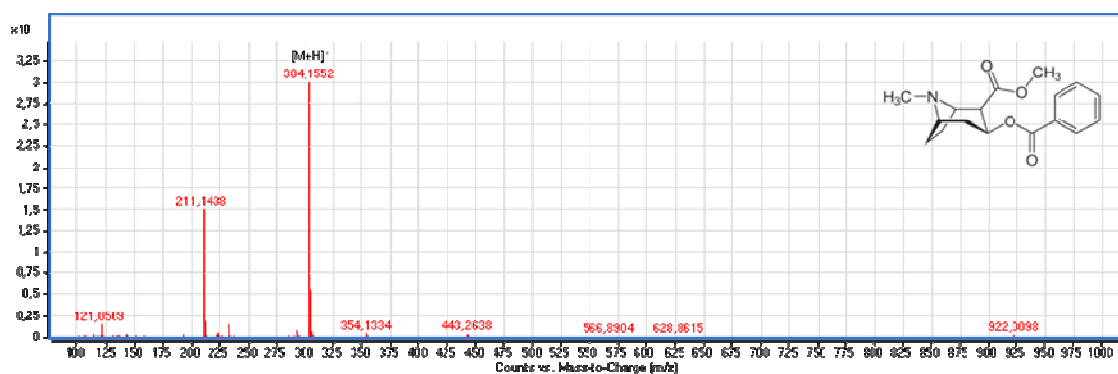


Figura 4.7. Espectro de masas de la meperidina.

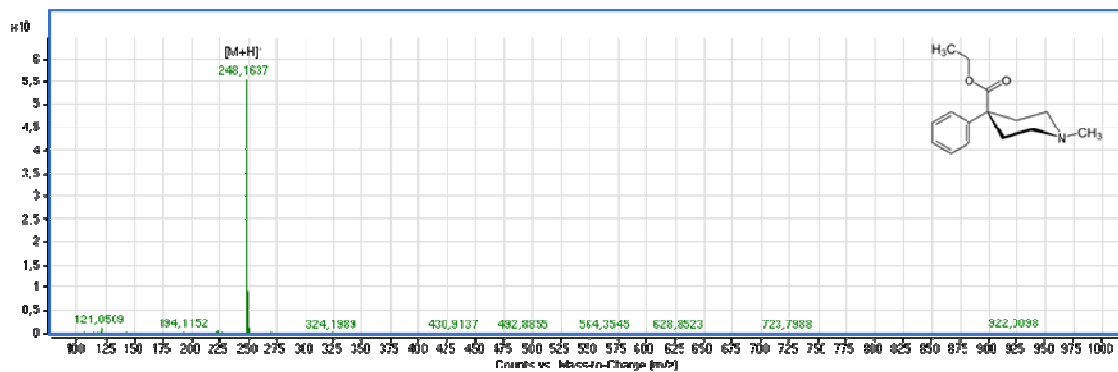


Figura 4.8. Espectro de masas del 7-aminoflunitrazepam.

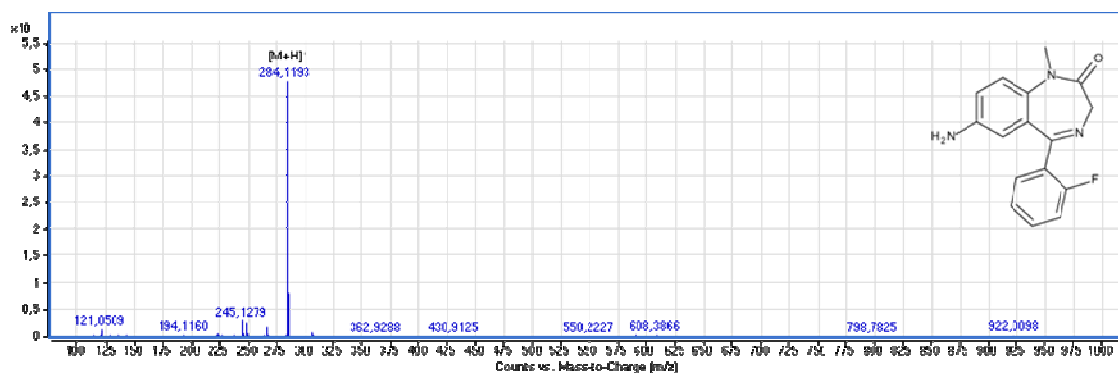


Figura 4.9. Espectro de masas del cocaetileno.

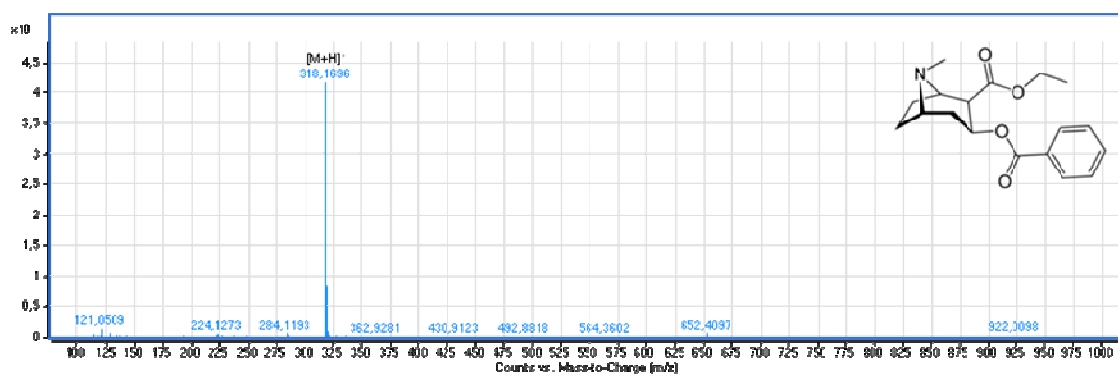


Figura 4.10. Espectro de masas de la trazodona.

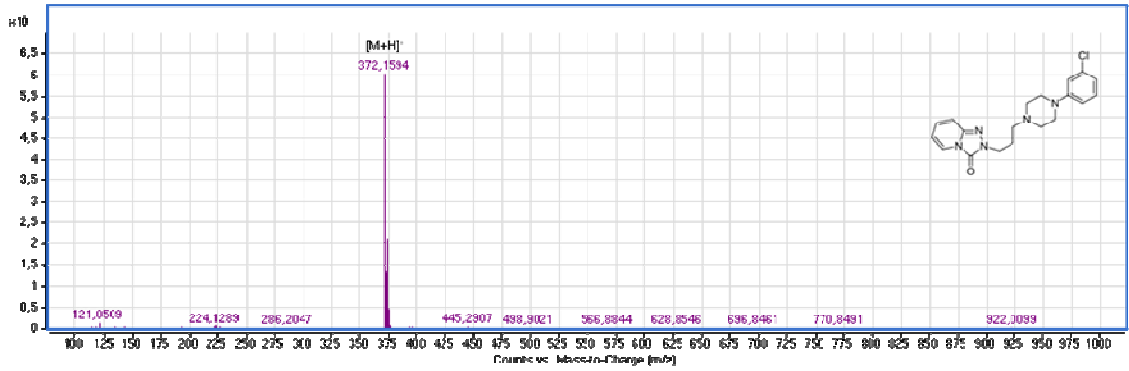


Figura 4.11. Espectro de masas de la clozapina.

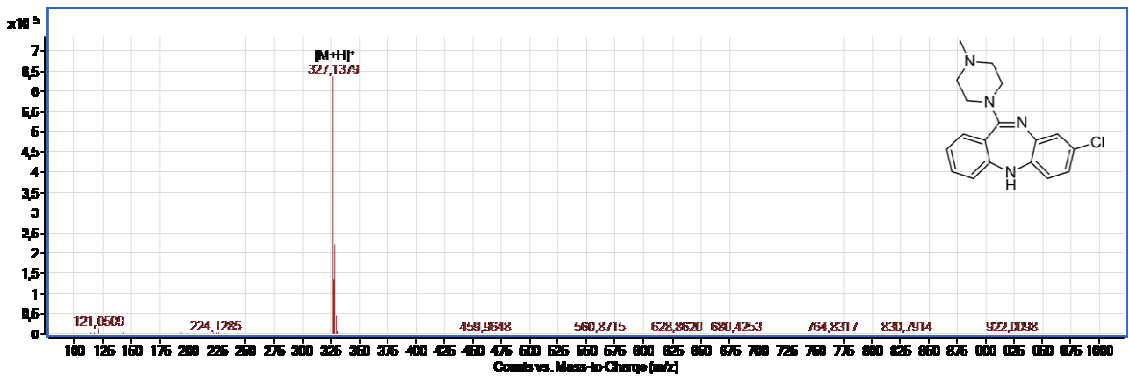


Figura 4.12. Espectro de masas del bromazepam.

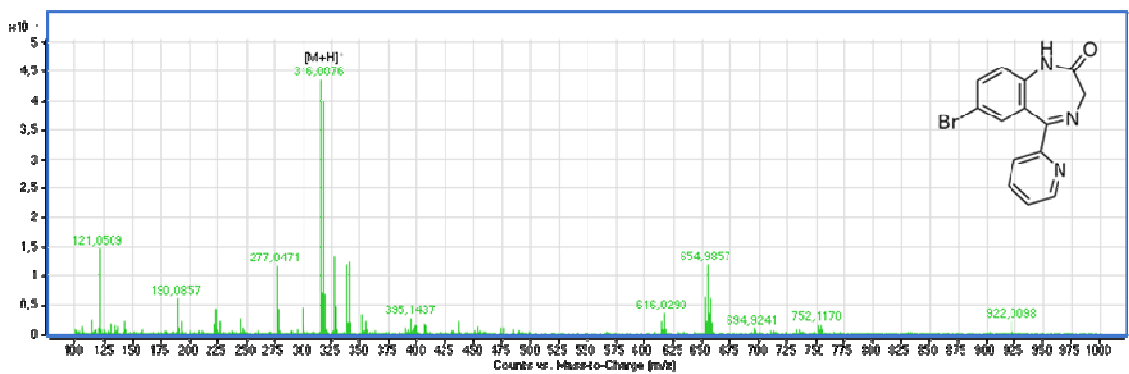


Figura 4.13. Espectro de masas del clonazepam.

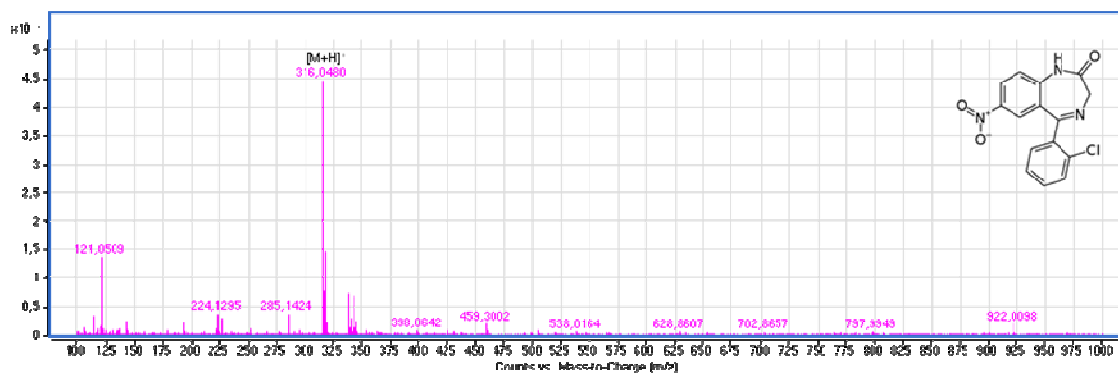


Figura 4.14. Espectro de masas del flunitrazepam.

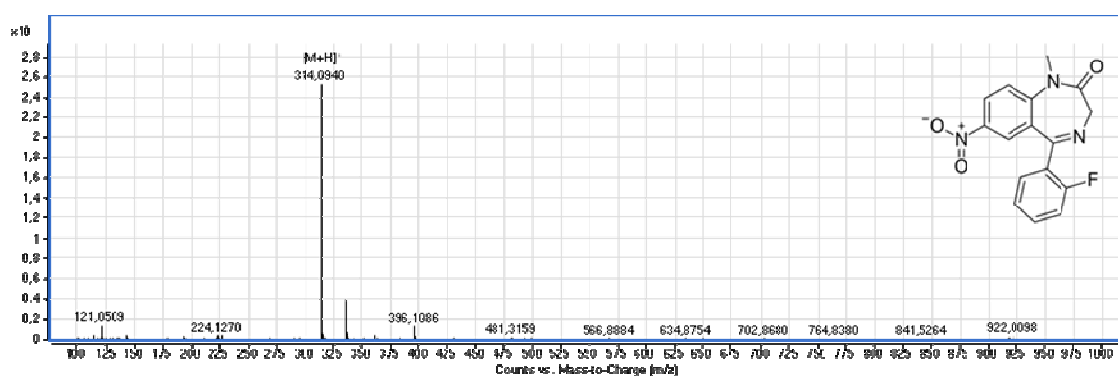


Figura 4.15. Espectro de masas de la nortriptilina.

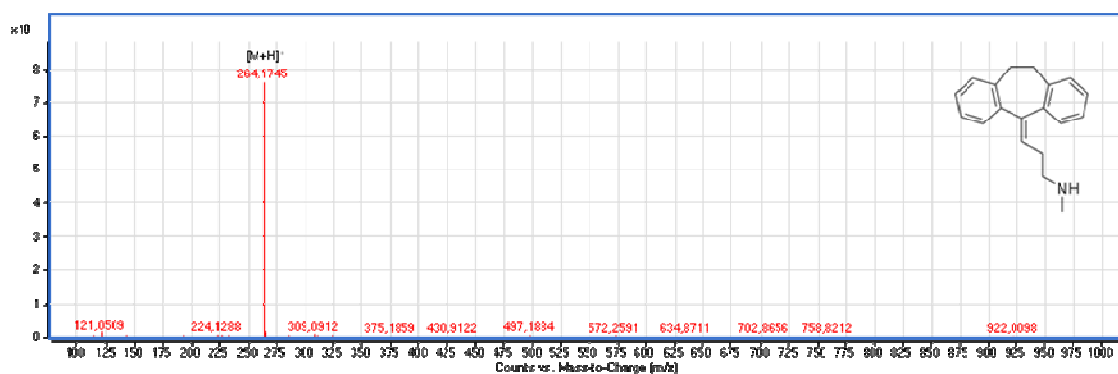


Figura 4.16. Espectro de masas del alprazolam.

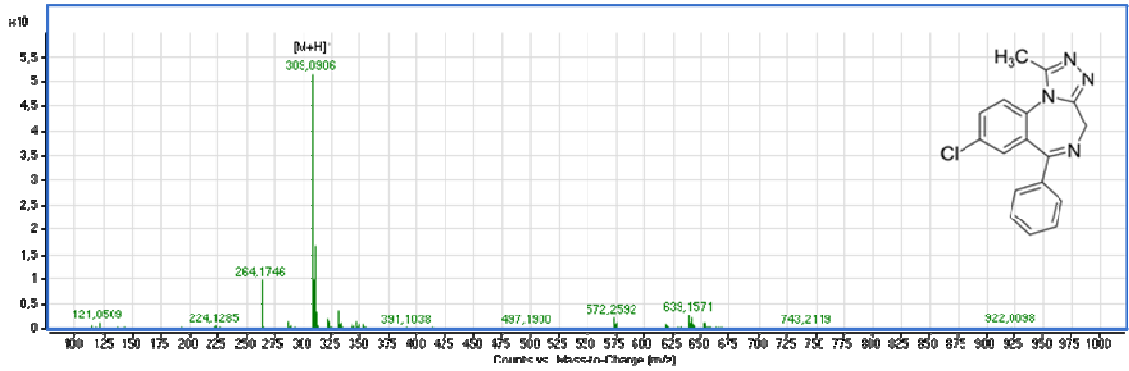


Figura 4.17. Espectro de masas del lorazepam.

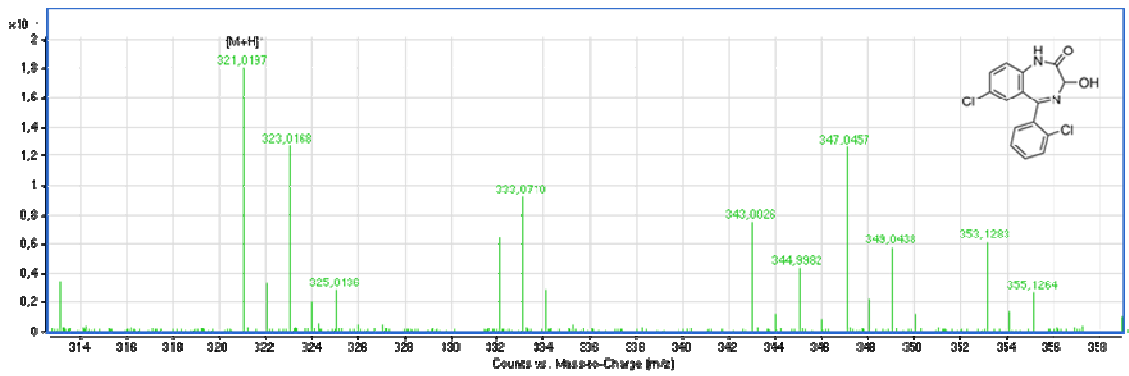


Figura 4.18. Espectro de masas del oxazepam.

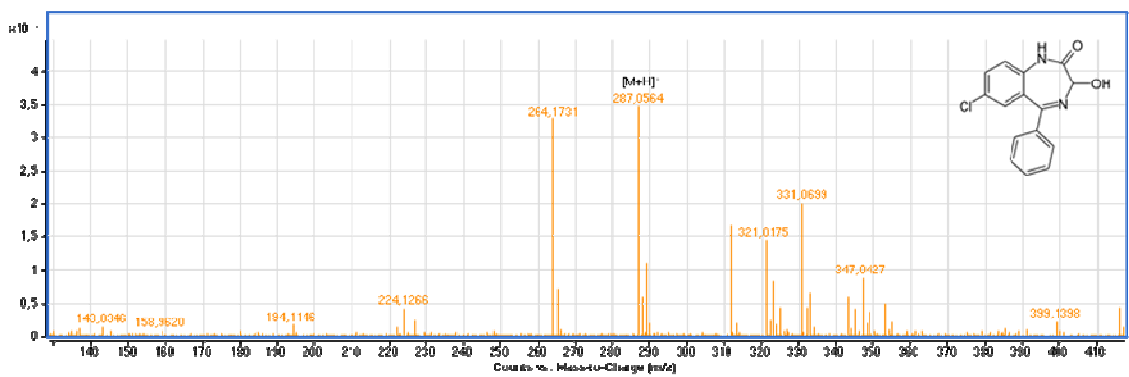


Figura 4.19. Espectro de masas de la fluoxetina.

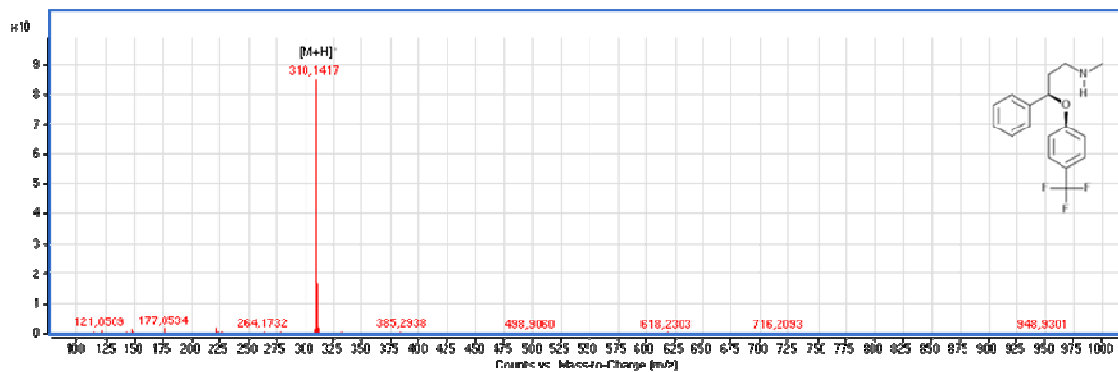


Figura 4.20. Espectro de masas de la clorpromazina.

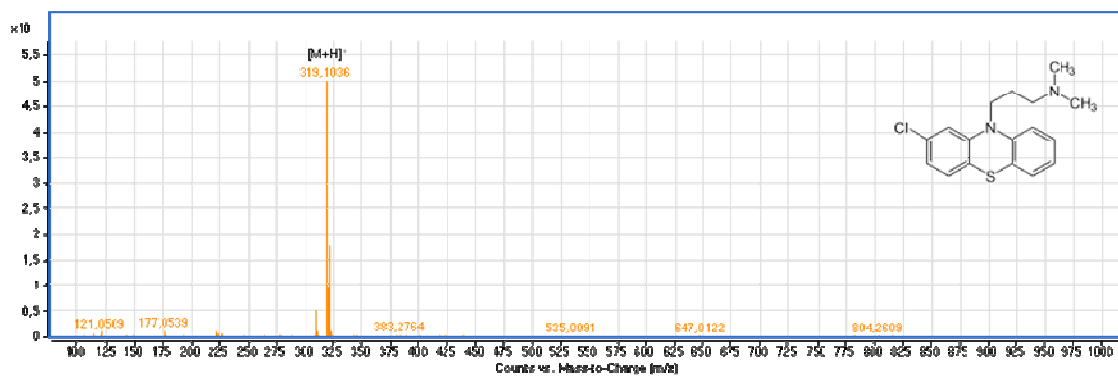


Figura 4.21. Espectro de masas del nordiazepam.

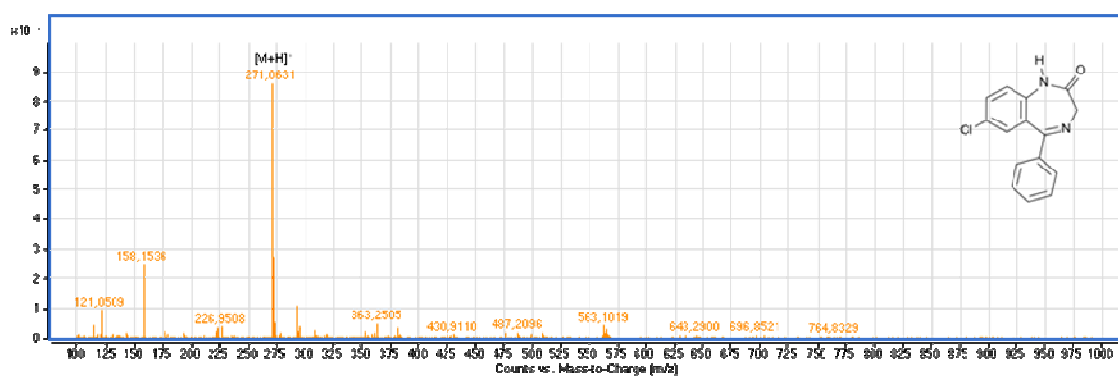
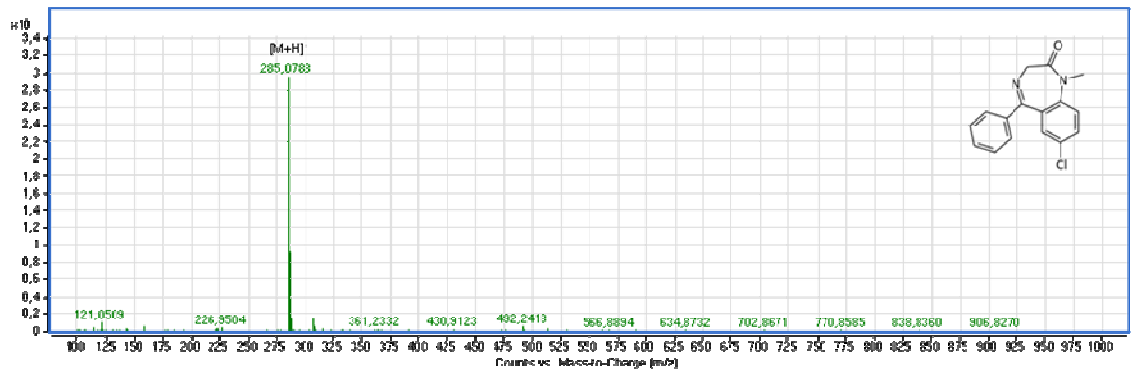


Figura 4.22. Espectro de masas del diazepam.



Anexo E. Curvas de calibración de 22 drogas relacionadas con delitos sexuales y hurtos, analizadas en orina y sangre por LC-ESI(+)-QTOF-MS.

Figura 5.1. Curva de calibración de la morfina en: (A) orina y (B) sangre.

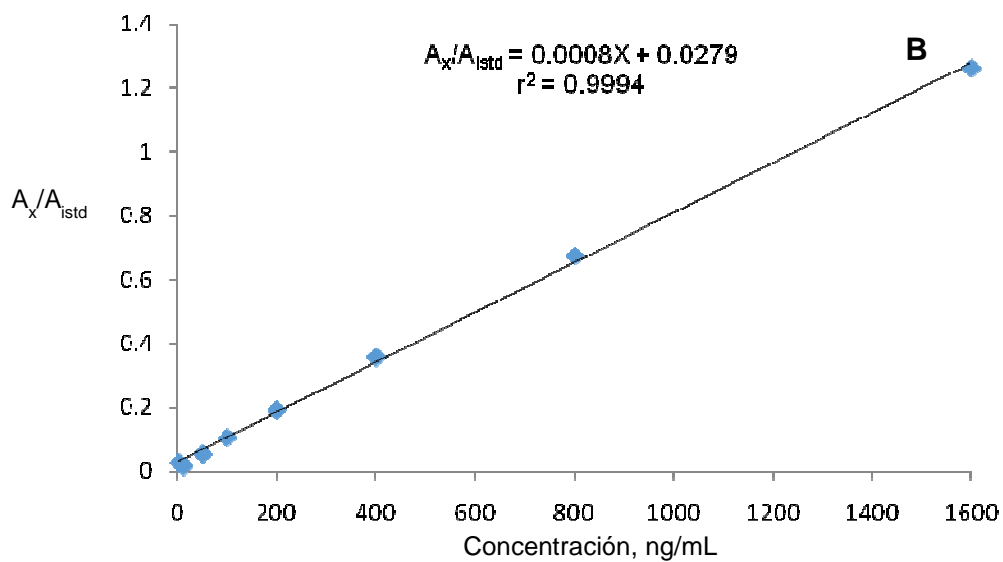
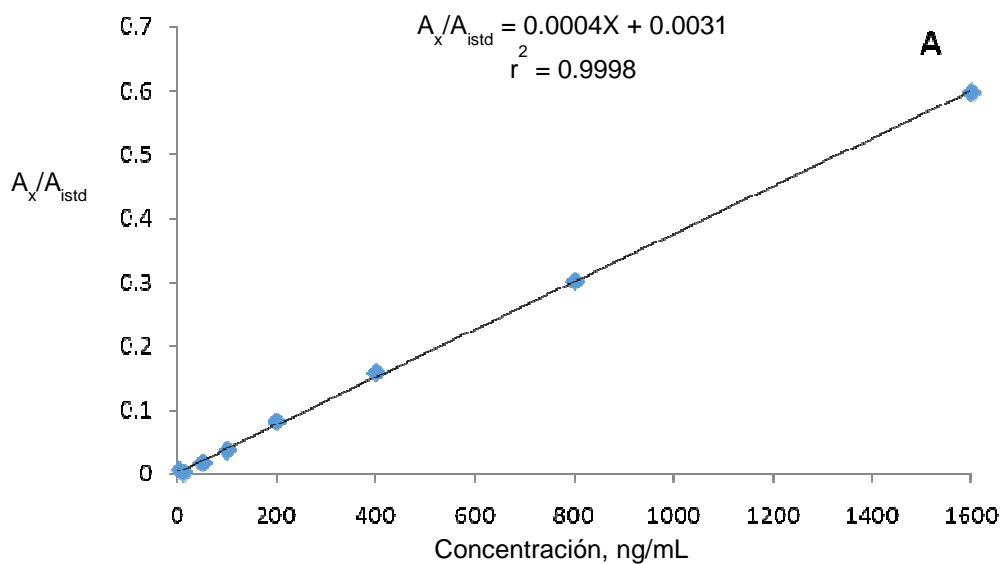


Figura 5.2. Curva de calibración de la codeína en: (A) orina y (B) sangre.

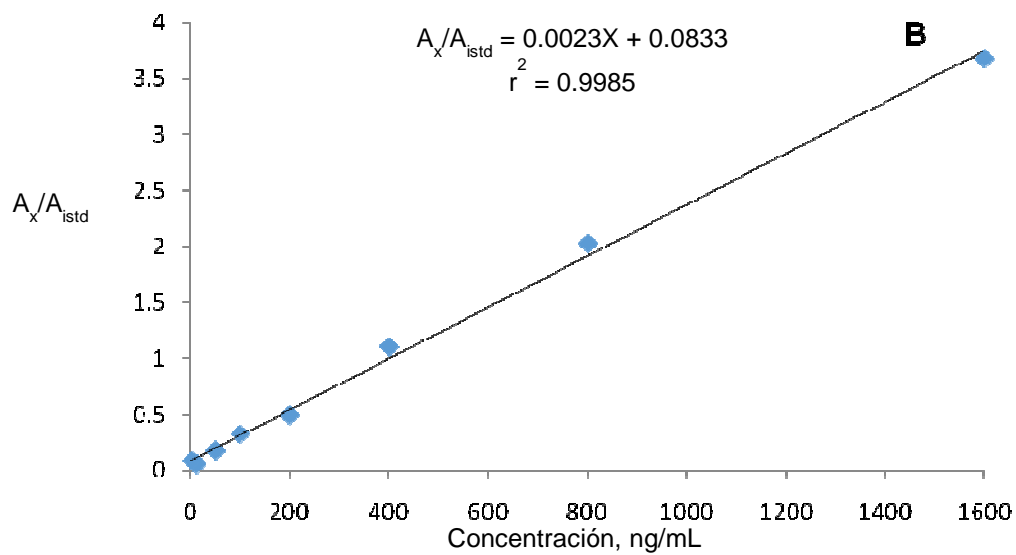
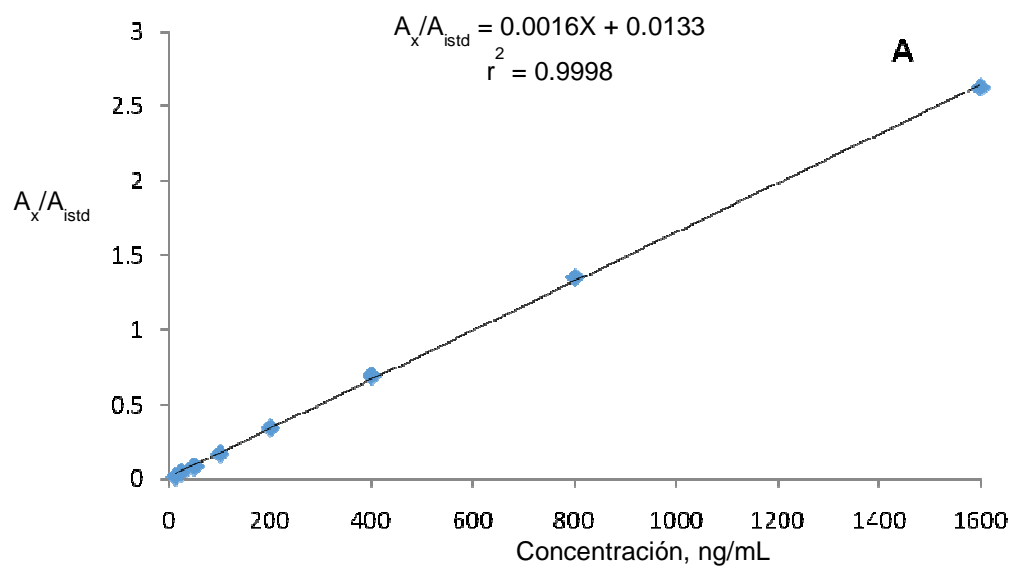


Figura 5.3. Curva de calibración de la escopolamina en: (A) orina y (B) sangre.

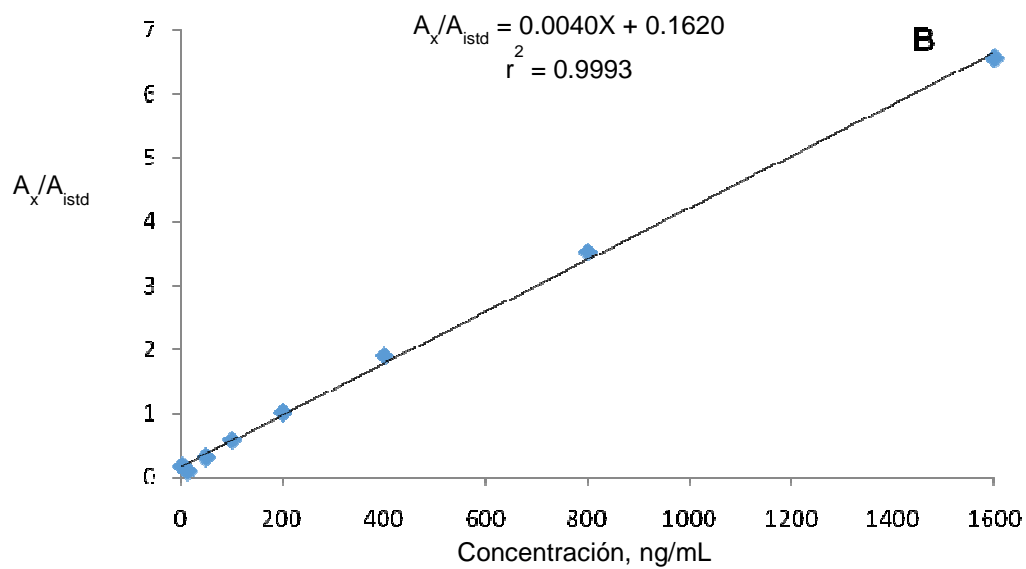
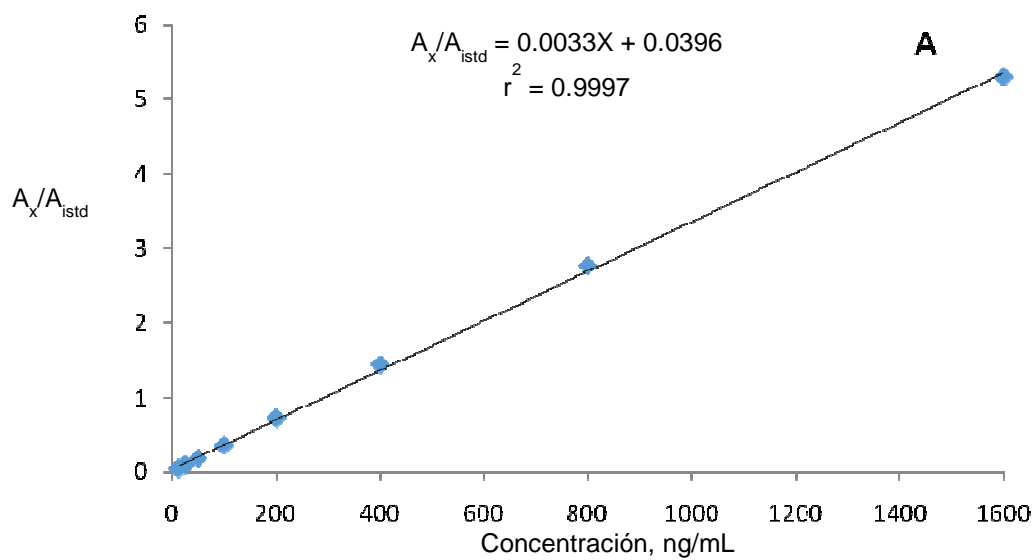


Figura 5.4. Curva de calibración de la benzoilecgonina en: (A) orina y (B) sangre.

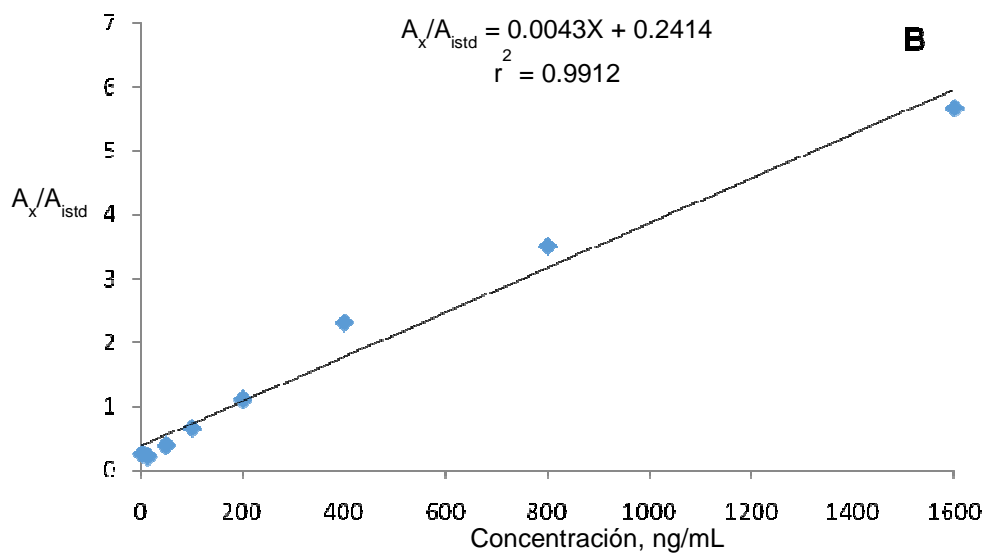
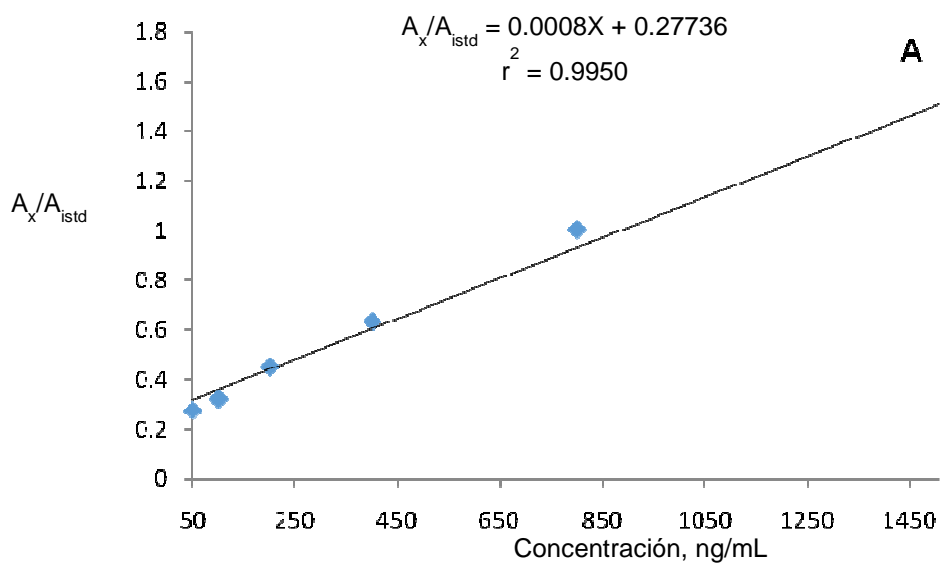


Figura 5.5. Curva de calibración de la ketamina en: (A) orina y (B) sangre.

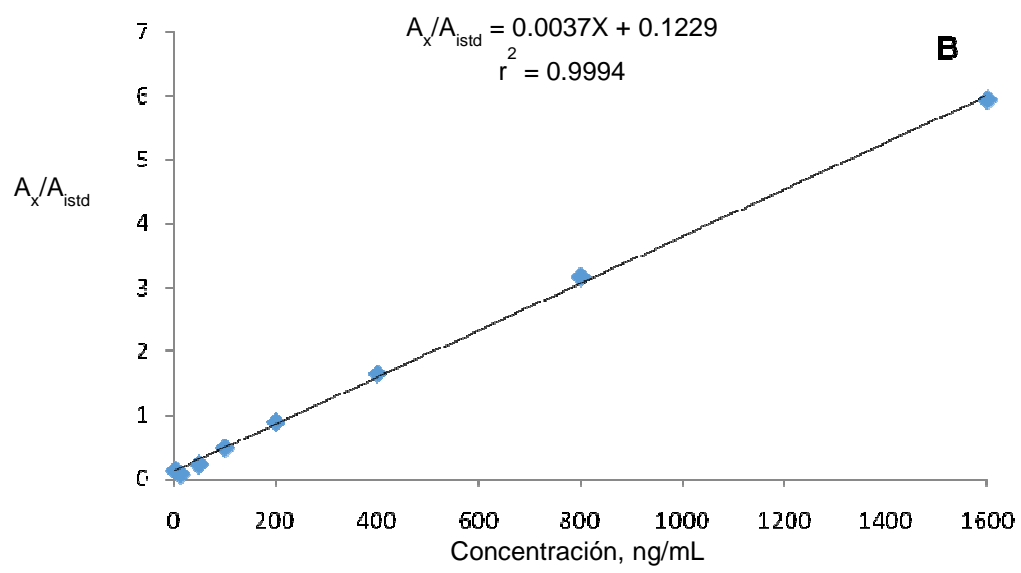
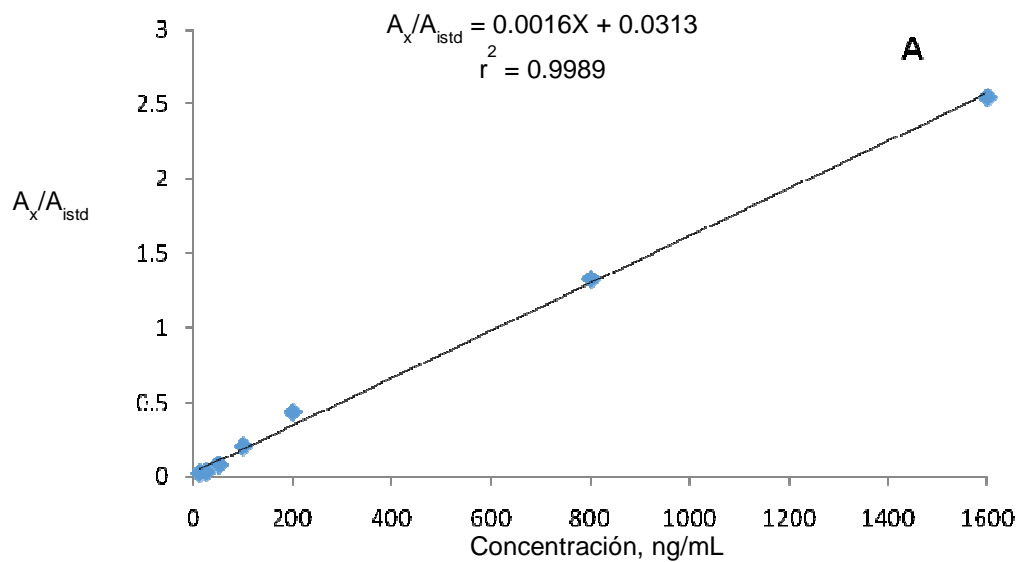


Figura 5.6. Curva de calibración de la cocaína en: (A) orina y (B) sangre.

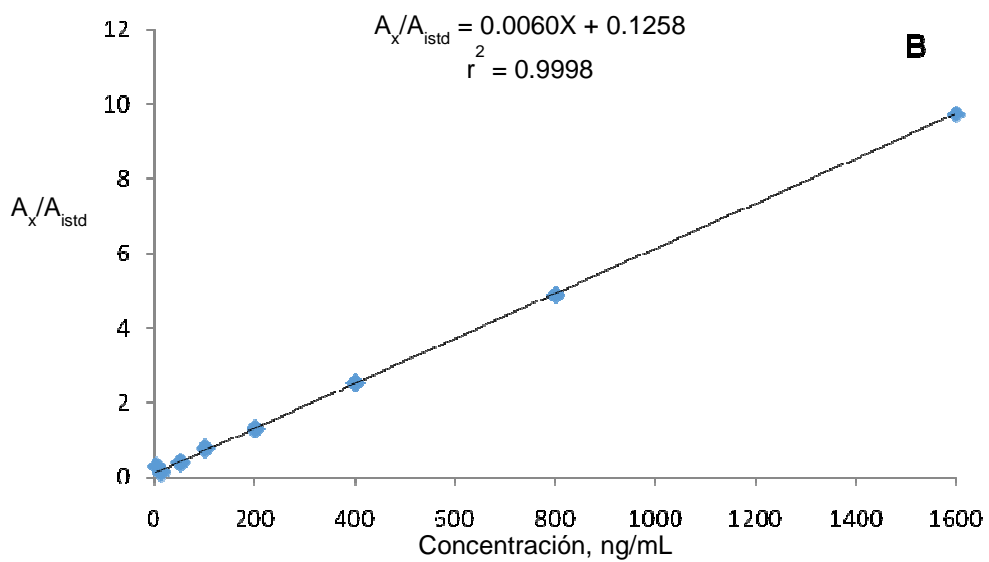
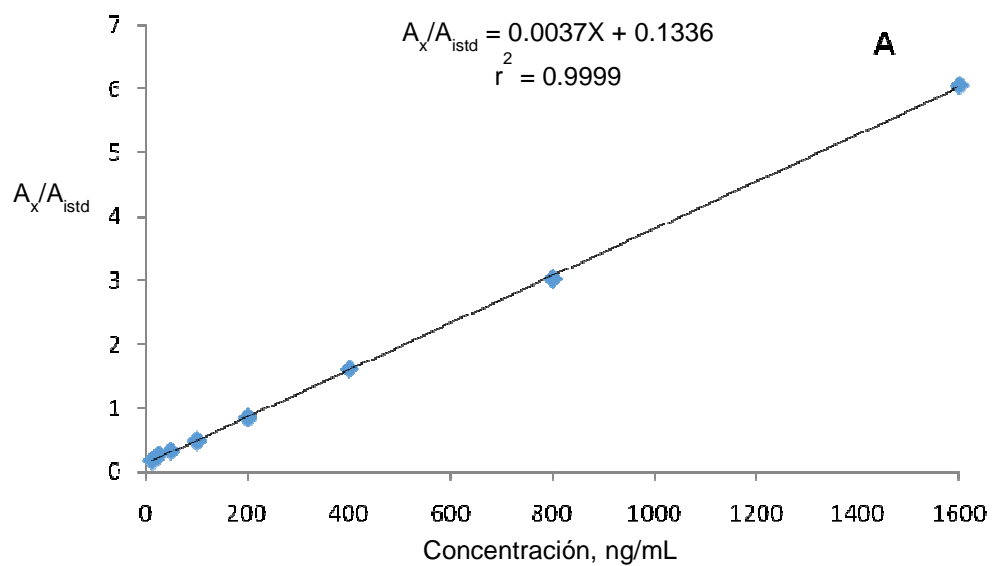


Figura 5.7. Curva de calibración de la meperidina en: (A) orina y (B) sangre.

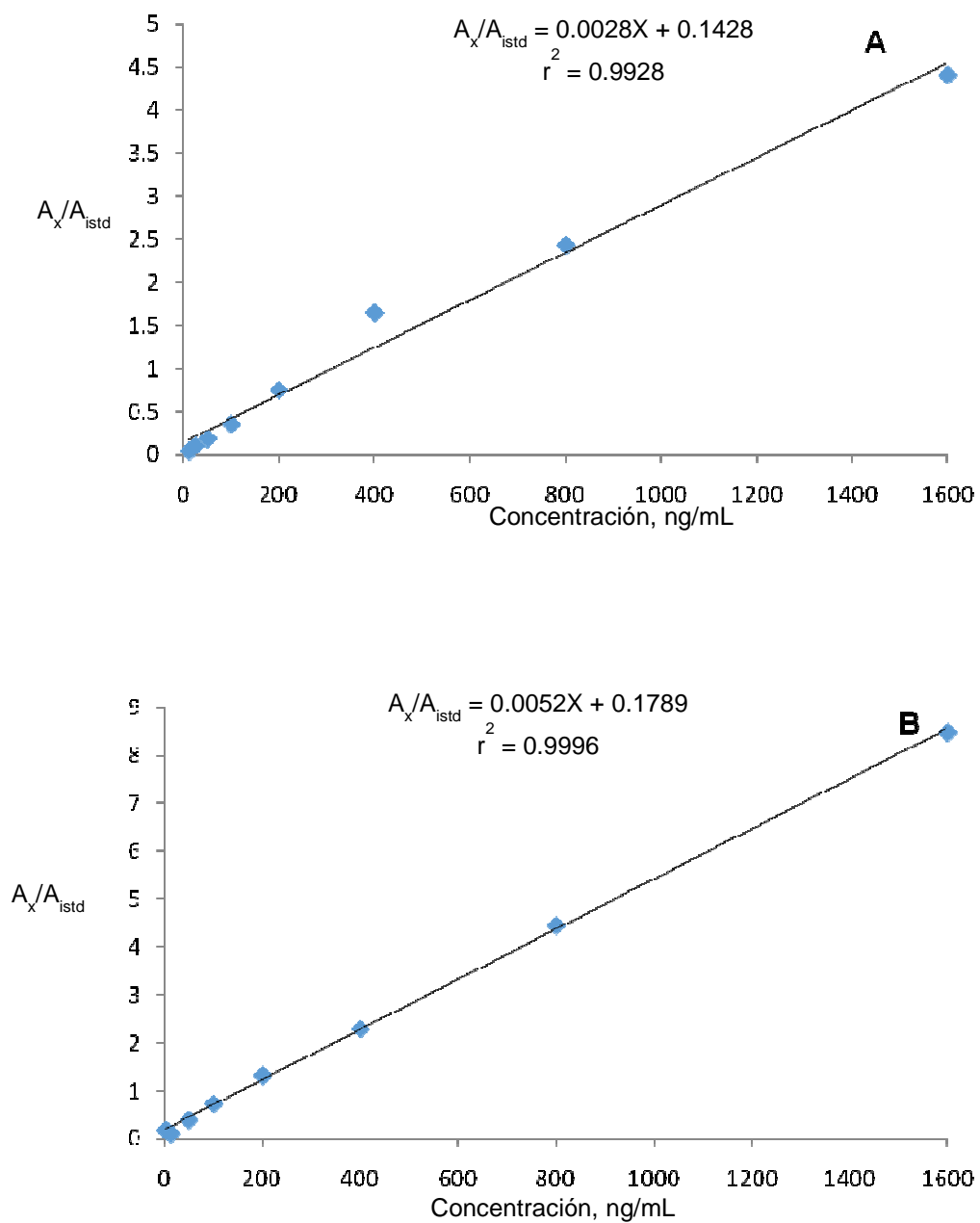


Figura 5.8. Curva de calibración de la aminoflunitrazepam en: (A) orina y (B) sangre.

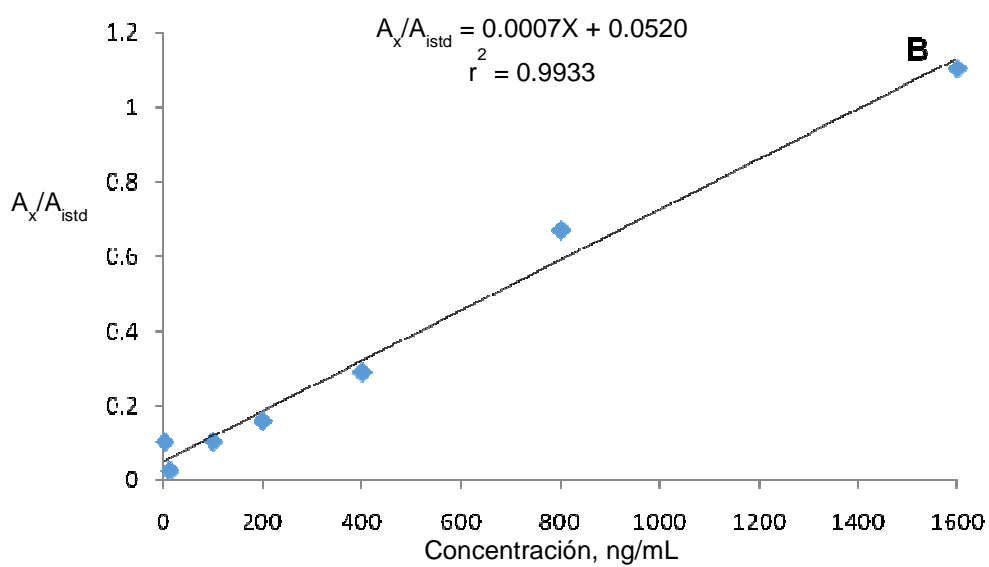
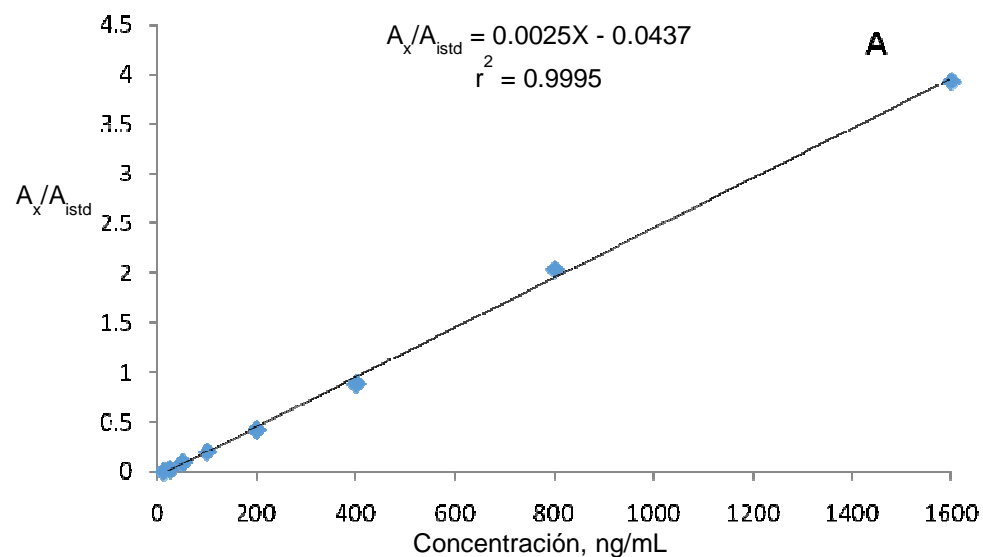


Figura 5.9. Curva de calibración de la cocaetileno en: (A) orina y (B) sangre.

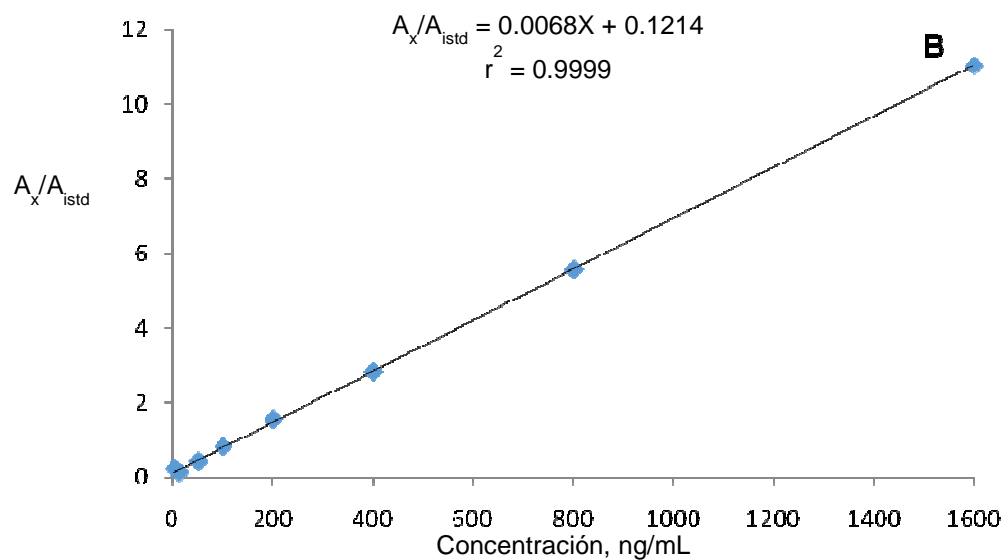
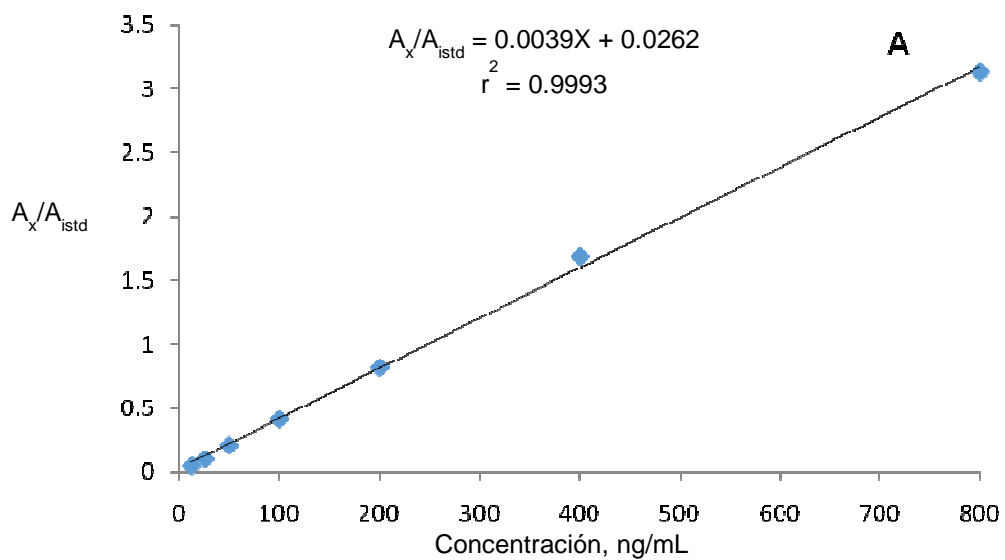


Figura 5.10. Curva de calibración de la trazodona en: (A) orina y (B) sangre.

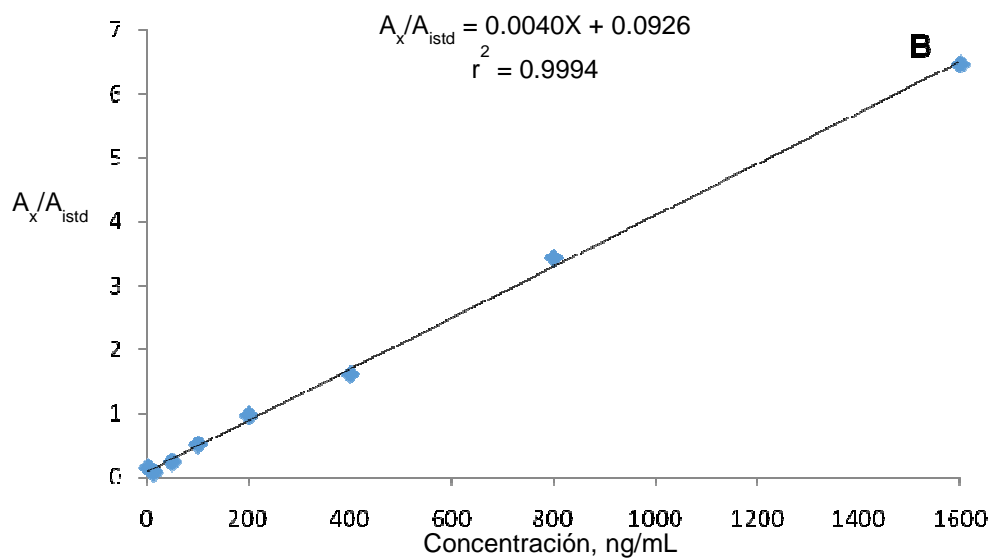
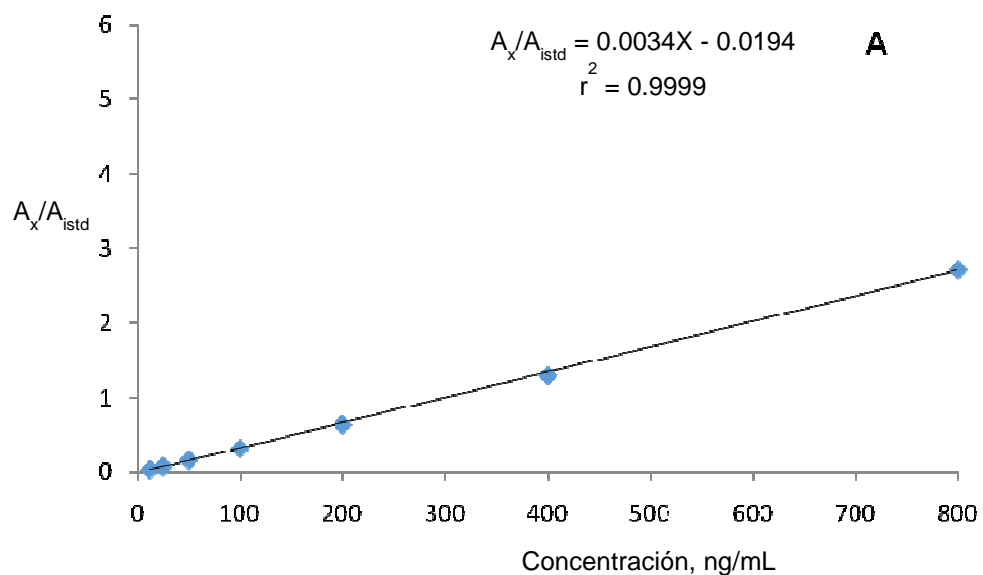


Figura 5.11. Curva de calibración de la clozapina en: (A) orina y (B) sangre.

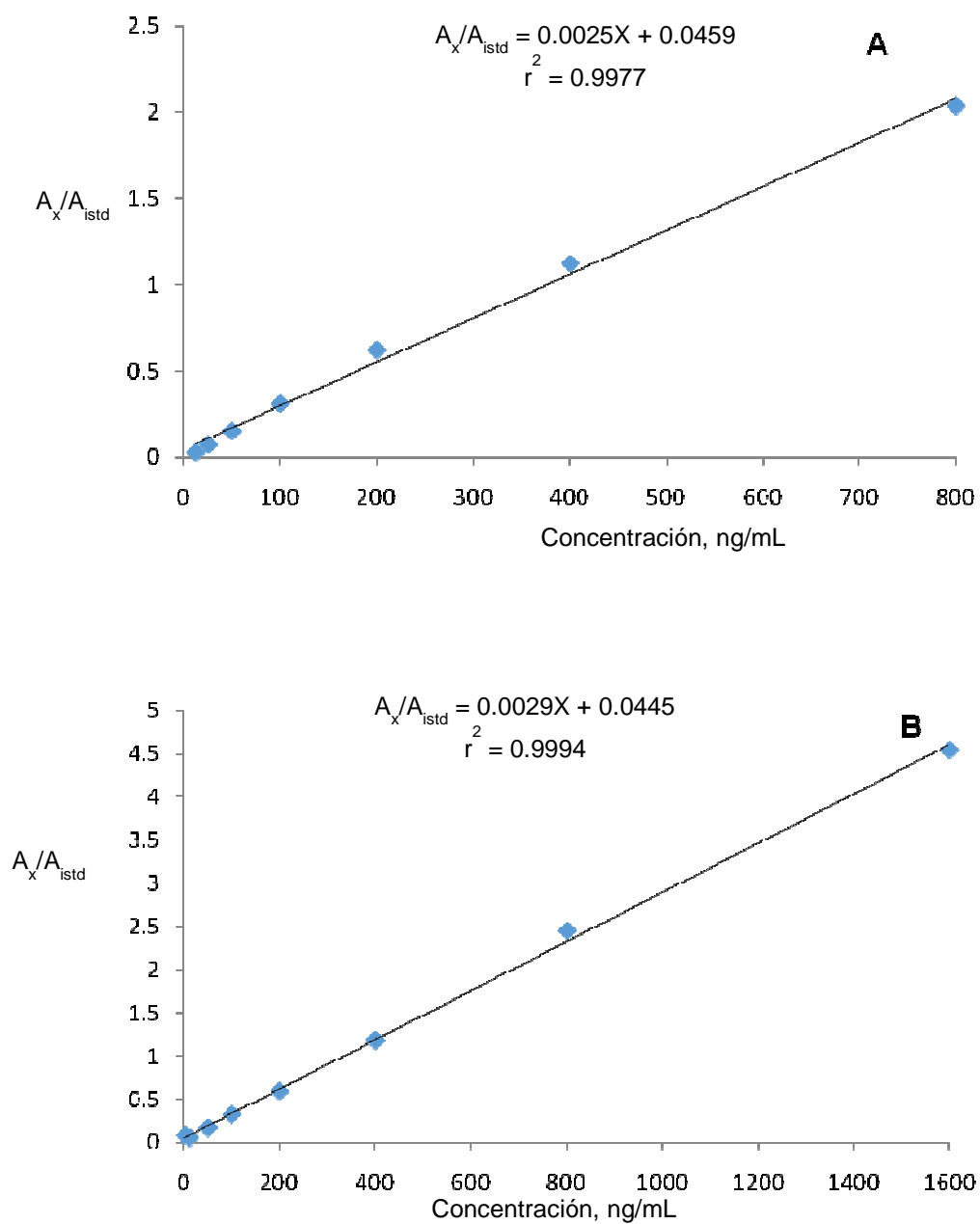


Figura 5.12 Curva de calibración de la bromazepam en: (A) orina y (B) sangre.

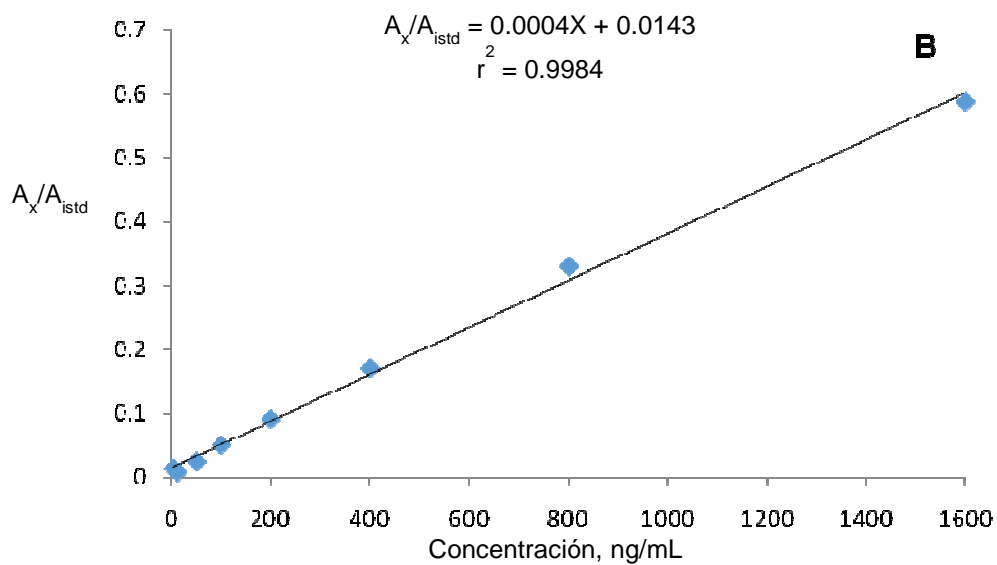
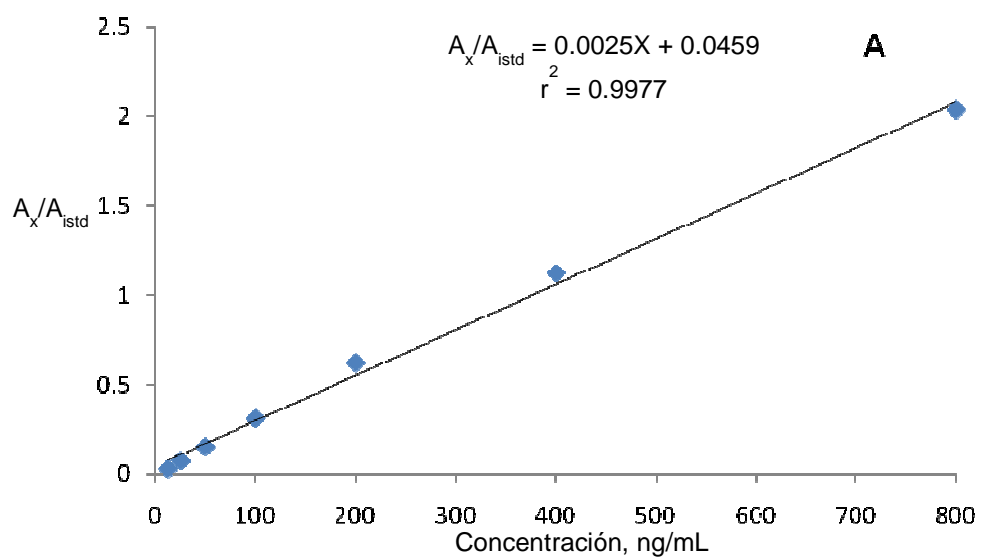


Figura 5.13 Curva de calibración de la clonazepam en: (A) orina y (B) sangre.

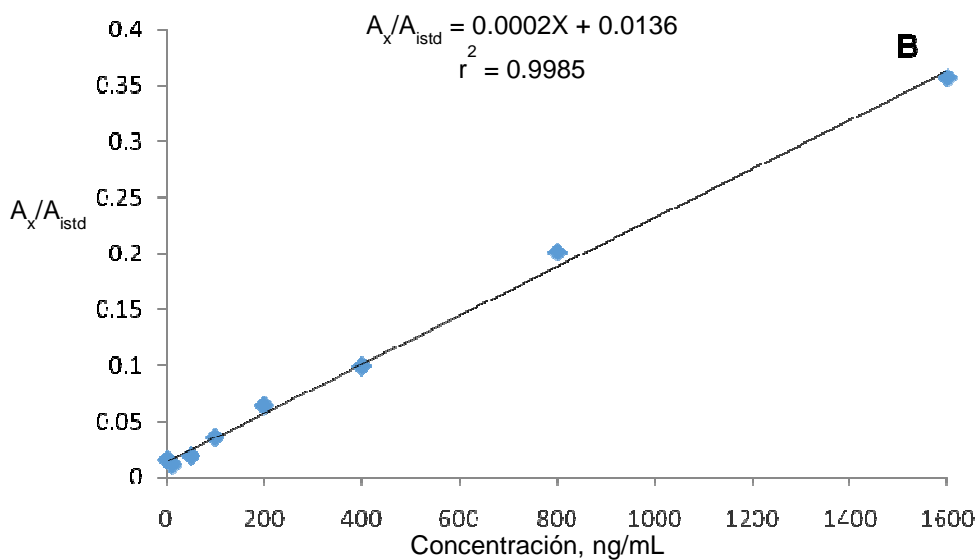
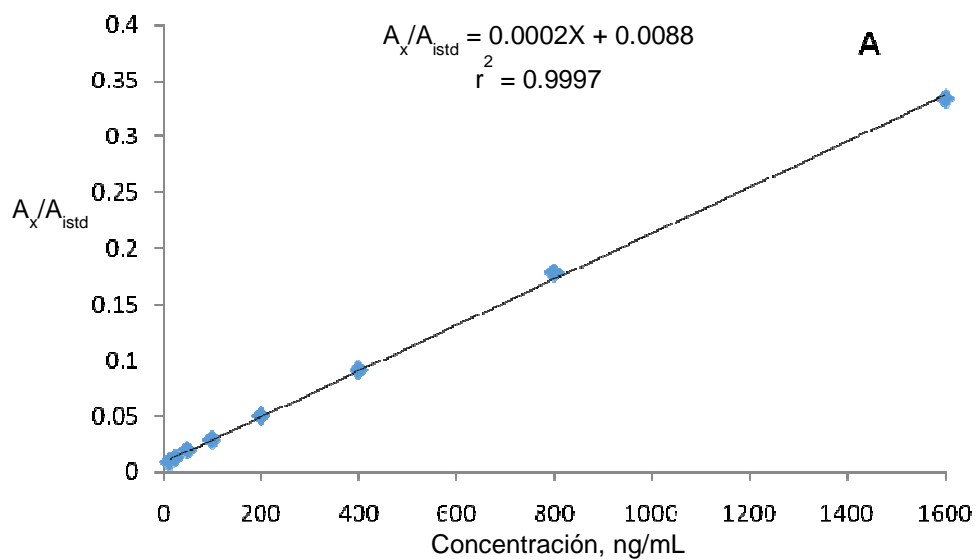


Figura 5.14 Curva de calibración de la flunitrazepam: (A) orina y (B) sangre.

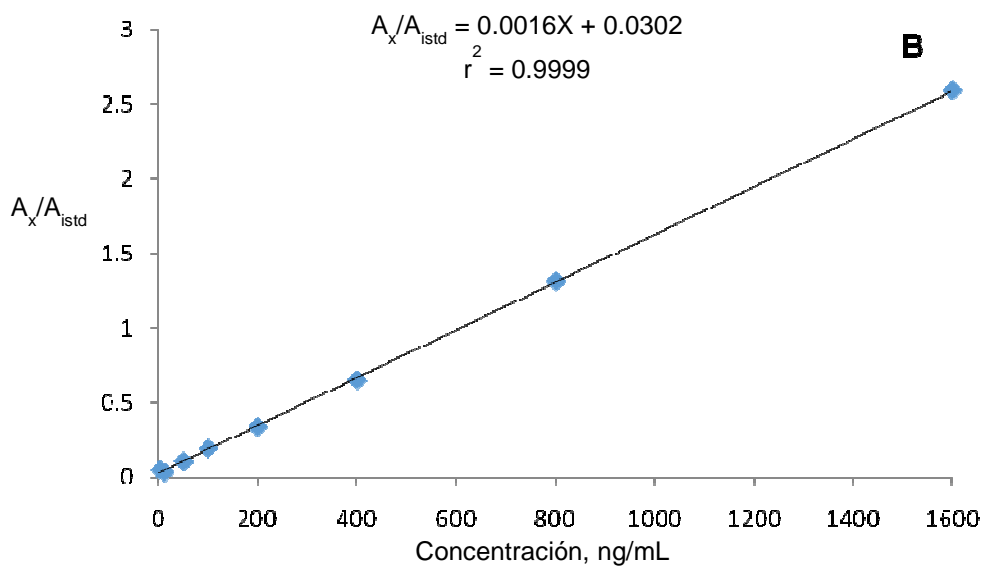
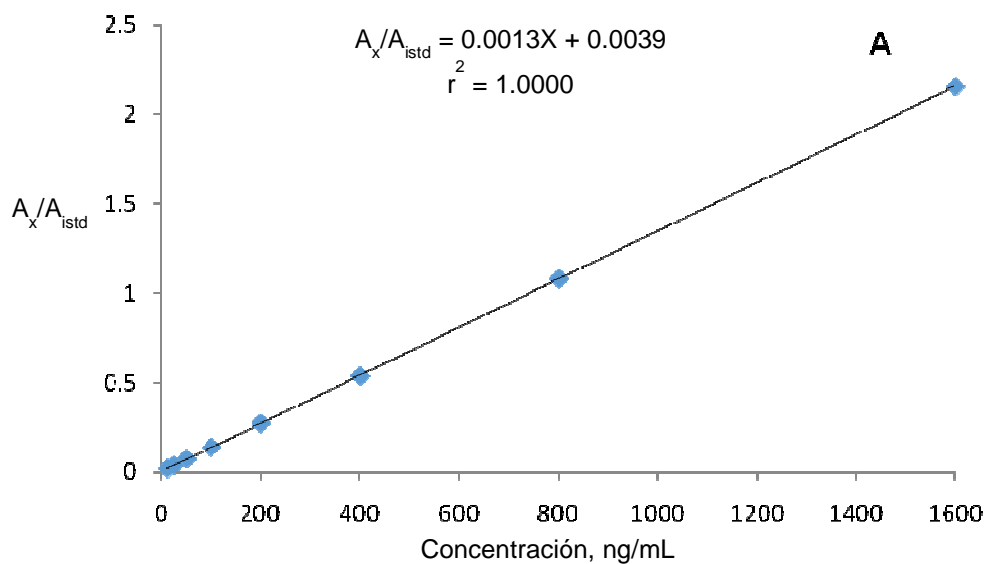


Figura 5.15 Curva de calibración de la nortriptilina: (A) orina y (B) sangre.

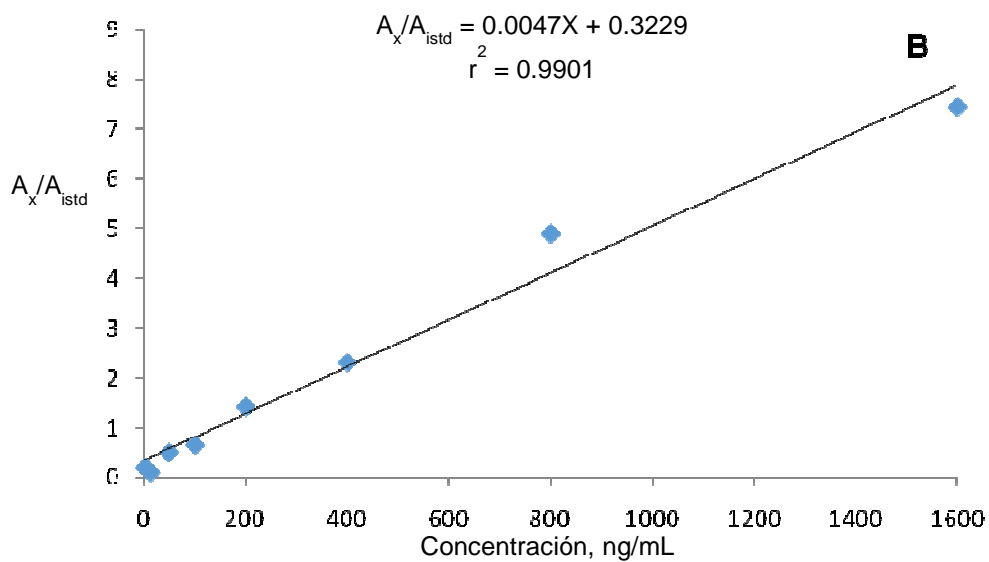
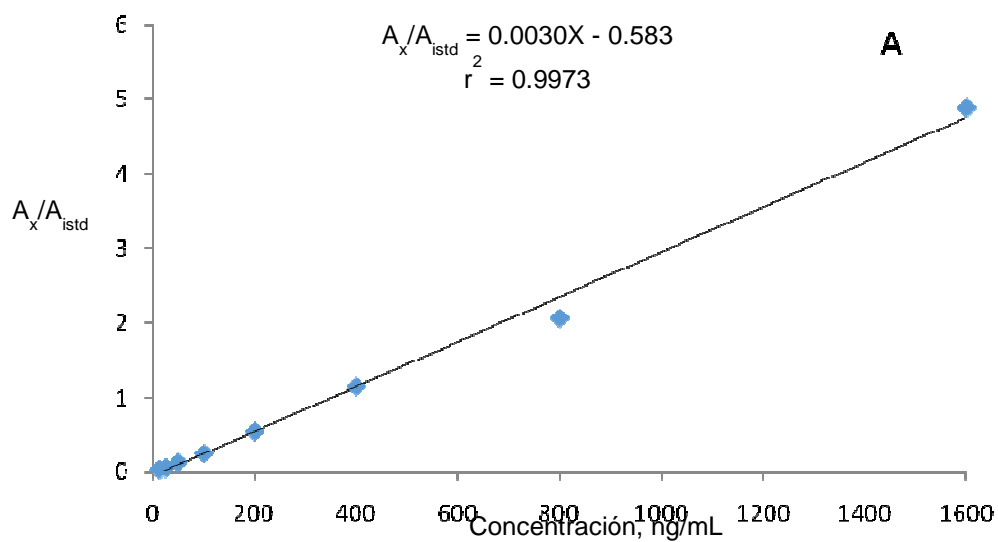


Figura 5.16 Curva de calibración de la alprazolam: (A) orina y (B) sangre.

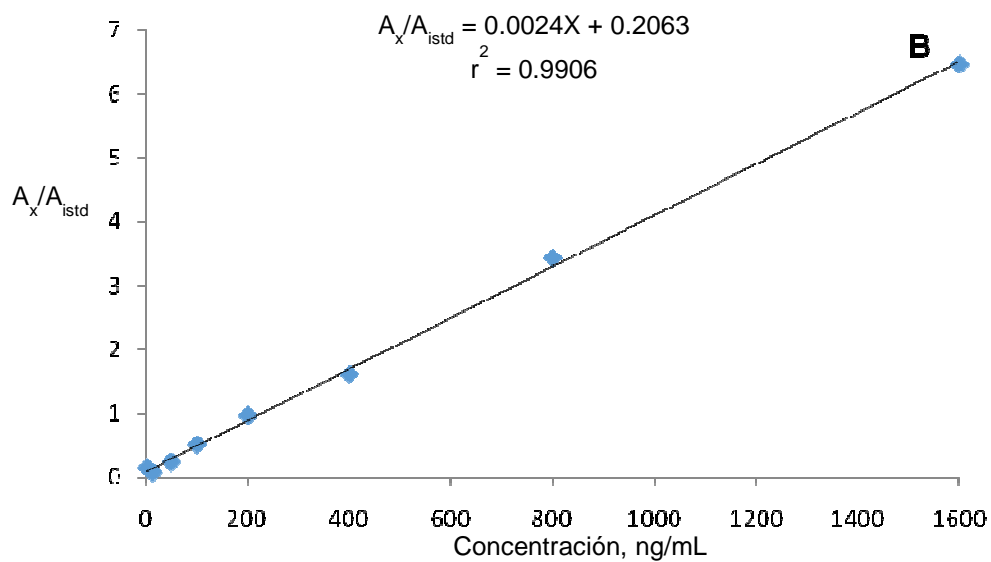
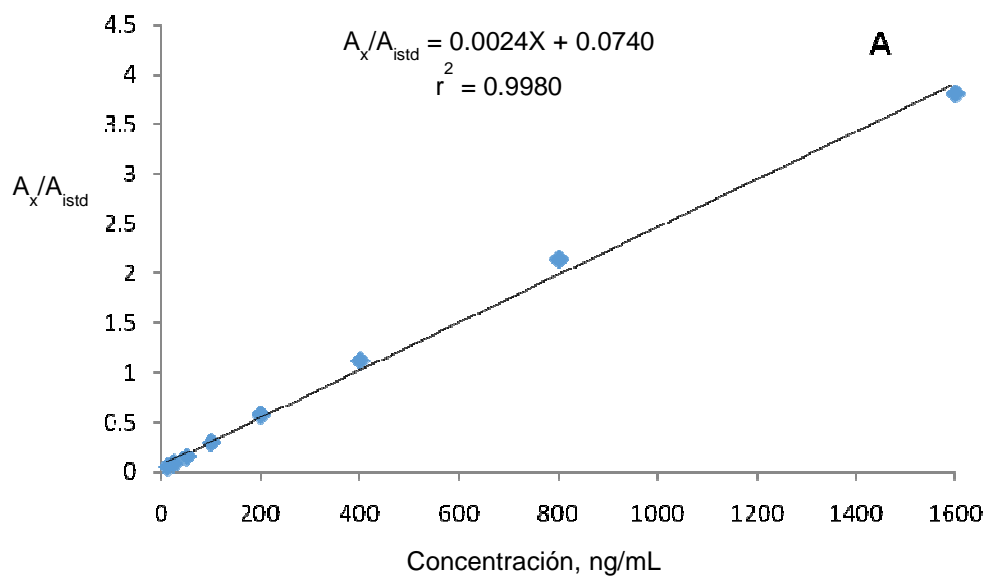


Figura 5.17 Curva de calibración de la lorazepam: (A) orina.

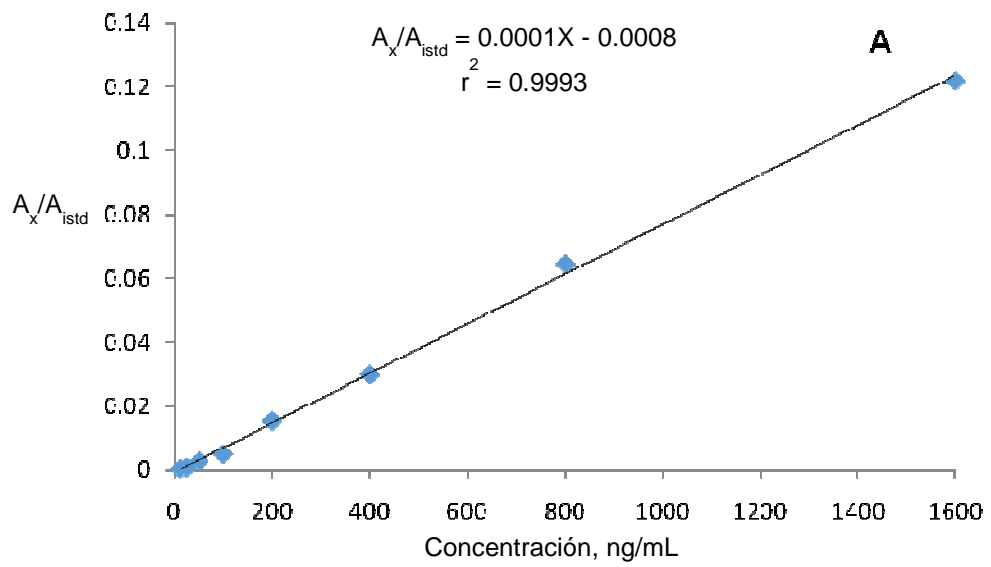


Figura 5.18 Curva de calibración de la oxazepam: (A) orina y (B) sangre.

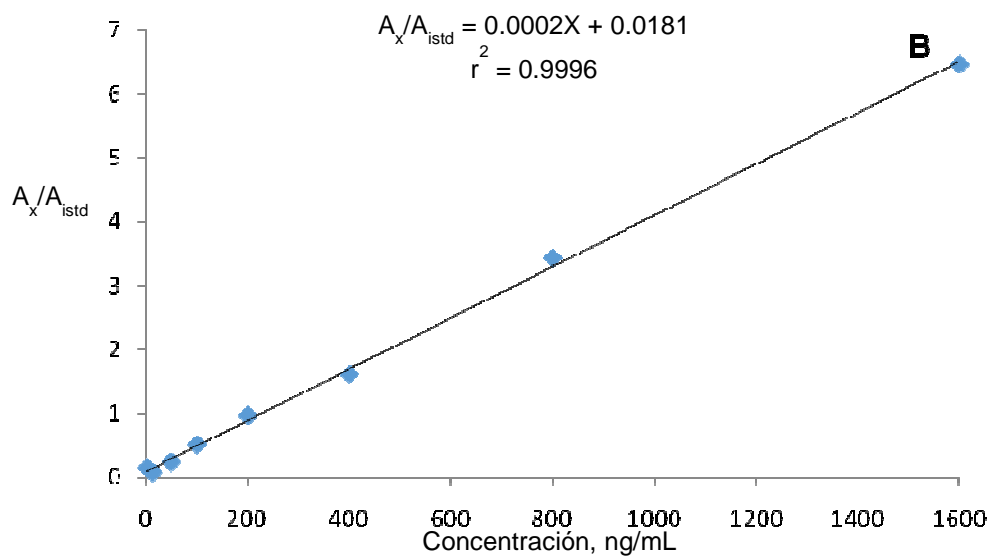
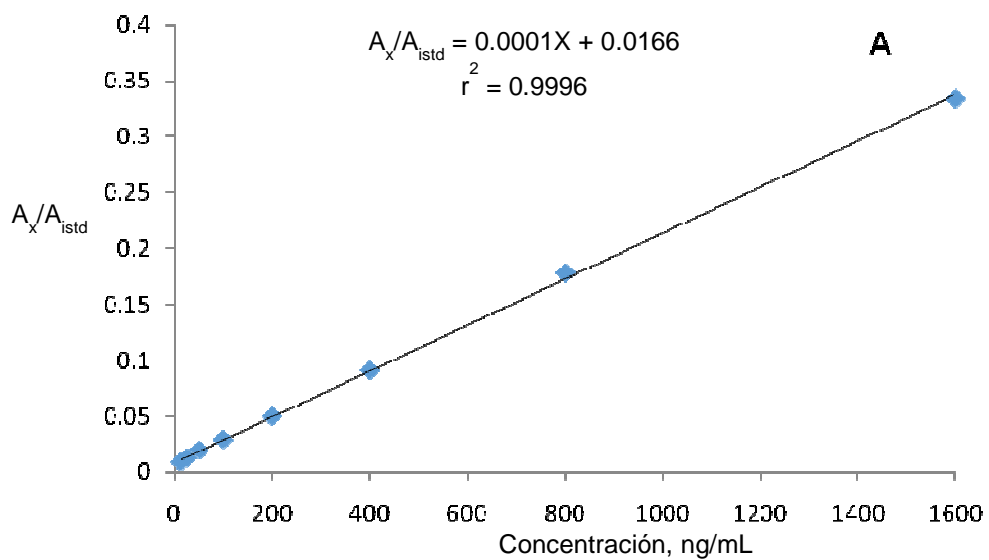


Figura 5.19 Curva de calibración de la fluoxetina: (A) orina y (B) sangre.

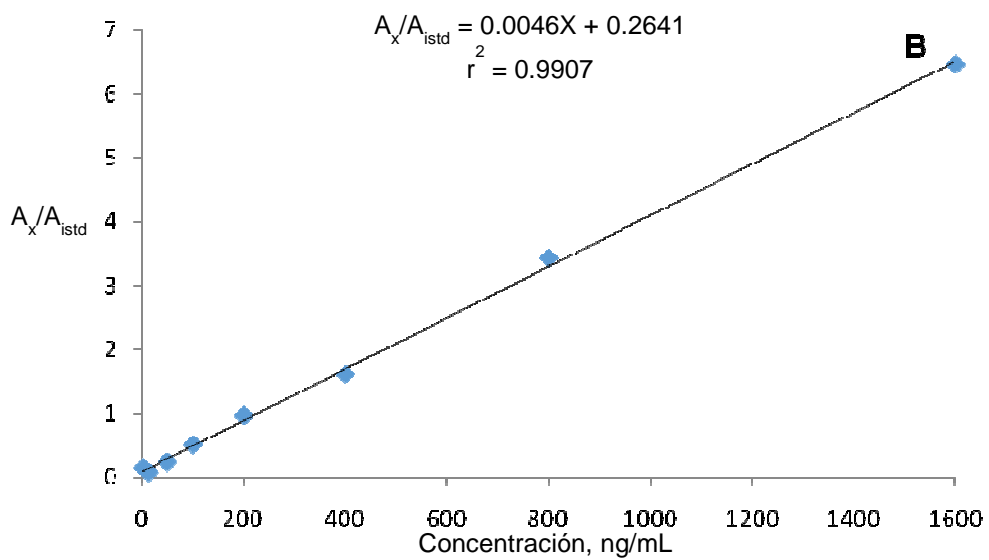
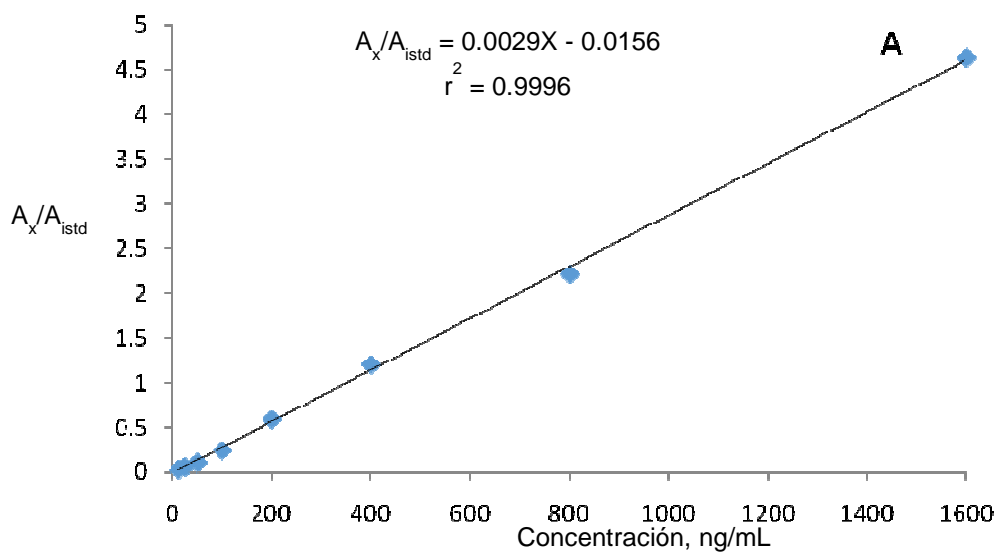


Figura 5.20 Curva de calibración de la clorpromazina: (A) orina y (B) sangre.

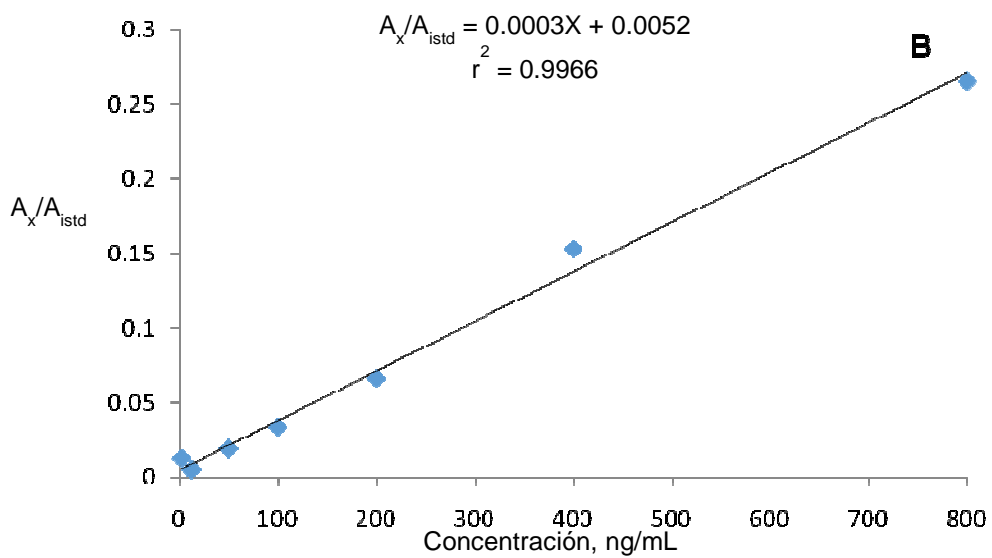
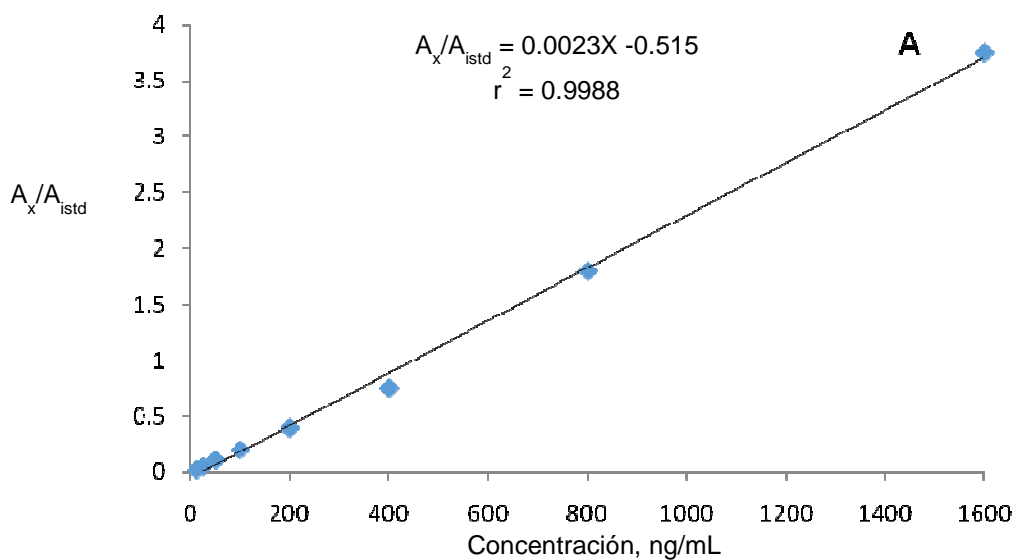


Figura 5.21 Curva de calibración de la nordiazepam: (A) orina y (B) sangre.

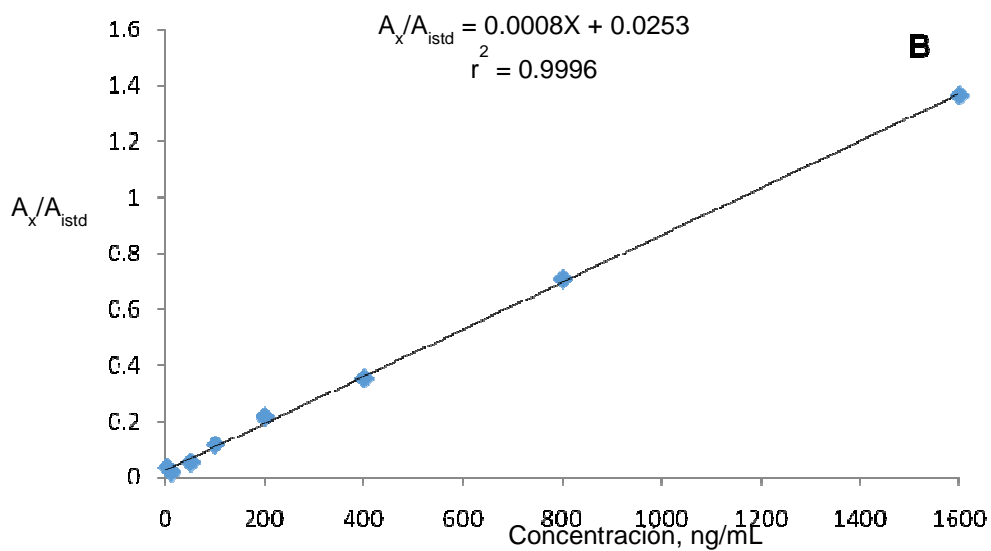
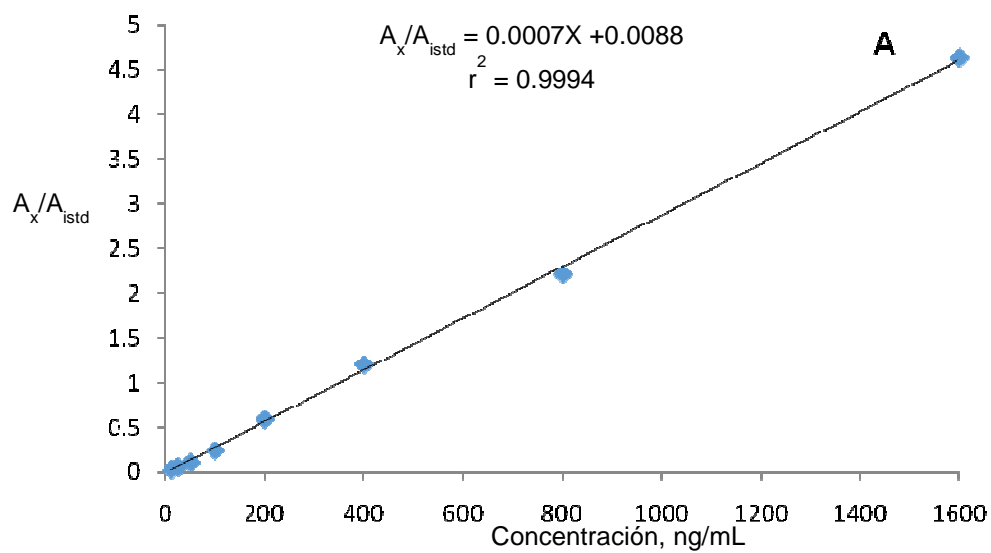


Figura 5.22 Curva de calibración de la diazepam: (A) orina y (B) sangre.

