

DETECCIÓN DE METABOLITOS DE DROGAS DE ABUSO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Ernesto Bernal Morales
P.G.J. del Estado de México



**GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO**

DEFINICIÓN DE DROGA DE ABUSO

- “Bajo el nombre genérico de *drogas de abuso* se pueden incluir una larguísima lista de sustancias químicas de diverso origen que pueden ser susceptibles de consumo con fines *no terapéuticos*”
 - Gisbert Calabuig “Medicina Legal y Toxicología Ed. Masson Barcelona 2001



CLASIFICACIÓN DE DROGAS DE ABUSO

- Alcohol etílico
- **Opiáceos**
- Inhalantes
- **Cocaína**
- **Anfetaminas y sustancias afines**
- Otros estimulantes (Café, Khat, etc.)
- **Derivados de la *Cannabis Sativa***
- Alucinógenos (PCP, LSD, etc.)
- **Hipnóticos y ansiolíticos**
- Tabaco



EFECTOS FARMACOLÓGICOS

- Compuestos psicoactivos
 - Estimulantes (cocaína, anfetaminas)
 - Depresores (alcohol etílico)
 - Narcóticos (opiáceos)
 - Alucinógenos (*Cannabis sativa*, PCP, LSD)



ÁREAS DE APLICACIÓN DE LA TOXICOLOGÍA FORENSE Y EL ANÁLISIS DE DROGAS

- Medico Legal
 - Postmortem – Causa y modo de la muerte
 - Identificar personas que manejan bajo la influencia de drogas (DUI y DUID)
 - Correccionales, fianza, etc.
- Laboral
 - Programas públicos y privados para la detección de drogas en empleados
- Deporte
 - Juegos Olímpicos, Tour de France, etc.



FUNCIONES DE LA TOXICOLOGÍA FORENSE

- Identificación de un agente lesivo
- Sustancias que produzcan una alteración psíquica pasajera o permanente
- Intoxicación como circunstancia calificadora de un delito
- Intoxicación como delito
- Intoxicación como estado peligroso



INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

- Es el conjunto de procesos analíticos que tienen por objeto el aislamiento, identificación y determinación cualitativa o cuantitativa de los tóxicos tanto en vivo como en el cadáver, con el fin de permitir el diagnóstico de intoxicación y el esclarecimiento de los hechos.



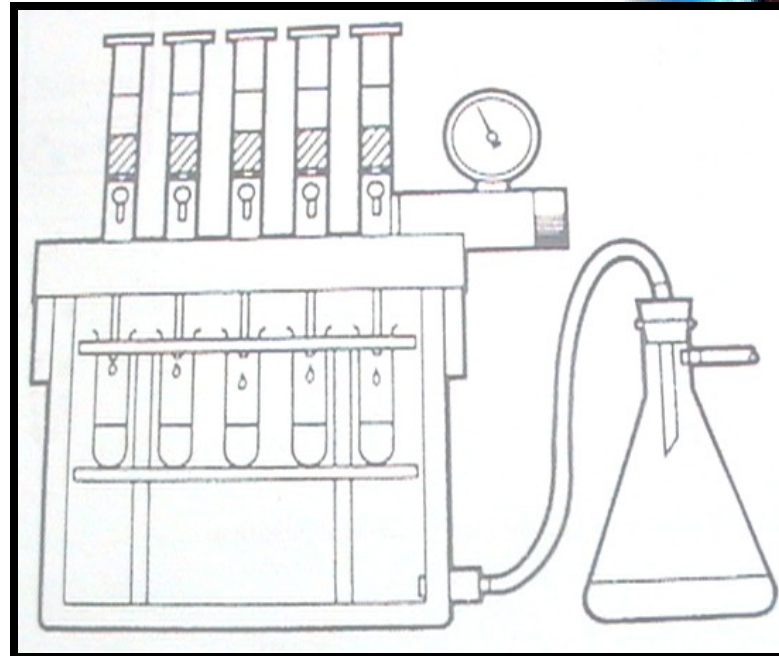
RECOMENDACIONES PARA LA INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA FORENSE (ORFILA)

- Todo los analistas deben de tener experiencia en Toxicología.
- El analista debe de recibir la historia completa del caso con toda la información disponible.
- Todas las evidencias correctamente etiquetadas y selladas en recipiente limpios deben ser remitidas y analizadas.
- Todas las pruebas analíticas deben ser aplicadas.
- Los reactivos tendrán que ser puros y tendrán que correrse siempre blancos.
- El análisis debe de hacerse por duplicado.



PASOS DE LA INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

- Información
- Toma de Muestra
- Procesamiento de la muestra
 - Aislamiento, Concentración
 - Hidrólisis, digestión, desproteinización, etc.
- Diferenciación y detección
- Identificación
 - Comparación datos encontrados con bases de datos de referencia
- Cuantificación
- Interpretación de los resultados

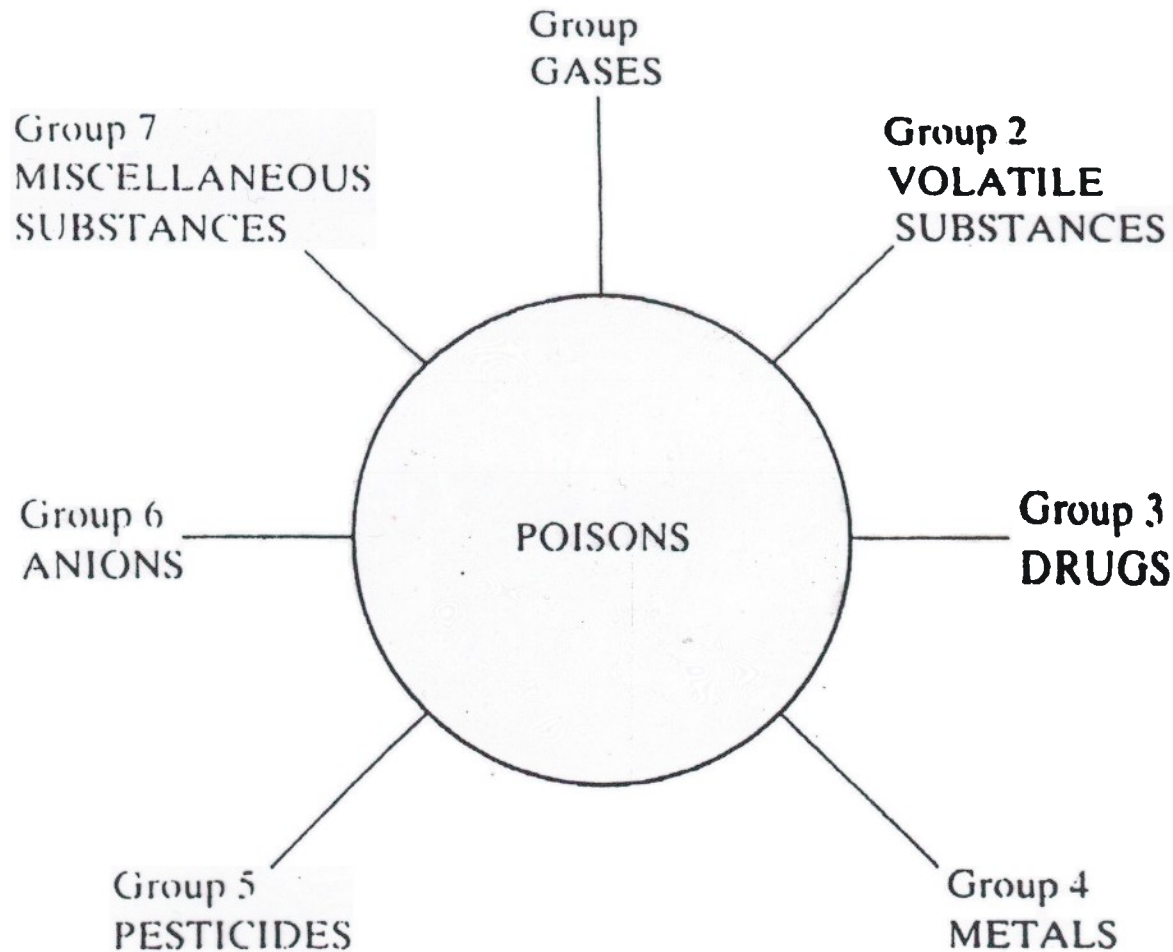


INFORMACIÓN QUE DEBE SER ENVIADA AL ANALISTA FORENSE

- Nombre, edad, sexo, peso, nacionalidad, ocupación
- Historia Clínica (Drogas prescritas, adicciones, sospechas)
- ¿Cuándo fue vista por última vez la víctima? ¿Dónde fue encontrada? Si estaba enferma ¿Desde cuándo?
- Datos sobre tratamiento médico, análisis previos hechos
- Síntomas
- Declaración de testigo de los hechos y Testigos de identidad.
- Descripción de la escena del crimen
- Necropsia



CLASIFICACIÓN DE TÓXICOS



“Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons”, ed. AC Moffat, MD Osselton, B. Widdop
Pharmaceutical Press London (2004).

ANÁLISIS DE DROGAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

- El análisis es posible en todas las muestras biológicas
- Diferentes muestras biológicas dan diferente información
- Interrelación entre las muestras
- Ventanas de Detección



ESPECÍMENES PARA BÚSQUEDA DE DROGAS

○ Vivos

- Sangre*
- Orina
- Fluido Oral
- Pelo
- Sudor
- Aliento

○ Muertos

- Sangre
- Orina
- Humor Vítreo
- Tejidos




Muestra		Cantidad		Comentarios
		SOFT/ AAFS	Tox.Rev.2005,24 (1): 63-71	
Sangre total	Periférica	10 ml	2 x 5 ml (sellada)*	Vena Femoral c/preservativo
	Corazón	25 ml	10 - 30 ml	Ventrículo derecho o vena cava inferior.S/ Preservativo
Orina		Toda	5 ml (sellada)	C/preservativo
			20 - 50 ml	S/preservativo
Contenido Gástrico		Todo	25 - 50 ml	S/preservativo
Humor vítreo		Todo	Ambos ojos (sellado)	C/preservativo
Bilis		Toda	10 ml	C/preservativo
Vísceras	Hígado	50 g	10 - 20 g	Lóbulo derecho (Hígado), s/formol, en recipientes de vidrio por separado.
	Riñón			
	Cerebro			
Pelo			Mechón ancho de un lápiz	Región occipital. Desde la base indicar punta

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE DIFERENTES MUESTRAS

Muestra	Ventajas	Desventajas
Sangre (Total /Suero/plasma)	Detecta Droga, análisis cuantitativo	Volumen reducido, bajas concentraciones, droga padre y metabolitos
Orina	Volumen elevado, altas concentraciones	No siempre disponible, metabolitos, análisis cuantitativo no siempre útil
Contenido Gástrico	Altas concentraciones	Muestra variable, No siempre útil
Pelo y uñas	Siempre disponible	Requiere alta sensibilidad, exposición de semanas a meses
Humor Vítreo	Putrefacción limitada	Volumen limitado
Vísceras	Altas	Análisis cuantitativo difícil de

DIFICULTAD DEL ANÁLISIS QUÍMICO DE ESPECIMENES BIOLÓGICOS

		º de Fluidéz	Muestra
-		Líquido	Líquido Cefalorraquídeo
			Lagrimas
			Saliva
			Orina
			Bilis
		Mixto	Plasma
			Suero
			Sangre
		Sólidos	Cerebro
			Corazón, riñón, hígado
	Pulmón, músculo		
+		Hueso	



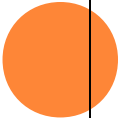
APROXIMACIONES AL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

- Enfocado
 - A una droga en particular
- Limitado
 - A una familia de Drogas
- Comprensivo
 - Una gran cantidad de drogas



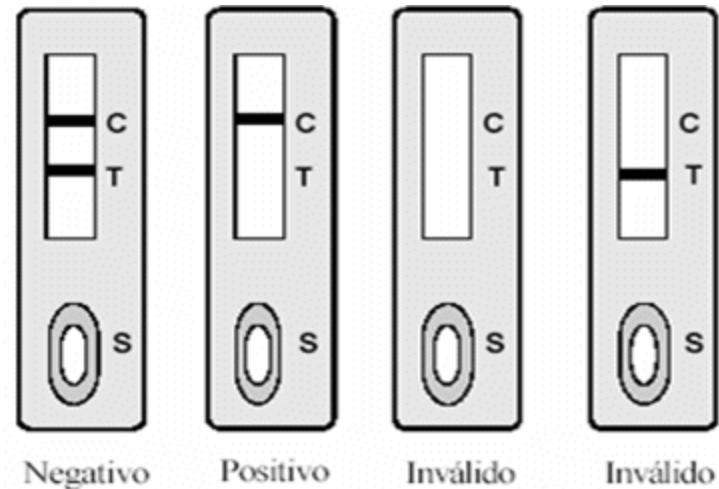
MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO

Presuntivas	Confirmación
<p>Inmunoensayos enzimáticos (EIA)</p> <p>Inmunoensayo por fluorescencia polarizada (FPIA)</p> <p>Radioinmunoanálisis (RIA)</p> <p>Cromatografía de capa fina (CCF)</p>	<p>Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas (CL-EM)</p> <p>Cromatografía de gases - Espectrometría de masas (CG-EM)</p> <p>Electroforesis Capilar- Espectrometría de masas (EC-EM)</p>



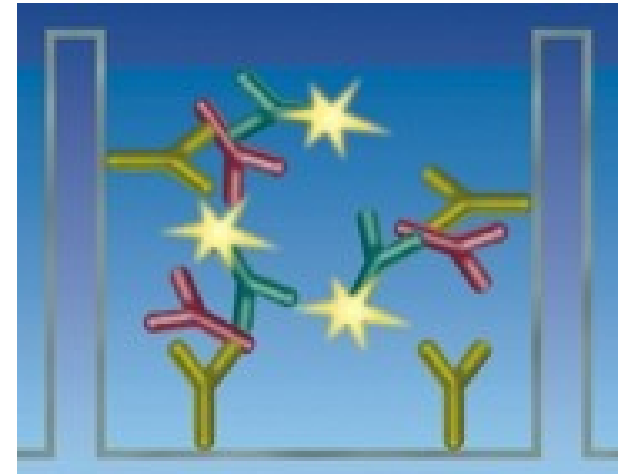
MÉTODOS PRESUNTIVOS

- Análisis inicial “Screening”
 - Identificar muestras negativas
 - Selectivos a familias de drogas
 - Sensibles
 - Rápidos
 - Barato
-
- Negativo es negativo
 - Positivo necesita confirmarse
-
- **Inmunoensayos**
 - **Cromatografía en capa fina**

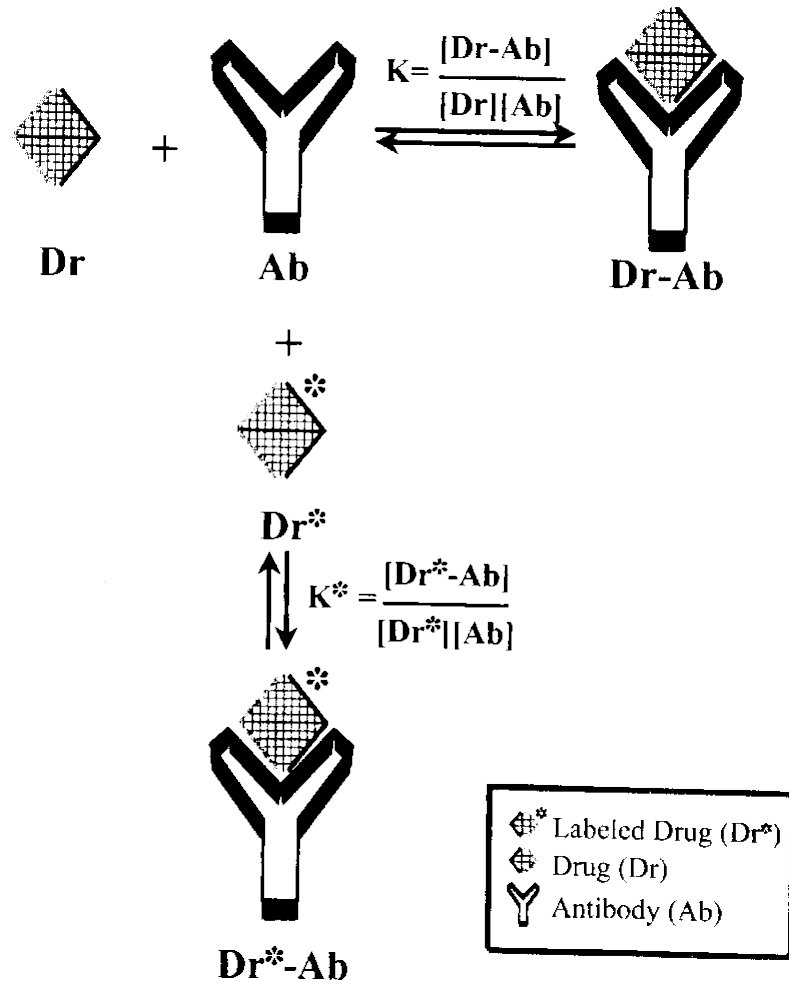


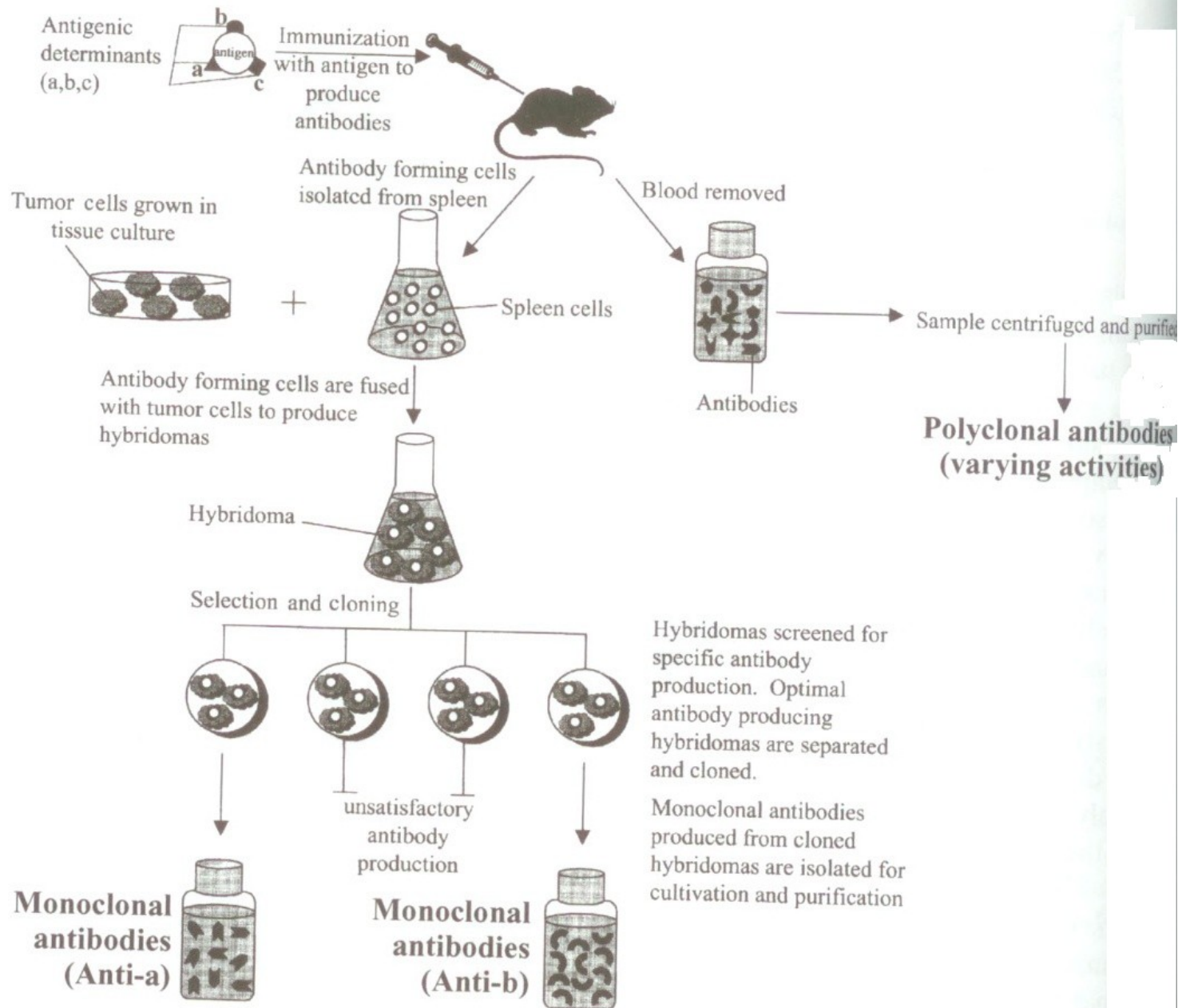
INMUNOENSAYOS

- Radioinmunoensayo (RIA)
- Inmunoensayo enzimático (EMIT, CEDIA)
- Inmunoensayo por Polarización de la fluorescencia (FPIA)
- Interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS)
- Ensayo por enzima unida a inmunoabsorbente (ELISA)



INMUNOENSAYOS – PRINCIPIO –





CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INMUNOENSAYOS

	EIA	FPIA	RIA	LAI
Instrumentación	Si	Si	Si	No
Estabilidad de los reactivos	Meses	Meses	3-4 semanas	años
Costo de los reactivos	++	++	+	+++
Automatización	Si	Si	Si	No
Pruebas/ 8 horas	100-400	250-300	200-400	200-350

ANÁLISIS TOXICOLÓGICO - PRUEBAS PRESUNTIVAS -



Equipo Viva Twin P.G.J.E.M.



PROCESO DE LA MUESTRA PARA INMUNOENSAYOS

- Orina
 - Centrifugar la muestra
- Sangre
 - Desproteínezación
 - Disolventes
 - Metanol
 - Acetona
 - Cloroformo
 - Acetonitrilo
 - Ácido sulfosalicílico
 - N,N Dimetilformamida
- Humor vítreo
 - Centrifugación
 - Dilución



ANÁLISIS TOXICOLÓGICO - PRUEBA CONFIRMATIVA -

- Un segundo análisis, empleando generalmente una técnica con un principio químico diferente a la prueba presuntiva.
 - Técnica cromatográfica acoplada a una espectrometría
 - CG/EM, CL/EM
 - Identifica sustancias
 - Sensibilidad
 - Generalmente, cuantitativa
 - Mas confiable (Validez Legal)



CROMATOGRAFÍA

○ Definición

- Es un método de separación basado en la diferente distribución de los componentes de una muestra entre una fase móvil y una fase estacionaria.
- Adsorción: basado en diferencias en la afinidad entre una fase móvil y la fase estacionaria.
- Partición: Diferencias en la solubilidad entre una fase líquida estacionaria y una fase móvil líquida o gaseosa.

“Principles on Forensic Toxicology” Barry Levine AACCC Press (2004)



CROMATOGRAFÍA - HISTORIA -

- 1903 -1906 Tswett
- 1929 Lederer
- 1938 -1939 Ismailov y Shraiber (CCF)
- 1941 - 1952 Martin, Synge and James (CG)
- 1950 M.J.E. Golay
- 1960 CL
- 1960 CG- EM

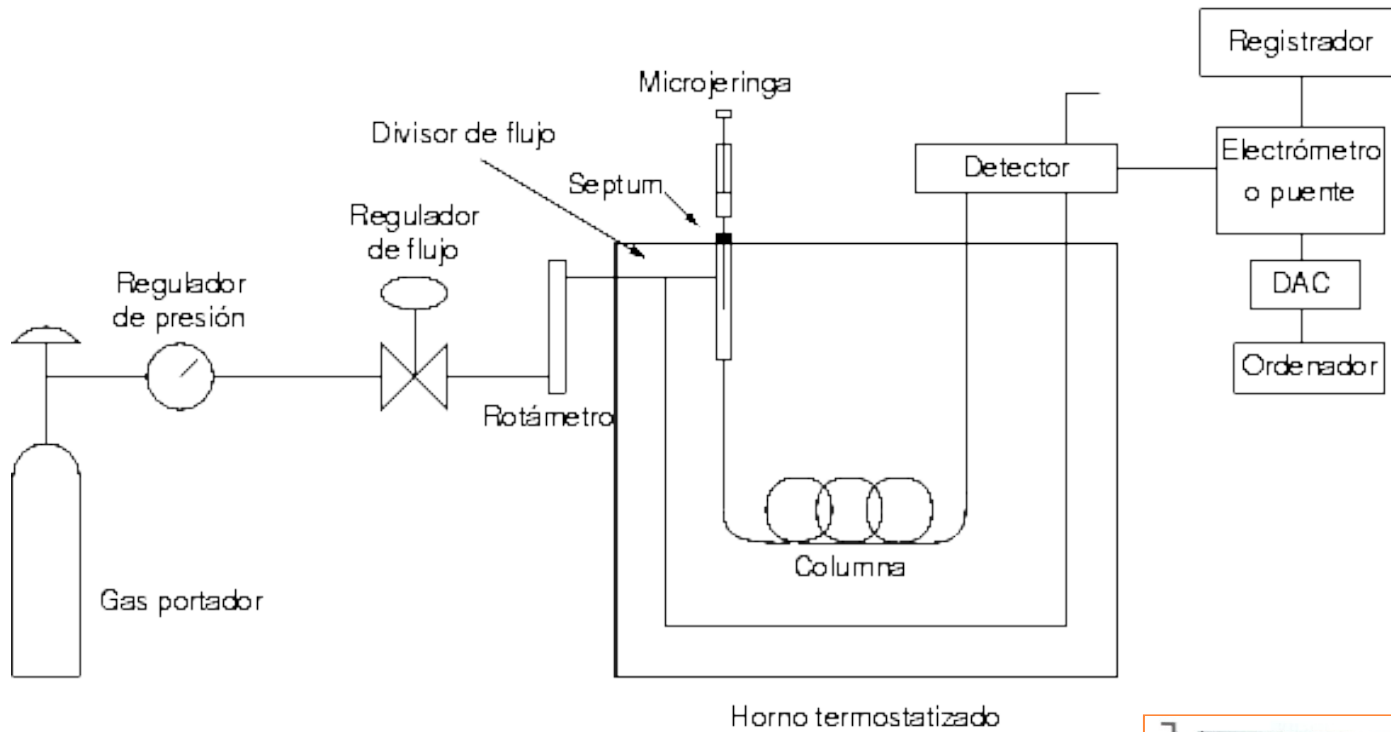


TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y SISTEMAS DE FASES

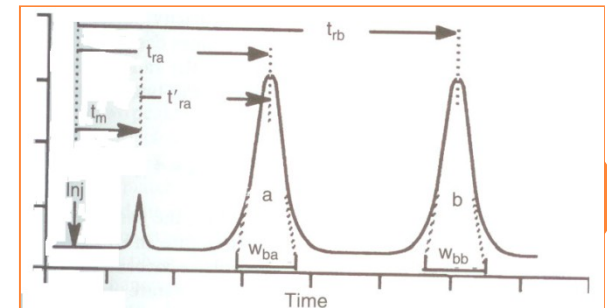
- Extracción líquido líquido (ELL) L/L
- Extracción en fase sólida (EFS) L/S
- Cromatografía en capa fina L/S
- Cromatografía en columna L/S
- Cromatografía de Líquidos L/L
- Cromatografía de Gases L/L y L/S



CROMATOGRAFO DE GASES

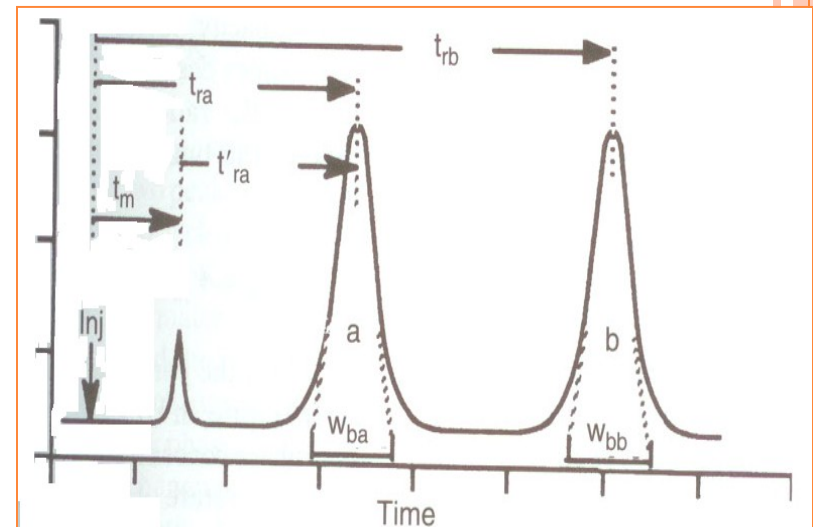


Sustancias térmicamente estables y volátiles

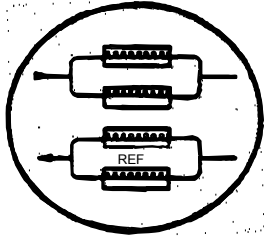


QUE PROPORCIONA LA CROMATOGRAFÍA DE GASES?

- SEPARACION
 - Diferencia analitos entre ellos y entre los componentes de la matriz
- PARAMETRO DE RETENCION
 - Determinado por las diferencias de afinidad del analito por la fase estacionaria y la fase móvil
 - Parámetro cualitativo
- RESPUESTA DEL DETECTOR
 - Señales del detector son proporcionales a la concentración de la sustancia
 - Parámetro cuantitativo

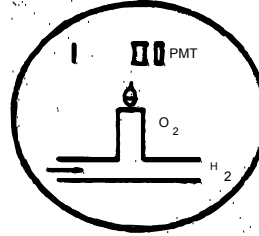


DETECTORES CG



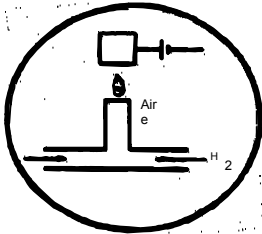
Conductividad térmica

El par de filamentos se calienta cuando la muestra diluye el gas portador



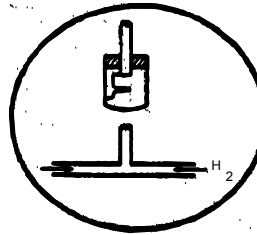
Fotométrico de llama

Un filtro óptico selecciona longitudes de onda específicas de compuestos de P o S



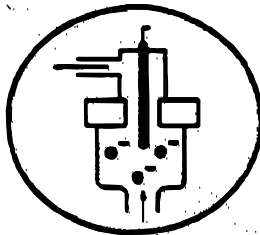
Ionización de llama

La combustión produce partículas cargadas que el colector convierte en una corriente



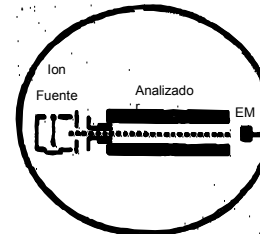
Termoiónico NP

Los compuestos de N o P aumentan la corriente en el plasma de la sal metálica vaporizada



Captura electrónica

La pérdida de electrones lentos por absorción de la muestra disminuye la corriente en la celda

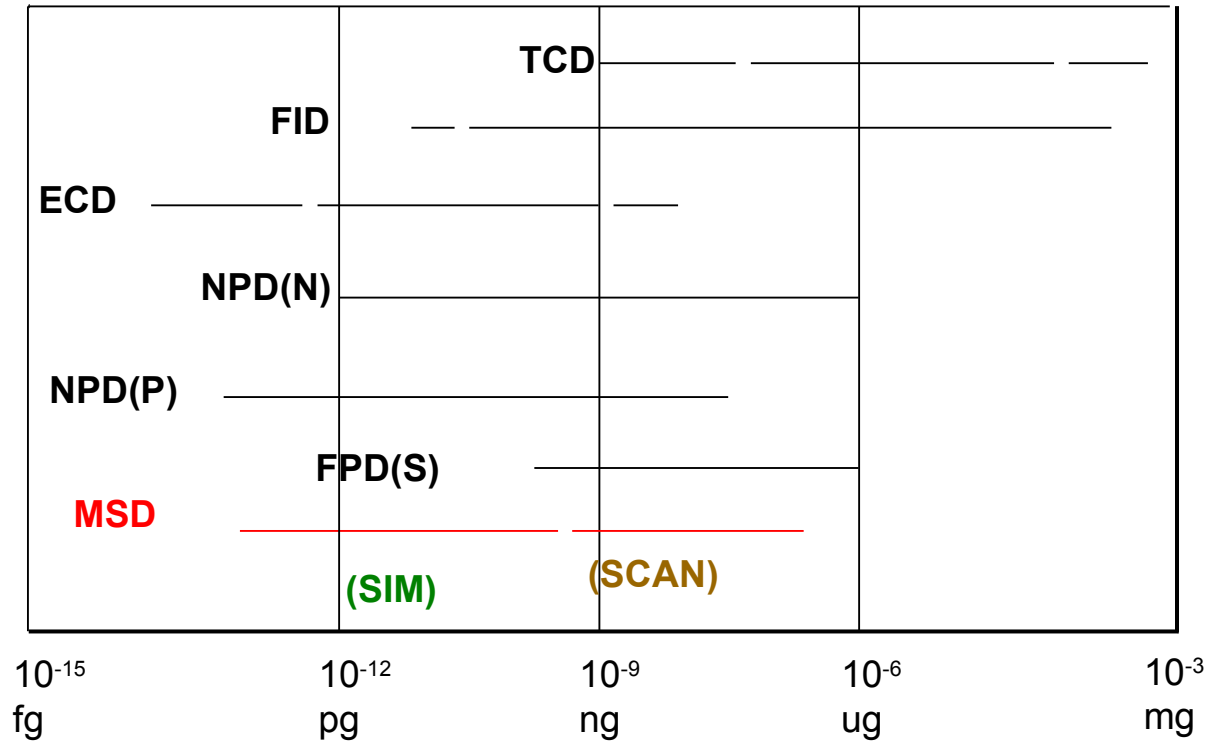


Detector selectivo de masas

La muestra ionizada es medida en un analizador de masas



COMPARACIÓN ENTRE DETECTORES DE GC



1 ng en 1 ul líquido (sg = 1) es concentración 1 ppm

El detector selectivo de masas es:

Específico y universal

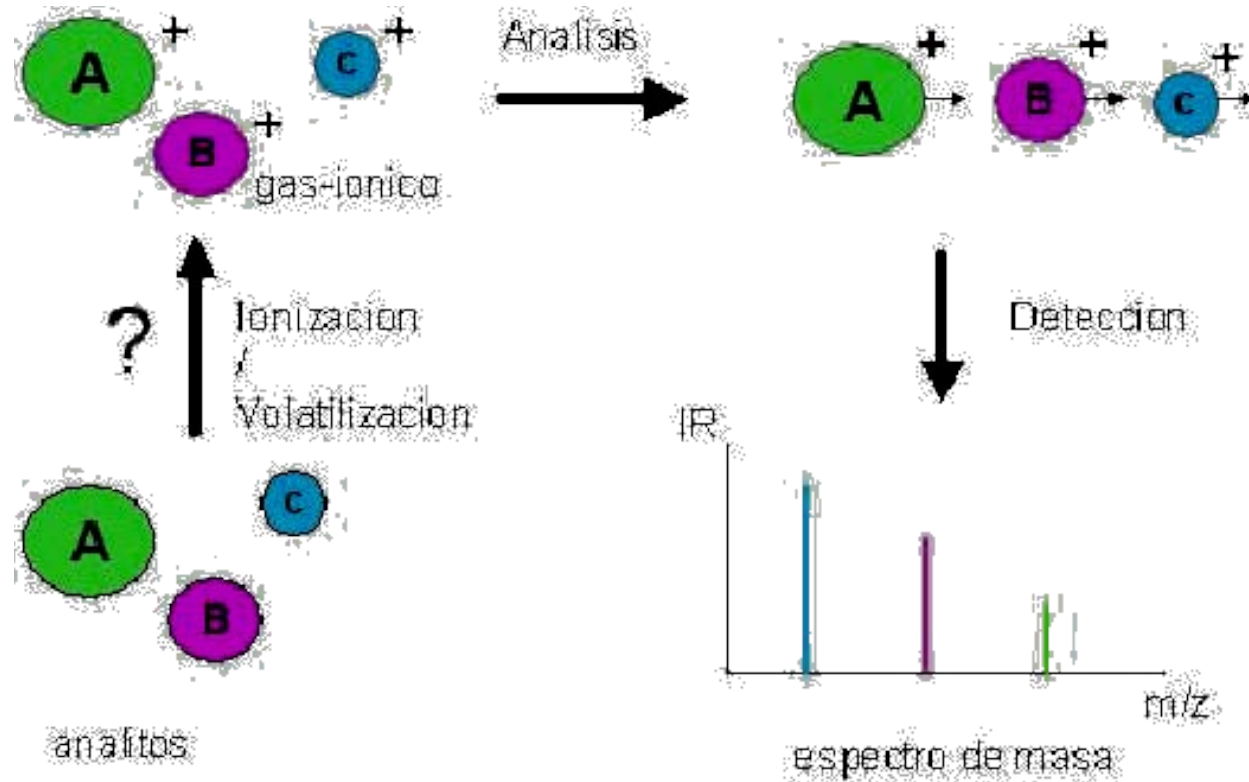


DETECCIÓN MULTIDIMENSIONAL

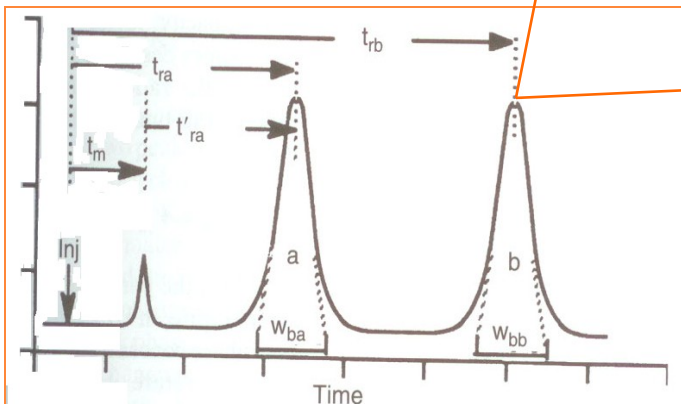
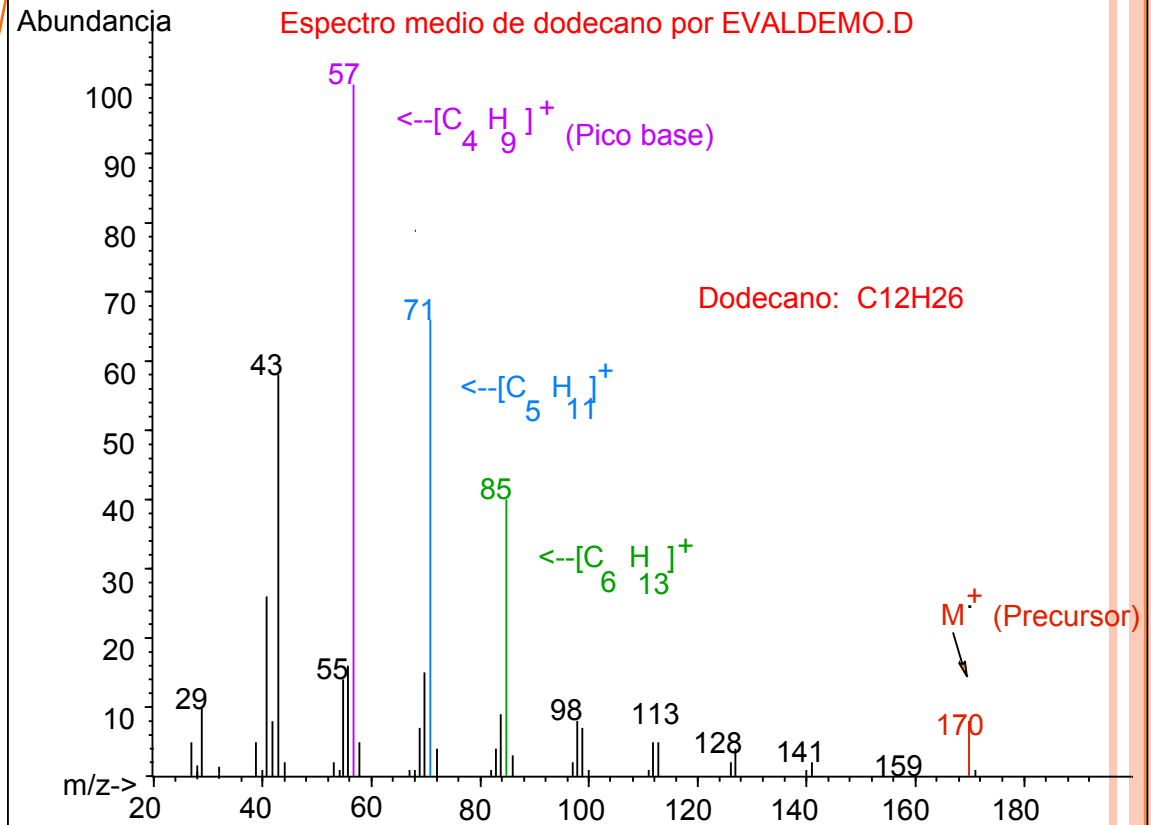
- Espectrometría de masas
 - Analitos son transformados en iones cargados o fragmentos los cuales son subsecuentemente separados de acuerdo a su radio masa /carga y sus abundancias son medidas
 - Proporciona información acerca de la estructura molecular del analito
 - Identificación de los analitos (comparación con bases de datos)



PROCESO

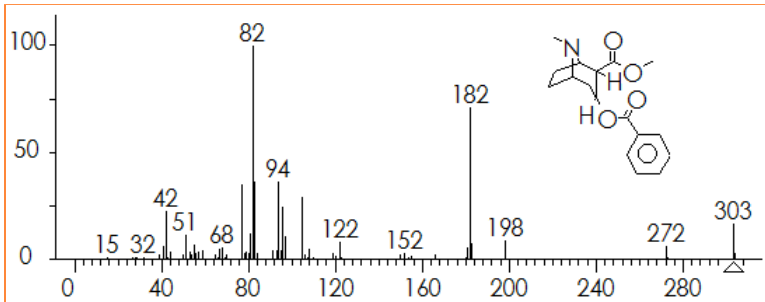


UN ESPECTRO DE MASAS TÍPICO

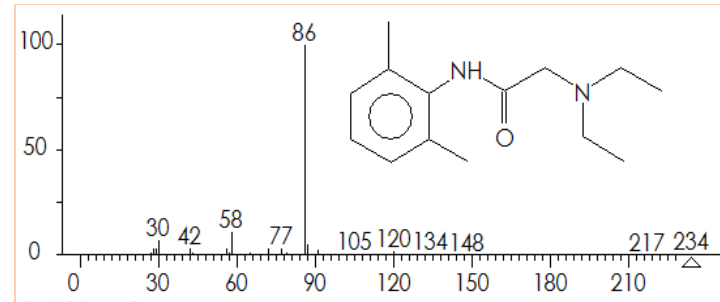
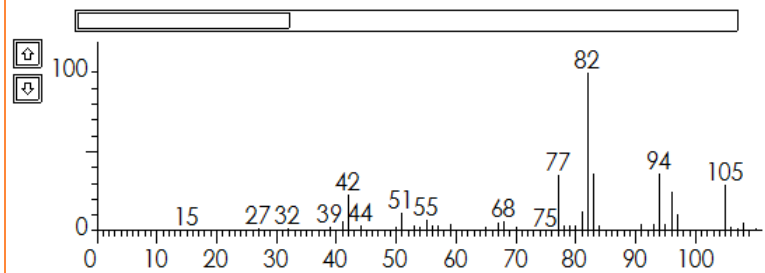


- Ion molecular (ion precursor): pérdida de un electrón
- Pico base: ion más abundante en el espectro

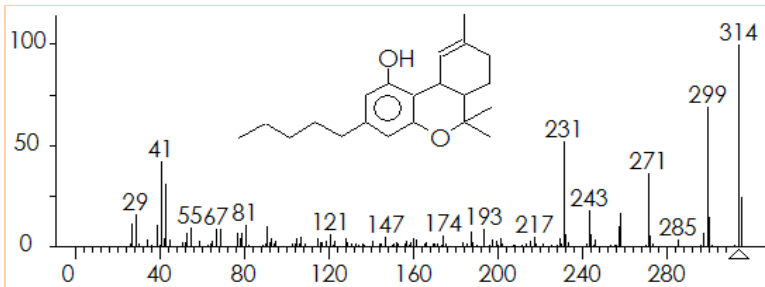
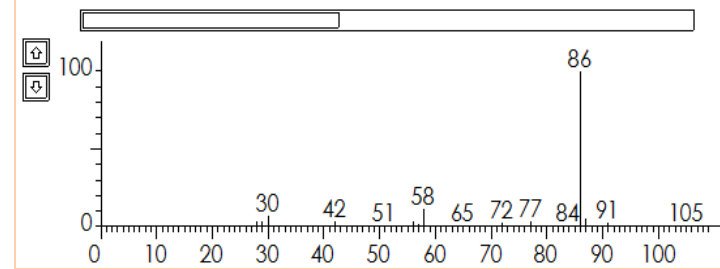




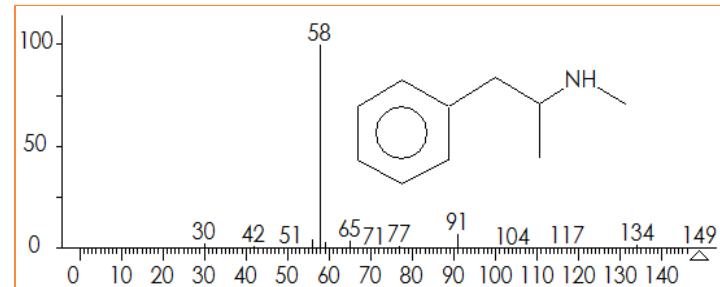
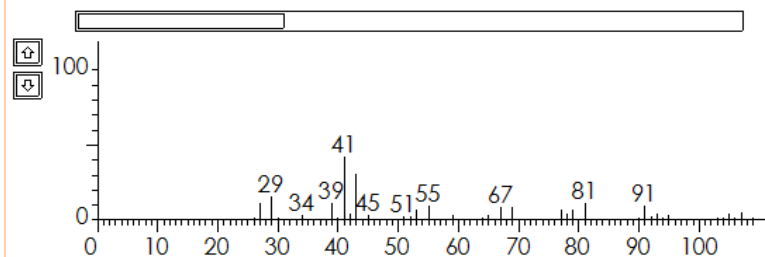
(M) Cocaine



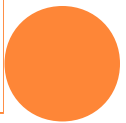
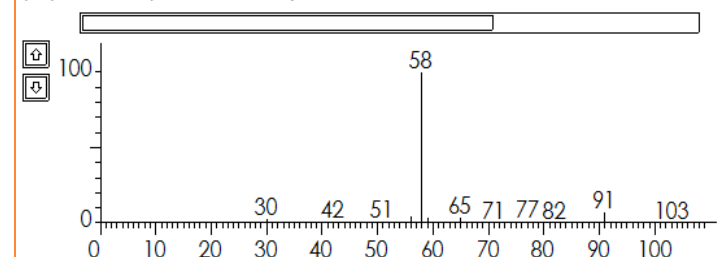
(M) Lidocaine



(M) Dronabinol



(M) Methamphetamine Hydrochloride



- Preparación de la muestra
 - Disgregar la materia orgánica (sólidas)
 - Hidrólisis (proteína, glucuronidos)
 - Extracción con una fase orgánica

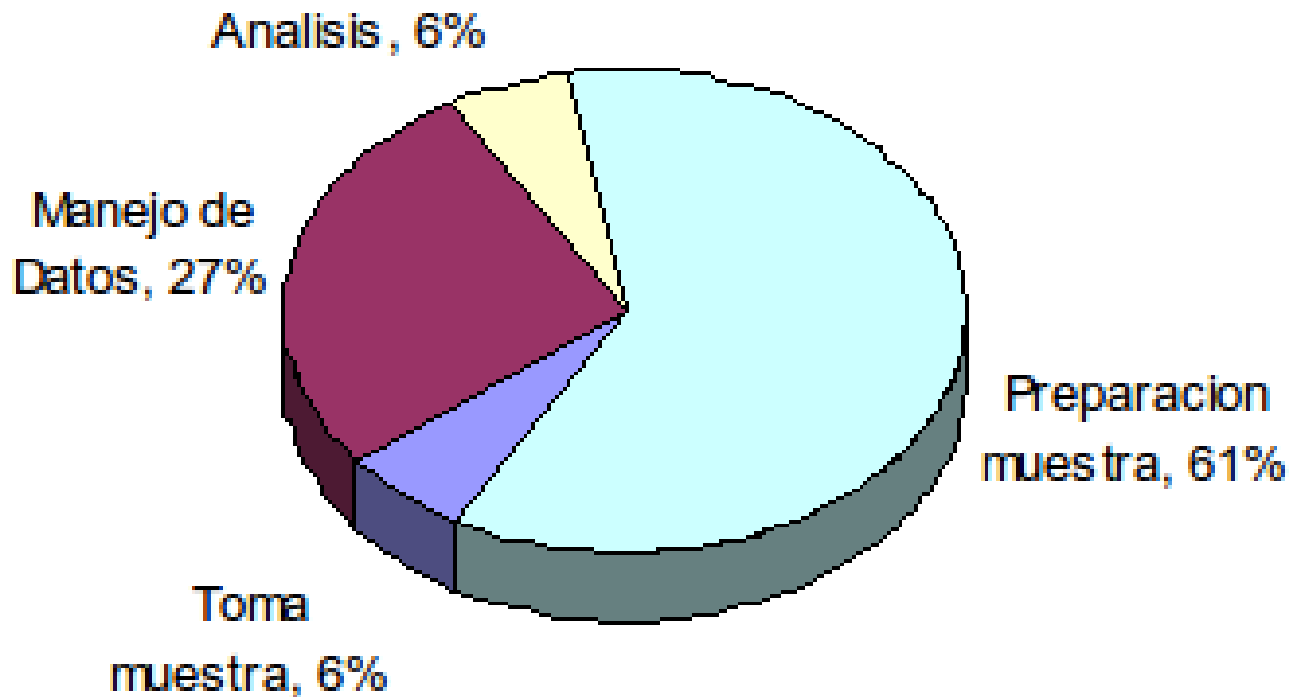


EXTRACCIÓN DE DROGAS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

- **Matrices Líquidas**
- Extracción líquido-líquido
- Extracción en fase sólida (discos, cartuchos)
- Microextracción en fase sólida
- **Muestras sólidas**
 - Extracción líquido-sólida (soxhlet, bligh & Dyer)
 - Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)
 - Extracción de Fluidos supercrítico (SFE)
 - Extracción acelerada de disolvente (ASE)
 - Extracción asistida por microondas (MAE)



ERRORES EN EL ANALISIS DE COMPUESTOS ORGANICOS



METABOLISMO

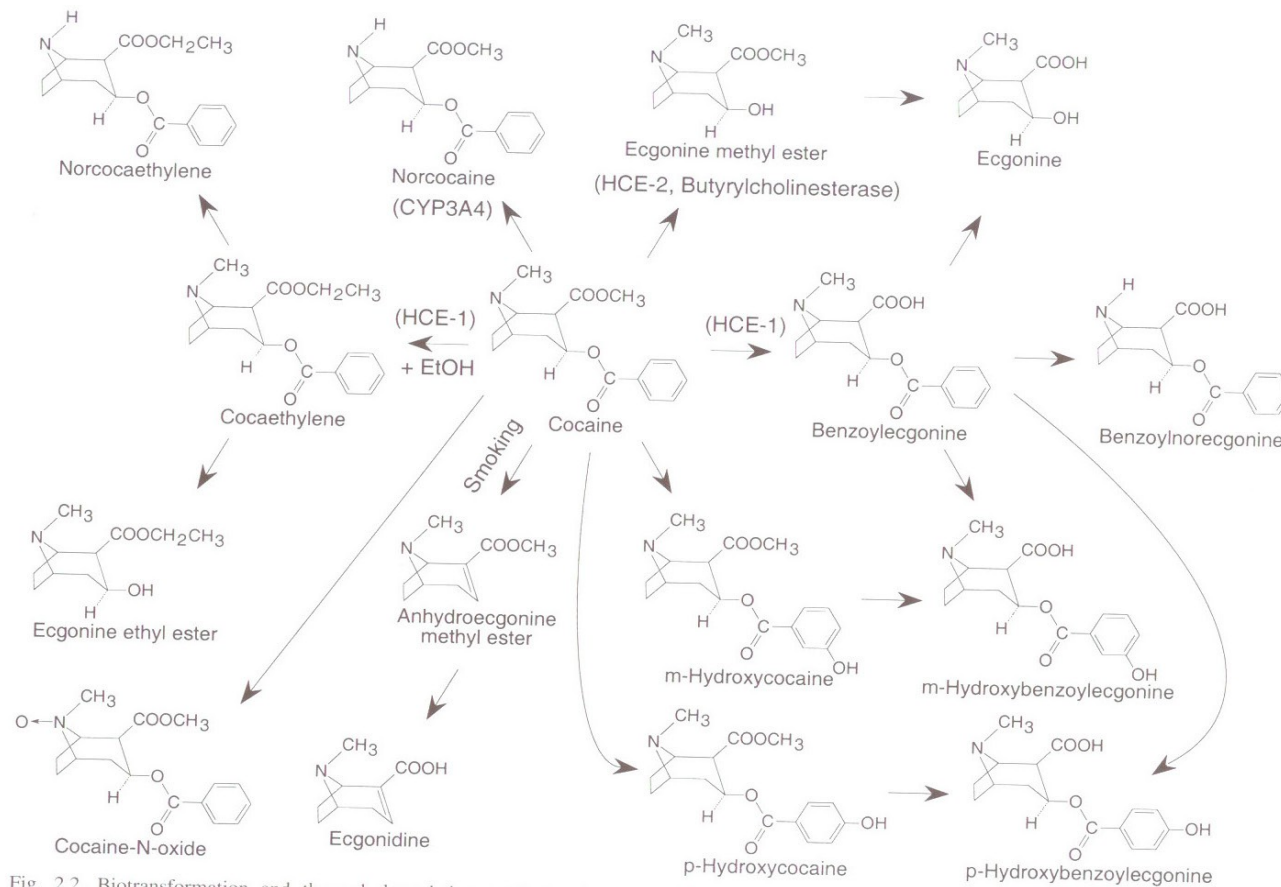
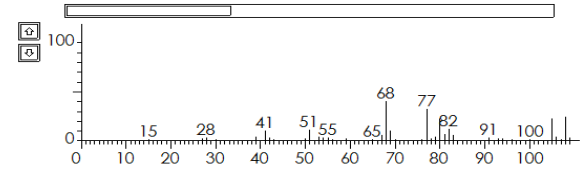
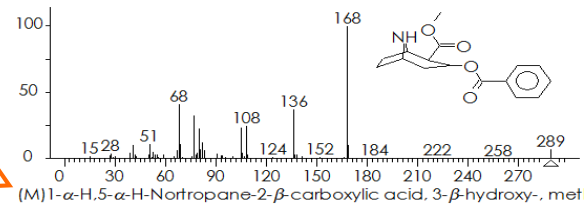
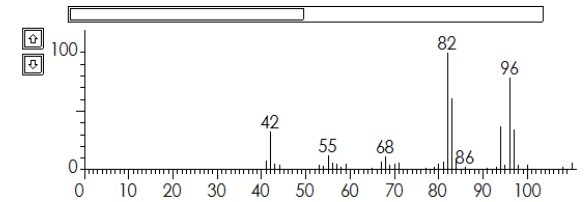
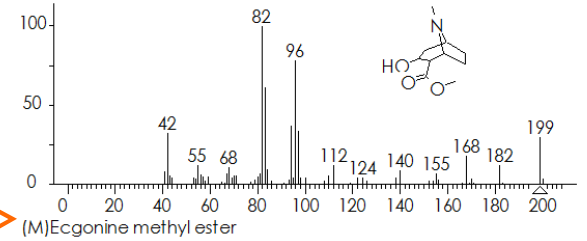
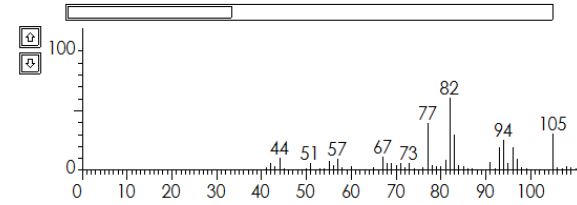
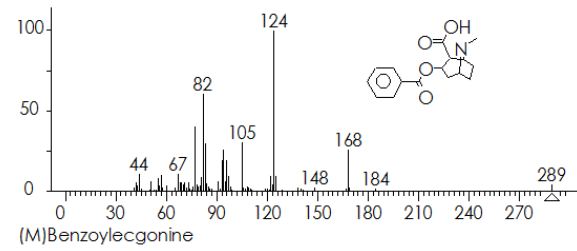
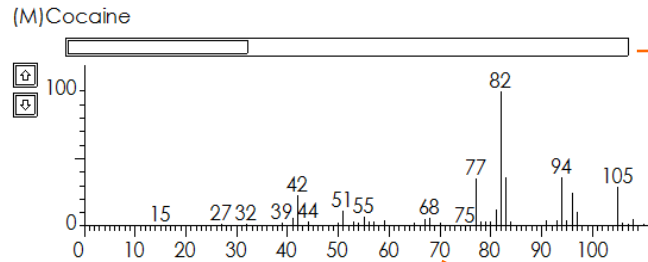
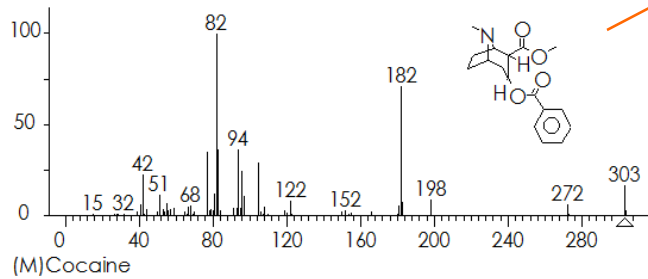


Fig. 2.2. Biotransformation and thermal degradation products of cocaine. Enzymes responsible for metabolism are indicated.





FACTORES QUE DETERMINAN LA DETECTABILIDAD DE LAS DROGAS

- Tipo de droga
- Dosis consumida
- Frecuencia de uso
- Espécimen biológico utilizado
- Diferencias individuales en metabolismo
- Momento de recolección vs consumo
- Sensibilidad del método



LIMITACIONES -ANÁLISIS DE DROGAS-

- Drogas detectables pero debajo del nivel de corte (Negativo)
- No pueden indicar la cantidad de droga consumida
- No puede indicar cuando se consumió
- No puede indicar la fuente de la droga



LIMITACIONES – ANÁLISIS DE DROGAS

-

- Muchos inmunoensayos no detectan algunos opiáceos sintéticos o semisintéticos (oxicodona, metadona, etc)
- No existen inmunoensayos para muchas drogas
- Algunas drogas requieren de inmunoensayos específicos



Agradecimientos

- Lic. Mario Alberto Carrasco Alcántara
Director del Instituto de Servicios Periciales de la P.G.J.E.M.
- Q. Moisés Saldívar Rodarte
Jefe del Laboratorio de Química del Instituto de Servicios Periciales de la P.G.J.E.M.

Al público
Gracias por su atención

