

**PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA
LA FISCALIZACIÓN INTERNACIONAL
DE DROGAS**

**MÉTODOS RECOMENDADOS
PARA LA
DETECCIÓN Y EL ANÁLISIS DE**

**Heroína, cannabinoides, cocaína,
anfetamina, metanfetamina, y
derivados anfetamínicos
con anillo sustituido
en especímenes biológicos**

**MANUAL PARA USO DE
LABORATORIOS NACIONALES**

**NACIONES UNIDAS
Nueva York, 1995**

La presente publicación se basa en las deliberaciones de las reuniones del Grupo de Expertos sobre la detección y el ensayo de drogas fiscalizadas en muestras biológicas, celebradas en Singapur del 2 al 29 de septiembre de 1989 y en Madrid del 1 al 5 de octubre de 1990. Las opiniones que en ella se expresan no reflejan necesariamente las de las Naciones Unidas. La presente publicación es traducción de un texto que no ha pasado por los servicios de edición.

ST/NAR/27

Índice

<i>Capítulo</i>	<i>Página</i>
Introducción	
I. Aspectos generales del análisis de drogas sujetas a fiscalización en especímenes biológicos	
A. Finalidad y estrategia	
B. Directrices generales para la entrega de muestras para la detección de drogas	
C. Toma de la muestra: procedimiento pormenorizado	
D. Carácter confidencial de los resultados	
E. La seguridad del personal del laboratorio	
F. Resumen de los procedimientos de seguridad	
G. Metodología	
H. Garantía de calidad	
I. Interpretación de los resultados	
II. Métodos recomendados para la detección y el análisis de heroína (morfina) en especímenes biológicos	
A. Tipos comunes de productos ilícitos de opio, morfina y heroína	
B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de la heroína y sus metabolitos	
C. Métodos de detección	
D. Métodos cromatográficos de confirmación	
E. Análisis por CG/EM de monoacetilmorfina como indicador del consumo de heroína	
F. Interpretación de los resultados	
III. Métodos recomendados para la detección y el análisis de cannabinoides en especímenes biológicos	
A. Tipos comunes de productos de la cannabis	
B. Descripción de los productos ilícitos de la cannabis	
C. Procedimientos de muestreo y preparación de la muestra para el análisis de 9-carboxi-THC	
D. Métodos de detección	
E. Métodos cromatográficos de confirmación	
F. Interpretación de los resultados	
IV. Métodos recomendados para la detección y el análisis de cocaína en especímenes biológicos	
A. Tipos comunes de productos de coca ilícitos	
B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de la cocaína y sus metabolitos	
C. Métodos de detección	
D. Métodos cromatográficos de confirmación	
E. Interpretación de los resultados	
F. Análisis e interpretación en otras matrices biológicas	

V. Métodos recomendados para la detección y el análisis de anfetamina y metanfetamina en especímenes biológicos	
A. Introducción	
B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de anfetamina y metanfetamina y sus metabolitos	
C. Métodos de detección	
D. Métodos cromatográficos de confirmación	
E. Interpretación de los resultados	
VI. Métodos recomendados para la detección y el análisis de los derivados anfetamínicos con anillo sustituido en especímenes biológicos	
A. Introducción	
B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de derivados anfetamínicos con anillo sustituido	
C. Métodos de detección	
D. Métodos cromatográficos de confirmación	
E. Interpretación de los resultados	
Referencias	

Introducción

A. Antecedentes

En los últimos diez años se ha registrado un enorme aumento no sólo de la producción y la oferta de drogas ilícitas, reflejado en las cantidades enormes y cada vez mayores de drogas decomisadas por las autoridades nacionales e internacionales, sino de la magnitud que ha cobrado el uso indebido de drogas, reflejado en su demanda ilícita. Las drogas decomisadas no son sólo las drogas tradicionales ya sujetas a fiscalización nacional e internacional, sino también drogas ilícitas nuevas e inesperadas, o combinaciones de drogas ilícitas preparadas por químicos que trabajan en laboratorios clandestinos. Al mismo tiempo, hay indicios de que es cada vez mayor el uso indebido de drogas de uso médico como los barbitúricos y las benzodiacepinas.

Este problema, que solía afectar sólo a los países desarrollados, incide ahora también en otros países. El uso indebido de drogas es hoy un problema mundial que afecta por igual a países desarrollados y a países en desarrollo; no hay ninguna nación que esté libre de esa amenaza.

La magnitud y las diversas formas del uso indebido de drogas han obligado a las naciones a intensificar sus actividades de reglamentación, en algunos casos mediante la adopción de leyes estrictas que pueden entrañar graves consecuencias para las personas acusadas de delitos relacionados con las drogas. En última instancia, el resultado de esas disposiciones legislativas depende de los resultados de las pruebas de laboratorio. Por ese motivo, han aumentado las exigencias a que se ven sometidos los laboratorios nacionales, que ahora deben no sólo identificar el material decomisado, sino también detectar el uso indebido de drogas. Además, los laboratorios, que antes sólo debían hacer análisis cualitativos, deben ahora producir resultados cualitativos y cuantitativos fiables.

En el ámbito del uso indebido de drogas, los laboratorios deben ocuparse de un mayor número de sustancias y emplear métodos de detección y análisis más rápidos y a la vez más precisos y específicos. El análisis de especímenes biológicos como la orina y la sangre es problemático por la necesidad de separar las sustancias que se desea analizar de las interferencias en la sangre y la orina, complejas matrices biológicas.

Además, el alcance internacional del problema del uso indebido de drogas exige que los laboratorios intercambien con rapidez datos analíticos entre ellos y con los organismos encargados de hacer cumplir las leyes pertinentes en los planos nacional e internacional. La formulación de métodos internacionalmente aceptables de detección y análisis contribuiría enormemente al logro de esos objetivos.

Mientras elaboraba métodos recomendados para el análisis de cannabis y anfetamina/metanfetamina decomisadas, el Grupo de Expertos reunido en Kuala Lumpur en 1986 reconoció que una cuestión de importancia creciente para todos los Estados Miembros era que se formularan métodos para el análisis de drogas de uso indebido y sus metabolitos en los fluidos orgánicos. Se recomendó que las Naciones Unidas estudiaran los medios más adecuados de abordar el problema [1].

La Comisión de Estupefacientes hizo suya esa propuesta en su 32º período de sesiones, celebrado en febrero de 1987, en el que se alentó al Laboratorio de las Naciones Unidas a prestar su asistencia a los Estados Miembros estableciendo y proporcionando directrices sobre métodos de análisis en humores orgánicos de sustancias sujetas a fiscalización.

En respuesta a esa sugerencia, la División de Estupefacientes convocó en 1987 una reunión de un grupo de expertos con el fin de que elaborase directrices para el establecimiento de programas y laboratorios nacionales para las pruebas de detección de drogas de uso indebido en fluidos del organismo humano. El grupo, al evaluar las necesidades mundiales en esta esfera concreta, observó que la lista de drogas que debían someterse a pruebas debía al menos incluir opiáceos (heroína, morfina, codeína), cannabinoides, cocaína, metadona, metacualona, anfetamina, metanfetamina y fenciclidina, y recomendó la “publicación de un manual de trabajo, a título de actividad de seguimiento, que sirva de orientación para la creación de laboratorios y la elaboración de programas” y “el establecimiento de un grupo de expertos que examine periódicamente la metodología y los procedimientos de pruebas para la detección de drogas y que elabore conceptos para la realización de pruebas eficaces a nivel internacional” [2].

La Comisión de Estupefacientes, en su décimo período extraordinario de sesiones, hizo suyas las recomendaciones del Grupo e hizo especial hincapié en “el desarrollo de métodos recomendados de pruebas de laboratorio y de criterios internacionales normalizados para los programas nacionales de

pruebas de fluidos del organismo humano, incluida la elaboración de ensayos eficaces y la validación de métodos y procedimientos” [3].

La Conferencia Internacional sobre el Uso Indebido y el Tráfico Ilícito de Drogas, en junio de 1987, había sugerido de forma similar, que “La División de Estupefacientes, en colaboración con la OMS y la OIT, debe fomentar y armonizar los esfuerzos nacionales elaborando directrices, criterios y metodologías internacionalmente aceptables para los programas nacionales de ensayo”. La Conferencia también propuso el establecimiento de “una fuente central de normas de referencia de los metabolitos de las principales drogas para servir a los laboratorios nacionales” [4].

En respuesta a la solicitud de la Comisión y por invitación del Gobierno de Singapur, la División de Estupefacientes convocó una reunión del Grupo de Expertos en detección y análisis de drogas sometidas a fiscalización en fluidos orgánicos y métodos recomendados para la detección y el análisis en especímenes biológicos y métodos recomendados para la detección y el análisis de heroína/morfina y cannabinoides en especímenes biológicos. Posteriormente se celebró una reunión en Madrid sobre los métodos para la detección y el análisis de cocaína, anfetamina, metanfetamina, y derivados anfetamínicos con anillo sustituido en especímenes biológicos.

B. Finalidad del manual

El presente manual revisado constituye un compendio de los manuales de las Naciones Unidas titulados *Métodos recomendados para la detección y el ensayo de heroína y cannabinoides* [5] y *Métodos recomendados para la detección y el ensayo de cocaína, anfetamina, metanfetamina y derivados anfetamínicos con anillo sustituido en muestras biológicas* [6]. Se ha hecho especial hincapié en la recogida, el transporte y el almacenamiento de muestras debidamente realizados y supervisados, y en el estricto mantenimiento del proceso de la cadena de custodia. En los análisis de especímenes biológicos resulta importante observar estrictamente las directrices para la presentación de las muestras por las graves consecuencias jurídicas que pueden tener los resultados para las personas.

El presente manual, elaborado por Operaciones de Laboratorio de la Subdivisión de Servicios Técnicos del Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas (PNUFID), recoge las conclusiones de los grupos de expertos y se ha concebido para proporcionar orientación práctica a las autoridades y analistas nacionales mediante la descripción de los métodos que se recomienda utilizar en los laboratorios forenses y toxicológicos con miras a la detección y el análisis de heroína/morfina, cannabinoides, cocaína, anfetamina, metanfetamina y derivados anfetamínicos con anillo sustituido en especímenes biológicos.

En cuanto a la selección de los métodos, el Grupo de Expertos no desconocía que muchos laboratorios utilizaban métodos que satisfacían, incluso con creces, los requisitos legislativos. No obstante, se observó una gran diversidad en cuanto a la estructura de los programas y del equipo y las metodologías de los laboratorios para la detección del uso indebido de drogas. En general, el presente manual tiene por objeto ayudar a promover y armonizar las actividades de los países proporcionando directrices internacionalmente aceptables y una selección de métodos para uso de los laboratorios. Fundamentalmente, se pretende prestar asistencia a los laboratorios que tal vez no tengan acceso a equipo y métodos complejos. Todos los métodos que se describen han sido utilizados durante varios años en laboratorios de renombre y cabe esperar que produzcan resultados fiables. Al determinar los métodos, el Grupo de Expertos no ignoraba la existencia de muchos otros métodos útiles y aceptables.

C. Utilización del manual

Los métodos recomendados en el presente manual se han seleccionado sobre la base de su fiabilidad comprobada, requisito importante si los resultados han de utilizarse con fines jurídicos o punitivos. El o la analista del país de que se trate tendrá la última palabra respecto de la selección de la metodología y el criterio con el que se encare el análisis. Por necesidad, su decisión dependerá de la disponibilidad de instrumental, material de referencia y personal capacitado. No obstante, se recomienda que, a los efectos de determinar el consumo ilícito de drogas, se utilicen dos métodos: un método de detección inicial (por lo general una técnica de inmunoanálisis) seguido por un método de confirmación en el que se empleen distintos principios químicos o físicos (por lo general una técnica de cromatografía). Cuando sólo se pueda utilizar cromatografía en capa delgada (CCD), se sugiere obtener una segunda cromatografía utilizando un disolvente distinto.

Cabe destacar que, independientemente del método que se escoja, es preciso prestar atención al mantenimiento del equipo y al control del ambiente, en particular, para el transporte y el almacenamiento de especímenes y reactivos inestables, y es importante que sólo se confíe en personal idóneo debidamente capacitado. También se insiste en la importancia de disponer de libros de texto sobre las drogas de uso indebido y las técnicas analíticas. Además, se presume que el analista se mantendrá al corriente de los adelantos en el ámbito del análisis toxicológico consultando la bibliografía más reciente sobre el tema. Los manuales de las Naciones Unidas de Métodos recomendados para el ensayo de la heroína [7], el opio y morfina en bruto [8], la cannabis [9], la cocaína [10], la anfetamina y la metanfetamina [11], y los derivados anfetamínicos con anillo sustituido [12], son complementos útiles del presente manual. Aunque estos manuales estuvieron destinados inicialmente al análisis de materiales incautados, contienen información también pertinente para el análisis de especímenes biológicos.

El Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas recibirá con agrado todas las observaciones que se le formulen sobre el contenido y la utilidad del presente manual. Deberán dirigirse a:

Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas
Subdivisión de Servicios Técnicos
Operaciones de Laboratorio
Oficina de las Naciones Unidas en Viena
Centro Internacional de Viena
Apartado postal 500
A-1400 Viena
Austria

I. Aspectos generales del análisis de drogas sujetas a fiscalización en especímenes biológicos

A. Finalidad y estrategia

El análisis de fluidos o especímenes biológicos suele tener dos finalidades:

Una finalidad forense, es decir, el análisis de muestras biológicas para la detección de drogas sujetas a fiscalización. En este contexto, un resultado analítico positivo de la muestra por lo general daría lugar a un proceso penal y a una sanción para el acusado cuya muestra se ha sometido al análisis.

Una finalidad de diagnóstico, tratamiento y rehabilitación, es decir, el análisis de muestras en un contexto clínico para determinar la causa de una intoxicación o establecer si el dador de la muestra se ha abstenido del uso de drogas en los últimos días. En este contexto, un resultado analítico positivo no necesariamente daría lugar a un proceso penal, pero podría servir como indicador fiable en que basar el tratamiento médico futuro del dador de la muestra.

Como los resultados analíticos positivos pueden dar lugar a medidas punitivas, en los procedimientos y métodos que se utilicen han de seguirse normas estrictas basadas en principios de toxicología forense. La estrategia generalmente recomendada es que se lleve a cabo una prueba inicial de detección para separar las muestras que podrían arrojar un resultado positivo seguida de una prueba de confirmación de las muestras presuntamente positivas.

En la prueba de detección inicial de las muestras, los laboratorios deberían considerar la posibilidad de utilizar técnicas de inmunoanálisis como el radioinmunoanálisis (RIA), el inmunoanálisis enzimático (IAE), el inmunoanálisis de polarización por fluorescencia (IAPF), y la inhibición de la aglutinación con látex y otras técnicas. Por esos medios podrán eliminarse con rapidez las muestras negativas. El resultado positivo obtenido mediante el inmunoanálisis deberá confirmarse con un método basado en un principio químico o físico diferente, como la cromatografía en capa delgada (CCD), la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (CLAR) o la cromatografía en fase gaseosa (CG).

B. Directrices generales para la entrega de muestras para la detección de drogas

La finalidad de las presentes directrices es describir procedimientos que satisfagan los criterios necesarios para garantizar la validez óptima de los resultados. Como recomendó el Grupo de Expertos de Bruselas, la orina es la muestra preferida para la detección de drogas de uso indebido. Aparte de que es fácil de obtener por procedimientos no invasivos, prácticamente todos los metabolitos de drogas se excretan en la orina y pueden detectarse en ella durante un período más largo que en la sangre. El uso de otros materiales biológicos como el pelo, la saliva y el sudor a los efectos de establecer el consumo ilícito de drogas todavía no ha sido generalmente aceptado.

Para mantener la validez de los resultados analíticos desde el punto de vista forense, hay que tener especial cuidado en la **supervisión** de la toma, el transporte y el almacenamiento de las muestras. La supervisión deberá estar a cargo de personal capacitado que comprenda claramente las consecuencias jurídicas del procedimiento y deberá hacerse por observación visual directa. Es preciso mantener una vigilancia adecuada en todo momento, haciendo al mismo tiempo todo lo posible por proteger la intimidad y la dignidad del dador. El supervisor también deberá prevenir todo intento de añadir sustancias contaminantes o reactivas a la orina. Cuando sea necesario transportar muestras a un laboratorio analítico, hay que mantener la seguridad y una cadena de custodia claramente establecida.

Las presentes directrices son aplicables a las situaciones en que la muestra de orina se tome fuera de un laboratorio analítico. Quizás ése no sea el caso en todos los países o las distintas localidades geográficas de un mismo país. Así pues, las directrices deberán adaptarse o modificarse para las circunstancias locales, por ejemplo, en el almacenamiento de muestras; si no existen instalaciones de refrigeración, el analista debe incorporar comprobaciones de estabilidad en su programa de control de la calidad.

C. Toma de la muestra: procedimiento pormenorizado

1. En el lugar de toma de la muestra

- El personal del **lugar en que se tome la muestra** se encargará de tomar, rotular, envasar y transportar las muestras, asegurando que los procedimientos de toma y almacenamiento se documenten debidamente y se apliquen con los métodos de seguridad necesarios.
- Todo el personal del lugar en que se tome la muestra estará suficientemente capacitado para comprender el proceso y su importancia para los resultados de laboratorio.
- La toma de la muestra será supervisada y presenciada por personal autorizado y apto.
- Antes de considerar la posibilidad de tomar una muestra de orina, es preciso disponer de instalaciones sanitarias adecuadas.
- La sala en que se tome la muestra se inspeccionará para ver si contiene alguna sustancia que pudiera usarse para invalidarla. En la sala no deberá haber recipientes que dispensen jabón ni productos de limpieza.
- La muestra de orina se tomará en dos botellas de 50 ml. Las botellas deberán llenarse al menos en 2/3. Siempre que sea posible, deberá evitarse el uso de recipientes plásticos y tapones de goma, ya que las drogas no polares y sus metabolitos, como los cannabinoides, son muy propensos a absorberse a algunas superficies de plástico y a la mayoría de las de goma. Si, por razones prácticas, se emplean recipientes plásticos desechables, los laboratorios deben realizar pruebas para garantizar que esos recipientes plásticos no alteran la composición o concentración de las drogas o metabolitos en la orina.
- Inmediatamente después de la toma de la muestra, se medirá y registrará su temperatura (32 a 38°C en cuatro minutos) y pH. Si se sospecha de adulteración, se notificará al laboratorio. En tales casos se recomienda una comprobación visual cuidadosa (color, precipitación, espuma, etc.) y el control de la creatinina (180 ± 80 mg/ 100 ml: “normal”; 10 a 30 mg/100 ml: “probablemente diluida”; < 10 mg/100 ml: “diluida”) y de la gravedad específica (1,007 a 1,035: “normal”) [13, 14].
- Las botellas deberán taparse, sellarse y rotularse debidamente. Se tomarán medidas para mantener la integridad de la muestra, por ejemplo, utilizando un sello de seguridad de cera estampado con un signo departamental o alguna otra medida que permita ver si ha sido adulterado. Es importante que el dador presencie el sellado de la botella y firme o inicie el sello o el rótulo.
- El rótulo del espécimen se adherirá al recipiente de la orina y no a la tapa para impedir la confusión o el trueque de especímenes o de rótulos identificadores.

Posibles formas de invalidar las muestras de orina

Añadiendo diversas sustancias químicas a la muestra. La sal común, los detergentes o algunos artículos domésticos como el hipoclorito (lejía) pueden destruir las drogas o afectar a la muestra y producir falsos resultados negativos.

En determinadas circunstancias, añadiendo sustancias ilícitas a la orina para producir resultados positivos.

Haciendo una pequeña perforación en el fondo del recipiente para producir una fuga del contenido.

Utilizando una jeringa escondida debajo del brazo y provista de un tubo que llegue a la región genital. Con la jeringa, se puede introducir en la muestra agua u otras sustancias que la diluyan o contaminen.

Haciendo pasar como propia orina de amigos que no tomen drogas.

Echando agua del inodoro en el recipiente de la muestra para diluir la orina.

El rótulo debe contener como mínimo la siguiente información:

<p>Nombre: .</p> <p>Número de documento de identidad:</p> <p>Fecha y hora de la toma:</p> <p>Lugar de la toma:</p> <p>Nombre del supervisor de la toma:</p> <p>Droga(s) que se procura detectar:.....</p> <p>Número de la muestra:.....</p>
--

- La información personal sobre el dador del espécimen se indicará en un formulario de solicitud de análisis. Ese formulario acompañará a la muestra al laboratorio.
- El dador del espécimen no intervendrá en la manipulación, el etiquetado, el embalaje ni el transporte al laboratorio de la muestra después de su obtención.
- También se adoptarán medidas estrictas de seguridad en el almacenamiento y la distribución de vasos vacíos, formularios de solicitud, rótulos y materiales de embalaje.

2. Transporte y almacenamiento

- Una vez relleno, el formulario de solicitud se entrega junto con la muestra al transportista para que lo lleve al laboratorio. La muestra debe protegerse de la luz directa y del calor durante el traslado y el almacenamiento, por lo que debería transportarse refrigerada, de preferencia con hielo o algún otro material de embalaje refrigerante, en un recipiente provisto de aislamiento.

Es importante proteger las muestras de la exposición prolongada a la luz y al calor desde que se toman hasta que se someten a análisis.

- El transportista designado se encargará de trasladar las muestras al laboratorio y de llevar un registro adecuado de la cadena de custodia para que no sean adulteradas durante el transporte.

3 En el laboratorio

- En el laboratorio, una persona autorizada deberá recibir e inspeccionar cuidadosamente las muestras y los documentos. Una de las dos muestras de orina deberá usarse para hacer el análisis y la otra deberá guardarse, congelada, para hacer otro análisis en caso necesario.
- Una vez que se ha comprobado que las muestras y los formularios de solicitud están en regla, se deberá dar un recibo firmado al transportista.
- El laboratorio deberá llevar registros bien documentados y mantener medidas estrictas de seguridad para garantizar la integridad de las muestras y la confidencialidad de los resultados.
- Si el análisis debe retrasarse más de uno o dos días, los especímenes de orina se guardarán congelados en una refrigeradora cerrada con llave. En general, los especímenes congelados son estables durante varios meses.

4. Formulario de solicitud de análisis de drogas

- El formulario de solicitud de análisis de drogas que acompaña a las muestras de orina permitirá al laboratorio cotejar cada muestra con la información del formulario para confirmar la identidad del dador y que todos los especímenes recogidos hayan llegado al laboratorio.
- El formulario debería incluir, como mínimo, datos que identifiquen al dador, a la persona que supervisó la toma de la muestra y al transportista, el número de muestra, la fecha y la hora de su obtención, y la temperatura y pH de la muestra en el momento en que se obtuvo.

- Como información adicional se puede incluir en el formulario una especificación de las drogas que se procurará detectar en el análisis y una nota acerca de cualquier sospecha en cuanto a su validez.
- Una vez rellenado, el formulario deberá recibir la firma de una persona autorizada y un sello oficial.

D. Carácter confidencial de los resultados

Es importante mantener la más absoluta seguridad y confidencialidad en todo momento.

- Toda la información relacionada con el dador y los resultados del análisis deberá guardarse bajo llave en lugar seguro.
- Sólo tendrán acceso a los informes las personas autorizadas.

E. La seguridad del personal del laboratorio

- La manipulación de materiales biológicos expone a las personas que se ocupan de ella al riesgo de contraer, entre otras infecciones, la hepatitis y el SIDA. Por consiguiente, todo el personal deberá adoptar las precauciones necesarias y aplicar medidas de seguridad como el uso de guantes y vestimenta protectora de otra índole.

F. Resumen de los procedimientos de seguridad

- Deberá mantenerse una seguridad estricta no sólo respecto de las muestras, sino del almacenamiento y la entrega de vasos vacíos, formularios de solicitud, rótulos y material de embalaje.
- El dador del espécimen no intervendrá en la manipulación, el etiquetado, el embalaje ni el transporte al laboratorio de la muestra después de su obtención.
- Es importante que el dador presencie el sellado del recipiente y firme o inicie el sello o rótulo.
- Deben mantenerse registros precisos y completos de todas las personas que participen de una manera u otra en la toma, el almacenamiento y el transporte de la orina.
- El rótulo de los especímenes debe adherirse al recipiente de la orina, no al tapón, para impedir la confusión o el trueque de especímenes o de rótulos identificadores.
- La información sobre el dador y los resultados serán estrictamente confidenciales y sólo podrán acceder a ellos personas autorizadas.

G. Metodología

Como se recomienda anteriormente, tanto las pruebas de detección como de confirmación son necesarias.

La prueba de detección debería permitir determinar las muestras que podrían arrojar resultados positivos de manera sumamente fiable, sensible, rápida y económica. Los inmunoanálisis suelen satisfacer esos requisitos. No obstante, los anticuerpos que se utilizan en ellos son relativamente poco específicos y pueden causar reactividad cruzada. Todos los resultados positivos obtenidos mediante una detección por inmunoanálisis deberían confirmarse con un segundo análisis basado en distintos principios químicos. La cromatografía en capa delgada (CCD) puede también utilizarse como prueba de detección.

Las pruebas de confirmación deberán ser al menos tan sensibles como las de detección, pero más específicas. Suelen abarcar técnicas cromatográficas y pueden incluir la cromatografía en capa delgada (CCD), la cromatografía en fase gaseosa (CG), la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (CLAR) y la cromatografía en fase gaseosa combinada con espectrometría de masas (CG-EM).

1. Métodos de inmunoanálisis

El inmunoanálisis es el método preferido cuando es preciso cribar un gran número de especímenes en poco tiempo. Hay varias pruebas de inmunoanálisis en venta para la detección de drogas de uso indebido. Los métodos más comúnmente utilizados son, entre otros, el radioinmunoanálisis (RIA), el inmunoanálisis enzimático (IAE), el inmunoanálisis de polarización por fluorescencia (IAPF) y la inhibición de la aglutinación con látex (IAL). El instrumental que requieren el RIA, el IAE, el IAPF y la IAL (versión instrumental en línea) es relativamente costoso. Los laboratorios pueden utilizar cualquiera de los análisis anteriores a los que tengan acceso.

La técnica que se utilice dependerá en la mayoría de los casos del volumen de trabajo (es decir, del número de muestras diarias) de que se ocupe el laboratorio. Las técnicas IAE y RIA, por ejemplo, se pueden obtener en versiones para pruebas únicas o múltiples. Los laboratorios que tengan un número reducido de muestras pueden utilizar las versiones para pruebas únicas, o IAL (versión para prueba no instrumental *in situ*), pero éstas resultan costosas desde el punto de vista del costo del análisis por muestra. Los inmunoanálisis enzimáticos para pruebas múltiples o el IAPF son más apropiados para un gran volumen de trabajo.

Para reducir al mínimo la posible inexactitud de los resultados, es preciso prestar la debida atención al mantenimiento del equipo, el control del medio ambiente (estabilidad térmica) y el suministro y el almacenamiento (en frío) de los reactivos relativamente inestables. Los resultados falsos pueden ser también consecuencia de la adulteración de los especímenes, por ejemplo, al añadirse agentes modificadores del pH (vinagre, ácido ascórbico, zumo de limón, disolvente de cal, etc.), de oxidación (hipoclorito de sodio), agentes activos de superficie (detergente, jabón, etc.) y de desactivación de enzimas (glutaraldehído), y medicamentos (como gotas oculares o nasales que contengan tetrahidrozolina), edulcorantes (sacarina) y cloruro de sodio. Las manipulaciones más comunes son la dilución endógena (tomar líquidos en exceso, uso de diuréticos) y la dilución exógena (adición de agua), así como también el intercambio o sustitución del espécimen de orina.

Aunque los requisitos en cuanto a capacitación y experiencia no son tan estrictos en algunas técnicas de inmunoanálisis, lo cual facilita la tarea de dotar al laboratorio de personal, los análisis deberían llevarse a cabo bajo la supervisión de analistas con amplia experiencia en la utilización de las técnicas.

Algunas de las características de los principales inmunoanálisis se resumen en el cuadro I.1.

Cuadro I.1 Características generales de los principales inmunoanálisis

<i>Característica</i>	<i>RIA</i>	<i>IAE</i>	<i>IAPF</i>	<i>IAL</i>
Requisito de instrumentación especial	Sí	Sí	Sí	No ^c /sí ^d
Estabilidad de reactivos	3- 4 semanas	Meses	Meses	>1 año ^{c,d}
Costos de reactivos	+	+++ ^a /++ ^b	++(+)	+++ ^{c,d}
Posibilidad de automatización	Sí	Sí	Sí	No ^c /Sí ^d
Pruebas por técnico por turno de 8 h	200-400	100-400 ^b	250-300	200-350 ^c / ^{>} 500 ^d

^aPrueba única

^bAnálisis de orina para determinar uso indebido de drogas (d.a.u.), prueba múltiple.

^cPrueba no instrumental *in situ*.

^dPrueba instrumental en línea.

2. Cromatografía en capa delgada

Los métodos de CCD son económicos en cuanto al equipo y otros gastos iniciales que requieren. Necesitan mucha mano de obra y suelen ser menos sensibles que otras técnicas; además, por el carácter subjetivo de su interpretación, hace falta una experiencia considerable para aplicarlos con precisión. Se recomiendan como análisis de confirmación de los resultados de la detección por inmunoanálisis y como prueba primaria cuando los gastos de mano de obra sean menos importantes que los gastos de capital y se disponga de personal debidamente capacitado.

Cuando los recursos obliguen al laboratorio a emplear únicamente la metodología de CCD, el resultado del análisis no se utilizará como única prueba de la presencia o el uso de una droga si ello entraña graves consecuencias para la persona. En ausencia de equipo más complejo, una solución aceptable podría ser una prueba de confirmación en que se utilice al menos un sistema disolvente distinto o un reactivo de detección diferente.

3. Cromatografía en fase gaseosa y cromatografía en fase líquida de alto rendimiento

La cromatografía en fase gaseosa y la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento son sumamente sensibles y específicas para la confirmación de resultados que se presuman positivos en el análisis de detección. No obstante, el equipo necesario es relativamente costoso en comparación con la CCD o el inmunoanálisis, y la capacitación y la experiencia en el empleo de estos sistemas sumamente complejos son fundamentales.

4. Espectrometría de masas en combinación con cromatografía en fase gaseosa

La espectrometría de masas en combinación con cromatografía en fase gaseosa es el método más sensible y específico de que se dispone para confirmar la presencia de una droga en un espécimen biológico. Exige la mayor inversión en costos de capital, capacitación y mantenimiento. Es el método con menos probabilidades de impugnación en los tribunales y debería considerarse un elemento necesario e importante de los programas nacionales en que el laboratorio de control sea la fuente de confirmación definitiva de análisis cuestionados.

5. Preparación de la muestra

En general, para los inmunoanálisis de detección iniciales la preparación de la muestra es mínima. No es necesario hidrolizar las muestras de orina porque el inmunoanálisis permite medir tanto las formas libres como conjugadas de las drogas y los metabolitos. Quizás sea necesario ajustar el pH o centrifugar la orina para eliminar la turbidez. Para obtener resultados óptimos, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

En los procedimientos de cromatografía, la buena preparación de la muestra es de suma importancia porque la orina es una sustancia compleja que contiene una mezcla de grandes cantidades de numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos en los cuales los analitos que se pretende detectar se encuentran en cantidades ínfimas. La preparación de la muestra suele consistir en la hidrólisis de la orina y en la extracción y purificación de los analitos. El procedimiento ha de ser eficiente, pues la recuperación ha de ser satisfactoria para poder extraer las pequeñas cantidades presentes, y selectivo, para asegurar que se retiren de la muestra las sustancias que pudieran interferir en el análisis.

La preparación de muestras para CG y CG-EM suele entrañar la preparación de derivados químicos de los analitos buscados. Aunque ese paso adicional tal vez requiera tiempo y datos adicionales a causa de la utilización de reactivos, suele recomendarse la derivación por los siguientes motivos:

Ofrece una sensibilidad mayor.

Los compuestos derivados son más estables desde el punto de vista térmico que las formas sin derivar.

Mejoran las propiedades de la cromatografía, es decir, la forma de los puntos máximos, los tiempos de retención y las separaciones.

Los espectros de masas contienen iones más apropiados para la CG-EM en el monitoreo selectivo de iones (SIM) que los de las formas sin derivar.

6. Análisis cuantitativo

Para determinar el uso ilícito de drogas, no es absolutamente necesario utilizar métodos analíticos cuantitativos. No obstante, conviene mucho medir las cantidades de una droga y sus metabolitos encontrados en el método de detección, en particular cuando hay problemas de interpretación.

Por lo general, los métodos cromatográficos permiten cuantificar los analitos de forma fiable. Los métodos de CCD pueden emplearse como procedimiento cuantitativo, pero exigirían el uso de un escáner de placas o un densitómetro y tal vez no resultarían fiables o eficaces en relación con los costos. Además, los métodos de inmunoanálisis no suelen permitir una cuantificación fiable en ese contexto por la posibilidad de que haya en la muestra sustancias no identificadas que puedan provocar reacciones cruzadas.

Para el análisis cuantitativo por CG, CLAR o CG-EM, es preciso añadir un patrón interno a la muestra antes de la extracción. El patrón interno también permite medir el tiempo de retención relativo. Los patrones internos deberán parecerse a los analitos buscados en el sentido de que se presten a la extracción, la derivación y el análisis en las mismas condiciones, y a la vez deberán ser fáciles de diferenciar de esos analitos durante el procedimiento cromatográfico. Ahora bien, debería evitarse el uso como patrón interno de sustancias que puedan encontrarse en la muestra, como otras drogas o materiales endógenos.

Para el análisis cuantitativo por CG-EM, el mejor patrón interno suele ser un análogo del analito marcado con deuterio. No obstante, esos análogos son costosos y a veces cuesta conseguirlos. Otros análogos del compuesto buscado también suelen dar resultados satisfactorios como patrones internos.

Si se toma la decisión de establecer métodos cuantitativos, como consecuencia inmediata será necesario validar el método con respecto a su exactitud y precisión, como se señala más adelante. El coeficiente de variación de un método cromatográfico debería ciertamente ser inferior al 10% y preferiblemente inferior al 5%.

La concentración de un analito puede calcularse utilizando la siguiente fórmula general:

$$\text{Concentración del analito X} = \frac{A_X/A_{IS} \text{ en cromatograma de la muestra}}{A_{RS}/A_{IS} \text{ en cromatograma patrón}} \cdot C_{RS}$$

Donde

A_X	= punto máximo del analito X del cromatograma de la muestra
A_{IS}	= punto máximo del patrón interno del cromatograma de la muestra
A_{RS}	= punto máximo del patrón de referencia del cromatograma patrón
A_{IS} en el cromatograma patrón	= punto máximo del patrón interno del cromatograma patrón
C_{RS}	= concentración del analito X en la solución patrón de referencia

H. Garantía de calidad

Para asegurar la fiabilidad de los resultados, es fundamental contar con personal apto y debidamente capacitado. El respeto de los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), la utilización de procedimientos normales de operación (PNO) y la recapitación periódica del personal ayudarán a mantener la calidad y la fiabilidad del laboratorio.

1. Control de calidad externo

El laboratorio de análisis de drogas deberá tener un programa de garantía de calidad eficaz y debidamente documentado que al menos incluya algún medio de evaluar la exactitud y precisión de todos los análisis. La precisión de los métodos se evaluará haciendo análisis múltiples de una misma muestra o incluyendo un número suficiente de especímenes de control de calidad (con diferentes concentraciones de la droga o el metabolito en el fluido orgánico de que se trate). Ello permitirá al analista hacer evaluaciones estadísticas de la precisión dentro de un mismo lote a lo largo de un período determinado.

2. Evaluación externa de calidad

En lo posible, el laboratorio deberá participar en un programa de control de calidad externo. Lo mejor sería que ese programa estuviera a cargo de un organismo externo independiente como las Naciones Unidas y que se invitara a participar en él a laboratorios de los Estados Miembros. A falta de ese programa, los laboratorios de los países podrán adoptar la siguiente estrategia:

Un programa de control de calidad entre laboratorios: en el marco de este programa los laboratorios intercambiarán muestras para analizarlas y comprobar los resultados obtenidos por los otros laboratorios.

La designación como laboratorio de referencia al principal laboratorio central, el cual enviará muestras con distintas concentraciones del analito o los analitos a todos los laboratorios para que los analicen. Posteriormente el laboratorio de referencia evaluará los resultados de los análisis.

I. Interpretación de los resultados

El análisis cualitativo o cuantitativo de una muestra biológica permitirá probar que una persona ha hecho o no uso de una droga sujeta a fiscalización. La presencia de metabolitos permite determinar que se ha administrado una droga.

Un resultado positivo en la detección inicial significa que la droga o el metabolito se encuentra en la orina en una concentración superior o igual al nivel límite (si se ha establecido tal nivel). La eliminación del organismo y las concentraciones de la droga en la orina dependen de factores como la vía de administración, la frecuencia y la duración del uso, la función de los órganos, la tasa de metabolización de la droga, el estado físico, la edad y el sexo de la persona, su alimentación, el momento en que se ha tomado la muestra, la ingesta de líquidos y otros factores. Es importante señalar, no obstante, que no es posible establecer una relación entre la concentración de una droga en la orina y el grado de trastorno mental.

II. Métodos recomendados para la detección y el análisis de heroína (morfina) en especímenes biológicos

A. Tipos comunes de productos ilícitos de opio, morfina y heroína [7, 8]

1. Opio

El opio es un producto natural obtenido por incisión de las cápsulas verdes de la adormidera. El látex lechoso que rezuma de las incisiones se rasca con la mano y se seca al aire para producir la goma de opio. El opio en bruto es una compleja mezcla que contiene azúcares, proteínas, lípidos, otras sustancias gomosas y agua, de manera que la fracción alcaloide activa constituye sólo el 10% al 20% del peso total. Se han notificado aproximadamente 40 alcaloides. Cuatro o cinco de estos alcaloides pueden considerarse como los elementos constituyentes principales, comprendidos en dos categorías generales, los alcaloides fenantrénicos, representados por la morfina, la codeína y la tebaína, y los alcaloides isoquinolínicos, representados por la papaverina y la narcotina (noscapina).

Las cantidades relativas de los diferentes alcaloides pueden variar considerablemente, según factores como el clima, la altitud, la fertilidad del suelo, la cantidad de humedad disponible, la edad de la planta, el momento de sangrado y la variedad de *Papaver somniferum*.

La morfina es el principal alcaloide del opio, y su concentración oscila entre el 4% y el 21%, y por lo general del 8% al 14%. El opio en bruto producido lícitamente, conocido como opio indio, contiene no menos del 9,5% de morfina, calculado como morfina anhidra.

La narcotina es el segundo alcaloide más abundante, y suele estar presente en un 2% a 8%. No es narcótico y a veces está presente en la morfina en bruto como una impureza.

La codeína se encuentra en el opio en bruto en concentraciones del 0,7% al 3%. Su presencia, como impureza en la morfina en bruto utilizada para la preparación de heroína, da por resultado la formación de acetilcodeína.

La tebaína es un alcaloide secundario presente en la *Papaver somniferum* en una concentración del 0,2% al 1%.

La papaverina suele encontrarse en la concentración de 0,5% a 1,3%.

Otra sustancia característica del opio es el ácido mecónico, presente en cantidades que llegan al 15%. Según la técnica de extracción, éste influye en la pureza de la morfina en bruto aislada del opio.

a) Opio en bruto

En estado fresco, el opio en bruto es una sustancia viscosa parecida al alquitrán, de color marrón oscuro, que puede moldearse en cualquier forma según el método de envase y el país de origen. A medida que madura pierde su consistencia y se hace frágil y duro. Tiene un olor característico parecido al regaliz que se intensifica cuando el producto se disuelve en agua. Es una sustancia no homogénea que contiene fragmentos de cápsulas de adormidera y a veces se adultera con pulpa de banano o colofonia. Suele envolverse en hojas de plantas y recubrirse después con una capa de plástico amarrada con un cordel.

b) Opio preparado

El opio preparado, conocido también como “chandu” en Asia sudoriental, se obtiene aplicando varios métodos al opio en bruto, entre otros, la extracción, filtración y evaporación del agua. Este tratamiento se lleva a cabo para obtener un producto adecuado para fumar.

c) Residuo de opio

El producto que queda en la pipa después que se fuma el opio se denomina residuo de opio. Debido a la combustión y volatilización incompleta, el producto tiene aún algunas características del opio, incluida la presencia de morfina en una cantidad importante. En Asia sudoriental se han notificado mezclas de residuo de opio con opio en bruto y preparado.

d) Opio medicinal

El opio medicinal, conocido también como opio en polvo, es el que se ha secado a una temperatura moderada, reducido a un polvo fino o moderadamente fino y cuyo contenido de morfina se ajusta al requisito de la farmacopea del 9,5% al 10,5% con la adición de lactosa en polvo, vaina de cacao, o

almidón de arroz. Suele ser un polvo marrón ligero compuesto por partículas de color marrón amarillento o rojizo y tiene el olor característico del opio.

Desde el punto de vista químico, las diferencias entre todos los productos del opio antes mencionados son relativamente pequeñas.

2. *Morfina en bruto*

La morfina en bruto obtenida en el mercado ilícito puede ser de calidad muy alta o muy baja, según los procedimientos de purificación utilizados, la finalidad que se persigue con el material y los hábitos, el conocimiento y la competencia profesional del químico ilícito.

3. *Heroína*

Hay que recalcar que dos especímenes de heroína nunca tienen exactamente la misma apariencia física. Fabricada a partir de un producto natural sumamente variable, mediante un proceso discontinuo capaz de una amplia variación, y posteriormente sometida a adulteración y transformación para fines de tráfico, no resulta sorprendente que la heroína se presente en una diversidad de formas. Las que se mencionan en el presente documento son sólo una selección, aunque las más comunes. El hecho de que el material presentado para el examen forense no guarde ninguna relación física con los tipos que se describen aquí no significa, por supuesto, de que no se trate de heroína o un producto que contenga heroína.

a) *Dos tipos de heroína de Asia sudoriental*

Tipo 1: Muy variable de color y consistencia y se ha encontrado prácticamente en toda la tonalidad del beige al marrón oscuro. Casi siempre es un polvo, a menudo fino, pero ocasionalmente se encuentran pequeños agregados en el polvo suaves y que ceden ante una ligera presión. Esta categoría constituye con mucho el principal tipo de esta región. La variación física va aparejada a una composición química muy diversa, pero los especímenes incautados más recientemente indican que se está fabricando un producto más consistente. Normalmente es un polvo fino marrón claro con un olor característico derivado del opio, la pureza de la heroína suele ser del 60%, y todos los alcaloides y derivados están presentes como base. El contenido típico de los demás alcaloides y derivados son:

Acetilcodeína.....	5%
O ⁶ -monoacetilmorfina.....	3%
Narcotina.....	10%
Papaverina.....	4%

Tipo 2: Polvo seco fino de color blanco, blanco-hueso o crema, que tiene menos olor que el del tipo 1, su pureza varía entre el 80% y el 90%, y en que la heroína está presente como sal de hidrocloreto. Algunas muestras de este tipo no pueden diferenciarse de la heroína de “pureza farmacéutica”. El contenido típico de los demás alcaloides y derivados es:

Acetilcodeína.....	3%
O ⁶ -monoacetilmorfina.....	2%
Narcotina.....	NO DETECTADA
Papaverina.....	NO DETECTADA

b) *Dos tipos de heroína del Oriente Medio*

Tipo 1: Polvos finos de color beige o marrón muy claro; pocas veces se encuentran agregados. Las muestras que contengan más del 70% de heroína son raras y la pureza media es de aproximadamente el 50%. Los alcaloides y derivados se presentan como sales de hidrocloreto. El contenido de los demás alcaloides y derivados es:

Acetilcodeína.....	3%
O ⁶ -monoacetilmorfina.....	2%
Narcotina.....	NO DETECTADA
Papaverina.....	NO DETECTADA

Este tipo contiene con mucha frecuencia un adulterante, a menudo un fármaco como la procaína.

Tipo 2: Polvos finos blancos o blanco-hueso. Algunas muestras contienen el 70% al 80% de heroína, mientras que otros tipos parecerían ser una forma diluida del producto de gran pureza, que contienen una cantidad equivalente de cafeína, de modo que la concentración típica de heroína se reduce del 30% al

40%. Los alcaloides y derivados se presentan como sales de hidrocloreto. Estas formas diluidas contienen sólo trazas de acetilcodeína, O⁶-monoacetilmorfina, papaverina y narcotina, pero las formas muy puras suelen contener:

Acetilcodeína..... 2% al 3%
O⁶-monoacetilmorfina..... 2%

c) Dos tipos de heroína de Asia sudoriental

Heroína para fumar “China No. 3”

Material granular duro. Los granos normalmente tienen 1 a 5mm de diámetro, y a diferencia de los agregados de la heroína del Asia sudoccidental, son duros y no ceden a la presión. Sólo una cantidad reducida de polvo está presente en el material. El color más frecuente del material es el gris, aunque a menudo se encuentra en marrón terroso, y hay una variación especial en que los gránulos son rojos o rosados: la “rosada de Penang”. Un análisis típico sería el siguiente:

Material gris o marrón terroso: heroína, 20%; cafeína, 40%; trazas de los demás alcaloides en el material recién producido, aunque en la heroína de este tipo puede formarse rápidamente hasta el 5% de O⁶-monoacetilmorfina mediante hidrólisis. Los alcaloides pueden presentarse como sales o bases de hidrocloreto; algunas muestras pueden presentarse en forma de sal y en forma de base, es decir, que el ácido clorhídrico no se ha añadido en cantidades estequiométricas.

Análisis de material rojo o rosado semejante al material gris o marrón terroso, pero el barbitál sustituye la cafeína.

Heroína para inyectar “China No. 4”

Polvo blanco fino con poco olor y sin agregados. Prácticamente todo el material consiste de heroína. La narcotina y la papaverina no son detectables; la O⁶-monoacetilmorfina suele ser inferior al 3%. El contenido de acetilcodeína con frecuencia es bastante más alto que en el producto de gran pureza equivalente del Asia sudoccidental. Todos los alcaloides se presentan como sales de hidrocloreto.

En todos los tipos de heroína de cualquier origen, hay que señalar que las concentraciones de O⁶-monoacetilmorfina en ocasiones son superiores a las citadas. Los especímenes de heroína de fabricación deficiente a menudo se hidrolizan con la heroína y se convierten en O⁶-monoacetilmorfina. La adición no estequiométrica de ácido clorhídrico (usualmente excesivo) es la causa más frecuente de esa hidrólisis.

Es raro que la hidrólisis produzca un alto contenido de morfina, al menos en la heroína ilícita en forma sólida. El alto contenido de morfina en material recientemente incautado indica muy probablemente un procedimiento de fabricación deficiente.

En el análisis de laboratorio de varios especímenes biológicos de heroína u opiáceos afines como la morfina y la codeína, revisten interés los siguientes compuestos (véanse las estructuras en la figura II.1):

Heroína (diacetilmorfina, DAM)
Morfina
O⁶-monoacetilmorfina (MAM)
Codeína
Acetilcodeína

Además, los diversos morfina-O-glucuronidos (véase la figura II.1) son de primordial importancia para el analista, ya que la parte principal de la heroína se excreta en la orina como morfina conjugada en forma de:

Morfina-3-O-glucuronido (M-3-G)
Morfina-6-O-glucuronido (M-6-G)
Morfina-3,6-O-diglucuronido.

INSERT FIGURE II.1

Figura II.1 Ruta metabólica de los opiáceos

Diacetilmorfina
(Heroína, DAM)

O⁶-monoacetilmorfina (MAM)

Codeína

Morfina

Opio (morfina, codeína)
Semillas de adormidera
(morfina, codeína)

Glucurónido

Morfina-3-O-glucurónido (M-3-G)

4. Vías de administración

La heroína se administra en varias formas: aspirándola o inhalándola, fumándola, o mediante inyección subcutánea o inyección intravenosa. Cuando se administra por inyección, el polvo se disuelve primeramente en agua a menudo con ayuda de calentamiento y acidificación.

5. Metabolismo y excreción

Después de su consumo, la heroína se diacetila rápidamente para convertirse en MAM [15, 16], que luego se hidroliza aún más para convertirse en morfina a un ritmo más lento. En la figura II.1 se indican las rutas metabólicas. Los principales metabolitos de la heroína que se encuentran en la orina en un lapso de 20 a 40 horas después de su administración intravenosa son la M-3-G (38,2% de la dosis), la morfina libre (4,2%), la MAM (1,3%) y la heroína inalterada (0,1%). Se podrán encontrar otros glucurónidos de la morfina, así como normorfina [17] como metabolitos secundarios de la heroína. La codeína se ha encontrado con frecuencia en la orina de personas que consumen heroína ilícita, aunque no es un metabolito de la heroína, sino más bien el resultado de la diacetilación de la acetilcodeína que se halla a menudo como impureza en la heroína ilícita.

Las concentraciones de morfina en la orina después de su administración terapéutica pueden elevarse hasta 10 µg/ml y la sobredosis de heroína puede causar muchas más muertes; por ejemplo, se ha notificado una concentración de 86 µg/ml en un caso [18]. La morfina (y la codeína) también se excreta en la orina después de la ingestión de semillas de adormidera [19].

Debido a su rápido metabolismo, no es práctico determinar la presencia de heroína directamente en los fluidos biológicos humanos (período de semidesintegración: 2 a 3 minutos [18]). Ello normalmente se hace analizando la morfina, su principal metabolito en la orina. El uso de heroína también puede confirmarse determinando la MAM en la orina, pero este metabolito específico sólo puede detectarse poco después del consumo de heroína (tiempo de detección: 2 a 8 horas [19]). ya que posteriormente también se metaboliza a morfina con relativa rapidez (período de semidesintegración: 0,6 horas [19]). Para detectar la MAM se requiere un procedimiento de extracción modificado e instrumentos más complejos. En la mayoría de los casos ello quizás no sea necesario.

B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de la heroína y sus metabolitos

Se pueden utilizar los procedimientos generales de muestreo expuestos en la sección I. C y G.5.

1. Preparación de la muestra para el inmunoanálisis

En general, se necesita poca o ninguna preparación de la muestra para los inmunoanálisis (véase también la sección I.G.5). No es necesario hidrolizar las muestras de orina porque los inmunoanálisis permiten medir tanto las formas libres como conjugadas de la droga y los metabolitos. Quizás sea necesario ajustar el pH o centrifugar la orina para eliminar la turbidez. Para obtener resultados óptimos, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

2. Preparación de la muestra para la cromatografía

El volumen de orina necesario para el análisis depende de la técnica cromatográfica que se vaya a emplear. El volumen recomendado para la CCD y la CG de columna de relleno es de 10 ml y para otras técnicas cromatográficas, de 5 ml.

a) Hidrólisis

Hidrólisis ácida

En una probeta de encaje rápido de 50 ml, se agrega 1 ml de ácido clorhídrico concentrado a 10 ml de orina, se tapa la probeta sin ajustarla y se incuba en un baño de agua a 100°C durante 60 minutos aproximadamente.

Hidrólisis enzimática

Se ajusta la muestra de orina (5 a 10 ml) a pH 7 añadiéndole ácido acético si se encuentra que es alcalino. Luego se agrega 0,1 ml de solución tampón de 0,1 M de acetato de sodio y ácido-acético (pH 5,5) y 0,02 ml de β-glucuronidasa (75 unidades/ml) por ml de orina. Se incuba la muestra por 24 horas a 37°C u opcionalmente por una hora a 55°C. Conviene asegurarse de que la temperatura no exceda de

55°C para evitar que se desnaturalice la enzima. Se procede con la extracción de la morfina libre como se describe a continuación.

Precaución

La hidrólisis ácida y enzimática puede producir la desacetilación de la MAM a morfina.

b) Extracción

Extracción líquido-líquido

Ajustar el pH de la orina de 8,5 a 9,0 y extraer con el doble del volumen de cualesquiera de los siguientes disolventes orgánicos:

- Cloroformo-isopropanol (9:1, v/v)
- Diclorometano-isopropanol (9:1, v/v)
- Acetato de etilo.

Hay que tomar precauciones para que la capa acuosa se separe completamente de la capa del disolvente antes de separar el extracto a fin de evitar que éste contenga agua. Si ocurren problemas con las emulsiones, se puede filtrar el extracto con un papel filtro tratado con sílica (papel de separación de fases); frenar la emulsión mediante sonicación. Cuando se requiere un extracto más puro, hay que volver a separar la solución orgánica con 6 ml de 0,5 M de ácido clorhídrico. Descartar la capa orgánica y ajustar la solución acuosa a un pH de 8,5 a 9,0; luego volver a separar con uno de los disolventes citados. Separar las capas orgánicas, combinar, filtrar la solución mediante una pequeña cantidad de sulfato de sodio seco, lavar el filtro con 5 ml de la fase orgánica. Concentrar la solución a aproximadamente 1 a 2 ml y evaporar hasta que esté totalmente seco el resto del disolvente bajo un chorro de nitrógeno. Volver a disolver el residuo en 0,1 ml de metanol o metanol-cloroformo (9:1) para efectuar el análisis de CCD o CG.

Extracción en fase sólida

Cuando se dispone de las instalaciones adecuadas, se puede utilizar el método para la extracción líquida con apoyo de "Celite" [20]. También se recomienda el método de extracción en fase sólida con el empleo de sílice C-18 [21].

Antes de utilizar las columnas, limpiarlas con 5 ml de metanol, 3 ml de agua destilada y 1 ml de 0,05 M de solución tampón de bórax (pH 9,0). Mezclar la muestra de orina (1 ml) con 50 ml (= 50 ng) de patrón interno de nalorfina y 1,0 ml de solución tampón (pH 9,0) y pasarla a una columna de sílice C-18. Lavar la columna con 100 ml de 80% de metanol acuoso y luego proceder a la elusión de la morfina con 0,5 ml de metanol.

c) Patrones internos

Los patrones internos deberán responder a las normas establecidas en la sección I.G.6. La nalorfina sirve para la CG. Para la CG/EM, los patrones internos preferidos son los análogos deuterados de la morfina o de los compuestos afines. Si no se pueden conseguir, se utilizarán algunos de los patrones antes indicados para la CG. Un patrón interno adecuado para la CLAR es el 1- α -acetilmetadol • HCl.

d) Patrones de calibración

Para la CG, preparar soluciones madre independientes de morfina y nalorfina en metanol en una concentración de 1 mg/ml. De estas soluciones madre, preparar patrones de calibración acuosos que contengan de 0 a 10 μ g/ml de morfina y 5 μ g/ml de nalorfina.

Para la CLAR, se preparan en metanol soluciones madre de 1- α -acetilmetadol • HCl, DAM, MAM y morfina en una concentración de 1 mg/ml, y se almacenan en una refrigeradora. Se preparan patrones de calibración diluyendo la solución madre con metanol-acetonitrilo (20:80, v/v).

C. Métodos de detección

1. Métodos de inmunoanálisis

Se recomienda que la detección inicial se haga con inmunoanálisis siempre que los laboratorios tengan acceso a tales técnicas. Se recomiendan, pues, el radioinmunoanálisis, el inmunoanálisis enzimático, el inmunoanálisis de polarización por fluorescencia, el análisis de inhibición de la aglutinación sanguínea y la inhibición de la aglutinación con látex. Los anticuerpos de los módulos de inmunoanálisis comerciales están orientados hacia la morfina, pero pueden provocar una reacción cruzada con otros opiáceos [22]. En

el cuadro II.1 figura un resumen de las reactividades cruzadas correspondientes a algunas pruebas comerciales.

Cuadro II.1 Reactividades cruzadas de la morfina obtenidas con módulos de inmunoanálisis comerciales

<i>Análisis</i>	<i>Reactividad cruzada (%)</i>			
	<i>Morfina</i>	<i>MAM</i>	<i>M-3-G</i>	<i>Codeína</i>
Coat-A-Count	84 (300) ^{a,b}	0 (100)	1 (618)	0,1 (600)
Abuscreen-RIA	85 (300) ^{a,b}	15 (100)	52 (618)	198 (300)
IAEPM – d.a.u.	86 (300) ^{a,b}	16 (100)	45 (618)	330 (300)
IAPF – TDx	90 (300) ^{a,b}	93 (50)	64 (185)	111 (300)
Abuscreen-Ontrak	100 (300) ^{c,d}	--	86 (350)	171 (175)
Abuscreen-Online	100 (300) ^{c,d}	97 (311)	62 (480)	134 (255)

a Reactividad cruzada aparente calculada dividiendo la concentración aparente por la concentración deseada y multiplicando por 100 (la concentración entre paréntesis, en que se determinó la reactividad cruzada, ng/ml).

b Véase Edwards [14].

c Reactividad cruzada calculada dividiendo la concentración deseada (300 ng/ml) por la concentración equivalente a 300 ng/ml de morfina y multiplicando por 100 (equivalentes entre paréntesis, ng/ml).

d Información del fabricante.

2. Cromatografía en capa delgada

Técnica estándar de CCD

En el Manual de las Naciones Unidas titulado *Métodos recomendados para el ensayo de opio y morfina en bruto* [8] figuran los detalles referentes a los materiales y procedimientos que se emplean en la técnica estándar de CCD, los cuales se aplican al análisis de extractos biológicos para detectar morfina.

Placas para la CCD

Revestimiento:	Gel de sílice activado G. También puede emplearse gel de sílice que contenga un aditivo fluorescente bajo luz ultravioleta, con una longitud de onda de 254 nm
Espesor de la capa:	0,25 mm
Tamaño de las placas:	Placas de vidrio de 20 X 20 cm, 20 X 10 cm ó 10 X 5 cm. El recorrido óptimo es de aproximadamente 10 cm

Soluciones tipo

Morfina.

Codeína.

Hacer todas las soluciones tipo a una concentración de 1 mg/ml en metanol y aplicar 5 a 10 µl de cada solución a la placa. Se puede emplear indistintamente una sal o una base, ya que en las placas de CCD los compuestos siempre se comportan como las bases libres.

Procedimiento

Con 25 y 50 µl del extracto manchar la placa (véase la sección II. B.d.) que luego se revela en uno de los sistemas de disolventes que figuran a continuación.

Disolventes para el revelado [8, 23]

Sistema A:	Tolueno	45
------------	---------	----

	Acetona	45
	Etanol	7
	Amoníaco concentrado	3
Sistema B:	Acetato de etilo	85
	Metanol	10
	Amoníaco concentrado	5

Visualización

Las placas deberán estar secas antes de la visualización. Esto se puede conseguir dejándolas secar a temperatura ambiente o, más rápidamente, en un horno a 120°C durante 10 minutos, o utilizando un secador de aire caliente. Para un revelado adecuado de los colores es importante eliminar de la placa todo resto de amoníaco u otras bases. Se recomiendan los siguientes métodos de visualización [7, 8, 24]:

Luz ultravioleta a 254 nm.

Reactivo de Dragendorff.

Mezclar 2 g de subnitrito de bismuto (oxinitrato de bismuto), 25 ml de ácido acético concentrado (glacial) y 100 ml de agua para obtener la solución A; disolver 40 g de yoduro potásico en 100 ml de agua para obtener la solución B. Para obtener el reactivo de Dragendorff, mezclar 10 ml de la solución A, 10 ml de la solución B, 20 ml de ácido acético concentrado (glacial) y 100 ml de agua.

Reactivo de yodoplatinato potásico acidificado

Disolver 0,25 g de cloruro platínico y 5 g de yoduro potásico en agua hasta completar 100 ml. Éste es el reactivo de yodoplatinato potásico. Para acidificarlo se añaden 2 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Reactivo de fluorescencia [24]

- i) Solución tampón AMP: Agregar 105 mg de 2-amino-2-metil-1,3-propanediol a 18,8 ml de ácido clorhídrico concentrado y disolver con agua hasta obtener 1.000 ml (pH 9,3 ± 0,2).
- ii) Solución de ferrocianuro potásico: Disolver 58 mg de ferrocianuro potásico en 100 ml de agua destilada y guardar en la refrigeradora. (Preparar una nueva solución después de una semana).

Primeramente, observar la placa con luz ultravioleta. La morfina produce manchas anaranjadas sobre fondo amarillo con el reactivo de Dragendorff, manchas de azul a púrpura cuando se rocía con el reactivo de yodoplatinato y es fluorescente con el reactivo de fluorescencia bajo una luz ultravioleta.

Resultados

Cuadro II.2 Valores $R_f \times 100$ [8]

<i>Compuesto</i>	<i>Sistema de revelado</i>	
	<i>A</i>	<i>B</i>
Morfina	19	20
Codeína	40	35

D. Métodos cromatográficos de confirmación

1. Cromatografía en fase gaseosa

a) Derivación de las muestras

Sililación

El extracto de orina se evapora hasta que esté totalmente seco con un chorro de nitrógeno y el residuo se deriva con 20 µl de *N,O*-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) o *N,O*-bis-trimetilsililacetamida (BSA) en una ampolla cerrada calentándolo a 85°C durante 15 minutos. Opcionalmente se puede utilizar una mezcla del reactivo de sililación y piridina (1:1, v/v) en lugar de los reactivos puros de sililación. La mezcla se inyecta directamente en el cromatógrafo.

Si se utiliza un detector de nitrógeno-fósforo (DNF), la sililación se puede llevar a cabo empleando un reactivo de sililación volátil como la *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MTSFA) o una mezcla

de hexa-metildisilano (HMDS), el trimetilclorosilano (TMCS) y la piridina. Los extractos derivados pueden evaporarse hasta que estén totalmente secos y la muestra reconstituirse en un disolvente seco como el tolueno antes de la inyección (1 a 2 µl) a la columna de CG.

Los derivados deberían prepararse poco antes del análisis, ya que los silil derivados no son muy estables.

Acilación

Añadir 50 µl de anhídrido pentafluoropropiónico (APFP) al extracto de orina y calentar la mezcla durante 30 minutos a 65°C en una probeta sellada. Evaporar el exceso de reactivo de APFP con un chorro de nitrógeno y reconstituir el residuo con 50 µl de acetato de etilo. Los derivados son estables en el reactivo durante meses y después de la evaporación del reactivo durante 24 horas como mínimo.

b) Técnica de la columna de relleno [8]

Condiciones de trabajo

Detector: Detector de ionización de llama

Nota: Para lograr una mayor sensibilidad y especificidad se recomienda un detector de nitrógeno-fósforo: los parámetros de trabajo deben coincidir con las recomendaciones del fabricante. Deberán elegirse preparaciones de la muestra y procedimientos de derivación que no contengan disolventes ni reactivos con nitrógeno en la solución final que se inyecta en el cromatógrafo.

Columna:	2 m X 2 a 4 mm de D.I.
Relleno:	a) Dimetil silicona (SE-30, OV-1) b) Fenilmetil silicona, 50% fenilo (OV-17)
Gas portador:	Nitrógeno a 70 ml/min
Temperaturas de trabajo:	Inyector: 275°C Horno: 230°C Detector: 275°C

Nota: Es preciso preparar todas las columnas de relleno antes de utilizarlas. Normalmente la temperatura de acondicionamiento debe ser por lo menos 30°C superior a la temperatura en que deberá hacerse el análisis, salvo que ésta supere la temperatura máxima de trabajo de la columna especificada por el fabricante. En este caso deberá utilizarse un margen de diferencia menor y extenderse considerablemente el período de acondicionamiento. Generalmente las columnas se acondicionan durante la noche, o por un mínimo de 15 horas.

El acondicionamiento se efectúa con el flujo normal de gas portador y con la columna desconectada del detector.

Nota:

- Silanizar las columnas de vidrio con frecuencia para evitar la adsorción de morfina durante las determinaciones de la CG;
- Limpiar el orificio de inyección y el detector con regularidad para evitar la descomposición de las muestras y la pérdida de sensibilidad del detector;
- Manipular con cuidado los agentes silanizantes porque son muy reactivos y sensibles a la humedad.

c) Técnica de la columna Megabore

Condiciones de trabajo

Detector:	Detector de ionización de llama
Columna:	Sílice fundida, 10 m X 0,53 mm de D.I. con 2,6 µm químicamente ligado con dimetil silicona en fase estacionaria, es decir, OV-1
Gas portador:	Helio a 25 ml/min
Temperaturas de trabajo:	Inyector: 280°C Horno: 260°C Detector: 300°C

Nota: En el Manual de las Naciones Unidas titulado Métodos recomendados para el ensayo de opio y morfina en bruto [8] también se describe una técnica apropiada de columna capilar. Las dimensiones de la columna capilar, la fase estacionaria, el espesor de la fase, el gas portador y el caudal utilizados pueden variar de los citados anteriormente, según su disponibilidad. Sin embargo, se recomienda el uso de una columna no polar, que es de aplicación general para el análisis de muestras biológicas. Las condiciones óptimas de trabajo para el sistema se seleccionarán según las recomendaciones del proveedor.

2. Cromatografía en fase gaseosa – espectrometría de masas

a) Análisis cualitativo

Condiciones de trabajo

Columna:	Sílice fundida, 25 m X 0,31 mm de D.I. con 0,17 µm de fenilmetil silicona en fase estacionaria cruzada al 5%.
Gas portador:	Helio a 1,8 ml/min
Temperaturas de trabajo:	Inyector: 280°C Horno: 230°C
Ionización:	Modo IE a 75 eV

Los principales iones en los espectros de masas de los derivados de la morfina y la trimetilsilil nalorfina utilizados para seleccionar el monitoreo de iones en una espectrometría de masas figuran en el cuadro II.3.

Cuadro II.3 Principales iones en los espectros de masas de la morfina, la MAM, la codeína y los patrones internos (derivados de TMS y TFA - SIM)

Compuesto	Principales fragmentos iónicos m/z
Morfina-diTMS	414, 429
Nalorfina-diTMS	441, 455
Morfina-diTFA	364, 477
<i>d</i> ₃ -morfina-diTFA	367, 480
MAM-TFA	311, 364, 423
<i>D</i> ₃ -MAM-TFA	367, 426
Codeína-TFA	282, 395
<i>d</i> ₃ -codeína-TFA	285, 398

b) Análisis cuantitativo [25]

Condiciones de trabajo

Columna:	Sílice fundida, 12 m X 0,2 mm de D.I. con 0,33 µm de dimetilpolisiloxano en fase estacionaria cruzada al 100%
Gas portador:	Helio a 1,9 ml/min
Temperaturas de trabajo:	Inyector: 250°C Horno: 150 a 300°C a 12°C/min
Técnica de inyección:	“Splitless”
Ionización:	Modo IE a 75 eV
Iones:	Derivados de MSI, TFA (véase el cuadro II.3)

Cuantificación

Calibración de un punto utilizando los coeficientes iónicos de los analitos y sus correspondientes patrones internos deuterados. Codeína 395/398; morfina 364/367; MAM 423/426.

Extracción

Se ajusta 1 ml de orina a pH 7,0 agregando 3 ml de solución tampón pH 7,00. Se añade una solución de mg/ml de d_3 -codeína, d_3 -morfina y d_3 -MAM y se somete a rotación acelerada la mezcla. La orina se pasa a través de una columna de extracción en fase sólida (Bond-Elut Certify) acondicionada previamente con 3 ml de metanol y 3 ml de agua destilada. La columna se lava alternativamente con 3 ml de agua, 3 ml de solución tampón de 0,1 M de acetato sódico (pH 4,5) y 3 ml de metanol. Después de secarse la columna (al vacío, 1 a 2 minutos), los analitos se eluyen con 3 ml de diclorometano-isopropanol-amoniaco concentrado (80:20:2) (recién preparada).

Derivación

Derivados de TFA: El residuo del eluyente evaporado (N_2 , 50 a 60°C) se reconstituye con 200 μ l de cloroformo y 100 μ l de anhídrido trifluoroacético (ATFA), se somete a rotación acelerada y se calienta a 70°C durante 15 minutos. Después de enfriarse y evaporarse a sequedad (N_2 , 50 a 60°C), el residuo se vuelve a disolver en 100 ml de cloroformo y se inyecta una alícuota de 2 μ l en la CG/EM.

3. Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento

Se han publicado diversos métodos para el análisis de la morfina mediante la CLAR. Se han empleado diversas técnicas de detección, como la absorción y fluorescencia UV. Algunos de ellos tienen la desventaja de acusar poca sensibilidad o requerir una preparación tediosa de la muestra. La detección electroquímica brinda una opción sensible y práctica. A continuación se describen dos métodos.

Condiciones de trabajo

Método A [16]

Columna:	Sílice (LiChrosorb Si-60 o equivalente), 5 μ m, 30 cm X 4 mm de D.I.
Fase móvil:	Acetonitrilo-metanol-solución-A-solución B (75:25:0,04:0,216, v/v/v/v) Solución A: Mezclar amoniaco concentrado y metanol (1:2, v/v) Solución B: Mezclar ácido acético glacial y metanol (1:1, v/v)
Caudal:	1,3 ml/min
Detección:	UV a 218 nm

Método B [26, 27]

Columna:	Columna en fase invertida de octadecilsílice, 5 μ m, 25 cm X 4,6 mm de D.I.
Fase móvil:	100 ml de acetonitrilo y 900 ml de solución tampón de 0,2 M de perclorato sódico/0,005 M de citrato sódico (filtrar a través de un filtro de membrana de 0,5 μ m antes de utilizarse)
Caudal:	1,9 ml/min
Detección:	Detección electroquímica, electrodo de carbón vítreo

Nota: *La determinación de morfina-3-O-glucurónido (M-3-G) y morfina-6-O-glucurónido (M-6-G) en la orina con CLAR y la detección electroquímica o UV se mencionan en otros lugares [28, 29].*

E. Análisis por CG/EM de monoacetilmorfina como indicador del consumo de heroína

Se dispone de diversos métodos para la detección y la determinación cuantitativa de los nanogramos de O^6 -monoacetilmorfina (MAM) contenidos en las muestras de orina de los heroinómanos. Según un método [30], la detección de MAM se basa en la extracción en fase sólida de la orina con un pH alcalino, mediante una columna de octadecilo, y la transformación subsiguiente en el derivado pentafluoropropionil (PFP). El pentafluoropropionato de monoacetilmorfina se separa y se identifica por la CG/EM con el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) utilizando nalorfina o d_3 -morfina como patrones internos. En la sección II.D.2 se describe otro método de CG/EM [25] en que se emplean derivados de TFA y el SIM. Una identificación positiva de MAM puede servir para distinguir entre el consumo de heroína (o MAM) y el uso indebido de morfina, codeína, opio o semillas de adormidera.

1. Preparación de la muestra y derivación

Nota: *No hay que hidrolizar las muestras de orina antes de este análisis porque tanto la hidrólisis ácida como la enzimática pueden provocar la hidrólisis de MAM a morfina.*

Agregar 1 ml de solución tampón (pH 9) a 10 ml de orina en un tubo centrífugo de 25 ml. Verificar que el pH sea de 8 a 9. Utilizar una columna de extracción en fase sólida C-18 que se acondiciona

lavándola alternativamente con 5 ml de metanol y 5 ml de agua destilada. Pasar la muestra de orina por la columna.

Lavar la columna dos veces con agua destilada. Agregar una gota de amoníaco concentrado, luego lavar nuevamente la columna con agua destilada. Secar la columna haciendo pasar aire por ella (5 minutos). Recuperar MAM y morfina por elusión doble de la columna con 0,75 ml de diclorometano-acetona (1:1, v/v). Evaporar la elución en un tubo de ensayo de 2 ml a 60°C. Disolver el residuo en 100 µl de diclorometano-acetona (1:1, v/v) y transvasar la solución a un tubo de 1,5 ml. Evaporarlo con un chorro suave de nitrógeno a 65°C.

Agregar 50 µl de anhídrido pentafluoropropiónico (APFP). Mantener la mezcla durante 30 minutos a 65°C en una probeta sellada. Evaporar el exceso del reactivo de APFP con un chorro de nitrógeno. Reconstituir el residuo con 50 µl de acetato de etilo. Inyectar 1 µl en la CG/EM.

Otra técnica posible, en que se utiliza una extracción por disolvente simple, se describe en otros lugares [31].

2. Condiciones de trabajo

Se aplican las condiciones especificadas anteriormente (véase la sección II.D.2. Para detectar los derivados PFP de la morfina, codeína y MAM, se controlan los siguientes iones: m/z 361, 414, 445, 473 y 577. El ión a m/z 603 se utiliza para el patrón interno.

F. Interpretación de los resultados

El resultado positivo del inmunoanálisis inicial de detección denota la presencia de un opiáceo en la orina a un nivel superior o igual al nivel límite, presencia que deberá confirmarse por un método que sea sensible pero más específico que el análisis inicial. La retención de opiáceos en el cuerpo y las concentraciones reales de la droga en la orina dependen de factores tales como el metabolismo de la droga, la condición física del sujeto, la cantidad del líquido ingerido y la forma de administración. En general, al usar el método citado los opiáceos pueden detectarse en la orina durante un plazo máximo de tres días.

La heroína, el opio, la codeína y la propia morfina, por seguir la misma ruta metabólica, pueden ser fuentes de morfina y de morfina-3-glucurónido en la orina. Además, otros opiáceos, como la etilmorfina, la folcodeína y la nicomorfina, también pueden ser fuentes de morfina [18]. Por lo tanto, la presencia de morfina en la orina no indica en sí cuál ha sido el opiáceo consumido.

Si tras los resultados analíticos se suscitan dudas sobre la fuente de la morfina, el análisis de detección o cuantitativo del compuesto originario, o ambos, así como la modalidad de excreción de otros metabolitos principales pueden dar una información más precisa sobre la droga ingerida. Por ejemplo, la detección de MAM puede considerarse como prueba del consumo de heroína [19, 30, 32].

En el caso de la codeína, si bien el tema sigue siendo hasta cierto punto polémico, generalmente se acepta que si la relación entre el total de codeína y el total de morfina es inferior a 0,5 y la concentración total de morfina en la orina es superior a 200 ng/ml, puede excluirse la codeína como fuente de la morfina presente [33, 34].

III. Métodos recomendados para la detección y el análisis de cannabinoides en especímenes biológicos

A. Tipos comunes de productos de la cannabis [9]

1. *Productos herbáceos (marihuana)*

La cannabis (*Cannabis sativa L.*) es una planta muy común en todas las zonas templadas y tropicales del mundo, y la mayoría de los países han informado del cultivo y tráfico ilícitos de sus productos herbáceos. El cultivo ilícito en gran escala de esta planta para elaborar productos de hierba de cannabis tiene lugar en América del Norte y del Sur, en el Caribe, África y el Asia sudoriental. La presentación de la materia herbácea en el tráfico ilícito varía no sólo de una a otra región, sino también dentro de los países de cada región.

Se cree tradicionalmente que sólo los ápices floridos y con fruto y las hojas de la planta de cannabis contienen cantidades importantes de los constituyentes psicoactivos (por ejemplo, tetrahidrocannabinol); se las conoce como las “partes que contienen droga”, y generalmente son sólo estas partes las que se venden en el tráfico ilícito. Dichas partes pueden ser arrancadas de la planta y ésta seguirá creciendo. El tallo central y los tallos laterales principales de la planta no se arrancan ni sirven para nada en la fabricación de productos ilícitos de la cannabis. Otra posibilidad es tomar toda la planta, cortando el tallo principal por debajo de los tallos laterales más bajos que lleven hojas. La materia herbácea separada, o las plantas enteras, se dejan secar al aire, generalmente esparciéndolas en el suelo o, si se trata de una cantidad relativamente pequeña, poniéndolas en bandejas poco profundas. Las plantas enteras pueden secarse suspendiéndolas invertidas y, una vez ya secas, las partes de la planta que contienen la droga se separan del tallo central y de los tallos laterales principales. Según sea el proceso posterior aplicado a la materia seca, la hierba puede presentarse de muy diversos modos. Las partes separadas pueden ser fuertemente comprimidas para formar bloques de materia herbácea (la cannabis de África occidental y del Caribe se comercia frecuentemente de esta forma). Otra posibilidad es dejar la cannabis como materia herbácea suelta (muestras procedentes de algunos países del África central y meridional y de países del Asia sudoccidental y sudoriental suelen presentarse de esta forma). Una presentación menos común es cuando la materia herbácea se enrolla en forma de “mazorca de maíz” y se envuelve con una fibra vegetal burda (África central y meridional).

Si para el tráfico ha de obtenerse un producto de alta calidad, se utilizan únicamente los ápices floridos y con fruto. La mayor parte de las veces se preparan en barritas; a menudo las inflorescencias se atan con un cordel alrededor de una caña central de bambú. Esas barritas pesan unos dos gramos (brutos), tienen aproximadamente ocho centímetros de largo y se conocen en el tráfico ilícito como “barritas de Buda” (Asia sudoriental). Con frecuencia, cuando son incautadas en el tráfico ilícito, se encuentran en haces de hasta 20 unidades. Otra posibilidad es que los ápices floridos y con fruto se dispongan formando un rollo pequeño forrado en papel de estraza (Sudáfrica). Estos rollos son considerablemente menores que los del Asia sudoriental. Normalmente hay menos de 0,5 gramos de cannabis por rollo y apenas llevan semillas.

Puede elaborarse un producto de alta calidad pasando la hierba de cannabis por un cedazo para eliminar aquellas partes de la planta que contienen niveles relativamente bajos de cannabinoides, o no los contienen en absoluto. Esencialmente, esto elimina las semillas y casi todas las partes menos valiosas del tallo. Todo lo que pasa por el cedazo se ha obtenido de los ápices floridos o con fruto, o de las hojas de la cannabis. Tiene el aspecto de materia herbácea cortada finamente. En el tráfico ilícito se denomina “kif”. Es un producto característico del norte de África. Esa materia tiene un alto contenido de resina de cannabis y puede comprimirse en tabletas que tienen cierta semejanza física con las tabletas de resina de cannabis hechas en la misma región. Sin embargo, cuando se someten a examen microscópico, se ve que han conservado características esencialmente herbáceas. Esta materia, ya sea suelta o comprimida en tabletas pequeñas, tiene el mismo perfil de cannabinoides que las tabletas de resina de cannabis hechas en la misma región.

Otro producto de alta calidad es la sinsemilla. La sinsemilla se produce retirando las plantas masculinas de cannabis de las inmediaciones de las plantas femeninas de cannabis, antes de que la planta masculina haya liberado su polen. Las plantas femeninas no llegan nunca a ser fertilizadas y, en consecuencia, no producen semillas. Quienes participan en el cultivo ilícito de cannabis afirman que las partes de tales plantas que contienen resina contienen también una mayor concentración de productos químicos psicoactivos (por ejemplo, THC) que las plantas femeninas ordinarias que se han dejado fertilizar

en la forma normal. El análisis forense corroboraría esta afirmación. Se comprueba que la sinsemilla contiene niveles superiores de cannabinoides, especialmente THC.

Cabe señalar que la supresión de las plantas masculinas del entorno de las plantas femeninas antes de que haya ocurrido la fertilización se ha practicado durante muchos años, por ejemplo, en el subcontinente indio. Se sabía que de lo contrario, las plantas femeninas granarían y se obtendría una cosecha muy baja de “ganja”. Sin embargo, invariablemente en ese material estaban presentes unas pocas inflorescencias con semillas. Esto puede haber ocurrido porque la cannabis no es totalmente una planta *dioica*. En cualquier campo extenso de plantas de cannabis algunas serán *monoicas*, esto es, que tienen tanto flores masculinas como femeninas.

La sinsemilla sigue siendo un producto cultivado sólo en América, si bien en otros lugares se han efectuado también incautaciones de sinsemilla. Sin embargo, el material incautado en estos casos había sido cultivado en América.

2. Productos de resina (hachís)

La producción de resina de cannabis se concentra principalmente en dos regiones del mundo. Los países situados alrededor de la parte meridional y oriental del Mediterráneo constituyen una de esas regiones y los del subcontinente indio la otra. En ambas regiones se han utilizado diversos procedimientos para fabricar resina de cannabis. No obstante, en general, los países de una misma región utilizan técnicas análogas. Esto tiene como consecuencia que hay dos “familias” de resina de cannabis. Los países de la zona meridional y oriental del Mediterráneo elaboran un grupo de productos de resina de cannabis y los países del subcontinente indio fabrican un segundo grupo de productos. Sin embargo, en ambas regiones existe cierta semejanza en los métodos utilizados para fabricar resina de cannabis; por ejemplo, en ambas regiones hay métodos en los que el cernido es parte importante del procedimiento.

La resina de un determinado país de cualquiera de estas regiones mostrará mucha más semejanza *física* con la de otro país de la misma región, que con una resina procedente de la otra región. (Puede haber diferencias importantes en el perfil de cannabinoides de las resinas de una misma región).

a) Resina de cannabis de los países del Mediterráneo

La materia herbácea se bate, a menudo contra una pared. Este proceso es para separar las partes de la planta que producen resina de las que no la producen y, en consecuencia, son bajas en componentes psicoactivos. Las partículas de resina, las de hojas, así como las semillas de cannabis, se separan de las partes más fibrosas de la planta. Éstas últimas se desechan. Después, el material se cierne (las semillas y las partes fibrosas menores se eliminan). El producto que queda tiene ahora un mayor contenido de resina. En esta etapa las características herbáceas macroscópicas quedan prácticamente destruidas, pero microscópicamente el material presenta aún muchos rasgos herbáceos. Físicamente se asemeja a un polvo fino y en esta etapa se comprime en tabletas. En algunos países (Mediterráneo oriental) antes de comprimirla, la materia se coloca en bolsas de tela; en otros países (África septentrional) antes de la compresión se envuelve en celulosa. En una zona (Mediterráneo nororiental) el material circula ocasionalmente en forma de polvo fino sin haber sido transformado en tabletas.

b) Resina de cannabis del subcontinente indio

En los países del subcontinente indio se utiliza un método diferente para producir la resina de cannabis. Los ápices floridos y con fruto de las plantas de cannabis que se cultivan en los países del subcontinente indio contienen altos niveles de resina, hasta el extremo de que ello hace que estas partes de la planta sean pegajosas al tacto. Cuando estos ápices de las plantas se frotan entre las palmas de las manos, la resina queda adherida a éstas.

En consecuencia, la producción de resina de cannabis en los países del subcontinente indio se basa en un proceso de frotamiento o amasadura, y no en uno de batido. Para ello pueden utilizarse diversos métodos. Los que a continuación se describen pueden considerarse como representativos del proceso.

El frotamiento entre las palmas de las manos de las partes de la planta de cannabis que contienen la resina supone un método lento y laborioso. A medida que el material se frota se va adhiriendo a las palmas de las manos una capa delgada de resina de cannabis. Una vez extraída toda la resina mediante frotamiento, la planta se tira (puede utilizarse como producto de calidad inferior, haciéndose con ella, por ejemplo, una infusión similar al té). La resina que se ha adherido a las palmas de las manos se quita raspándola con el filo de un instrumento metálico, y puede depositarse en un cuenco. Entonces otro montón de cannabis se somete al mismo proceso de frotamiento. Poco a poco va aumentando la resina de

cannabis depositada en el cuenco. Una cantidad adecuada de resina se saca del cuenco y se comprime o se enrolla en forma de tabletas, barrita, bolas o en la forma preferida en cada localidad.

Otro método es frotar los ápices floridos y con fruto de la cannabis contra una hoja de goma. La resina de cannabis pasa a la hoja de goma y de ésta puede rasparse y recogerse en cantidades adecuadas para producir tabletas. Este método puede variarlo la persona que cosecha la resina de cannabis, quien puede llevar consigo una hoja de goma, cuero o un tejido similar, mientras recorre el campo de plantas de cannabis. La resina se acumula en la hoja de goma a medida que se frotran los ápices floridos y con fruto de las plantas y, cuando se ha recogido suficiente, la hoja de goma puede rasparse hasta que quede limpia. Seguidamente se producen las tabletas, y se aplica el proceso descrito anteriormente.

Los ápices floridos y con fruto pueden recolectarse de forma semejante a la utilizada en la producción de hierba de cannabis. Después se dejan secar y se rompen y trituran entre las manos dando un polvo grueso. Este polvo se pasa entonces a través de cedazos para que alcancen una fineza similar a la que se obtiene en el Mediterráneo. El polvo fino, que es todavía verde, se almacena en sacos de cuero durante cuatro a cinco meses hasta que el clima vuelva a ser cálido. El polvo se expone al sol por corto tiempo, suficiente para que la resina se derrita. El polvo se vuelve a poner en los sacos de cuero algunos días, después de lo cual se saca y se moldea bien con varillas de madera, de modo que una cierta cantidad de materia aceitosa aparezca en la superficie. El amasamiento continúa hasta que se produce un material adecuado para su compresión en tabletas.

Por último, en algunas localidades del subcontinente indio se utiliza un método fundamentalmente diferente. En lo que a cantidad se refiere, en esta forma se produce poca resina de cannabis. La materia vegetal, separada de los tallos principales, se sumerge en agua hirviendo. Esto separa la resina de los ápices floridos y con fruto (compárese el modo en que, al hervirse la carne, las grasas animales se separan de ella). La cannabis a la que ya le ha sido extraída la resina se desecha (puede utilizarse para fines culinarios) y cuando el líquido obtenido en la extracción se enfría, se forma en la superficie una capa de resina solidificada. A ésta se le da forma de tabletas o cualquier otra forma que se desee. El problema con este método es que se introduce agua en la resina. En consecuencia, a menudo las tabletas de resina se enmohecen con el tiempo.

3. Cannabis líquida (aceite de hachís)

La cannabis líquida es un extracto líquido obtenido de la hierba de cannabis o de la resina de cannabis; a menudo el extracto se concentra antes de ser objeto de tráfico. La cannabis líquida se extrae para concentrar los ingredientes psicoactivos (por ejemplo, THC). De esta forma, el traficante puede burlar más fácilmente la ley, pues puede ocultar más material psicoactivo en un envase más pequeño. Otra ventaja es que el traficante puede introducir la cannabis líquida en un envase que no podría contener fácilmente hierba o resina de cannabis. Además, es fácil cerrar herméticamente el recipiente de la cannabis líquida, con lo que se evita la posibilidad de que se detecte por el olor que desprende.

La cannabis líquida, tanto si procede de la hierba como de la resina de cannabis, se prepara mediante un procedimiento semejante al que se emplea para filtrar el café. Ese procedimiento puede compararse también con el de la extracción en un aparato de soxhlet que se efectúa en los laboratorios químicos para obtener sustancias químicas de materiales sólidos y en el cual el disolvente empleado en la extracción refluja continuamente.

B. Descripción de los productos ilícitos de la cannabis

1. Nombres y sinónimos de los productos ilícitos de la cannabis

Se emplean tantos sinónimos para los distintos productos ilícitos de la cannabis que no es posible enumerarlos todos en este manual. Remitimos al lector a la publicación de las Naciones Unidas que trata de este tema y que lleva por título *Diccionario multilingüe de los estupefacientes y de las sustancias sicotrópicas sometidos a fiscalización internacional* (ST/NAR/1).

2. Apariencia física y características químicas de los productos ilícitos de la cannabis

Hay que destacar que no existen dos productos de la cannabis que tengan exactamente la misma apariencia. Como se obtienen a partir de un producto natural de características mudables, mediante un proceso discontinuo que puede variar considerablemente, y posteriormente se elaboran y transforman para traficar con ellos, no es sorprendente que los productos de la cannabis se presenten en formas tan diversas. En este documento sólo se describen algunos productos seleccionados que son, por otro lado, los más comunes. Naturalmente, el hecho de que un producto sometido a un examen forense no se parezca en

nada a ninguno de los tipos aquí descritos no significa que no sea cannabis o un producto que contenga cannabis.

a) Productos herbáceos (marihuana)

Cannabis cultivada en climas templados

La cannabis que se cultiva en Europa, en América del Norte y en las partes meridionales del hemisferio sur es de un verde intenso cuando está en pie; una vez cosechada, algunas muestras pierden su color verde y se vuelven amarillas, pero raras veces de color pardo. Por lo general, los ápices floridos y con frutos no contienen resina y, contrariamente a lo que sucede con la hierba de cannabis procedente del subcontinente indio, no son pegajosas cuando se comprimen en la palma de la mano. Por esa misma razón es difícil comprimir en tabletas este material como se hace fácilmente, por ejemplo, con la cannabis del África occidental. Contiene invariablemente semillas. La cannabis europea tendrá un mayor contenido de hojas que la cannabis norteamericana, en la que predominan los ápices floridos y con fruto.

Características químicas: muy variables, porque las semillas se han importado, a menudo de forma ilícita, de muchas regiones diferentes donde la cannabis crece silvestre. Se pueden encontrar perfiles de cannabinoides diferentes, con o sin CBD y THV.

Cannabis cultivada en climas tropicales

Cannabis del África septentrional

Raras veces se trafica con ella fuera de la región; es una hierba de un verde claro o amarillento finamente picada que no contiene semillas ni materia fibrosa.

Características químicas: idénticas a la de la resina que se produce en la región, es decir, escasa proporción de THV y de CBD con relación al THC.

Cannabis del África occidental y del Caribe

Cuando está en pie la planta es verde; al cosecharla y secarla se vuelve de color pardo. Algunas muestras conservan su color verde. Por lo general, la cannabis del Caribe conserva más su color verde que la del África occidental. Es raro encontrar una muestra seca de cannabis del África occidental que no sea parda. Aparte del color, ambos tipos de cannabis son física y químicamente muy similares. En algunas muestras de cannabis del África occidental se observa que los ápices floridos y con fruto han quedado destruidos en el proceso de elaboración, y en la masa comprimida de materia herbácea pueden verse muchas semillas de color pardo oscuro.

Hasta hace pocos años la cannabis del Caribe era de baja calidad y contenía muchos tallos, que apenas tienen componentes psicoactivos o carecen de ellos. Últimamente se ha intentado producir sinsemilla; todavía no se ha encontrado ninguna muestra totalmente desprovista de semillas, pero en las aprehensiones ha disminuido considerablemente la cantidad de material que no contiene sustancias psicoactivas, y los ápices floridos y con fruto de esas aprehensiones son comparables a las que se encuentran en la sinsemilla norteamericana.

Características químicas: ninguno de esos dos tipos contiene CBD y en ambos la relación THV/THC es baja.

Cannabis del África central

La mayoría de las muestras son similares a la cannabis del África occidental, pero unas pocas se asemejan a la cannabis que se produce en la parte meridional de África.

Características químicas: muestras pardas similares a la cannabis del África occidental en perfil de cannabinoides: muestras verdes similares a la cannabis del África meridional en perfil de cannabinoides.

Cannabis del África meridional

Una vez seco y preparado para el tráfico, este material se asemeja por lo general a la cannabis que crece en zonas templadas. Es mucho más verde y contiene una proporción mayor de hojas que la cannabis del África occidental.

Características químicas: no contienen CBD. Aparecen THV y THC en cantidades aproximadamente iguales.

Cannabis de América del Sur

Es semejante a la cannabis del Caribe; la calidad de las muestras varía considerablemente, desde los productos que contienen una gran proporción de material fibroso sin sustancias psicoactivas hasta los productos del tipo de la sinsemilla, que constan únicamente de ápices floridos y con fruto.

Características químicas: similares a las del Caribe. En ocasiones la muestra contiene una cantidad reducida de CBD.

Cannabis del subcontinente indio

Tres son los tipos que pueden ser objeto de tráfico: 1) los ápices pardos floridos y con fruto con alto contenido de resina y pegajosos al comprimirlos en la palma de la mano; 2) la materia de color pardo verdoso oscuro semejante a algunas muestras procedentes del África occidental; 3) la materia verde, con gran cantidad de hojas, desprovista de ápices floridos y con fruto.

Características químicas: el tipo 1) contiene CBD y aproximadamente la misma cantidad de THC y THV; el tipo 2) se parece a la cannabis del África occidental; el tipo 3) es semejante al tipo 1) pero con bajo contenido de cannabinoides.

Cannabis del Asia sudoriental

“Barritas de Buda” – véase la sección III.A.1

Características químicas: Normalmente sólo contienen THC, nada de CBD y cantidades despreciables de THV.

b) Productos de resina de cannabis

Resina de cannabis del África septentrional

Tabletas rectangulares delgadas de color pardo amarillento, envueltas en celofán que raras veces llevan alguna marca. De vez en cuando llevan la señal impresa de una moneda.

Producto recientemente introducido que, superficialmente, es semejante a la resina de cannabis procedente del subcontinente indio. Es casi negra en la superficie, y por dentro mucho más oscura que las tabletas de color pardo amarillento. Se presenta en forma de pastillas de jabón de tocador que van envueltas en celofán. No presenta señales pero algunas muestras llevan la marca de una moneda.

Características químicas: Por lo general, baja proporción de CBD en relación con el THC, y THV en cantidades muy pequeñas. El contenido de ácidos cannabinoides varía de unas incauciones a otras.

Resina de cannabis del Mediterráneo oriental

Parda rojiza y en polvo. Su tráfico se realiza siempre en bolsas de tela, que hasta hace pocos años eran siempre blancas, pero que de vez en cuando llevaban una marca impresa con tinta. Actualmente las bolsas de tela son a veces de colores vivos, con o sin marcas de tinta. Las tabletas pesan hasta 0,5 kilogramos y algunas veces un kilo. Cuando se desenvuelve, la resina lleva impresa la huella de la tela.

Características químicas: Presencia de CBD en cantidades mayores que en cualquier otro producto de resina de cannabis. Muy poco contenido de THV. También contiene ácidos, principalmente CBDA, en mayor proporción que cualquier otro producto de resina de cannabis.

Resina de cannabis del Mediterráneo nororiental

Polvo verdoso parduzco o (rara vez) en forma de pequeñas obleas delgadas de materia quebradiza envueltas en celofán.

Características químicas: mucho menos CBD que THC. Bajo contenido de THV. Grandes cantidades de ácidos.

Resina de cannabis del subcontinente indio

Se fabrica una gran variedad de productos. En cantidad predominan sobre todos los demás tipos las tabletas rectangulares, negras en su superficie y de color verde oscuro por dentro, originarias de la parte noroccidental del subcontinente. Estas tabletas, que suelen llevar en la superficie una marca grabada en relieve, se envuelven a menudo en celofán oscuro antes de traficar con ellas. Algunas tabletas son cuadradas. El espesor de las tabletas varía de 5mm a 20 mm; son olorosas y flexibles cuando están recién hechas. Con el tiempo pierden el olor y se vuelven quebradizas. La tableta típica pesa 250 gr, 500 gr o un

kilo, pero a veces se encuentran pesos mayores. Las tabletas procedentes de la parte septentrional del subcontinente indio suelen ser mohosas y se deshacen fácilmente.

Otros productos de resina de cannabis procedentes del subcontinente indio son las barritas, con frecuencia en haces, las bolitas (de 1 cm de diámetro), las bolas grandes (de 8 cm de diámetro) y trozos de resina de formas irregulares. Todos estos productos son de color pardo oscuro o negro en su superficie y verde oscuro o castaño oscuro en su interior.

Características químicas: varían tanto como las características físicas. Generalmente, el contenido de ácido cannabinoide es inferior al de la resina de cannabis del Mediterráneo. El contenido de cannabidiol de la variedad en tabletas es inferior al de la resina del Mediterráneo oriental, pero superior al de la resina del África septentrional; puede ser bajísimo o nulo en algunos otros tipos. Generalmente el contenido de THV es bajo, pero algunos tipos contienen más THC que cualquier otra resina de cannabis, por lo que alcanzan precios más altos cuando se venden en el tráfico ilícito.

c) *Cannabis líquida (aceite de hachís)*

La cannabis líquida es un aceite viscoso oscuro de olor característico. Cuando se diluye en disolventes orgánicos, se convierte en una solución de color verde o pardo. El color no indica necesariamente su origen, pues en él pueden influir la madurez de la materia de la planta y el disolvente que se use para preparar la cannabis líquida. Generalmente la cannabis líquida que al diluirse produce una solución de color verde se ha hecho de cannabis herbácea, y la cannabis líquida que al diluirse produce una solución de color castaño se ha hecho de resina de cannabis. La cannabis líquida no puede diluirse en agua; si se añade agua a la cannabis líquida diluida en etanol, por ejemplo, se forma una emulsión.

Alguna cannabis líquida no está concentrada antes de ser objeto de tráfico; este producto tiene la consistencia (y a menudo el olor) de un disolvente orgánico y puede ser de color verde o pardo.

Características químicas: el perfil de cannabinoides es, con una importante diferencia, similar al de la cannabis o al de la resina de cannabis de la que se haya hecho la cannabis líquida. La diferencia radica en que la cannabis líquida carece de ácidos cannabinoides. Las principales regiones productoras de cannabis líquida son los países productores de resina del Mediterráneo y del subcontinente indio, y las zonas del Caribe productoras de cannabis herbácea. Los perfiles de cannabinoides neutrales de la cannabis líquida procedente de estas regiones se asemejan a los de la resina o los productos herbáceos de las mismas regiones. Sin embargo, los cannabinoides forman una proporción mucho más elevada de esa materia.

Niveles típicos de THC en los tres productos ilícitos derivados de la cannabis:

Cannabis herbácea:	0,5% a 5%
Resina de cannabis:	2 % a 10%
Cannabis líquida:	10% a 30%

Cabe observar que estos valores sirven sólo de indicación en cuanto a los niveles que probablemente va a hallar el analista forense. Muchas muestras de hierba, resina o cannabis líquida tendrán un contenido de THC fuera de estos límites.

Además de los cannabinoides neutros, la materia de cannabis aprehendida puede contener asimismo, en proporciones muy diferentes, los correspondientes ácidos cannabinoides. Aunque no parece existir una relación sistemática entre el origen del material y el contenido real de ácidos cannabinoides y la composición de éstos, es posible que se pida al químico forense, según la legislación nacional, que demuestre, por separado, la presencia o determine el contenido de estos ácidos en la muestra sometida a examen, o ambas cosas.

Asimismo, se hace referencia a varios manuales y memorias recapitulativas en los que se examina a fondo la química de los cannabinoides [35 a 37].

La cannabis contiene una compleja mezcla de determinados productos químicos específicos denominados cannabinoides. Cuatro de los elementos principales que los componen son los siguientes:

- Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC)
- Cannabinol (CBN)
- Cannabidiol (CBD)
- Cannabicromeno (CBC)

El THC es el principal cannabinoide que produce la mayoría de los efectos psicológicos característicos de los productos de cannabis. Por consiguiente, es el único cannabinoide de interés en el presente contexto.

3. Vías de administración, metabolismo y excreción del THC [38, 39]

La forma más difundida de usar indebidamente la cannabis es fumarla. Ocasionalmente puede haber casos de uso indebido por ingestión. El THC se metaboliza extensamente en el cuerpo humano, por ello en la orina se recupera menos del 1% de THC inalterado. Cuando se fuma marihuana, el metabolismo se inicia en el pulmón, en tanto que si ésta se ingiere, el metabolismo tiene lugar en el hígado. En la figura III.1 se resume la ruta metabólica del THC.

Setenta y dos horas después de haber fumado se excreta (como metabolito) aproximadamente el 50% del THC inhalado y el 50% restante se distribuye por todo el cuerpo, el cual lo absorbe en su mayor parte por los tejidos grasos y lo excreta lentamente en los días posteriores. La excreción se hace principalmente por vía urinaria (25%) y por las heces (65%).

Si bien se han identificado hasta el momento más de 20 metabolitos del THC, los principales compuestos que aparecen en la orina se deben a la oxidación en la posición C-11 y la glucuronidación. El principal metabolito ácido es el ácido 11-nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílico (9-carboxi-THC) que se convierte en conjugados monoglucurónidos y diglucurónidos, que son las principales formas de metabolitos excretados en la orina. Por ello la identificación del 9-carboxi-THC en la orina se considera la mejor indicación de consumo previo de cannabis (ingestión de THC).

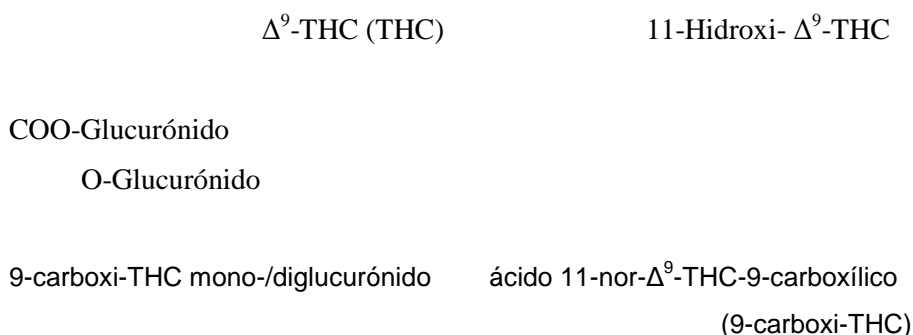
La concentración de THC en el plasma disminuye rápidamente debido al metabolismo y al almacenamiento en los tejidos. Sin embargo, el período de semidesintegración terminal es largo y suele durar más de 20 horas. Como resultado de ello, el THC queda presente en el cuerpo durante muchas horas, posiblemente días, después del último consumo. Por consiguiente, la excreción de 9-carboxi-THC es prolongada. La modalidad de excreción urinaria en el consumidor ocasional es diferente de la del consumidor crónico. En el consumidor ocasional el metabolito es detectable en la orina durante un período de uno a tres días, según el método analítico empleado, mientras que la orina de los fumadores crónicos contiene niveles detectables durante un período de una semana o más después de la última dosis.

C. Procedimientos de muestreo y preparación de la muestra para el análisis de 9-carboxi-THC

Se aplican los procedimientos de muestreo descritos en la sección I.C y G.5.

INSERT FIGURE III.1

Figura III.1 Ruta metabólica del THC



Precauciones

Hay que observar algunas precauciones adicionales cuando se trabaja con muestras de orina para el análisis de 9-carboxi-THC. La degradación térmica de los metabolitos de cannabinoides ocurre en forma relativamente rápida y el principal metabolito, 9-carboxi-THC, puede disminuir considerablemente incluso a temperatura ambiente después de una semana, y hasta en un 45% después de 6 meses [40, 41]. La disminución depende de factores tales como la oxidación, la cantidad de orina en el recipiente y el tipo de recipiente utilizado. También se ha informado de que el 9-carboxi-THC se absorbe irreversiblemente al material de diversos tipos de recipientes, lo cual causa pérdidas considerables.

1. Preparación de la muestra para el inmunoanálisis

a) Hidrólisis

En general, se necesita poca o ninguna preparación de la muestra para los inmunoanálisis (véase también la sección I.G.5).

2. Preparación de la muestra para cromatografía

a) Hidrólisis

Más del 80% del metabolito de cannabinoide excretado, 9-carboxi-THC, está presente en la orina en forma de glucurónido conjugado. Para liberar el metabolito es necesario hidrolizar la orina, lo cual puede efectuarse mediante una hidrólisis alcalina o enzimática. La hidrólisis alcalina se considera más eficiente y reproducible que la hidrólisis ácida o la enzimática [42, 43].

Se transvasan en pipeta 10 ml de orina del recipiente original a una probeta con tapa de vidrio. Para los métodos que exigen un patrón interno (CG, CG-EM, CLAR), se agrega éste al tubo. Se añaden 2 ml de hidróxido de potasio 10 N al tubo, se cierra y se incuba por 20 minutos a 50°C, revolviéndolo ocasionalmente.

En esta etapa puede hacerse una extracción simple con 20 ml de ciclohexano-acetato de etilo (7:1, v/v) como medida de purificación para eliminar impurezas de carácter básico y neutro, especialmente antes de uno de los análisis cromatográficos ya mencionados: CG, CG-EM y CLAR.

b) Extracción

El procedimiento de extracción debe ser eficiente y selectivo. Es importante una buena recuperación, ya que la cantidad total de cannabinoides presentes es muy reducida. La selectividad es importante para que se eliminen las sustancias interferentes presentes en la orina.

La extracción de 9-carboxi-THC de la orina hidrolizada se lleva a cabo a pH ácido para que el metabolito sea soluble en los disolventes orgánicos utilizados. Los disolventes o mezclas de disolventes comúnmente utilizados en la extracción líquido-líquido propuestos en publicaciones son: éter de petróleo, hexano, éter dietílico, cloroformo y mezclas de hexano y acetato de etilo. También se han indicado varios métodos de extracción en fase sólida.

Extracción líquido-líquido

Después de enfriar la muestra tras la hidrólisis, se ajusta su pH a 2 con 2 N HCl o 2 N H₂SO₄. Se agregan 15 ml de ciclohexano/acetato de etilo (7:1 v/v) y se extrae la solución por agitación durante 10 minutos. Se retira la capa orgánica y se filtra con una pequeña cantidad de sulfato de sodio seco a una probeta cónica, se lava el filtro con 5 ml de disolvente y se evapora a sequedad a temperatura ambiente con un chorro de aire o de nitrógeno. Se vuelve a disolver el residuo en 0,2 ml de metanol o acetonitrilo-metanol (3:1 v/v) mediante agitación o sonicación.

Extracción en fase sólida

Como alternativa a la técnica anterior, se puede emplear la técnica de extracción en fase sólida. Se recomienda utilizar un absorbente con enlaces químicos en fase invertida (sílice modificada) de acuerdo con la instrucciones del fabricante. Según los datos de publicaciones pertinentes, varios métodos han alcanzado tasas altas de recuperación [44, 45], uno de los cuales se describe a continuación.

Se acondicionan las columnas enjuagando lenta y alternativamente con porciones de 3 ml de metanol, agua, metanol y agua. Una jeringa plástica de 10 ml adosada a la columna sirve de depósito. Se hace un vacío débil para aumentar el flujo. Se deja pasar la orina hidrolizada (2 ml) por la columna, y se

lava con 10 ml de 0,1 N HCl y 25 ml de 50 mM de ácido fosfórico en 10% de acetonitrilo. Se eluye 9-carboxi-THC con 1 ml de acetona. Se evapora el disolvente bajo un chorro de nitrógeno y se vuelve a disolver el residuo en 0,1 ml de metanol.

En otros lugares [46] se describe un procedimiento nuevo, sencillo y rápido de preparación y limpieza de muestras para CG y CG/EM utilizando el disco (microcolumna) de extracción en fase sólida y la derivación en disco.

c) Patrones internos

Los patrones internos deben cumplir los criterios que figuran en la sección II.G.6. El cannabino (CBN), la oxifenbutazona o el ketoprofen son apropiados para la mayoría de los métodos de cromatografía en fase gaseosa. Si se dispone de productos análogos de 9-carboxi-THC (d_3 o d_6) se recomienda emplearlo en CG-EM. El cannabino o el n-octil-p-hidroxibenzoato son apropiados para la CLAR.

Preparación de soluciones de patrones internos:

Preparar una solución madre en etanol absoluto que contenga 1 mg/ml de cannabino. Transvasar 1 ml de la solución a un matraz común de 200 ml, y llenar hasta la marca con etanol absoluto (1 ml de solución de patrón interno = 5 μ g de cannabino).

d) Solución patrón

Dado que no es necesaria la cuantificación, se utiliza la solución de 9-carboxi-THC disponible para distinguir los metabolitos en la orina.

D. Métodos de detección

1. Métodos de inmunoanálisis

Se recomienda que la detección inicial se haga con inmunoanálisis cuando los laboratorios tengan acceso a tales técnicas. Se pueden adquirir diversos módulos de inmunoanálisis comerciales para detectar cannabinoides en la orina [47, 48]. Con la mayoría de los inmunoanálisis se detecta el 9-carboxi-THC, con una reactividad cruzada media a alta hacia otros metabolitos urinarios de THC, con estructura dibenzopiránica cíclica, como el 11-hidroxi-THC [49, 50]. Todo resultado positivo obtenido por las pruebas iniciales de detección deberá ser confirmado por un segundo análisis del espécimen original recurriendo a métodos basados en técnicas y principios químicos diferentes de los de la prueba inicial de detección. Estos análisis deberán ser más específicos y, por lo menos, igualmente sensibles. En el cuadro III.1 se resumen las reactividades cruzadas de algunos productos en venta.

Cuadro III.1 Reactividades cruzadas de módulos de inmunoanálisis comerciales para la detección de cannabinoides

Análisis	Reactividad cruzada (%)			
	9-carboxi-THC	11-Hidroxi-THC	THC	CBN
EMIT-d.a.u.	100 (50) ^{a,d}	56 (90)	---	---
IAPF-TDx	100 (100) ^{b,c}	36 (277)	15 (655)	11 (899)
Abuscreen-Ontrak	100 (100) ^{b,d}	40 (250)	14 (714)	1 (10 640)
Abuscreen Online	100 (100) ^{b,d}	>100 (50)	3 (3 000)	5 (2 000)

^{a,b} Reactividad cruzada calculada dividiendo la concentración deseada ($50^a/100^b$ ng/ml) por la concentración equivalente a $50^a/100^b$ ng/ml de 9-carboxi-THC y multiplicando por 100 (equivalentes entre paréntesis, ng/ml).

^cM. A. ElSohly [50].

^dInformación del fabricante.

2. Cromatografía en capa delgada

Técnica estándar de CCD

En el Manual de las Naciones Unidas, *Métodos recomendados para el ensayo de la cannabis* [9] figuran los detalles referentes a los materiales y procedimientos que se emplean en la técnica estándar de CCD, los cuales se aplican al análisis de extractos biológicos para detectar 9-carboxi-THC.

Placas para la CCD

Revestimiento:	Gel de sílice activado G. También puede emplearse gel de sílice que contenga un aditivo fluorescente bajo luz ultravioleta, con una longitud de onda de 254 nm.
Espesor de la capa:	0,25 mm
Tamaño de las placas:	Placas de vidrio de 20 X 30 cm, 20 X 10 cm, ó 10 X 5 cm. El recorrido óptimo es de 10 cm aproximadamente.

Procedimiento

Se aplica a la placa una solución de CCD reconstituida de 25 a 50 μ l. También se aplica una solución patrón de 9-carboxi-THC a la placa, que luego se revela en alguno de los sistemas de disolventes que figuran a continuación.

Disolventes para el revelado

Sistema A [51]:	Acetato de etilo	12
	Metanol	5
	Amoníaco concentrado	1
	Agua	0,5

Sistema B [52]:	Cloroformo	70
	Metanol	30
	Amoníaco concentrado	2

Visualización

Las placas deberán estar secas antes de la visualización. Esto se puede conseguir dejándolas secar a temperatura ambiente o, más rápidamente, en un horno a 120°C durante 10 minutos, o utilizando un secador de aire caliente. Para revelar bien los colores es importante eliminar de la placa todo resto de amoníaco u otras bases. Se recomienda el siguiente método de visualización:

Reactivo para rociado:

Solución acuosa al 0,1% de sal de azul sólido B (Fast Blue B). La solución deberá estar recién preparada. Una frecuencia aceptable es una vez por día.

Para los revelados en color es importante que la placa para la CCD esté alcalinizada. Esto se puede hacer exponiendo la placa a vapores de amoníaco o de dietilamina después de pulverizada. A continuación se seca la placa mediante un secador de aire caliente. El 9-carboxi-THC aparece como una mancha de color rosa o rojo rosado al mismo valor R_f que la mancha patrón del 9-carboxi-THC.

Nota: *Algunas autoridades sostienen que la sal azul sólido B es un posible agente cancerígeno. Las mismas autoridades afirman que la tintura azul sólido BB suscita menos sospechas de serlo [53]. Por lo tanto, como alternativa, se puede pulverizar la placa con una solución recién preparada de sal de azul sólido BB en 0,1 M de hidróxido de sodio (0,75 mg/10 ml) y luego secarla para conseguir un revelado en color que sea apropiado y estable.*

Resultados

Cuadro III.2 Valores R_f 3 X 100

Sistema de revelado		
Compuesto	A	B
9-carboxi-THC	35-40	25-38

Estos valores están sujetos a variaciones que dependen de las condiciones del laboratorio (humedad, temperatura, corrientes de aire) y otros parámetros (por ejemplo, la calidad de los materiales utilizados).

E. Métodos cromatográficos de confirmación

1. Cromatografía en fase gaseosa

a) Derivación de las muestras

El extracto de orina se evapora hasta que esté totalmente seco bajo un chorro de nitrógeno y se añaden 50 µl de N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) y de trimetilclorosilano (TMCS) al tubo, que se centrifuga y calienta a 60°C durante 10 minutos. Otra posibilidad es utilizar MSTFA/TMCS [39, 54] o MTBSTFA/TBDMS [55, 56] para la derivación. La *t*-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) es más reactiva y los derivados de TBDMS resultantes son más estables y muestran mayor sensibilidad en la CG/EM.

Otro método de derivación, que produce el derivado de dimetilo de 9-carboxi-THC, puede realizarse utilizando hidróxido de tetrametilamonio (HTMA) [57, 58]. En este caso, se añaden 70 µl de HTMA-dimetilsulfóxido al 10% al residuo seco, y después de 2 minutos, 5 µl de metilioduro. Luego de otros 10 minutos, se añaden 200 µl de 0,1 N de ácido clorhídrico y se extrae la solución con 2 ml de isooctano. La capa de isooctano se separa y evapora bajo un chorro de nitrógeno. El residuo se reconstituye en 50 µl de disolvente. Se inyectan 1 a 2 µl de la solución derivada.

b) Técnica de la columna de relleno [57]

Condiciones de trabajo

Detector:	Detector de ionización de llama
Columna:	2 m X 2 mm de D.I.
Relleno:	a) 3% dimetil silicona (OV-1) b) 3% fenilmetil silicona, 50% fenilo (OV-17)
Gas portador:	Nitrógeno o helio a 30 ml/min
Temperaturas de trabajo:	Inyector: 260°C Horno: 255°C Detector: 275°C

Nota: Es preciso preparar todas las columnas de relleno antes de utilizarlas. Normalmente la temperatura de acondicionamiento debe ser por lo menos 30°C superior a la temperatura en que deberá hacerse el análisis, salvo que ésta supere la temperatura máxima de trabajo de la columna especificada por el fabricante. En este caso deberá utilizarse un margen de diferencia menor y extenderse considerablemente el período de acondicionamiento. Generalmente las columnas se acondicionan durante la noche, o por un mínimo de 15 horas.

El acondicionamiento se efectúa con el flujo normal de gas portador y con la columna desconectada del detector.

Nota:

- Silanizar las columnas de vidrio con frecuencia para evitar la adsorción de morfina durante las determinaciones de la CG;
- Limpiar el orificio de inyección y el detector con regularidad para evitar la descomposición de las muestras y la pérdida de sensibilidad del detector;

- *Manipular con cuidado los agentes silanizantes porque son muy reactivos y sensibles a la humedad.*

c) *Técnica de la columna Megabore [58].*

Condiciones de trabajo

Detector:	Detector de ionización de llama		
Columna:	Sílice fundida, 10 m X 0,52 mm de D.I. con 2,6 µm químicamente ligado con dimetil silicona en fase estacionaria, es decir, OV-1		
Gas portador:	Helio a 2 ml/min		
Técnica de inyección:	“Split/splitless”		
Temperaturas de trabajo:	Inyector:	290°C	
	Horno:	240°C	
	Detector:	290°C	

2. Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas

Condiciones de trabajo [46, 56, 59, 60].

Columna:	Sílice fundida, 10 a 30 m X 0,18 a 0,25 mm de D.I. con 0,25 µm químicamente ligado con fenilmetil o dimetilpolisiloxano en fase estacionaria		
Gas portador:	Helio a 2 ml/min		
Temperatura de la columna:	Desde 150 a 220°C hasta 270 a 290°C, a 5-25°C/min		
Temperaturas del inyector:	250 a 260°C operado en modo “splitless”		
Ionización:	Por impacto de electrón (IE) o ionización química (IQ)		

Patrones internos

Análogos de 9-carboxi-THC deuterado (d_3 o d_6) o patrones no isotópicos (p.ej., ácido meclofenámico).

Extracción

Extracción en fase sólida [46, 59, 60] o extracción líquido-líquido [56].

Derivación

Con BSTFA o MSTFA (derivados de TMS) [46, 59], MTBSTFA (derivados de TBDMS) [56] o hidróxido de trimetilamonio (derivados del metilo) [60].

Cuadro III.3 Principales iones en los espectros de masas de derivados de 9-carboxi-THC (SIM)

<i>Compuesto</i>	<i>Principales fragmentos iónicos m/z</i>
9-carboxi-THC-derivado de dimetilo	372 (M ⁺), 357, 313
9-carboxi-THC-diTMS	488 (M ⁺), 473, 371
9-carboxi-THC-diTMS ^a	489 (M ⁺), 399, 371
9-carboxi-THC-diTBDMS	572 (M ⁺), 557, 515, 413

^a(modo IQ, isobutano como gas reactivo).

3. Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento

La cromatografía en fase líquida de alto rendimiento en columnas de fase invertida con rayos ultravioleta [61] o detección electroquímica [55, 62] ofrece una gran sensibilidad y una suficiente especificidad para confirmar los resultados positivos obtenidos en una detección por inmunoanálisis. Permite la rápida detección de 9-carboxi-THC a un nivel bajo de ng/ml sin derivación previa. Para obtener una cuantificación reproducible se recomienda utilizar un patrón interno (por ejemplo, cannabinol [55, 61]).

Condiciones de trabajo

Método A [61]

Columna:	Octilsílice (Spherisorb C-8 o equivalente) , 5 µm, 25 cm X 4,6 nm de D.I.
Fase móvil:	Acetonitrilo-50 mM de ácido fosfórico (65:35, v/v)
Caudal:	1,5 ml/min
Detección:	UV a 211 nm (200 a 350 nm de amplitud si se utiliza un detector de red de diodos)
Volumen de inyección:	10 a 15 µl
Patrón interno:	Cannabinol

Método B [62]

Columna:	Octilsílice (Zorbax C-8, o equivalente), 5 µm, 25 cm X 4,6 nm de D.I.
Fase móvil:	Acetonitrilo-metanol-0,02 N de ácido fosfórico (35:15:50, v/v/v)
Caudal:	1,1 ml/min
Detección:	ECD, 110 mV (Ag/AgCl) (electrodo de carbono vítreo)
Volumen de inyección:	5 a 10 µl
Patrón interno:	n-octil-p-hidroxibenzoato

Véanse otras técnicas de CLAR en Dixit y Dixit [63].

F. Interpretación de los resultados

1. Período de detección

El período en que es posible detectar el metabolito varía según el método de inmunoanálisis empleado y el nivel límite fijado para las pruebas de detección inicial. Generalmente, el consumidor ocasional de marihuana (menos de dos veces por semana) puede detectarse con un análisis de orina durante uno a tres días si se ha fijado un nivel límite de 100 ng/ml (o menor). Si se trata de una persona que ha consumido marihuana en forma crónica durante largo tiempo, el período de detección puede prolongarse considerablemente debido a que el THC tiende a ser absorbido y acumulado en los tejidos grasos. En estas circunstancias, es posible detectar el 9-carboxi-THC durante una semana o más [39, 64].

2. Inhalación pasiva

A veces se hace alusión a la posibilidad de exposición pasiva o involuntaria al humo de marihuana para explicar un resultado positivo del análisis de orina. Si bien se ha demostrado que esto puede ocurrir, acumular una dosis suficiente de THC por esta vía es difícil y poco probable en la mayoría de los casos. Si en los análisis de detección el nivel límite es de 20 ng/ml, pueden darse resultados positivos, aunque ello es muy poco frecuente. Con niveles límite de 100 ng/ml, queda prácticamente eliminada la posibilidad de que los análisis de “pasivo” tengan resultados positivos [43, 65 a 68].

3. Variaciones de concentración

Varios factores diferentes pueden afectar a las concentraciones de droga en la orina, principalmente la ingestión de líquidos. La concentración de una droga en la orina puede decuplicarse en unas horas, lo cual significa que hay que tener cautela al interpretar un resultado positivo obtenido, por ejemplo, después de un resultado negativo en un régimen de muestreo diario. Esto es particularmente problemático en el caso de una droga como el THC con un largo período de semidesintegración en que la droga es probablemente detectable durante varios días, pero con niveles de concentración que fluctúan considerablemente alrededor del nivel límite. El hecho de que se registren muestras positivas tras muestras negativas no indica necesariamente un consumo adicional de marihuana.

IV. Métodos recomendados para la detección y el análisis de cocaína en especímenes biológicos

A. Tipos comunes de productos de coca ilícitos [10]

1. Hoja de coca

Diferentes especies de *Erythroxylon* producen hojas de distintos tamaños y aspectos. En todas las especies, la cara superior de la hoja es más oscura que la cara inferior, que puede ser de color gris verdoso. En la cara inferior de la hoja se aprecian dos líneas paralelas al nervio central, que se consideran características de la hoja de coca.

2. Cocaína

Aunque se fabrica a partir de un producto natural un tanto variable, por un proceso discontinuo susceptible de amplias variaciones, la cocaína varía relativamente poco si se compara, por ejemplo, con los productos de heroína. Sin embargo, no existen dos muestras ilícitas de cocaína que sean exactamente idénticas. Por lo general se trata de un polvo blanco o blanco mate a menudo fino y raramente húmedo. Tiene un olor característico.

La pasta de coca es un polvo de color blanco mate, cremoso o pajizo. Raramente fino, suele contener agregados y es generalmente húmedo. A menos que los agregados sean cristalinos (lo que es raro), suelen disgregarse bajo una ligera presión. Tiene un olor característico.

En ocasiones la cocaína se presenta en forma de grandes cristales a veces incoloros (“cocaína de roca”) que pueden ser muy duros. De ordinario, algunas de tales muestras, si no la mayor parte, son de un material análogo a la cocaína en polvo o corriente.

Su adulteración es relativamente rara en los países productores y es objeto de tráfico internacional con una pureza que llega a ser a menudo del 80% al 90% (como clorhidrato de cocaína). Su ulterior adulteración y transformación con fines de tráfico en los países económicamente desarrollados entraña la adición de algún anestésico sintético local no fiscalizado (por ejemplo, lidocaína, procaína o benzocaína) o un carbohidrato (por ejemplo, manitol, lactosa o glucosa). En cualquier caso, el aspecto físico sólo se modifica ligeramente, pues virtualmente todos los adulterantes son también polvos blancos finos y secos.

La pureza típica de la cocaína objeto de tráfico en los países económicamente desarrollados es de aproximadamente el 30%. En el tráfico internacional se adultera con un diluyente cuyo peso viene a ser tres veces superior.

Además de los adulterantes y las impurezas mencionados, el clorhidrato de cocaína puede contener también una serie de sustancias; por ejemplo, almidón, ácido bórico, carbonato de hidrógeno sódico y dipirona.

Últimamente han aparecido en el mercado variedades inéditas de cocaína, en particular variedades de base libre como la cocaína base extractada y el “crack”, en las que puede haber residuos de disolventes, así como anestésicos locales que se emplean como adulterantes. Una combinación frecuente es la denominada “speed-ball”, que consiste en una mezcla de cocaína y heroína.

Además, se hace referencia a memorias recapitulativas que tratan en detalle la química de los alcaloides de la coca [69 a 72]. En el análisis de laboratorio de varios especímenes biológicos de la cocaína revisten interés los siguientes compuestos (véanse las estructuras en la figura IV.1):

- Cocaína
- Benzoilecgonina
- Éster metílico de la ecgonina
- Ecgonina

INSERT FIGURE IV.1

Figura IV.1 Ruta metabólica de la cocaína

Norcocaína

Cocaína

Benzoilecgonina

Éster metílico de la ecgonina

Ecgonina

3. Vías de administración

La cocaína puede administrarse por vía intranasal (es decir, aspirándola o inhalándola, que es la forma más habitual) o por vía intravenosa e inyección intramuscular. También se puede ingerir oralmente, sublingualmente, vaginalmente o por el recto, y se puede fumar. Para inhalarlo, el polvo de cocaína se coloca en forma de raya estrecha sobre una superficie lisa y se aspira con una paja o un tubo de papel enrollado. Una “raya” de cocaína tiene normalmente 3 a 5 centímetros de longitud y contiene 10 a 100 miligramos de polvo. La cocaína de base libre y el crack se administran por inhalación, es decir, fumándolos con ayuda de aparatos especiales. En algunas zonas geográficas las hojas de coca se mascan mezcladas con arcilla alcalina.

La biodisponibilidad de la cocaína varía según la vía de administración (véase el cuadro IV.1) [73].

Cuadro IV. 1 Biodisponibilidad de la cocaína por distintas vías

<i>Vía de administración</i>	Biodisponibilidad (%)
Oral	20-30
Intranasal	20-30
Intrapulmonar (fumándola)	6-32
Intravenosa	100

4. Metabolismo y excreción

La cocaína se transforma en dos metabolitos principales: la benzoilecgonina y el éster metílico de la ecgonina [74]. Recientemente se han detectado otros metabolitos de menor importancia en orina humana, entre ellos la norcocaína [75]. En la figura IV.1 se resumen sus rutas metabólicas. La cocaína se elimina en la orina en forma de droga sin modificar (1% a 9% de la dosis), benzoilecgonina (35% a 54%) y éster metílico de la ecgonina (32% a 49%) [76]. Las sustancias que se recomienda buscar son la cocaína y sus metabolitos: la benzoilecgonina y el éster metílico de la ecgonina.

El valor máximo de la cocaína en el plasma se alcanza poco después de su administración por vía intranasal, intrapulmonar o intravenosa. El tiempo necesario para alcanzar los efectos sicotrópicos y fisiológicos máximos también es breve; a continuación los efectos eufóricos disminuyen en un plazo de 30 a 60 minutos (20 minutos si se ha fumado). El período medio de eliminación de la cocaína del plasma tras su administración por vía intravenosa o intrapulmonar es de 38 a 39 minutos [77].

B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de la cocaína y sus metabolitos

Se siguen los procedimientos de muestro expuestos en la sección I.C y G.5.

Precauciones

Hay que observar algunas otras precauciones al manipular muestras de orina que se van a someter a análisis de detección de cocaína y sus metabolitos, pues las sustancias que se buscan tienen escasa estabilidad hidrolítica, en particular si se encuentran en un ambiente alcalino [78, 79]. En la medida de lo posible, las muestras deberán mantenerse en un entorno frío y oscuro tras la toma. Se ha determinado que con un pH 8 las concentraciones de cocaína en las muestras de orina disminuyen entre un 40% y un 70% si se almacenan a 4°C durante 21 días. Por consiguiente, conviene ajustar el pH de la muestra a 5 con ácido acético diluido. El éster metílico de la ecgonina, por ejemplo, es estable en un período de hasta tres años en la orina entre un pH 3 y 5, almacenada a 4 a 5°C [80]. Cabe señalar además de que las muestras de sangre que se utilicen para el análisis de cocaína y sus metabolitos se conservan mejor con fluoruro a un pH 5.

1. Preparación de la muestra para el inmunoanálisis

En caso necesario, se debe centrifugar la orina para eliminar la turbidez. Se debe ajustar el pH de las muestras de orina entre 6,5 y 8,0, según se requiera. Deben acatarse las instrucciones del fabricante con respecto a los procedimientos ulteriores.

2. Preparación de la muestra para la cromatografía

a) Hidrólisis

No es preciso efectuar hidrólisis.

b) Extracción

Extracción líquido-líquido

Se extrae una parte alícuota de orina de 1 a 20 ml según la metodología que se utilizará posteriormente. Se ajusta el pH de la muestra a 9 (entre 8 y 9,5) con el tampón adecuado. Se puede utilizar cualquiera de los siguientes tampones [89]:

Bórax (pH 9 a 9,6): una solución que contenga 19,07 g de tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua.

Tampón de amoníaco (pH 9,5): se disuelve el cloruro de amonio (10,7 g) en hidróxido de amonio (5 M; 40 ml) y se añade agua hasta tener un litro de líquido.

A continuación se extrae la muestra por lo menos dos veces con volúmenes iguales de disolvente de extracción. Es adecuada una mezcla de diclorometano-isopropanol (85:15 v/v) o de cloroformo-isopropanol (50:50 v/v). Hay que dejar que la capa acuosa (superior) se separe totalmente de la capa de disolvente (inferior) antes de retirar el extracto para no retirar también agua con él. Si surge algún problema con las emulsiones, se puede filtrar el extracto con papel de filtro tratado con sílice (papel disyuntor de fases). Se filtran las capas orgánicas a través de una pequeña cantidad de sulfato de sodio seco (colocado en el filtro) y se enjuaga el filtro con 5 ml de disolvente. Se evapora el extracto hasta que esté totalmente seco, en vacío o en un chorro de nitrógeno.

Extracción en fase sólida

Diatomita

Los procedimientos de extracción que utilicen diatomita deben ajustarse a las instrucciones del fabricante (p.ej., Extrelut[®]). El siguiente es un procedimiento típico [90 a 92].

Ajustar a 9 el pH de una muestra de orina (20 ml) con un tampón saturado de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$. A continuación llevar la muestra a una columna de cromatografía en fase líquida que contenga 20 g de diatomita y se deja en remojo de 10 a 15 minutos. Eluir la columna con 40 ml de diclorometano-isopropanol (85:15 v/v). Recuperar aproximadamente 25 ml de eluato. Recoger el eluato orgánico y evaporarlo hasta que esté totalmente seco.

Sílice modificado

También se recomiendan métodos de extracción en fase sólida que utilizan cartuchos de sílice modificado [82, 93, 94]. Este método presenta ventajas porque ahorra tiempo, disminuye el volumen de disolventes necesarios y evita los problemas que ocasionan las emulsiones que a veces se producen durante la extracción líquido-líquido. Ahora bien, estas ventajas están contrarrestadas por el costo de los cartuchos. A continuación se describen dos procedimientos de extracción en fase sólida representativos,

característicos ambos de este tipo de método. Hay otros materiales de extracción en fase sólida, pero en cualquier caso hay que seguir cuidadosamente las instrucciones de los fabricantes.

Procedimiento A Este procedimiento utiliza un cartucho de sílice modificado (p.ej., Bond Elut Certify^R) que permite interacciones iónicas y no polares entre las sustancias que se buscan y el adsorbente [85].

Se introducen los cartuchos de extracción en un aparato de vacío y se acondicionan lavándolos con metanol (2 ml) y un tampón de fosfato (0,1 M, pH 7; 2 ml). Hay que tener cuidado de no secar los cartuchos una vez preparados.

Se centrifugan las muestras de orina y se mezclan la partes alícuotas (2,5 ml) con la solución de patrón interno, si es necesario, y el tampón de fosfato (0,1 M; pH 7; 1ml). Se comprueba el pH y si hace falta se ajusta el pH a 7.

A continuación se llevan las muestras de orina a los cartuchos y se les hace atravesarlos lentamente en condiciones de vacío.

Se lavan los cartuchos con agua desionizada (3 ml), ácido clorhídrico acuoso (0,1 M; 3 ml) y metanol (9 ml).

Se eluyen los analitos con una mezcla de cloroformo-isopropanol-amoníaco concentrado (80:20:2 v/v/v; 2 ml).

Evaporar los eluatos hasta que estén totalmente secos.

Procedimiento B Este procedimiento utiliza una columna rellena de ciclodextrán (p.ej., Ciclobond I) pues se ha demostrado que produce un extracto limpio de benzoilecgonina con una eficiencia de recuperación del 50% [85].

Se emplean columnas de ciclodextrano (500 mg/3 ml), que no requieren acondicionamiento.

Se añade la orina (5 ml) a una columna y se hace atravesar lentamente en condiciones de vacío.

Se lava la columna con agua (10 ml) y se seca por centrifugado o haciendo pasar aire por la columna durante 20 minutos.

A continuación se lava la columna con acetona (2,5 ml) y se seca al vacío.

Se eluye la benzoilecgonina con cloroformo-etanol (8:2 v/v: 2 ml) ejerciendo una leve presión positiva en la parte superior de la columna con una ampolla de caucho.

Se evapora el eluato hasta que esté totalmente seco.

Anderson [95] describe un método de extracción en fase sólida de la benzoilecgonina mejorado, rápido y eficiente con una recuperación de 90% a 100%. En otros lugares [96] se describe un procedimiento nuevo, sencillo y rápido de preparación y limpieza de las muestras para CG y CG/EM con el empleo del disco (microcolumna) de extracción en fase sólida y la derivación en disco [96].

c) Patrones internos

Si es posible, la selección de un patrón interno adecuado deberá ajustarse a los criterios generales expuestos en la sección II.G.6. Los patrones internos para el análisis de la cocaína y sus metabolitos por cromatografía en fase gaseosa corresponden a los tres grupos siguientes:

Un producto análogo de la benzoilecgonina; por ejemplo, la propilbenzoilecgonina [81].

Un alcaloide opiáceo; por ejemplo, levorfanol [82], nalorfina [83], etilmorfina [84] o codeína [85].

Diversas sustancias, como por ejemplo, *n*-tetracosano, tetrafeniletileno (únicamente con detector de llama de ionización) o butiltraquinona [86].

En cuanto a la CG/EM, los patrones internos más adecuados son productos análogos de la cocaína y sus metabolitos marcados con deuterio; si no se puede disponer de ellos, conviene utilizar uno de los patrones mencionados anteriormente para la CG. Los patrones internos adecuados para la CLAR son la lidocaína [87] y la tropacocaína (benzoiltropina) [88].

d) Patrones de calibración

Preparar soluciones concentradas en metanol que contengan 1 mg/ml de cocaína, benzoilecgonina, éster metílico de la ecgonina y el patrón interno. A partir de esas soluciones concentradas, preparar

patrones de orina que contengan entre 0 y 5 µg/ml de cocaína, entre 0 y 0,25 µg/ml de benzoilecgonina y éster metílico de la ecgonina, y el patrón interno a una concentración de 25 µg/ml. Al mismo tiempo que las muestras de prueba, se debe tratar un conjunto de patrones de orina para la calibración.

C. Métodos de detección

1. Métodos de inmunoanálisis

Las técnicas de radioinmunoanálisis, inmunoanálisis mediante polarización por fluorescencia, análisis inmunológico enzimático para pruebas múltiples, y de inhibición de la aglutinación con látex se recomiendan si los laboratorios disponen del instrumental necesario para emplearlas (véase la sección I.G.1). Los límites de detección del radioinmunoanálisis y el inmunoanálisis mediante polarización por fluorescencia son normalmente 50 ng/ml o inferiores, mientras que con la técnica de inmunoanálisis enzimático para pruebas múltiples (EMIT) son de 300 ng/ml. Los anticuerpos de los materiales comerciales de inmunoanálisis reaccionan en presencia de benzoilecgonina, pero pueden tener una reacción cruzada de diversas modalidades ante la cocaína y sus demás metabolitos [97]. En el cuadro IV.2 se resumen las reactividades cruzadas de algunos análisis comerciales.

Cuadro IV. 2 Reactividades cruzadas de módulos de inmunoanálisis comerciales para detectar metabolitos de la cocaína

Análisis	Reactividad cruzada (%)			
	Benzoilecgonina	Cocaína	Éster metílico de la ecgonina	Ecgonina
Coat-A-Count	104 (300) ^{a,b}	7 259 (50)	1,3 (5 000)	--
Abuscreen-RIA	108 (300) ^{a,b}	215 (300)	0,6 (5 000)	--
EMIT-d.a.u.	100 (300) ^{c,d}	0,15 (200 000)	--	1,5 (20 000)
EMIT-d.a.u.	pos. (300) ^b	neg. (5 000)	neg. (5 000)	--
IAPF-TDx	95,7 (300) ^{a,b}	1,2 (5 000)	0,1 (5 000)	--
Abuscreen-Ontrak	100 (300) ^{c,d}	10 (3 000)	< 0,01 (> 100 000)	0,75 (40 000)
Abuscreen-Online	100 (300) ^{c,d}	0,97 (30 928)	0,31 (96 774)	1,2 (25 000)

^aReactividad cruzada (%) aparente calculada dividiendo la concentración aparente por la concentración deseada y multiplicando por 100 (la concentración entre paréntesis, en la que se determinó la reacción cruzada, ng/ml).

^bJ. E. Wallace [86].

^cReactividad cruzada calculada dividiendo la concentración deseada (300 ng/ml) por la concentración equivalente a 300 ng/ml de benzoilecgonina y multiplicando por 100 (equivalentes entre paréntesis, ng/ml).

^dInformación del fabricante.

2. Cromatografía en capa delgada

Se debe extraer un volumen de 5 a 20 ml de orina. La CCD tradicional tiene un límite de detección de cocaína y benzoilecgonina de 1 mg/ml de orina. La cromatografía en capa delgada de gran rendimiento (CCDGR) tiene un límite de detección de benzoilecgonina de aproximadamente 0,3 mg/ml de orina y debe emplearse preferentemente si se dispone del instrumental necesario.

Técnica estándar de CCD

En otros lugares [10] se exponen detalladamente los materiales y procedimientos de la CCD estándar, que son aplicables al análisis de extractos biológicos.

Placas de CCD

Revestimiento: Gel de sílice activado G que contiene un aditivo que al ser irradiado con luz ultravioleta emite rayos de luz fluorescente con una longitud de onda de 254 nm.

Espesor de la capa	0,25 mm
Tamaño de las placas:	Placas de vidrio de 20 X 30 cm, 20 X 10 cm ó 10 X 5 cm. El recorrido óptimo es de aproximadamente 10 cm.

Placas de CCDGR

Placas comerciales para CCDGR, de 10 X 10 cm, que normalmente dan un revelado superior a 5 cm.

Soluciones patrón

Cocaína
Benzoilecgonina
Éster metílico de la ecgonina

Se preparan soluciones patrón con una concentración de 1 mg/ml en metanol y se depositan 5 µl de cada solución en la placa.

Procedimiento

Se evaporan los extractos de orina en un tubo de ensayo (véase la sección IV.B.c) hasta que estén totalmente secos y se vuelven a disolver en metanol (50 µl). A continuación se deposita todo el extracto en la placa.

Disolventes para el revelado

Sistema A (CCD) [10]:	Metanol	100
	Amoníaco concentrado	1,5
Sistema B (CCD) [98]:	Cloroformo	50
	Metanol	50
Sistema C (CCDGR) [99]:	Acetato de etilo	15
	Metanol	15
	Diclorometano	5
	Amoníaco concentrado	3

Visualización

Antes de la visualización hay que secar las placas a la temperatura ambiente o, más rápidamente, con un secador de aire caliente o en horno a 120°C durante 10 minutos. Para el revelado adecuado de los colores es importante que no queden vestigios de amoníaco u otras bases en la placa. Se recomiendan los siguientes métodos de visualización:

Rayos UV a 254 nm.

Reactivo de yodoplatinato de potasio acidificado (véase la preparación en la sección II.C.2)

Reactivo de Dragendorff (véase la preparación en la sección II.C.2).

El rociado posterior de la mezcla con cloruro férrico acidificado puede mejorar la reacción [100].

Reactivo para rociado: se añade cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado (1 ml) a la solución acuosa de cloruro férrico (5%, p/v: 10 ml) y se mezclan.

Resultados

Cuadro IV.3 Valores R_f X 100

<i>Compuesto</i>	<i>Sistema de revelado</i>	
	<i>A</i>	<i>B</i>
Cocaína	59	61
Benzoilecgonina	25	28
Éster metílico de la ecgonina	65	--

Cuadro IV.4 Aspecto de las manchas según el método de visualización

Compuesto	Método de detección		
	UV	Yodoplatinato	Dragendorff
Cocaína	Oscura	Violeta	Naranja ^a
Benzoilecgonina	Oscura	Negativa ^b	Naranja ^a
Éster metílico de la ecgonina	Negativa	Azul	Naranja ^a

^a El color no varía tras rociar la placa con la solución de cloruro férrico acidificado.

^b Las manchas de >1 µg son púrpuras sobre fondo púrpura algo más claro [85].

D. Métodos cromatográficos de confirmación

I. Cromatografía en fase gaseosa

a) Derivación de las muestras

Para detectar los metabolitos de la cocaína, habrá que someter a derivación el extracto de orina (véanse también las notas en la sección I.G.5).

Alquilación/acilación (derivados de PFP, adecuada para detectores de llama de ionización y de nitrógeno-fósforo) [83].

Se evapora el extracto de orina hasta que esté totalmente seco y se añaden anhídrido pentafluoropropiónico (50 µl) y pentafluoropropanol (25 µl). Se calienta la mezcla a 90°C durante 15 minutos. Se evaporan los reactivos de derivación y se vuelve a disolver el residuo en acetato de etilo (25 µl). Los derivados de PFP que se forman son estables en el reactivo durante meses, y por lo menos durante 24 horas tras la evaporación del reactivo.

Sililación (derivados de TMS o TBDMS, adecuada para detectores de llama de ionización)

Se evapora el extracto de orina hasta que esté totalmente seco y se reconstituye en acetonitrilo (25 µl). el reactivo sililador, por ejemplo, 25 µl de *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) para derivados de TMS o *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA) [88] para derivados de TBDMS, y se deja que tenga lugar la reacción a una temperatura de 50 a 60°C durante 30 minutos. Se inyecta directamente la mezcla en el cromatógrafo. Habrá que preparar los derivados inmediatamente antes del análisis por CG o CG/EM. Los derivados sólo son estables en el reactivo durante unos cuantos días.

b) Técnica de la columna de relleno [10]

Condiciones de trabajo

Detector: Detector de llama de ionización, hidrógeno a 30 ml/min, aire a 450 ml/min.

Nota: Para mejorar la sensibilidad y la especificidad, se recomienda un detector de nitrógeno-fósforo cuyos parámetros de trabajo correspondan a las recomendaciones del fabricante. Habrá que escoger procedimientos de preparación y derivación de muestras que no necesiten reactivos ni disolventes nitrogenados en la solución final inyectada en el cromatógrafo.

Columna: 2 m X 2 a 4 mm de D.I.

Relleno: a) Dimetil silicona (SE-30, OV-1)

b) Fenilmetil silicona, 50% fenilo (OV-17)

Gas portador: Nitrógeno a 30 ml/min

Temperaturas de trabajo:

Inyector: 220°C

Horno: 220°C

Detector: 300°C

Acondicionamiento de las columnas de relleno:

Nota: Antes de emplearlas, habrá que preparar todas las columnas de relleno. De ordinario, la temperatura de acondicionamiento debe ser superior en por lo menos 30°C a la temperatura a que se vaya a efectuar el análisis, a no ser que esto obligue a rebasar el límite superior de temperatura de la columna que indique el fabricante; en tal caso se aplicará un diferencial de temperatura menor y se prolongará considerablemente el período de acondicionamiento. La preparación de las columnas suele durar una noche o un mínimo de 15 horas.

El acondicionamiento se efectúa con el chorro normal de gas portador y con la columna desconectada del detector.

Nota:

- Silanizar las columnas de vidrio con frecuencia para evitar la adsorción de la morfina durante las determinaciones de CG.
- Limpiar el orificio de inyección y el detector periódicamente para evitar la descomposición de las muestras y la pérdida de sensibilidad del detector.
- Manipular los reactivos de sililación con cuidado, ya que son muy reactivos y sensibles a la humedad.

c) Técnica de la columna capilar

Condiciones de trabajo

Detector:	Detector de llama de ionización o de nitrógeno-fósforo (véase la nota <i>supra</i> , bajo Detector)			
Columna:	Sílice fundida, 25 m X 0,32 mm de D.I. con 0,15 µm de fase estacionaria químicamente ligada no polar (metilsilicona)			
Gas portador:	Helio o hidrógeno a 2 ml/min			
Temperaturas de trabajo:	Inyector:	250°C		
	Horno:	150 a 280°C, a 9°C/min		
	Detector:	280°C		

Nota: Las dimensiones de la columna capilar, la fase estacionaria, el espesor de fase, el gas portador y el caudal empleados pueden diferir de los citados según el instrumental de que se disponga. Ahora bien, las columnas no polares son de aplicación general en el análisis de muestras biológicas y se recomienda su uso. Habrá que seleccionar las condiciones óptimas de trabajo del sistema atendiendo a las recomendaciones del proveedor.

2. Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas

Si se emplea como detector un espectrómetro de masas, los principales iones (m/z) de los espectros de IE+ son los que figuran en el cuadro IV.5. Véanse en otros lugares [95, 101] procedimientos detallados de CG/EM que emplean el método de monitoreo selectivo de iones (SIM).

Cuadro IV.5 Principales iones en los espectros de masas correspondientes a la cocaína y sus metabolitos

Compuesto	Principales fragmentos de ion (m/z)			
	Subderivados	Derivados PFP	Derivados TMS	Derivados TDMS
Cocaína	82,105,182,303	(no se forma)	(no se forma)	(no se forma)
Benzoilecgonina	82,93,124,168	272,300,316,421	82,240,361	282,346,403
Éster metílico de la ecgonina	82,96,168,199	119,182,345	82,83,96,98,182	182,256,313

3. Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento

Procedimiento

Se evaporan los extractos de orina hasta que estén totalmente secos, se reconstituyen en acetonitrilo o fase móvil (50 a 100 µl) y se inyectan 10 a 20 µl.

Son apropiados los siguientes sistemas de CLAR:

Condiciones de trabajo

Método A [87]

Columna:	Octadecilsílice, columna en fase inversa, 3 μ m; D.I. 10 cm X 3,2 mm
Fase móvil:	Tampón de fosfato (0,01 M; pH 2,1) que contenga hidróxido de tetrabutilamonio (0,2 mM) y acetonitrilo (6% v/v)
Caudal:	1,5 ml/min
Detección:	UV a 233 nm

Método B [88]

Columna:	Octadecilsílice, columna en fase inversa, 3 μ m; D.I. 15 cm X 4,6 mm + precolumna
Fase móvil:	Acetonitrilo-agua (17,5:82,5, v/v) que contenga ácido fosfórico (8,5 g/l y hexilamina (0,28 ml/l), pH 3
Caudal:	1,2 ml/min
Detección:	UV a 230 nm

Método C [94]

Columna:	Octadecilsílice, columna en fase inversa, D.I. 25 cm X 4,6 mm + precolumna
Fase móvil:	Inicial: 10% de acetonitrilo en tampón de fosfato potásico (0,05 M; pH 3,2). Se aumenta a un 50% de acetonitrilo durante 15 minutos y la composición definitiva se mantiene durante 5 minutos. Entre las inyecciones es preciso dejar un período de 5 minutos para que la mezcla se reequilibre.
Caudal:	1,5 ml/min
Detección:	UV a 200 nm

E. Interpretación de los resultados

1. Período de detección

Tras una sola dosis de cocaína se puede detectar la droga inalterada durante un período de hasta 24 horas y los metabolitos benzoilecgonina y éster metílico de la ecgonina hasta 48 horas [102 a 104]. Si el consumo es crónico, el tiempo de detección puede llegar hasta 5 días o más [105 y 106].

Las diferencias en las cantidades relativas de metabolitos excretados son mínimas entre la administración de cocaína por vía intranasal, intravenosa o intrapulmonar (si se ha fumado) [107].

Por lo general, no se pueden sacar conclusiones a partir de la concentración de cocaína y sus metabolitos en la orina en lo tocante a la cantidad de droga administrada, el tiempo transcurrido desde la última dosis o el grado de trastorno.

2. Precauciones

El éster metílico de la ecgonina se forma por acción de la enzima seudocolinesterasa. Diversas anomalías de la actividad de la seudocolinesterasa, que tienen causas genéticas [108] o se deben a la ingestión simultánea de inhibidores de la colinesterasa – por ejemplo, plaguicidas organofosfóricos – podrían alterar la pauta de excreción del metabolito.

Se puede observar la presencia de éster metílico de la benzoilecgonina (cocaetileno), un homólogo de la cocaína, y otros productos menores de transformación a raíz de la administración simultánea de cocaína y etanol [99, 109].

El consumo de bebidas preparadas con té que contiene hojas de coca (“Health Inca Tea”) puede dar lugar a ingestión de cocaína y a la consiguiente excreción urinaria de benzoilecgonina con una concentración de varios miligramos por litro de orina [110].

Se puede detectar éster metílico de anhidroecgonina después de fumarse la cocaína de base libre (“crack”) [111].

F. Análisis e interpretación en otras matrices biológicas

Las concentraciones de cocaína y benzoilecgonina en el plasma tras la administración terapéutica de cocaína suelen ser inferiores a 0,5 y 0,1 µg/ml, respectivamente. En caso de sobredosis, los niveles encontrados en la sangre extraída durante la autopsia varían normalmente entre 1 a 20 µg/ml y 1 a 10 µg/ml, respectivamente [76, 112].

Como ya se ha indicado (sección IV.B), la cocaína y sus metabolitos son poco estables si se someten a hidrólisis (enzimática o no enzimática). Las muestras de sangre y plasma se deben recoger en tubos que contengan fluoruro sódico y su pH se debe ajustar a 5 con ácido acético (10%, v/v). De ese modo se pueden conservar en un refrigerador a 4°C o de ser posible congelarse durante varios meses [78, 79, 113].

Se ha descubierto que las muestras de cabellos y saliva de consumidores de cocaína contienen cocaína [114 a 118]. Aunque la interpretación cuantitativa de las concentraciones de cocaína en los cabellos aún no se ha perfeccionado suficientemente, los niveles de cocaína de la saliva parecen guardar una estrecha correlación con las concentraciones en el plasma.

V. Métodos recomendados para la detección y el análisis de anfetamina y metanfetamina en especímenes biológicos

A. Introducción

Gran parte de la anfetamina y la metanfetamina ilícitas se obtiene por síntesis en laboratorios clandestinos, aunque cantidades considerables, si bien relativamente menores, proceden de la desviación o el uso inadecuado de materiales de producción legal. La difusión de la anfetamina y la metanfetamina en distintas partes del mundo varía considerablemente: en Europa predomina la anfetamina, en tanto que la metanfetamina es la droga más corriente en los Estados Unidos, el Japón y Asia sudoriental.

Los métodos de producción, las características químicas y el aspecto material de la anfetamina y la metanfetamina ilícitas se describen pormenorizadamente en la publicación de las Naciones Unidas titulada *Métodos recomendados para el ensayo de anfetamina y metanfetamina* [119], por lo que no se repetirán aquí. Ahora bien, desde que se publicó el manual ha aparecido una forma pura de hidrocloreto de (+)-metanfetamina que, por sus cristales transparentes en forma de hoja, se denomina “hielo” [120],

1. Vías de administración

La anfetamina se ingiere generalmente por vía oral o intranasal (inhalación) en forma de sal de sulfato o fosfato y en dosis de 5 a 15 mg en los consumidores ocasionales y de 100 a 2.000 mg al día si se trata de consumidores habituales [121]. La metanfetamina, como la sal de clorhidrato, se prepara la mayoría de las veces para su inyección o para fumarla (“hielo”) [120], pero existe también en forma de tabletas.

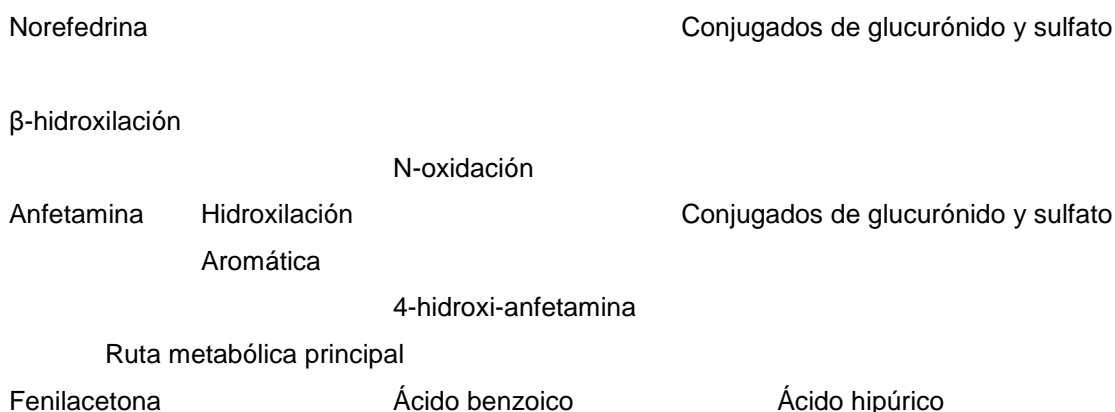
2. Metabolismo y excreción

Tras la ingestión de dosis orales de anfetamina de 2,5 a 15 mg, se alcanzan niveles máximos en el plasma de 30 a 170 µg/ml en dos horas y la duración media de eliminación del plasma oscila entre 8 y 12 horas. En los casos de fallecimiento, las concentraciones en la sangre suelen ser superiores a 500 µg/ml [106].

La anfetamina y la metanfetamina empiezan a aparecer en la orina al cabo de 20 minutos de su administración. La anfetamina se excreta como droga inalterada, normalmente entre el 20% y el 30% de la dosis, y en forma de droga desaminada (ácido hipúrico y ácido benzoico) y de metabolitos hidroxilados, en parte como conjugados, que suelen añadir hasta el 25% de la dosis. El ritmo de excreción y el porcentaje de la dosis excretada en forma de droga inalterada varían según el pH de la orina. En la orina alcalina se excreta cerca del 45% de la dosis en 24 horas, el 2% de la dosis como droga inalterada, en tanto que en la orina ácida se puede excretar hasta el 78% de la dosis en 24 horas y el 68% como droga inalterada [122]. Así pues, las sustancias cuya búsqueda se recomienda son las drogas no inalteradas. En la figura V.1 se resumen las rutas metabólicas principales y secundarias de la anfetamina.

INSERT FIGURE V.1

Figura V.1 Rutas metabólicas de la anfetamina



La metanfetamina se excreta en forma de droga inalterada (44%) y de sus principales metabolitos, anfetamina (6% a 20%) y 4-hidroximetanfetamina (10%) [123]. Las rutas metabólicas de la metanfetamina se resumen en la figura V.2. Igual que sucede con la anfetamina, la orina acidificada aumenta el ritmo de excreción y el porcentaje de droga inalterada que se excreta.

Tras su administración crónica, se han hallado en la orina de los consumidores concentraciones de anfetamina de 1 a 90 µg/ml y concentraciones de metanfetamina de 25 a 300 µg /ml [124].

B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de anfetamina y metanfemina y sus metabolitos

Los procedimientos y precauciones de carácter general expuestos en la sección I.C y G.5 se aplican a las muestras empleadas para ensayos de detección de anfetamina y metanfetamina.

Precauciones

Se debe tener cuidado al concentrar por evaporación extractos que contengan anfetamina y metanfetamina, pues se pueden perder las bases libres en el curso de la evaporación del disolvente. Se pueden evitar esas pérdidas añadiendo ácido clorhídrico metanoico (metanol: ácido clorhídrico concentrado a 9:1 v/v; 50 µl) al extracto, para formar las correspondientes sales clorhídricas de las drogas antes de que se evapore el disolvente.

INSERT FIGURE V.2

Figura V.2 Ruta metabólica de la metanfetamina

4-hidroxi-metanfetamina

Hidroxilación aromática

Metanfetamina

N-oxidación

Anfetamina

1. Preparación de la muestra para el inmunoanálisis

En general, para los inmunoanálisis iniciales la preparación de la muestra es mínima. No es necesario hidrolizar las muestras de orina porque el inmunoanálisis permite medir tanto las formas libres como conjugadas de las drogas y los metabolitos. Quizás sea necesario ajustar el pH o centrifugar la orina para eliminar la turbidez. Para obtener resultados óptimos, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

2. Preparación de la muestra para la cromatografía

a) Hidrólisis

No es preciso efectuar hidrólisis.

b) Extracción

Extracción líquido-líquido

La anfetamina y la metanfetamina se extraen de la orina con un pH alcalino cuando el grupo amino se encuentra en estado neutro. Los valores pK_a de ambas drogas son 9,9 y 10,1, respectivamente, y hay que ajustar a 11 el pH de la orina para obtener un rendimiento óptimo. Se puede aplicar el siguiente método [125]:

Se pipetea orina (2 ml) en un tubo de fondo cónico de 50 ml y se añade una solución del patrón interno (solución de 2-metil-feniletilamina; 8 µg/ml; 0,25 ml), una solución de hidróxido sódico (1 M; 2 ml), agua (5 ml) y diclorometano (20 ml). Se tapona la probeta, se agita, se centrifuga a poca velocidad durante 5 minutos y se desecha la capa superior.

Si es menester purificar más el extracto, se puede seguir el siguiente procedimiento de eliminación, que se basa en la extracción por rotación acelerada en ácido:

Se añade al extracto ácido sulfúrico (0,15 M; 2 ml) y se cierra la probeta, se agita y se centrifuga como se ha indicado antes. Se traslada la fase acuosa superior a una probeta de fondo redondo de 15 ml, añadiendo una solución de hidróxido sódico (1 M; 1 ml) y 1-clorobutano o diclorometano (2,5 ml). Se tapona la probeta, se somete a una enérgica rotación acelerada superficial y se centrifuga. Se traslada el disolvente orgánico a una probeta limpia. Se añade ácido clorhídrico metanoico (9:1 v/v; 50 µl) y se evapora el extracto hasta que esté totalmente seco.

Extracción en fase sólida

Este método permite ahorrar tiempo, disminuye el volumen de disolventes necesarios y evita los problemas que ocasiona la formación de emulsiones que a veces tiene lugar en el curso de la extracción líquido-líquido, aunque estas ventajas se contrarrestan por el costo de los cartuchos que deben emplearse.

Los cartuchos adecuados contienen diatomita o sílice sustituida con grupos no polares (octadecilsílice) [126], grupos de intercambio de cationes, o sustitutos mixtos no polares y con intercambio de iones [127]. Hay que seguir las instrucciones del fabricante de los cartuchos que se utilicen.

A continuación se describe un procedimiento corriente:

Se acondicionan los cartuchos con fuerte intercambio de cationes (sílice benceno-sulfonilpropilo, de 1 ml de capacidad) al vacío o en un aparato de vacío con metanol (2 ml), agua (1 ml) y ácido fosfórico (10 mM; 0,5 ml). Mezclar cuidadosamente orina (1 ml) y ácido fosfórico (10 mM; 0,5 ml) en una probeta y verter la mezcla en el cartucho. Secar el cartucho con aire durante aproximadamente 30 segundos y luego lavarlo con ácido fosfórico (10 mM; 1 ml), ácido acético (0,1 M; 0,5 ml) y metanol (1 ml). Se seca de nuevo con aire la columna durante aproximadamente 30 segundos y se eluyen los analitos con metanol amoniacoal (3% v/v; 2 ml). Se evapora el extracto hasta que esté totalmente seco al vacío o utilizando un chorro de nitrógeno, teniendo presente la advertencia formulada en la sección V.B.2.b.

c) Patrones internos

Si es posible, la selección de un patrón interno adecuado deberá ajustarse a los criterios generales expuestos en la sección I.G.6. Para el análisis por CG o CLAR de anfetaminas en la orina se proponen los siguientes patrones internos: fentermina, propilamfetamina y otros productos análogos de la anfetamina. En cuanto a la CG/EM, los patrones internos idóneos son productos análogos marcados con deuterio de la anfetamina y la metanfetamina; si no se puede disponer de ellos se utilizará uno de los patrones antes mencionados para la CG.

d) Patrones de calibración

Preparar soluciones concentradas en metanol que contengan 1 mg/ml de anfetamina, metanfetamina o el patrón interno. A partir de esas soluciones concentradas, preparar patrones de orina que contengan entre 0 y 5 µg/ml de anfetamina y metanfetamina y el patrón interno con una concentración de 5 µg/ml. Al mismo tiempo que las muestras de prueba se debe tratar un conjunto de patrones de orina para la calibración.

C. Métodos de detección

1. Métodos de inmunoanálisis

Como se indica en la sección I.G.1, se pueden utilizar técnicas de inmunoanálisis para seleccionar las sustancias, pero si se obtienen resultados positivos hay que confirmarlos con un método distinto, más específico. Esto es especialmente importante si se trata de analizar anfetamina y metanfetamina, pues hay muchas drogas similares a la anfetamina que pueden tener una reacción cruzada con anticuerpos que reaccionan con la anfetamina y la metanfetamina (véase también la sección VI.C.1). Los módulos de inmunoanálisis comerciales para detectar anfetamina y metanfetamina comprenden el inmunoanálisis enzimático, el inmunoanálisis con polarización por fluorescencia, la inhibición de la aglutinación con látex y el radioinmunoanálisis. Los pormenores de estos inmunoanálisis varían considerablemente, según

el anticuerpo que se utilice. En el cuadro V.1 se resumen alguna características de los inmunoanálisis disponibles.

Cuadro V.1 Reactividades cruzadas de módulos de inmunoanálisis comerciales para la detección de anfetamina (A) y metanfetamina (MA)

<i>Inmunoanálisis</i>	<i>Reactividad cruzada (%)</i>				
	<i>d-A</i>	<i>l-A</i>	<i>d,l-A</i>	<i>d-MA</i>	<i>l-MA</i>
EMIT-d.a.u. monoclonal	200 (300) ^{a,b}	10 (2 900)	60 (500)	100 (1 000)	14 (7 000)
IAPF-TDx anfetamina	91 (1000) ^{c,d}	61 (1 000)	100 (1 000)	123 (1 000)	115 (1 000)
IAPF-TDx anfetamina/ metanfetamina II	100 (1 000) ^{c,d}	57 (1 000)	165 (1 000)	98 (1000)	7 (1 000)
Abuscreen-Online	100 (1 000) ^{a,b}	--	66 (1 517)	0,5 (219 298)	--

^aReactividad cruzada calculada dividiendo la concentración deseada (300 o 1 000 ng/ml) por la concentración equivalente a 300 o 1 000 ng/ml de *d*-anfetamina o 1 000 ng/ml de *d*-metanfetamina y multiplicando por 100 (equivalente entre paréntesis, ng/ml).

^bInformación del fabricante.

^cReactividad cruzada calculada dividiendo la concentración aparente (medida) por la concentración real y multiplicando por 100 (la concentración entre paréntesis, en que se determinó la reactividad cruzada, ng/ml).

^dJ. T. Cody [128].

2. Cromatografía en capa delgada

Técnica estándar de CCD

En la sección I.G.2 figuran diversas observaciones de carácter general sobre la utilización de la cromatografía en capa delgada como técnica de detección. En otros lugares [10] se exponen detalladamente los materiales y procedimientos estándar de la CCD, que son aplicables al análisis de extractos biológicos.

Placas de CCD

Revestimiento:	Gel de sílice activado G que contiene un aditivo que al ser irradiado con luz UV emite rayos de luz fluorescente con una longitud de onda de 254 nm.
Espesor de la capa:	0,25 mm
Tamaño de las placas:	20 X 20 cm, 20 X 10 cm ó 10 X 5 cm; el recorrido óptimo es de aproximadamente 10 cm.

Soluciones patrón

Anfetamina
Metanfetamina

Se hacen todas las soluciones patrón con una concentración de 5 mg/ml en metanol y se deposita 1 µl de cada solución en la placa.

Procedimiento

Se evaporan los extractos de orina en una probeta de ensayo hasta que estén totalmente secos, teniendo presente la advertencia formulada en la sección V.B.2.b, y se vuelven a disolver en metanol (50 µl). Se deposita todo el extracto en la placa con un tubo capilar de vidrio.

Disolventes para el revelado [129]

Sistema A:	Metanol	100
	Amoníaco concentrado	1,5
Sistema B:	Acetato de etilo	85
	Metanol	10
	Amoníaco concentrado	5

Visualización

Antes de la visualización hay que secar las placas a la temperatura ambiente en un horno a 120°C durante 10 minutos o, más rápidamente, utilizando un secador de aire caliente. Para el revelado adecuado de los colores es importante que no queden vestigios de amoníaco en la placa. Se recomiendan los métodos de visualización siguientes:

Reactivo Fast Black [130 a 132]

Solución A: 1% de sal Fast Black K en agua
Solución B: 1 M de hidróxido sódico

Pulverizar las placas con la solución A y observar si aparecen manchas de color. Las aminas secundarias como la metanfetamina producen manchas de inmediato. El rociado con la solución B produce una mancha de color si hay anfetamina (o cualquier otro sustituto de la anfetamina). Secar con aire las placas y rociarlas una vez más con la solución A, lo cual producirá manchas de color más intenso. El color varía de violeta, si se trata de aminas primarias, a naranja, si se trata de aminas secundarias como la metanfetamina. Los umbrales de detección de anfetamina y metanfetamina son 0,1 µg y 0,05 µg, respectivamente [130].

Reactivo de ninhidrina.

Preparar una solución al 10% en etanol.

Rociar con el reactivo de ninhidrina y calentar en un horno a 120°C durante por lo menos 15 minutos. Aparecerán manchas violetas o rosas si se trata de aminas primarias como la anfetamina, y manchas más intensas si se trata de aminas secundarias como la metanfetamina.

Reactivo con fluorescamina (Floram).

Preparar una solución de 10 mg de fluorescamina en 50 ml de acetona.

Rociar con el reactivo de fluorescamina. Secar la placa con un secador de aire caliente. Observar la placa usando una luz UV de 365 nm: La anfetamina produce una mancha fluorescente amarilla brillante. El umbral de detección de la anfetamina y otras anfetaminas primarias es de aproximadamente 10 ng. No se detecta la metanfetamina.

Reactivo de Simons

Solución A: Carbonato sódico acuoso al 20%
Solución B: Nitroprusiato sódico acuoso al 1%.

Rociar la placa con la solución A y luego con la solución B. Colocar la placa en una cubeta de revelado vacía junto a una cubeta que contenga acetaldehído. Tapar el recipiente. El vapor de acetaldehído originará una mancha de metanfetamina que adoptará un color azul intenso. El umbral de detección de la metanfetamina en la orina es de aproximadamente 0,1 µg/ml. La anfetamina y otras aminas primarias producen manchas que varían de rosa pálido a rojo vivo y la reacción es menos sensible.

Resultados

Cuadro V.2 Valores R_f X 100

Compuesto	Sistema de revelado	
	A	B
Anfetamina	44	66
Metanfetamina	33	63

3. Prueba del color

Se ha dado a conocer una prueba sensible y específica para detectar metanfetamina en la orina [133].

Preparación de los cartuchos adsorbentes

Se introduce el sílice octadecilsilil (sílice-ODS; 0,13 g) por succión con un aspirador en un tubo de polietileno (35 mm X 4 mm de D.I.), rematado con una punta fina (2 mm de D.I. aproximadamente).

Preparación del reactivo de Simons modificado

Se mezcla acetaldehído (25 ml) que contenga 1,5% de ácido acético con metanol (25 ml) y se guarda en una refrigeradora. Antes de usarlo, se mezcla un volumen de la solución de acetaldehído con un volumen de 1% de solución acuosa de nitroprusiato sódico.

Procedimiento

En primer lugar se activa cada cartucho adsorbente haciendo pasar a través de él metanol-0,1 M de ácido clorhídrico (9:1 v/v; 2 ml) y luego agua destilada (3 ml). Se mezcla una parte alícuota de la muestra de orina (5 ml) con el tampón (0,5 M; pH 8,0; 2,5 ml) y se hace pasar lentamente la solución a través del cartucho adsorbente con una jeringa desechable. Se limpia el cartucho con acetona acuosa (20% v/v; 4 ml) y luego se hace pasar el reactivo de Simons modificado (0,4 ml) a través del adsorbente. Se recoge el eluyente en cuatro fracciones de tres gotas y se añade una gota de solución de carbonato sódico (1% p/v) a cada fracción. Si hay metanfemina, aparece un color azul, fundamentalmente en la tercera fracción, pero también en la segunda y la cuarta si hay una concentración elevada de metanfetamina en la orina. Si no hay metanfetamina, el color será naranja pálido. El umbral de detección es 1 µg/ml de metanfetamina en la orina y la prueba se puede realizar en tres minutos.

D. Métodos cromatográficos de confirmación

1. Cromatografía en fase gaseosa

a) Derivación de las muestras

Anhídrido heptafluobutírico (AHFB) [134]:

Se añade AHFB (50 µl) al residuo seco. Se tapa el tubo, se somete a rotación acelerada y se incuba a 75°C durante 20 minutos. Se destapa el tubo y se seca con aire o nitrógeno a 30°C. Se disuelve su contenido en 50 µl de acetato de etilo y se inyectan de 1 a 2 µl en la columna de CG.

Otro procedimiento [135]:

Se añade hidróxido de potasio (0,5 M; 50 µl) al residuo seco y después 500 µl de tolueno. Tras mezclarlos y centrifugarlos, se deposita la capa orgánica en un tubo de ensayo limpio y se añaden 5 µl de AHFB. Se mezcla cuidadosamente la solución y se añade inmediatamente bicarbonato sódico (10% p/v; 500 µl) sin dejar de revolver la mezcla. Se centrifuga el tubo y se inyecta 1 µl de la capa (superior) de tolueno en la columna de CG.

Anhídrido trifluoroacético (ATFA) [50, 60]:

Se añade acetato de etilo (100 µl) y ATFA (50 µl) al residuo seco. Se agita el tubo y se incuba a 60°C durante 20 minutos. Se evapora cuidadosamente la mezcla hasta obtener un volumen de 50 µl en un chorro débil de aire o nitrógeno a temperatura ambiente y se inyectan de 1 a 2 µl en la columna de CG.

N-metil-N-tert-butildimetilsilil trifluoroacetamida (MTBSTFA) [137]:

Se añaden 100 µl de acetonitrilo y 150 µl de MTBSTFA al residuo seco. Se tapa el tubo y se calienta a 90°C durante 15 minutos y se deja seguidamente a temperatura ambiente durante 2 horas o más. Se añaden 500 µl de acetonitrilo y el contenido se mezcla y se utiliza para CG o CG/EM.

b) Método sin derivación

Condiciones de trabajo

Detector:

Detector de llama de ionización o de nitrógeno-fósforo

Columna: Columna de relleno de vidrio (2 m X 3 a 4 mm de D.I.) con fases estacionarias líquidas de dimetilsilicona (p.ej., OV-1, SE-30) o metilfenilsilicona (p.ej., OV-17)

Gas portador: Nitrógeno a 30 ml/min

Las columnas capilares de sílice fundida con fases estacionarias no polares ligadas (p.ej., SE-54) son una variante útil de las columnas de relleno que se acaban de describir. Se utiliza gas portador de helio con un caudal de 1 ml/min

Temperaturas de trabajo: Inyector: 250 a 280°C
 Horno: 90 a 280°C (la programación de la temperatura dependerá de la columna que se utilice)
 Detector: 280 a 300°C

c) Método con derivación

Condiciones de trabajo

Detector: Detector de llama de ionización, de nitrógeno-fósforo, ECD o EM con ionización IE+, en el modo de trabajo de monitoreo selectivo de iones (SIM).

Columnas y temperaturas: Véase el método sin derivación *supra*.

Resultados

Cuadro V.3 Datos de retención de la anfetamina y la metanfetamina y sus derivados

Compuesto	Columna		
	SE-30 ^a	3% OV-17	SE-54
	<i>Sin derivar^a</i>	<i>Derivado por TFA^a</i>	<i>Derivado por AHFB^b</i>
Anfetamina	1 129	1 536	2,74
Metanfetamina	1 176	1 722	3,61

^aÍndices de retención.

^bTiempos de retención (min) en una columna capilar SE-54 (25 m X 0,3 mm de D.I., espesor de la película 0,17 µm) con un programa de temperatura de 120°C (1 min) a 280°C a 10°/min.

2. Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas [125,134, 136, 137]

Cuando se emplea un espectrómetro de masas como detector, los principales iones (m/z) en la ionización IE+, en el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) son los que figuran en el cuadro V.4.

Cuadro V.4 Principales iones en los espectros de masas de la anfetamina y la metanfetamina y sus derivados

Compuesto	Principales fragmentos iónicos (m/z)			
	<i>Sin derivar</i>	<i>AHFB</i>	<i>TFA</i>	<i>TBDMs</i>
		<i>Sin derivar^a</i>	<i>Derivado^a</i>	<i>Derivado^b</i>
Anfetamina	44, 65, 91	91, 118, 240	91, 118, 140	73, 100, 158, 192
Metanfetamina	58, 91, 134	91, 118, 254	110, 118, 154	73, 172, 173, 206

3. Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (CLAR)

A continuación se exponen dos métodos para el análisis de anfetamina y metanfetamina en la orina por medio de la CLAR [138 a 141].

a) Método sin derivación [138].

Preparación de las muestras

La extracción de muestras se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente (sección V.B), empleando fentermina como patrón interno. Los extractos se evaporan en un chorro de nitrógeno hasta que estén totalmente secos, teniendo en cuenta las advertencias formuladas en la sección V.B.2, y después se vuelven a disolver en 50 a 100 µl de acetonitrilo o fase móvil.

Soluciones patrón

Las soluciones patrón se preparan disolviendo el material de referencia en acetonitrilo para obtener una concentración de 0,01 mg/ml.

Condiciones de trabajo

Columna:	Octadecilsilíce, (Spherisorb ODS-1 o equivalente), 3 ó 5 µm, 12, 5 cm X 4,0 mm de D.I. + precolumna
Fase móvil:	Acetonitrilo-agua (57:943 p/p) + ácido fosfórico (8,5 g/l) + hexilamina (0,28 ml/l). Según el tipo de columna que se utilice, se pueden optimizar los valores K' variando la proporción entre el acetonitrilo y el agua.
Caudal:	0,8 ml/min
Detección:	UV a 190 nm
Volumen de inyección:	10 µl
Cuantificación:	Por punto máximo usando el patrón interno.

Resultados

Tiempos de retención con respecto a la fentermina (patrón interno)

Anfetamina	0,64
Metanfetamina	0,93
Fentermina	1,00 (8,1 min)

b) Método con derivación [141]

Preparación de las muestras

La extracción de muestras se lleva a cabo conforme se ha descrito anteriormente (sección V.B), empleando fentermina como patrón interno. Las soluciones patrón se preparan disolviendo el material de referencia de orina (sustancia testigo) hasta obtener una concentración de 5 µg/ml y se tratan de igual modo que las muestras de orina para análisis. Se evaporan los extractos en un chorro de nitrógeno hasta que estén totalmente secos, teniendo en cuenta las advertencias formuladas en la sección V.B.2, y a continuación se vuelven a disolver en bicarbonato sódico (2% p/v; 200 µl) y se añade un volumen igual de β-naftoquinona-4-sulfonato de sodio. Tras calentar en un horno a 60°C durante 30 minutos, se extrae la solución acuosa con hexano/éter dietílico (2:1 v/v) utilizando un mezclador de torbellino durante 1 min. Se deposita la capa orgánica en una probeta limpia y se evapora en un chorro de nitrógeno hasta que esté totalmente seca. Se disuelve el residuo en acetonitrilo (100 µl).

Condiciones de trabajo

Columna:	Octadecilsilíce, (µ-Bondapack C-18 o equivalente), 3 ó 5 µm, 15 cm X 3,9 mm de D.I.
Fase móvil:	Acetonitrilo-metanol-0,01 M de ácido sulfúrico (20.20:60, v/v/v).
Caudal:	0,8 ml/min
Temperatura:	40°C
Detector:	UV a 248 nm o detector electroquímico a 0,0 V en contraposición a Ag/AgCl
Volumen de inyección:	5 a 10 µl
Cuantificación:	Por punto máximo usando el método del patrón interno.

Resultados

Los tiempos de retención con respecto a la fentermina (patrón interno) son los siguientes:

Anfetamina	0,57
Metanfetamina	0,70
Fentermina	1,00 (25,12 min)

E. Interpretación de los resultados

Se ha detectado anfetamina inalterada en la orina hasta 29 horas después de la toma de una sola dosis oral de 5 mg de anfetamina. También se ha detectado metanfetamina inalterada hasta 23 horas después de una sola dosis oral. Por lo general, un análisis de anfetamina positivo indica que en las 24 a 48 horas anteriores se ha consumido anfetamina o metanfetamina.

Hay que considerar otras tres cuestiones. En primer lugar, algunos fármacos genéricos que se utilizan como descongestivos y anoréxicos contienen efedrina y fenilpropanolamina, que pueden dar resultados positivos con análisis a base de EMIT y RIA si están presentes en la orina en una concentración significativa. En segundo lugar, algunos fármacos cuya prescripción requiere receta médica, como por ejemplo, benzfetamina, fenfluramina, mefentermina, fenmetracina y fentermina, también pueden dar resultados positivos en inmunoanálisis. Por último, algunas drogas producen anfetamina y metanfetamina en la orina como metabolitos (figura V.4). Por consiguiente, si se tienen dudas sobre la procedencia de la anfetamina o de la metanfetamina detectadas en una muestra de orina, es sumamente importante analizar de nuevo la orina en busca de las drogas originarias.

INSERT FIGURE V.4

Figura V.4 Drogas que se metabolizan en anfetamina o metanfetamina

Anfetamina como metabolito

Etilanfetamina
Clobenzorex
Mefenorex
Fenproporex
Prenilamina
Anfetaminil
Fenetilina

Metanfetamina como metabolito

Dimetilanfetamina
Benzfetamina
Furfenorex
Selegilina
Fencamina

VI. Métodos recomendados para la detección y el análisis de los derivados anfetamínicos con anillo sustituido en especímenes biológicos

A. Introducción

Los derivados anfetamínicos ilícitos con anillo sustituido se encuentran en general con menos frecuencia que la anfetamina y la metanfetamina, de las cuales se diferencian además por sus características químicas y farmacológicas y sus métodos de análisis. En este manual se abordarán las siguientes sustancias:

3,4-metilendioxfanfetamina	MDA
3,4-metilendioximetanfetamina	MDMA, éxtasis
3,4-metilendioxi-etil-anfetamina	MDE, MDEA
5-metoxi-3,4-metilendioxfanfetamina	MMDA
4-metoxianfetamina	PMA
4-metoximetanfetamina	PMMA
2,5-dimetoxianfetamina	DMA
2,5-dimetoxi-4-metil-anfetamina	DOM, STP
2,5-dimetoxi-4-etil-anfetamina	DOET
3,4,5-trimetoxianfetamina	TMA
4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina	DOB, bromo-STP

Se han sintetizado otros muchos productos análogos de la anfetamina y de la metanfetamina, algunos de los cuales se han distribuido ilícitamente en pequeña escala en distintos lugares; por ejemplo, la 3,4-metilendioxi-etil-anfetamina y la *N,N*-dimetil-anfetamina. Salvo la PMMA, también figuran entre las sustancias enumeradas en las listas anexas al Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971. En el Manual de las Naciones Unidas titulado *Métodos recomendados para el ensayo de los derivados anfetamínicos con anillo sustituido* [129] se exponen la historia y las propiedades físicas y químicas de esos derivados, por lo que no se reproducirán aquí. En recientes reseñas bibliográficas figuran nuevos datos sobre farmacología y toxicología [142 a 144].

1. Vías de administración

Prácticamente todas las sustancias ilícitas contienen la droga en forma de sal de clorhidrato y consisten en polvos blancos o mate, tabletas o cápsulas o, en el caso de la DOB, impregnada en papel (secante) para su administración por vía oral. No obstante, también se pueden inyectar por vía intravenosa o se pueden fumar, como sucede con el “hielo” (véase la sección V.A.2). La dosis habitual de MDA y MDMA oscila entre 80 y 125 miligramos. La DOM y la DOB se consumen por lo general por vía oral en dosis de 15 a 25 miligramos.

2. Metabolismo y excreción

La mayoría de los derivados anfetamínicos se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal y atraviesan con facilidad la barrera sangre-cerebro. Igualmente rápida es la aparición de los efectos sicotrópicos de las drogas.

No se ha estudiado a fondo el metabolismo humano de las anfetaminas con anillo sustituido, pero se pueden enunciar algunos aspectos generales a partir de los datos disponibles sobre seres humanos y de las conclusiones de estudios de metabolismo hechos en laboratorio con animales [144 a 153]. En todos los casos se excreta inalterada con la orina una fracción considerable de la dosis, o sea, que los compuestos originarios son la sustancia que hay que buscar en la detección del consumo de estas drogas mediante análisis de orina.

En el cuadro VI.1 se resumen las informaciones de que se dispone actualmente sobre el metabolismo de estas sustancias.

Asimismo, se sabe poco acerca del período de semidesintegración de estos derivados en el plasma y de su excreción en la orina, aunque diversos estudios aparecidos sobre la DOM y la DOET indican que en las 24 primeras horas se excreta sin alteración en la orina hasta un 20% de la primera y entre el 10% y el 40% de la segunda. La excreción urinaria máxima tiene lugar al cabo de 3 a 6 horas en ambos casos [150, 151].

En un estudio de control clínico con 1,5 mg/kg de peso corporal de MDMA, se observaron niveles máximos en el plasma del orden de 0,33 µg/ml después de 2 horas, con un período de semidestingración en el plasma de 8 horas. Pudieron observarse en el plasma pequeñas cantidades de MDA, el metabolito *N*-demetilo de la MDMA. Los niveles medios en la orina de MDMA fueron de aproximadamente 1,4, 14 y 23 µg/ml después de 1,5, 10 y 22 horas, respectivamente. Los principales metabolitos de la orina fueron la 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina y la 3,4-dihidroxi-metanfetamina, ambas excretadas como glucurónidos [153].

Cuadro VI. 1 Metabolismo de derivados de anfetamina con anillo sustituido

<i>Compuesto</i>	<i>Especies</i>	<i>Compuesto específico</i>	<i>Otros metabolitos</i>	<i>Referencias</i>
MDA	Ratas	MDA	4-hidroxi-3-metoxianfetamina	145
MDMA	Humanos	MDMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina	146, 153
			3,4-dihidroxi-metanfetamina (conjug.)	153
			3,4-metilendioxi-metanfetamina	153
PMA	Humanos	PMA	4-hidroxianfetamina	147
DOM	Humanos	DOM	4-carboxi-2,5-dimetoxianfetamina	148-150
DOET	Humanos	DOET		151
DOB	Humanos	DOB		152

B. Procedimientos de muestreo y de preparación de la muestra para el análisis de derivados anfetamínicos con anillo sustituido

Los procedimientos y las advertencias generales de la sección I.C y G.5 se aplican a las muestras utilizadas para ensayar derivados anfetamínicos con anillo sustituido.

Precauciones

Hay que tener cuidado al concentrar por evaporación extractos que contengan derivados anfetamínicos con anillo sustituido, pues durante la evaporación del disolvente se puede perder las bases libres. Para evitar estas pérdidas se puede añadir ácido clorhídrico metanólico (metanol: ácido clorhídrico concentrado 9:1 v/v; 50 µl) al extracto para formar las correspondientes sales clorhídricas de las drogas antes de que se evapore el disolvente.

1. Preparación de las muestras para el inmunoanálisis

En general, para los inmunoanálisis de detección la preparación de la muestra es mínima. No es necesario hidrolizar las muestras de orina porque el inmunoanálisis permite medir tanto las formas libres como conjugadas de las drogas y los metabolitos. Quizás sea necesario ajustar el pH o centrifugar la orina para eliminar la turbidez. Para obtener resultados óptimos, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

2. Preparación de las muestras para la cromatografía

a) Hidrólisis

En general no se requiere efectuar hidrólisis para las anfetaminas con anillo sustituido, salvo cuando tengan que analizarse concentraciones bajas de metabolitos mono-/dihidroxiados (p.ej., de MDMA) [153].

b) Extracción

Las sustancias que se buscan son los derivados anfetamínicos con anillo sustituido inalterados que se extraen de la orina siguiendo procedimientos similares a los descritos a propósito de la anfetamina y la metanfetamina (sección V.B). Obsérvese que algunos de los metabolitos de las sustancias de este grupo pueden contener grupos ácidos (carboxílicos y fenólicos) y básicos (aminas). Si hay que analizar estos metabolitos, habrá que seleccionar cuidadosamente las condiciones de extracción, en particular el pH.

Se han propuesto varios procedimientos de extracción en fase sólida de MDMA utilizando sorbentes mixtos [154] o de intercambio iónico [138, 153]. Se recomienda el método de extracción en fase sólida que se expone a continuación.

Se mezcla orina (2 ml) y el patrón interno (0,25 ml de una solución de 8 µg/ml del patrón interno escogido) con un tampón de fosfato (0,1 M; pH 6; 2 ml) [154]. De ser preciso, se ajusta el pH a un pH 5 a 7 con hidróxido sódico (0,1 M) o ácido clorhídrico (0,1 M). Se preparan los cartuchos para la extracción en fase sólida (de 5 ml de capacidad, rellenos con sílice modificada que contenga una mezcla de grupos no polares y de intercambio catiónico, por ejemplo, Bond Elud Certify^R) con metanol (2 ml) y el tampón de fosfato (0,1 M; pH 6; 2 ml). Se hacen pasar lentamente las muestras de orina por los cartuchos durante por lo menos 2 minutos. Se lavan los cartuchos con ácido acético (1 M; 1 ml) y luego se secan con aire a vacío total durante 5 minutos. Se vuelven a enjuagar los cartuchos con metanol (6 ml) y se secan de nuevo durante 2 minutos. Se eluyen las sustancias que se buscan con acetato de etilo que contenga un 2% de amoníaco concentrado (preparado poco antes; 2 ml). Se evapora cuidadosamente el eluato bajo una corriente de nitrógeno a temperatura inferior a 40°C. Obsérvese que no se puede añadir ácido clorhídrico metanólico a estos extractos para evitar las pérdidas por evaporación de la sustancia que se busca (véase la sección VI.B, *supra*), ya que haría que se precipitase el cloruro amónico. De ser preciso se puede purificar este extracto, según el método de análisis subsiguiente, dividiendo el residuo entre hidróxido sódico acuoso (1 M; 1 ml) y clorobutano (2,5 ml). Se lleva la capa orgánica superior a un tubo de vidrio limpio y se evapora cuidadosamente hasta que esté totalmente seca, después de lo cual se puede añadir ácido clorhídrico metanólico antes de evaporar el disolvente.

c) Patrones internos

La elección de un patrón interno adecuado deberá ajustarse, de ser posible, a los criterios generales formulados en la sección I.G. Se proponen los siguientes patrones internos para el análisis por CG o CLAR de anfetaminas con anillo sustituido en la orina: fentermina, propilamfetamina, metilendioxi-propilamfetamina y otros productos análogos de la anfetamina. En cuanto a la CG/EM, los patrones internos idóneos son los productos análogos marcados con deuterio de las sustancias que se buscan, y si no se pueden utilizar, se empleará uno de los patrones mencionados anteriormente para la CG.

d) Patrones de calibración

Preparar una solución concentrada de cada una de las sustancias que se buscan y del patrón interno en metanol con una concentración de 1 mg/ml. A partir de estas soluciones concentradas, preparar patrones de orina que contengan entre 0 y 5 µg/ml del compuesto o los compuestos que se buscan y el patrón interno con una concentración de 5 µg/ml. Simultáneamente con las muestras del ensayo se debe tratar un conjunto de patrones de orina para calibración.

C. Métodos de detección

1. Métodos de inmunoanálisis

En la sección I.G.1, se formulan diversas observaciones generales acerca de la selección y el empleo de inmunoanálisis. La mayoría de los inmunoanálisis para drogas similares a la anfetamina tienen por objeto detectar anfetaminas y metanfetaminas; ahora bien, algunos tienen una considerable capacidad de reactividad cruzada con miembros de la familia de los derivados anfetamínicos con anillo sustituido. Como los inmunoanálisis no son específicos, es necesario confirmar siempre los resultados positivos con un segundo método, más específico.

No se han determinado los niveles límite ni los umbrales de detección de las anfetaminas con anillo sustituido; en cambio, se poseen algunos datos sobre reactividad cruzada, que pueden compararse con las reactividades cruzadas y los niveles límite de la anfetamina y la metanfetamina para estimar los de los derivados con anillo sustituido (véase el cuadro VI.2).

Cuadro VI.2 Reactividades cruzadas de los derivados anfetamínicos con anillo sustituido obtenidas con módulos de inmunoanálisis comerciales

Análisis	Reactividad cruzada (%)						
	MDA	MDMA	MDE	DMA	TMA	DOB	DOM
EMIT-d.a.u. (monoclonal)	147 (1 000) ^{a,b}	74 (1 000) ^b	---	---	---	---	---
IAPF-TDx anfetamina	15 (1 000) ^{c,d}	25 (1 000)	32 (1 000)	0,6 (5 000)	0,4 (5 000)	0,5 (5 000)	0,6 (5 000)
IAPF-TDx anfetamina/metanfetamina II	148 (1 000) ^{c,d}	97 (1 000)	43 (1 000)	7 (5 000)	3 (5 000)	5 (5 000)	4 (5 000)
Abuscreen-Online	41 (1 000) ^{a,b}	0,2 (1 000)	66 (1 517)	0,5 (219 298)	---	---	---

^aReactividad cruzada calculada dividiendo la concentración deseada (1.000 ng/ml) por la concentración equivalente a 1.000 ng/ml de d-anfetamina y multiplicando por 100 (equivalentes entre paréntesis, ng/ml).

^bInformación del fabricante.

^cReactividad cruzada calculada dividiendo la concentración aparente (medida) por la concentración real y multiplicando por 100 (la concentración entre paréntesis, en que se determinó la reactividad cruzada, ng/ml).

^dVéase J.T. Cody [128].

2. Cromatografía en capa delgada

Técnica estándar de CCD

En la sección I.G.2, figuran diversas observaciones de carácter general sobre la utilización de la cromatografía en capa delgada como técnica de detección. En otros lugares [10] se exponen detalladamente los materiales y procedimientos estándar de la CCD, que son aplicables al análisis de extractos biológicos.

Placas de CCD

Revestimiento:	Gel de sílice activado G que contiene un aditivo que al ser irradiado con luz UV emite rayos de luz fluorescente con una longitud de onda de 254 nm.
Espesor de la capa:	0,25 mm
Tamaño de las placas:	Placas de vidrio de 20 X 20 cm, 20 X 10 cm ó 10 X 5 cm; el recorrido óptimo es de aproximadamente 10 cm

Soluciones patrón

Se hacen todas las soluciones patrón con una concentración de 1 mg/ml en metanol y se depositan 5 µl de cada solución en la placa.

Procedimiento

Se evaporan los extractos de orina en un tubo de ensayo hasta que estén totalmente secos, teniendo en cuenta la advertencia formulada en la sección VI.B, y se vuelven a disolver en metanol (50 µl). Se deposita todo el extracto en la placa con un tubo capilar de vidrio.

Disolventes para el revelado [129]

Sistema A:	Metanol	100
	Amoníaco concentrado	1,5
Sistema B:	Acetato de etilo	85
	Metanol	10
	Amoníaco concentrado	5

Visualización

Antes de la visualización hay que secar las placas a la temperatura ambiente en un horno a 120°C durante 10 minutos o, más rápidamente, utilizando un secador de aire caliente. Para el revelado adecuado de los colores es importante que no queden vestigios de amoníaco en la placa.

Reactivo Fast Black K [129 a 132]. (Véase la preparación en la sección V.C.2)]

Reactivo de ninhidrina. (Véase la preparación en la sección V.C.2)

Reactivo de fluorescamina (Fluram). (Véase la preparación en la sección V.C.2)

Se recomienda utilizar el reactivo de fluorescamina (Fluram) para la detección de concentraciones bajas de aminas primarias (véase la sección V.C.2).

Cuadro VI.3 Valores R_t X 100

Compuesto	Sistema de revelado	
	A	B
MDA	41	62
MDMA	31	62
PMA	41	62
DMA	37	65
DOM	35	63
DOET	36	61
DOB	37	62

D. Métodos cromatográficos de confirmación

1. Cromatografía en fase gaseosa

a) Derivación de las muestras

Anhídrido heptafluorobutírico (AHFB) [134]

Añadir AHFB (50 µl) al residuo seco. Tapar el tubo, someterlo a rotación acelerada e incubarlo a 75°C durante 20 minutos. Destapar el tubo y secarlo con aire o nitrógeno a 30°C. Disolver el contenido en 50 µl de acetato de etilo e inyectar 1 a 2 µl en la columna de CG.

Otro procedimiento [135]

Añadir hidróxido de potasio (0,5 M; 50 µl) al residuo seco y después 500 µl de tolueno. Tras mezclarlos y centrifugarlos, depositar la capa orgánica en un tubo de ensayo limpio y añadir 5 µl de AHFB. Mezclar cuidadosamente la solución y añadir inmediatamente bicarbonato sódico (10% p/v; 500 µl) sin dejar de revolver la mezcla. Centrifugar el tubo e inyectar 1 µl de la capa (superior) de tolueno en la columna de CG.

Anhídrido trifluoroacético (ATFA) [125, 136]

Añadir acetato de etilo (100 µl) y ATFA al residuo seco. Agitar el tubo e incubarlo a 60°C durante 20 minutos. Evaporar cuidadosamente la mezcla hasta obtener un volumen final de 50 µl en una corriente débil de aire o nitrógeno a temperatura ambiente e inyectar 1 a 2 µl en la columna de CG.

b) Método sin derivación: técnica de columna de relleno

Condiciones de trabajo

Detector:	Detector de llama de ionización, detector de nitrógeno-fósforo
Columnas:	Columnas de vidrio de relleno (2 m X 3 a 4 mm de D.I) con fases estacionarias líquidas de dimetilsilicona (p.ej., OV-1, SE-30) o metilfenilsilicona (p.ej., DB-1, OV-17)
Gas portador:	Nitrógeno a 30 ml/min.
	Las columnas capilares de sílice fundida con fases estacionarias no polares ligadas (p.ej., SE-54) son una alternativa útil a las columnas de relleno que se acaban de describir. El gas portador helio se utiliza a un caudal de 1 ml/min.
Temperaturas de trabajo:	Inyector: 250 a 280°C Horno: 90 a 180°C (la programación de la temperatura dependerá de la columna que se utilice). Detector: 280 a 300°C

c) Método con derivación

Condiciones de trabajo

Detector: Detector de llama de ionización, detector de nitrógeno-fósforo, CDE o EM con ionización IE, en el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM).

Columnas y temperaturas: Véase el método sin derivación *supra*.

Resultados

Cuadro VI.4 Datos de retención de las anfetaminas con anillo sustituido y sus derivados

Compuesto	Columna		
	OV-1 o SE-30 <i>Sin derivar^a</i>	DB-1 <i>Sin derivar^a</i>	SE-54 <i>Derivado por AHFB^b</i>
MDA	1 477	1 444	5,77
MDMA	1 585	1 501	6,87
PMA	1 412	1 346	4,77
DMA	1 558	1 527	6,24
DOM	1 618	1 593	6,65
DOET	1 654	1 654	7,23
DOB	1 809	1 786	8,70

^aÍndices de retención.

^bTiempos de retención (min) en una columna capilar SE-54, 25 m X 0,3 mm de D. I.; espesor de la película 0,17 µm, con un programa de temperatura de 120°C (1 min) a 280°C, a 10°C/min. El tiempo de retención de la anfetamina es con este régimen de 2,74 minutos.

2. Cromatografía en fase gaseosa-espectrometría de masas

Cuando se emplea un espectrómetro de masas como detector, los principales iones (m/z) de los espectros de IE+ son los que figuran en el cuadro VI.5.

Cuadro VI.5 Principales iones en los espectros de masas de derivados anfetamínicos con anillo sustituido

Compuestos	Principales fragmentos iónicos (m/z)	
	<i>Sin derivar</i>	<i>Derivados por AHFB</i>
MDA	44, 135, 136	135, 162, 240
MDMA	58,77, 135, 136	135, 162, 254
PMA	44, 78, 122	121, 148, 240
PMMA	58, 77, 78, 121	--
DMA	44, 72, 91	151, 178, 240
DOM	44, 151, 166	91, 135, 165, 193, 405
DOET	44, 165, 180	179, 206, 240
DOB	44, 215, 217, 230 232	229, 231, 256, 258, 240

3. Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento

A continuación se exponen dos métodos para el ensayo de derivados anfetamínicos con anillo sustituido en la orina por medio de CLAR [138 a 141].

a) Método sin derivación [138].

Preparación de las muestras

La extracción de muestras se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente (véase la sección VI. B), empleando fentermina como patrón interno. Los extractos se evaporan en un chorro de nitrógeno hasta que estén totalmente secos, teniendo en cuenta las advertencias formuladas en la sección VI.B.2, y después se vuelven a disolver en 100 µl de acetonitrilo o fase móvil.

Soluciones patrón

Las soluciones patrón se preparan disolviendo el material de referencia en acetonitrilo para obtener una concentración de 0,01 mg/ml.

Condiciones de trabajo

Columna:	Octadesílico (Spherisorb ODS-1 o equivalente), 3 ó 5 µm, 12,5 cm X 4,0 mm de D.I. + precolumna
Fase móvil:	Acetonitrilo-agua (57:943 p/p) + ácido fosfórico (8,5 g/l) + hexilamina (0,28 ml/l. Según el tipo de columna que se utilice, los valores K' pueden optimizarse variando la proporción entre el acetonitrilo y el agua.
Caudal:	0,8 ml/min
Detección:	UV a 190 nm
Volumen de inyección:	10 µl
Cuantificación:	Por punto máximo usando el patrón interno

b) Método con derivación [141]

Preparación de las muestras

La extracción de muestras se lleva a cabo conforme se ha descrito anteriormente (véase la sección VI.B), empleando fentermina como patrón interno. Se evaporan los extractos en una ampolla de cristal con corriente de nitrógeno hasta que estén totalmente secos y a continuación se vuelven a disolver en bicarbonato sódico acuoso (2%, p/v; 200 µl) y se añade una solución acuosa de β-naftoquinona-4-sulfonato sódico (0,5% p/v; 200 µl). Se tapan las ampollas y se calientan a 60°C durante 30 minutos. Después de enfriarlas, se extrae la solución acuosa con hexano/éter dietílico (2:1, v/v) utilizando un mezclador de torbellino durante un minuto. Se extrae la capa orgánica y se evapora en un chorro de nitrógeno hasta que esté totalmente seca. Se disuelve el residuo en acetonitrilo (100 µl).

Soluciones patrón

Las soluciones patrón se preparan disolviendo el material de referencia en orina (sustancia testigo) hasta obtener una concentración de 5 µg/ml.

Condiciones de trabajo

Columna:	Octadesílico (µ-Bondapack C-18 o equivalente) 3 ó 5 µm, 15 cm X 3,9 mm de D.I.
Fase móvil:	Acetonitrilo-metanol-0,01 M de ácido sulfúrico (20:20:60 v/v/v).
Caudal:	0,8 ml/min
Temperatura:	40°C
Detector:	UV a 248 nm o detector electroquímico a 0,0 V
Volumen de inyección:	5 a 10 µl
Cuantificación:	Por puntos máximos usando el método del patrón interno

Resultados

Cuadro VI.6 Tiempos de retención de los derivados anfetamínicos con anillo sustituido con respecto a la fentermina (patrón interno)

<i>Compuesto</i>	<i>Método sin derivación</i>	<i>Método con derivación</i>
MDA	0,83	0,49
MDMA	1,19	--
PMA	0,90 ^a	0,57
PMMA	--	0,76
Fentermina	1,00 (8,1 min; 3,4 min ^a)	1,00 (25,12 min)
DMA	1,88	--
DOM	2,15 ^a	1,44
DOET	4,06 ^a	--
DOB	2,59 ^a	1,72

^aValor determinado con una fase móvil que contiene acetonitrilo-agua (182:816 (p/p) + ácido fosfórico (8,5 g/l) + hexilamina (0,28 ml/l).

E. Interpretación de los resultados

Apenas hay publicaciones científicas sobre la gama de concentraciones que cabe prever entre los consumidores ocasionales o crónicos de anfetaminas con anillo sustituido.

Se sabe que, tras una sola dosis de MDA, las concentraciones en el plasma y la orina de droga inalterada son inferiores a 0,4 µg/ml y a 10 µg/ml, respectivamente. En cuanto a la PMA, las concentraciones correspondientes de droga en el plasma y la orina son inferiores a 0,2 µg/ml y 5 µg/ml, respectivamente [84].

En caso de consumo excesivo, se han hallado en el plasma y la orina niveles de MDA de 5 a 25 µg/ml y 50 a 150 µg/ml, respectivamente. En cuanto a la PMA, los niveles encontrados varían entre 0,3 y 2 µg/ml en el plasma y 5 y 200 µg/ml en la orina, respectivamente [84].

Después de administrarse 1,5 mg/kg de peso corporal de MDMA, se observaron niveles máximos en el plasma de aproximadamente 0,33 µg/ml, mientras que pudieron encontrarse concentraciones en la orina de cerca de 1,4, 14 y 23 µg/ml después de 1,5, 10 y 22 horas, respectivamente [153].

Se han notificado casos de defunción relacionados con el consumo de estas drogas. Las concentraciones en la sangre y la orina en dichos casos varían entre 2,3 y 26 µg/ml en la sangre y entre 46 y 175 µg/ml en la orina, respectivamente [154 a 156]. En cinco casos de defunción asociados con el consumo de MDMA y de MDEA se hallaron en la sangre niveles entre 0,9 y 2 µg/ml [157]. Nueve cadáveres de personas que habían consumido PMA presentaban concentraciones de PMA en la sangre y en la orina de 0,3 a 1,9 µg/ml y de 6,0 a 175 µg/ml, respectivamente [158].

Referencias

- 1 Informe del Grupo de Expertos sobre métodos recomendados para las pruebas de cannabis y el análisis de la anfetamina/metanfetamina, E/CN.7/1987/8.
- 2 Informe del Grupo de Expertos sobre directrices para el establecimiento de programas y laboratorios nacionales para las pruebas de detección de drogas de uso indebido en fluidos del organismo humano, E/CN.7/1988/CRP.5, párr. 42.
- 3 Comisión de Estupefacientes, informe sobre el décimo período extraordinario de sesiones, E/1988/13-E/CN.7/1988/14, párr. 236 b).
- 4 Informe de la Conferencia Internacional sobre el Uso Indebido y el Tráfico Ilícito de Drogas (publicación de las Naciones Unidas, No. de venta: S.87.1.18), párr. 84.
- 5 Métodos recomendados para la detección y el ensayo de heroína y cannabinoides en especímenes biológicos, Manual para uso de los laboratorios nacionales, ST/NAR/23, Naciones Unidas, 1993.
- 6 Métodos recomendados para la detección y el ensayo de cocaína, anfetamina, metanfetamina y derivados anfetamínicos con anillo sustituido en muestras biológicas, Manual para uso de los laboratorios nacionales, ST/NAR/24, Naciones Unidas, 1995.
- 7 Métodos recomendados para el ensayo de heroína, Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/6, Naciones Unidas, 1986.
- 8 Métodos recomendados para el ensayo de opio y morfina en bruto, Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/11, Naciones Unidas, 1987.
- 9 Métodos recomendados para el ensayo de la cannabis, Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/8, Naciones Unidas, 1987.
- 10 Métodos recomendados para el ensayo de cocaína, Manual para uso de laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/7, Naciones Unidas, 1986.
- 11 Métodos recomendados para el ensayo de anfetamina y metanfetamina, Manual para uso de laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/9, Naciones Unidas, 1988.
- 12 Métodos recomendados para el ensayo de los derivados anfetamínicos ilícitos con anillo sustituido, Manual para uso de laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/12, Naciones Unidas, 1988.
- 13 B. Needleman, M. Porvaznik y D. Ander, Creatinine analysis in single collection urine specimens, *J. Forens. Sci.* 37, 1125 a 1133 (1992).
- 14 C. Edwards, M. J. Fyfe, R. H. Liu y A. S. Walia, Evaluation of common urine specimen adulteration indicators, *J. Anal. Toxicol.* 17, 251 y 252 (1993).
- 15 R. C. Baselt, *Disposition of Toxi Drugs and Chemicals in Man*, Vol. 1, Biomedical Publications, Canton, Connecticut 06019, 1978, pág. 10.
- 16 J. G. Umans, T. S. K Chiu, R. A. Lipman, M. F. Schultz, S-U. Shin y C. E. Inturrisi, Determination of heroin and its metabolites by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 233, 213 a 225 (1982).
- 17 S. Y. Yeh, C. W. Gorodetzky y R. L. McQuinn, Urinary excretion of heroin and its metabolites in man, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196, 249 a 256 (1976).
- 18 *Opiachweis in Harn*, DFG/TIAFT Mitt. XXI, Verlag Chemie, Weinheim, 1993.
- 19 E. J. Cone y W. D. Darwin, Rapid assay of cocaine, opiates and metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 580, 43 a 61 (1992).

- 20 K. Bjerver, J. Johnsson, A. Nilsson, J. Schuberth y J. Schuberth, Morphine intake from poppy seed food, *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 798 a 801 (1982).
- 21 R. H. Drost, R. D. Van Ooijen, T. Ioescu y R. A. A. Maes, Determination of morphine in serum and cerebrospinal fluid by gas chromatography and selected ion monitoring after reversed phase column extraction, *J. Chromatogr.* 310, 193 a 198 (1984).
- 22 E. J. Cone, S. Dickerson, B. D. Paul y J. M. Mitchell, Forensic drug testing for opiates. IV. Analytical sensitivity, specificity, and accuracy of commercial urine opiate immunoassays, *J. Anal. Toxicol.* 16, 72 a 78 (1992).
- 23 Thin-Layer Chromatography, R_f Values of Toxicologically-Relevant Substances in Standardised Systems, DFG/TIAFT Mitt. XVII. Verlag Chemie, Weinheim, 1992.
- 24 L. R. Goldbaum, P. Santinga y A. M. Domínguez, A Procedure for the rapid analysis of large numbers of urine samples for drug, *Clin. Toxicol.* 5, 369 a 379 (1972).
- 25 D. C. Fuller y W. H. Anderson, A simplified procedure for the determination of free codeine, free morphine, and 6-acetylmorphine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 315 a 318 (1992).
- 26 P. M. Kabra y L. J. Marton, *Clinical Liquid Chromatography*, Vol. 1, Analysis of Exogenous Compounds, CRC Press, 1984, págs. 153 a 157.
- 27 C. Kim y T. Kats, Rapid and sensitive analysis of morphine in serum by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Anal. Toxicol.* 8, 135 a 137 (1984).
- 28 J. O. Svensson, Determination of morphine, morphine-6-glucuronide and normorphine in plasma and urine with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 375, 174 a 178 (1986).
- 29 J. Gerostamoulos, K. Crump, I. M. McIntyre y O. H. Drummer, Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 617, 152 a 156 (1993).
- 30 J. Fehn y G. Megges, Detection of O⁶-monoacetylmorphine in urine samples by GC/MS as evidence for heroin use, *J. Anal. Toxicol.*, 9, 134 a 138 (1985).
- 31 R. W. Romberg y V. E. Brown, Extraction of 6-monoacetylmorphine from urine, *J. Anal. Toxicol.* 14, 58 y 59 (1990).
- 32 E. J. Cone, P. Welch, J. M. Mitchell y B. D. Paul, Forensic drug testing for opiates: I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times, *J. Anal. Toxicol.* 15, 1 a 7 (1991).
- 33 M. C. Dutt, D. S.-T. Lo, D. L. K. Ng y S. Woo, Gas chromatographic study of the urinary codeine-to-morphine ratios in controlled codeine consumption and in mass screening for opiate drugs, *J. Chromatogr.* 267, 117 a 124 (1983).
- 34 M. A. ElSohly y A. B. Jones, Morphine and codeine in biological fluids: Approaches to source differentiation, *Forens. Sci. Rev.* 1, 13 a 21 (1989).
- 35 R. Mechoulam, *Marijuana Chemistry*, Science, 168, 1159 a 1166 (1970).
- 36 R. Mechoulam, *Marijuana*, Academic Press, New York y Londres, 1973.
- 37 C. E. Turner, Constituents of *Cannabis sativa* L., XVII: A Review of the natural constituents, *J. Nat. Prod.* 43, 169 a 234 (1980).
- 38 M. M. Halldin, S. Carlsson, S. L. Kanter, M. Widman y S. Agurell, Urinary metabolites of *delta*-9-tetrahydrocannabinol in man, *Arzneim.-Forsch.* 32, 764 a 768 (1982).
- 39 T. S. Baker, J. V. Harry, J. W. Russell y R. L. Myers, Rapid method for the GC/MS confirmation of 11-nor-9-carboxy-*delta*-9-tetrahydrocannabinol in urine, *J. Anal. Toxicol.* 8, 255 a 259 (1984).
- 40 A. S. Christophersen, Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: Plastic versus glass containers, *J. Anal. Toxicol.* 10, 129 a 131 (1986).

- 41 J. R. Jonson, T. A. Jennison, M. A. Peat y R. L. Foltz, Stability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in blood and plasma, *J. Anal. Toxicol.* 8, 202 a 204 (1984).
- 42 P. L. Williams, A. C. Moffat y L. J. King, Combined high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay method for the analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in human urine, *J. Chromatogr.* 186, 595 (1979).
- 43 E. J. Cone, R. E. Jonson, W. D. Darwin, D. Yousefnejad, L. D. Mell, B. D. Paul y J. Mitchell, Passive inhalation of marijuana smoke: urinalysis and room levels of *delta*-9-tetrahydrocannabinol, *J. Anal. Toxicol.* 11, 89 a 96 (1987).
- 44 K. Verebey, D. Jukofsky y S. J. Mule, Evaluation of a new TLC confirmation technique for positive EMIT cannabinoid urine samples, *Res. Comm. Subst. Abuse* 6, 1 a 9 (1985).
- 45 R. C. Parry, L. Nolan, R. E. Shirey, G. D. Wachob y D. J. Gisch, Pretreatment of urine samples for the analysis of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.* 14, 39 a 44 (1990).
- 46 A. H. B. Wu, N. Liu, Y.-J. Cho, K. G. Johnson y S. S. Wong, Extraction and simultaneous elution and derivatization of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol using Toxi-Lab SPEC^R prior to GC/MS analysis of urine, *J. Anal. Toxicol.* 17, 215 a 217 (1993).
- 47 J. Irving, B. Leeb, R. L. Foltz, C. E. Cook, J. T. Bursey y R. E. Willette, Evaluation of immunoassays for cannabinoids in urine, *J. Anal. Toxicol.* 8, 192 a 196 (1984).
- 48 D. L. Black, B. A. Goldberer, D. S. Isenschmid, S. M. White e Y. H. Caplan, Urine cannabinoid analysis: An integrated multi-method approach, *J. Anal. Toxicol.*, 8, 224 a 227 (1984).
- 49 A. B. Jones, H. N. ElSohly y M. A. ElSohly, Analysis of the major metabolite of *delta*-9-tetrahydrocannabinol in urine. V. Cross-reactivity of selected compounds in a radioimmunoassay, *J. Anal. Toxicol.*, 8, 252 a 254 (1984).
- 50 M. A. ElSohly, A. B. Jones y H. N. ElSohly, Cross-reactivity of selected compounds in the Abbott TDx^R cannabinoid assay, *J. Anal. Toxicol.* 14, 277 a 279 (1990).
- 51 M. J. Kogan, E. Newman y N. J. Wilson, detection of the marijuana metabolite 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by bonded-phase adsorption and thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.* 306, 441 a 443 (1984).
- 52 K. K. Kaistha Y R. Tadrus, Semi-quantitative thin-layer mass screening detection of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxy acid in human urine, *J. Chromatogr.* 237, 528 a 533 (1982).
- 53 R. B. Hughes y R. R. Kessler, Increased safety and specificity in the thin-layer chromatographic identification of marihuana, *J. Forens. Sci.* 24, 842 a 846 (1979).
- 54 M. Congost, R. de la Torre y S. Segura, Optimization of the quantitative analysis of the major Cannabis metabolite (11-nor-9-COOH- Δ^9 -tetrahydrocannabinol) in urine by gas chromatography/mass spectrometry, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 367 a 372 (1988).
- 55 D. Bourquin y R. Brenneisen, Confirmation of Cannabis abuse by the determination of 11, nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 414, 187 a 191 (1987).
- 56 R. Clouette, M. Jacob, P. Koteel y M. Spain, Confirmation of 11- nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine as its *t*-butyldimethylsilyl derivative using GC/MS, *J. Anal. Toxicol.* 17, 1 a 4 (1993).
- 57 J. D. Whiting y W. W. Manders, Confirmation of a tetrahydrocannabinol metabolite in urine by GC, *J. Anal. Toxicol.* 6, 49 a 52 (1982).
- 58 M. Hanke y G. Megges, Routine-Nachweis des THC-Metaboliten 11-Nor-*delta*-9-THC-9-Carbonsäure in der forensischen Praxis, *A. Rechtsmed.* 90, 105 a 108 (1983).
- 59 R. C. Parry y D. J. Gisch, Confirmation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using solid-phase extraction pre-treatment, *LC-GC Int.* 3, 29 a 35 (1990).
- 60 G. R. Nakamura, R. D. Meeks y W. J. Stall, Solid-phase extraction, identification, and quantitation of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, *J. Forens. Sci.* 35, 792 a 796 (1990).

- 61 D. Bourquin y R. Brenneisen, Determination of the major *delta*-9-tetrahydrocannabinol metabolite in urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *Anal. Chim. Acta* 198, 183 a 189 (1987).
- 62 Y. Nakahara, H. Sekine y SE. Cook, Confirmation of Cannabis use II. Determination of tetrahydrocannabinol metabolites in urine and plasma by HPLC with ECD, *J. Anal. Toxicol.* 13, 22 a 24 (1989).
- 63 V. Dixit y V. M. Dixit, A unique solid phase extraction column for isolation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine, *J. Liq. Chromatogr.* 13, 3313 a 3325 (1990).
- 64 P. Kelly y R. T. Jones, Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users, *J. Anal. Toxicol.* 16, 228 a 235 (1992).
- 65 A. C. Moffat, Monitoring urine for inhaled cannabinoids, *Arch. Toxicol., Suppl.* 9, 103 a 110 (1986).
- 66 B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, R. I. Gleadle y L. J. King, Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of Cannabis resin, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 289 a 294 (1984).
- 67 B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, L. J. King y V. Marks, Passive inhalation of cannabis smoke, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 578 a 581 (1984).
- 68 R. H. Liu, Important considerations in the interpretation of forensic urine drug test results, *Forens. Sci. Rev.* 4, 51 a 65 (1992).
- 69 L. D. Baugh y R. H. Liu, Sample differentiation: Cocaine example. *Forens. Sci. Rev.* 3, 101 a 115 (1991).
- 70 J. F. Casale y R. F. X. Klein, Illicit production of cocaine, *Forens. Sci. Rev.* 5, 95 a 107 (1993).
- 71 J. M. Moore, R. P. Meyers, M. D. Jiménez, The anatomy of a cocaine comparison case: A prosecutorial and chemistry perspective, *J. Forens. Sci.* 38, 1305 a 1325 (1993).
- 72 J. F. Casale y J. M. Moore, 3',4',5'-Trimethoxy-substituted analogues of cocaine, cis-/transcinnamoylcocaine and tropacocaine: Characterization and quantitation of new alkaloids in coca leaf, coca paste and refined illicit cocaine, *J. Forens. Sci.* 39, 462 a 472 (1994).
- 73 K. Verebey y M. S. Gold, From coca leaves to crack: The effects of dose and routes of administration in abuse liability, *Psychiatr. Ann.* 18, 513 a 520 (1988).
- 74 T. Inaba, Cocaine: Pharmacokinetics and biotransformation in man, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1154 a 1157 (1989).
- 75 J. Jue Zhang y R. L. Foltz, Cocaine metabolism in man: Identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine, *J. Anal. Toxicol.* 14, 201 a 205 (1990).
- 76 R. C. Baselt (Ed.) *Disposition of Toxi Drugs and Chemicals in Man: Cocaine*, Biomed Public., Davis, California (1982), págs. 193 a 198.
- 77 D. S. Isenschmid, M. W. Fischman, R. W. Foltin e Y. H. Caplan, Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 311 a 314 (1992).
- 78 R. C. Baselt, Stability of cocaine in biological fluids, *J. Chromatogr.* 268, 502 a 505 (1983).
- 79 D. S. Isenschmid, B. S. Levine e Y. H. Caplan, A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites, *J. Anal. Toxicol.* 13, 250 a 256 (1989).
- 80 J. Vasiliades, Long-term stability of ecgonine methyl ester in urine, *J. Anal. Toxicol.* 17, 253 (1993).
- 81 J. Ambre, T. I. Ruo, J. Nelson y S. Belknap, Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in humans, *J. Anal. Toxicol.* 12, 301 a 306 (1988).
- 82 J. Ortuño, R. de la Torre, J. Segura y J. Cami, Simultaneous detection in urine of cocaine and its main metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8, 911 a 914 (1990).

- 83 K. Verebey y A. DePace, Rapid confirmation of enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT^R) cocaine positive samples by capillary gas-liquid chromatography/nitrogen phosphorus detection (GLC/NPD), *J. Forensic Sci.* 34, 46 a 52 (1989).
- 84 R. C. Baselt, *Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology*, 2nd Ed., PSG Publishing, Mass. (1987).
- 85 L. K. Thompson, D. Yousefnejad, K. Kumor, M. Sherer y E. J. Cone, Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use, *J. Anal. Toxicol.* 11, 36 a 38 (1987).
- 86 J. E. Wallace, H. E. Hamilton, J. G. Christenson, E. L. Shimek, P. Land y S. C. Harris, An evaluation of selected methods for determining cocaine and benzoylecgonine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 1, 20 a 26 (1977).
- 87 J. A. Sandberg y G. D. Olsen, Microassay for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 525, 113 a 121 (1990).
- 88 D. Bourquin y R. Brenneisen, Determination of cocaine and cocaine metabolites in urine using HPLC and photodiode array detection, *Proceed. Ann. Meeting A. Acad. Forens. Sci. (AAFS)*, Las Vegas (1989).
- 89 A. C. Moffat, J. V. Jackson, M. S. Moss y B. Widdop (Eds.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2nd Ed., Pharmaceutical Press, Londres (1986).
- 90 J. Breiter, R. Helger y H. Lang, Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs, *Forens. Sci.* 7, 131 a 140 (1976).
- 91 G. Gübitz y R. Wintersteiger, Identification of drugs of abuse by high performance thin-layer chromatography, *J. Anal. Toxicol.* 4, 141 a 144 (1980).
- 92 K. Matsubara, C. Maeda e Y. Fukui, Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction, *Forens. Sci. Int.* 26, 181 a 192 (1994).
- 93 J. Sherma, J. E. Bernard y M. H. Higgs, Screening of benzoylecgonine in urine with Cyclobond solid phase extraction and high performance TLC, *J. Liq. Chromatogr.* 11, 3135 a 3143 (1988).
- 94 B. K. Logan, D. T. Stafford, I. R. Tebbett y C. M. Moore, Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection, *J. Anal. Toxicol.* 14, 154 a 159 (1990).
- 95 R. E. Anderson y G. L. Nixon, Isolation of benzoylecgonine from urine using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.* 17, 432 y 433 (1993).
- 96 Toxi-Lab Inc., documentación del fabricante: Toxi-Lab SPEC-VC-MP1 Extraction of Benzoylecgonine from Urine Using On-Disc Derivatization (1992).
- 97 E. J. Cone y J. Mitchell, Validity testing of comercial urine cocaine metabolite assays: II. Sensitivity, specificity, accuracy and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Forens. Sci.* 34, 32 a 45 (1989).
- 98 M. J. Kogan, D. J. Pierson, M. M. Durkin y N. J. Wilson, Thin layer chromatography of benzoylecgonine: A rapid qualitative method for confirming the EMIT urine cocaine metabolite assays, *J. Chromatogr.* 490, 236 a 242 (1989).
- 99 F. K. Rafla y R. L. Epstein, Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol, *J. Anal. Toxicol.* 3, 59 a 63 (1979).
- 100 S. Goenechea y M. Franke, Kokain, *Mitteilung der Senatskommission für Klinische Toxikologische Analytik*, DFG (1993).
- 101 J. Gerlits, GC/MS quantitation of benzoylecgonine following liquid-liquid extraction of urine, *J. Forens. Sci.* 38, 1210 a 1214 (1993).
- 102 R. L. Hawks y C. N. Chiang (Eds.) *Urine Testing for Drugs of Abuse*, NIDA Res. Monogr. 73, 93 (1986).
- 103 J. Ambre, M. Fischman y Tsuen-Ih Ruo, Urinary excretion of ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine in humans, *J. Anal. Toxicol.* 8, 23 a 25 (1984).

- 104 J. Ambre, The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: A kinetic analysis of published data, *J. Anal. Toxicol.* 8, 241 a 245 (1985).
- 105 E. J. Cone y W. W. Washington, Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use, *J. Anal. Toxicol.* 13, 56 a 58 (1989).
- 106 Am. Assoc. for Clin. Chem. Special Report, Critical issues in urinalysis of abused substances: Report of the substance-abuse testing committee, *Clin. Chem.* 34, 605 a 632 (1988).
- 107 C. Cook, R. Jeffcoat y M. Pérez Reyes, Pharmacokinetic Studies of Cocaine and Phencyclidine in Man, en G. Barnett y C. N. Chiang (Eds.) *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychoactive Drugs*, Biomed. Public., (1985) págs. 48 a 74.
- 108 P. Jatlow, P. Barash, C. Van Dike, J. Roddnig y R. Byck, Cocaine and succinylcholine: A new caution, *Anesth. Anal.* 58, 235 a 238 (1979).
- 109 R. M. Smith, Ethyl esters of arylhydroxymethoxy cocaines in the urines of simultaneous cocaine and ethanol users, *J. Anal. Toxicol.* 8, 38 a 42 (1984).
- 110 G. F. Jackson, J. J. Saady y A. Poklis, Urinary excretion of benzoylecgonine following ingestion of Health Inca Tea, *Forens. Sci. Int.* 49, 57 a 64 (1991).
- 111 J. Osterloh, Testing for drugs of abuse – Pharmacokinetic consideration for cocaine in urine, *Clin. Pharmacokin.* 24, 355 a 361 (1993).
- 112 K. K. Redda, en A. Walker y G. Barnett (Eds.) *Cocaine, Marihuana and Designer Drugs: Chemistry, Pharmacology and Behaviour*, CRC Press (1989), pág. 72.
- 113 Y. Liu, R. D. Budd y E. C. Griesemer, Study of the stability of cocaine and benzoylecgonine, its major metabolite, in blood samples, *J. Chromatogr.* 248, 318 a 320 (1982).
- 114 M. R. Harkey y G. L. Henderson, Hair analysis for drugs of abuse, in R. C. Baselt (Ed.) *Adv. Anal. Toxicol.*, Vol. II, Year Book Medical Publishers (1989) págs. 198 a 329.
- 115 E. J. Cone, K. Kumor, L. K. Thompson y M. Sherer, Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects, *J. Anal. Toxicol.* 12, 200 a 206 (1988).
- 116 L. K. Thompson, D. Yousefnejad, K. Kumor, M. Sherer y E. J. Cone, Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use, *J. Anal. Toxicol.* 11, 36 a 38 (1987).
- 117 M. R. Harkey, G. L. Henderson y C. Zhou, Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 15, 260 a 265 (1991).
- 118 W. Schramm, P. A. Craig, R. H. Smith y G. E. Berger, Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum and urine, *Clin. Chem.* 39, 481 a 487 (1993).
- 119 Métodos recomendados para el ensayo de anfetamina y metanfetamina, Manual para uso de laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/9, Naciones Unidas, 1988.
- 120 A. K. Cho, Ice: A new dosage form of an old drug, *Science* 249, 631 a 634 (1990).
- 121 R. De Cresce, A. Mazura, M. Lifshitz y J. Tilson, *Drug Testing in the Workplace*, American Society of Clinical Pathology Press, Chicago (1989), pág. 108.
- 122 L. G. Dring, R. L. Smith y R. T. Williams, The fate of amphetamine in man and other mammals, *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 402 a 405 (1966).
- 123 J. Caldwell, L. G. Dring y R. T. Williams, Metabolism of [14C] metamphetamine in man, the guinea pig and the rat, *Biochem. J.* 129, 11 a 22 (1972).
- 124 A. H. Beckett y M. Rowland, Urinary excretion kinetics of methamphetamine in man, *J. Pharm. Pharmacol.* 17/Suppl., 109s a 114s (1965).
- 125 C. L. Hornbeck y R. J. Czarny, Quantitation of methamphetamine and amphetamine in urine by capillary GC/MS. Part I. Advantages of trichloroacetyl derivatisation, *J. Anal. Toxicol.* 13, 251 a 262 (1989).

- 126 K. Shimosato, M. Tomita e I. Ijiri, Urinary excretion of p-hydroxylated methamphetamine metabolites in man. A method for determination by high-performance liquid chromatography-electrochemistry, *Arch. Toxicol.* 59, 135 a 140 (1986).
- 127 X. Chen, J. Wijsbeek, J. Van Veen, J. P. Franke y R. A. de Zeeuw, Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify, *J. Chromatogr.* 529, 161 a 166 (1990).
- 128 J. T. Cody y R. Schwarzhoff, Fluorescence polarization immunoassay detection of amphetamine, methamphetamine, and illicit amphetamine analogues, *J. Anal. Toxicol.* 17, 26 a 30 (1993).
- 129 Métodos recomendados para el ensayo de los derivados anfetamínicos ilícitos con anillo sustituido: Manual para uso de laboratorios nacionales de estupefacientes, ST/NAR/12, Naciones Unidas, 1988.
- 130 I. Ojanperä, K. Wähälä y T. A. Hase, Fast Black K salt: A versatile thin-layer chromatographic visualisation reagent for the differentiation of aliphatic amines, *Analyst* 115, 263 a 267 (1990).
- 131 P. Lillsunde y T. Korte, Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification, *J. Anal. Toxicol.* 15, 71 a 81 (1991).
- 132 I. Ojanperä, P. Lillsunde y T. Korte, Detection of amphetamine analogues by thin layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Proceed. Int. Congress on Clin. Toxicol., Poison Control and Analytical Toxicology, LUX TOX'90, 1990, Luxemburgo, Bull. Soc. Sci. Med. Luxemburgo* 127, 88 a 92 (1990).
- 133 Y. Nakahara y H. Sekine, A high selective screening test for methamphetamine in human urine, *Forensic Sci. Int.* 26, 277 a 282 (1984).
- 134 R. W. Taylor, S. D. Le, S. Philip y N. C. Jain, Simultaneous identification of amphetamine and methamphetamine using solid phase extraction and gas chromatography/nitrogen phosphorus detection or gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 13, 293 a 295 (1989).
- 135 P. Lillsunde y T. Korte, Determination of ring- and N-substituted amphetamines as heptafluorobutyl derivatives, *Forens. Sci. Int.* 49, 205 a 213 (1991).
- 136 K. Hara, T. Nagata y K. Kimura, Forensic toxicological analysis of methamphetamine and amphetamine in body materials by gas chromatography/mass spectrometry, *Z. Rechtsmed.* 96, 93 a 104 (1986).
- 137 E. Melgar y R. C. Kelly, A novel GC/MS derivatization method for amphetamines, *J. Anal. Toxicol.* 17, 399 a 402 (1993).
- 138 H. J. Helmlin y R. Brenneisen, Determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection, *J. Chromatogr.* 593, 87 a 94 (1992).
- 139 B. M. Farrell y T. M. Jefferies, An investigation of HPLC methods for the analysis of amphetamines, *J. Chromatogr.* 272, 111 a 128 (1983).
- 140 Y. Nakahara e Y. Takeda, β -Naphthaquinone sulfonate as electrochemical labelling reagent for high-sensitivity LC analysis of drugs in biological fluids, *Chromatographia* 26, 363 a 368 (1988).
- 141 Y. Nakahara, A. Ishigami e Y. Takeda, Electrochemical label for high-performance liquid chromatography. I., β -Naphthaquinone-4-sulphonate as an electrochemical detection labelling reagent of amines, *J. Chromatogr.* 489, 371 a 376 (1989).
- 142 K. Ashgar y E. De Souza (Eds.), *Pharmacology and Toxicology of Amphetamine and Related Designer Drugs*, NIDA Res. Monogr. 94, 1989.
- 143 K. K. Redda, C. A. Walker y G. Barnett (Eds.), *Cocaine, Marijuana, Designer Drugs: Chemistry, Pharmacology, and Behaviour*, CRC Press, Florida (1989).
- 144 *Manual on Designer Drugs, An Information Booklet on New Types of Drugs of Abuse-Analogues of Controlled Substances*, WHO/PSA/90.5 (1991).
- 145 G. M. Marquardt, V. DiStefano y L. L. Ling, Metabolism of β -3,4-methylene-dioxyamphetamine in the rat, *Biochem. Pharmacol.* 27, 1503 a 1505 (1978).

- 146 H. K. Lim y R. L. Foltz, Identification of metabolites of 3,4-(methylenedioxy)-methamphetamine in human urine, *Chem. Res. Toxicol.* 2, 142 y 143 (1989).
- 147 I. Kitchen, J. Trembley, J. Andre, L. G. Dring, J. R. Idle, R. L. Smith y R. T. Williams, Interindividual and interspecies variation in the metabolism of the hallucinogen 4-methoxyamphetamine, *Xenobiotica* 9, 397 a 404 (1979).
- 148 S. H. Snyder, L. A. Faillace y H. Weingartner, DOM (STP), a new hallucinogenic drug, y DOET: Effects in normal subjects, *Am. J. Psychiat.* 125, 357 a 364 (1968).
- 149 B. T. Ho, V. Estévez, L. W. Tansey, L. F. Englert, P. J. Creaven y W. M. McIsaac, Analogs of amphetamine. 5. Excretory metabolites of 1-(2,5 dimethoxy-4-methyl-phenyl)-2-aminopropane (DOM) in rats, *J. Med. Chem.* 14, 158 a 160 (1971).
- 150 S. H. Snyder, L. A. Faillace y L. E. Hollister, 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine (STP): A new hallucinogenic drug science, *Science* 158, 669 y 670 (1967).
- 151 S. H. Snyder, L. A. Faillace y H. Weingartner, A new psychotropic agent. Psychological and physiological effects of 2,5-dimethoxy-4-ethylamphetamine (DOET) in man, *Arch. J. Gen. Psychiat.* 21, 95 a 101 (1969).
- 152 T. Sargent, D. A. Kalbhen, A. T. Shulgin, G. Braun, H. Stauffer y N. Kusubor. In vivo human pharmacodynamics of the psychodysleptic 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylisopropylamine labelled with bromine-82 or bromine-77, *Neuropharmacol.* 14, 165 a 174 (1975).
- 153 H. J. Helmlin, K. Bracher, S. J. Salamone y R. Brenneisen, Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in human plasma and urine by HPLC-DAD, GC/MS and Abuscreen-Online, *Proceed. SOFT/CAT Meeting, Phoenix* (1993).
- 154 B. K. Gan, D. Baugh, R. H. Liu y A. S. Walia, Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine samples by solid-phase extraction, derivatisation, and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Forens. Sci.* 36, 1331 a 1341 (1991).
- 155 G. Cimbura, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA): Analytical and forensic aspects of fatal poisoning, *J. Forens. Sci.* 23, 319 a 323 (1972).
- 156 A. Poklis, M. A. MacKell y W. K. Drake, Fatal intoxication from 3,4-methylenedioxyamphetamine, *J. Forens. Sci.* 79, 70 a 75 (1978).
- 157 G. P. Dowling, E. T. McDonough II y R. O. Bost, "Eve" and "Ecstasy": A report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA, *J. Am. Med. Assoc.* 257, 1615 a 1617 (1987).
- 158 G. Cimbura, PMA deaths in Ontario, *Can. Med. Assoc. J.* 110, 1263 a 1267 (1974).