

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC-MS PARA ANÁLISIS DE COCAÍNA Y CARACTERIZACIÓN DE SUS PRINCIPALES ADULTERANTES EN EL EJE CAFETERO

ANDRÉS FELIPE RAMÍREZ RODRÍGUEZ

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
2011**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC-MS PARA ANÁLISIS DE COCAÍNA
Y CARACTERIZACIÓN DE SUS PRINCIPALES ADULTERANTES EN EL EJE
CAFETERO**

ANDRÉS FELIPE RAMÍREZ RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO
Requisito para optar por el título de Químico industrial.

Director:
Qco. Msc. JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ.
Profesor Universidad Tecnológica de Pereira.

Coordinadora:
Qco. GLORIA ANGÉLICA RÍOS RODRÍGUEZ.
Cuerpo Técnico de Investigación seccional Risaralda.

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
2011**

**NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC-MS PARA ANÁLISIS DE COCAÍNA
Y CARACTERIZACIÓN DE SUS PRINCIPALES ADULTERANTES EN EL EJE
CAFETERO.**

**Presentado por:
ANDRÉS FELIPE RAMÍREZ RODRÍGUEZ**

Los suscritos director, coordinadora y jurado del presente trabajo de grado, una vez presentada la versión escrita y presentada la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de _____

Con la connotación _____

Para constancia se firma hoy ____ de _____ del año 2011

JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ _____
Director

GLORIA ANGÉLICA RÍOS _____
Coordinadora

YESID AYA BARRETO _____
Jurado

"Trata de dejar a este mundo
en mejores condiciones
de como lo encontraste."
- Sir Baden Powell

"La palabra más hermosa que
cualquier idioma haya podido
Pronunciar... Libertad"
Prof. Luis Guillermo Ríos.

A mi familia
A las personas que hicieron posible
La elaboración de este proyecto
A la vida...

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre y hermano por el apoyo incondicional, a mi Padre por el apoyo económico.

Al Qco. Msc. Juan Pablo Arrubla quien fue el director de la tesis, aportando documentación y conocimiento para la elaboración y ejecución del proyecto.

Agradezco infinitamente al Qco. Yesid Aya y a la Qco. Angélica Ríos quienes fueron las personas que me dieron la confianza para realizar una práctica no conducente y posteriormente la oportunidad para realizar este proyecto. A todos los integrantes del Cuerpo Técnico de Investigación de la Fiscalía General de la Nación por el apoyo moral y que hicieron más llevadera la realización del proyecto.

A mis compañeros de química, en especial a David Rosero quien fue de gran ayuda y apoyo durante la realización del trabajo; haciendo más amena la estadía en la universidad

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|----------------------------------|-------------|
| ÍNDICE DE TABLAS | 11 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 13 |
| RESUMEN | 16 |
| INTRODUCCIÓN | 17 |
| JUSTIFICACIÓN | 18 |
| OBJETIVOS | 20 |
| 1 MARCO TEÓRICO | 21 |
| 1.1 ANTECEDENTES | 21 |
| 1.2 DEFINICIÓN DE ESTUPEFACIENTE | 22 |
| 1.3 ANALITOS | 22 |
| 1.3.1 COCAÍNA | 22 |
| 1.3.1.1 Historia. | 22 |
| 1.3.1.2 Características | 23 |
| 1.3.1.3 Normatividad | 24 |
| 1.4 ADULTERANTES COMUNES | 24 |
| 1.4.1 CAFEÍNA | 24 |
| 1.4.1.1 Características | 24 |
| 1.4.2 FENACETINA | 25 |
| 1.4.2.1 Características. | 25 |
| 1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG) | 26 |

| | Pag. |
|---|-------------|
| 1.5.1 Ventajas. | 27 |
| 1.6 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM) | 28 |
| 1.6.1 Impacto Electrónico (IE). | 28 |
| 1.6.2 Ionización Química (IQ) | 29 |
| 1.6.3 Ion Molecular. | 30 |
| 1.7 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG – EM) | 30 |
| 1.8 COLUMNA CROMATOGRÁFICA. | 32 |
| 1.8.1 Soporte cromatográfico. | 32 |
| 1.8.2 Fase estacionaria | 33 |
| 1.9 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS | 34 |
| 1.9.1 Linealidad | 34 |
| 1.9.2 Limite de detección (LD). | 35 |
| 1.9.3 Limite de Cuantificación (LC). | 36 |
| 1.9.4 Precisión. | 36 |
| 1.10 ESTÁNDAR INTERNO | 37 |
| 1.10.1 Características. | 37 |
| 2 SECCIÓN EXPERIMENTAL | 39 |
| 2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS | 39 |
| 2.1.1 Reactivos | 39 |
| 2.1.1.1 Cocaína | 39 |
| 2.1.1.2 Cafeína. | 39 |

| | Pag. |
|---|-------------|
| 2.1.1.3 Fenacetina | 39 |
| 2.1.1.4 Tetracosano. | 40 |
| 2.1.1.5 Etanol. | 40 |
| 2.1.2 Materiales | 40 |
| 2.1.3 Equipos | 41 |
| 2.1.3.1 Balanza Analítica. | 41 |
| 2.1.3.2 Sonicator. | 41 |
| 2.1.3.3 Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas | 42 |
| 2.2 METODOLOGÍA | 43 |
| 2.2.1 Diagrama de flujo. | 44 |
| 2.2.2 Análisis preliminar. | 45 |
| 2.2.3 Curvas de calibración | 45 |
| 2.2.4 Determinación de parámetros de estandarización. | 45 |
| 2.2.5 Muestras reales. | 45 |
| 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |
| 3.1 Determinación de las condiciones cromatográficas. | 46 |
| 3.1.1 Determinación de la rampa de temperatura | 46 |
| 3.1.2 Determinación del modo de inyección | 47 |
| 3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO. | 49 |
| 3.2.1 Linealidad | 49 |
| 3.2.1.1 Cafeína. | 50 |

| | Pag. |
|---|-------------|
| 3.2.1.2 Fenacetina | 52 |
| 3.2.1.3 Cocaína. | 54 |
| 3.2.2 Curvas de calibración. | 57 |
| 3.2.2.1 Cafeína. | 57 |
| 3.2.2.2 Fenacetina. | 58 |
| 3.2.2.3 Cocaína. | 60 |
| 3.2.2.4 Contraste con un indicador estadístico (t) de student. | 61 |
| 3.2.3 Límite de detección (LD). | 62 |
| 3.2.3.1 Cafeína. | 63 |
| 3.2.3.2 Fenacetina. | 63 |
| 3.2.3.3 Cocaína. | 64 |
| 3.2.4 Limite de cuantificación (LC). | 65 |
| 3.2.4.1 Cafeína. | 66 |
| 3.2.4.2 Fenacetina. | 67 |
| 3.2.4.3 Cocaína. | 67 |
| 3.2.5 Precisión. | 68 |
| 3.2.6 Precisión intermedia. | 71 |
| 3.2.7 Exactitud. | 72 |
| 3.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES | 74 |
| 3.3.1 Resultados previos a la validación. | 74 |
| 3.3.2 Resultados finales. | 77 |
| 3.3.3 Análisis de Adulterantes. | 81 |

| | Pag. |
|---------------------------|-------------|
| 3.3.3.1 Cafeína | 82 |
| 3.3.3.2 Fenacetina | 84 |
| 4 CONCLUSIONES | 88 |
| 5 RECOMENDACIONES | 91 |
| 6 BIBLIOGRAFIA | 92 |
| 7 ANEXOS | 96 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Tiempos de retención | 47 |
| Tabla 2. Rangos de las concentraciones | 50 |
| Tabla 3. Índices de correlación de las gráficas de la Cafeína. | 52 |
| Tabla 4. Índices de correlación de las gráficas de la Fenacetina | 54 |
| Tabla 5. Índices de correlación de las gráficas de la Cocaína | 56 |
| Tabla 6. Características de la curva de calibración de la Cafeína. | 57 |
| Tabla 7. Características de la curva de calibración de la Fenacetina | 59 |
| Tabla 8. Características de la curva de calibración de la Cocaína. | 61 |
| Tabla 9. Resultados del test student | 62 |
| Tabla 10. Límites de detección del método | 65 |
| Tabla 11. Límites de cuantificación del método | 68 |
| Tabla 12. Datos de la curva de calibración Cafeína. | 69 |
| Tabla 13. Datos de la curva de calibración Fenacetina. | 70 |
| Tabla 14. Datos de la curva de calibración Fenacetina | 71 |
| Tabla 15. Ensayo de precisión intermedia. | 72 |
| Tabla 16. Porcentajes de error. | 73 |
| Tabla 17. Resultados por muestras Caldas | 74 |
| Tabla 18. Resultados por muestras Quindío | 74 |
| Tabla 19. Resultados por muestras Risaralda | 75 |
| Tabla 20. Resultados por muestras Totales | 75 |
| Tabla 21. Límites de detección y cuantificación del método | 89 |

| | |
|--|-------------|
| | Pág. |
| Tabla 22. Resultados de la cuantificación de cocaína. | 105 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Estructura bidimensional de la cocaína. | 23 |
| Figura 2. Estructura bidimensional de la Cafeína. | 25 |
| Figura 3. Estructura bidimensional de la fenacetina. | 25 |
| Figura 4. Fuente de ionización. | 29 |
| Figura 5. Reacción global para producir el ion molecular. | 30 |
| Figura 6. Estructura resumida del dimetilpolisiloxano. | 33 |
| Figura 7. Balanza analítica marca KERN ref. 100-5AM. | 41 |
| Figura 8. Sonificador VGT 375 H. | 42 |
| Figura 9. Imagen del equipo GC-MS QP 2010plus. | 43 |
| Figura 10. Diagrama de flujo. | 44 |
| Figura 11. Rampa de temperatura usada para la validación. | 46 |
| Figura 12. Cromatograma de la rampa de temperatura usada en la validación. | 47 |
| Figura 13. Tetracosano, modo de inyección splitless. | 48 |
| Figura 14. Cromatograma del tetracosano y los tres analitos. | 49 |
| Figura 15. Gráfico de bajas concentraciones para la Cafeína. | 50 |
| Figura 16. Gráfico de medias concentraciones para la Cafeína. | 51 |
| Figura 17. Gráfico de altas concentraciones para la Cafeína. | 51 |
| Figura 18. Gráfico de medias concentraciones para la Fenacetina. | 53 |
| Figura 19. Gráfico de altas concentraciones para la Fenacetina. | 53 |
| Figura 20. Gráfico de bajas concentraciones para la Cocaína. | 55 |

| | Pag. |
|--|-------------|
| Figura 21. Grafico de medias concentraciones para la Cocaína. | 55 |
| Figura 22. Gráfico de altas concentraciones para la Cocaína. | 56 |
| Figura 23. Curva de calibración Cafeína. | 58 |
| Figura 24. Curva de calibración Fenacetina. | 59 |
| Figura 25. Curva de calibración Cocaína. | 60 |
| Figura 26. Cromatograma limite de detección cafeína. | 63 |
| Figura 27. Cromatograma limite de detección fenacetina. | 64 |
| Figura 28. Limite de detección Cocaína. | 65 |
| Figura 29. Cromatograma del ensayo 1. | 72 |
| Figura 30. Cromatograma del ensayo 2. | 73 |
| Figura 31. Cromatograma del ensayo 3. | 73 |
| Figura 32. Diagramas tipo pastel de la tabla 18, tabla 19 y tabla 20, departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda. | 75-76 |
| Figura 33. Diagrama tipo pastel de los totales. | 77 |
| Figura 34. Coincidencias en las purezas, Cafeína. | 78 |
| Figura 35. Coincidencias de pureza, Fenacetina. | 78 |
| Figura 36. Coincidencias en la pureza, Cocaína. | 79 |
| Figura 37. Distribución de la cocaína en cada departamento | 80 |
| Figura 38. Uso de los adulterantes en el eje cafetero | 81 |
| Figura 39. Distribución de la Cafeína en el eje cafetero. | 82 |
| Figura 40. Distribución de concentraciones en el eje cafetero | 82 |
| Figura 41. Grafico de la distribución de las concentraciones en (a) caldas (b) Quindío y (c) Risaralda | 83 |

| | Pag. |
|--|-------------|
| Figura 42. Distribución de las concentraciones en los departamentos. | 84 |
| Figura 43. Distribución de la fenacetina en el eje cafetero. | 85 |
| Figura 44. Distribución de concentraciones en el eje cafetero | 85 |
| Figura 45. Grafico de la distribución de las concentraciones en (a) caldas (b) Quindío y (c) Risaralda | 86 |
| Figura 46. Distribución de las concentraciones en los departamentos. | 87 |

RESUMEN

El trabajo consistió en realizar la estandarización del método de la técnica Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (siglas en ingles GC-MS) que consiste en el análisis de muestras de cocaína, incautadas en el eje cafetero realizado en el Cuerpo Técnico de Investigación de la Fiscalía General de la Nación

Durante la realización del trabajo, se encontraron resultados correspondientes a la estandarización en sí, como límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión, exactitud, etc. A parte de los resultados de estandarización, se encontraron igualdades entre las concentraciones de los adulterantes en las diferentes muestras incautadas.

Finalmente el trabajo aporta en la investigación judicial, ya que al ser un método estandarizado, es bien visto por la comunidad científica, dando iniciativa a la investigación en este campo, fortaleciendo el vinculo que existe entre la rama judicial y la investigación. Enmarcándolo en un contexto social, el trabajo ayuda a la lucha contra el tráfico de estupefacientes y permitiendo a las autoridades e instituciones realizar mejor su trabajo.

En este proyecto se estandarizó un método analítico presente en el laboratorio de la Fiscalía General de la Nación seccional Pereira, empleando la técnica de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, para la determinación y cuantificación de cocaína y los principales adulterantes presentes en la cocaína incautada en el eje cafetero

Palabras clave: *Cocaína, estandarización de métodos, drogas, espectroscopia de masas, adulterantes, cromatografía de gases.*

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemorables, los alcaloides, se han usado empíricamente en el tratamiento de enfermedades, tales como afecciones cardíacas y cerebrales, sin saber que estos son peligrosos ya que la mayoría causan dependencia física y/o psicológica. Desde el siglo XIX se vienen aislando diferentes tipos de alcaloides que coincidieron más o menos con la introducción del proceso de extracción de las drogas provenientes de plantas exóticas. El farmacéutico francés Charles Derosne aisló en 1803 el alcaloide denominado después narcotina, y el farmacéutico Friedrich Sertüner investigó sobre el opio y aisló la morfina. A ello siguió rápidamente el aislamiento de otros alcaloides como la estricnina, cafeína, cocaína, entre otros, este último aislado por el químico alemán Albert Niemann en 1859.^[1]

Aunque la cocaína fue usada como suplemento para las personas adictas a la morfina^[2], algunas personas inescrupulosas lo usaron con fines delictivos, es por eso que desde 1986 el gobierno nacional de la república de Colombia, ha creado la ley 30, prohibiendo el uso, consumo y transporte de estupefacientes y algunos de sus insumos. Debido a esto, las personas que trafican este tipo de sustancias se han ingeniado diferentes formas de “camuflar” la droga y así burlar a las autoridades.^[3]

La necesidad de judicializar a las personas que quebrantan la ley y aportar pruebas contundentes para la investigación en los casos de tráfico y porte de estupefacientes ha generado en las autoridades la necesidad de adoptar técnicas avanzadas para la identificación y cuantificación de alcaloides^[4]; una de estas técnicas es la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas ya que proporciona alta sensibilidad, permite la identificación exacta de los compuestos y la comparación entre el espectro de masas dado por los analitos con un espectro encontrado en la literatura^[5]. Por estas razones los laboratorios de forenses de Colombia están empleando esta técnica para el análisis de estupefacientes.^[6]

JUSTIFICACIÓN

Con la puesta en marcha del código de procedimiento penal, siendo la ley 906 de 2004, esto conlleva a una exigencia mayor en lo referente a la calidad de pruebas y ensayos realizados por las instituciones que cumplan funciones de investigación. Como respuesta a esto, los grupos de química y balística del Laboratorio Regional Cafetero del Cuerpo Técnico de Investigación de la Fiscalía General de la Nación Seccional Pereira están en proceso de validación de sus métodos de análisis a fin de aportar pruebas con validez científica que tengan peso en el proceso judicial. Adicionalmente las instituciones estatales están viviendo un proceso de mejoramiento de la calidad en los resultados, en la cual ha tomado gran importancia la acreditación de pruebas y ensayos en los laboratorios de análisis por medio de la Norma Técnica Colombiana ISO - IEC 17025 cuya finalidad es demostrar que se opera un sistema de calidad técnicamente competente, en el cual sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su propósito o finalidad ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados suministran. La validación de las técnicas, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.

Estas técnicas deben validarse o estandarizarse también para establecer por medio de estudios en laboratorio, una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Además implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo en la calibración sino en el análisis de muestras reales. La estandarización debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento usado para la estandarización y una declaración de que el método se ajusta al uso propuesto.

Por otra parte los laboratorios encargados del análisis de estupefacientes en la zona cafetera no han hecho estudios que permitan caracterizar la droga incautada en la región, esto debido a que la ley no exige la cuantificación de la droga, ya que la pena dada por el delito de tráfico o porte de estupefacientes se dicta por la cantidad de droga incautada entendiéndose esta como la totalidad de sustancia decomisada, sin importar si está mezclada con algún tipo de diluyente o adulterante, sin embargo para fines de investigación criminal, estos datos pueden ser muy importantes para establecer si la adición de adulterantes se hace al azar o

en proporciones definidas y así establecer vínculos de muestras a partir de dichos resultados.

En este proyecto se estandarizó la técnica instrumental para el análisis de cocaína (análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras de cocaína y los diluyentes o adulterantes principales presentes en estas, por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas) utilizada en el laboratorio de Química del Cuerpo Técnico de Investigación de la Fiscalía General de la Nación Seccional Pereira, a fin de obtener de resultados confiables, con límites de detección correctamente establecidos, respaldados por una adecuada calibración, recolección y toma de muestras, que permitan generar resultados con evidencias sólidas contundentes y veraces para la judicialización de las personas involucradas en el proceso, adicionalmente efectuar la caracterización de los adulterantes presentes en las muestras de cocaína incautada para evaluar si la cantidad de estos es proporcional, variada y si tienen alguna relación entre si.

OBJETIVOS

GENERAL

- Estandarizar un método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para el análisis de cocaína y caracterizar los adulterantes presentes en la cocaína incautada en el eje cafetero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los parámetros de estandarización del método analítico: Repetibilidad, exactitud, linealidad, límite de cuantificación y límite de detección para el equipo Shimadzu GC-MS QP 2010. Plus
- Caracterizar los llamados adulterantes, presentes en la cocaína incautada en el eje cafetero.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

Desde los inicios de la identificación de la cocaína, se han usado diversas técnicas para la determinación y visualización de esta, algunas de las técnicas ya han sido reemplazadas o son obsoletas, pero de no haber sido por estas técnicas el análisis de cocaína hubiera sido un tanto tedioso. Los primeros análisis realizados fueron análisis no instrumentales, como lo fue la cristalización de la cocaína hidroclicórica, realizando precipitaciones con cloruro de platino, cloruro de oro y yoduro de plomo. Seguido de esto se realizaron ensayos de colorimetría, para la diferenciación de la cocaína base de la cocaína clorhidrato.^[48]

Siendo una técnica no instrumental la cromatografía de capa delgada (con sus siglas en inglés TLC – Thin-Layer Chromatography) fue una de las técnicas más usadas durante las décadas de 1960's hasta 1990's siendo en esa época la técnica no instrumental más acertada y disponible para los científicos, aun en hoy en día la técnica es usada para la cualificación de cocaína.^[48]

Otro de los métodos de análisis de cocaína usado antes de realizar ensayos en equipos como lo son los cromatógrafos, RMN y demás, fueron los ensayos de radioinmunología, inmunoensayo de polarización por fluorescencia, electrodos de ion selectivo, entre otros.^[48]

Luego de eso, la cromatografía de gases acoplada a diferentes técnicas o de manera individual, y la cromatografía líquida de alta eficiencia son las técnicas más empleadas para el análisis de estupefacientes en la actualidad, otros métodos que utilizan para este fin son: cromatografía de capa delgada, cromatografía capilar electrocinética, electroforesis capilar, espectroscopia infrarroja.^[7]

La División de Estupefacientes de la Oficina de Naciones Unidas en Viena reporta el uso de las siguientes técnicas para la detección y análisis de sustancias puras: Cromatografía en capa delgada (TLC), Cromatografía gas – líquido, Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), Espectroscopia infrarroja (IR).^[8]

El método original fue proporcionado por las naciones unidas en 1986^[44], derivándose desde ahí diversos estudios sobre la cocaína, como “*Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography–mass spectrometry*” y “*Determination of cocaine and cocaethylene in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry*”, siendo estos dos artículos una pequeña muestra de los estudios realizados por parte de los científicos.

Los laboratorios de química del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Policía Nacional y la Fiscalía General de la Nación, son las instituciones del estado que se encargan del análisis de estupefacientes en nuestro país, en sus métodos utilizan las técnicas más usadas son cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y espectrofotometría infrarroja.^[6]

1.2 DEFINICIÓN DE ESTUPEFACIENTE

El artículo 2 de la Ley 30 de 1986 reglamentada por el Decreto reglamentario 3788 de 1986, se define como estupefaciente a la droga no prescrita médicamente que actúa sobre el sistema nervioso central produciendo dependencia física o psicológica y como droga a toda sustancia que introducida en el organismo vivo modifica sus funciones fisiológicas.^[3]

1.3 ANALITOS

Las principales características de analitos usados en el trabajo, se mencionan a continuación, características que son importantes para la investigación y para la elaboración del método analítico.

1.3.1 COCAÍNA

1.3.1.1 Historia. En los comienzos del siglo XX, se decidió controlar el cultivo de la coca, ya que al haberse aislado la cocaína, los efectos de ésta, más agresivos que los de las hojas de coca, empezaron a crear los primeros problemas de drogadicción.^[1]

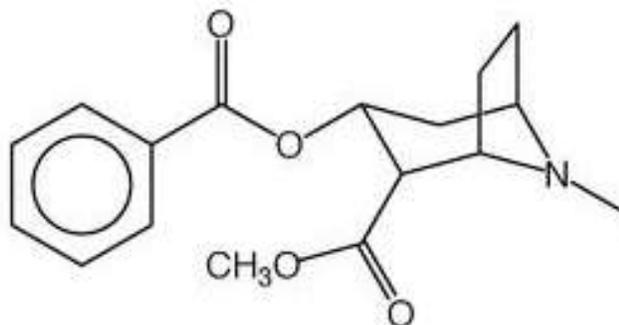
El uso de la cocaína como droga estimulante tiene sus antecedentes en la existencia de la práctica de mascar coca entre los indígenas de la región de los Andes, pero como droga adictiva propiamente dicha, la cocaína empezó a usarse en la década de 1880 por hombres de empresa que la añadían a bebidas alcohólicas y refrescos; un vivo ejemplo es la Coca Cola (hasta 1904 en que fue “descocainizada”) que se anunciaba como “tónico cerebral de mucho valor y cura para todas las afecciones nerviosas: dolor de cabeza, neuralgia, histeria, melancolía, etc.” [2]

En 1970, en la 4ª edición de las “Bases farmacológicas de la terapéutica” de Goodman & Gilman, J.H. Haffe afirmaba: “El abuso de la cocaína es muy poco frecuente en los países occidentales, si bien mascar hojas de coca es todavía común entre los indios peruanos de los Andes”.

A pesar de esta afirmación de J.H. Haffe en 1970 su consumo aumentó de manera espectacular, y desde hace unos años (1985-1990), la drogodependencia cocaínica constituye el problema sanitario más grave en el mundo occidental en el campo de las toxicomanías [10]

1.3.1.2 Características [6].

Figura 1. Estructura bidimensional de la cocaína.



En la figura anterior (Figura 1) se aprecia la estructura bidimensional de la cocaína.

Es un alcaloide proveniente del tropano, cristalino, que se obtiene de las hojas de la planta *Erythroxylum coca*, esta es estimulante del sistema nervioso central, supresor del apetito y anestésico local, En concreto, se trata de un inhibidor de la noradrenalina-dopamina. sus Propiedades químicas son: Peso molecular 369.42 g/mol. Cristales blancos amorfos, a temperatura ambiente 1g se disuelve en 1.5 ml de cloroformo, 31 ml de alcohol, 1700 ml de agua y 100 ml de éter etílico.^[12]

1.3.1.3 Normatividad. En 1973 el Congreso de la República de Colombia dio facultades al Presidente de la República para legislar sobre el tema de las drogas. En 1974 el Decreto 1188 conocido como Estatuto Nacional de Estupefacientes hizo la primera definición de dosis personal diciendo “es la cantidad de fármaco o droga que ingerida de una sola vez produce efectos”^[2]. Posteriormente se dio vigencia a un nuevo Estatuto Nacional de Estupefacientes, bajo la ley 30 de 1986, reglamentado por el decreto 3788 de 1986 y el cual su articulaje se traslado a regulaciones, penas y procedimientos vistos en la ley 599 de 2000, titulo XIII: Delitos contra la salud pública, capítulo II: Tráfico de estupefacientes y otras infracciones, desde el articulo 375 hasta el articulo 385 sustentan la normatividad de este alcaloide.^[9]

1.4 ADULTERANTES COMUNES

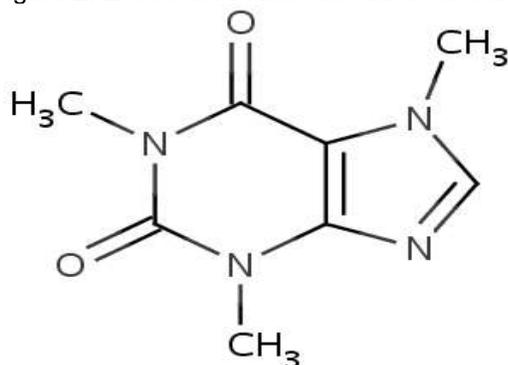
Los adulterantes más comunes son: Anestésicos (benzocaína, lidocaína, procaína), Analgésicos (quinina), Otros estimulantes (cafeína, efedrina, metanfetaminas) y finalmente Inertes en polvo (bicarbonato de sodio, inositol, levamisol).

A continuación se mencionan las características de los adulterantes encontrados más comúnmente

1.4.1 CAFEÍNA

1.4.1.1 Características.^[6,12] La cafeína es un alcaloide de la familia metilxantina, cuyos metabolitos incluye los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar y efectos similares (aunque de menor intensidad a las mismas dosis). En estado puro es un polvo blanco muy amargo. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-dional.

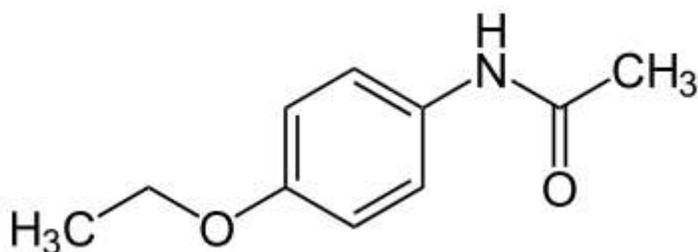
Figura 2. Estructura bidimensional de la Cafeína



1.4.2 FENACETINA

1.4.2.1 Características. La fenacetina es un sólido blanco o polvo cristalino, normalmente presentado como cristales finos de color blanco, sustancia inodora de fórmula molecular $C_{10}H_{13}NO_2$ ^[6], su peso molecular es 179.22 g/mol, a temperatura ambiente 1 gramo de fenacetina se disuelve en 15 mL de etanol, 14 mL de cloroformo, 90 mL de éter y 1310 mL de agua; La sobredosis produce metahemoglobinemia y hemólisis, por su naturaleza oxidante, sobre todo si existe déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. También produce necrosis tubular renal. Su nombre IUPAC es N-(4-Etoxyfenil) acetamida. ^[12]

Figura 3. Estructura bidimensional de la fenacetina



Para el análisis de los analitos mencionados anteriormente, existen diversos tipos de técnicas analíticas, en este trabajo se estudian los analitos mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, la cual es una de las más recomendadas para este fin. A continuación se presentan las principales características de las técnicas acopladas y por separado.

1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

En muy poco tiempo la cromatografía de gases se ha convertido en la técnica principal para la separación y análisis de compuestos volátiles. Ha sido usada para analizar gases, líquidos y sólidos (este último usualmente se disuelven en solventes volátiles). Tanto material orgánico como inorgánico pueden ser analizados, y el peso molecular puede estar en un rango de 2 hasta 1.000 Daltons.

Los cromatógrafos de gases son los instrumentos de análisis más usados en el mundo. Las columnas capilares eficientes proporcionan alta resolución por ejemplo en el estudio del café, donde más de 450 componentes en el aroma del café son diferenciables entre sí. Detectores sensibles como el detector de ionización de llama el cual puede cuantificar hasta concentraciones de 50 partes por billón de componentes orgánicos con una desviación estándar relativa de 5%. La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra en dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada apretadamente dentro de una columna. Esta es la fase estacionaria y puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido ^[21]. La otra fase consiste en un gas o un líquido que pasa sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. Esta fase se denomina fase móvil, En el caso de la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas inerte, su separación se basa en las diferencias en los puntos de ebullición y la temperatura de la columna. En la cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas transportador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna.

Los líquidos orgánicos de alto punto de ebullición constituyen la fase estacionaria de la CG de fase líquida. La fase líquida se extiende como una película delgada sobre un sólido inerte llamado soporte sólido. La base para la separación es la partición de la muestra dentro o fuera de esta película líquida. Si se puede encontrar una fase líquida que tenga solubilidad selectiva para dos compuestos, entonces estos dos pueden separarse mediante cromatografía de gases. La CG de fase líquida es la forma más selectiva de la cromatografía y la que se presta a mayores usos. En la cromatografía de gases se emplea el procedimiento de elusión; la muestra se añade a la columna y el gas puro que actúa de portador fluye continuamente. Esta técnica tiene la ventaja de que los picos de la muestra están rodeados por un gas transportador puro y cuando se concluye el análisis, la columna queda lista para otra muestra. ^[23]

1.5.1 Ventajas. ^[21] Las principales ventajas de la cromatografía de gases son: alta resolución, velocidad en el análisis reflejado por el tiempo de análisis, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos. Alta Resolución: La CG puede generar miles de platos teóricos en unos pocos minutos. Los isómeros con puntos de ebullición muy próximos que no pueden separarse por destilación se separan fácilmente mediante la cromatografía de gases. Además la CG se presta a usos más variados que la mejor columna de destilación, ya que las columnas cromatográficas puede sustituirse fácilmente. Esto permite la separación selectiva debido a solubilidades diferentes, aun cuando los puntos de ebullición estén muy cercanos. Como hay numerosas columnas, se puede escoger entre ellas, lo que confiere variedad a la gama de muestras que pueden manejarse.^[21]

Tiempo de análisis: Normalmente, el análisis por CG tarda unos minutos; muchas separaciones útiles se completan en 10 minutos. Con altas presiones se han terminado análisis completos en apenas unos segundos. Sin embargo, en la mayoría de los análisis de laboratorio este ahorro en tiempo no reduce apreciablemente el tiempo total involucrado en la toma de la muestra, el análisis cromatográfico y el cálculo de los resultados. En consecuencia no se ha destacado mucho la rapidez de estos análisis. Basta señalar que la CG permite lograr rápidamente buenos datos analíticos. Sensibilidad: Una de las razones principales por las que se usa ampliamente la CG en los análisis es la sensibilidad conseguida. El detector de conductividad térmica puede fácilmente medir microgramos. El detector de ionización de llama fácilmente mide nano gramos (10^{-9} g), y los detectores más selectivos como el de captura de electrones y el detector fotométrico de llama alcanzan los pico gramos (10^{-12} g).^[22]

Debido a esta sensibilidad, la CG es un método preferido para el análisis de trazas, particularmente plaguicidas, herbicidas y contaminantes orgánicos en el aire y del agua. Otra ventaja de esta extrema sensibilidad es la pequeñez de la muestra requerida. Para completar un análisis bastan unos micro litros. Sencillez Tanto las técnicas como el instrumental de la cromatografía de gas son relativamente sencillos y fáciles de comprender. Con solo unos pocos días de trabajo de laboratorio los estudiantes son capaces de obtener datos analíticos significativos. Resultados Cuantitativos: Una ventaja importante de la CG es que permite obtener muy buenos resultados cuantitativos. Sin embargo, la exactitud es función de muchos factores. Se puede obtener buena exactitud en una amplia gama de concentraciones de la muestra, desde miligramos hasta nano gramos.^[23]

A continuación se presenta el detector con mayor afinidad con la cromatografía de gases, usado en diferentes tipos de análisis científicos, tanto en investigación como en control de calidad, particularmente análisis forense.

1.6 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

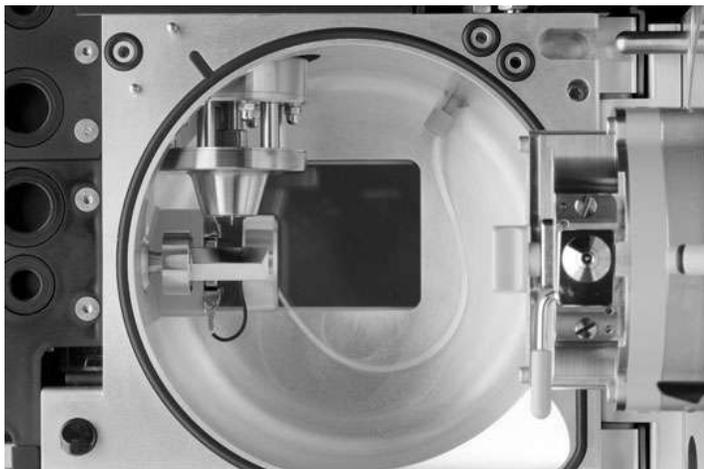
De todas las herramientas analíticas de que dispone un científico, la espectrometría de masas es quizás la de mayor aplicación, en el sentido de que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; ^[24] la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras. ^[25]

Como muchas reacciones químicas usadas para análisis, el propósito básico de la espectrometría de masas es convertir la muestra en productos que son indicativos de la molécula original. Los productos formados son bastante extraños: iones positivos gaseosos, cuya masa y abundancias relativas son mostrados en el espectro de masa. ^[26]

1.6.1 Impacto Electrónico (IE). ^[24] Para este método de ionización, el “reactivo” que produce los productos iónicos es un haz de electrones energéticos. Estos son calentados en un filamento incandescente, y viajan a través de la cámara de iones hasta un ánodo (trampa de iones) en el lado opuesto. El flujo de moléculas vaporizadas de la muestra a una presión de aproximadamente 10^{-3} Pa (10^{-5} torr) que entra a la fuente interactúa con el flujo de iones para formar una variedad de productos, incluyendo los iones positivos. Con la IE se pueden introducir muestras de moléculas largas usando la técnica de haz de partículas

En la figura que se muestra a continuación (figura 4) se muestra una cámara de ionización que hace parte del sistema del espectrómetro de masas.

Figura 4. Fuente de ionización.



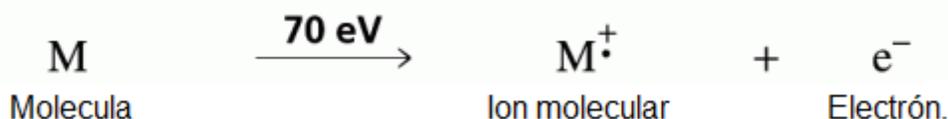
1.6.2 Ionización Química (IQ). ^[24] El gas reactivo entra a la cámara de ionización aumentando la presión en la cámara de ionización a ~ 70 Pa (0,50 torr), se puede asegurar que la muestra sufrirá cientos de colisiones antes de escapar. El bombardeo de electrones de metano o cualquier otro gas a tal presión en una cámara de ionización cerrada produce una abundancia de iones "reactivos" como CH_5^+ . Estos reaccionarán con las moléculas de la muestra adicionada a través de reacciones ión-molécula; algunas son "suaves" produciendo iones estables que representan las moléculas de la muestra sin disociar. ^[26] Con la ionización química diferentes tipos de moléculas pueden ser ionizadas selectivamente con iones positivos o negativos específicos. Ambos tipos de iones son utilizados para indicar el peso molecular, porque están a menudo presentes en espectros de IQ de compuestos que no muestran ión molecular en el espectro de IE. Para IQ el gas reactivo R es introducido a la fuente de iones a una concentración en exceso ($\sim 10^{-4}:1$) ^[25] comparado con la muestra, y es ionizado por bombardeo de electrones o descarga eléctrica. Los iones R inicialmente formados pueden reaccionar con otras moléculas de R para formar iones reactivos los cuales atacan las moléculas de la muestra.

Mediante las técnicas de ionización se producen diferentes tipos de especies químicas, entre ellas el ion molecular, que es aquel resultado de la ionización de la muestra.

1.6.3 Ion Molecular. ^[24] El ión molecular, M^+ provee la más importante información en el espectro de masa. Desafortunadamente, para algunos tipos de compuestos el ión molecular no es lo suficientemente estable para

ser encontrado con apreciable abundancia en el espectro de IE. Para estos casos la espectrometría de masas proporciona la técnica de ionización química ^[26]. Los siguientes son requerimientos necesarios pero no suficientes para el ión molecular en un espectro de masas: Debe ser el ión con mayor masa en el espectro; debe ser una especie radical, que contenga un electrón desapareado; debe ser capaz de producir los iones importantes en la región de masas alta del espectro por pérdidas de especies neutras lógicas ^[25]. A continuación se presenta la reacción global que da como resultado la producción del ion molecular a partir de la molécula.

Figura 5. Reacción global para producir el ion molecular.



Sin embargo, el uso de un espectrómetro de masas como detector en cromatografía de gases se desarrolló durante la década de 1950 por Roland Gohlke y McLafferty Fred.

1.7 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG – EM)

Algunos fabricantes de instrumentos ofrecen equipos de cromatografía de gases que pueden acoplarse directamente con distintos tipos de espectrómetros de masas de barrido rápido. ^[27]

La CG es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles, por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos. Desafortunadamente la CG no puede confirmar la identidad o estructura de cada pico. Los tiempos de retención son característicos de cada compuesto pero no son únicos. ^[28]

Tanto el sistema cromatográfico como el espectroscópico están calentados (200 - 300°C), ambos trabajan con compuestos en estado gaseoso y ambos

requieren pequeños tamaños de muestra (micro o nano gramos). CG y EM son muy compatibles. El único problema es que la presión atmosférica en la salida del CG debe ser reducida a un vacío de 1 a 10^{-6} torr para la entrada al EM W. Las moléculas del analito deben ser primero ionizadas para ser atraídas (o repelidas) por un apropiado campo magnético o eléctrico. Existen numerosas técnicas de ionización, pero impacto electrónico (IE) es el más antiguo, común y simple. La fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas.^[28, 29]

Los electrones de alta energía golpean las moléculas neutras del analito, causando la ionización (usualmente pierde un electrón) y fragmentación.^[30]

Comúnmente esta técnica produce menos fragmentaciones y espectros más simples. El pico mayor que resulta es $(M + 1)$, siendo M el peso molecular. Para llevar a cabo la ionización química, la cantidad de iones es habitualmente diferente de la usada para impacto electrónico, la presión de operación es mayor y la temperatura es más baja.^[27]

Después de la ionización, las partículas cargadas son repelidas y atraídas por lentes cargados en el analizador de masa. Aquí las especies iónicas son separadas por su razón masa-carga por cualquiera de los dos campos magnético o eléctrico. Los analizadores de masa típicos para CG/EM son cuadrupolos o trampa de iones. El primero consiste en cuatro varas hiperbólicas perpendiculares a cada una. Tiene la ventaja de ser sencillo, pequeño, de costo moderado y rápido análisis lo que lo hace ideal a los sistemas CG/EM.^[28]

El de trampa de iones es también simple en diseño y de análisis rápidos para CG/EM. El espectro generado, difiere a menudo del espectro clásico creado en uno de cuadrupolo y algunos iones sufren disociación o colisiones ión-molécula adentro de la trampa de iones.^[30, 31]

El espectro de masa es simplemente un plano de la abundancia de los iones en función del (m/z) . Bajo condiciones controladas, las razones de abundancia y (m/z) específico que presentan las especies son únicos para cada compuesto. Estos pueden ser utilizados para determinar el peso molecular y la estructura química de cada compuesto.^[30, 31]

CG-EM combina las ventajas de ambas técnicas: el alto poder de resolución y la velocidad de análisis de CG, mientras la EM provee tanto identificación positiva como análisis cuantitativos por debajo del nivel de las ppb. Por otro lado los instrumentos de CG-EM representan una inversión importante de capital, son más complicados de operar que un CG .^[30, 31]

La presentación de datos puede ser de dos maneras; o como un total análisis (scan, TIC-Total Ion Current) o como un número pequeño individual de iones (SIM-Selected Ion Monitoring) característicos de un compuesto. Un cromatograma de ión total (TIC) es usado para identificar compuestos desconocidos. Un rango específico de masas es escaneado. Todos los picos son reportados así que los espectros de masa pueden ser recuperados del computador y ser usados para identificar cada pico. La computadora compara rápidamente cada espectro de masa desconocido con cerca de 450.000 espectros de referencia. La adquisición de datos necesario para examinar todos los iones en el rango seleccionado es lento, la sensibilidad es limitada, y usualmente no es óptima.^[30, 31]

En SIM solo un pequeño número de iones (habitualmente 6) son monitoreados. Aquí la adquisición de datos es más rápida durante el tiempo de vida del pico, por lo tanto la cuantificación es mejor y la sensibilidad aumenta considerablemente. SIM no puede usarse para análisis cualitativo (no todas las masas son escaneadas), pero es el mejor modo para el análisis de compuestos designados, a menudo por debajo del nivel de los ppb.^[30, 31]

1.8 COLUMNA CROMATOGRÁFICA.

Es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el "corazón" de un cromatógrafo. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio ó teflón. El relleno puede ser un sólido, ó un líquido recubriendo un sólido.

Las columnas básicamente se dividen en dos partes, el soporte cromatográfico y la fase estacionaria.

1.8.1 Soporte cromatográfico. La función básica del soporte es la de "mantener" (sostener, retener) la fase estacionaria. Idealmente debería ser un material inerte que "mantiene" la fase estacionaria sobre su superficie como una película delgada. La mayoría de los soportes cromatográficos

está hecha de diatomita. Químicamente es casi todo sílice, con algunas impurezas. También se conoce como Tierras Diatomáceas ó Kieselguhr (palabra alemana). Domina el campo de los soportes debido a su estructura, superficie y disponibilidad.

1.8.2 Fase estacionaria. Al hablar de fase estacionaria líquida entramos en contacto con dos palabras ó términos: Polaridad y Selectividad.

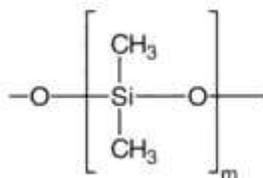
Las fases líquidas podemos clasificarlas según sus polaridades cromatográficas, nos valemos de unas constantes que determinan dicha polaridad. Existen dos sistemas:

- * Constante de Rohrchneider
- * Constante de McReynolds

Existen muchas discusiones sobre este tema para poder definir y describir el parámetro polaridad en cromatografía, podemos decir que la polaridad de una fase estacionaria líquida se refiere a las interacciones intermoleculares que involucra dipolos permanentes. Selectividad es definida como las diferentes atracciones intermoleculares.

La estructura de la fase estacionaria usada durante la elaboración del trabajo es la que se puede observar en la figura 6.

Figura 6. Estructura resumida del dimetilpolisiloxano.



1.9 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Estandarizar un método de análisis consiste en verificar y documentar, que este conduzca con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados

precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable (en algunos casos puede superar los seis meses).

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realizan millones de análisis cada día en el mundo en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, naturales, análisis medioambientales, clínicos, forenses, químicos y físicos. En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La estandarización de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad permite conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.

Desde la vertiente económica, los costos asociados al proceso analítico suelen ser elevados y surgen costos adicionales ligados a las decisiones que se toman sobre la base de los resultados obtenidos. No se puede dar el lujo, por ejemplo, de que se devuelvan un lote de producto expedido en función de unos resultados analíticos que erróneamente expresaban conformidad a la normatividad vigente. Una correcta estandarización del método debería haber detectado la presencia de error en los resultados emitidos.

1.9.1 Linealidad. El término Linealidad aplicado a un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones de analito en el que la respuesta es función lineal de la concentración; la representación gráfica de este tramo (Concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena adherencia de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable. En muchos textos se hace referencia al mismo tramo de concentraciones con la denominación Intervalo de concentración.^[35,36]

Debe evaluarse la linealidad en un intervalo de concentraciones que comprenda la zona de trabajo y es habitual adoptar un intervalo del 80 al 120 % o del 50 al 150 % de la concentración que se espera hallar.^[37]

En determinados procedimientos analíticos se debe acortar este intervalo para conseguir una linealidad aceptable. Otros métodos requieren la transformación de los datos experimentales a sus logaritmos para conseguirla.

1.9.2 Limite de detección (LD). Se define el Límite de Detección como la menor cantidad o menor concentración de analito que puede ponerse en evidencia; para un determinado analito, varía según el método analítico que se utilice y en la literatura especializada se encuentran diversas definiciones de LD, aplicables en función de la técnica analítica considerada. ^[35,36]

Además del LD basado en la evaluación visual y del basado en el ruido de fondo o relación señal/ruido del instrumento de medida, que no requieren el concurso de cálculos estadísticos, se consideran varios LD, obtenidos todos por cálculo a partir de las desviaciones tipo de las respuestas analíticas. La guía CPMP/ICH/281/95 considera los siguientes: ^[37]

- LD basado en la relación señal/ruido, aplicable a aquellos procedimientos analíticos en los que el aparato de medida presenta un ruido de fondo o línea de base. Su determinación se efectúa comparando las señales obtenidas a partir de muestras conteniendo bajas concentraciones, conocidas, de analito con preparaciones sin analito (blancos) y estableciendo la concentración mínima a la cual el analito puede ser detectado de una manera fehaciente. Se considera generalmente aceptable una relación señal/ruido comprendida entre 3/1. ^[37]
- LD basado en la desviación tipo de las respuestas del blanco. La estimación de esta desviación tipo se efectúa midiendo la magnitud de las respuestas analíticas de un número apropiado de muestras blanco. ^[37]
- LD basado en la desviación tipo residual de la regresión, efectuada con muestras conteniendo concentraciones de analito en el rango del LD. ^[37]
- LD basado en la desviación tipo del término independiente de la citada recta de regresión. ^[37]

1.9.3 Limite de Cuantificación (LC). El LC es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud. Varias convenciones lo definen como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media de blancos. ^[35,36]

En los textos especializados se define también un Límite de Cuantificación (LC) como la menor cantidad de analito que puede cuantificarse con seguridad por el método que se considera. Valores típicos del LC son, para el cálculo basado en la relación señal/ruido, una relación de 10 a 1 y para los calculados a partir de desviaciones tipo, el LC es de 3.3 veces el LD (o el resultado de multiplicar por 10 la desviación tipo considerada). ^[35,36]

1.9.4 Precisión. Las dos medidas más comunes de la precisión, que generalmente se define en términos de la desviación estándar o el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) son la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad, que es la precisión más pequeña esperada, da una idea de la variabilidad que se espera cuando un método es aplicado por un solo analista en un equipo durante un periodo corto (análisis por duplicado). En el otro extremo, la reproducibilidad, que representa la variabilidad que se obtiene cuando una muestra es analizada por varios laboratorios tiene un valor más amplio. La precisión intermedia y más útil en casos específicos se obtiene cuando se evalúa la reproducibilidad entre analistas en un mismo laboratorio. ^[35,36]

La repetibilidad y la reproducibilidad generalmente dependen de la concentración del analito y por lo tanto se deben determinar para diferentes concentraciones, estableciendo, cuando sea relevante, la relación entre la concentración y el coeficiente de variación. ^[35,36]

Para la estandarización y/o validación de un método analítico por GC-MS existen 3 tipos de métodos comunes para la calibración: estándar externo, normalización de área y estándar interno; este último usado en el trabajo para la estandarización del método, a continuación se presentan las características que tiene este método de calibración.

1.10 ESTÁNDAR INTERNO

Tanto en la cromatografía de gases como en otras técnicas con el mismo principio y/o afines, se sugiere el uso de un estándar interno. El método del

Estándar interno consiste en adicionar un compuesto estandarizado al cual se le conocen todas las características, a la muestra analizada y medir la relación de las áreas de los picos de la muestra y del estándar, este método se emplea para superar las variaciones en la inyección de la muestra, la variación con respecto al ruido y otros factores que afectan la medición por parte del equipo. El estándar interno debe cumplir con las siguientes características: ^[6]

- Debe ser estable bajo condiciones cromatográficas
- Debe ser inerte a todos los componentes de la muestra y de la columna.
- No debe interferir con los analitos, es decir debe estar separado de todos los picos de la muestra.
- Debe ser soluble en la muestra.
- Debe tener un tiempo de retención comparable a los componentes de la muestra.

Para el análisis de estupefacientes las sustancias que se emplean como estándar interno son colesterol o el tetracosano (también conocido como el triacontano) ^[18]

1.10.1 Características. Tetracosano, es un alcano de hidrocarburos con la fórmula estructural $C_{24}H_{50}$. Al igual que otros alcanos, su nombre se deriva del griego para el número de átomos de carbono, 24, en la molécula. Tiene 14.490.245 isómeros constitucionales. ^[6]

n -Tetracosano, se encuentra en el mineral llamado evenkita en la Región evenki en Siberia, la Evenkita se encuentra en forma de escamas incoloras y se dice que presentan fluorescencia de color amarillo-naranja. ^[19]

En la literatura se recomienda el tetracosano, ya que posee las siguientes características principales ^[12,19]:

- No co-eluye con ninguno de los adulterantes de la cocaína, por lo tanto no se presentan superposiciones entre estos.
- Es un hidrocarburo relativamente más estable que las drogas o compuestos químicos similares a la cocaína.

- No proviene de ninguna de las fuentes a las cuales sí lo hacen los adulterantes y la droga.
- No reacciona con los demás analitos y finalmente posee un factor de dilución en el solvente a usar

2 SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1 Reactivos. los reactivos usados en la estandarización de este método y posterior cuantificación de los principales adulterantes y por supuesto de la cocaína misma fueron proporcionados y recibidos por el laboratorio de química del Cuerpo Técnico de Investigación, muestras reales catalogadas como elementos material probatorios y evidencias físicas. Por ello el estándar de cocaína es un estándar primario, pero los estándares de fenacetina y cafeína son estándares secundarios proporcionados por el mismo laboratorio. Los reactivos adicionales como los son el tetracosano y el etanol son reactivos de calidad analítica, puesto que para tener un grado de HPLC se necesita una inversión monetaria bastante alta, para efectos prácticos y disminución del presupuesto se decidió usar los mencionados a continuación.

2.1.1.1 Cocaína. ^[19] A continuación se presenta una breve descripción del estándar usado en este trabajo:

Fabricante: SIGMA
Código: C – 5776
Lote: 036K1662
Pureza: 99% (Garantizada >97,5%)

Adicional a esto en los anexos (anexo 1) se presenta el certificado de pureza del fabricante.

2.1.1.2 Cafeína. Seguido están las principales características del estándar secundario de cafeína usado:

Tipo de estándar: Secundario
Pureza: 93%

2.1.1.3 Fenacetina. Al igual que la cafeína, la fenacetina usada en el trabajo es una fenacetina estándar secundaria ya que para la compra de estándares primarios es necesario hacer un proceso de licitación lo que hubiera complicado aun más la finalización del trabajo. A continuación se presenta la pureza de la fenacetina.

Tipo de estándar: Secundario

Pureza: 95%

- 2.1.1.4 Tetracosano.** ^[38] Este reactivo fue proporcionado desde el Laboratorio de Química del Cuerpo Técnico de Investigación y a continuación se presentan las principales características.

Fabricante: ACROS Organics

Código: 138040250

Lote: A0259991

Pureza: 99%

Adicional a lo anterior se presenta en los anexos (anexo 2) el certificado por parte del fabricante.

- 2.1.1.5 Etanol.** ^[39] El etanol usado para los análisis fue proporcionado por el laboratorio.

Fabricante: Merck

Código: -----

Lote: -----

Pureza: 95%

En el anexo 2.5 de este trabajo se encuentra el certificado de pureza del fabricante.

- 2.1.2 Materiales.** ^[40] Los materiales usados para este trabajo serán mencionados a continuación, con sus principales características, fabricantes y sus incertidumbres.

Balones aforados de 50.0ml BRAND

Certificado ISO 9001

Volumen nominal 50.0 mL

Incertidumbre: ± 0.05 (20 °C)

Balones aforados de 10.0ml BRAND

Certificado ISO 9001

Volumen nominal 10.0 mL

Incertidumbre: ± 0.01 (20 °C)

Balones aforados de 5.0ml BRAND

Certificado ISO 9001

Volumen nominal 5.0 mL
Incertidumbre: ± 0.005 (20 °C)

Balones aforados de 2.0ml BRAND
Certificado ISO 9001
Volumen nominal 2.0 mL
Incertidumbre: ± 0.0025 (20 °C)

2.1.3 Equipos. Estos fueron calibrados previamente y cada uno de ellos tienen su certificado de calibración proveniente de su fabricante o la empresa que realiza este tipo de mantenimientos, a continuación se mencionan y se realiza una breve descripción de cada uno de los equipos usados en el proceso de realización de este trabajo.

2.1.3.1 Balanza Analítica. ^[41] La balanza usada es una balanza analítica marca KERN, de origen alemán y con referencia 100-5AM, la cual se autoajusta cada 15 minutos. Su peso mínimo y certero es de 0,1 mg y su tolerancia máxima de peso es de 100 mg. Para una mayor confiabilidad en los datos la balanza se calibró con anterioridad; en los anexos se encuentra el orden de calibración, a continuación se puede ver una imagen de la balanza utilizada en el proceso (ver figura 7)

Figura 7. Balanza analítica marca KERN ref. 100-5AM



2.1.3.2 Sonificador. El sonificador fue usado para asegurar que todos los sólidos usados en el proceso, se diluyeran por completo ya que para algunos de

los sólidos no es inmediata la solvatación y es necesario mezclar o como en este caso, sonicar unos minutos. El sonicador usado fue un VGT con referencia 375 H, con rejilla separadora y regulador de temperatura, con una temperatura máxima de 60°C y un temporizador para el ultrasonido. A continuación se presenta una imagen del sonicador. (ver figura 8)

Figura 8. Sonicador VGT 375 H



2.1.3.3 Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas. ^[42]

Este cromatógrafo es el GC-MS - QP2010plus tiene la mayor sensibilidad de cualquier sistema GC/MS proporcionando velocidades de adquisición mayores a otras técnicas analíticas. Tiene un inyector automático que hace mucho más efectivo el análisis, ya que la incertidumbre con la que inyecta la cantidad solicitada es muy bajo. Su puerto de inyección hace que las muestras líquidas se evaporen inmediatamente, ya que la temperatura máxima del puerto es de 300 °C, la temperatura del horno se puede elevar hasta que la columna lo permita, luego en el detector de masas, el alto vacío llega casi a cero, haciendo que el trayecto de las especies químicas detectables sea mucho más rápido, ayudado por el cuadrupolo que hace más selectiva la técnica. La columna usada es una columna Agilent J&W HP-1 MS, con longitud de 30 metros, diámetro de película de 0.25 mm y diámetro externo de 0.50 mm. La fase estacionaria es 100% de dimetilpolisiloxano, el ID de la columna es 19091S-633UI, la estructura se puede visualizar en la figura 6.

Figura 9. Imagen del equipo GC-MS QP 2010plus



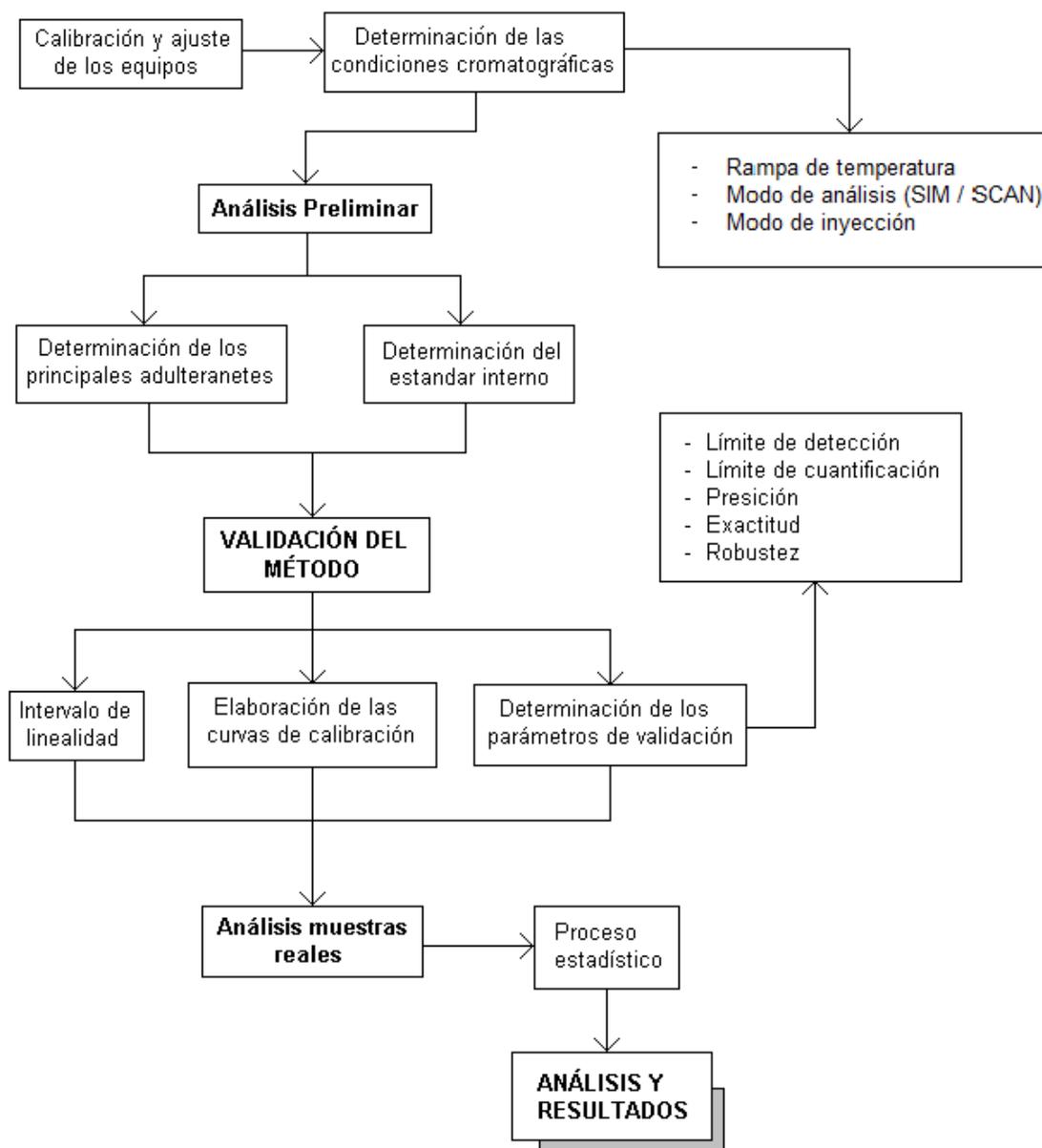
En los anexos (anexo 4) se puede ver el certificado de calibración del equipo, tanto del equipo de inyección automático, como del cromatógrafo y el espectrómetro de masas.

2.2 METODOLOGÍA

La metodología usada en este trabajo fue basada en la metodología que usó la Ingeniera Gloria Angélica Ríos Rodríguez en su tesis de grado[6], adicionándole algunos ensayos puesto que para el proceso de las muestras reales y las conclusiones fue necesario indagar un poco más sobre el proceso estadístico que tiene este tipo de trabajos. A continuación se muestra un diagrama de flujo global, donde se puede observar el proceso que se llevó a cabo desde la calibración y ajuste de los equipos, hasta el análisis y resultados de las muestras reales.

2.2.1 Diagrama de flujo.

Figura 10. Diagrama de flujo



2.2.2 Análisis preliminar. Para la realización de este análisis se tomaron muestras de la cocaína incautada durante los meses de Junio, Julio y Agosto del año 2010, provenientes de las distintas ciudades del eje cafetero; ya que no se tenía una idea clara de cuáles eran los principales adulterantes (o como se conoce en el argot popular “rebajantes”) presentes en la cocaína. Con este análisis preliminar se buscó encaminar la estandarización del método ya que al conocerse los adulterantes se podría proceder con la preparación de las curvas de calibración y su respectiva estandarización.

2.2.3 Curvas de calibración. Las curvas de calibración se realizan para buscar la relación lineal entre un carácter medible y la variable a determinar, para este caso la concentración y la intensidad de la señal detectada por el equipo que en este caso es el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas.

2.2.4 Determinación de parámetros de estandarización. Los parámetros que se determinaron fueron: Límite de Cuantificación, Límite de Detección, precisión y exactitud. Existen otra variedad de parámetros que se pueden emplear para la validación de un método analítico, pero en este caso se tomaron los parámetros antes mencionados, sugeridos por la IUPAC para la estandarización de métodos analíticos, los cuales son iguales a los sugeridos para la validación de métodos analíticos, con la salvedad de no evaluar la robustez y la incertidumbre.^[35]

2.2.5 Muestras reales. Después de tener un método estandarizado para la cuantificación de cocaína, cafeína y fenacetina, se procedió al análisis de muestras incautadas, por parte de los peritos del Cuerpo Técnico de Investigación, estos resultados fueron tabulados y posterior a un pequeño proceso estadístico se procedió a dar análisis a estos resultados. Las muestras reales son muestras incautadas entre los límites del eje cafetero, ya sea en cualquier municipio de Caldas, Quindío y Risaralda.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

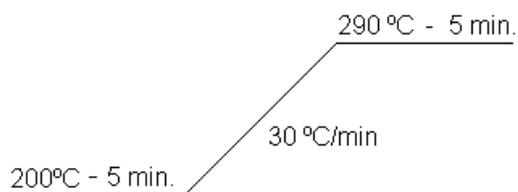
En el ítem 3.3.1 se muestran los resultados obtenidos previos a la estandarización, identificando los adulterantes, analitos que se utilizaron durante dicha estandarización.

3.1 Determinación de las condiciones cromatográficas.

Para la determinación de las condiciones cromatográficas, se realizaron ensayos con respecto a la rampa de temperatura y al modo de inyección, ya que el tetracosano (Estándar interno) no eluía durante el tiempo que estaba el método en funcionamiento. A continuación se muestran los resultados correspondientes a la determinación de la rampa de temperatura y al modo de inyección que fueron los parámetros que causaron mayor dificultad en su definición.

3.1.1 Determinación de la rampa de temperatura. ^[6] La rampa de temperatura se basó en el método de análisis cuantitativo de cocaína desarrollado por el laboratorio de química de la Unidad Central del Cuerpo Técnico de Investigación seccional Bogotá, el cual fue adaptado del manual de las naciones unidas para el análisis de cocaína, heroína y morfina, entregado en New York en 1986^[44]. y se presenta a continuación la rampa de temperatura usada en la estandarización del método y análisis de muestras incautadas. (Ver figura 11)

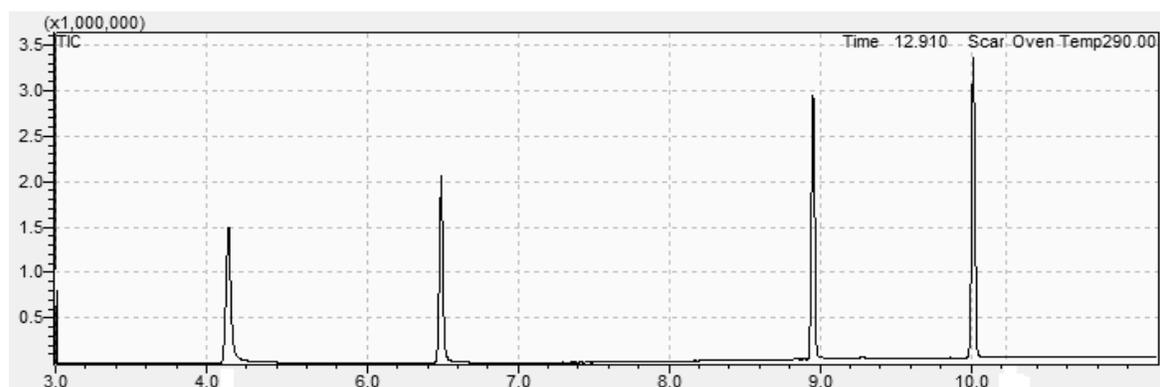
Figura 11. Rampa de temperatura usada para la estandarización



Así pues se observa la aparición del tetracosano y de los tres analitos de interés con una buena resolución, perfecta separación y un tiempo estimado de 12 minutos. A continuación se observa el cromatograma del

análisis con la rampa de temperatura que se utilizaría durante toda la estandarización y el análisis de las muestras reales. (Ver figura 11)

Figura 12. Cromatograma de la rampa de temperatura usada en la estandarización



El cromatograma anterior (figura 12) se evidencian los tiempos de retención que se definen a continuación en la siguiente tabla (ver tabla 1) tomada de los resultados que proporciona el equipo.

Tabla 1. Tiempos de retención

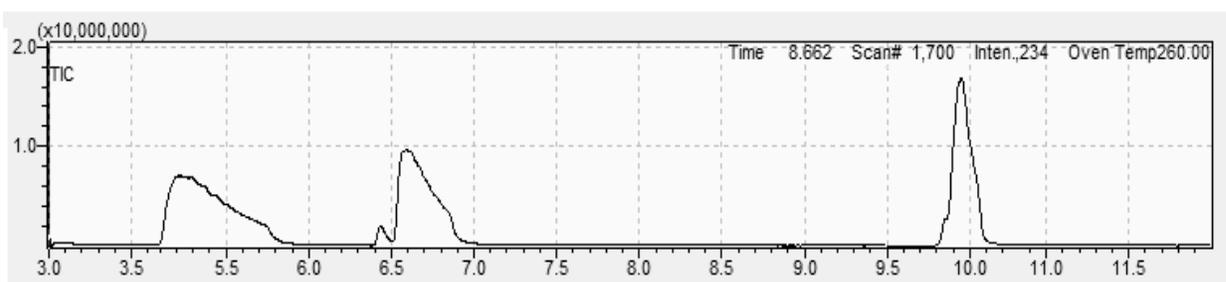
| ID# | Name | Type | ISTD G | m/z | Ret. Time | Unit | Ref. Ions |
|-----|------------|--------|--------|-----|-----------|------|-----------|
| 1 | Phenacetin | Target | 1 | TIC | 5.161 | ppm | 108.00-17 |
| 2 | Caffeine | Target | 1 | TIC | 6.597 | ppm | 194.00-10 |
| 3 | Cocaine | Target | 1 | TIC | 8.982 | ppm | 82.00-182 |
| 4 | Triacotane | ISTD | 1 | TIC | 10.045 | ppm | 57.00-71. |

Para verificar que sean efectivamente las sustancias analizadas, se presentan los espectros de masas, apoyados en fragmentogramas mostrados en el anexo 5.

3.1.2 Determinación del modo de inyección. ^[6] Debido a un problema con el estándar interno, se contemplo la posibilidad de cambiar el modo de inyección de *Split* a *Splitless* lo que implicaba que toda la muestra iba a parar a la columna cromatográfica y se podría saturar, así que se hicieron ensayos para verificar si el tetracosano se observaba usando una rampa de temperatura alterna, diferente a la usada en la estandarización y análisis la cual era 200°C por 5 minutos, aumento de 30°C por minuto hasta una temperatura final de 260°C por 5 minutos.

En primera se obtuvieron resultados inesperados, el tetracosano con una concentración de 250 ppm no se pudo observar en el tiempo de análisis del método, acto seguido se propuso realizar el análisis aumentando la concentración del tetracosano a 500 ppm, en el tope de concentración establecida inicialmente (concentración máxima de los analitos para la curva), sin embargo, duplicando la concentración, fue imposible determinar el tetracosano mediante esta rampa de temperatura, lo que llevó a cambiar inicialmente el modo de inyección de split a splitless con la misma rampa de temperatura. A continuación se presenta el cromatograma y los resultados con la rampa de temperatura descrita en el párrafo anterior (ver figura 13).

Figura 13. Tetracosano, modo de inyección splitless

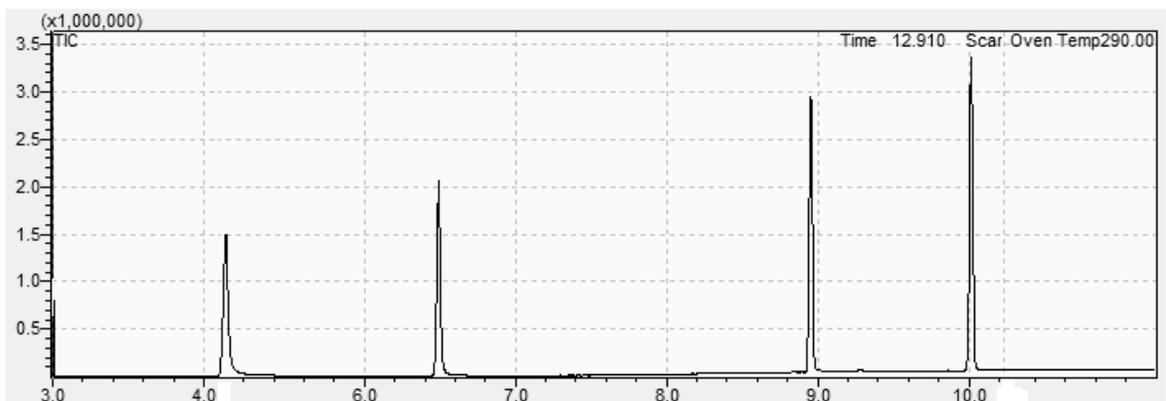


Modo de inyección: splitless

Como característica adicional se puede observar que los picos de los analitos de interés se observan poco definidos ya que splitless inyecta toda la muestra directamente a la columna, lo que produce un desplazamiento del pico por saturación. Sin embargo aun realizando splitless no se observa el tetracosano, finalmente se decidió cambiar la rampa por la rampa descrita en el aparte 3.1.1

Luego de hacer el análisis con la rampa de temperatura en el literal 3.1.1 se puede observar que el tetracosano tiene un tiempo de retención aproximado de 10,1 minutos (ver figura 12), lo que indica pues que la temperatura a la cual debe aparecer es elevada, lo que lleva a tomar la decisión de usar la rampa de temperatura propuesta en el aparte 3.1.1 (usada en la estandarización), para ello se inyectó una muestra que contiene los tres analitos de interés y el estándar interno tomando split con ratio 1:10 como modo de inyección

Figura 14. Cromatograma del tetracosano y los tres analitos.



Modo de inyección: Split
Split ratio: 1:10

Así pues el mejor tipo de inyección es el split con un ratio de 10 y con una rampa de temperatura determinada anteriormente, con la ayuda del modo de inyección.

3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO.

Según el documento de la IUPAC *harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*, los parámetros de estandarización para que un método sea científicamente aceptable, son: Linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, precisión y exactitud. A continuación se presentan los valores de los parámetros establecidos para la estandarización del método.^[35]

3.2.1 Linealidad^[37]. La linealidad del método está establecida por el grado de dispersión que tengan los datos, cuanto más correlación tengan los datos, mas lineal será el método.^[35] Para ello se debe hacer una regresión lineal, logarítmica o exponencial, en este caso se debe realizar una correlación lineal entre la concentración y el área del pico, puesto que debe ser lineal para que haya una congruencia en la posterior cuantificación. Para determinar la linealidad, se debe hallar el índice de correlación R^2 el cual debe ser lo más cercano posible a uno (1), entre más cercano, mas lineal es el sistema, siendo un método informal pero efectivo. A continuación se presentan los gráficos de linealidad para cada uno de los analitos.^[6]

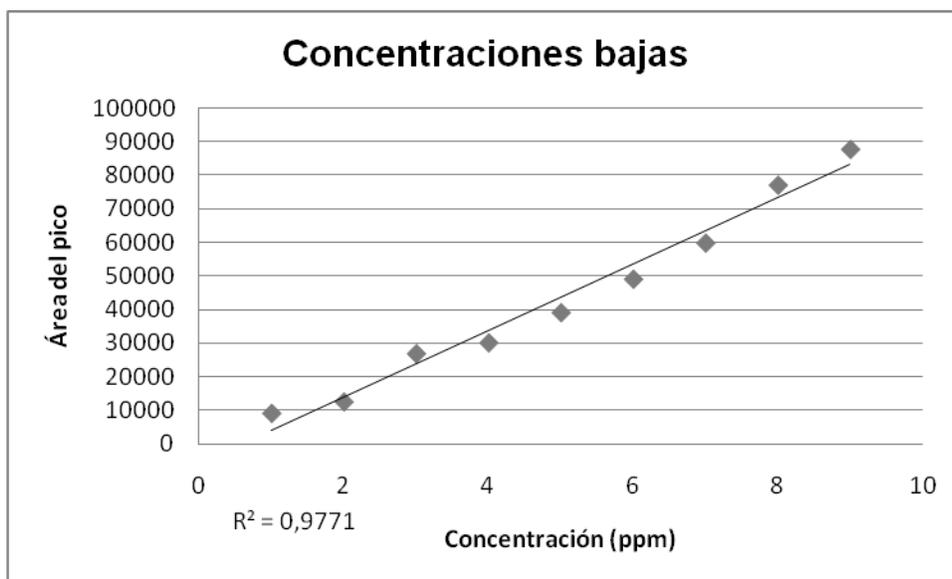
3.2.1.1 Cafeína. Para la cafeína se realizaron gráficos para bajas, medias y altas concentraciones, a continuación se presenta una tabla indicando las bajas, medias y altas concentraciones;

Tabla 2. Rangos de las concentraciones.

| Rango de concentración | Rango (ppm) | Proporción de aumento |
|------------------------|-------------|-----------------------|
| Bajas | 1 – 10 | 1 ppm |
| Medias | 10 – 100 | 10 ppm |
| Altas | 100 – 450 | 50 ppm |

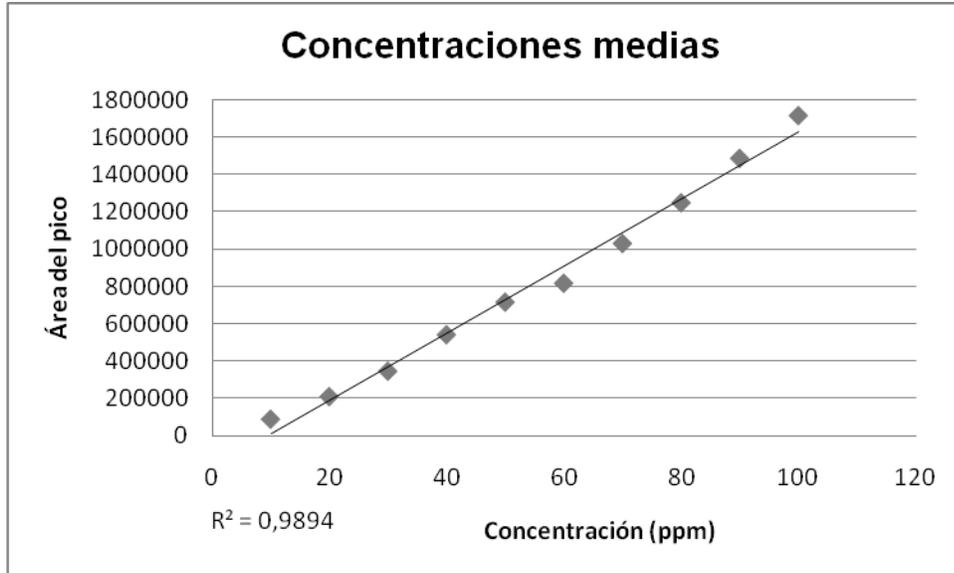
Con el fin de encontrar el rango lineal del sistema, a continuación se presentan los gráficos correspondientes.

Figura 15. Gráfico de bajas concentraciones para la Cafeína.



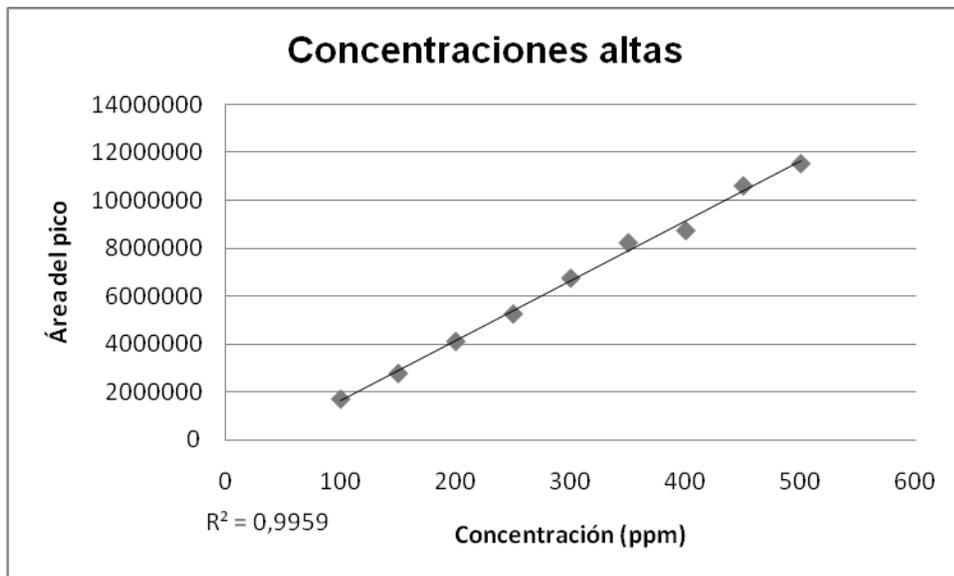
Como se ve en la figura 15, el R^2 es muy próximo a 1, sin embargo no puede ser concluyente ya que no se han observado las otras gráficas, a continuación se presenta el gráfico 15 para las concentraciones medias.

Figura 16. Gráfico de medias concentraciones para la Cafeína.



Al igual que en el gráfico anterior (figura 16), el R² de la figura 16 es cercano a 1. Finalmente se observa el último gráfico (figura 17) para verificar en que rango de concentraciones es lineal el método.

Figura 17. Gráfico de altas concentraciones para la Cafeína.



Para ver mejor los resultados de las gráficas, se presenta la tabla 3 y se pasa a analizar los resultados.

Tabla 3. Índices de correlación de las gráficas de la Cafeína.

| Rango de concentración | Índice de correlación R ² |
|------------------------|--------------------------------------|
| Bajo | 0.9771 |
| Medio | 0.9804 |
| Alto | 0.9959 |

A medida que aumenta el rango de las concentraciones, aumenta el índice de correlación, se puede deducir de esto que el rango lineal aumenta con respecto a la concentración, sin embargo, a 500 ppm la linealidad se comienza a perder, puesto que la intensidad del área del pico se torna constante a causa de una saturación de la columna.

3.2.1.2 Fenacetina. Al igual que en la cafeína, a la fenacetina se le realizaron pruebas para verificar el rango de linealidad, para visualizar las pruebas realizadas se presenta de nuevo la tabla 2.

Tabla 2. Rangos de las concentraciones.

| Rango de concentración | Rango (ppm) | Proporción de aumento |
|------------------------|-------------|-----------------------|
| Bajas | 1 – 10 | 1 ppm |
| Medias | 10 – 100 | 10 ppm |
| Altas | 100 – 450 | 50 ppm |

A continuación se muestran las gráficas correspondientes a las medias y altas concentraciones (ver figura 18 y 19).

Figura 18. Gráfico de medias concentraciones para la Fenacetina.

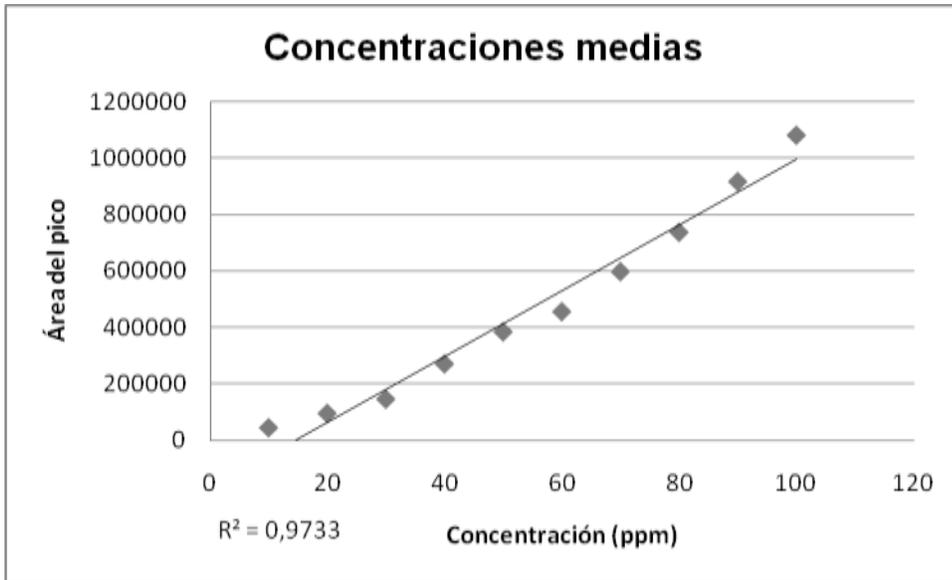
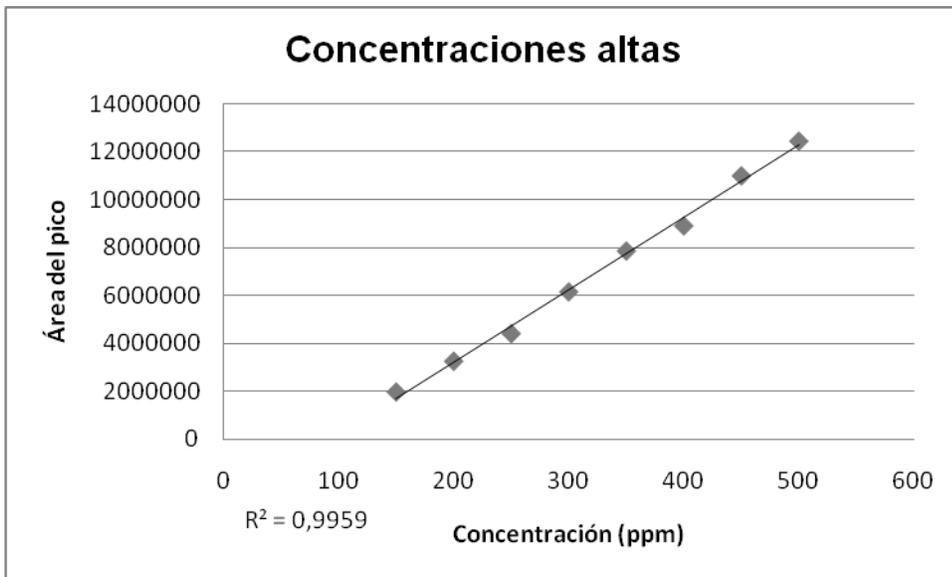


Figura 19. Gráfico de altas concentraciones para la Fenacetina



De la misma forma que en la cafeína, en las medias concentraciones para la fenacetina se ve un buen índice de correlación entre los datos, finalmente se analiza el gráfico de altas concentraciones (ver figura 19).

Para mejor visualización de los resultados, se presenta una tabla con los respectivos índices de correlación. (Ver tabla 3)

Tabla 4. Índices de correlación de las gráficas de la Fenacetina.

| Rango de concentración | Índice de correlación R ² |
|------------------------|--------------------------------------|
| Bajo | ----- |
| Medio | 0.9733 |
| Alto | 0.9959 |

Se encontró que para las bajas concentraciones, era insuficiente el área del pico y se planteo la posibilidad de que el límite de detección estuviera por encima de las 10 ppm

Al igual que en la Cafeína, la fenacetina también presenta un aumento en el índice de correlación a medida que se aumenta la concentración, sin embargo, también tiene el mismo inconveniente y es que la linealidad se comienza a perder después de las 450 ppm, lo que implica que ese podría ser el punto de inflexión de la linealidad del sistema.

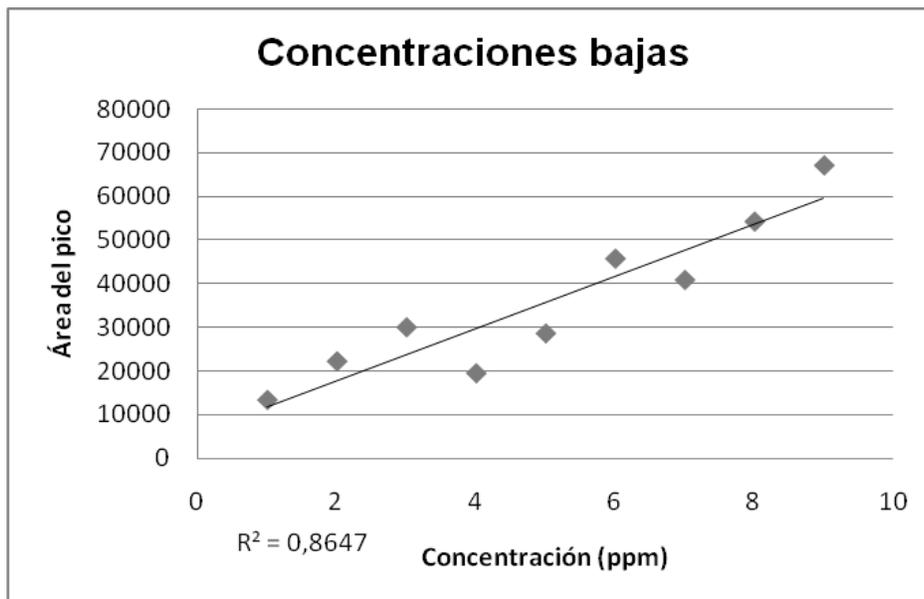
3.2.1.3 Cocaína.

Este es el analito mas importante puesto que el método se valida con el fin que el análisis de todas las muestras que se encuentran en el laboratorio de química del Cuerpo Técnico de Investigación, sea científicamente aceptado. Debido a esto y al igual que en los analitos anteriores, se realizaron análisis para bajas medias y altas concentraciones. Al igual que los analitos anteriores, se presenta la tabla 2, donde se visualizan los rangos de concentración

Tabla 2. Rangos de las concentraciones.

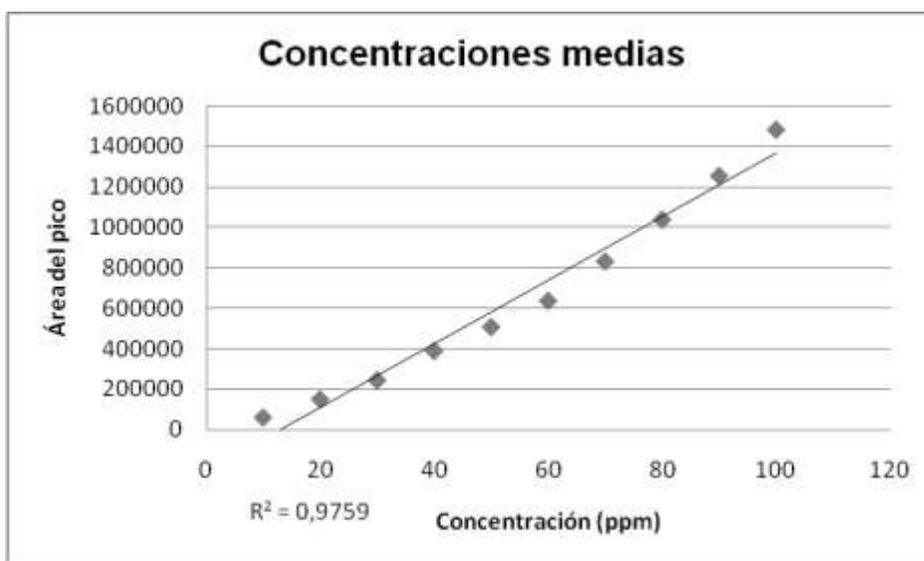
| Rango de concentración | Rango (ppm) | Proporción de aumento |
|------------------------|-------------|-----------------------|
| Bajas | 1 – 10 | 1 ppm |
| Medias | 10 – 100 | 10 ppm |
| Altas | 100 – 450 | 50 ppm |

Figura 20. Gráfico de bajas concentraciones para la Cocaína.



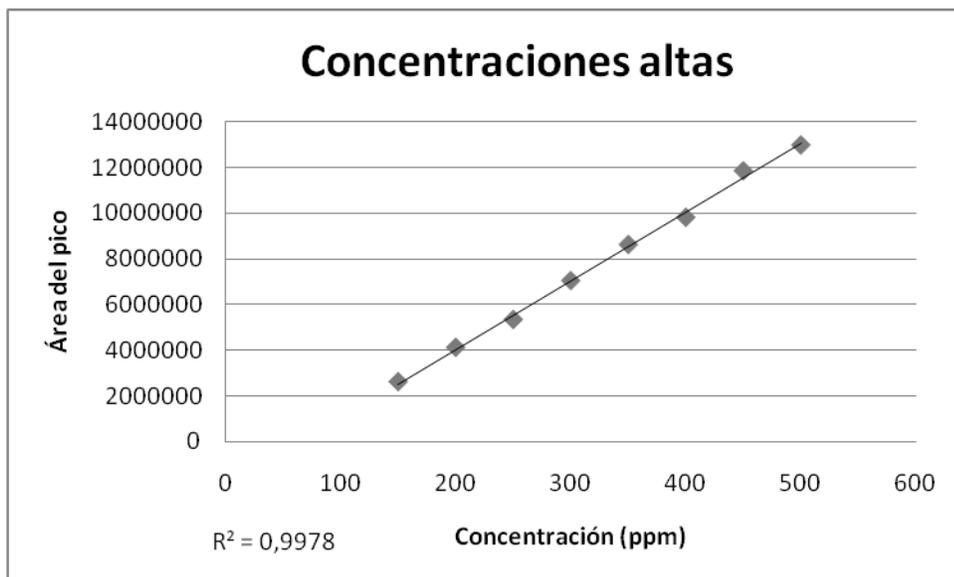
Como se puede ver en la gráfica (figura 20), el R^2 está muy alejado de 1, lo que deduce que el rango de concentraciones bajas es muy inestable. Luego se puede observar el grafico correspondiente a las concentraciones medias (ver figura 21).

Figura 21. Grafico de medias concentraciones para la Cocaína.



De la misma manera que en la cafeína, en las gráficas de la Cocaína se observa un aumento en el índice de correlación; situación que no se presentó con la fenacetina debido a la no correlación en las bajas concentraciones; a continuación se observa la gráfica para las altas concentraciones (ver figura 22).

Figura 22. Gráfico de altas concentraciones para la Cocaína.



Finalmente y para tener una mejor perspectiva de los resultados se presenta la tabla 5.

Tabla 5. Índices de correlación de las gráficas de la Cocaína.

| Rango de concentración | Índice de correlación R ² |
|------------------------|--------------------------------------|
| Bajo | 0.8647 |
| Medio | 0.9759 |
| Alto | 0.9978 |

Analizando los resultados, se puede observar que al igual que en la cafeína y en la fenacetina, a medida que aumenta la concentración, aumenta el índice de correlación, pero a pesar de eso, se sigue

observando que el punto de inflexión para la gráfica de linealidad sigue entre 450 y 500 ppm.

Teniendo los resultados anteriores, se procede a usar las altas concentraciones para la realización de las curvas de calibración.

3.2.2 Curvas de calibración. Si bien la linealidad es un parámetro importante, las curvas de calibración son determinantes a la hora de estandarizar y validar un método, pues son ellas quienes definen los límites y alcances del método [37]. A medida que se avanza en una investigación, se encuentran dificultades o pistas sobre el mejoramiento del método, es por eso que por medio de las gráficas de linealidad se puede indicar que el rango de linealidad constante va hasta 450 ppm; debido a esto, las curvas de calibración correspondientes a los analitos tienen un rango de concentraciones que va desde 100 ppm hasta 450 ppm. A continuación se muestran las curvas de calibración de los analitos y sus correspondientes características.

3.2.2.1 Cafeína. La curva de calibración correspondiente a la cafeína se realizó mediante el método de estándar interno, donde la concentración es de 250 ppm. Se tienen 8 niveles de concentración a concentraciones altas; cada nivel de concentración se inyectó un total de diez (10) veces y se obtuvo la gráfica.(ver figura 23)

Para presentar una breve descripción de los datos se da la siguiente tabla obtenida del equipo.

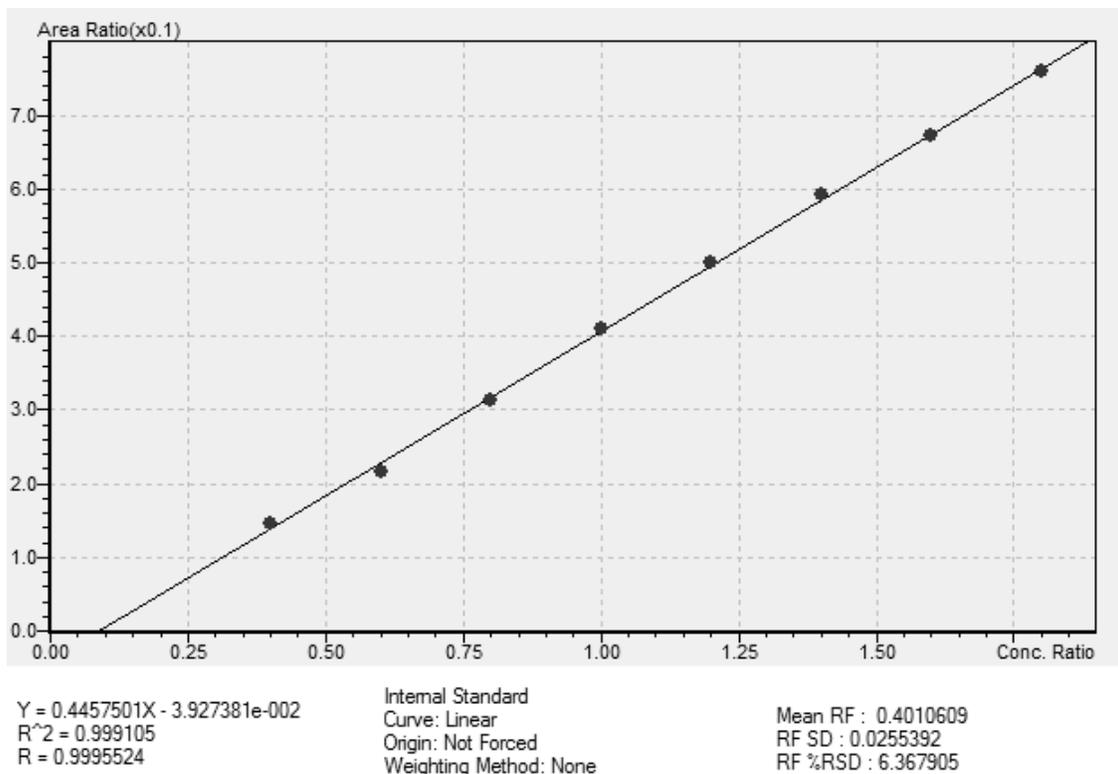
Tabla 6. Características de la curva de calibración de la Cafeína.

| Level | Conc. Rati | Conc. | Mean Area | SD | %RSD |
|-------|------------|---------|-----------|-----------|----------|
| 1 | 0.400000 | 100.000 | 0.1456735 | 0.0090771 | 6.231105 |
| 2 | 0.600000 | 150.000 | 0.2169827 | 0.0030862 | 1.422331 |
| 3 | 0.800000 | 200.000 | 0.3134531 | 0.0033967 | 1.083642 |
| 4 | 1.000000 | 250.000 | 0.4102719 | 0.0068079 | 1.659352 |
| 5 | 1.200000 | 300.000 | 0.4996708 | 0.0079569 | 1.592419 |
| 6 | 1.400000 | 350.000 | 0.5923393 | 0.0062713 | 1.058738 |
| 7 | 1.600000 | 400.000 | 0.6714805 | 0.0125382 | 1.867242 |
| 8 | 1.800000 | 450.000 | 0.7585385 | 0.0251024 | 3.309309 |

SD: Desviación Estándar

%RSD: porcentaje de desviación estándar relativa

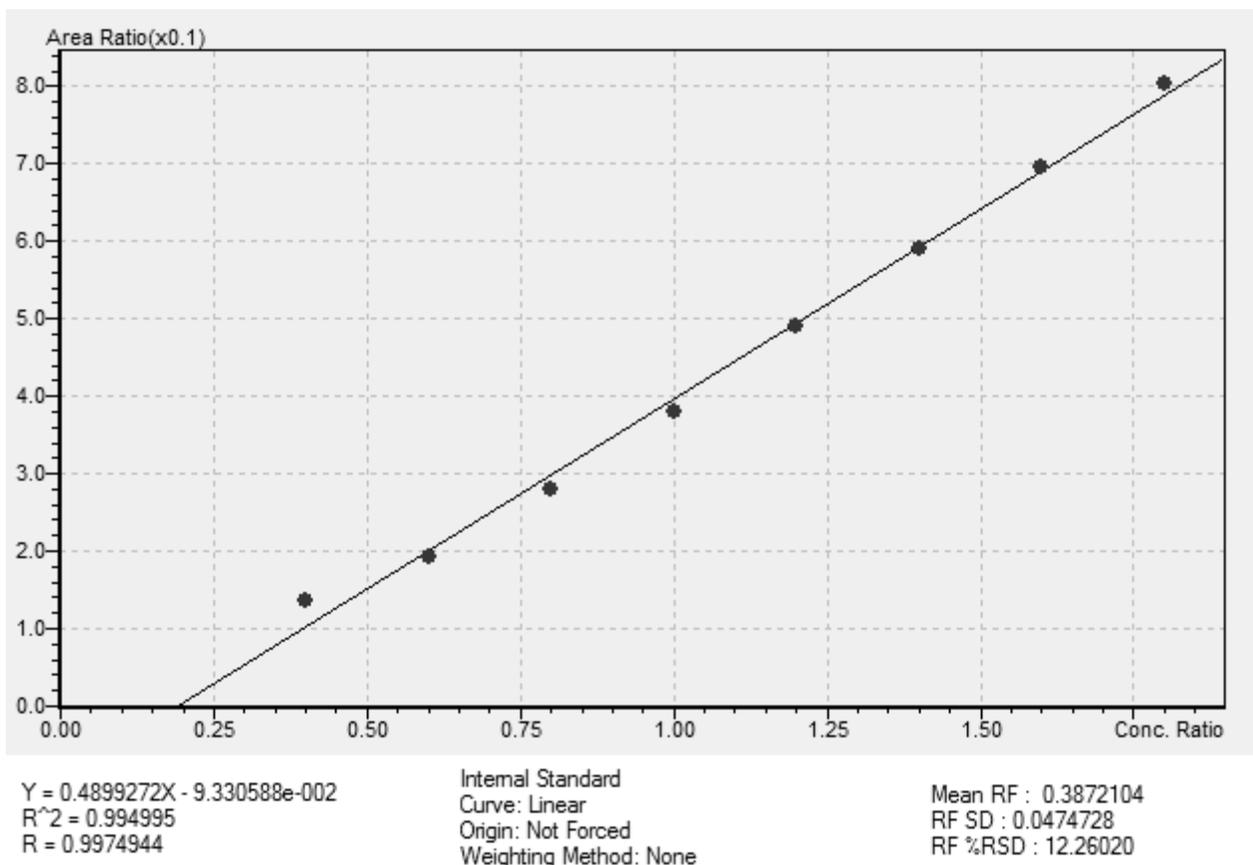
Figura 23. Curva de calibración Cafeína.



Se puede ver que los valores de R^2 y de desviación estándar de la curva de calibración son bastante buenos ya que el índice de correlación es muy cercano a 1 (ver tabla 6), apoyando la hipótesis de la linealidad y dando como resultado una curva de calibración lineal.

3.2.2.2 Fenacetina. La siguiente curva de calibración se realizó de la misma forma que la cafeína, 8 niveles de concentración que van desde 100 ppm aumentando cada nivel 50 ppm hasta 450 ppm, inyectando al equipo diez (10) veces cada nivel de concentración. De la misma forma que en la cafeína, la curva de calibración correspondiente a la fenacetina se realizó por el método de estándar interno, adicionando una cantidad constante de tetracosano, que en este caso es 250 ppm, luego el equipo realiza una división entre el área del pico correspondiente a la fenacetina y el área del pico del tetracosano. Teniendo en cuenta lo anterior se obtuvo la siguiente gráfica por parte del equipo. (Ver figura 24)

Figura 24. Curva de calibración Fenacetina.



Para ver más características de la curva de calibración, se recurre a la tabla proporcionada por el equipo donde se pueden encontrar las áreas y las desviaciones estándar. (Ver tabla 7)

Tabla 7. Características de la curva de calibración de la Fenacetina.

| Level | Conc. Rati | Conc. | Mean Area | SD | %RSD |
|-------|------------|---------|-----------|-----------|----------|
| 1 | 0.400000 | 100.000 | 0.1351078 | 0.0200464 | 14.83733 |
| 2 | 0.600000 | 150.000 | 0.1922600 | 0.0054604 | 2.840126 |
| 3 | 0.800000 | 200.000 | 0.2792563 | 0.0097141 | 3.478567 |
| 4 | 1.000000 | 250.000 | 0.3789792 | 0.0051390 | 1.356017 |
| 5 | 1.200000 | 300.000 | 0.4908537 | 0.0163808 | 3.337200 |
| 6 | 1.400000 | 350.000 | 0.5914398 | 0.0130763 | 2.210922 |
| 7 | 1.600000 | 400.000 | 0.6948525 | 0.0133366 | 1.919341 |
| 8 | 1.800000 | 450.000 | 0.8021635 | 0.0336029 | 4.189035 |

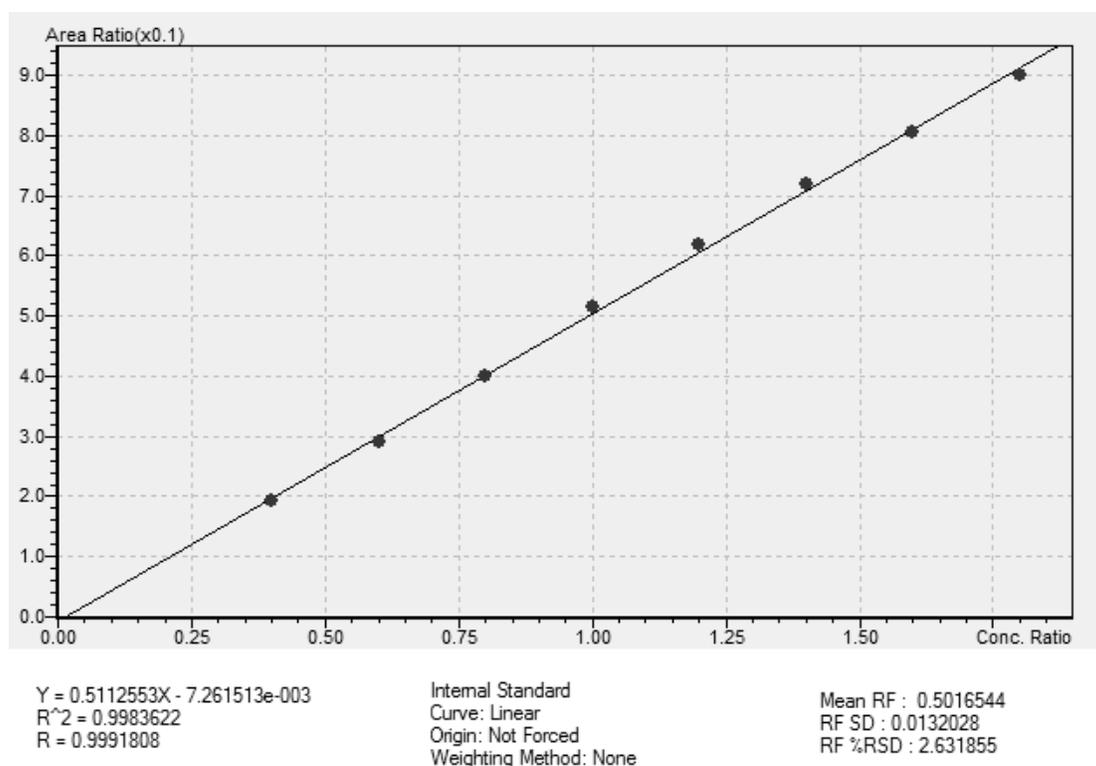
SD: Desviación Estándar

%RSD: porcentaje de desviación estándar relativa

Al igual que en la cafeína, la fenacetina presenta un buen índice de correlación (ver tabla 5), lo que implica una buena linealidad del sistema, las desviaciones estándar de las concentraciones son relativamente buenas y cabe recordar que las áreas de las respuestas en las concentraciones son divididas por el área del tetracosano obtenida en ese cromatograma.

3.2.2.3 Cocaína. Al igual que en los dos literales anteriores, la curva de calibración para la cocaína se realizó, preparando una solución madre de 500 ppm, luego realizando diluciones aisladas mas no consecutivas se prepararon soluciones desde 100 ppm, aumentando cada vez 50 ppm, hasta 450 ppm; posteriormente cada una de ellas se llevó al cromatógrafo, analizándolas diez (10) veces cada una. Así pues se obtuvo el siguiente gráfico. (ver figura 25)

Figura 25. Curva de calibración Cocaína.



Finalmente, se extrajo la tabla proporcionada por el equipo para una mejor visualización y entendimiento de la curva de calibración, la cual se presenta a continuación (tabla 8)

Tabla 8. Características de la curva de calibración de la Cocaína.

| Level | Conc. Rati | Conc. | Mean Area | SD | %RSD |
|-------|------------|---------|-----------|-----------|----------|
| 1 | 0.400000 | 100.000 | 0.1351078 | 0.0200464 | 14.83733 |
| 2 | 0.600000 | 150.000 | 0.1922600 | 0.0054604 | 2.840126 |
| 3 | 0.800000 | 200.000 | 0.2792563 | 0.0097141 | 3.478567 |
| 4 | 1.000000 | 250.000 | 0.3789792 | 0.0051390 | 1.356017 |
| 5 | 1.200000 | 300.000 | 0.4908537 | 0.0163808 | 3.337200 |
| 6 | 1.400000 | 350.000 | 0.5914398 | 0.0130763 | 2.210922 |
| 7 | 1.600000 | 400.000 | 0.6948525 | 0.0133366 | 1.919341 |
| 8 | 1.800000 | 450.000 | 0.8021635 | 0.0336029 | 4.189035 |

Donde

SD: Desviación Estándar

%RSD: porcentaje de desviación estándar relativa

Como se puede observar en la tabla se ve que la desviación estándar de las concentraciones es bastante baja lo que hace que sean menos dispersas y más confiables, de la misma forma como se observó en las curvas de calibración anteriores, el índice de correlación R^2 es bastante alto, al acercarse a la unidad se puede deducir que es una curva de calibración lineal.

3.2.2.4 Contraste con un indicador estadístico (t) de student. La aplicación de la prueba demuestra que la diferencia entre los puntos experimentales y los puntos de la líneas rectas son mucho más pequeñas de lo que convencionalmente se acepta como diferencias aceptables para este tipo de análisis,

Para determinar éste indicador se debe trabajar con dos hipótesis: H_0 , hipótesis nula (Se asume que la correlación es cero; es decir, no existe relación entre las variables) y H_1 , hipótesis alterna (Se asume que existe correlación entre las variables).

Para el desarrollo del test se calcula t_r con $n-2$ grados de libertad para un nivel de confianza del 98% (probabilidad $p=0,02$) siendo n el número de niveles de concentración analizados (en este caso $n=8$) y se compara con el valor $t_{\text{crítico}}$ que corresponde al t tabulado. Los valores de t se presentan en el anexo 7

Esto se realiza para cada compuesto, y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Para un nivel de confianza del 98%; $n= 8-2 =6$ grados de libertad, se tiene: $t_{\text{crítico}} = 3,14$

Ahora, si $t_r > t_{\text{crítico}}$ se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 9. Resultados del test student

| Analitos | R | r^2 | t_r | $t_{\text{crítico}}$ | H_0 | Correlación lineal |
|------------|-----------|----------|----------|----------------------|-----------|--------------------|
| Cafeina | 0.9995524 | 0.999105 | 81,84076 | 3,14 | Rechazada | Significativa |
| Fenacetina | 0.9974944 | 0.994995 | 34,53695 | 3,14 | Rechazada | Significativa |
| Cocaina | 0.9991808 | 0.998362 | 60,47317 | 3,14 | Rechazada | Significativa |

3.2.3 Límite de detección (LD). [6, 35, 37] Según el documento IUPAC “*harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*”, el límite de detección se define como la cantidad de muestra que se puede diferenciar del cero, en este y muchos textos sugiere que el límite de detección debe ser calculado con la siguiente ecuación

$$LD = 3 * S_r$$

LD: Limite de Detección
 S_r : Señal del ruido.

Así pues, siguiendo el parámetro anterior se tiene lo siguiente.

3.2.3.1 Cafeína. Usando la señal de fondo entregada por el equipo, se debe multiplicar por 250 ppm que es la concentración de tetracosano, puesto que para realizar todos los cálculos, la concentración de tetracosano se ve involucrada en ello, por eso se tiene lo siguiente,

$$S_r = 0.00255$$

$$LD = 3 * S_r * 250 \text{ ppm}$$

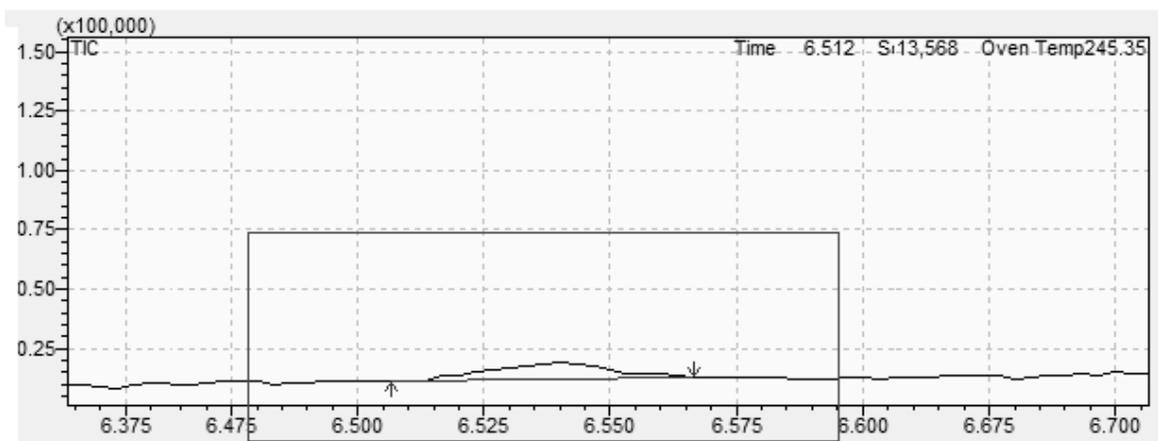
$$LD = 3 * 0.001888 * 250 \text{ ppm}$$

$$LD = 0.005664 * 250 \text{ ppm}$$

$$LD = 0.47 \text{ ppm}$$

Se obtiene finalmente un límite de detección para la cafeína. A continuación se presenta el cromatograma correspondiente al ensayo de verificación. (Ver figura 26).

Figura 26. Cromatograma limite de detección cafeína.



3.2.3.2 Fenacetina. De la misma forma que para la cafeína, la fenacetina obtiene el mismo procedimiento, obteniéndose una señal para el ruido de fondo y posteriormente calculando el límite de detección para la fenacetina.

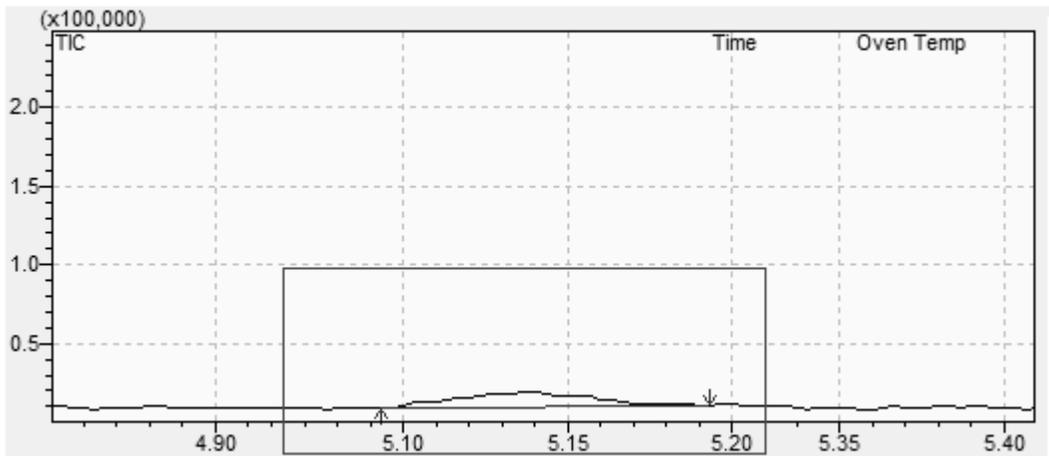
$$S_r = 0.003816$$

$$\begin{aligned} LD &= 3 * S_r * 250 \text{ ppm} \\ LD &= 3 * 0.003816 * 250 \text{ ppm} \\ LD &= 0.01144 * 250 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$LD = 0.95 \text{ ppm}$$

Al igual que la cafeína, se presenta el cromatograma de la fenacetina en su límite de detección. (Ver figura 27)

Figura 27. Cromatograma limite de detección fenacetina.



3.2.3.3 Cocaína. Finalmente y de la misma forma se determino el límite de detección para la cocaína, debido a que es un método rápido y efectivo para hallar los valores.

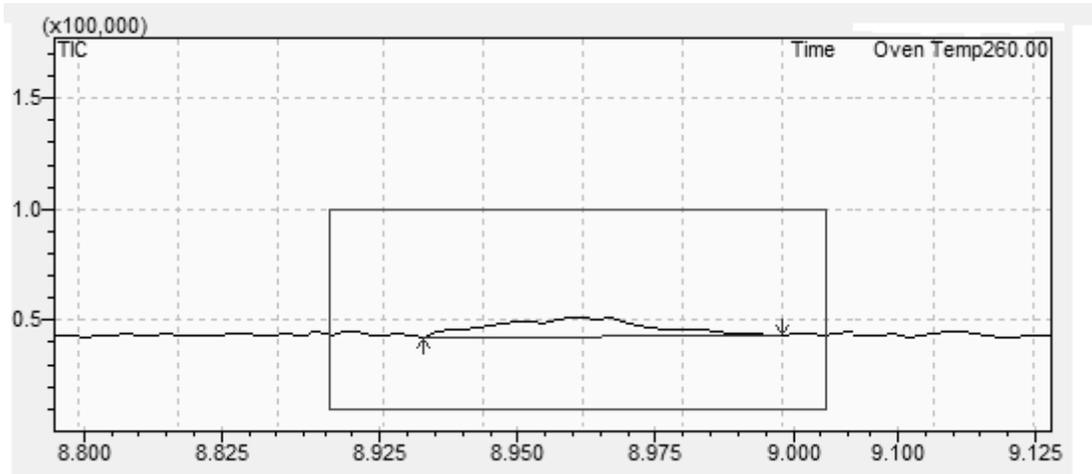
$$S_r = 0.00232$$

$$\begin{aligned} LD &= 3 * S_r * 250 \text{ ppm} \\ LD &= 3 * 0.00232 * 250 \text{ ppm} \\ LD &= 0.00696 * 250 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$LD = 0.58 \text{ ppm}$$

Al igual que en los anteriores, se realizaron ensayos para determinar el límite de detección de la cocaína, se obtuvo el siguiente cromatograma (figura 26).

Figura 28. Limite de detección Cocaína.



Para observar mejor los resultados, se presenta en la tabla 10 que contiene los límites de cuantificación de los analitos

Tabla 10. Limites de detección del método

| Analito | Limite de detección (ppm) |
|------------|---------------------------|
| Cafeína | 0.47 |
| Fenacetina | 0.95 |
| Cocaína | 0.58 |

3.2.4 Limite de cuantificación (LC). ^[37] El límite de cuantificación se define gráficamente como el intercepto de la recta de regresión lineal de la curva de calibración con el eje de las concentraciones, siempre y cuando la recta no sea forzada a cero ni sea un valor negativo ya que por ser un método lineal puede ocurrir, sin embargo, lo mínimo que se podría cuantificar es ese valor.

3.2.4.1 Cafeína. Recordando la curva de calibración se tienen los siguientes datos.

$$Y = 0.4457501X - 3.927381e-002$$
$$R^2 = 0.999105$$
$$R = 0.9995524$$

Según la regresión lineal, la formula global es:

$$Y = mX + b$$

Teniendo en cuenta que:

m = pendiente

b= intercepto

Se le da el valor del intercepto:

$$B = 0.0392$$

Luego, se reitera que, la concentración es una fracción entre la concentración encontrada y 250 ppm que es la concentración del tetracosano. Así pues se tiene el límite de Cuantificación

$$LC = 0.0392$$

$$LC = 0.0392 * 250 \text{ ppm}$$

$$LC = 9.8 \text{ ppm}$$

3.2.4.2 Fenacetina. Para la fenacetina se tienen los siguientes datos de la curva de calibración.

$$Y = 0.4899272X - 9.330588e-002$$
$$R^2 = 0.994995$$
$$R = 0.9974944$$

Según la regresión lineal, la formula global es:

$$Y = mX + b$$

Teniendo en cuenta que:

m = pendiente

b= intercepto

Se le da el valor del intercepto:

$$B = 0.0933$$

Luego, se reitera que, la concentración es una fracción entre la concentración encontrada y 250 ppm que es la concentración del tetracosano. Así pues se tiene el límite de Cuantificación

$$LC = 0.0933$$

$$LC = 0.0933 * 250 \text{ ppm}$$

$$LC = 23.3 \text{ ppm}$$

3.2.4.3 Cocaína. Para la cocaína se tienen los siguientes datos de la curva de calibración.

$$Y = 0.5112553X - 7.261513e-003$$

$$R^2 = 0.9983622$$

$$R = 0.9991808$$

Según la regresión lineal, la formula global es:

$$Y = mX + b$$

Teniendo en cuenta que:

m = pendiente

b= intercepto

Se le da el valor del intercepto:

$$B = 0.00726$$

Luego, se reitera que, la concentración es una fracción entre la concentración encontrada y 250 ppm que es la concentración del tetracosano. Así pues se tiene el límite de Cuantificación

$$LC = 0.00726$$

$$LC = 0.00726 * 250 \text{ ppm}$$

$$LC = 1.8 \text{ ppm}$$

Finalmente para tener una visión global de los resultados obtenidos para el límite de cuantificación se muestra la tabla 11

Tabla 11. Límites de cuantificación del método

| Analito | Límite de cuantificación (ppm) |
|----------------|---------------------------------------|
| Cafeína | 9.8 |
| Fenacetina | 23.3 |
| Cocaína | 1.8 |

Detallando un poco los resultados anteriores y contrastándolos con los resultados del límite de cuantificación, se puede observar que efectivamente el límite de detección es menor que el límite de cuantificación. Además, como se observó anteriormente en las gráficas de linealidad, el límite de cuantificación de la fenacetina debería ser alto ya que la fenacetina no se puede cuantificar por debajo de las 10 ppm.

3.2.5 Precisión. ^[35] La precisión se define como la dispersión de datos entre sí independiente de los valores reales de concentración. En otras palabras la precisión es la capacidad del método de dar valores similares para una misma concentración.

Tabla 12. Datos de la curva de calibración Cafeína.

| $[\text{A}]^*$ | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 | 1,2 | 1,4 | 1,6 | 1,8 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0,16858 | 0,21834 | 0,31713 | 0,40027 | 0,49919 | 0,59878 | 0,67376 | 0,72244 |
| | 0,15143 | 0,21663 | 0,31123 | 0,41451 | 0,4852 | 0,59061 | 0,64646 | 0,75084 |
| | 0,14883 | 0,21294 | 0,31437 | 0,4034 | 0,50581 | 0,58794 | 0,68119 | 0,73124 |
| | 0,13967 | 0,21611 | 0,31629 | 0,41293 | 0,51156 | 0,59041 | 0,67659 | 0,77732 |
| | 0,1445 | 0,21328 | 0,313 | 0,41839 | 0,48992 | 0,60147 | 0,66148 | 0,75644 |
| | 0,14233 | 0,22235 | 0,31005 | 0,40289 | 0,50328 | 0,59302 | 0,68531 | 0,7786 |
| | 0,13999 | 0,22123 | 0,30694 | 0,40517 | 0,50589 | 0,5842 | 0,66618 | 0,79809 |
| | 0,14204 | 0,2174 | 0,31278 | 0,41067 | 0,50292 | 0,5861 | 0,68909 | 0,7563 |
| | 0,14165 | 0,21698 | 0,31483 | 0,4179 | 0,49521 | 0,60168 | 0,66759 | 0,73894 |
| | 0,13771 | 0,21456 | 0,31791 | 0,4166 | 0,49772 | 0,58917 | 0,66716 | 0,78517 |
| \bar{X} | 0,14567 | 0,21698 | 0,31345 | 0,41027 | 0,49967 | 0,59234 | 0,67148 | 0,75954 |
| σ | 0,00908 | 0,00309 | 0,0034 | 0,00681 | 0,00796 | 0,00627 | 0,01254 | 0,02476 |

$[\text{A}]^*$: Área del pico / área del tetracosano

\bar{X} : Media de los datos

σ : Desviación estándar.

Como se puede observar en la tabla 12 en las desviaciones estándar, son lo bastante bajas; lo que quiere decir que los datos son muy precisos entre sí. A continuación se muestran los datos de la curva de calibración de la fenacetina.

Tabla 13. Datos de la curva de calibración Fenacetina.

| $[\]^*$ | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 | 1,2 | 1,4 | 1,6 | 1,8 |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0,18088 | 0,20059 | 0,29758 | 0,37616 | 0,47950 | 0,59141 | 0,68703 | 0,74440 |
| | 0,15484 | 0,19385 | 0,27767 | 0,38866 | 0,46944 | 0,58570 | 0,70548 | 0,77832 |
| | 0,14399 | 0,19584 | 0,28719 | 0,37085 | 0,49670 | 0,57580 | 0,70055 | 0,77838 |
| | 0,12827 | 0,19771 | 0,26948 | 0,38555 | 0,52872 | 0,59690 | 0,70070 | 0,80009 |
| | 0,13108 | 0,19166 | 0,28125 | 0,37884 | 0,48877 | 0,60119 | 0,68163 | 0,78774 |
| | 0,13049 | 0,19107 | 0,29099 | 0,38015 | 0,50082 | 0,58005 | 0,71560 | 0,82572 |
| | 0,12660 | 0,19421 | 0,27145 | 0,38066 | 0,49193 | 0,57887 | 0,70080 | 0,83074 |
| | 0,12349 | 0,18442 | 0,27270 | 0,37699 | 0,48603 | 0,58330 | 0,70079 | 0,80546 |
| | 0,11349 | 0,18320 | 0,27375 | 0,37644 | 0,49100 | 0,60559 | 0,68552 | 0,80466 |
| | 0,11796 | 0,19006 | 0,27050 | 0,37550 | 0,47563 | 0,61558 | 0,67042 | 0,86613 |
| \bar{X} | 0,13511 | 0,19226 | 0,27926 | 0,37898 | 0,49085 | 0,59144 | 0,69485 | 0,80216 |
| σ | 0,02005 | 0,00546 | 0,00971 | 0,00514 | 0,01638 | 0,01308 | 0,01334 | 0,03360 |

$[\]^*$: Área del pico / área del tetracosano

\bar{X} : Media de los datos

σ : Desviación estándar.

Al igual que la Cafeína, los datos de la curva de calibración de la fenacetina tienen desviaciones estándar pequeñas (ver tabla 13), lo que indica una coincidencia en los datos y una precisión.

Finalmente se presenta la tabla correspondiente a los datos de la curva de calibración de la cocaína (tabla 14).

Tabla 14. Datos de la curva de calibración Fenacetina.

| $[\]^*$ | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 | 1,2 | 1,4 | 1,6 | 1,8 |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0,20306 | 0,28693 | 0,40117 | 0,52596 | 0,62310 | 0,72957 | 0,81083 | 0,87151 |
| | 0,18483 | 0,28186 | 0,40672 | 0,51872 | 0,61466 | 0,73477 | 0,79124 | 0,89869 |
| | 0,19020 | 0,28519 | 0,40846 | 0,52079 | 0,62733 | 0,73241 | 0,81187 | 0,87849 |
| | 0,19645 | 0,32047 | 0,39752 | 0,50966 | 0,61263 | 0,72178 | 0,81524 | 0,92596 |
| | 0,18666 | 0,28586 | 0,39065 | 0,51454 | 0,61002 | 0,72322 | 0,78096 | 0,92585 |
| | 0,21976 | 0,28877 | 0,40380 | 0,51053 | 0,61535 | 0,72431 | 0,81979 | 0,92089 |
| | 0,18787 | 0,28268 | 0,39422 | 0,50151 | 0,62007 | 0,71139 | 0,80931 | 0,93767 |
| | 0,19212 | 0,28736 | 0,40087 | 0,51310 | 0,61233 | 0,70155 | 0,82147 | 0,86041 |
| | 0,18456 | 0,27922 | 0,39670 | 0,51731 | 0,62509 | 0,72704 | 0,78032 | 0,90385 |
| | 0,18862 | 0,29555 | 0,40112 | 0,50311 | 0,62139 | 0,69961 | 0,81645 | 0,87068 |
| \bar{X} | 0,19341 | 0,28939 | 0,40012 | 0,51352 | 0,61820 | 0,72057 | 0,80575 | 0,89940 |
| σ | 0,01085 | 0,01178 | 0,00550 | 0,00765 | 0,00598 | 0,01235 | 0,01562 | 0,02771 |

$[\]^*$: Área del pico / área del tetracosano

\bar{X} : Media de los datos

σ : Desviación estándar.

Finalmente se puede observar que todas las desviaciones estándar son lo suficientemente pequeñas como para deducir que la curva de calibración es precisa.

3.2.6 Precisión intermedia. La precisión intermedia se define como la capacidad del método analítico de generar una respuesta errada ante cambios pequeños pero significativos en el método y analistas como tal o en quienes lo ejecutan ^[35,46]. Para este caso se realizaron dos ensayos pequeños, variando el volumen de inyección, la fecha y variando el analista. Para realizar el ensayo, se inyectó una de las muestras usadas en el ensayo de exactitud, para este caso se usó el ensayo número 2 de la exactitud. El volumen de inyección cambió de 1 uL a 1,5 uL y estos fueron los resultados

A: 12 de septiembre de 2010 (Andrés Felipe Ramírez – Analista 1)

B: 22 de septiembre de 2010 (María F. Medina – Analista 2)

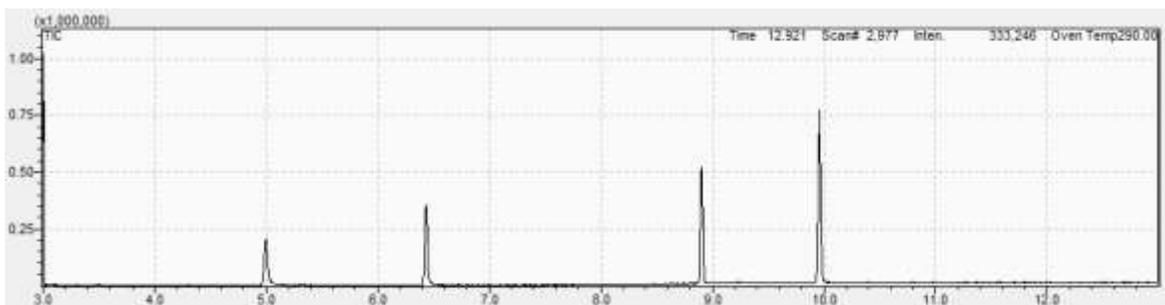
Tabla 15. Ensayo de precisión intermedia

| Analito | Masa (mg) | Volumen (L) | [*] real (ppm) | [*] ensayo 1 uL (ppm) ^A | [*] ensayo 1,5 uL (ppm) ^B | % error |
|------------|-----------|-------------|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------|
| Cafeína | 1,55 | 0,005 | 310 | 311 | 313 | 0,53 |
| Fenacetina | 1,22 | 0,005 | 244 | 242 | 246 | 0,68 |
| Cocaína | 1,57 | 0,005 | 314 | 315 | 318 | 1,16 |

Como se puede observar en la tabla 15, al variar el volumen de inyección varia la concentración del analito, sin embargo, es insignificante el cambio, cabe resaltar que el ensayo fue resultado del análisis de otro operario del equipo GC-MS QP 2010 plus y con una diferencia de 10 días calendario (12 de septiembre de 2010 y 22 de septiembre de 2010).

3.2.7 Exactitud. ^[35] Para este parámetro se realizó una solución que contiene los tres (3) analitos, cafeína, fenacetina y cocaína, posteriormente se hicieron tres (3) inyecciones y se obtuvieron los respectivos cromatogramas. A continuación se presenta la tabla de las concentraciones que se prepararon para la inyección, y los cromatogramas correspondientes a los tres (3) análisis.

Figura 29. (A) Cromatograma del ensayo 1, (B) Cromatograma del ensayo 2 (C) Cromatograma del ensayo 3



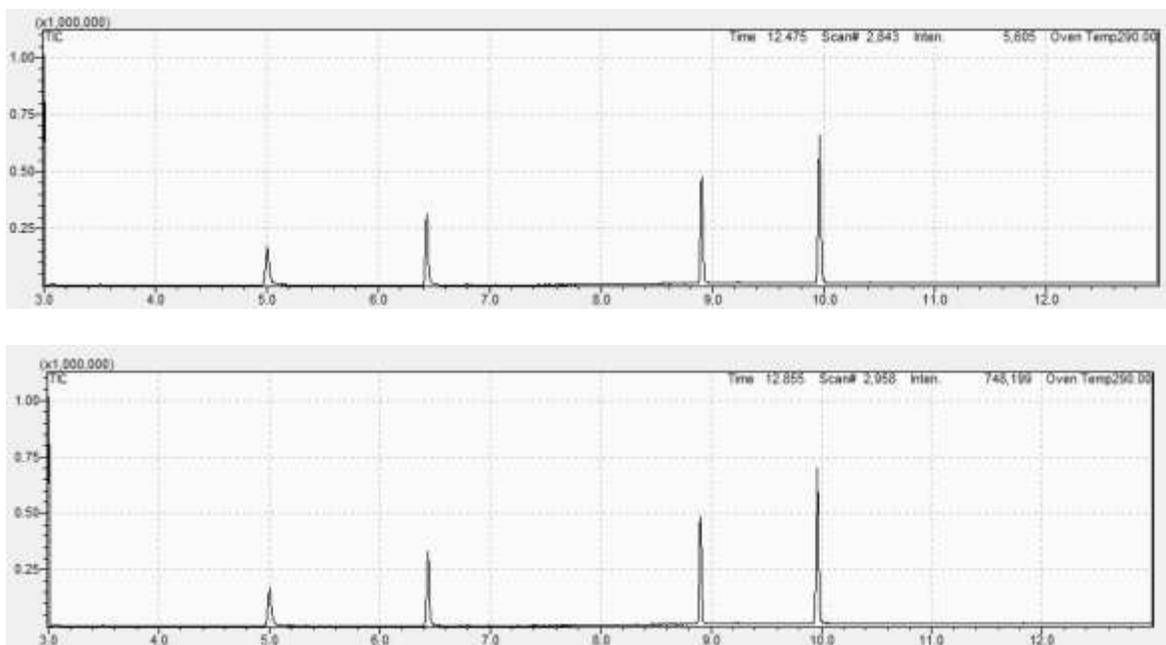


Tabla 16. Porcentajes de error.

| Analito | Masa (mg) | Volumen (L) | [*] real (ppm) | [*]1 (ppm) | [*] 2 (ppm) | [*] 3 (ppm) | % error |
|------------|-----------|-------------|----------------|------------|-------------|-------------|---------|
| Cafeína | 1,55 | 0,005 | 310 | 312 | 314 | 309 | 0,53 |
| Fenacetina | 1,22 | 0,005 | 244 | 236 | 245 | 256 | 0,68 |
| Cocaína | 1,57 | 0,005 | 314 | 308 | 318 | 305 | 1,16 |

[*] : Concentración del ensayo numero o concentración

% error: Media de los porcentajes de erro entre las concentraciones de los ensayos y la concentración real de la muestra.

Los porcentajes de error son lo suficientemente pequeños para decir que el método genera resultados exactos (ver tabla 16).

3.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Una parte del objetivo general del trabajo es el de encontrar cuales son los principales adulterantes presentes en la cocaína incautada en el eje cafetero, posterior a ello se desea cuantificar y hallar los porcentajes de pureza que tienen. Para ello se realizaron análisis previos a la validación del método, puesto que para realizar una validación se requiere primero tener conocimiento de la matriz y así generar curvas de calibración apropiadas para hacer una cuantificación precisa y exacta.

3.3.1 Resultados previos a la estandarización. Antes de realizar la correspondiente validación del método, se realizó el análisis a aproximadamente 286 muestras, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de química del Cuerpo Técnico de investigación de la Fiscalía General de la Nación. Desafortunadamente a estas muestras no se les podía realizar una cuantificación ya que el método no era válido y aun no estaba consolidado como tal. Debido a eso, se les aplico solo un análisis cualitativo, lo que dio como resultado los principales adulterantes presentes en la cocaína incautada en el eje cafetero que se podrían observar durante el análisis por parte del equipo. A continuación se muestra una tabla con la cantidad de muestras, por región y un total para ver la cantidad de muestras que contienen los respectivos analitos o una mezcla de las dos. (Ver tablas 17, 18 y 19)

Tabla 17. Resultados por muestras Caldas

| Caldas | | | |
|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| FENACETINA | CAFEÍNA | FENACETINA Y CAFEÍNA | TOTAL MUESTRAS |
| 2 | 92 | 18 | 112 |

Tabla 18. Resultados por muestras Quindío

| Quindío | | | |
|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| FENACETINA | CAFEÍNA | FENACETINA Y CAFEÍNA | TOTAL MUESTRAS |
| 12 | 76 | 24 | 112 |

Tabla 19. Resultados por muestras Risaralda

| Risaralda | | | |
|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| FENACETINA | CAFEÍNA | FENACETINA Y CAFEÍNA | TOTAL MUESTRAS |
| 34 | 22 | 6 | 62 |

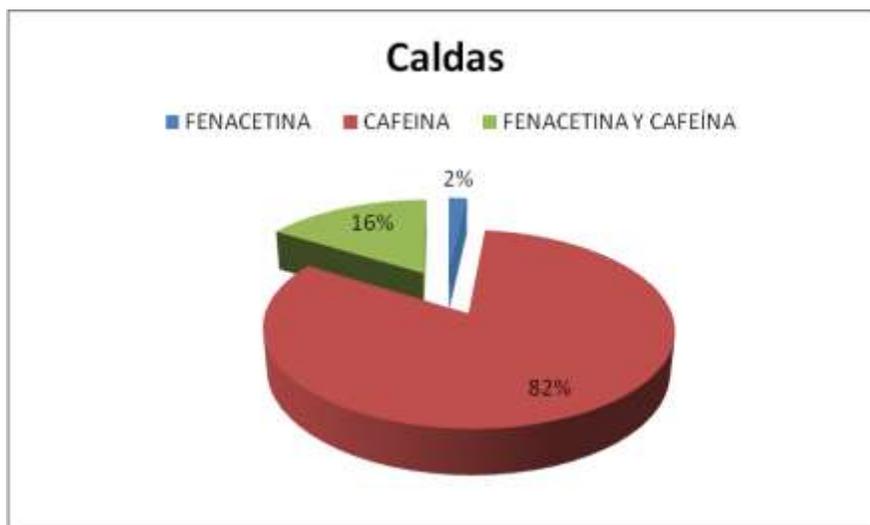
Finalmente se obtienen los totales de todas las tablas anteriores.

Tabla 20. Resultados por muestras Totales

| TOTAL | | | |
|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| FENACETINA | CAFEÍNA | FENACETINA Y CAFEÍNA | TOTAL MUESTRAS |
| 48 | 190 | 48 | 286 |

En las tablas se muestra la cantidad de resultados que contienen fenacetina, cafeína y una combinación de los dos, también se puede observar (ver tablas 17, 18, 19), las personas que elaboran dichas sustancias ilegales, tienden a utilizar más la cafeína en Caldas y Quindío, caso contrario en Risaralda que es más usada la Fenacetina, pero en ninguno de los tres departamentos prevalece el uso combinado de las dos sustancias. Para ver un poco mejor los resultados se proceden a realizar las gráficas correspondientes a cada una de las tablas.

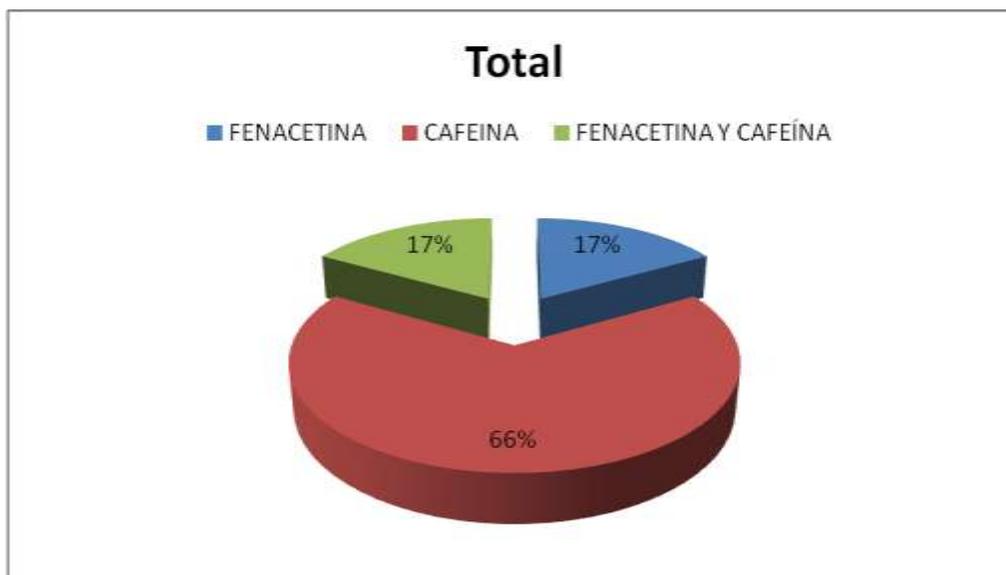
Figura 32. Diagramas tipo pastel de la tabla 17, tabla 18 y tabla 19, departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda





Para finalizar se realiza la gráfica correspondiente a los totales, las muestras que contenían solo cafeína, solo fenacetina y las que contienen una combinación de ambas independiente de la concentración de cada una y de la pureza de cada uno.

Figura 33. Diagrama tipo pastel de los totales.



Al manejarse un total de las muestras, se observa (ver figura 33) que la cantidad de fenacetina individual y fenacetina combinada con cafeína son iguales (en porcentaje) quizá debido a que la fenacetina genera vaso constricción causando una sensación de euforia, muy similar a la causada por la cocaína. Estos dos adulterantes se usan debido a que son medicamentos (en el caso de la fenacetina) y alcaloides (en el caso de la cafeína) que no son controlados ni regulados por la ley.

3.3.2 Resultados finales. Luego de que el método está estandarizado, debido a su estandarización por medio de la ostentación de los parámetros mínimos para esto, finalmente se pueden cuantificar las muestras y dar un porcentaje de pureza de la cocaína utilizada, para ello, se analizaron muestras provenientes de los 3 departamentos, de los últimos tres meses del año 2010. se presenta una tabla con los datos relacionados, los nombres de las muestras no se muestran por confidencialidad. (ver anexo 6)

Para tener una mejor visualización de los resultados, se tienen las siguientes gráficas.

Figura 34. Coincidencias en las purezas, Cafeína.

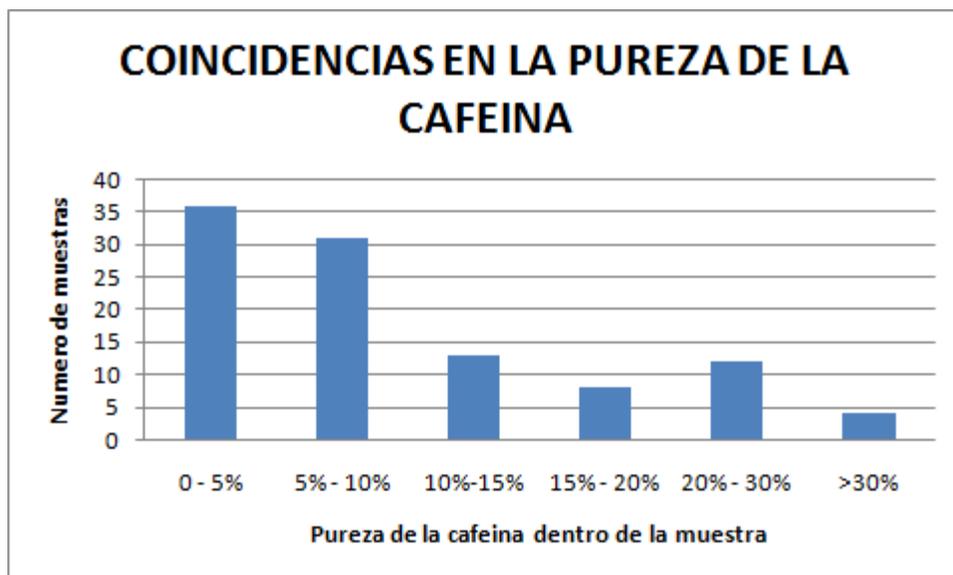
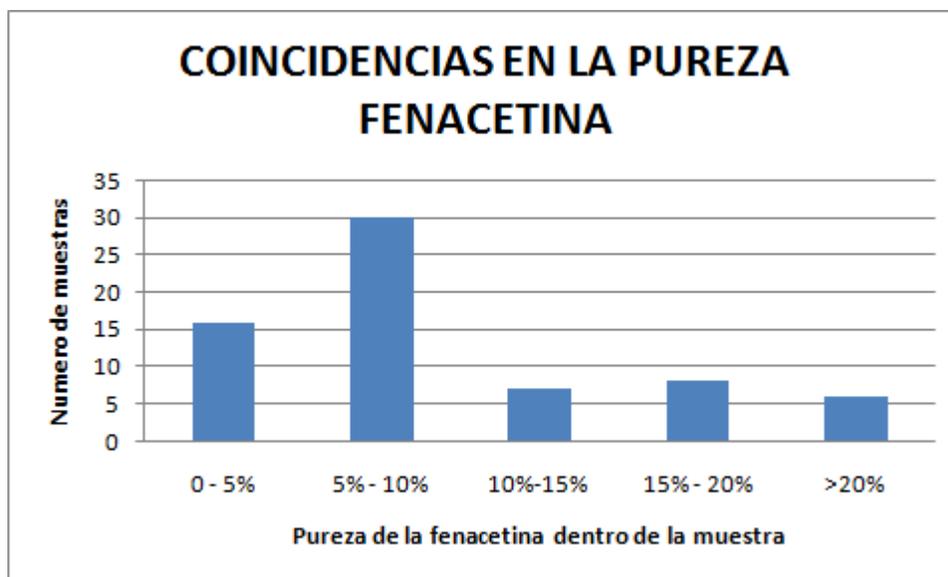


Figura 35. Coincidencias de pureza, Fenacetina.



Como se puede observar claramente (ver figura 34), la mayoría de las concentraciones están aproximadamente entre 0,1% y 15%, lo que indica que la cafeína es usada en una concentración muy pobre,

aproximadamente una decima parte de la droga incautada. Ahora veamos la gráfica proveniente de las coincidencias de la pureza de la fenacetina.

La concentración de la fenacetina (ver figura 35) en las muestras es baja, debido a que se debe preparar soluciones bastante concentradas para que la concentración se pueda ver en la curva de calibración. Al igual que en la cafeína, la Fenacetina tiene una pureza por debajo del 10%.

Finalmente se tiene la gráfica de la cocaína (figura 36).

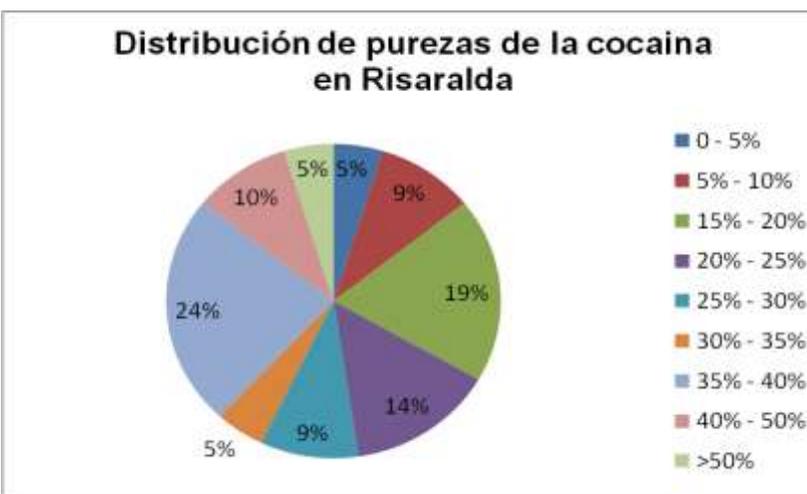
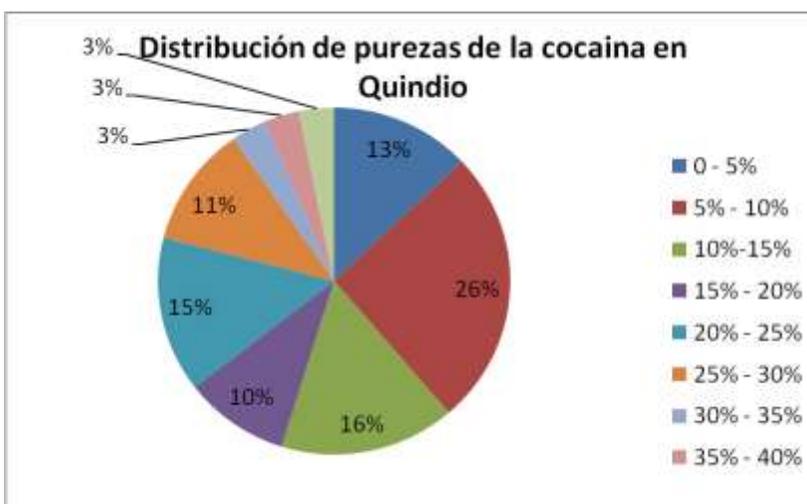
Figura 36. Coincidencias en la pureza, Cocaína.



En este caso (ver figura 36), la cocaína está un poco mas distribuida, pero no en concentraciones que superen el 30%, aunque algunas lo hacen, aproximadamente el 86% de las muestras está por debajo del 30% de pureza. Esto nos lleva a concluir y a pensar que es necesario realizar más estudios sobre esta cocaína y así dar con una congruencia mayor.

Para finalizar el análisis sobre la cocaína, se presentan a continuación, una distribución por departamentos, del porcentaje de cocaína usado en cada uno de ellos, dependiendo de la procedencia de la muestra.

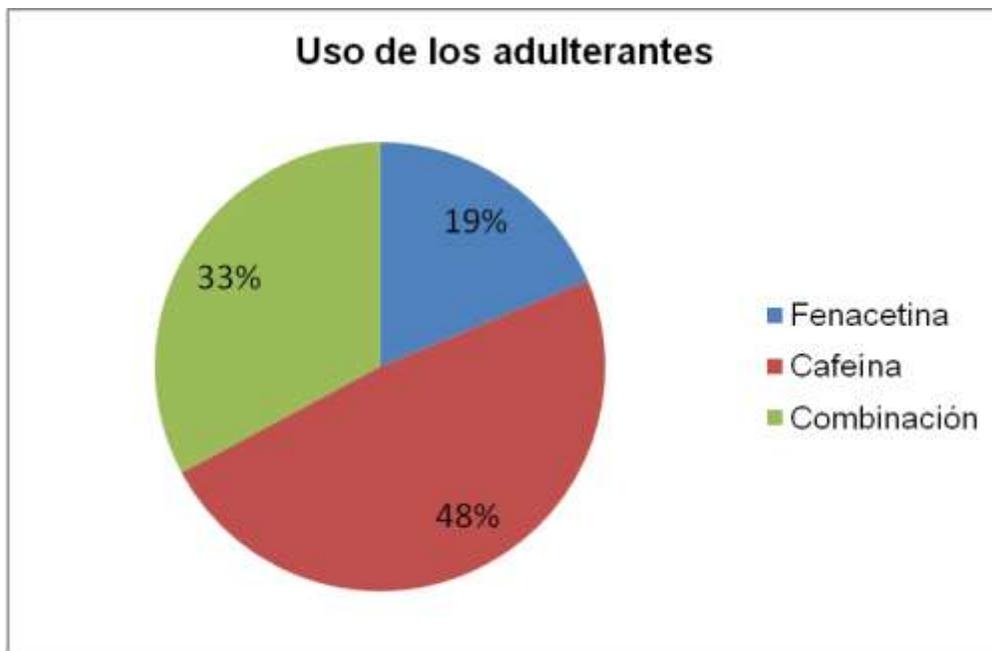
Figura 37. Distribución de la cocaína en cada departamento.



Posterior al análisis de cocaína, a continuación se muestra un análisis correspondiente a los adulterantes encontrados.

3.3.3 Análisis de Adulterantes. Para finalizar, se realizaron análisis correspondientes a los adulterantes, ya que ellos son el centro del trabajo. Para empezar, se tiene un grafico (grafico 37) donde se ve el uso de los adulterantes, ya sean solos o una combinación de ambos.

Figura 38. Uso de los adulterantes en el eje cafetero

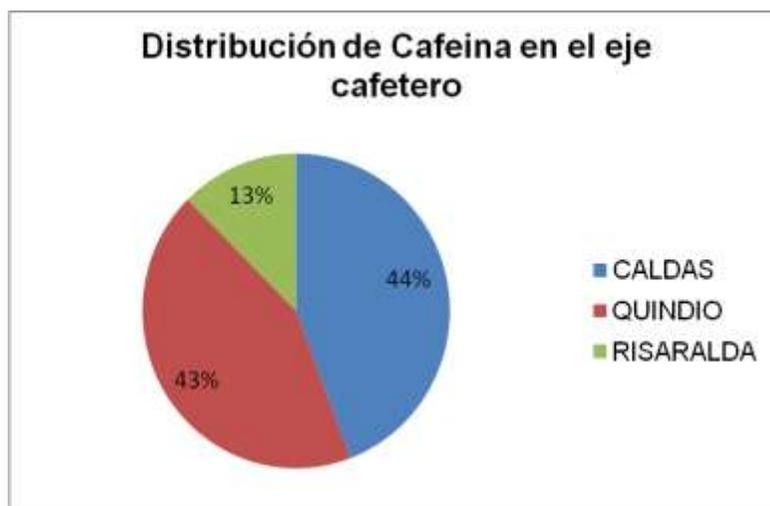


Como se puede observar en el grafico anterior, en las muestras analizadas, se encuentra que la que presenta el mayor uso discriminando de cual departamento sea, es la cafeína, sin embargo un gran porcentaje de las muestras proporciona una visión de que la combinación de ambos adulterantes es usada considerablemente.

Luego de esto se analizó adulterante por adulterante y finalmente se encontraron los siguientes resultados para cada adulterante

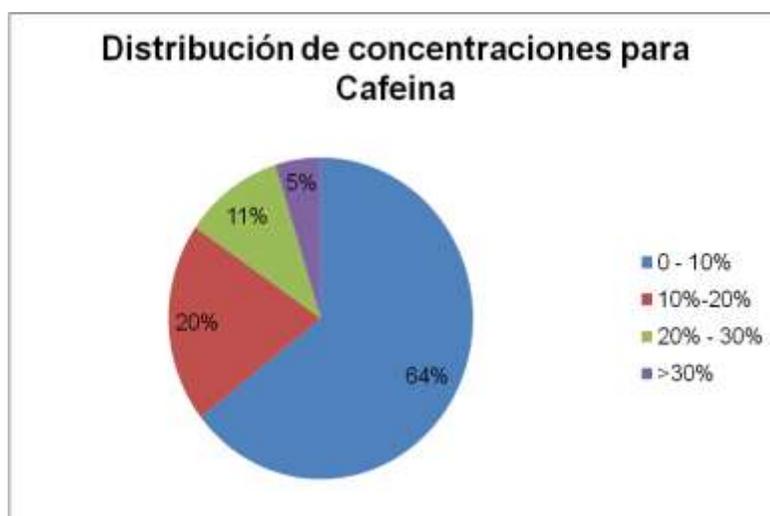
3.3.3.1 Cafeína. Para la distribución de la cafeína en el eje cafetero se encontró el siguiente grafico

Figura 39. Distribución de la Cafeína en el eje cafetero.



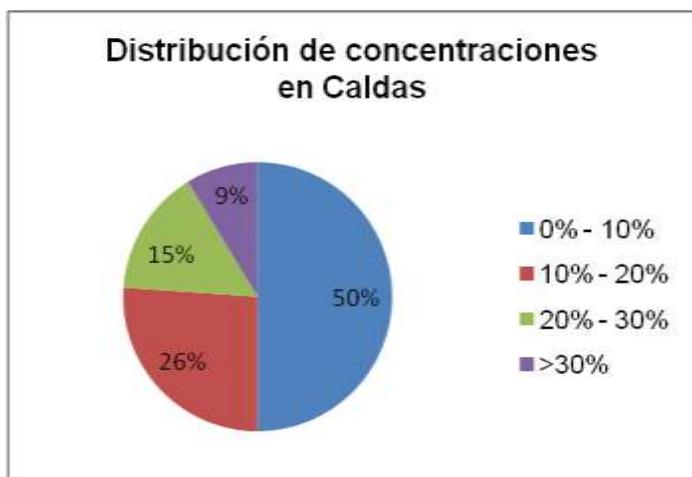
El porcentaje de cafeína en las muestras se observa a continuación, indiferente a cada departamento.

Figura 40. Distribución de concentraciones en el eje cafetero

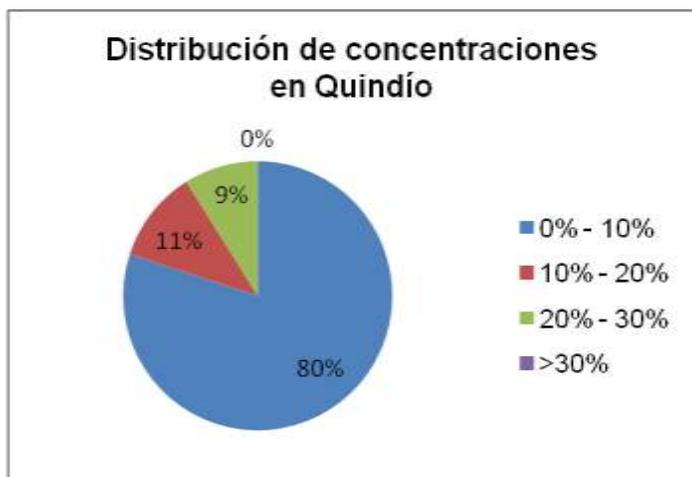


Ahora, para tener una combinacion de ambos se realizaron los gráficos correspondientes, los cuales se pueden ver a continuación.

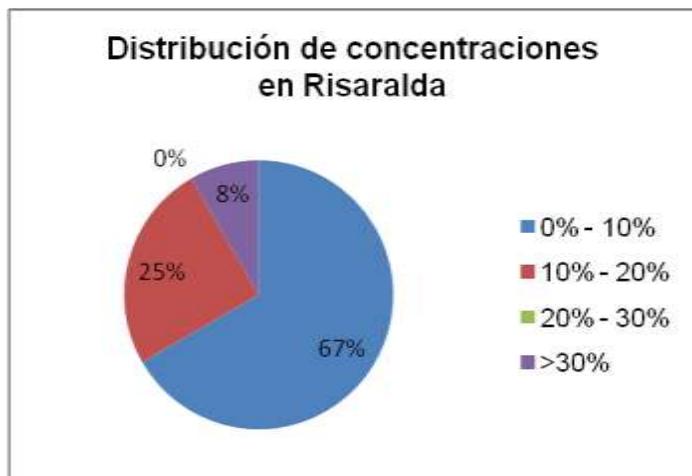
Figura 41. Grafico de la distribución de las concentraciones en (a) caldas (b) Quindío y (c) Risaralda



(a)



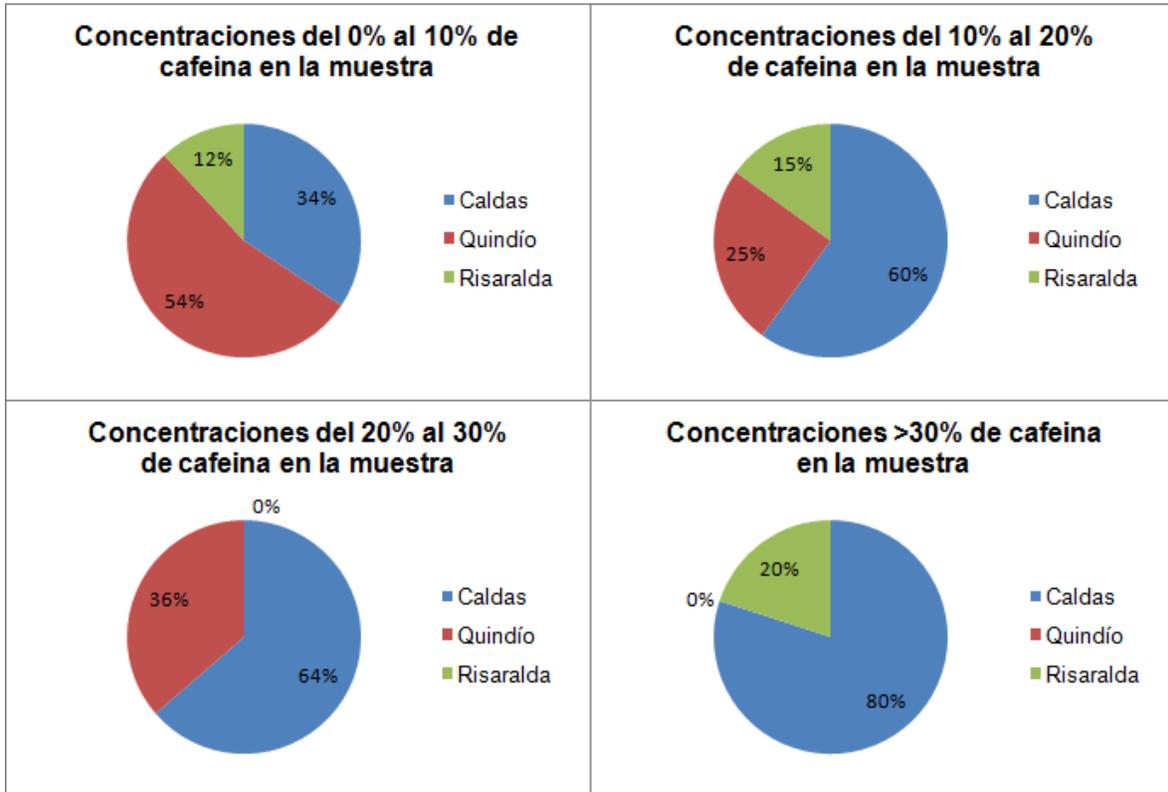
(b)



(c)

Para tener otra perspectiva de los resultados por departamento, se ve ahora en que porcentaje se usa cada concentración de cafeina en las diferentes muestras analizadas en el trabajo, provenientes de los diferentes departamentos.

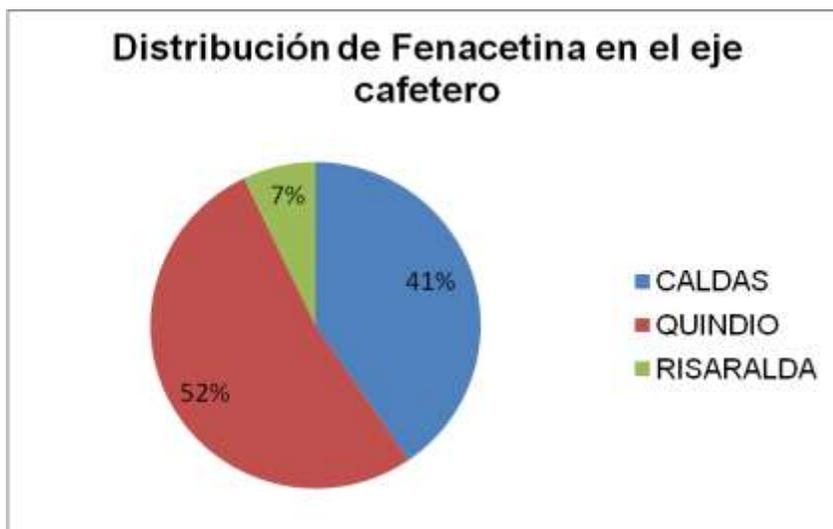
Figura 42. Distribución de las concentraciones en los departamentos.



Así pues se observa el uso de la cafeina como adulterante de la cocaína que se distribuye en el eje cafetero, observándose un porcentaje elevado en el departamento de caldas.

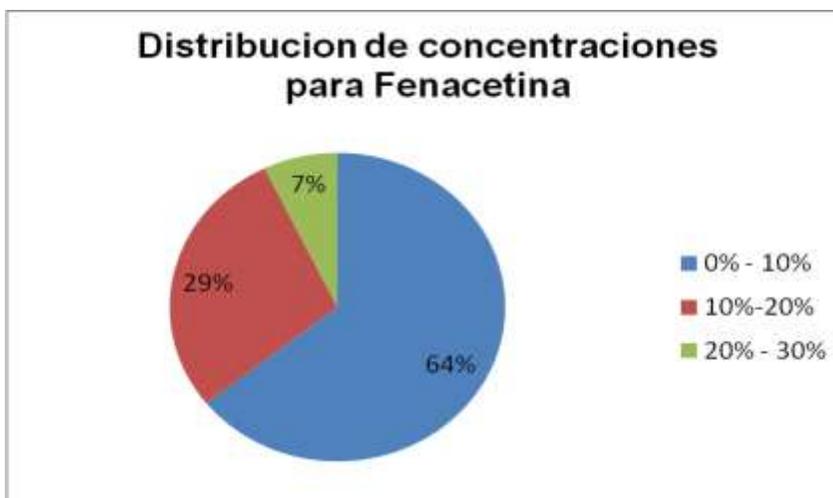
3.3.3.2 Fenacetina Para la distribución de la fenacetina en el eje cafetero se encontró el siguiente gráfico

Figura 43. Distribución de la fenacetina en el eje cafetero.



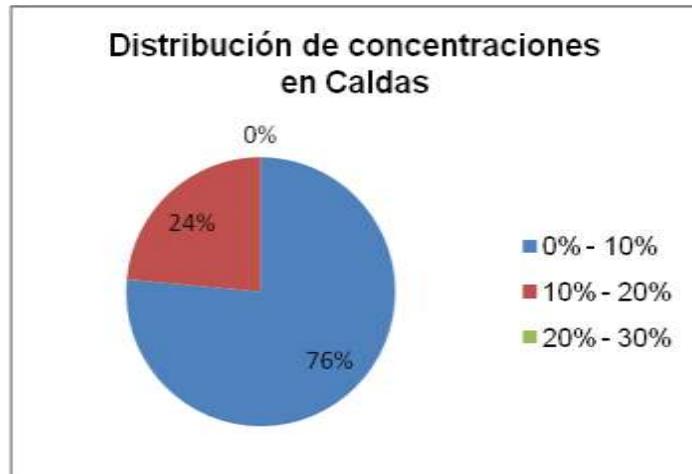
El porcentaje de fenacetina en las muestras se observa a continuación, indiferente a cada departamento.

Figura 44. Distribución de concentraciones en el eje cafetero

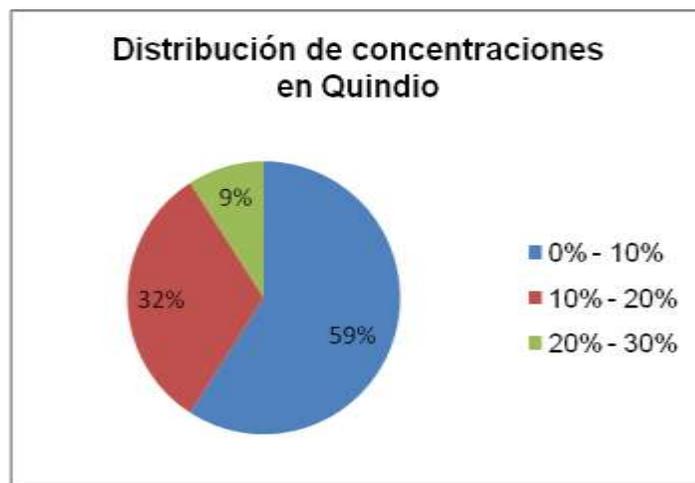


Ahora, para tener una combinación de ambos se realizaron los gráficos correspondientes, los cuales se pueden ver a continuación.

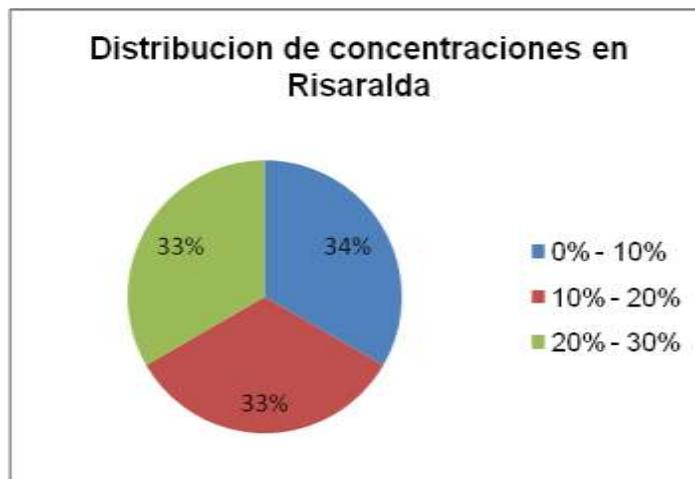
Figura 45. Grafico de la distribución de las concentraciones en (a) caldas (b) Quindío y (c) Risaralda



(a)



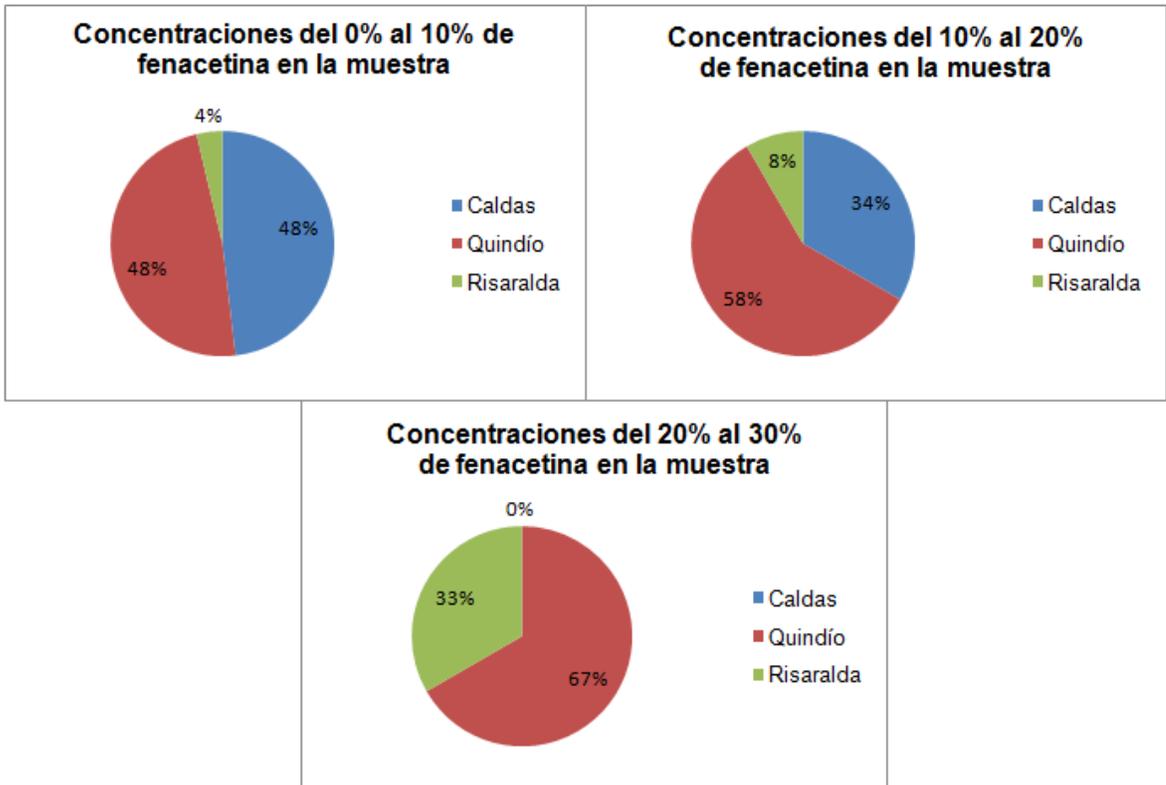
(b)



(c)

Para tener otra perspectiva de los resultados por departamento, se ve ahora en que porcentaje se usa cada concentración de fenacetina en las diferentes muestras analizadas en el trabajo, provenientes de los diferentes departamentos.

Figura 46. Distribución de las concentraciones en los departamentos.



Así pues se observa el uso de la fenacetina como adulterante de la cocaína que se distribuye en el eje cafetero, observándose un porcentaje de uso elevado en el departamento de del Quindío..

4 CONCLUSIONES

1. Se concluye que el método es preciso y exacto, puesto que las desviaciones estándar y los errores en las concentraciones, son lo suficientemente bajos para decir esto. Los errores para la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas deben ser menores al 5% (ya que son muchos los parámetros que se deben controlar y otros que no se pueden controlar) y los del método no superan el 2%
2. Los resultados previos a la validación demostraron que la fenacetina y cafeína son los adulterantes principales detectados por el método, sin embargo, no son los únicos utilizados, a pesar de eso no fueron detectados en el método ya que exigía que fuera un análisis rápido y efectivo para la cocaína.
3. Las proporciones que usan para preparar la cocaína en el eje cafetero son muy similares entre sí, lo que indica una posible procedencia similar para cada grupo de muestras.
4. Mediante las curvas de calibración se pudo concluir que el límite del rango de linealidad esta en 450 ppm ya que después de esta concentración, la curva comienza a volverse constante, porque se satura la columna y el detector. Además de ello, se observó que los índices de correlación y los datos obtenidos a partir de ellas son coherentes con el método y el equipo.
5. Se realizo el test t-student para n-2 grados de libertad y un porcentaje de confianza del 98%, dando como resultado una correlación significativa entre los datos, rechazando la hipótesis nula y se demuestra que existe una correlación.

6. Los valores de límite de detección y límite de cuantificación fueron calculados con éxito y se presentan a continuación.

Tabla 21. Límites de detección y cuantificación del método

| Analito | Límite de detección (ppm) | Límite de cuantificación (ppm) |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Cafeína | 0.47 | 9.8 |
| Fenacetina | 0.95 | 23.3 |
| Cocaína | 0.58 | 1.8 |

El límite de cuantificación para la Fenacetina es alto porque, como se observó en los análisis de linealidad, las bajas concentraciones eran lo suficientemente dispersas para ser un gráfico de primer o segundo orden.

7. Se puede concluir que los adulterantes se usan en los tres departamentos, solos o una combinación de ambos, sin embargo el uso de la cafeína predomina en el departamento de caldas en concentraciones superiores al 10%
8. En general para el departamento del Quindío, donde la fenacetina es el adulterante predominante, se detecta el uso de la fenacetina en concentraciones inferiores al 30%.

5 RECOMENDACIONES

1. Guardar copias de seguridad de los análisis, puesto que por problemas ajenos a la tesis, fue necesario repetir análisis y parte del escrito.
2. Para determinar una rampa de temperatura y un modo de inyección, no se deben realizar por separado, ya que se complementan entre sí. Como se observó en el escrito para hallar el modo de inyección adecuado, necesitó la ayuda de todas las rampas de temperatura, puesto que se pensó que cambiando el modo de inyección aparecería el tetracosano
3. La continuación del trabajo, debe realizarse por parte de la entidad judicial implicada en el trabajo, debido a que es responsabilidad darle continuidad al proyecto, ya sea realizando la validación del método o usando los resultados presentados en este, para la realización de procedimientos judiciales.
4. Se recomienda una evaluación de los parámetros relacionados con la robustez y con la incertidumbre para hacer que el método estandarizado en el trabajo, sea completamente validado. Para el ensayo de robustez se recomienda un estudio previo de los equipos a usar, columnas y analistas ya que el método debe ser robusto y no generar cambios significativos a la hora de cambiar de equipo y demás parámetros
5. También se recomienda demás estudios estadísticos para una posterior perfilación de los adulterantes.
6. El análisis de las muestras reales se realizó durante determinado lapso de tiempo, se recomienda verificar variaciones en los adulterantes, y el porcentaje de uso en las muestras incautadas ya que cabe la posibilidad de un cambio de concentraciones o de adulterantes.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] "Drug that spans the ages: The history of cocaine". London: The Independent (UK). 2006.
- [2] Fattore L, Piras G, Corda MG, Giorgi O (2009). "The Roman high- and low-avoidance rat lines differ in the acquisition, maintenance, extinction, and reinstatement of intravenous cocaine self-administration". *Neuropsychopharmacology* 34 (5): 1091–101
- [3] Artículo 2. Ley 30 de 1986. Estatuto nacional de estupefacientes. 1991. Colombia.
- [4] Valente-Campos, S. Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic science international*. (2004).
- [5] Martin Smith, R. *The Mass Spectrum of Cocaine: Deuterium Labeling and MS/MS Studies*. US Department of justice. New York.
- [6] Rios Rodríguez, A. Validacion de un metodo por cromatografia de gases - masas para la cuantificacion de estupefacientes en muestras de droga incautada. Universidad Nacional de Colombia. 2004
- [7] Russell J. Lewis, R.D. Johnson. Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. (2004)
- [8] S. Locicero, P. Hayoz, P. Esseiva. Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method. *Forensic Science International*. 167 (2007).
- [9] Código de procedimiento penal, ley 906 de 2004.
- [10] Aggrawal, Anil. *Narcotic Drugs*. National Book Trust, India (1995).
- [11] Yang Y, Ke Q, Cai J, Xiao YF, Morgan JP (2001). "Evidence for cocaine and methylecgonidine stimulation of M(2) muscarinic receptors in cultured human embryonic lung cells". *Br. J. Pharmacol.* 132.
- [12] THE MERCK INDEX. MERCK S.A. 13th Edition. 2006

- [13] Escohotado, Antonio; Ken Symington. A Brief History of Drugs: From the Stone Age to the Stoned Age. (1999)
- [15] Brodie BB & Axelrod J (1948). J. Pharmacol. Exp. Ther. 94
- [16] Villar D, Buck WB, Gonzalez JM (1998). "Ibuprofen, aspirin and acetaminophen toxicosis and treatment in dogs and cats"
- [18] Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (1998).
- [19] Sigma-Aldrich web page. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/> - visitada 03 de enero de 2011
- [20] While library. GC-MS Solutions's software complement.
- [21] Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S. Kriz, Randall G. Engel (2006). Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.).
- [22] Skoog, D. Principios de Analisis instrumental. 8a Edicion. 2000
- [23] Harris, Daniel C. (1999), "24. Gas Chromatography", Quantitative chemical analysis (Fifth ed.), W. H. Freeman and Company,
- [24] Sparkman, O. David (2000). Mass spectrometry desk reference. Pittsburgh: Global View Pub
- [25] KM Downard (2007). "William Aston - the man behind the mass spectrograph". European Journal of Mass Spectrometry
- [26] Siri, William (1947). "Mass spectroscopy for analysis in the low-mass range". Review of Scientific Instruments 18
- [27] H. B. Niemann, S. K. Atreya, S. J. Bauer, "The abundances of constituents of Titan's atmosphere from the GCMS instrument on the Huygens probe".(2005)
- [28] Giannelli, Paul C. and Imwinkelried, Edward J. (1999). Drug Identification: Gas Chromatography. In Scientific Evidence 2
- [29] Gohlke, R. S. (1959). "Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography". Analytical Chemistry.
- [30] Gohlke, R; McLafferty, Fred W. (1993). "Early gas chromatography/mass spectrometry". Journal of the American Society for Mass Spectrometry

- [31] Optimizing the Analysis of Volatile Organic Compounds - Technical Guide" Restek Corporation, Lit.
- [32] MILENA PÉREZ, GLORIA RAMÍREZ. Validación del método analítico para la determinación de valsartán en plasma humano por HPLC/UV con adición de estándar empleando losartán como estándar interno. Colombia Médica.Vol. 38 N° 1, 2007.
- [33] Sys Stybe Johansen, Helle Merete Bhatia. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography b. 2007
- [34] Fernández Serret, A. Aguilera Cabrera Y. Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe rev. Cubana Farm (2002)
- [35] MICHAEL THOMPSON, STEPHEN L. R. ELLISON. HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS. IUPAC Publications. 2002
- [36] ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 2006
- [37] Lopez, JP. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metil esteres de acidos. Universidad Tecnologica de Pereira. 2008
- [38] ACROS-Organics web page. <http://www.acros.be/> - visitada 03 de enero de 2011
- [39] Merck web page. <http://www.merck.com.co/> visitada 03 de enero de 2011
- [40] BRAND web page. <http://www.namebrandglass.com/> visitada 03 de enero de 2011
- [41] KERN web page. <http://www.kern-sohn.com/es/index.html> visitada 03 de enero de 2011
- [42] Shimadzu web page. <http://www.ssi.shimadzu.com/> visitada 03 de enero de 2011

[43] Norma Técnica Colombiana NTC 1486. Presentación de tesis y otros trabajos de investigación. Icontec.(2008)

[44] Manual para uso de los Laboratorios Nacionales de Estupefacientes - Métodos recomendados para el ensayo de cocaína, heroína y morfina - Naciones Unidas Nueva York (1986).

[45] World Drug Report 2007. United Nations Organization.

[46] MALTOVSKA K. HAJŠLOVA S. LEHOTAY S. Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in food crops. 2004.

[47] *Association of official Analytical Chemists*. Official Methods of analysis. Washington, D.C, 2256 – 2258. 1990

[48] Smith, F. Handbook of forensic drug analysis. Pg 235. 2005

7 ANEXOS

Los anexos presentados a continuación son los correspondientes a los mencionados durante el trabajo.

A1. Certificado de pureza de la cocaína.

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

| | |
|-------------------|---|
| Product Name | Cocaine hydrochloride |
| Product Number | C5776 |
| Product Brand | SIGMA |
| CAS Number | 53-21-4 |
| Molecular Formula | C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ · HCl |
| Molecular Weight | 339.81 |

| TEST | SPECIFICATION | LOT 036k1662 RESULTS |
|-------------------------------------|--|--------------------------------------|
| APPEARANCE | WHITE POWDER | CONFORMS |
| SOLUBILITY | CLEAR COLORLESS SOLUTION AT 50 MG/ML IN WATER | CONFORMS |
| IR SPECTRUM | CONSISTENT WITH STRUCTURE | CONFORMS |
| CARBON | 58.9 TO 61.2% | 60.2% |
| NITROGEN | 3.8 TO 4.4% | 4.0% |
| SPECIFIC ROTATION | -71 TO -73 DEG (C= 2 IN WATER AT 25 DEG CENTIGRADE | -71 DEG * |
| PURITY BY PERCHLORIC ACID TITRATION | NLT 99% | 99.3% * |
| PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY | MINIMUM 97.5% | 99% |
| QC RELEASE DATE | | * SUPPLIER INFORMATION APRIL 2006 |



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

A2. Certificado de pureza del tetracosano.



Product 13804
Tetracosane,99%

General Product Data

Version 2
CAS No. 646-31-1
Molecular weight 338.65
Molecular formula C₂₄H₅₀
Linear formula CH₃(CH₂)
22CH₃
Flash point (°C) >110

Product Specifications

| | |
|-----------------------|--------------------|
| Appearance | WHITE SHINY FLAKES |
| Infrared spectrometry | AUTHENTIC |
| Melting point | 49°C to 52°C |
| Separat. techn. GC | >=98.5 % |

Acros Organics

Geel West Zone 2, Janssen Pharmaceuticaaan 3a, B-2440 Geel, Belgium
Tel +32 14/57.52.11 - Fax +32 14/59.34.34 Internet: <http://www.acros.com>
1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410, USA
Fax 201-796-1329

A2.5. Certificado de pureza del etanol



Specification

1.00988.9180 Ethanol absolute suitable for use as excipient
EMPROVE® exp Ph Eur,BP,JP,USP

| | Spec. Values | |
|--|---------------|------|
| Assay | | |
| m/m | ≥ 99.2 | % |
| V/V | ≥ 99.5 | % |
| Identity (IR) | conforms | |
| Appearance | conforms | |
| Clarity of solution | conforms | |
| Colour of solution | conforms | |
| Acidity or alkalinity | < 30 ppm | |
| Density | | |
| d 20 °C/20 °C | 0.790 - 0.793 | |
| d 15,56 °C/15,56 °C | ≤ 0.7962 | |
| d 15 °C/15 °C | 0.794 - 0.797 | |
| Absorbance | | |
| at 240 nm | ≤ 0.40 | |
| between 250nm and 260nm | ≤ 0.30 | |
| between 270nm and 340nm | ≤ 0.10 | |
| The absorption curve is smooth | conforms | |
| Volatiles impurities (GC) | | |
| Acetaldehyde and Acetal | ≤ 10 | ppm |
| Benzene | ≤ 2 | ppm |
| Methanol | ≤ 100 | ppm |
| Total of other impurities | ≤ 300 | ppm |
| disregard limit | ≤ 9 | ppm |
| Residual solvents (Ph. Eur./USP/ICH) class 3 | < 0.5 % | |
| residue on evaporation | ≤ 25 | mg/l |

Specification

1.00988.9180 Ethanol absolute suitable for use as excipient
EMPROVE® exp Ph Eur,BP,JP,USP

Other residual solvents (Ph Eur/USP/ICH) included by production process:

*Residues of metal catalysts or metal reagents acc. to EMEA/CHMP/SWP/4446/2000
are not likely to be present.*

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

A3. Certificado de calibración de la balanza.

| ORDEN DE SERVICIO IMPROTEC LTDA | | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------|----------|
| EMPRESA: <i>Fiscalía General de la Nación</i> | CLASE SERVICIO: <i>MTO.</i> | EJECUCION # <i>23031</i> | |
| DIRECCION: | MODELO EQUIPO: <i>AH-100-0-AH</i> | TECNICO: <i>Nelson S</i> | |
| TELEFONO: | SERIE: <i>W1080319</i> | CAPACIDAD: <i>100</i> | <i>g</i> |
| CIUDAD: | No. INVENTARIO: <i>F.I.G. 6</i> | Div. Escala d: <i>0.0000</i> | <i>g</i> |
| FECHA: <i>7 de mayo 2010-27-03</i> | UBICACIÓN: <i>Lab. Clince</i> | Escala Ver. e: <i>0.0001</i> | <i>g</i> |
| SOLICITADO POR: | DESCRIPCION | H.I.: | H.F.: |

TRABAJO REALIZADO: *Limpieza, ajuste y verificación con Tetal
Tambien el equipo asegurando bien según
pruebas realizadas*

OBSERVACIONES:

ESTIMADO CLIENTE: VERIFIQUE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO.
CUALQUIER INQUIETUD FAVOR COMUNICARLA INMEDIATAMENTE A NUESTRO REPRESENTANTE.
VERIFICACIÓN EFECTUADA CON PESAS CERTIFICADAS RED DE METROLOGIA.

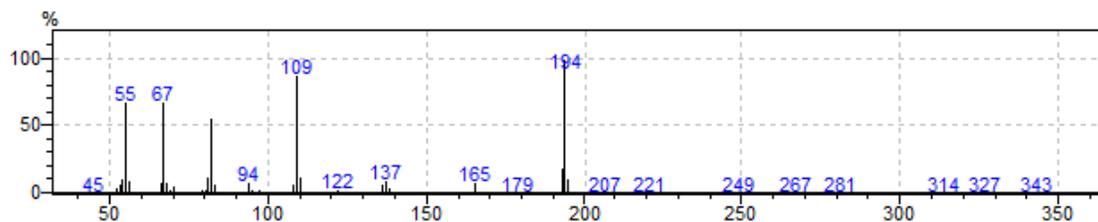
FIRMA ENCARGADO

Nelson S. S.M.
FIRMA TECNICO

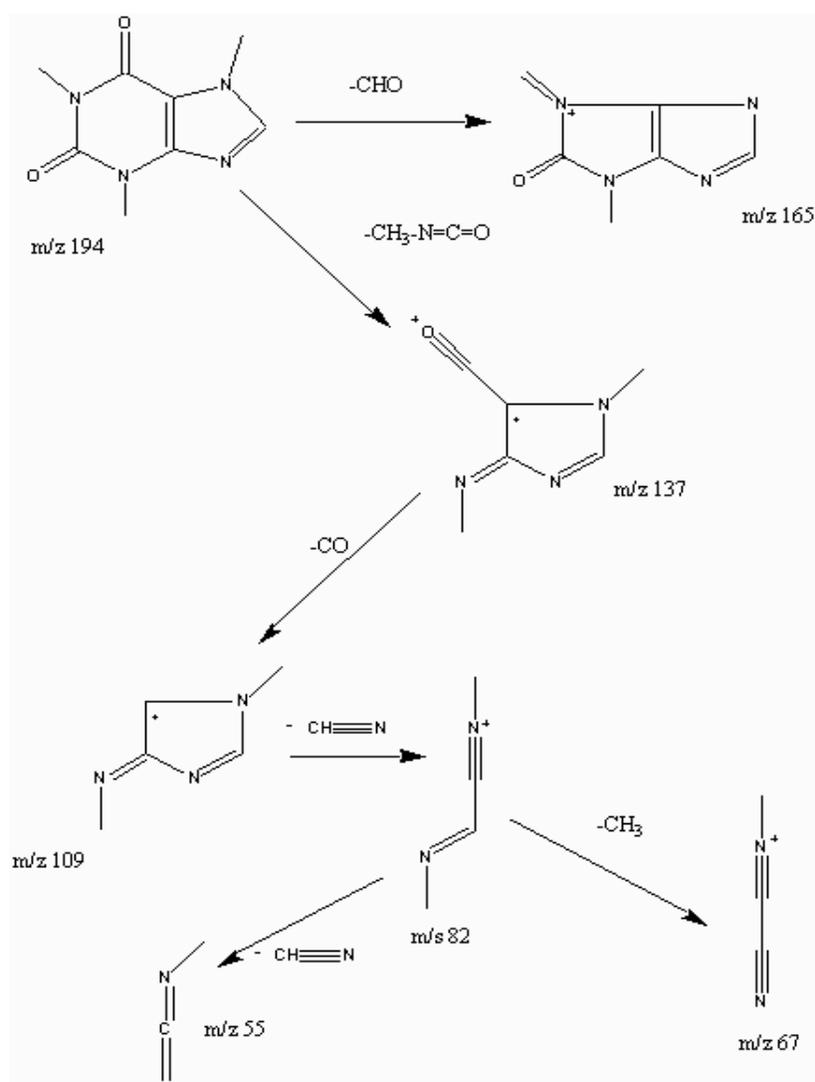
Km. 17 via Bogota - Mosquera Parque Agroindustrial de la Sabana Int. 44 - Mosquera - Cund.
TEL 8275596 / 8293045 / 8293333 Telefax 8293115

A5. Espectros de masas con su respectivos fragmentogramas

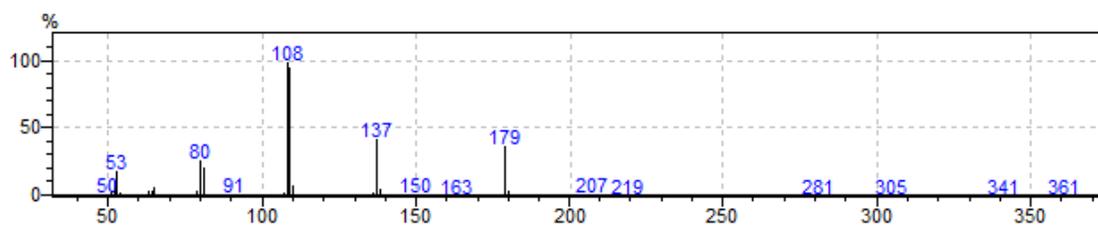
A5.1 Cafeína



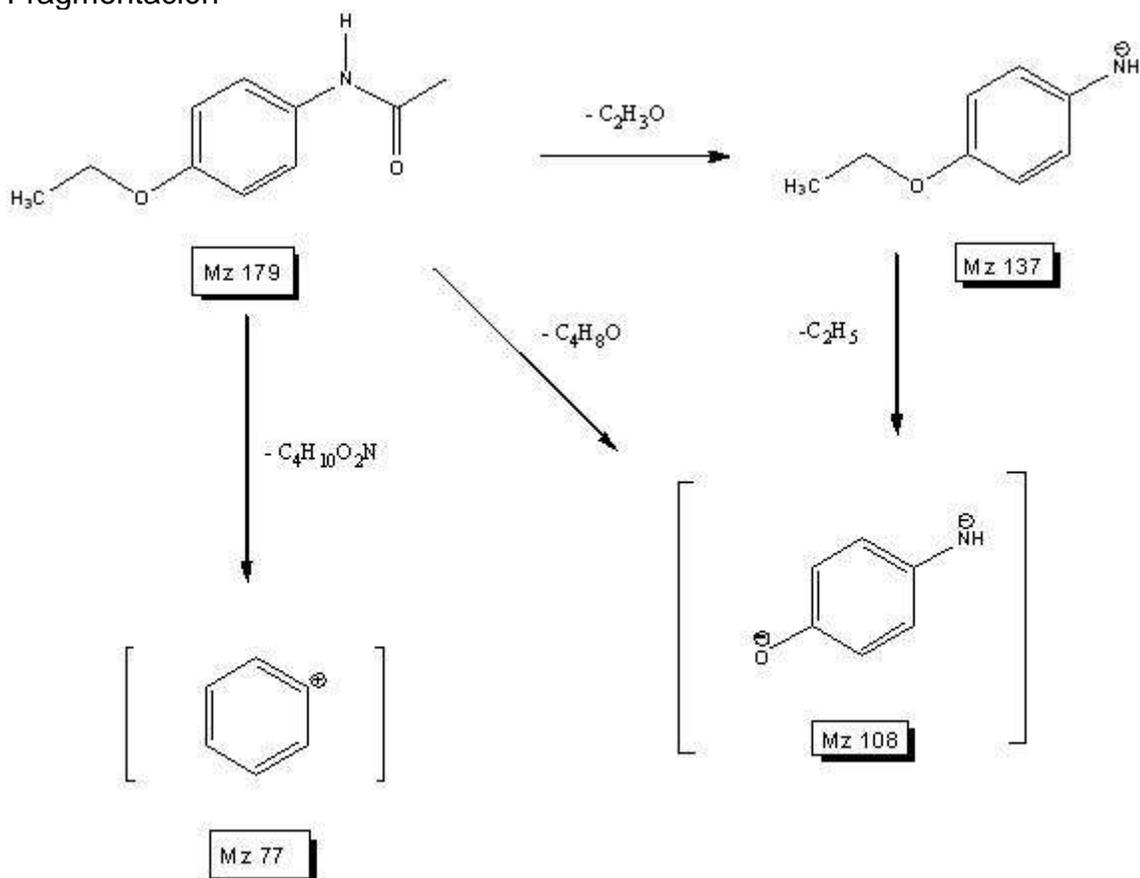
Fragmentación



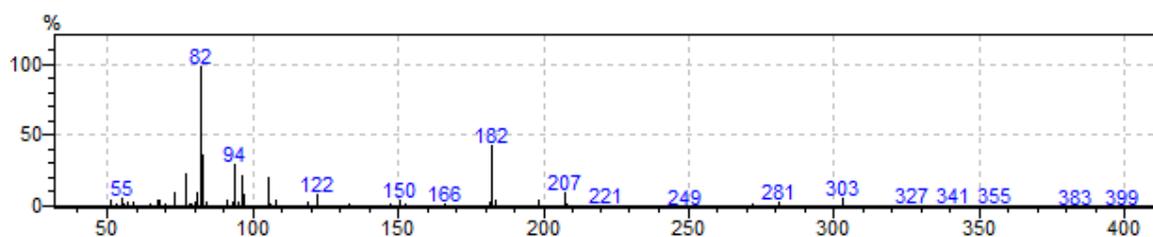
A5.2 Fenacetina.



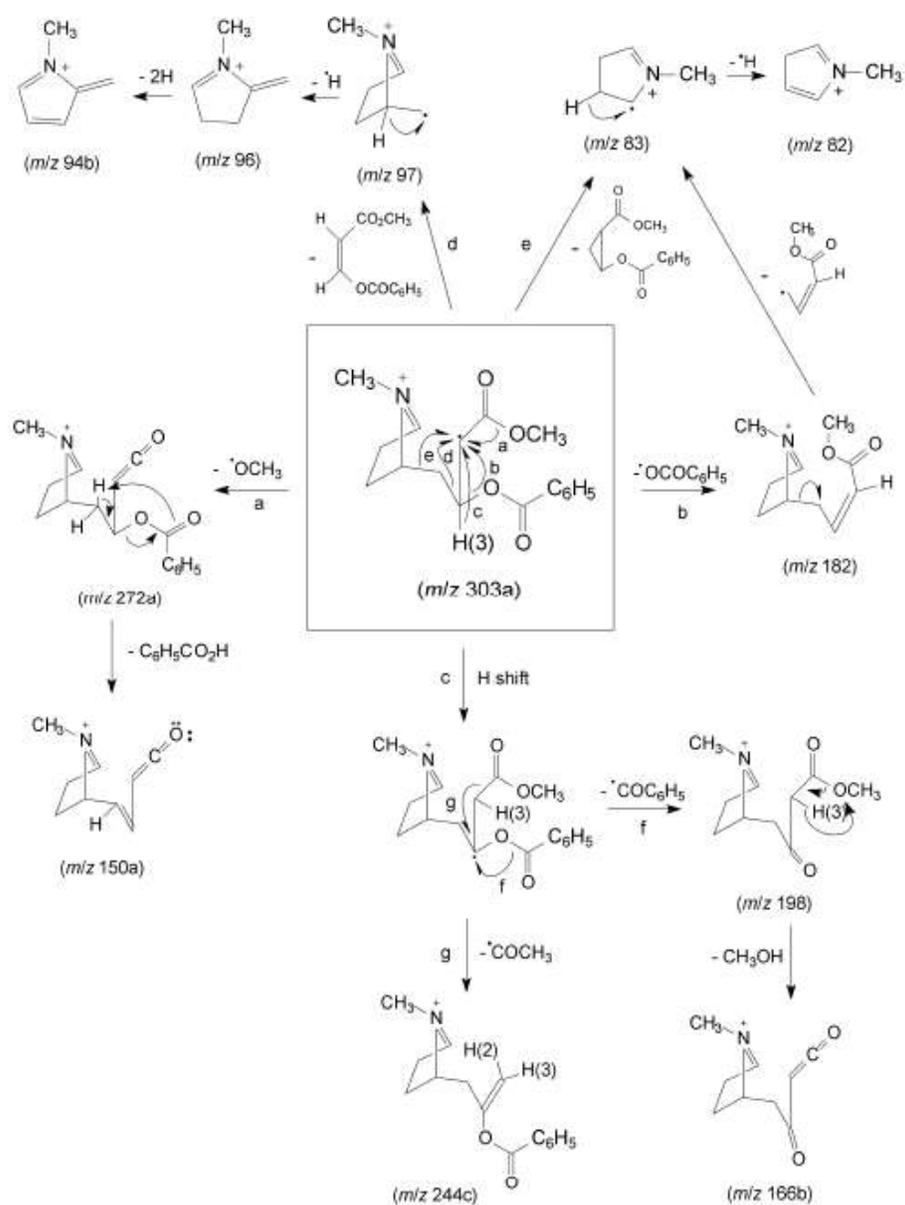
Fragmentación



A5.3 Cocaína.



Fragmentación



A6 Tabla 22. Resultados de la cuantificación de cocaína.

| PESO (mg) | volumen (L) | []* teórica (ppm) | []* real (ppm) fenacetina | []* real (ppm) cafeína | []* real (ppm) cocaína | % Pureza cocaína. |
|------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 0,98 | 0,0015 | 653 | | 101 | 115 | 17,60 |
| 0,55 | 0,0015 | 367 | 77 | 66,7 | 60 | 16,36 |
| 0,63 | 0,0015 | 420 | | | 171,3 | 40,79 |
| 0,91 | 0,0015 | 607 | | 25 | 219,5 | 36,18 |
| 0,73 | 0,0015 | 487 | | 26 | 38 | 7,81 |
| 0,84 | 0,0015 | 560 | | | 103 | 18,39 |
| 0,79 | 0,0015 | 527 | | | 138 | 26,20 |
| 0,84 | 0,0015 | 560 | 50 | 22 | 69 | 12,32 |
| 0,87 | 0,0015 | 580 | | 127 | 117 | 20,17 |
| 0,86 | 0,0015 | 573 | 55 | 47 | 111 | 19,36 |
| 0,76 | 0,0015 | 507 | 48 | | 72 | 14,21 |
| 0,8 | 0,0015 | 533 | | | 85 | 15,94 |
| 0,99 | 0,0015 | 660 | | 103 | 146 | 22,12 |
| 1,05 | 0,0015 | 700 | 48 | 32 | 151 | 21,57 |
| 0,67 | 0,0015 | 447 | | 52 | 127 | 28,43 |
| 0,84 | 0,0015 | 560 | | 36 | 228 | 40,71 |
| 0,88 | 0,0015 | 587 | | 22 | 270 | 46,02 |
| 0,75 | 0,0015 | 500 | 87 | 86 | 74 | 14,80 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | 80 | 22 | 215 | 29,32 |
| 1,2 | 0,0015 | 800 | | 167 | 160 | 20,00 |
| 1,23 | 0,0015 | 820 | 131 | | 204 | 24,88 |
| 0,96 | 0,0015 | 640 | 130 | 24 | 190 | 29,69 |
| 0,85 | 0,0015 | 567 | 97 | 41 | 155 | 27,35 |
| 1,02 | 0,0015 | 680 | 49 | 37 | 103 | 15,15 |
| 1,16 | 0,0015 | 773 | 81 | 44 | 213 | 27,54 |
| 1,14 | 0,0015 | 760 | 48 | | 164 | 21,58 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | 41 | 246 | 33,55 |
| 1,22 | 0,0015 | 813 | | 109 | 215 | 26,43 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | | 241 | 32,86 |
| 1,21 | 0,0015 | 807 | | 43 | 210 | 26,03 |
| 1,08 | 0,0015 | 720 | | | 276 | 38,33 |
| 1,22 | 0,0015 | 813 | | | 312 | 38,36 |
| 0,96 | 0,0015 | 640 | | 74 | 60 | 9,38 |
| 1,12 | 0,0015 | 747 | 225 | | 157 | 21,03 |
| 0,88 | 0,0015 | 587 | | 99 | 130 | 22,16 |

Tabla 22. Resultados de la cuantificación de cocaína (continuación)

| | | | | | | |
|-------|--------|------|-----|-----|-------|-------|
| 1,05 | 0,0015 | 700 | | 27 | 268 | 38,29 |
| 1,24 | 0,0015 | 827 | | 81 | 234 | 28,31 |
| 1 | 0,0015 | 667 | | 22 | 153 | 22,95 |
| 1,2 | 0,0015 | 800 | | | 298 | 37,25 |
| 1,09 | 0,0015 | 727 | 47 | 437 | 467 | 64,27 |
| 1,2 | 0,0015 | 800 | 49 | | 313 | 39,13 |
| 0,821 | 0,0015 | 547 | 77 | 73 | 123 | 22,47 |
| 1,71 | 0,0015 | 1140 | 64 | 60 | 35 | 3,07 |
| 0,71 | 0,0015 | 473 | 89 | 22 | 137 | 28,94 |
| 1,14 | 0,0015 | 760 | | 161 | 4,6 | 0,61 |
| 1,14 | 0,0015 | 760 | 47 | 71 | 15 | 1,97 |
| 1,14 | 0,0015 | 760 | | 41 | 246 | 32,37 |
| 1,43 | 0,0015 | 953 | 48 | 52 | 152 | 15,94 |
| 1,95 | 0,0015 | 1300 | | 22 | 5,3 | 0,41 |
| 1,07 | 0,0015 | 713 | 48 | 112 | 142 | 19,91 |
| 2,04 | 0,0015 | 1360 | | 31 | 429 | 31,54 |
| 3,15 | 0,0015 | 2100 | | 98 | 101 | 4,81 |
| 0,98 | 0,0015 | 653 | 49 | 42 | 272 | 41,63 |
| 1,02 | 0,0015 | 680 | 51 | 25 | 87 | 12,79 |
| 3,27 | 0,0015 | 2180 | | 63 | 162 | 7,43 |
| 1,7 | 0,0015 | 1133 | 30 | | 282 | 24,88 |
| 2,97 | 0,0015 | 1980 | | 23 | 180 | 9,09 |
| 2,75 | 0,0015 | 1833 | | 26 | 134 | 7,31 |
| 1,6 | 0,0015 | 1067 | | 205 | 412 | 38,63 |
| 1,5 | 0,0015 | 1000 | | | 264,5 | 26,45 |
| 3,02 | 0,0015 | 2013 | 59 | 32 | 280 | 13,91 |
| 2,94 | 0,0015 | 1960 | | | 391 | 19,95 |
| 2,14 | 0,0015 | 1427 | 270 | | 422 | 29,58 |
| 2,49 | 0,0015 | 1660 | | | 93 | 5,60 |
| 3,09 | 0,0015 | 2060 | | | 265 | 12,86 |
| 3,09 | 0,0015 | 2060 | 69 | | 145 | 7,04 |
| 2,41 | 0,0015 | 1607 | 72 | | 91 | 5,66 |
| 2,42 | 0,0015 | 1613 | 67 | | 94 | 5,83 |
| 2,11 | 0,0015 | 1407 | | | 75 | 5,33 |
| 1,95 | 0,0015 | 1300 | | | 65 | 5,00 |
| 1,37 | 0,0015 | 913 | 58 | | 218 | 23,87 |
| 1,04 | 0,0015 | 693 | | 114 | 49 | 7,07 |
| 1,18 | 0,0015 | 787 | | 51 | 179 | 22,75 |

Tabla 22. Resultados de la cuantificación de cocaína (continuación)

| | | | | | | |
|------|--------|------|-----|-----|-----|-------|
| 1,15 | 0,0015 | 767 | 60 | 23 | 27 | 3,52 |
| 1,28 | 0,0015 | 853 | | 184 | 109 | 12,77 |
| 1,19 | 0,0015 | 793 | | 175 | 118 | 14,87 |
| 1,28 | 0,0015 | 853 | | 109 | 155 | 18,16 |
| 1,32 | 0,0015 | 880 | | | 126 | 14,32 |
| 0,98 | 0,0015 | 653 | | | 171 | 26,17 |
| 0,99 | 0,0015 | 660 | 49 | 22 | 117 | 17,73 |
| 1,24 | 0,0015 | 827 | | 111 | 140 | 16,94 |
| 1,3 | 0,0015 | 867 | | | 99 | 11,42 |
| 0,7 | 0,0015 | 467 | | 26 | 69 | 14,79 |
| 1,05 | 0,0015 | 700 | | | 168 | 24,00 |
| 0,91 | 0,0015 | 607 | 269 | | | 0,00 |
| 1,08 | 0,0015 | 720 | | 199 | 76 | 10,56 |
| 0,98 | 0,0015 | 653 | | | 168 | 25,71 |
| 0,63 | 0,0015 | 420 | | 50 | 138 | 32,86 |
| 1,07 | 0,0015 | 713 | 62 | 65 | 56 | 7,85 |
| 1,03 | 0,0015 | 687 | 52 | 43 | 82 | 11,94 |
| 1,18 | 0,0015 | 787 | | 69 | 61 | 7,75 |
| 1,07 | 0,0015 | 713 | 60 | 54 | 150 | 21,03 |
| 1 | 0,0015 | 667 | 67 | 35 | 90 | 13,50 |
| 1,2 | 0,0015 | 800 | 137 | 74 | 175 | 21,88 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | 50 | 22 | 121 | 16,50 |
| 1,6 | 0,0015 | 1067 | | 22 | 246 | 23,06 |
| 3,74 | 0,0015 | 2493 | 49 | | 127 | 5,09 |
| 2,93 | 0,0015 | 1953 | | 88 | 324 | 16,59 |
| 1,84 | 0,0015 | 1227 | 53 | 22 | 215 | 17,53 |
| 3,32 | 0,0015 | 2213 | | | 258 | 11,66 |
| 3,22 | 0,0015 | 2147 | 49 | | 107 | 4,98 |
| 2,93 | 0,0015 | 1953 | 48 | 28 | 61 | 3,12 |
| 2,21 | 0,0015 | 1473 | | 217 | 12 | 0,81 |
| 2,79 | 0,0015 | 1860 | | 37 | 20 | 1,08 |
| 2,84 | 0,0015 | 1893 | | 51 | 35 | 1,85 |
| 3,99 | 0,0015 | 2660 | | 56 | 39 | 1,47 |
| 2,17 | 0,0015 | 1447 | | 40 | 20 | 1,38 |
| 1,41 | 0,0015 | 940 | | 59 | 162 | 17,23 |
| 1,01 | 0,0015 | 673 | | 60 | 58 | 8,61 |
| 3,14 | 0,0015 | 2093 | | 110 | 210 | 10,03 |
| 3,04 | 0,0015 | 2027 | | | 111 | 5,48 |

Tabla 22. Resultados de la cuantificación de cocaína (continuación)

| | | | | | | |
|------|--------|------|-----|-----|-----|-------|
| 2,14 | 0,0015 | 1427 | 47 | 25 | 210 | 14,72 |
| 1,67 | 0,0015 | 1113 | 47 | 22 | 157 | 14,10 |
| 2,43 | 0,0015 | 1620 | 151 | 25 | 45 | 2,78 |
| 2,99 | 0,0015 | 1993 | 50 | 23 | 42 | 2,11 |
| 2,57 | 0,0015 | 1713 | 49 | | 72 | 4,20 |
| 1,98 | 0,0015 | 1320 | 47 | | 44 | 3,33 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | 50 | | 125 | 17,05 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | 169 | 146 | 19,91 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | | 75 | 10,23 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | 102 | 105 | 14,32 |
| 1,05 | 0,0015 | 700 | 47 | | 98 | 14,00 |
| 1,16 | 0,0015 | 773 | | 58 | 192 | 24,83 |
| 1,14 | 0,0015 | 760 | 99 | 25 | 66 | 8,68 |
| 1,12 | 0,0015 | 747 | | 164 | 125 | 16,74 |
| 1,13 | 0,0015 | 753 | | | 323 | 42,88 |
| 1,2 | 0,0015 | 800 | 50 | | 276 | 34,50 |
| 0,98 | 0,0015 | 653 | | 64 | 155 | 23,72 |
| 0,98 | 0,0015 | 653 | 80 | 64 | 167 | 25,56 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | 74 | 199 | 27,14 |
| 1,16 | 0,0015 | 773 | | 177 | 144 | 18,62 |
| 1,02 | 0,0015 | 680 | | 213 | 44 | 6,47 |
| 1,13 | 0,0015 | 753 | | 194 | 84 | 11,15 |
| 1 | 0,0015 | 667 | | | 279 | 41,85 |
| 1 | 0,0015 | 667 | | 221 | 62 | 9,30 |
| 1,14 | 0,0015 | 760 | | 200 | 78 | 10,26 |
| 1,08 | 0,0015 | 720 | 58 | 82 | 119 | 16,53 |
| 1,01 | 0,0015 | 673 | | 175 | 102 | 15,15 |
| 1,08 | 0,0015 | 720 | | 248 | | 0,00 |
| 1,2 | 0,0015 | 800 | 165 | | 4 | 0,50 |
| 1,04 | 0,0015 | 693 | 122 | 36 | 138 | 19,90 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | | 83 | 11,32 |
| 1,06 | 0,0015 | 707 | | 22 | 226 | 31,98 |
| 0,95 | 0,0015 | 633 | 49 | 22 | 102 | 16,11 |
| 1,03 | 0,0015 | 687 | 118 | | 148 | 21,55 |
| 1,1 | 0,0015 | 733 | | 67 | 174 | 23,73 |
| 1,31 | 0,0015 | 873 | | | 103 | 11,79 |
| 1,15 | 0,0015 | 767 | | 50 | 110 | 14,35 |
| 1,06 | 0,0015 | 707 | | | 100 | 14,15 |

Tabla 22. Resultados de la cuantificación de cocaína (continuación)

| | | | | | | |
|------|--------|-----|-----|-----|-----|-------|
| 1 | 0,0015 | 667 | 49 | | 81 | 12,15 |
| 1,06 | 0,0015 | 707 | 47 | | 104 | 14,72 |
| 1 | 0,0015 | 667 | 51 | | 115 | 17,25 |
| 1,4 | 0,0015 | 933 | 246 | 38 | 81 | 8,68 |
| 1,16 | 0,0015 | 773 | 98 | 80 | 164 | 21,21 |
| 1,26 | 0,0015 | 840 | 48 | 107 | 233 | 27,74 |

A7. Tabla del análisis T-Student.

Tabla A.2. La distribución t .

| <i>Valor de t para un intervalo de confianza de</i> <i>Valor crítico de t para valores de P de número</i> <i>de grados de libertad</i> | <i>90%</i> | <i>95%</i> | <i>98%</i> | <i>99%</i> |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>0.10</i> | <i>0.05</i> | <i>0.02</i> | <i>0.01</i> |
| 1 | 6.31 | 12.71 | 31.82 | 63.66 |
| 2 | 2.92 | 4.30 | 6.96 | 9.92 |
| 3 | 2.35 | 3.18 | 4.54 | 5.84 |
| 4 | 2.13 | 2.78 | 3.75 | 4.60 |
| 5 | 2.02 | 2.57 | 3.36 | 4.03 |
| 6 | 1.94 | 2.45 | 3.14 | 3.71 |
| 7 | 1.89 | 2.36 | 3.00 | 3.50 |
| 8 | 1.86 | 2.31 | 2.90 | 3.36 |
| 9 | 1.83 | 2.26 | 2.82 | 3.25 |
| 10 | 1.81 | 2.23 | 2.76 | 3.17 |
| 12 | 1.78 | 2.18 | 2.68 | 3.05 |
| 14 | 1.76 | 2.14 | 2.62 | 2.98 |
| 16 | 1.75 | 2.12 | 2.58 | 2.92 |
| 18 | 1.73 | 2.10 | 2.55 | 2.88 |
| 20 | 1.72 | 2.09 | 2.53 | 2.85 |
| 30 | 1.70 | 2.04 | 2.46 | 2.75 |
| 50 | 1.68 | 2.01 | 2.40 | 2.68 |
| ∞ | 1.64 | 1.96 | 2.33 | 2.58 |