

**ESTANDARIZACION Y VALIDACION DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA
POR GC- MS PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA, BENZOILECGONINA,
ACIDO 11- NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL-9-CARBOXÍLICO (THC-
COOH) Y 11-HIDROXI- DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL (THC- Δ 9) EN
MUESTRAS DE ORINA Y SANGRE**

**LUIS FELIPE BENAVIDES ARIAS
JULIANA JARAMILLO HURTADO**

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

**ESTANDARIZACION Y VALIDACION DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA
POR GC- MS PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA, BENZOILECGONINA,
ACIDO 11- NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL-9-CARBOXÍLICO (THC-
COOH) Y 11-HIDROXI- DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL (THC- Δ 9) EN
MUESTRAS DE ORINA Y SANGRE**

LUIS FELIPE BENAVIDES ARIAS

Código: 1088268076

JULIANA JARAMILLO HURTADO

Código: 1088264252

**TRABAJO DE GRADO
Requisito final para optar al título de Químico Industrial**

Director del proyecto:

Nelson Contreras Coronel

**Asesor en el Instituto Nacional de Medicina
Legal y Ciencias Forenses Regional Occidente:**

Lina Erika Galvis Mususu

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA**

2011

Nota de aceptación

Lina Erika Galvis Mususu

Nelson Contreras Coronel

Pereira, Noviembre de 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darnos la paciencia y sabiduría suficientes para resolver los inconvenientes que se presentaron a lo largo de este trabajo.

A nuestros padres y nuestras familias, por acompañarnos en este proceso y por su apoyo incondicional.

Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, por permitirnos desarrollar nuestro proyecto de grado, en especial a Lina Erika Galvis quien nos aportó todo su conocimiento y ayuda para que el proyecto se llevara a cabo satisfactoriamente.

A nuestro director Nelson Contreras, por su confianza y colaboración.

CONTENIDO

Pág.

LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ANEXOS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4. SITUACIÓN ACTUAL.....	6
5. IMPORTANCIA FORENSE.....	7
6. MARCO TEÓRICO.....	9
• CANNABINOIDES.....	9
• COCAÍNA.....	9
• MATRICES BIOLÓGICAS EN LAS QUE SE ANALIZAN ESTAS SUSTANCIAS.....	10
• TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS UTILIZADAS.....	11
• VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	13
• SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	13
• LÍMITE DE DETECCIÓN.....	14
• PRECISIÓN.....	14
– REPETIBILIDAD.....	14
– PRECISIÓN INTERMEDIA.....	14
• ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA.....	14
• ROBUSTEZ.....	15
• DERIVATIZACIÓN QUÍMICA.....	15

7. METODOLOGÍA.....	16
7.1. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS.....	16
7.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	16
7.1.1.1. REACTIVOS.....	16
7.1.1.2. EQUIPOS.....	17
7.1.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO.....	17
7.1.2. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES.....	18
7.1.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK.....	18
7.1.2.2. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE CADA ANALITO.....	20
7.1.2.3. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MEZCLA.....	20
7.1.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	21
• EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	21
• DERIVATIZACIÓN.....	21
• ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	22
• PROCEDIMIENTO.....	22
• EXTRACCIONES BÁSICA Y ÁCIDA.....	22
• EXTRACCIÓN BÁSICA.....	24
• EXTRACCIÓN ÁCIDA.....	25
7.2. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	26
7.3. SISTEMA DE IDONEIDAD.....	26
7.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	26
• SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	26
• PRECISIÓN.....	28
• REPETIBILIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.....	28
• PRECISIÓN INTERMEDIA.....	28
• LÍMITE DE DETECCIÓN.....	28
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
8.1. REPETIBILIDAD Y ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR INTERNO.....	29
8.2. IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	32
8.3. VALIDACIÓN.....	41

8.3.1. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	41
8.3.2. LÍMITE DE DETECCIÓN.....	45
8.3.3. PRECISIÓN.....	46
8.3.4. REPETIBILIDAD.....	47
8.3.4.1. ANALITOS COCAÍNA.....	47
8.3.4.2. ANALITOS CANNABINOIDES.....	49
8.3.5. PRECISIÓN INTERMEDIA.....	51
8.3.5.1. ANALITOS COCAÍNA.....	51
8.3.5.2. ANALITOS CANNABINOIDES.....	52
8.3.6. ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA.....	54
8.3.6.1. ANÁLISIS DE ANOVA PARA LOS ANALITOS DE COCAÍNA.....	54
8.3.6.2. ANÁLISIS DE ANOVA PARA LOS ANALITOS DE CANNABINOIDES.....	55
9. CONCLUSIONES.....	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57
11. ANEXOS.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Procedimiento de extracción y derivatización para confirmar presencia de cocaína y cannabinoides y sus respectivos metabolitos en muestras de orina.	22
Tabla 2. Proceso de extracción y derivatización para confirmar presencia de cocaína y sus metabolitos en muestra de orina y sangre.	24
Tabla 3. Proceso de extracción y derivatización para confirmar presencia de cannabinoides y sus metabolitos en muestra de orina.	25
Tabla 4. Condiciones del Cromatógrafo de Gases.	27
Tabla 5. Datos de repetibilidad y estabilidad para el estándar interno Lidocaína...	30
Tabla 6. Parámetros cromatográficos para los analitos estudiados.	32
Tabla 7. Parámetros cromatográficos para los analitos de Cocaína estudiados.	33
Tabla 8. Parámetros cromatográficos para los analitos de Cannabinoides estudiados.	35
Tabla 9. Especificidad de los analitos de interés.	42
Tabla 10. Selectividad del método cromatográfico.	43
Tabla 11. Coeficientes de variación para el límite de detección de Cocaína.	46
Tabla 12. Coeficientes de variación para el límite de detección de Cannabinoides.	46
Tabla 13. Repetibilidad para Cocaína	47
Tabla 14. Repetibilidad para Benzoilecgonina.	48
Tabla 15. Repetibilidad para THC-COOH	49
Tabla 16. Repetibilidad para THC- Δ 9.	50
Tabla 17. Precisión intermedia para Lidocaína en sistema y método.	51
Tabla 18. Precisión intermedia para Benzoilecgonina en sistema y método.	51
Tabla 19. Precisión intermedia para Cocaína en sistema y método.	52
Tabla 20. Precisión intermedia para THC-COOH en sistema y método.	52
Tabla 21. Precisión intermedia para THC- Δ 9 en sistema y método.	53
Tabla 22. Precisión intermedia para todos los analitos en sistema y método.	53
Tabla 23. Cuadro resumen del análisis de ANOVA para analitos Cocaína	54
Tabla 24. Cuadro resumen del análisis de ANOVA para analitos Cannabinoides .	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma Lidocaína después de 1 mes de su preparación	31
Figura 2. Cromatograma Lidocaína después de 6 meses de su preparación	31
Figura 3. Cromatograma de Cannabinoides con sus analitos en matriz agua.	37
Figura 4. Cromatograma de Cannabinoides con sus analitos en la matriz orina.	37
Figura 5. Cromatograma de Cocaína con sus analitos en la matriz agua.	38
Figura 6. Cromatograma de Cocaína con sus analitos en la matriz orina.	38
Figura 7. Cromatograma de Cocaína con sus analitos en la matriz sangre.	39
Figura 8. Patrón de fragmentación de THC-COOH.	39
Figura 9. Patrón de fragmentación de THC- Δ 9.	40
Figura 10. Patrón de fragmentación de Cocaína.	40
Figura 11. Patrón de fragmentación de Benzoilecgonina.	40
Figura 12. Patrón de fragmentación de Lidocaína.	41
Figura 13. Cromatograma de los contaminantes presentes en agua.	44
Figura 14. Cromatograma de los contaminantes presentes en orina.	44
Figura 15. Cromatograma de los contaminantes presentes en sangre.	45

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de repetibilidad y estabilidad para el estándar interno Lidocaína.	59
Anexo 2. Idoneidad y Especificidad del sistema cromatográfico analitos Cocaína.	62
Anexo 3. Idoneidad y Especificidad del sistema cromatográfico analitos Cannabinoides.	66
Anexo 4. Límite de detección en sistema y método.....	68
Anexo 5. Precisión Intermedia de analitos Cocaína	74
Anexo 6. Precisión Intermedia de analitos Cannabinoides.....	83
Anexo 7. Análisis de varianza ANOVA de analitos Cocaína	87
Anexo 8. Análisis de varianza ANOVA de analitos Cannabinoides	97

RESUMEN

En este proyecto se busca identificar sustancias de abuso tales como COCAÍNA, BENZOILECGONINA, ACIDO 11- NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL-9-CARBOXÍLICO (THC-COOH) Y 11-HIDROXI- DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL (THC- Δ 9) por medio de la estandarización y validación de una metodología analítica por Cromatografía de Gases/espectrometría de masas (GC-MS) con extracción líquido-líquido, en sangre y orina como fluidos biológicos. La importancia en la identificación de estos compuestos radica en que estos representan un grave problema social, relacionado al consumo de estupefacientes que se asocia a casos de homicidio y demás tipos de violencia, no solo en Colombia sino en todos los países del mundo. Esta problemática afecta la calidad de vida de la población, generando mayor inseguridad y violencia. [1]

Los distintos tipos de drogas tienen efectos diferentes sobre nuestro sistema nervioso: unas son excitantes y otras depresoras, es decir, unas aceleran nuestro funcionamiento físico y mental, y otras lo disminuyen e incluso pueden causar alucinaciones y distorsión en la percepción de la realidad.

En Colombia, los laboratorios del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INML) están en proceso de mejoramiento de sus técnicas de análisis para estas drogas en respuesta a la problemática antes mencionada, y con el fin de proporcionar a las autoridades herramientas útiles para aplicar la ley de forma justa. Siendo este proyecto, una contribución a la mejora de la calidad de estos análisis y los esfuerzos por controlar el problema que las drogas ilícitas representan.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la drogadicción en el mundo es un problema contemporáneo que afecta un 80% de la población civil. En Colombia la drogadicción ha alcanzado cifras muy altas de consumo y expendio, durante los últimos doce años se ha pasado de ser un productor a un consumidor de drogas. Hay alrededor de 20.000 jóvenes entre 10-24 años que son procesados por algún delito, el 50% los cometió bajo el efecto de las drogas, siendo esta la población más alta en el consumo de estas sustancias que van desde la marihuana, cocaína, heroína y consumo de fármacos, afectando a los jóvenes y convirtiéndose en un problema de salud pública.

En la mayoría de los casos los asaltos, homicidios, suicidios y prostitución se llevan a cabo bajo el efecto de la droga, elevando la delincuencia en el país. Colombia durante los últimos 30 años ha estado sometida bajo el rigor del narcotráfico que ha sido el motor fundamental en el aumento del consumo de droga [1].

En conclusión, el consumo de estas sustancias genera en nuestra sociedad un ambiente de violencia y corrupción, donde los más afectados son los jóvenes, generando en los padres de familia mayor preocupación y control sobre sus hijos con el fin de evitar que resulten involucrados en este tipo de problemática.

Por las razones anteriores se desarrolló un método analítico de extracción líquido-líquido con diclorometano y una mezcla de hexano-acetato de etilo con la técnica (GC-MS) para la detección y confirmación de Cocaína, Cannabinoides y sus principales metabolitos en sangre y orina.

Desde el punto de vista analítico, en el análisis toxicológico se debe contar con métodos analíticos selectivos para la evaluación cualitativa de las sustancias

toxicas que conduzcan a una correcta interpretación forense, teniendo en cuenta que además de esto, se debe buscar resultados confiables obtenidos bajo rigurosos controles de calidad.

Para lograr esto, se hace necesario validar el método desarrollado, con el fin de demostrar que es idóneo y apropiado para el propósito para el cual fue diseñado, permitiendo conocer la confiabilidad del mismo para su aplicación rutinaria.

Los parámetros que se evalúan en un método analítico cualitativo son: precisión, especificidad, selectividad, límite de detección y robustez. También, en el estudio de validación se evalúa la idoneidad del sistema que para métodos cromatográficos incluye el factor de selectividad, determinación y estabilidad del tiempo de retención de cada uno de los analitos, la resolución, el factor de capacidad y el número de platos teóricos. Estos parámetros permiten determinar la capacidad que tiene el sistema cromatográfico de arrojar resultados reproducibles cada vez que el método sea aplicado.

Se realizó un análisis estadístico para la interpretación de los datos obtenidos, en un estudio de validación, la aplicación de pruebas como análisis de varianza (ANOVA), desviación estándar y coeficiente de variación, son utilizadas para demostrar la validez de un método.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El uso de drogas de abuso tales como Marihuana y Cocaína representa un grave problema social en el país y en el mundo, debido a que generalmente se asocia su consumo con episodios de violencia.

En la actualidad, dos de las principales drogas de mayor abuso en el mundo son la Marihuana y Cocaína, siendo esta última la que presenta casos más graves de intoxicación y muerte. La Cocaína en dosis elevadas puede producir alucinaciones, trastornos paranoides y convulsiones, y en muchos casos la muerte. [2]. A diferencia de la cocaína, la Marihuana no presenta casos de muerte registrados, aunque su toxicidad está bien establecida, en dosis elevadas puede inducir alucinaciones y pérdida de juicio de la realidad, por lo que se asocia frecuentemente con casos de violencia. [3]

Por todo lo expuesto anteriormente, es necesario contar con análisis confiables que permitan evidenciar el consumo de estas sustancias y sirvan de apoyo en la lucha contra esta problemática. Un analista puede decir que ha determinado la presencia de Cocaína y Cannabinoides en una muestra proveniente de una víctima, pero se debe demostrar que los resultados son verídicos y confiables, es decir que el método utilizado para el análisis cumple con los parámetros de calidad establecidos y que la manipulación de la muestra fue óptima. Para comprobar dichos resultados, el analista debe suministrar evidencias documentadas, tales como, registro de los límites de detección, robustez y repetibilidad del método, la óptima calidad de los reactivos soportada a través de un certificado de calidad y pureza expedido por el laboratorio, análisis de incertidumbre del resultado obtenido y monitoreo de las condiciones ambientales.[4] [5]

La aplicación del nuevo Sistema Penal Acusatorio conlleva a un aumento en la exigencia en lo referente a la calidad de las pruebas y ensayos realizados por las

instituciones que cumplan funciones de investigación. [6]. En respuesta a esto, el Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Occidente está en proceso de desarrollo y validación de nuevas metodologías de análisis a fin de aportar pruebas reconocidas científicamente y que sirvan de soporte en el proceso judicial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar cualitativamente por medio de la técnica de extracción líquido-líquido utilizando un cromatógrafo de gases con detector de espectrofotómetro de masas Cocaína, Benzoilecgonina, THC-COOH y Δ 9-THC en sangre y orina humana.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar Cocaína, Benzoilecgonina, THC-COOH y Δ 9-THC en muestras de sangre y orina.
- Estandarizar y validar una técnica analítica por cromatografía de gases con extracción líquido-líquido y detector espectrofotómetro de masas.
- Elaborar una metodología analítica para la identificación y análisis de estas sustancias en muestras forenses de sangre y orina.

4. SITUACIÓN ACTUAL

Prácticamente en todas las culturas conocidas hasta ahora se encuentra el uso y también el abuso de algunas sustancias de las que crean dependencia física y de otras que solo afectan el comportamiento psíquico. Pero es cierto que como común denominador, encontradas excepciones, aparece su empleo ritual o social, en los jóvenes, adultos y en la mayoría de los casos inscrita a los varones. Hoy en día, y quizás esto distinga nuestra época, son los adolescentes de ambos sexos y también los niños, los que consumen en alta cantidad drogas de abusos que muchas veces son exigidas por grupos, costumbres sociales o medios de evasión de alivio a presiones internas o externas.

5. IMPORTANCIA FORENSE

La ciencia forense no es otra cosa que la aplicación de la química y disciplinas afines a la ley. Pretende analizar las evidencias encontradas en la escena de un delito, para aportar a las pruebas que un experto debe presentar ante un tribunal [3].

Es importante resaltar que el análisis cromatográfico depende de una cuidadosa toma y preparación de muestras, así como la selección de patrones que servirán de referencia para la realización de la validación y la confrontación de resultados obtenidos por la técnica de cromatografía de gases (GC)

Con la estandarización y validación de una técnica analítica para la determinación cualitativa de Cocaína, Cannabinoides y sus metabolitos en sangre y orina, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses puede beneficiarse de la siguiente manera:

1. El valor de los resultados analíticos toxicológicos encontrados en el laboratorio sirven de apoyo para la correlación con los hallazgos clínicos o patológicos para establecer posibles causas de muerte. Por estas razones, es muy importante garantizar que estos resultados toxicológicos obtenidos sean confiables y legalmente defendibles en juicio oral. [7]
2. El resultado del dictamen pericial que se le está entregando a la autoridad competente es más completo y con una mayor credibilidad lo que conlleva a estar cada vez más relacionado con la utilización de sistemas de gestión que permitan asegurar una monitorización del control de calidad sobre el trabajo desarrollado, mejorando la prestación de los servicios forenses debido a la reducción de tiempos de repuesta. [8]

3. Debido a que el método de extracción permite obtener dos familias de compuestos diferentes, se logrará la reducción de costos y tiempos requeridos para el análisis toxicológico en comparación con los métodos actualmente utilizados.
4. Fácilmente la metodología puede ser aplicada en todas las regionales de la institución por las bondades anteriores y el manejo previo que tienen las regionales con los equipos GC/MS.
5. Ser una entidad referente de apoyo a las instituciones judiciales aportando informes periciales que son producto de análisis validados, confiables y con credibilidad en sus resultados apoyados en un sistema integrado de gestión de calidad que permite satisfacer las necesidades y expectativas de la comunidad y la administración de justicia. [7] [9]

6. MARCO TEORICO

CANNABINOIDES:

La Marihuana cuyo nombre científico corresponde a *Cannabis Sativa* es una planta que sintetiza más de 60 Cannabinoides siendo su principal componente activo el isómero l-delta 9- THC. Una vez es consumida los efectos se presentan de 15 a 30 minutos para alcanzar el máximo a una hora y prolongarse durante 2 o 3 horas. La ingestión hace retrasar el comienzo de los efectos hasta los 30 o 60 minutos, alcanzando el máximo a las 2-3 horas y prolongándose hasta las 6 horas. El THC circula unido mayoritariamente a fracciones lipoproteínas y albúmina desapareciendo con cierta rapidez del plasma dificultando de esta manera su identificación en sangre como THC. El THC se transforma en el hígado por metabolismo de primer paso al ácido 11-Nor-Delta-9 Tetrahidrocannabinol-9-Carboxílico eliminándose de manera conjugada con el Ácido Glucurónico. Al cabo de una semana se elimina del 67 – 71%, del cual el 65% es excretado en las heces y un 20% en orina. [10]

La marihuana es consumida principalmente por vía oral (ingestión de alimentos que contienen marihuana y partes de la planta) y vía inhalatoria. La intoxicación por THC puede dar como resultado pérdida de conocimiento, afectar el equilibrio, la estabilidad de la postura, aumentar la frecuencia cardiaca y la presión arterial, incluso puede producir la muerte, pero muy pocos reportes de fatalidades se han encontrado.

COCAÍNA:

La cocaína es un alcaloide que se obtiene de la planta de coca. Es un estimulador del sistema nervioso y supresor del hambre, era usado en medicina como

anestésico, incluso en niños, específicamente en cirugías de ojos y nariz, pero actualmente está prohibido. A nivel del sistema nervioso central, actúa específicamente como un inhibidor de la recaptación de serotonina –norepinefrina-dopamina, aumentando el efecto de estos neurotransmisores, causando diferentes acciones a nivel sistémico. En la mayoría de los países la cocaína es una popular droga recreacional prohibida. [11]

La cocaína puede ser suministrada por tres principales vías: oral, parenteral (intravenosa) e inhalatoria. Su dosis letal mínima estimada es de 1,2 g, pero personas susceptibles han muerto de dosis tan pequeñas como 30 mg y los adictos pueden ser capaces de tolerar hasta 5 g el día.

MATRICES BIOLÓGICAS EN LAS QUE SE ANALIZAN ESTAS SUSTANCIAS

La matriz es generalmente un espécimen biológico como un fluido corporal o un tejido sólido. El agente de interés debe existir en la matriz en una solución simple o debe estar unido a proteínas y otros constituyentes celulares. El reto es separar el agente tóxico con suficiente pureza y cantidad para permitir que sea caracterizado y cuantificado. [12]

Las matrices en las cuales se desarrolla este proyecto son sangre y orina, siendo estas las matrices de mayor interés toxicológico debido a la ruta de distribución u eliminación de las sustancias. [12]

En el caso de la cocaína, se utilizan ambas matrices debido a que una vez absorbida la cocaína pasa a la sangre y se distribuye en todos los órganos, metabolizándose especialmente en el hígado [2]. Su eliminación se efectúa por vía renal con varios metabolitos de la ecgonina y con una pequeña cantidad de cocaína libre [3]

Para el caso de la Marihuana, también se utiliza la orina como matriz principal en el análisis toxicológico, debido a que su toxicocinética es similar a la de la cocaína en cuanto a su excreción (orina). En la sangre los cannabinoides se unen a proteínas, por lo tanto es muy difícil su extracción en dicha matriz.

TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS UTILIZADAS

Entre las diversas prácticas instrumentales empleadas en el campo de las ciencias forenses, particularmente en el análisis de compuestos químicos, las técnicas cromatográficas ocupan un lugar preponderante, sin desacreditar otras técnicas de importancia. Considerando esos métodos cromatográficos, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se destacan quizá como los de mayor utilidad, debido a su alta resolución y especificidad, facilidad en la identificación de sustancias y bajos límites de detección (alrededor de ppm y ppb). [3]

En este proyecto, la técnica utilizada es la cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS). La cromatografía de gases es un proceso de separación de los componentes de una mezcla, la cual ocurre por interacción entre la fase estacionaria, la fase móvil y el analito, a través de mecanismos fisicoquímicos de adsorción y reparto. Los compuestos separados pasan por el detector, el cual genera una respuesta en tiempo al paso de una sustancia. La cromatografía de gases es una técnica de separación basada en el coeficiente de reparto de los componentes de una muestra entre una fase móvil (Gaseosa) y una fase estacionaria. [13]

El detector de masas, permite obtener un espectro de masas que muestra la relación masa/carga de la molécula, sus fragmentos y su abundancia relativa, La ionización de la molécula puede llevarse a cabo mediante impacto electrónico, ionización química negativa o positiva e ionización por campo eléctrico.

La cromatografía de gases constituye una herramienta útil y versátil tanto en análisis cualitativo como cuantitativo de diferentes tipos de tóxicos en fluidos y tejidos biológicos. Son candidatos a ser analizados por GC los compuestos volátiles o fácilmente derivatizables a productos relativamente volátiles, cuyo peso molecular no exceda de 500 UMAS. Entre estos se encuentran drogas de abuso, etanol y otros alcoholes, agentes volátiles, plaguicidas utilizados en agricultura, disolventes, fármacos o sus metabolitos, etc. Existen en la actualidad patrones cromatográficos de gases contra los cuales comparar los datos obtenidos en un análisis, con el propósito de determinar la presencia de un compuesto dado. [3]

El dato característico para cada sustancia en la determinación cualitativa es el tiempo de retención y la fragmentación de masas característica para cada una de las sustancias comparándola con la biblioteca predeterminada en el equipo. [3]

En general, antes de realizar un análisis cromatográfico o de otro tipo en toxicología forense, se debe proceder a un pretratamiento a manera de preparación de la muestra, que pretende extraer de la matriz biológica el compuesto por analizar y aislarlo de sustancias que dificultan el procedimiento, tales como proteínas, así como ajustar el pH y la fuerza iónica para permitir eficiencias de extracción óptimas. Este proceso abarca una primera etapa de dilución de la muestra (plasma, suero, orina, etc). Posteriormente, la droga se extrae de la matriz biológica mediante procedimientos de extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida. Estos métodos deben optimizarse para lograr un máximo de recuperación de cada compuesto en particular. Algunos factores que afectan la recuperación de una droga son los siguientes: [3]

Selección de la droga.

- pH de la muestra.
- Propiedades y volumen del disolvente.
- Propiedades y volumen del diluyente.

- pH y tipo de buffer.
- Coeficiente de reparto.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO:

La validación de una metodología analítica, es un proceso de seguimiento que comprende la determinación de una serie de parámetros que demuestren que los resultados del método son confiables y reproducibles. Cada uno de los parámetros a validar debe tener un diseño experimental planteado donde se define la hipótesis nula (H_0), la hipótesis alternativa (H_1), se fija la probabilidad de error (P) o confiabilidad, los grados de libertad (gl), etc. Posterior al diseño, se compara el valor experimental con el tabulado para aceptar o no la hipótesis planteada.

Los parámetros evaluados son selectividad, especificidad, límite de detección, precisión y robustez, en un sistema acuoso, una matriz de sangre y una matriz de orina enriquecidas con soluciones estándares denominadas método. [14]

- **SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD:** Se considera selectividad como la habilidad de un método para diferenciar uno o varios analitos en presencia de otros componentes que se sospecha puedan estar presentes en la muestra. Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de degradación, impurezas etc. El método se considera selectivo si ninguno de los blancos u otras sustancias analizadas presenta el mismo tiempo de retención de los analitos de interés.

La especificidad está definida como la habilidad que tiene el método para medir de forma inequívoca los analitos de interés en presencia de otros componentes que pudiesen estar presente en la muestra. [14]

- **LÍMITE DE DETECCIÓN:** Es la mínima concentración o la mínima masa de un analito que se puede detectar y que proporciona una señal igual a la señal del blanco (ySB) más tres veces la desviación estándar del blanco SB. [14]
- **PRECISIÓN:** Es la concordancia mutua entre datos que se han obtenido de la misma forma, e indica la medida del error aleatorio de un análisis. Se divide en repetibilidad y precisión intermedia. [14]
- **REPETIBILIDAD:** Se refiere a la concordancia de los resultados recolectados por el mismo investigador, los mismos reactivos, laboratorio e instrumento en un corto periodo de tiempo, se evalúa determinando el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD). [14]

$$CV \text{ o } RSD = (s/x) * 100$$

S: desviación estándar

X: media aritmética.

- **PRECISIÓN INTERMEDIA:** Es hallada realizando mediciones a una muestra en diferentes días, por diferentes analistas, se expresa en coeficiente de variación global. Para este estudio se realizan análisis a cinco muestras en tres días diferentes, dos analistas y el mismo instrumento. Se analiza por el método de análisis de varianza ANOVA. [14]
- **ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA:** El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos. Sirve para comparar si los valores de un

conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza (coeficiente de variación) global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. [14]

- **ROBUSTEZ:** Se refiere a la validez de aplicación del método en las condiciones dadas, así como su reproducibilidad en dichas condiciones. Se dice que un método es robusto, cuando los datos de variabilidad están dentro de los límites establecidos por parámetros como selectividad y precisión. [14]

DERIVATIZACIÓN QUÍMICA.

La derivatización química es un proceso en el cual una sustancia, generalmente orgánica, es transformada en otra mediante una reacción química. Cuando es usada en conjunto con GC y HPLC la cantidad de derivatizante utilizada está en el orden de los miligramos a microgramos. Dentro de los grupos funcionales presentes en una molécula susceptibles de ser derivatizados están; -COOH, -OH, -NH, y -NH₂, generándose reacciones de derivatización química como acilaciones, alquilaciones, esterificaciones, silanizaciones o procesos análogos. [15]

Cuando la metodología es desarrollada para aplicaciones ya sea en cromatografía gaseosa o líquida se obtienen numerosas ventajas dentro de las cuales podemos destacar:

- Disminución de la polaridad e incremento de la volatilidad y estabilidad térmica para mejorar las propiedades cromatográficas de la sustancia.
- Aumentar la sensibilidad del GC para detectar drogas de abuso y sus metabolitos. [15]

7. METODOLOGÍA

La metodología de trabajo se estableció con base en el procedimiento estandarizado de trabajo PET con título “Confirmación de Cocaína, Benzoilecgonina, Cocaetileno y Cannabinoides en muestras biológicas de orina y sangre por GC/MSD.” [15].

7.1. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

7.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS

7.1.1.1. REACTIVOS

- Cocaína clorhidrato estándar certificado primario
- Benzoilecgonina hidrato estándar certificado primario
- Lidocaína certificado primario
- Acido 11-Nor-delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxílico (THC-COOH) estándar certificado primario
- 11-Hidroxi- delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC DELTA9)
- Etanol Grado Reactivo Analítico (R.A.)
- Metanol R.A.
- KOH en lentejas R.A
- NaOH en lentejas R.A
- Tetraborato de sodio decahidratado R.A
- Acido acético Glacial R.A
- Diclorometano R.A
- n – Hexano R.A
- Acetato de etilo R.A
- Agua destilada y desionizada.

7.1.1.2. EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases Agilent 7890 A Network GC System con automuestreador 7693 series, con detector selectivo de masas Agilent 5975 XL MSD, equipado con columna capilar Agilent 19091S-433: 30m * 0.25 mm I.D. * 0.25 μ m.
- Sistema de manejo de información, estación de datos cromatográficos de canal simple MSD ChemStation Agilent E.02.00.493.
- Impresora laser monocromática.
- Sistema de suministro de gases calidad cromatográfica: Helio.
- Equipo de calentamiento y evaporación Rapid – Vap Labconco serie 110847010H.
- Balanza analítica con división de escala 0.001 g.
- Agitador de muestras Vortex Thermolyne Maxi Mix II 37600.
- Centrífuga Indulab.
- Ultrasonido Fisher Scientific FS60H.

7.1.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO

- Micropipeta de 10 μ L -100 μ L, BRAND.
- Micropipeta de 100 μ L -1000 μ L, BRAND.
- Balones aforados de 10 mL
- Pipetas aforadas de 3, 5 y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL
- Puntas para micropipetas de capacidad para 100 μ L y 1000 μ L
- Vasos de precipitado de 50 mL.
- Erlenmeyer de 250 mL
- Embudo de vidrio.

- Tubos de ensayos de 10mL y 15 mL.
- Viales de 3mL.
- Insertos para viales.
- Pipetas Pasteur.

7.1.2. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

7.1.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA CADA UNO DE LOS ANALITOS: Para la preparación de las soluciones madre (stock), es necesario hacer un ajuste de la cantidad a pesar, de acuerdo a la pureza del material de referencia utilizado, siguiendo la fórmula:

$$\begin{array}{ccccccc}
 \text{Cantidad en} & & \text{Peso molecular} & & & & \\
 \text{(mg) del} & & \text{de la sal} & & 100 & & \\
 \text{material de} & & & & & & \text{Cantidad en (mg)} \\
 \text{referencia a} & \times & \frac{\quad}{\quad} & \times & \frac{\quad}{\quad} & = & \text{que se debe pesar} \\
 \text{pesar como} & & \text{Peso molecular} & & \text{Pureza} & & \\
 \text{base} & & \text{del la base} & & & &
 \end{array}$$

Se prepararon soluciones stock de 1000 ppm de cada una de las sustancias a analizar, de la siguiente manera:

- **SOLUCIÓN DE LIDOCAÍNA DE 1000 ppm (1mg/ ml ó 1000µg/ml)**

Pesar 10mg de Lidocaína, llevar a un balón aforado de 10mL, diluir y completar a volumen con metanol.

- **SOLUCIÓN DE COCAÍNA DE 1000 ppm (1mg/ ml ó 1000µg/ml)**

Nota: Peso molar de cocaína Clorhidrato = 339,8g/mol

Peso molar de cocaína Base = 303,36g/mol

Pesar 11,2mg de Cocaína clorhidrato, correspondientes a 10,0mg de Cocaína Base llevar a un balón aforado de 10mL, diluir y completar a volumen con metanol.

- **SOLUCIÓN DE BENZOILECGONINA DE 1000 ppm (1mg/ ml ó 1000µg/ml)**

Nota: La Benzoilecgonina Hidrato tiene un 18,4% de humedad, es decir el 81,6% de la cantidad tomada corresponde a Benzoilecgonina.

Pesar 12,25mg de Benzoilecgonina Hidrato, correspondientes a 10mg de Benzoilecgonina, llevar a un balón aforado de 10mL, diluir y completar a volumen con metanol.

- **SOLUCIÓN DE 11-HIDROXI- DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL DE 1000ppm (1mg/ml ó 1000µg/ml)**

Preparar una solución que contenga 1mg de 11-Hidroxi-delta-9-Tetrahidrocannabinol por mL de solución utilizando como solvente metanol.

Si el contenido del frasco es de 0,5mg, diluir el contenido del frasco en 500µL de metanol.

Nota: se debe almacenar protegido de la luz.

- **SOLUCIÓN DE ÁCIDO 11-NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL-9-CARBOXÍLICO (THC-COOH) DE 1000ppm (1 mg/mL ó 1000µg/mL)**

Preparar una solución que contenga 1mg de Ácido 11-Nor-delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxílico (THC-COOH) por mL de solución utilizando como solvente metanol.

O SOLUCIÓN DE ÁCIDO 11-NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL-9-CARBOXÍLICO (THC-COOH) DE 100ppm (0,1 mg/mL ó 100µg/mL)

Si el contenido del frasco de estándar de Ácido 11-Nor-delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxílico (THC-COOH) es de 0,1mg, diluir el contenido del frasco en 1mL de metanol.

Nota: se debe almacenar protegido de la luz.

7.1.2.2. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE CADA ANALITO: Se preparó una solución de 100 ppm a partir de cada una de las soluciones anteriores.

7.1.2.3. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA MEZCLA: Se preparó una solución de 10 ppm de los analitos de carácter ácido y básico, a partir de las soluciones de cada analito, de la siguiente manera:

Analitos de carácter básico:

- De la solución Madre de Cocaína de 1000ppm tomar 100µL, llevar al balón aforado de 10mL.
- De la solución Madre de Benzoilecgonina de 1000ppm tomar 100µL, llevar al balón aforado de 10mL.

Analitos de carácter ácido:

- De la solución Madre de 11-Hidroxi- delta-9-Tetrahidrocannabinol de 1000ppm tomar 100 μ L, llevar al balón aforado de 10mL.
- De la solución Madre de Ácido 11-Nor-delta-9-Tetrahidrocannabinol-9-Carboxílico (THC-COOH) de 1000ppm, tomar 100 μ L llevar al balón aforado de 10mL ó de la solución Madre de 11-Hidroxi- delta-9-Tetrahidrocannabinol de 100ppm tomar 1000 μ L, llevar al balón aforado de 10mL.

Llevar a volumen con metanol tanto la mezcla de solución ácida como básica.

7.1.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO: Se realiza una extracción líquido-líquido para separar la sustancia a analizar de la matriz en la que se encuentra, esta extracción varía dependiendo de las características de solubilidad de cada sustancia a separar, utilizándose una extracción alcalina para el caso de la Cocaína, con diclorometano como solvente. Para los Cannabinoides, se utiliza una extracción ácida y una mezcla de hexano-acetato de etilo como solvente.

DERIVATIZACIÓN: Después de la extracción, se procede a evaporar el solvente hasta sequedad para su posterior derivatización con Bis-(trimetilsilyl)-trifluoroacetamida (BSTFA), teniendo especial cuidado con el manejo de las temperaturas tanto de evaporación como de derivatización para evitar la destrucción de la muestra.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO: Se llevan las muestras a viales y luego al inyector del cromatógrafo de gases para identificar cada analito.

PROCEDIMIENTO: Cada una de las muestras se trata de manera diferente dependiendo de las sustancias a analizar, para ello se siguen los siguientes procedimientos:

- **Extracciones Básica y Ácida:** Se realiza para confirmar la presencia de Cocaína y/o metabolitos y Cannabinoides en la misma muestra de orina.

Tabla 1. Procedimiento de extracción y derivatización para confirmar presencia de cocaína y cannabinoides y sus respectivos metabolitos en muestras de orina.

ETAPA	DESCRIPCIÓN
Adicionar el estándar interno	En tubo de ensayo de 15mL tomar 2 mL de muestra de orina a analizar, adicionar el estándar interno: 50µL de Lidocaína de concentración de 100ppm. Agitar con vortex.
Extracción alcalina	Adicionar 5 mL de solución saturada de tetraborato de sodio pH=10, agitar con vortex., confirmar el pH (debe estar entre 9 y 10), Adicionar 6 mL de Diclorometano, tapar cada tubo, agitar durante 30 minutos en ultrasonido y centrifugar a 7000r.p.m. durante 15 minutos.
Separar las fases	Separar la fase acuosa de la orgánica, llevando la fase orgánica a un tubo de ensayo de 10mL, (la fase orgánica contiene las sustancia básicas de interés como son la Cocaína, Benzoilecgonina y el estándar interno Lidocaína) secar la fase orgánica en el evaporador a 56°C.
Hidrólisis	NOTA: Si la fase acuosa presenta alta cantidad de grasa en la superficie y/o paredes del tubo, transferirla a otro

Hidrólisis	<p>tubo de ensayo de 15mL, para quitar de la muestra la mayor cantidad de grasa posible.</p> <p>A la fase acuosa adicionar 500µL de hidróxido de potasio (KOH 10N), agitar, calentar a 56°C con vortex de 15 r.p.m durante 20 minutos.</p>
Extracción ácida	<p>Dejar enfriar a temperatura ambiente y acidificar con 1mL de ácido acético glacial, agita con vortex y confirmar el pH (debe estar entre 4 y 5).</p> <p>*Adicionar 6 mL de la mezcla de hexano: acetato de etilo (9:1), tapar cada tubo, agitar en ultrasonido durante 30 minutos y centrifugar a 7000r.p.m durante 15 minutos.</p>
Separar las fases	<p>*Separar la fase orgánica (la cual contiene los Cannabinoides), llevándola al mismo tubo de 10mL en donde se encuentra el extracto alcalino seco, de tal manera que queden unidos los dos extractos orgánicos tanto el alcalino como la ácido de la misma muestra.</p>
Secar y derivatizar	<p>Evaporar a sequedad en el evaporador a 62°C; adicionar 80µL del derivatizante BSTFA + 1% TMS o BSTFA tapar cada tubo, calentar durante 20 minutos a 80°C. Con vortex de 15r.pm.</p>
Llevar al análisis cromatográfico	<p>Llevar a los insertos dentro de los viales e inyectar en el cromatógrafo de gases CG/DSM.</p>

- **Extracción Básica:** Se realiza para confirmar la presencia de Cocaína y/o metabolitos en una muestra de orina o de sangre.

Tabla 2. Proceso de extracción y derivatización para confirmar presencia de cocaína y sus metabolitos en muestra de orina y sangre.

ETAPA	DESCRIPCIÓN
Adicionar el estándar interno	En tubo de ensayo de 15mL tomar 2 mL de muestra de orina o de sangre a analizar, adicionar el estándar interno: 50µL de Lidocaína de concentración de 20ppm. Agitar con vortex.
Extracción alcalina	Adicionar 5 mL de solución saturada de tetraborato de sodio pH=10, Agitar con vortex, confirmar el pH (debe estar entre 9 y 10), Adicionar 6 mL de Diclorometano, tapar cada tubo, agitar durante 30 minutos en ultrasonido y centrifugar a 7000r.p.m. durante 15 minutos.
Separar las fases	separar la fase acuosa de la orgánica, llevando la fase orgánica a un tubo de ensayo de 10mL, (la fase orgánica contiene las sustancia básicas de interés como son la Cocaína, Benzoilecgonina y el estándar interno Lidocaína) secar la fase orgánica en el evaporador a 56°C.
Secar y derivatizar	Evaporar a sequedad en el evaporador a 56°C; adicionar 80µL del derivatizante BSTFA + 1% TMS tapar cada tubo, calentar durante 20 minutos a 80°C. Con vortex de 15r.p.m.
Llevar al análisis cromatográfico	Llevar a los insertos dentro de los viales e inyectar en el cromatógrafo de gases CG/DSM.

- **Extracción Ácida:** Se realiza para confirmar la presencia de Cannabinoides en una muestra de orina.

Tabla 3. Proceso de extracción y derivatización para confirmar presencia de cannabinoides y sus metabolitos en muestra de orina.

ETAPA	DESCRIPCIÓN
Toma de muestra	En tubo de ensayo de 15mL tomar 2 mL de muestra de orina a analizar.
Hidrólisis	Adicionar 500 μ L de hidróxido de potasio (KOH 10N), Agitar con vortex, calentar a 56°C con vortex de 15 r.p.m durante 20 minutos.
Extracción ácida	*Dejar enfriar a temperatura ambiente y acidificar con 1mL de ácido acético glacial, agita con vortex y confirmar el pH (debe estar entre 4 y 5). *Adicionar 6 mL de la mezcla de hexano: acetato de etilo (9:1), tapar cada tubo, agitar en ultrasonido durante 30 minutos y centrifugar a 7000r.p.m durante 15 minutos.
Separar las fases	*Separar la fase orgánica (la cual contiene los cannabinoides), llevándola a un tubo de 10mL.
Secar y derivatizar	Evaporar a sequedad en el evaporador a 60°C; adicionar 80 μ L del derivatizante BSTFA + 1% TMS o BSTFA tapar cada tubo, calentar durante 20 minutos a 80°C. Con vortex de 15 r.p.m.
Llevar al análisis cromatográfico	Llevar a los insertos dentro de los viales e inyectar en el cromatógrafo de gases CG/DSM.

7.2. ESTANDARIZACION DEL MÉTODO CROMATOGRAFICO: Se partió de un método cromatográfico utilizado para el análisis de estas sustancias denominado MICROMET. Se modificaron los parámetros de dicho método para mejorar la resolución entre los picos, y evitar interferencias de sustancias que puedan estar presentes en las matrices evaluadas, realizando varios ensayos hasta encontrar la configuración adecuada para el análisis. Los parámetros del nuevo método se encuentran en la tabla 4 y a dicho método se le denominó VALIDACION 3.

7.3. SISTEMA DE IDONEIDAD: Se hicieron cinco inyecciones de la solución de trabajo de la mezcla, con el fin de evaluar los parámetros de la columna cromatográfica tales como: tiempo de retención (t_r), resolución (R), factor de selectividad (α), factor de capacidad (k) y número de platos teóricos (N) evaluando que permanezcan constantes durante el desarrollo de la metodología.

7.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO: Se recolectó sangre y orina obtenidas de personas en las que se garantice la ausencia de los analitos a analizar.

Se colocaron tanto la orina como la sangre en tubos de ensayo y bajo refrigeración (4°C) (para la sangre se utilizan tubos vacutainer tapa gris que contienen anticoagulante para evitar la pérdida de la muestra).

Los parámetros evaluados en la técnica de validación son selectividad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límite de detección y robustez. [14]

Selectividad y Especificidad: Para garantizar que la metodología analítica no presentará resultados falsos positivos, se hizo necesario analizar las siguientes muestras:

1. Muestras de matriz sin ningún analito.

2. Muestras de matriz biológica con cada uno de los analitos, solos y en mezcla.
3. Muestras de analitos en sistema (agua).
4. Blanco de reactivos.

Se analizaron 3 muestras individuales de cada analito y 3 mezclas de estos.

Tabla 4. Condiciones del Cromatógrafo de Gases.

OVEN	Initial temp	100°C (On)		
	Initial time	1.00min.		
	Ramps			
	#	Rate °C/min	Final temp. °C	Final time min.
	1	40.00	200	1.00
	2	5.00	250	3.00
	3	15.00	300	2.00
	4	0.0 (off)		
	Post temp.	300°C		
	Post time	0.0min.		
	Run time	22.833 min.		
FRONT INLET	Mode	Pulsed Splitless		
	Inicial Temp.	240°C (On)		
	Pressure	18.273 psi (On)		
	Total flow	64.714 mL/min		
	Septum Purge Flow	3 mL/min (On)		
	Total flow	54.714 mL/min		
	Gas saber	On		
	Saver flow	20.0mL/min		
	Saver time	2.00min		
	Injection Pulse Pressure	19 psi until 0.5 min		
	Gas type	Helium		
COLUMNNA	Capillary columna			
	Model Number	Agilent 19091S-433		
	Max temperatura	325°C		
	Nominal length	30.0m		
	Nominal diameter	250.00µm		
	Nominal film thickness	0.25µm		
	Mode	Constant flow		
	Initial flow	1.7136 mL/min		
	Nominal init pressure	18.273 psi		
	Average velocity	48.884 cm/sec		
	Inlet	Front Inlet		
	Outlet	Front Detector		
	Outlet pressure	Vacuum		
DETECTOR	MSD			
	Temperature	280°C		

Precisión:

Repetibilidad del Sistema y del Método: Este parámetro fue evaluado a un solo nivel de concentración de la mezcla de analitos. Se analizaron 10 muestras en sistema (agua) y método (orina y sangre respectivamente) con una sola inyección. Esto se hizo tanto para Cocaína como Cannabinoides.

Precisión Intermedia: Este parámetro fue evaluado por dos analistas en tres días diferentes, con un solo nivel de concentración. Realizando cinco muestras y cada una con tres inyecciones.

Límite de Detección: Este parámetro fue evaluado a cinco niveles de concentración, menores a la mínima concentración de los controles indicados en el PET. Cada nivel con tres muestras y tres inyecciones por muestra.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La evaluación de los parámetros de calidad fue realizada utilizando tres matrices:

- Una matriz acuosa denominada sistema (agua). Se utiliza para ambos grupos de sustancias a analizar (Cocaína y Cannabinoides), para analizar el comportamiento del método, sin la interferencia de las matrices.
- Una matriz de orina denominada método, en ella se evalúa la respuesta del análisis tanto para Cocaína como para Cannabinoides.
- Una matriz de sangre también llamada método, en la cual se evalúa la respuesta del análisis únicamente para Cocaína.

8.1. REPETIBILIDAD Y ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR INTERNO

La utilización de un estándar interno en técnicas cromatográficas, es de gran importancia debido a que su adición permite garantizar una relación de áreas constante con los analitos presentes en la muestra. En este caso, por ser un análisis cualitativo se utiliza para garantizar que el método se encuentra funcionando en caso de que no se detecte el analito.

Por esto, se hace necesario evaluar la repetibilidad y la estabilidad del estándar interno evaluando sus tiempos de retención, debido a que el análisis validado es de carácter cualitativo.

El estándar interno evaluado es la Lidocaína, utilizada en el análisis de Cocaína y sus metabolitos. Este análisis se realizó a corto plazo (8 días, 15 días y 1 mes después de su preparación), y a largo plazo (1 mes, 3 meses, 6 meses) para

demostrar que el estándar permaneció en óptimas condiciones durante la realización del proyecto, comprobando así su estabilidad.

El estándar interno para Cannabinoides, es el Aprobarbital, el cual no se utilizó en este proyecto debido a que no se detectaba correctamente después de preparado.

Tabla 5. Datos de repetibilidad y estabilidad para el estándar interno Lidocaína

Coeficientes de Variación (R.S.D)	REPETIBILIDAD Y ESTABILIDAD PARA LIDOCAÍNA					
	ESTABILIDAD A CORTO PLAZO			ESTABILIDAD A LARGO PLAZO		
	8 DÍAS	15 DÍAS	1 MES	1 MES	3 MESES	6 MESES
MATRIZ						
SANGRE	0,3573	0,5256	0,4274	0,4274	0,3177	0,4967
ORINA	0,5412	0,2885	0,6284	0,6284	0,3480	0,3041
AGUA	0,5368	0,3641	0,2998	0,2998	0,5274	0,5450
Criterio de aceptación: R.S.D ≤ 5 %						

Estos datos corresponden a un resumen de los presentados en el **anexo 1**.

En la tabla 5 se puede apreciar que las mediciones realizadas al estándar interno cumplen con los parámetros de repetibilidad y estabilidad, incluso después de seis meses de su preparación, presentando un coeficiente de variación menor al 5%, el cual es el criterio de aceptación, lo que indica que el estándar se encuentra en óptimas condiciones, siendo estable durante toda la validación.

En las figuras 1 y 2 se observan los cromatogramas correspondientes al estándar interno Lidocaína 1 mes y 6 meses después de su preparación respectivamente. En dichas figuras se puede apreciar que la Lidocaína se mantiene estable durante el desarrollo del proyecto.

Figura 1. Cromatograma Lidocaína después de 1 mes de su preparación

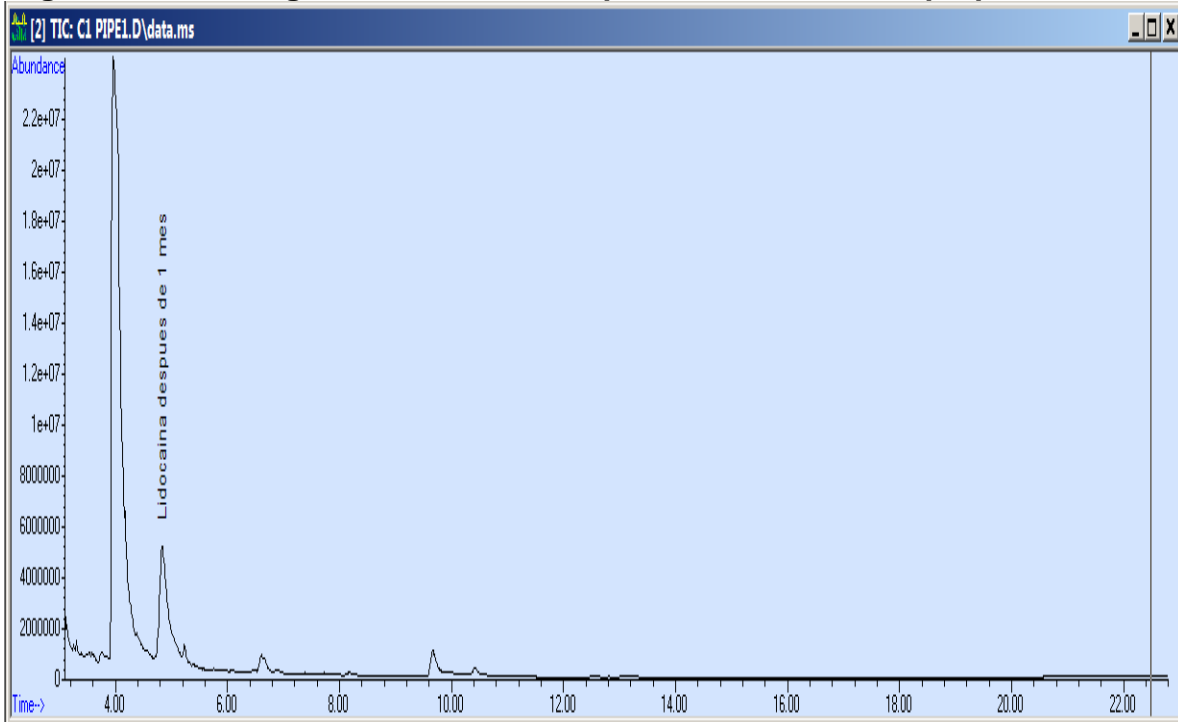
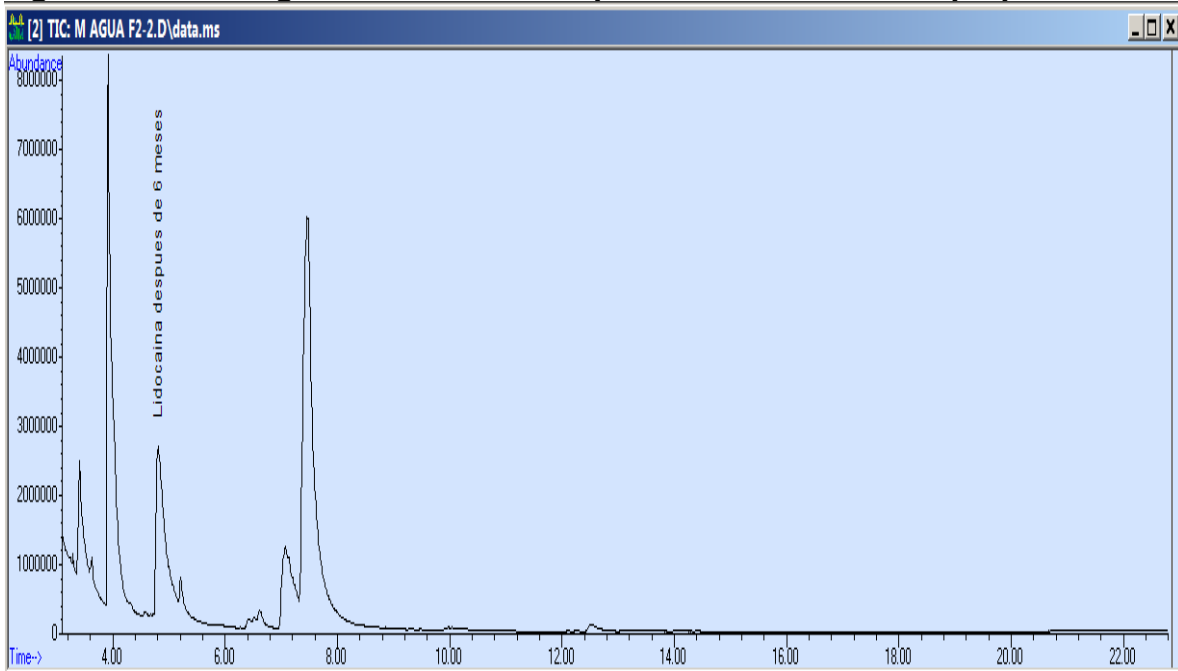


Figura 2. Cromatograma Lidocaína después de 6 meses de su preparación



8.2. IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

La idoneidad de un sistema cromatográfico consiste en evaluar que los parámetros cromatográficos estén dentro de criterios de aceptación garantizando que el equipo y el método son los adecuados para el análisis al momento de validar.

Para determinar la idoneidad del sistema cromatográfico se realizó un análisis de estadística sobre 5 inyecciones de las mezclas de analitos correspondientes a Cocaína y Cannabinoides por separado. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

Tabla 6. Parámetros cromatográficos para los analitos estudiados.

Parámetros evaluados:	Criterio de aceptación
Tiempo de Retención (Tr)	R.S.D ≤ 5% para biológicas, y para sistema (agua) R.S.D ≤ 3%
Número de Platos Teóricos (N)	N ≥ 10000
Factor de Capacidad (k')	Entre 1,5 y 10
Resolución (R)	R ≥ 2
Factor de Selectividad (α)	N/A

Los resultados se calcularon con base en tiempos de retención y anchos de base reportados por el equipo, y mediante el uso de las siguientes fórmulas:

$$N = 16 * \left(\frac{Tr}{W}\right)^2 \qquad k' = \frac{Tr - Tm}{Tm}$$

$$R = 2 * \frac{Trb - Tra}{Wa + Wb} \qquad \alpha = \frac{k'b}{k'a}$$

Donde “N” es el número de platos teóricos, “Tr” es el tiempo de retención de cada analito, “W” es el ancho de base del pico de cada analito, “Tm” es el tiempo muerto de la corrida que corresponde a 2 min, “k’” es el factor de capacidad, “R” la resolución y “α” el factor de selectividad.

Los datos presentados en las tablas 7 y 8 son un promedio de los valores reportados en los anexos 2 y 3 que corresponden a los cálculos realizados a partir de las fórmulas anteriores, para Cocaína y Cannabinoides respectivamente.

Tabla 7. Parámetros cromatográficos para los analitos de Cocaína estudiados.

Sistema de idoneidad para analitos de Cocaína					
Estadístico	Tr (min.)	N	k'	R	α
LIDOCAÍNA EN AGUA					
Promedio	4,777	16318,79	1,389	N/A	N/A
S.D	0,01	237,131	0,005	N/A	N/A
R.S.D	0,213	1,453	0,366	N/A	N/A
Cumple	SI	SI	NO	N/A	N/A
LIDOCAÍNA EN ORINA					
Promedio	4,818	17194,27	1,409	N/A	N/A
S.D	0,002	320,996	0,001	N/A	N/A
R.S.D	0,048	1,867	0,082	N/A	N/A
Cumple	SI	SI	NO	N/A	N/A
LIDOCAÍNA EN SANGRE					
Promedio	4,831	20436,77	1,416	N/A	N/A
S.D	0,012	409,012	0,006	N/A	N/A
R.S.D	0,258	2,001	0,441	N/A	N/A
Cumple	SI	SI	NO	N/A	N/A

Estadístico	Tr (min.)	N	k'	R	α
COCAÍNA EN AGUA					
Promedio	7,051	33730,79	2,526	15	1,819
S.D	0,009	869,159	0,004	0,192	0,01
R.S.D	0,125	2,577	0,174	1,281	0,523
Cumple	SI	SI	SI	SI	N/A
COCAÍNA EN ORINA					
Promedio	7,07	30030,52	2,535	14,515	1,799
S.D	0,005	582,044	0,003	0,105	0,002
R.S.D	0,077	1,938	0,108	0,725	0,125
Cumple	SI	SI	SI	SI	N/A
COCAÍNA EN SANGRE					
Promedio	7,089	26263,67	2,545	14,557	1,797
S.D	0,006	616,99	0,003	0,18	0,008
R.S.D	0,085	2,349	0,118	1,234	0,438
Cumple	SI	SI	SI	SI	N/A

Estadístico	Tr (min.)	N	k'	R	α
BENZOILECGONINA EN AGUA					
Promedio	7,424	37118,38	2,712	2,425	1,074
S.D	0,002	1284,751	0,001	0,056	0,002
R.S.D	0,03	3,461	0,04	2,296	0,17
Cumple	SI	SI	SI	SI	N/A
BENZOILECGONINA EN ORINA					
Promedio	7,462	35170,81	2,731	2,436	1,077
S.D	0,002	1012,718	0,001	0,022	0,001
R.S.D	0,024	2,879	0,033	0,918	0,094
Cumple	SI	SI	SI	SI	N/A
BENZOILECGONINA EN SANGRE					
Promedio	7,495	29426,92	2,748	2,324	1,08
S.D	0,004	612,537	0,002	0,029	0,001
R.S.D	0,049	2,082	0,066	1,256	0,101
Cumple	SI	SI	SI	SI	N/A

Tabla 8. Parámetros cromatográficos para los analitos de Cannabinoides estudiados.

Sistema de idoneidad para analitos de Cannabinoides					
Estadístico	Tr (min.)	N	k'	R	α
THC-COOH EN AGUA					
Promedio	12,648	551103,661	5,324	N/A	N/A
S.D	0,003	26849,799	0,002	N/A	N/A
R.S.D	0,027	4,872	0,032	N/A	N/A
Cumple	SI	SI	SI	N/A	N/A
THC-COOH EN ORINA					
Promedio	12,610	445461,172	5,305	N/A	N/A
S.D	0,006	15890,984	0,003	N/A	N/A
R.S.D	0,046	3,567	0,054	N/A	N/A
Cumple	SI	SI	SI	N/A	N/A
THC-Δ9 EN AGUA					
Promedio	12,758	523031,492	5,379	1,573	1,010
S.D	0,004	22449,097	0,002	0,031	0,000
R.S.D	0,032	4,292	0,038	1,962	0,035
Cumple	SI	SI	SI	NO	N/A
THC-Δ9 EN ORINA					
Promedio	12,759	358924,436	5,380	1,864	1,014
S.D	0,002	7125,932	0,001	0,094	0,001
R.S.D	0,019	1,985	0,022	5,031	0,065
Cumple	SI	SI	SI	NO	N/A

Tr: tiempo de retención en min, **k'**: factor de capacidad, **N**: número de platos teóricos, **R**: resolución, **α** : factor de selectividad, **S.D**: desviación estándar, **R.S.D**: coeficiente de variación. La media corresponde a 5 determinaciones.

En las tabla 7 y 8 se puede observar que los tiempos de retención para cada analito presentan un **coeficiente de variación (R.S.D)** muy inferior a 5%, el cual es el criterio de aceptación, y nos indica que no hay diferencia significativa entre los datos reportados. El **número de platos teóricos (N)** determina la eficiencia de la columna cromatográfica para separar los analitos, y en todos los casos evaluados es significativamente alto, superior al valor mínimo recomendado de 10000; esto nos sirve para determinar el desgaste de la columna midiendo su eficiencia de separación. El **factor de capacidad (k')** es una medida de la fortaleza con la que la fase estacionaria retiene un soluto dado midiendo la velocidad de migración de este en la columna, y se puede observar que k' se encuentra dentro del rango de aceptación para todos los analitos excepto para la Lidocaína aunque no se considera significativo ya que se aproxima mucho al rango; con esto podemos decir que las velocidades de migración de los analitos en la columna son ideales para su análisis. El **factor de selectividad (α)** compara los factores de capacidad de dos analitos y muestra que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Para todos los analitos α es mayor a la unidad lo que nos muestra una buena separación. En cuanto a la **resolución (R)**, esta constituye una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos, donde una resolución de 1,5 permite una separación esencialmente completa de los dos componentes. Para metodologías analíticas lo ideal es que R sea mayor a 2, criterio que aceptan todos los analitos, con excepción del THC- Δ 9, ya que ambos metabolitos de Cannabinoides se comportan de forma similar en la elución, y su separación total es bastante difícil de conseguir, debido a que tienen una estructura química similar; por lo tanto se espera este tipo de comportamiento entre ellos [16].

Tanto la **resolución** como el **factor de selectividad** se calculan con base en el analito inmediatamente anterior, por lo cual no pueden ser calculados para la Lidocaína ni tampoco para el THC- COOH debido a que son los primeros analitos en aparecer en sus respectivos análisis.

Con base en estos resultados, se considera que el sistema cromatográfico es idóneo para los analitos estudiados. En las figuras 3 a 7 se observan los perfiles cromatográficos de Cannabinoides y Cocaína en matriz acuosa, orina y sangre, donde se puede observar que los picos se encuentran a suficiente distancia del tiempo muerto de la corrida.

Figura 3. Cromatograma de Cannabinoides con sus analitos en matriz agua.

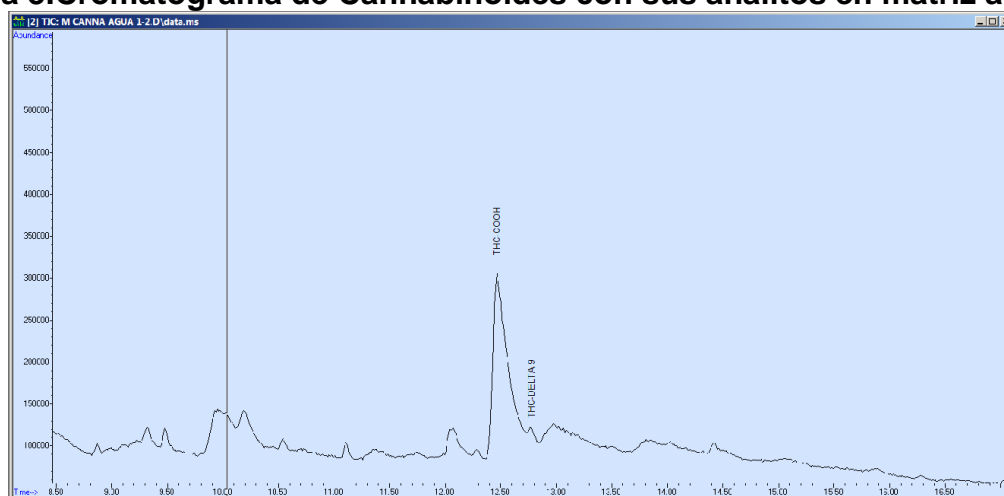


Figura 4. Cromatograma de Cannabinoides con sus analitos en la matriz orina.

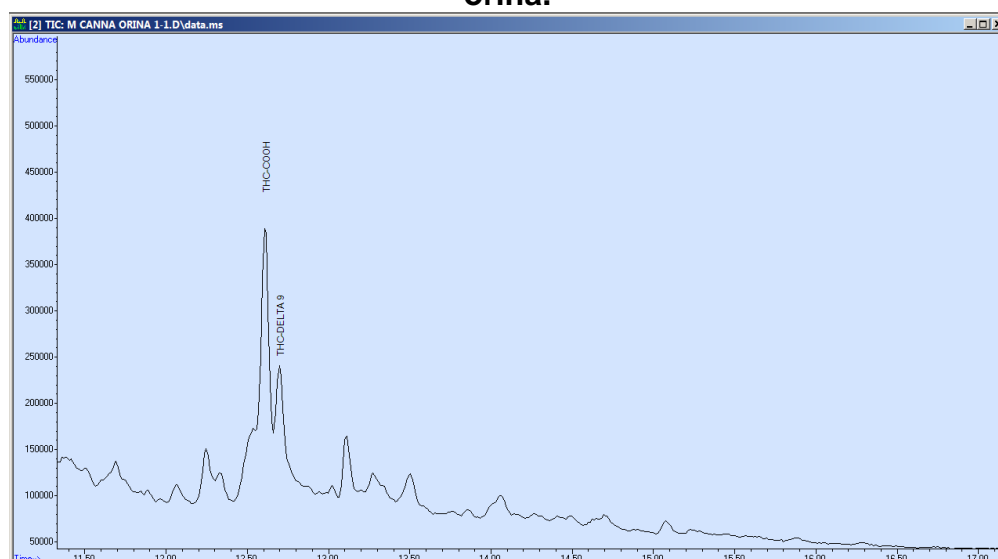


Figura 5. Cromatograma de Cocaína con sus analitos en la matriz agua.

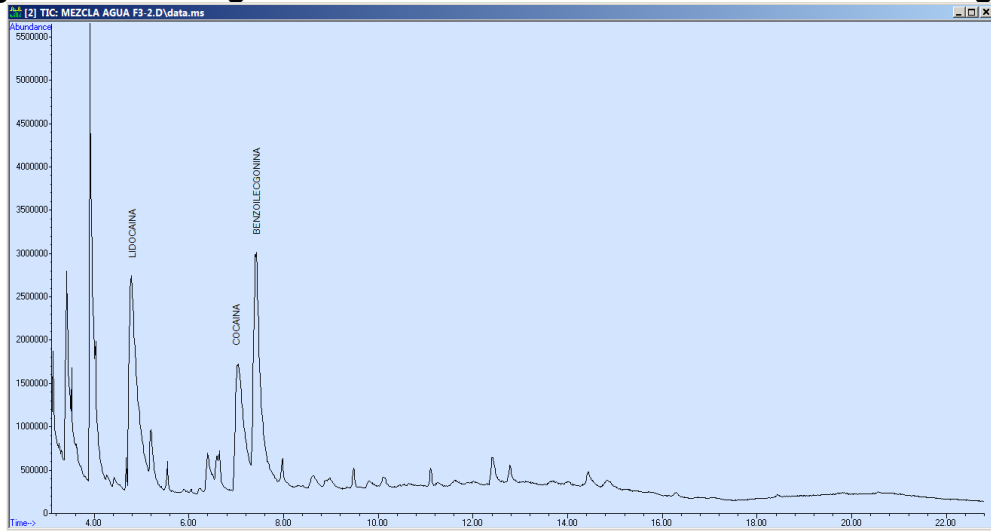


Figura 6. Cromatograma de Cocaína con sus analitos en la matriz orina.

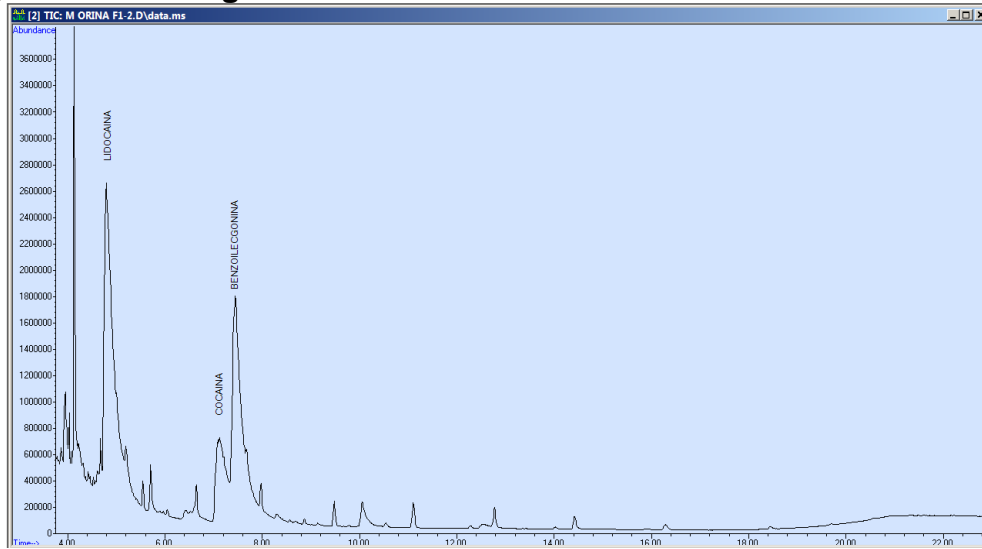
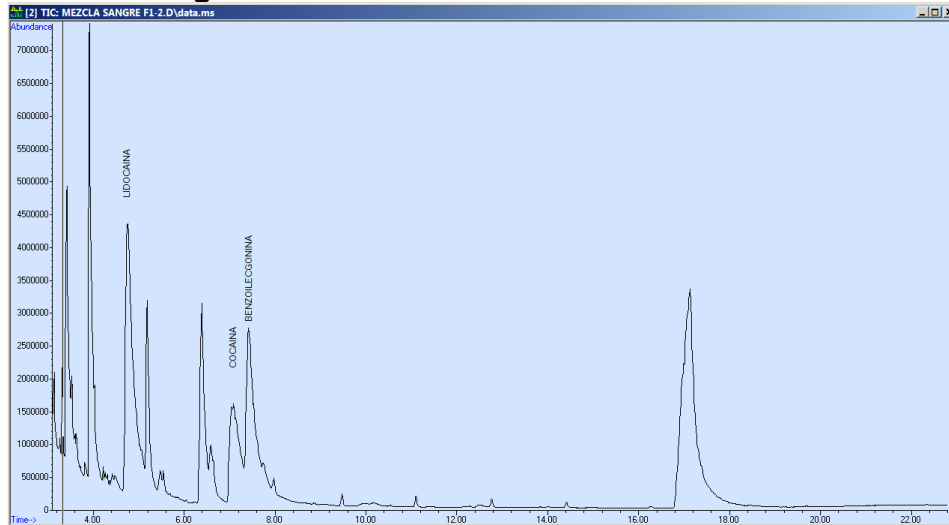


Figura 7. Cromatograma de Cocaína con sus analitos en la matriz sangre.



Los analitos de interés se reconocen mediante un detector selectivo de masas, comparando los patrones de fragmentación obtenidos, con los encontrados en la biblioteca del equipo. Estos patrones son únicos para cada sustancia y se encuentran a continuación en las figuras 8 a 12.

Figura 8. Patrón de fragmentación de THC-COOH.

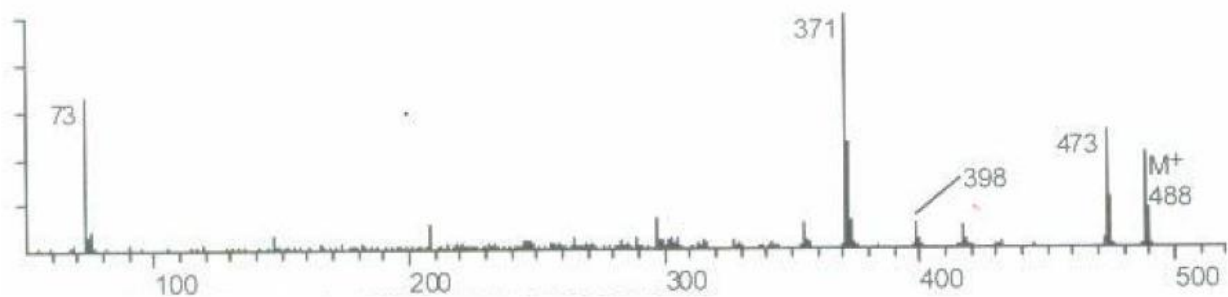


Figura 9. Patrón de fragmentación de THC- Δ^9 .

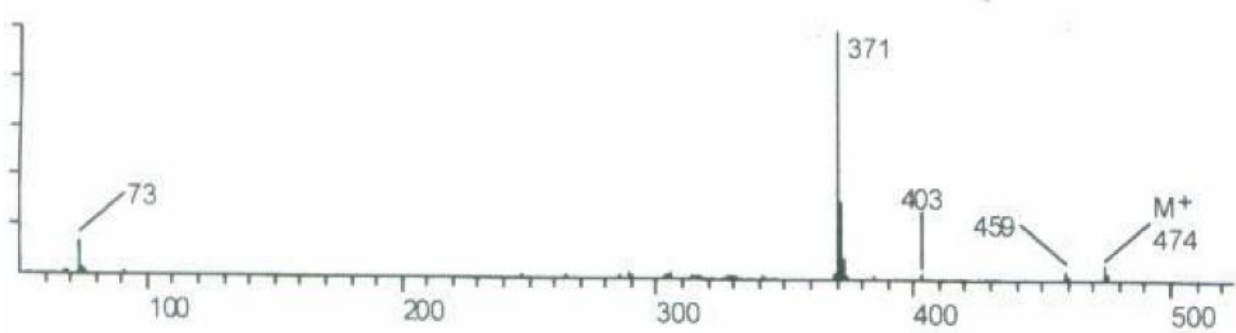


Figura 10. Patrón de fragmentación de Cocaína.

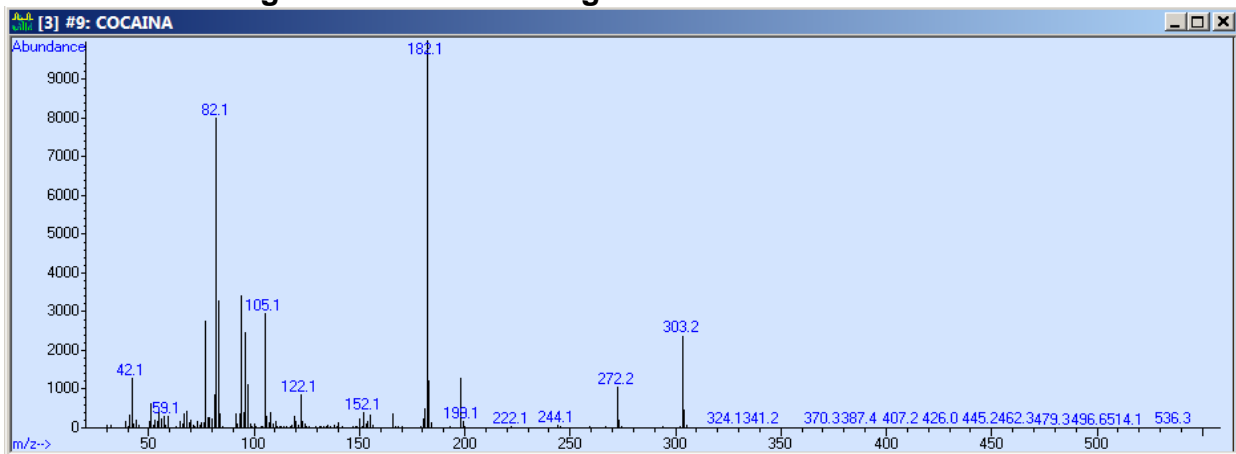


Figura 11. Patrón de fragmentación de Benzoilecgonina.

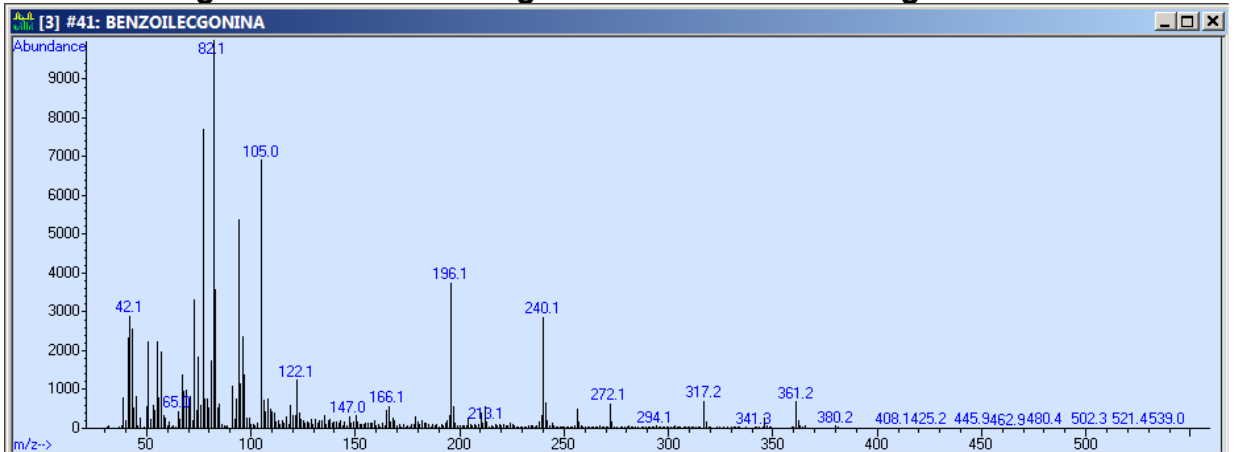
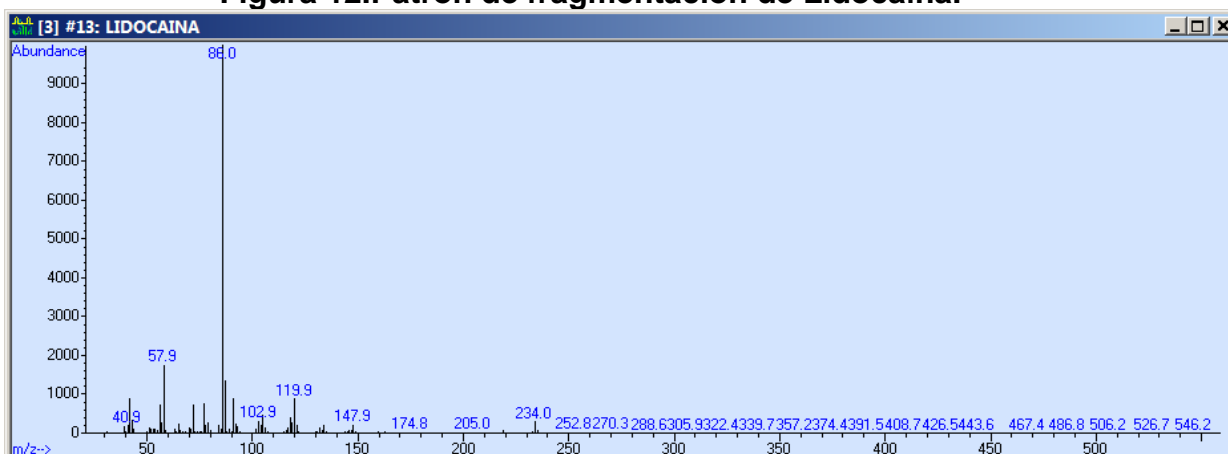


Figura 12. Patrón de fragmentación de Lidocaína.



8.3. VALIDACIÓN

8.3.1. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD

La selectividad de un método determina las interferencias que se puedan presentar debido a sustancias presentes en las matrices de análisis, y la Especificidad evalúa que el método reconozca los analitos inequívocamente de acuerdo a sus tiempos de retención.

Se realizaron corridas de cada mezcla de analitos y de los blancos correspondientes a las matrices para verificar los tiempos de retención y

Parámetros Evaluados:

1. **Selectividad:** Tiempo de retención (Tr) de sustancias presentes en los blancos de las matrices y en las mezclas, que potencialmente puedan interferir en el análisis.

2. **Especificidad:** Tiempos de retención de los analitos.

Criterio de Aceptación:

1. **Selectividad:** Las sustancias pertenecientes a los blancos de las matrices no presentan el mismo Tr de los analitos de interés, y no son reconocidas por el equipo como alguno de los analitos.

2. **Especificidad:** Los analitos no presentan interferencia entre ellos, y se reconocen de manera inequívoca en el equipo.

Tabla 9. Especificidad de los analitos de interés.

Tr ANALITOS DE INTERÉS				
ANALITO		Tr		
		Agua	Orina	Sangre
LIDOCAÍNA		4,8346	4,8472	4,8449
Cocaína	BENZOILECGONINA	7,4685	7,4787	7,5053
	COCAÍNA	7,1453	7,1466	7,1456
THC	Δ 9-THC	12,5301	12,5119	N/A
	THC-COOH	12,4868	12,4326	N/A

Cada dato corresponde al promedio de 10 repeticiones tomadas de los datos de repetibilidad.

En la tabla anterior podemos observar que no se presentó interferencia entre los analitos de la THC y de Cocaína, y que el método los reconoce inequívocamente.

Para el caso de los Cannabinoides, estos presentan un tiempo de retención muy cercano, esto se da porque su estructura química es muy similar, comportándose de igual manera en la elución y dificultando mucho su total separación.

Tabla 10. Selectividad del método cromatográfico.

Matriz	CONTAMINANTES	Tiempo de retención
Sangre	Colesterol	17,131
	BSTFA	3,917
	Ácido Hexadecanóico	5,248
	Ácido Octadecanóico	6,471
Orina	Úrea	3,136
	BSTFA	3,917
	Ácido Hexadecanóico	5,247
	Ácido Octadecanóico	6,578
Agua	BSTFA	3,924
	Ácido Hexadecanóico	5,269
	Ácido Octadecanóico	6,545

Cada dato corresponde al promedio de 4 mediciones.

De la tabla anterior se determina que no se presentó ninguna interferencia entre los analitos de interés y sustancias inherentes a las matrices analizadas, y que el método reconoce individualmente cada analito.

En las figuras 13, 14 y 15 se muestran los perfiles cromatográficos de las mezclas de los respectivos analitos, junto con los blancos de las matrices en las que se encuentran.

Figura 13. Cromatograma de los contaminantes presentes en agua.

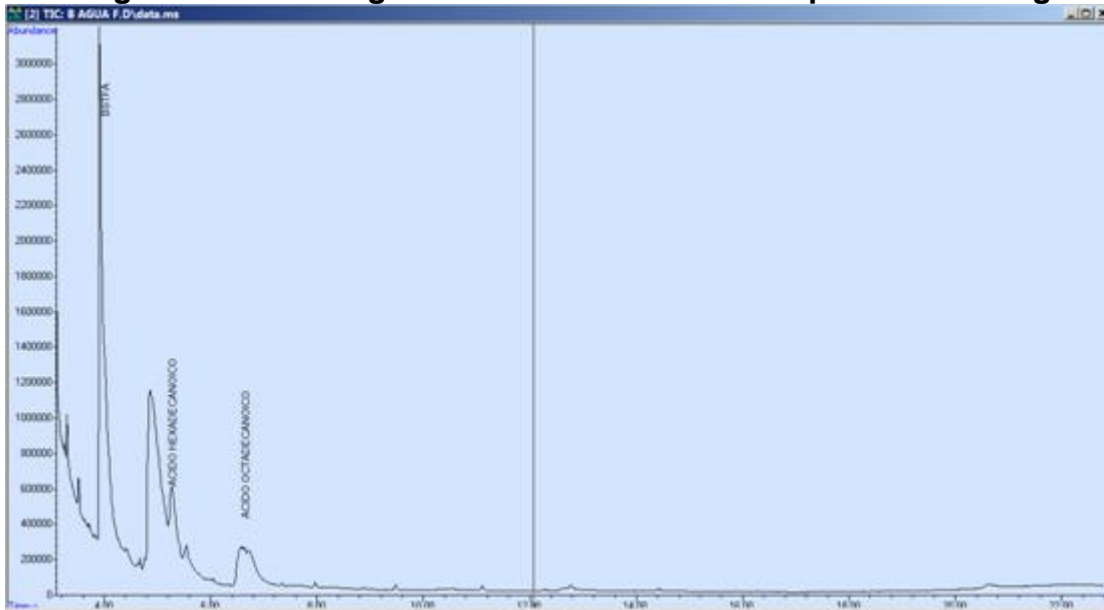


Figura 14. Cromatograma de los contaminantes presentes en orina.

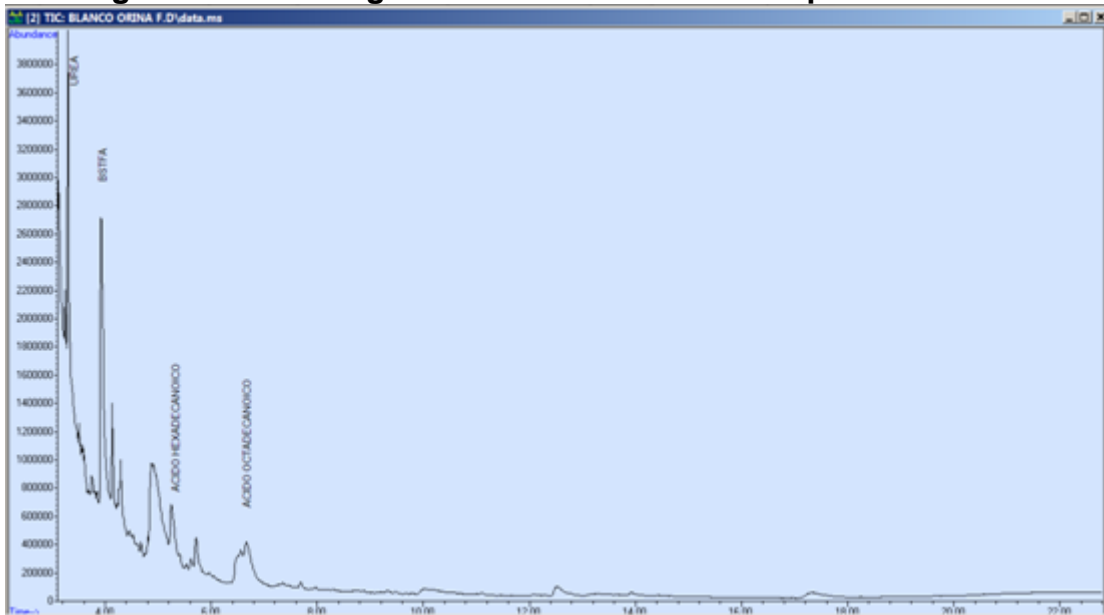
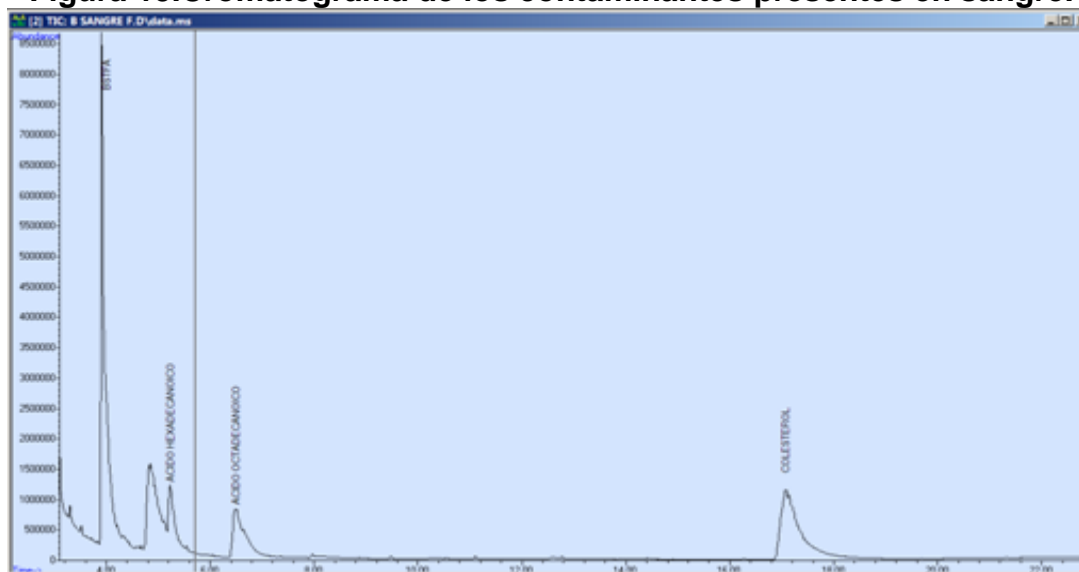


Figura 15. Cromatograma de los contaminantes presentes en sangre.



8.3.2. LÍMITE DE DETECCIÓN

Para hallar la cantidad mínima que el método detecta de cada analito, se enriquecieron muestras con varias concentraciones obtenidas a partir de la solución de mezcla de analitos tanto para Cocaína como para Cannabinoides.

Se realizaron corridas de tres repeticiones y tres inyecciones por repetición a cinco concentraciones diferentes, reportando los resultados de R.S.D para Cocaína y Cannabinoides en las tablas 11 y 12 respectivamente.

A partir de estos resultados, se pudo determinar que las concentraciones mínimas preparadas donde se logran identificar las señales de los analitos de una manera cualitativa son de 0,7 ppm para Cocaína y 1,5 ppm para Cannabinoides, ya que se reconocen los picos, y se presenta buena repetibilidad en sus resultados.

Tabla 11. Coeficientes de variación para el límite de detección de Cocaína.

Concentración (ppm)	Detección	Coeficiente de Variación R.S.D					
		Cocaína			Benzoilecgonina		
		Agua	Orina	Sangre	Agua	Orina	Sangre
1,5	SI	0,3468	0,6948	0,388	0,3149	0,4858	0,2204
1,2	SI	0,3160	0,3330	0,1231	0,6683	0,5790	0,3769
0,7	SI	0,7035	0,5223	0,3237	0,5937	0,4436	0,4266
0,5	NO	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0,05	NO	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 12. Coeficientes de variación para el límite de detección de Cannabinoides.

Concentración (ppm)	Detección	Coeficiente de Variación R.S.D			
		THC-COOH		THC- Δ 9	
		Agua	Orina	Agua	Orina
1,5	SI	0,2218	0,2762	0,0735	0,0517
1,2	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
0,7	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
0,5	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
0,05	NO	N/A	N/A	N/A	N/A

Estos resultados corresponden al resumen de los datos presentados en el anexo 4.

8.3.3. PRECISIÓN

Este término nos sirve para comprobar que entre los datos no hay dispersión, por lo tanto el método genera datos relacionados y no variantes entre sí. La precisión se compone de dos parámetros: la repetibilidad que evalúa que no existan errores sistemáticos, y la precisión intermedia que evalúa el comportamiento del método en varios días y con varios analistas.

8.3.4. REPETIBILIDAD

8.3.4.1. ANALITOS COCAÍNA

- **COCAÍNA:**

Para evaluar la repetibilidad de la Cocaína se realizaron 10 repeticiones de cada analito de cocaína tanto en sistema como en el método con el fin de observar la desviación estándar y el coeficiente de variación en los resultados arrojados y de verificar la dispersión que presentan los resultados.

Tabla 13. Repetibilidad para Cocaína

COCAÍNA			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	7,148	7,171	7,205
2	7,138	7,217	7,136
3	7,148	7,067	7,205
4	7,148	7,113	7,102
5	7,136	7,113	7,136
6	7,182	7,171	7,136
7	7,136	7,148	7,136
8	7,136	7,148	7,113
9	7,136	7,182	7,136
10	7,148	7,136	7,148
PROMEDIO	7,1456	7,1466	7,1453
Desviación Estándar (S.D)	0,0140	0,0423	0,0341
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,1965	0,5920	0,4777

Tanto para la metodología acuosa (Sistema) como para la metodología bioanalítica, que tiene como matriz sangre y orina (Método), es aceptable un coeficiente de variación de hasta el 5%, por lo tanto para el sistema y el método se cumplen con los criterios de repetibilidad para la cocaína, indicando que no hay variación significativa entre los resultados.

- **BENZOILECGONINA:**

Para la Benzoilecgonina, al igual que como en la Cocaína se verifica la repetibilidad de sus resultados realizando 10 repeticiones tanto en sistema como en método.

Tabla 14. Repetibilidad para Benzoilecgonina

BENZOILECGONINA			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	7,528	7,459	7,471
2	7,505	7,471	7,494
3	7,494	7,459	7,471
4	7,494	7,459	7,471
5	7,540	7,459	7,471
6	7,494	7,505	7,459
7	7,494	7,505	7,459
8	7,505	7,494	7,459
9	7,505	7,471	7,459
10	7,494	7,505	7,471
PROMEDIO	7,5053	7,4787	7,4685
Desviación Estándar (S.D)	0,0162	0,0210	0,0108
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,2157	0,2812	0,1441

La tabla 14 indica que tanto para el sistema como para el método los coeficientes de variación no superan el 5%, por lo tanto no varía significativamente los resultados de tiempo de retención de Benzoilecgonina.

8.3.4.2. ANALITOS CANNABINOIDES

De igual forma que en los analitos de cocaína, para la repetibilidad de los analitos de THC se realizaron 10 repeticiones en tanto en sistema (agua), como para método (orina).

- **THC-COOH:**

Tabla 15. Repetibilidad para THC-COOH

THC-COOH		
Repetibilidad	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)	
1	12,454	12,424
2	12,466	12,489
3	12,466	12,489
4	12,454	12,489
5	12,466	12,501
6	12,420	12,477
7	12,466	12,420
8	12,477	12,454
9	12,500	12,489
10	12,454	12,454
PROMEDIO	12,4623	12,4686
Desviación Estándar (S.D)	0,0202	0,0290
Coficiente de Variación (R.S.D)	0,1624	0,2325

Se puede observar que para ambas matrices, el coeficiente de variación está dentro del rango aceptado, lo que indica que el THC-COOH no presenta variación considerable entre sus datos, por lo tanto no se presentan errores sistemáticos en su análisis.

- $\Delta 9$ -THC:

Tabla 16. Repetibilidad para THC- $\Delta 9$

THC-$\Delta 9$		
Repetibilidad	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)	
1	12,454	12,588
2	12,500	12,535
3	12,489	12,547
4	12,489	12,548
5	12,524	12,558
6	12,477	12,558
7	12,581	12,512
8	12,558	12,501
9	12,535	12,500
10	12,512	12,454
PROMEDIO	12,5119	12,5301
Desviación Estándar (S.D)	0,0385	0,0386
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,3077	0,3080

Se observa que la tabla 16 presenta un coeficiente de variación inferior al 5% para sus dos matrices, agua y orina. Se puede concluir que se cuenta con una buena repetibilidad para THC- $\Delta 9$, y que la variación entre sus datos se debe únicamente a errores aleatorios.

8.3.5. PRECISIÓN INTERMEDIA

Para determinar la precisión intermedia del método para cada analito se realizaron corridas en tres diferentes días, con cinco repeticiones y cada una con tres inyecciones y por dos analistas. En las siguientes tablas se observan los resultados de coeficientes de variación global para cada analito.

8.3.5.1. ANALITOS COCAÍNA:

Los cálculos de los resultados en las tablas 17, 18 y 19 se reportan en el anexo 5.

Tabla 17. Precisión intermedia para Lidocaína en sistema y método

Lidocaína			
Repeticiones	R.S.D Global		
	Agua	Orina	Sangre
1	0,6131	1,0678	0,6889
2	1,0019	0,6691	0,6680
3	1,1621	0,5700	0,4634
4	0,8526	0,3550	0,4067
5	1,2528	0,7472	0,4236

Tabla 18. Precisión intermedia para Benzoilecgonina en sistema y método.

Benzoilecgonina			
Repeticiones	R.S.D Global		
	Agua	Orina	Sangre
1	0,2075	0,2335	0,1848
2	0,3029	0,1689	0,2575
3	0,2405	0,1873	0,1944
4	0,8691	0,2393	0,1989
5	0,3441	0,1928	0,2201

Tabla 19. Precisión intermedia para Cocaína en sistema y método.

Cocaína			
Repeticiones	R.S.D Global		
	Agua	Orina	Sangre
1	0,9036	0,5696	0,3264
2	1,0622	0,8313	0,2981
3	0,9349	0,4341	0,1740
4	0,4778	0,4780	0,3549
5	1,1484	0,4898	0,2682

8.3.5.2. ANALITOS CANNABINOIDES:

Las tablas 20 y 21 corresponden a un resumen del anexo 6 de precisión intermedia para Cannabinoides.

Tabla 20. Precisión intermedia para THC-COOH en sistema y método.

THC-COOH		
Repeticiones	R.S.D Global	
	Agua	Orina
1	1,1544	1,1509
2	0,7882	0,9277
3	1,0614	0,9019
4	0,7627	0,7031
5	0,9353	0,8315

Tabla 21. Precisión intermedia para THC- Δ 9 en sistema y método

THC- Δ 9		
Repeticiones	R.S.D Global	
	Agua	Orina
1	0,8917	0,9520
2	0,7983	0,7053
3	0,8337	0,7145
4	0,6477	0,6006
5	0,8601	0,5967

Tabla 22. Precisión intermedia para todos los analitos en sistema y método.

Matriz	Agua	Orina	Sangre
Lidocaína	1,0242	0,7239	0,5668
Cocaína	0,9348	0,5856	0,2921
BE	0,2686	0,2058	0,2098
THC-COOH	0,9746	0,9006	N/A
THC- Δ 9	0,8462	0,7195	N/A

En la tabla 22 se encuentran los coeficientes de variación global para cada analito, los cuales corresponden a una análisis de los tres días y las cinco repeticiones como un solo grupo de datos, debido a que de esta forma se puede observar que los coeficientes de variación global para Lidocaína, Benzoilecgonina, Cocaína, THC-COOH y THC- Δ 9 no superan el límite establecido para metodologías bioanalíticas de un 3% para el sistema y 5% para el método, lo que nos indica que no hay diferencia significativa entre los datos obtenidos a pesar de variar condiciones como analistas, días de análisis y preparaciones de muestras.

8.3.6. ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA

Se analizaron los resultados obtenidos de la precisión intermedia tanto en sistema como en el método, la hipótesis nula planteada es que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos.

8.3.6.1. Análisis de ANOVA para los analitos de Cocaína

Tabla 23. Cuadro resumen del análisis de ANOVA para analitos Cocaína

ANÁLISIS DE VARIANZA			
Analitos	Matriz	F	Valor crítico para F
Lidocaína	agua	0,54622292	1,82590825
	orina	0,33714395	1,82590825
	sangre	0,77570998	1,82590825
Cocaína	agua	0,27066213	1,82590825
	orina	0,46598543	1,82590825
	sangre	0,74960946	1,82590825
Benzoilecgonina	agua	0,73568712	1,82590825
	orina	0,31055927	1,82590825
	sangre	0,18298076	1,82590825

La tabla 23 corresponde a un resumen del anexo 7 y presenta los datos obtenidos del análisis usando ANOVA de un factor, el valor de F experimental es menor que el F crítico tanto para sistema como para método en todos los analitos, por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se determina que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores del sistema y método, donde la diferencia o discrepancia entre los datos corresponde a errores aleatorios más no sistemáticos.

8.3.6.2. Análisis de ANOVA para los analitos de Cannabinoides

Tabla 24. Cuadro resumen del análisis de ANOVA para analitos Cannabinoides

ANÁLISIS DE VARIANZA			
Analitos	Matriz	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
THC-COOH	agua	0,54301464	1,82590825
	orina	0,09621742	1,82590825
THC- Δ 9	agua	0,79586856	1,82590825
	orina	0,19192944	1,82590825

La tabla 24 corresponde a un resumen del anexo 8 y presenta los datos obtenidos del análisis usando ANOVA de un factor, el valor de *F* experimental es menor que el *F* crítico tanto para sistema como para método en todos los analitos, por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se determina que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores del sistema y método e indicando que la diferencia existente se debe únicamente a errores aleatorios.

9. CONCLUSIONES

- Se estandarizó y validó el método analítico para la determinación de Cocaína, Benzoilecgonina, ácido 11-nor-delta-9-tetrahidrocannabinol-9-carboxílico (THC-COOH) y 11-hidroxi-delta-9-tetrahidrocannabinol (THC- Δ 9) en muestras de orina y sangre a las condiciones indicadas del cromatógrafo de gases con detector de masas GC/MS.
- Con la implementación de la técnica y su validación se permite la obtención de resultados confiables respaldados por procedimientos validados, mejorando la calidad de los procedimientos en el laboratorio de toxicología de la Regional Occidente.
- El estudio de validación cumple con los criterios exigidos para cada uno de los parámetros evaluados, indicando así que el método es robusto y lo suficientemente confiable para generar resultados, de acuerdo a las exigencias de la comunidad internacional en este tipo de estudios.
- Se determinó que no existen diferencias significativas en el análisis de Cocaína y Cannabinoides, sin importar si se cambia de analista y/o día de realización del análisis, demostrando la reproducibilidad y robustez del método a las condiciones establecidas para el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Occidente.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ARRIAGADA. I, HOPENHAYN. M. “Producción, tráfico y consumo de drogas en América Latina”. Organización de las Naciones Unidas. División de desarrollo social. Santiago de Chile. 2000.
- [2] LITTER. M. “Farmacología experimental y clínica”. Séptima edición. Editorial El ateneo. Pag 436-437. 1988.
- [3] CORDOBA. D. “Toxicología”. Cuarta edición. Editorial Manual Moderno. Capítulo 65, Pag 480.
- [4] REPETTO. M, JIMÉNEZ. MP. “Sistemática Analítica Toxicológica General”. Quím. Indus. Pag 255 - 258. 1983.
- [5] <http://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6025/6/CAPITULO%204.doc>. ICONTEC, *ISO IEC - 17025:2000*. 2000. Consultado Abril de 2011.
- [6] OSORIO. L. “Manual de procedimientos de Fiscalía en el Sistema Penal Acusatorio Colombiano”. 2005.
- [7] DIAS. M, CASTAÑERA. A, FRANCO. J. “La importancia de la acreditación en los laboratorios de toxicología forense”. Servicio de toxicología forense. Delegación sur del Instituto Nacional de Medicina Legal (INML). Rua Manuel Bento de Sousa. Lisboa-Portugal.
- [8] Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. “Sistema integrado de Gestión de Calidad”. Modelo Estándar de Control Interno MECI.
- [9] <http://problemascolombianos.wordpress.com/comunicaciones/1-marco-teorico/2-marco-practico/drogadiccion-en-colombia/>. Seminario de problemas colombianos contemporáneos. “Drogadicción en Colombia”. Marzo de 2007. Consultado Junio de 2011.
- [10] MORALES. N.S, MARTINEZ. J.A. “Validación del proceso de extracción en fase sólida y determinación del principal metabolito de la Cannabis sativa en muestras de orina”. Universidad Nacional de Colombia. Santa fe de Bogotá. Diciembre 1995.

- [11]** CHERI. L, WILLIAMS. S, CASEY. L, PARKER. R.B. "Quantitation of cocaine and cocaethylene in canine serum by high performance liquid chromatography. November 1995.
- [12]** KLAASSEN. C.D. "Casarett & doull's toxicology". Quinta edición. Editorial McGraw-Hill. Pag 952. 1996.
- [13]** CHIAROTTI. M, COSTAMAGNA. L. "Analysis of 11-nor-9-carboxy-D9-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS)". April 2000.
- [14]** U.S DEPARTMENT OF HEALTH END HUMAN SERVICES. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation; Food and Drug Administration; Center for Veterinary Medicine. BP. Mayo 2001.
- [15]** INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES. REGIÓN OCCIDENTAL. Procedimiento estandarizado de trabajo (PET), "Confirmación de Cocaína, Benzoilecgonina, Cocaetileno y Cannabinoides en muestras de orina y sangre por GC/MSD."
- [16]** http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. "Técnicas cromatográficas". Diciembre de 2007. Consultado Noviembre de 2011.

11. ANEXOS

Anexo 1. Datos de repetibilidad y estabilidad para el estándar interno Lidocaína.

LIDOCAÍNA DESPUÉS DE 8 DÍAS			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	4,829	4,829	4,817
2	4,817	4,840	4,827
3	4,840	4,829	4,887
4	4,817	4,852	4,840
5	4,852	4,829	4,840
6	4,875	4,829	4,829
7	4,840	4,887	4,817
8	4,840	4,887	4,852
9	4,840	4,852	4,887
10	4,852	4,806	4,863
PROMEDIO	4,8402	4,844	4,8459
Desviación Estándar (S.D)	0,0173	0,0262	0,0260
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,3573	0,5412	0,5368

LIDOCAÍNA DESPUÉS DE 15 DÍAS			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	4,794	4,806	4,806
2	4,794	4,827	4,806
3	4,806	4,827	4,806
4	4,817	4,84	4,817
5	4,863	4,806	4,817
6	4,863	4,794	4,794
7	4,840	4,829	4,840
8	4,829	4,817	4,817
9	4,840	4,817	4,852
10	4,840	4,829	4,829
PROMEDIO	4,8286	4,8192	4,8184
Desviación Estándar (S.D)	0,0254	0,0139	0,0175
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,5256	0,2885	0,3641

LIDOCAÍNA DESPUÉS DE 1 MES			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	4,806	4,827	4,819
2	4,806	4,827	4,817
3	4,852	4,817	4,806
4	4,852	4,817	4,806
5	4,806	4,817	4,827
6	4,829	4,840	4,816
7	4,829	4,887	4,840
8	4,817	4,887	4,852
9	4,852	4,887	4,817
10	4,852	4,840	4,817
PROMEDIO	4,8301	4,8446	4,8217
Desviación Estándar (S.D)	0,0206	0,0304	0,0145
Coficiente de Variación (R.S.D)	0,4274	0,6284	0,2998

LIDOCAÍNA DESPUÉS DE 3 MESES			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	4,794	4,806	4,817
2	4,794	4,827	4,840
3	4,827	4,827	4,840
4	4,817	4,827	4,863
5	4,806	4,817	4,840
6	4,817	4,829	4,852
7	4,806	4,806	4,852
8	4,840	4,863	4,887
9	4,827	4,817	4,806
10	4,827	4,840	4,806
PROMEDIO	4,8155	4,8259	4,8403
Desviación Estándar (S.D)	0,0153	0,0168	0,0255
Coficiente de Variación (R.S.D)	0,3177	0,3480	0,5274

LIDOCAÍNA DESPUÉS DE 6 MESES			
Repetibilidad	Sangre	Orina	Agua
Repeticiones	Tiempo de Retención (TR)		
1	4,817	4,840	4,817
2	4,852	4,840	4,817
3	4,840	4,852	4,806
4	4,817	4,852	4,817
5	4,817	4,852	4,840
6	4,887	4,852	4,852
7	4,875	4,840	4,806
8	4,852	4,875	4,852
9	4,840	4,817	4,887
10	4,852	4,852	4,852
PROMEDIO	4,8449	4,8472	4,8346
Desviación Estándar (S.D)	0,0241	0,0147	0,0263
Coficiente de Variación (R.S.D)	0,4967	0,3041	0,5450

**Anexo 2. Idoneidad y Especificidad del sistema cromatográfico analitos
Cocaína.**

Parámetros evaluados:	Criterio de aceptación
Tiempo de Retención (Tr)	R.S.D ≤ 5% para biológicas, y para sistema (agua) R.S.D ≤ 3%
Número de Platos Teóricos (N)	N ≥ 10000
Factor de Capacidad (k')	Entre 1,5 y 10
Resolución (R)	R ≥ 2
Factor de Selectividad (α)	N/A

ANALITOS DE COCAÍNA EN AGUA						
LIDOCAÍNA						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	4,786	0,149	16507,94	1,393	N/A	N/A
2	4,783	0,149	16487,25	1,392	N/A	N/A
3	4,785	0,15	16281,76	1,393	N/A	N/A
4	4,764	0,151	15926,11	1,382	N/A	N/A
5	4,769	0,149	16390,87	1,385	N/A	N/A
Promedio	4,777	0,15	16318,79	1,389	N/A	N/A
S.D	0,01	0,001	237,131	0,005	N/A	N/A
R.S.D	0,213	0,598	1,453	0,366	N/A	N/A
Cumple	SI	N/A	SI	NO	N/A	N/A

COCAÍNA						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	7,046	0,154	33493,75	2,523	14,91749	1,8112
2	7,048	0,156	32658,98	2,524	14,85246	1,81387
3	7,042	0,154	33455,74	2,521	14,84868	1,81041
4	7,056	0,153	34029,4	2,528	15,07895	1,82923
5	7,064	0,151	35016,08	2,532	15,3	1,82882
Promedio	7,051	0,154	33730,79	2,526	14,99952	1,81871
S.D	0,009	0,002	869,159	0,004	0,192	0,01
R.S.D	0,125	1,183	2,577	0,174	1,281	0,523
Cumple	SI	N/A	SI	SI	SI	N/A

BENZOILECGONINA						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	7,425	0,153	37681,66	2,713	2,46906	1,07511
2	7,425	0,158	35334,48	2,713	2,40127	1,07468
3	7,424	0,152	38168,82	2,712	2,49673	1,07576
4	7,421	0,156	36207,26	2,711	2,36246	1,07219
5	7,427	0,152	38199,67	2,714	2,39604	1,07168
Promedio	7,424	0,154	37118,38	2,712	2,42511	1,07389
S.D	0,002	0,003	1284,751	0,001	0,056	0,002
R.S.D	0,03	1,74	3,461	0,04	2,296	0,17
Cumple	SI	N/A	SI	SI	SI	N/A

ANALITOS DE COCAÍNA EN SANGRE						
LIDOCAÍNA						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	4,844	0,134	20908,3	1,422	N/A	N/A
2	4,837	0,137	19944,86	1,419	N/A	N/A
3	4,84	0,135	20565,68	1,42	N/A	N/A
4	4,818	0,134	20684,45	1,409	N/A	N/A
5	4,818	0,136	20080,56	1,409	N/A	N/A
Promedio	4,831	0,135	20436,77	1,416	N/A	N/A
S.D	0,012	0,001	409,012	0,006	N/A	N/A
R.S.D	0,258	0,964	2,001	0,441	N/A	N/A
Cumple	SI	N/A	SI	NO	N/A	N/A

COCAÍNA						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	7,086	0,178	25356,09	2,543	14,37179	1,78833
2	7,084	0,176	25921	2,542	14,35783	1,79203
3	7,099	0,174	26632,74	2,55	14,62136	1,79542
4	7,086	0,174	26535,29	2,543	14,72727	1,80483
5	7,09	0,173	26873,25	2,545	14,7055	1,80625
Promedio	7,089	0,175	26263,67	2,545	14,55675	1,79737
S.D	0,006	0,002	616,99	0,003	0,18	0,008
R.S.D	0,085	1,143	2,349	0,118	1,234	0,438
Cumple	SI	N/A	SI	SI	SI	N/A

BENZOILECGONINA						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	7,495	0,174	29686,89	2,748	2,32386	1,08042
2	7,498	0,175	29372,08	2,749	2,35897	1,08143
3	7,5	0,178	28405,5	2,75	2,27841	1,07864
4	7,491	0,173	29999,04	2,746	2,33429	1,07963
5	7,493	0,174	29671,05	2,747	2,32277	1,07917
Promedio	7,495	0,175	29426,92	2,748	2,32366	1,07986
S.D	0,004	0,002	612,537	0,002	0,029	0,001
R.S.D	0,049	1,1	2,082	0,066	1,256	0,101
Cumple	SI	N/A	SI	SI	SI	N/A

**Anexo 3. Idoneidad y Especificidad del sistema cromatográfico analitos
Cannabinoides.**

ANALITOS DE CANNABINOIDES EN AGUA						
THC-COOH						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	12,644	0,067	569822,182	5,322	N/A	N/A
2	12,652	0,069	537947,840	5,326	N/A	N/A
3	12,651	0,066	587870,711	5,326	N/A	N/A
4	12,646	0,069	537437,735	5,323	N/A	N/A
5	12,649	0,070	522439,840	5,325	N/A	N/A
Promedio	12,648	0,068	551103,661	5,324	N/A	N/A
S.D	0,003	0,002	26849,799	0,002	N/A	N/A
R.S.D	0,027	2,409	4,872	0,032	N/A	N/A
Cumple	SI	N/A	SI	SI	N/A	N/A
THC-Δ9						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	12,754	0,072	502050,975	5,377	1,58273	1,01033
2	12,762	0,072	502681,000	5,381	1,56028	1,01033
3	12,754	0,069	546656,639	5,377	1,52593	1,00967
4	12,756	0,069	546828,098	5,378	1,59420	1,01033
5	12,762	0,071	516940,747	5,381	1,60284	1,01061
Promedio	12,758	0,071	523031,492	5,379	1,57320	1,01026
S.D	0,004	0,002	22449,097	0,002	0,031	0,000
R.S.D	0,032	2,148	4,292	0,038	1,962	0,035
Cumple	SI	N/A	SI	SI	NO	N/A

ANALITOS DE CANNABINOIDES EN ORINA						
THC-COOH						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	12,603	0,077	428633,791	5,302	N/A	N/A
2	12,616	0,075	452731,608	5,308	N/A	N/A
3	12,604	0,075	451870,766	5,302	N/A	N/A
4	12,613	0,077	429314,270	5,307	N/A	N/A
5	12,612	0,074	464755,424	5,306	N/A	N/A
Promedio	12,610	0,076	445461,172	5,305	N/A	N/A
S.D	0,006	0,001	15890,984	0,003	N/A	N/A
R.S.D	0,046	1,775	3,567	0,054	N/A	N/A
Cumple	SI	N/A	SI	SI	N/A	N/A
THC-Δ9						
Repetición	Tr (min)	W (min)	N	k'	R	α
1	12,758	0,085	360451,906	5,379	1,91358	1,01462
2	12,758	0,085	360451,906	5,379	1,77500	1,01338
3	12,762	0,084	369316,653	5,381	1,98742	1,01490
4	12,757	0,086	352062,843	5,379	1,76687	1,01357
5	12,762	0,086	352338,873	5,381	1,87500	1,01413
Promedio	12,759	0,085	358924,436	5,380	1,86357	1,01412
S.D	0,002	0,001	7125,932	0,001	0,094	0,001
R.S.D	0,019	0,982	1,985	0,022	5,031	0,065
Cumple	SI	N/A	SI	SI	NO	N/A

Anexo 4.Límite de detección en sistema y método.

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
0,7 ppm(agua)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	7,136	7,136	7,113	1	7,528	7,54	7,494
2	7,004	7,009	7,113	2	7,425	7,505	7,505
3	7,079	7,094	7,113	3	7,436	7,425	7,459
Promedio	7,088555556			Promedio	7,479666667		
Desviación Estándar (S.D)	0,049867602			Desviación Estándar (S.D)	0,044407207		
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,7035			Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,5937		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
1,2 ppm(agua)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	7,113	7,136	7,148	1	7,528	7,528	7,528
2	7,102	7,136	7,136	2	7,436	7,425	7,436
3	7,182	7,136	7,148	3	7,425	7,425	7,425
Promedio	7,137444444			Promedio	7,461777778		
Desviación Estándar (S.D)	0,022556103			Desviación Estándar (S.D)	0,049869274		
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,316			Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,6683		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
1,5 ppm(agua)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	7,102	7,032	7,102	1	7,505	7,54	7,563
2	7,101	7,101	7,101	2	7,563	7,505	7,54
3	7,113	7,101	7,113	3	7,54	7,563	7,563
Promedio	7,096222222			Promedio	7,542444444		
Desviación Estándar (S.D)	0,02461086			Desviación Estándar (S.D)	0,023749269		
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,3468			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,3149		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
0,7 ppm(orina)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	7,032	7,102	7,102	1	7,54	7,528	7,54
2	7,032	7,032	7,102	2	7,563	7,54	7,45
3	7,032	7,102	7,032	3	7,528	7,54	7,563
Promedio	7,063111111			Promedio	7,532444444		
Desviación Estándar (S.D)	0,036893239			Desviación Estándar (S.D)	0,033414485		
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,5223			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,4436		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
1,2 ppm(orina)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	6,975	7,009	7,009	1	7,54	7,563	7,563
2	6,94	6,975	6,975	2	7,459	7,528	7,528
3	6,998	6,998	7,009	3	7,459	7,528	7,459
Promedio	6,98755556			Promedio	7,51411111		
Desviación Estándar (S.D)	0,023270749			Desviación Estándar (S.D)	0,043504151		
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,333			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,579		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
1,5 ppm(orina)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	7,113	6,975	7,102	1	7,528	7,54	7,54
2	7,113	7,032	7,113	2	7,563	7,54	7,459
3	7,102	7,113	7,113	3	7,459	7,528	7,528
Promedio	7,08622222			Promedio	7,52055556		
Desviación Estándar (S.D)	0,049236109			Desviación Estándar (S.D)	0,036538032		
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,6948			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,4858		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
0,7 ppm(sangre)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	6,905	6,963	6,963	1	7,471	7,54	7,471
2	6,94	6,94	6,963	2	7,54	7,471	7,54
3	6,905	6,94	6,94	3	7,505	7,471	7,505
Promedio	6,939888889			Promedio	7,501555556		
Desviación Estándar (S.D)	0,022463551			Desviación Estándar (S.D)	0,032000434		
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,3237			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,4266		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
1,2 ppm(sangre)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	6,96 3	6,975	6,963	1	7,54	7,54	7,54
2	6,96 3	6,963	6,963	2	7,505	7,505	7,54
3	6,98 2	6,982	6,963	3	7,505	7,563	7,471
Promedio	6,968555556			Promedio	7,523222222		
Desviación Estándar (S.D)	0,008574834			Desviación Estándar (S.D)	0,028353914		
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,1231			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,3769		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA COCAÍNA							
1,5 ppm(sangre)							
Repetición	Tr (min) Inyecciones Cocaína			Repetición	Tr (min) Inyecciones Benzoilecgonina		
	1	2	3		1	2	3
1	6,963	6,963	6,963	1	7,505	7,54	7,505
2	6,982	6,982	6,982	2	7,528	7,528	7,505
3	7,032	7,032	6,982	3	7,54	7,505	7,54
Promedio	6,986777778			Promedio	7,521777778		
Desviación Estándar (S.D)	0,027105248			Desviación Estándar (S.D)	0,016581449		
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,388			Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,2204		

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA CANNABINOIDES						
1,5 (agua)						
Repetición	Tr (min) Inyecciones THC-COOH			Repetición	Tr (min) Inyecciones THC-Δ9	
	1	2	3		1	2
1	12,616	12,616	12,616	1	12,662	12,685
2	12,616	12,673	12,673	2	12,662	12,673
3	12,662	12,673	12,662	3	12,662	12,673
Promedio	12,64522222			Promedio	12,6695	
Desviación Estándar (S.D)	0,028048074			Desviación Estándar (S.D)	0,009311283	
Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,2218			Coefficiente de Variación (R.S.D)	0,0735	

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA CANNABINOIDES						
1,5 (orina)						
Repetición	Tr (min) Inyecciones THC-COOH			Repetición	Tr (min) Inyecciones THC-Δ9	
	1	2	3		1	2
1	12,639	12,639	12,639	1	12,708	12,708
2	12,65	12,627	12,627	2	12,72	12,708
3	12,539	12,65	12,65	3	12,72	12,72
Promedio	12,62888889			Promedio	12,714	
Desviación Estándar (S.D)	0,034876369			Desviación Estándar (S.D)	0,006572671	
Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,2762			Coeficiente de Variación (R.S.D)	0,0517	

Anexo 5. Precisión Intermedia de analitos Cocaína

Lidocaína

Lidocaína: Agua							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	1	4,910	4,875	4,944	4,944	4,956	4,944
	2	4,886	4,875	4,944	4,944	4,944	4,944
	3	4,886	4,875	4,944	4,944	4,944	4,910
2	1	4,875	4,875	4,840	4,990	4,910	4,910
	2	4,875	4,875	4,840	4,990	4,944	4,910
	3	4,875	4,886	4,840	4,990	4,921	4,910
3	1	4,840	4,840	4,852	4,990	4,910	4,910
	2	4,840	4,840	4,852	4,994	4,944	4,910
	3	4,840	4,840	4,852	4,990	4,910	4,910
4	1	4,840	4,840	4,840	4,944	4,909	4,910
	2	4,852	4,852	4,840	4,944	4,910	4,910
	3	4,840	4,852	4,840	4,944	4,910	4,910
5	1	4,852	4,852	4,990	4,990	4,909	4,956
	2	4,840	4,852	4,886	4,990	4,910	4,990
	3	4,840	4,840	4,886	4,990	4,910	4,979
Promedio Global		4,903					
S.D Global		0,050215759					
R.S.D Global		1,024156509					

Lidocaína: Orina							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	4,840	4,840	4,783	4,875	4,956	4,887
	2	4,852	4,852	4,783	4,875	4,956	4,910
	3	4,840	4,852	4,783	4,875	4,910	4,909
2	1	4,840	4,887	4,875	4,910	4,944	4,886
	2	4,840	4,886	4,875	4,910	4,944	4,886
	3	4,840	4,887	4,875	4,910	4,944	4,886
3	1	4,840	4,840	4,875	4,910	4,904	4,886
	2	4,840	4,840	4,875	4,910	4,910	4,886
	3	4,852	4,852	4,875	4,910	4,910	4,886
4	1	4,840	4,886	4,875	4,875	4,886	4,887
	2	4,840	4,875	4,875	4,875	4,910	4,887
	3	4,852	4,886	4,875	4,875	4,887	4,886
5	1	4,852	4,840	4,817	4,910	4,887	4,910
	2	4,852	4,852	4,817	4,921	4,875	4,910
	3	4,852	4,875	4,817	4,921	4,875	4,910
Promedio Global		4,876					
S.D Global		0,035298034					
R.S.D Global		0,7238659					

Lidocaína: Sangre							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	4,840	4,852	4,817	4,921	4,852	4,875
	2	4,852	4,840	4,817	4,921	4,852	4,852
	3	4,840	4,840	4,817	4,921	4,852	4,875
2	1	4,840	4,817	4,875	4,921	4,852	4,875
	2	4,840	4,840	4,875	4,921	4,852	4,887
	3	4,841	4,817	4,875	4,921	4,852	4,875
3	1	4,817	4,817	4,840	4,875	4,875	4,852
	2	4,840	4,817	4,840	4,875	4,875	4,852
	3	4,840	4,817	4,840	4,875	4,875	4,852
4	1	4,840	4,817	4,875	4,840	4,875	4,840
	2	4,840	4,817	4,875	4,840	4,875	4,852
	3	4,840	4,852	4,875	4,840	4,875	4,852
5	1	4,817	4,852	4,806	4,840	4,852	4,852
	2	4,817	4,852	4,806	4,840	4,875	4,852
	3	4,817	4,852	4,806	4,840	4,84	4,852
Promedio Global		4,852					
S.D Global		0,02749905					
R.S.D Global		0,566764796					

Cocaína

Cocaína: Agua							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	7,182	7,113	7,182	7,292	7,148	7,113
	2	7,113	7,113	7,182	7,298	7,171	7,148
	3	7,113	7,102	7,182	7,298	7,182	7,136
2	1	7,113	7,113	7,079	7,298	7,102	7,182
	2	7,113	7,113	7,079	7,298	7,101	7,148
	3	7,102	7,113	7,078	7,298	7,113	7,182
3	1	7,101	7,136	7,148	7,298	7,113	7,148
	2	7,101	7,102	7,148	7,298	7,148	7,148
	3	7,102	7,136	7,148	7,298	7,136	7,136
4	1	7,113	7,113	7,078	7,182	7,148	7,148
	2	7,113	7,113	7,078	7,182	7,113	7,148
	3	7,113	7,113	7,079	7,182	7,148	7,148
5	1	7,113	7,113	7,044	7,298	7,101	7,229
	2	7,136	7,113	7,044	7,298	7,113	7,217
	3	7,136	7,136	7,113	7,298	7,101	7,217
Promedio Global		7,152					
S.D Global		0,066858806					
R.S.D Global		0,934841222					

Cocaína: Orina							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	7,148	7,113	7,136	7,228	7,101	7,171
	2	7,113	7,136	7,136	7,228	7,113	7,148
	3	7,136	7,136	7,136	7,228	7,113	7,171
2	1	7,113	7,113	7,171	7,286	7,171	7,182
	2	7,113	7,148	7,171	7,286	7,136	7,148
	3	7,102	7,171	7,171	7,286	7,113	7,182
3	1	7,136	7,113	7,136	7,182	7,101	7,148
	2	7,113	7,113	7,136	7,182	7,102	7,182
	3	7,113	7,148	7,136	7,182	7,102	7,182
4	1	7,136	7,148	7,136	7,217	7,101	7,171
	2	7,136	7,136	7,136	7,217	7,136	7,113
	3	7,113	7,136	7,136	7,182	7,102	7,113
5	1	7,136	7,136	7,136	7,217	7,113	7,182
	2	7,136	7,136	7,136	7,217	7,136	7,171
	3	7,136	7,136	7,136	7,217	7,102	7,171
Promedio Global		7,151					
S.D Global		0,041878076					
R.S.D Global		0,585638196					

Cocaína: Sangre							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	7,136	7,136	7,136	7,182	7,113	7,148
	2	7,148	7,113	7,136	7,182	7,113	7,148
	3	7,136	7,113	7,136	7,182	7,113	7,136
2	1	7,136	7,113	7,136	7,171	7,113	7,171
	2	7,136	7,113	7,136	7,171	7,136	7,148
	3	7,136	7,113	7,136	7,171	7,113	7,148
3	1	7,136	7,113	7,136	7,136	7,136	7,136
	2	7,148	7,113	7,136	7,136	7,113	7,113
	3	7,136	7,113	7,136	7,136	7,113	7,113
4	1	7,136	7,136	7,171	7,101	7,148	7,113
	2	7,113	7,136	7,171	7,102	7,136	7,101
	3	7,136	7,113	7,171	7,101	7,148	7,101
5	1	7,136	7,136	7,101	7,136	7,113	7,136
	2	7,136	7,171	7,171	7,136	7,136	7,136
	3	7,136	7,113	7,101	7,136	7,136	7,113
Promedio Global		7,134					
S.D Global		0,020836574					
R.S.D Global		0,292094218					

Benzoilecgonina

Benzoilecgonina: Agua							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	7,459	7,459	7,471	7,494	7,494	7,459
	2	7,459	7,459	7,471	7,494	7,494	7,459
	3	7,459	7,459	7,471	7,494	7,459	7,459
2	1	7,459	7,471	7,436	7,494	7,425	7,471
	2	7,459	7,459	7,436	7,494	7,425	7,471
	3	7,459	7,459	7,436	7,494	7,436	7,471
3	1	7,459	7,459	7,459	7,494	7,459	7,494
	2	7,459	7,459	7,459	7,494	7,459	7,471
	3	7,459	7,459	7,459	7,494	7,436	7,436
4	1	7,471	7,459	7,436	7,459	7,436	7,459
	2	7,471	7,459	7,436	7,459	7,436	7,471
	3	7,471	7,459	7,436	7,459	7,436	7,459
5	1	7,459	7,459	7,425	7,494	7,436	7,494
	2	7,459	7,436	7,424	7,494	7,425	7,471
	3	7,471	7,459	7,459	7,459	7,436	7,505
Promedio Global		7,461					
S.D Global		0,020038854					
R.S.D Global		0,268564149					

Benzoilecgonina: Orina							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	7,459	7,459	7,436	7,471	7,424	7,459
	2	7,459	7,459	7,436	7,471	7,425	7,471
	3	7,459	7,459	7,436	7,471	7,425	7,471
2	1	7,459	7,471	7,436	7,471	7,459	7,471
	2	7,459	7,459	7,436	7,471	7,471	7,471
	3	7,459	7,459	7,436	7,471	7,471	7,459
3	1	7,459	7,459	7,436	7,471	7,424	7,459
	2	7,459	7,459	7,436	7,471	7,459	7,459
	3	7,459	7,459	7,436	7,471	7,436	7,459
4	1	7,471	7,459	7,436	7,471	7,424	7,459
	2	7,471	7,459	7,436	7,471	7,436	7,436
	3	7,459	7,471	7,436	7,471	7,425	7,436
5	1	7,459	7,459	7,459	7,471	7,436	7,459
	2	7,459	7,436	7,459	7,471	7,436	7,471
	3	7,436	7,459	7,459	7,471	7,425	7,459
Promedio Global		7,455					
S.D Global		0,015339475					
R.S.D Global		0,205769796					

Benzoilecgonina: Sangre							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	7,459	7,459	7,436	7,459	7,424	7,436
	2	7,459	7,471	7,436	7,459	7,436	7,436
	3	7,459	7,459	7,436	7,459	7,436	7,436
2	1	7,471	7,471	7,436	7,471	7,425	7,459
	2	7,471	7,471	7,436	7,471	7,425	7,436
	3	7,459	7,471	7,436	7,471	7,424	7,459
3	1	7,471	7,471	7,436	7,459	7,436	7,436
	2	7,471	7,459	7,436	7,459	7,436	7,459
	3	7,471	7,459	7,436	7,459	7,459	7,436
4	1	7,459	7,471	7,459	7,436	7,459	7,425
	2	7,459	7,471	7,459	7,436	7,459	7,436
	3	7,459	7,471	7,459	7,436	7,436	7,436
5	1	7,471	7,459	7,459	7,471	7,425	7,424
	2	7,459	7,471	7,459	7,471	7,436	7,436
	3	7,459	7,459	7,459	7,436	7,436	7,436
Promedio Global		7,451					
S.D Global		0,015630443					
R.S.D Global		0,20976737					

Anexo 6. Precisión Intermedia de analitos Cannabinoides

THC-COOH

THC-COOH: Agua							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	12,424	12,477	12,708	12,743	12,743	12,800
	2	12,489	12,500	12,685	12,743	12,870	12,835
	3	12,477	12,489	12,662	12,743	12,731	12,824
2	1	12,489	12,420	12,673	12,558	12,673	12,570
	2	12,489	12,431	12,650	12,558	12,731	12,558
	3	12,489	12,408	12,662	12,547	12,697	12,547
3	1	12,489	12,454	12,743	12,731	12,743	12,777
	2	12,489	12,466	12,743	12,731	12,766	12,743
	3	12,477	12,454	12,754	12,731	12,766	12,731
4	1	12,489	12,489	12,708	12,616	12,754	12,651
	2	12,501	12,477	12,650	12,627	12,754	12,627
	3	12,489	12,478	12,650	12,627	12,708	12,616
5	1	12,501	12,454	12,708	12,650	12,708	12,720
	2	12,489	12,443	12,731	12,627	12,754	12,662
	3	12,478	12,454	12,731	12,685	12,731	12,731
Promedio Global		12,623					
S.D Global		0,12301704					
R.S.D Global		0,9746					

THC-COOH: Orina							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	1	12,454	12,420	12,731	12,731	12,784	12,697
	2	12,454	12,420	12,720	12,697	12,789	12,697
	3	12,443	12,420	12,731	12,685	12,789	12,651
2	1	12,466	12,466	12,708	12,697	12,662	12,754
	2	12,454	12,446	12,697	12,685	12,685	12,720
	3	12,454	12,480	12,697	12,651	12,697	12,720
3	1	12,466	12,477	12,662	12,697	12,662	12,766
	2	12,466	12,420	12,674	12,674	12,627	12,731
	3	12,454	12,466	12,662	12,674	12,627	12,720
4	1	12,454	12,500	12,662	12,627	12,662	12,697
	2	12,466	12,501	12,616	12,593	12,628	12,720
	3	12,454	12,501	12,639	12,604	12,616	12,697
5	1	12,466	12,454	12,674	12,697	12,662	12,650
	2	12,477	12,443	12,697	12,697	12,651	12,662
	3	12,466	12,443	12,651	12,697	12,662	12,651
Promedio Global		12,609					
S.D Global		0,113557876					
R.S.D Global		0,9006					

THC-Δ9

THC-Δ9: Agua							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	12,588	12,558	12,708	12,743	12,743	12,800
	2	12,547	12,535	12,754	12,743	12,870	12,835
	3	12,535	12,547	12,720	12,743	12,731	12,824
2	1	12,535	12,512	12,743	12,570	12,673	12,570
	2	12,535	12,431	12,731	12,604	12,731	12,558
	3	12,535	12,420	12,720	12,570	12,697	12,547
3	1	12,547	12,501	12,743	12,731	12,743	12,777
	2	12,547	12,535	12,743	12,731	12,766	12,743
	3	12,547	12,512	12,754	12,731	12,766	12,731
4	1	12,548	12,500	12,708	12,616	12,754	12,651
	2	12,535	12,500	12,650	12,627	12,754	12,627
	3	12,558	12,501	12,650	12,627	12,708	12,616
5	1	12,558	12,454	12,708	12,650	12,708	12,720
	2	12,535	12,443	12,731	12,627	12,754	12,662
	3	12,535	12,454	12,731	12,685	12,731	12,731
Promedio Global		12,643					
S.D Global		0,106991106					
R.S.D Global		0,8462					

THC-Δ9: Orina							
Días		1		2		3	
Repetición	Inyección	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista	Analista
		1	2	1	2	1	2
1	1	12,454	12,477	12,731	12,731	12,789	12,697
	2	12,512	12,466	12,720	12,697	12,789	12,697
	3	12,512	12,524	12,731	12,685	12,789	12,651
2	1	12,500	12,581	12,708	12,697	12,662	12,754
	2	12,500	12,501	12,697	12,685	12,685	12,720
	3	12,512	12,547	12,697	12,651	12,697	12,720
3	1	12,489	12,558	12,662	12,697	12,662	12,766
	2	12,489	12,547	12,674	12,674	12,627	12,731
	3	12,489	12,500	12,662	12,674	12,627	12,720
4	1	12,489	12,535	12,662	12,627	12,662	12,697
	2	12,500	12,500	12,616	12,639	12,628	12,720
	3	12,489	12,547	12,639	12,604	12,616	12,697
5	1	12,524	12,512	12,674	12,697	12,662	12,650
	2	12,535	12,524	12,697	12,697	12,651	12,662
	3	12,524	12,501	12,651	12,697	12,662	12,651
Promedio Global		12,627					
S.D Global		0,090849711					
R.S.D Global		0,7195					

Anexo 7. Análisis de varianza ANOVA de analitos Cocaína

Lidocaína en agua

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	29,573	4,9288333	0,0009362
Fila 2	6	29,537	4,9228333	0,0010874
Fila 3	6	29,503	4,9171667	0,0009922
Fila 4	6	29,400	4,9000000	0,0026300
Fila 5	6	29,434	4,9056667	0,0029587
Fila 6	6	29,422	4,9036667	0,0025963
Fila 7	6	29,342	4,8903333	0,0034487
Fila 8	6	29,380	4,8966667	0,0040619
Fila 9	6	29,342	4,8903333	0,0034487
Fila 10	6	29,283	4,8805000	0,0021271
Fila 11	6	29,308	4,8846667	0,0017867
Fila 12	6	29,296	4,8826667	0,0019675
Fila 13	6	29,549	4,9248333	0,0040650
Fila 14	6	29,468	4,9113333	0,0043259
Fila 15	6	29,445	4,9075000	0,0042999

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,13177681	14	0,00941263	0,79586856	0,67056779	1,82590825
Dentro de los grupos	0,88701481	75	0,01182686			
Total	1,01879162	89				

Lidocaína en orina

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	29,181	4,863500	0,003365
Fila 2	6	29,228	4,871333	0,003445
Fila 3	6	29,169	4,861500	0,002301
Fila 4	6	29,342	4,890333	0,001213
Fila 5	6	29,341	4,890167	0,001215
Fila 6	6	29,342	4,890333	0,001213
Fila 7	6	29,255	4,875833	0,000927
Fila 8	6	29,261	4,876833	0,001000
Fila 9	6	29,285	4,880833	0,000685
Fila 10	6	29,249	4,874833	0,000322
Fila 11	6	29,262	4,877000	0,000514
Fila 12	6	29,261	4,876833	0,000179
Fila 13	6	29,216	4,869333	0,001504
Fila 14	6	29,227	4,871167	0,001535
Fila 15	6	29,250	4,875000	0,001447

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,00656549	14	0,00046896	0,33714395	0,98668704	1,82590825
Dentro de los grupos	0,10432417	75	0,00139099			
Total	0,11088966	89				

Lidocaína en sangre.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	29,157	4,85950000	0,00126430
Fila 2	6	29,134	4,85566667	0,00120987
Fila 3	6	29,145	4,85750000	0,00132430
Fila 4	6	29,180	4,86333333	0,00128347
Fila 5	6	29,215	4,86916667	0,00100697
Fila 6	6	29,181	4,86350000	0,00127430
Fila 7	6	29,076	4,84600000	0,00068720
Fila 8	6	29,099	4,84983333	0,00050857
Fila 9	6	29,099	4,84983333	0,00050857
Fila 10	6	29,087	4,84783333	0,00052217
Fila 11	6	29,099	4,84983333	0,00050857
Fila 12	6	29,134	4,85566667	0,00025307
Fila 13	6	29,019	4,83650000	0,00040870
Fila 14	6	29,042	4,84033333	0,00063947
Fila 15	6	29,007	4,83450000	0,00035830

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0085126	14	0,00060804	0,77570998	0,69144388	1,8259082 5
Dentro de los grupos	0,058789	75	0,00078385			
Total	0,0673016	89				

Cocaína en agua

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	43,030	7,17166667	0,0044275
Fila 2	6	43,025	7,17083333	0,0047014
Fila 3	6	43,013	7,16883333	0,0051386
Fila 4	6	42,887	7,14783333	0,0065966
Fila 5	6	42,852	7,14200000	0,0063408
Fila 6	6	42,886	7,14766667	0,0066243
Fila 7	6	42,944	7,15733333	0,0051111
Fila 8	6	42,945	7,15750000	0,0052567
Fila 9	6	42,956	7,15933333	0,0048555
Fila 10	6	42,782	7,13033333	0,0013267
Fila 11	6	42,747	7,12450000	0,0012835
Fila 12	6	42,783	7,13050000	0,0013059
Fila 13	6	42,898	7,14966667	0,0089039
Fila 14	6	42,921	7,15350000	0,0080979
Fila 15	6	43,001	7,16683333	0,0057710

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,01913356	14	0,0013666 83	0,27066213	0,995548068	1,825908247
Dentro de los grupos	0,37870533	75	0,0050494 04			
Total	0,39783889	89				

Cocaína en orina

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	42,897	7,1495000	0,002099
Fila 2	6	42,874	7,1456667	0,001821
Fila 3	6	42,920	7,1533333	0,001683
Fila 4	6	43,036	7,1726667	0,004011
Fila 5	6	43,002	7,1670000	0,003755
Fila 6	6	43,025	7,1708333	0,004294
Fila 7	6	42,816	7,1360000	0,000803
Fila 8	6	42,828	7,1380000	0,001284
Fila 9	6	42,863	7,1438333	0,001139
Fila 10	6	42,909	7,1515000	0,001543
Fila 11	6	42,874	7,1456667	0,001306
Fila 12	6	42,782	7,1303333	0,000827
Fila 13	6	42,920	7,1533333	0,001481
Fila 14	6	42,932	7,1553333	0,001109
Fila 15	6	42,898	7,1496667	0,001564

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,01249049	14	0,00089218	0,46598543	0,94412237	1,82590825
Dentro de los grupos	0,14359533	75	0,0019146			
Total	0,15608582	89				

Cocaína en sangre.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	42,851	7,1418333	0,000517
Fila 2	6	42,840	7,1400000	0,000673
Fila 3	6	42,816	7,1360000	0,000635
Fila 4	6	42,840	7,1400000	0,000682
Fila 5	6	42,840	7,1400000	0,000360
Fila 6	6	42,817	7,1361667	0,000485
Fila 7	6	42,793	7,1321667	0,000088
Fila 8	6	42,759	7,1265000	0,000238
Fila 9	6	42,747	7,1245000	0,000159
Fila 10	6	42,805	7,1341667	0,000621
Fila 11	6	42,759	7,1265000	0,000719
Fila 12	6	42,770	7,1283333	0,000799
Fila 13	6	42,758	7,1263333	0,000239
Fila 14	6	42,886	7,1476667	0,000327
Fila 15	6	42,735	7,1225000	0,000238

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00474316	14	0,0003388	0,74960946	0,7181644	1,82590825
Dentro de los grupos	0,03389733	75	0,00045196			
Total	0,03864049	89				

Benzoilecgonina en agua

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	44,836	7,4726667	0,000295
Fila 2	6	44,836	7,4726667	0,000295
Fila 3	6	44,801	7,4668333	0,000200
Fila 4	6	44,756	7,4593333	0,000639
Fila 5	6	44,744	7,4573333	0,000607
Fila 6	6	44,755	7,4591667	0,000485
Fila 7	6	44,824	7,4706667	0,000327
Fila 8	6	44,801	7,4668333	0,000200
Fila 9	6	44,743	7,4571667	0,000453
Fila 10	6	44,720	7,4533333	0,000202
Fila 11	6	44,732	7,4553333	0,000253
Fila 12	6	44,720	7,4533333	0,000202
Fila 13	6	44,767	7,4611667	0,000821
Fila 14	6	44,709	7,4515000	0,000788
Fila 15	6	44,789	7,4648333	0,000517

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00431529	14	0,00030823	0,73568712	0,7322248	1,82590825
Dentro de los grupos	0,03142317	75	0,00041898			
Total	0,03573846	89				

Benzoilecgonina en orina

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	44,708	7,4513333	0,000309
Fila 2	6	44,721	7,4535000	0,000358
Fila 3	6	44,721	7,4535000	0,000358
Fila 4	6	44,767	7,4611667	0,000187
Fila 5	6	44,767	7,4611667	0,000187
Fila 6	6	44,755	7,4591667	0,000163
Fila 7	6	44,708	7,4513333	0,000309
Fila 8	6	44,743	7,4571667	0,000131
Fila 9	6	44,720	7,4533333	0,000202
Fila 10	6	44,720	7,4533333	0,000370
Fila 11	6	44,709	7,4515000	0,000308
Fila 12	6	44,698	7,4496667	0,000396
Fila 13	6	44,743	7,4571667	0,000131
Fila 14	6	44,732	7,4553333	0,000253
Fila 15	6	44,709	7,4515000	0,000298

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00114749	14	8,1963E-05	0,31055927	0,99106937	1,82590825
Dentro de los grupos	0,01979417	75	0,00026392			
Total	0,02094166	89				

Benzoilecgonina en sangre

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	44,6730	7,4455000	0,000238
Fila 2	6	44,6970	7,4495000	0,000238
Fila 3	6	44,6850	7,4475000	0,000159
Fila 4	6	44,7330	7,4555000	0,000409
Fila 5	6	44,7100	7,4516667	0,000465
Fila 6	6	44,7200	7,4533333	0,000370
Fila 7	6	44,7090	7,4515000	0,000308
Fila 8	6	44,7200	7,4533333	0,000202
Fila 9	6	44,7200	7,4533333	0,000202
Fila 10	6	44,7090	7,4515000	0,000298
Fila 11	6	44,7200	7,4533333	0,000202
Fila 12	6	44,6970	7,4495000	0,000238
Fila 13	6	44,7090	7,4515000	0,000466
Fila 14	6	44,7320	7,4553333	0,000253
Fila 15	6	44,6850	7,4475000	0,000159

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00071816	14	5,1297E-05	0,18298076	0,99947811	1,82590825
Dentro de los grupos	0,0210255	75	0,00028034			
Total	0,02174366	89				

Anexo 8. Análisis de varianza ANOVA de analitos Cannabinoides

THC-COOH en agua

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	75,895	12,6491667	0,024833
Fila 2	6	76,122	12,6870000	0,026541
Fila 3	6	75,926	12,6543333	0,020273
Fila 4	6	75,383	12,5638333	0,010039
Fila 5	6	75,417	12,5695000	0,011698
Fila 6	6	75,350	12,5583333	0,011528
Fila 7	6	75,937	12,6561667	0,020819
Fila 8	6	75,938	12,6563333	0,019370
Fila 9	6	75,913	12,6521667	0,021142
Fila 10	6	75,707	12,6178333	0,012194
Fila 11	6	75,636	12,6060000	0,010478
Fila 12	6	75,568	12,5946667	0,008437
Fila 13	6	75,741	12,6235000	0,013606
Fila 14	6	75,706	12,6176667	0,016109
Fila 15	6	75,810	12,6350000	0,017512

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,12395627	14	0,00885402	0,54301464	0,89917621	1,82590825
Dentro de los grupos	1,22289783	75	0,0163053			
Total	1,3468541	89				

THC-COOH en orina.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	75,817	12,6361667	0,0246910
Fila 2	6	75,777	12,6295000	0,0234867
Fila 3	6	75,719	12,6198333	0,0234794
Fila 4	6	75,753	12,6255000	0,0161287
Fila 5	6	75,687	12,6145000	0,0164059
Fila 6	6	75,699	12,6165000	0,0139803
Fila 7	6	75,730	12,6216667	0,0149843
Fila 8	6	75,592	12,5986667	0,0158375
Fila 9	6	75,603	12,6005000	0,0127439
Fila 10	6	75,602	12,6003333	0,0098283
Fila 11	6	75,524	12,5873333	0,0084567
Fila 12	6	75,511	12,5851667	0,0081998
Fila 13	6	75,603	12,6005000	0,0120999
Fila 14	6	75,627	12,6045000	0,0129839
Fila 15	6	75,570	12,5950000	0,0121820

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,02024949	14	0,00144639	0,09621742	0,99998937	1,82590825
Dentro de los grupos	1,12744033	75	0,01503254			
Total	1,14768982	89				

THC- Δ 9 en agua

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	76,140	12,690000	0,00917
Fila 2	6	76,284	12,714000	0,02027
Fila 3	6	76,100	12,683333	0,01351
Fila 4	6	75,603	12,600500	0,00791
Fila 5	6	75,590	12,598333	0,01377
Fila 6	6	75,489	12,581500	0,01242
Fila 7	6	76,042	12,673667	0,01389
Fila 8	6	76,065	12,677500	0,01132
Fila 9	6	76,041	12,673500	0,01275
Fila 10	6	75,777	12,629450	0,00915
Fila 11	6	75,693	12,615500	0,00809
Fila 12	6	75,660	12,610000	0,00522
Fila 13	6	75,798	12,633000	0,01135
Fila 14	6	75,752	12,625333	0,01409
Fila 15	6	75,867	12,644500	0,01447

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,02540729	14	0,00181481	0,19192944	0,99931456	1,82590825
Dentro de los grupos	0,70916933	75	0,00945559			
Total	0,73457662	89				

THC- Δ 9 en orina.

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	6	75,879	12,646500	0,020585
Fila 2	6	75,881	12,646833	0,016296
Fila 3	6	75,892	12,648667	0,012403
Fila 4	6	75,902	12,650333	0,008759
Fila 5	6	75,788	12,631333	0,010434
Fila 6	6	75,824	12,637333	0,007602
Fila 7	6	75,834	12,639000	0,009922
Fila 8	6	75,742	12,623667	0,008122
Fila 9	6	75,672	12,612000	0,009181
Fila 10	6	75,672	12,612000	0,006702
Fila 11	6	75,603	12,600500	0,007392
Fila 12	6	75,592	12,598667	0,005264
Fila 13	6	75,719	12,619833	0,006478
Fila 14	6	75,766	12,627667	0,006134
Fila 15	6	75,686	12,614333	0,006560

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,02540729	14	0,00181481	0,19192944	0,99931456	1,82590825
Dentro de los grupos	0,70916933	75	0,00945559			
Total	0,73457662	89				