



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE
ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-TOX-38

VERSION: 09

Rige desde: 07/03/2023

PAGINA: 1 de 46

Elaborado o modificado por:

Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes
Perito, Sección Toxicología

Revisado por Líder Técnico:

Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes
Líder Técnico de Sección/Unidad de
Confirmatorios/Plaguicidas

Visto Bueno Encargado de Calidad:

Dr. Marco Martínez Esquivel
Encargado de Calidad, Sección de
Toxicología

Aprobado por:

Dr. Diego Arias Alfaro
Jefatura, Sección de Toxicología

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	18/04/2018	30/10/2018	Versión Inicial del Procedimiento	06-2018	DAA
02	30/10/2018	15/05/2019	Se modifican LA para algunos analitos. Se modifica el orden del procedimiento y algunos puntos. Se especifican los análisis que requieren hidrólisis de orinas. Se incluye preparación de otras matrices. Se incluyen algunos equipos y materiales. Se indican excepciones en los criterios de aceptación y rechazo	15-2018	DAA
03	15/05/2019	30/07/2019	Se modifican condiciones ambientales, se incluyen otras matrices y sus respectivos blancos de matriz en el alcance, se incluye uso del dilutor. Verificación de arrastre.	06-2019	DAA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE
ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-TOX-38

VERSION: 09

Rige desde: 07/03/2023

PAGINA: 2 de 46

04	30/07/2019	06/12/2019	Se incluye referencia a lista de chequeo, se estandariza la nomenclatura de reactivos, se modifican temperaturas y tiempos aproximados	17-2019	DAA
05	06/12/2019	20/07/2020	Se realizan cambios según los resultados de la validación en el equipo GC/MS 7890A/5975C	28-2019	DAA
06	20/07/2020	03/08/2021	Se incluye MRC en la lista de reactivos y materiales de referencia, inclusión de LA de vísceras en el alcance. Modificar definición de control de arrastre, criterios de aceptación y rechazo.	08-2020	DAA
07	03/08/2021	28/01/2022	Se modifica el reporte de análisis y resultados según guías y estándares de ANSI/ASB. Se define período de utilización de sangre blanco para cannabinoides	12-2021	DAA
08	28/01/2022	07/03/2023	Se elimina el análisis de cocaína en torunda nasal.	02-2022	DAA
09	07/03/2023		Se incluye el procedimiento para análisis de cannabinoides en vísceras	001-2023	DAA

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 3 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

1 Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer un procedimiento para la determinación cualitativa de drogas de abuso (cocaína y sus metabolitos, fenciclidina, metadona, ketamina, opiáceos y cannabinoides) en muestras biológicas en la Sección de Toxicología del Departamento de Ciencias Forenses del O.I.J. de Costa Rica.

2 Alcance:

Este procedimiento permite realizar la identificación y confirmación de drogas de abuso que incluyen cannabinoides (delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC) y drogas alcalinas: metilecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, cocaína, morfina, codeína, monoacetilmorfina, fenciclidina, metadona y ketamina en muestras que hayan dado positivo en los análisis con métodos de escrutinio o preliminares y que según el Listado de tipos de caso de la Sección de Toxicología, corresponda realizar la confirmación de una o más drogas o en casos donde la Autoridad Judicial solicite específicamente alguna de las sustancias analizadas por esta metodología.

Para la determinación se requieren muestras de al menos 1 mL de sangre anticoagulada o suero. Las muestras de orina, 0,5 mL como mínimo, deben hidrolizarse para algunos analitos con el fin de determinar la presencia de los metabolitos que se eliminan como glucorónidos. Para el caso de muestras de hígado o músculo debe utilizarse 1 o 3 g de la muestra (según el homogeneizador utilizado) la cual se homogeniza previo a la extracción con agua desionizada.

Para la preparación de las muestras se utiliza la metodología de Extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos Clean Screen THC (cannabinoides) y cartuchos Clean Screen DAU para los demás analitos. La identificación y confirmación de las drogas de abuso, tanto de cannabinoides como de drogas alcalinas, se realiza mediante análisis en el Cromatógrafo de Gases con Detector de Masas.

La identificación y confirmación de los analitos se establece con base en los criterios de aceptación indicados en el Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense y cuyo cumplimiento se puede verificar en los informes de validación de esta metodología (referencia 3.3 y 3.4). El resumen de los resultados de la validación de drogas de abuso se puede observar en el Anexo 3 (referencia 3.4).

Los estándares internos utilizados para la determinación de drogas de abuso y metabolitos son benzoilecgonina-D3 (benzoilecgonina), cocaína-D3 (cocaína, metilecgonina, cocaetileno, metadona, ketamina y fenciclidina), morfina D3 (morfina y 6-monoacetilmorfina), codeína-D3 (codeína) y carboxy-delta-9-THC-D3 (delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC).

El área del pico obtenido de cada analito es corregida por el área del estándar interno.

En el anexo 2 se presentan los parámetros de identificación de las drogas de abuso validadas, las intensidades relativas mostradas corresponden a la concentración en el Límite Administrativo.

Este procedimiento alcanza límites de detección menores de 30 ng/mL en sangre y de 60 ng/mL en orina de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, metilecgonina, codeína, morfina, metadona y ketamina; De 10 ng/mL en sangre y de 20 ng/mL en orina de fenciclidina y monoacetilmorfina. Por esta razón se establecieron las concentraciones mencionadas como límites administrativos (LA) para las drogas alcalinas.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 4 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Para los cannabinoides, se establecen las siguientes concentraciones como límites administrativos (se obtuvieron límites de detección menores); de 10 ng/mL en sangre para carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC y delta-9-THC y de 15 ng/mL en orina para carboxy-delta-9-THC.

En muestras de vísceras (hígado y músculo rojo) se definen como límites administrativos para cannabinoides: carboxy-delta-9-THC 50 ng/mg y para drogas alcalinas: cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, metilecgonina, codeína, morfina, metadona y ketamina de 60 ng/mg.

De los resultados obtenidos de estabilidad de las muestras en la validación, se desprende que no debe programarse análisis en el equipo cuando no se tenga personal capacitado en la pericia que pueda revisar el progreso de las inyecciones al menos cada 24 horas.

El análisis de cocaína y opiáceos idealmente debe realizarse en un período no mayor a 2 meses a partir del ingreso de las muestras a la Sección de Toxicología.

3 Referencias:

- 3.1** United Chemical Technologies (UCT). Clinical and Forensic Applications Manual, 2015.
- 3.2** Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). 2013. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. J Anal Toxicol, 37:452-474.
- 3.3** Validación de la determinación cualitativa de Drogas de Abuso en matrices biológicas por SPE-GC/MS con el Cromatógrafo de gases con detector de masas 7890B/5977A (GC/MS-2), Informe de Validación: 002-TOX-VAL-INC-2017. Sección Toxicología.
- 3.4** Validación de la determinación cualitativa de Drogas de Abuso en matrices biológicas por SPE-GC/MS con el Cromatógrafo de gases con detector de masas 7890A/5975C (GC/MS-1), Informe de Validación: 002-TOX-VAL-INC-2019. Sección Toxicología.

4 Equipos y Materiales:

Agitador por vibración tipo vortex.

Agitador de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).

Agitador magnético.

Balanza analítica, rango 0,00001 a 30 gramos ($\pm 0,00001$ gramos) y de 30 a 120 gramos ($\pm 0,0001$ gramos), similar o superior.

Balanza semianalítica, rango de 0,001 a 200 gramos ($\pm 0,001$ gramos) similar o superior.

Balones aforados de 5 mL, 100 mL, 500 mL y 1000 mL.

Baño maría con control de temperatura desde aprox. 5,0 °C sobre la temperatura ambiente hasta 96 ± 4 °C.

Baño ultrasónico con timer de 0 a 60 min.

Base de datos "RAS electrónico confirmatorios"

Beakers de vidrio de 50 mL, 250 mL, 500 mL y 1000 mL.

Botellas de vidrio de 500 mL y de 1L o similar.

Botellas plásticas de 250 mL, 500 mL y de 1L o similar.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 5 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Bomba de vacío, de 0 a 30 in. Hg o similar

Cabina de Bioseguridad Clase 2-B2.

Cámara de Bioseguridad tipo I.

Capilla de extracción de gases.

Cartuchos de SPE Clean Screen THC, con reservorio de 10 mL., parte No. ZCTHC020, o similar, deben ser nuevos.

Cartuchos de SPE Clean Screen, con reservorio de 10 mL., parte No. ZCDAu020, o similar, deben ser nuevos.

Centrífuga refrigerada, con una fuerza centrífuga relativa de al menos 5000 r.p.m. Termo Sorvall S16R o similar.

Congelador ($\leq 0^{\circ}\text{C}$)

Dilutor Microlab 600 Series Hamilton, con jeringas de dilución y con jeringas de muestreo con rango de 10 uL a 50000 uL, exactitud menor a $\pm 3,0\%$, o similar.

Etiquetas adhesivas con código micro QR.

Formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental (GC-MS)"

Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso"

Formulario "Registro de preparación de disoluciones".

Formulario "Registro de uso y control de material de referencia".

Gabacha y uniforme de laboratorio.

GC/MS-1: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890, con horno estándar, puerto de inyección split/splitless y con columna capilar polar (HP-5MS) o similar, acoplado a espectrómetro de masas Agilent Technologies modelo 5975C con triple axis detector, bomba turbomolecular y cámara de ionización por impacto electrónico; Un robot multipropósito marca Gerstel, modelo MPS-2, con inyector de líquidos e inyección head space; controlado por una computadora con sistema operativo Windows 10 o superior, capaz de correr el programa "MassHunter Workstation Software" versión B-07.04.2260 o superior que a su vez tenga anidado el software MAESTRO versión 1.4.39.3 / 3.5 para el control de los MPS-2, el programa "MSD Chemstation Rev. F.01.03.2357 o superior; Con al menos las siguientes bibliotecas de espectros de masas: Cayman Spectral Library, SWGDRUG Mass Spectra Library, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2014 y Maurer/Pfleger/Weber Mass Spectral Library 2007.

GC/MS-2: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890B/5977A con horno estándar, puerto de inyección split/splitless y con columna capilar polar (HP-5MS) o similar; Acoplado a espectrómetro de masas Agilent Technologies modelo 5977A con triple axis detector, bomba turbomolecular y cámara de ionización por impacto electrónico; Un robot multipropósito marca Gerstel, modelo MPS-2, con inyector de líquidos e inyección head space; controlado por una computadora con sistema operativo Windows 7 Professional o superior, capaz de correr el programa "MassHunter Workstation Software" versión B-07.04.2260 o superior que a su vez tenga anidado el software MAESTRO versión 1.4.39.3 / 3.5 para el control de los MPS-2, el programa "MSD Chemstation Rev. F.01.03.2357 o superior; Con al menos las siguientes bibliotecas de espectros de masas: Cayman Spectral Library, SWGDRUG Mass Spectra Library, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2014 y Maurer/Pfleger/Weber Mass Spectral Library 2007.

Guantes desechables.

Guías de teflón desechables para cámara SPE Visiprep DL Supelco.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 6 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Homogeneizador de tejidos IKA Ultra Turrax T-18 o con dispersores desechables o similar.

Horno de cromatógrafo, rango 40-250°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) o similar.

Impresora de Etiquetas, Citizen CI-S621 o similar.

Insertos de vidrio para viales Agilent de 2 mL o similar. Son desechables.

Insertos desactivados de vidrio para viales Agilent de 2 mL o similar. Son desechables.

Lector de código de barras.

Lentes de seguridad.

Listado de tipos de caso de la Sección de Toxicología.

Micropipeta ajustable de 100 a 1000 μL o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta ajustable de 10 μL a 100 μL o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta ajustable de 20 μL a 200 μL o similar. Con puntas nuevas.

[Micropipeta automática 20 \$\mu\text{L}\$. Con puntas nuevas.](#)

Viales de vidrio de 18 x 32 mm de 2,0 mL tapa rosca nuevos.

pH metro, calibrado a pH 4,0 y 7,0 con las disoluciones amortiguadoras de referencia (la calibración debe ser diaria), rango 2,0 a 12,0 ($\pm 0,1$ unidades de pH). Similar o superior.

Pinza de disección con punta plana o similar.

Pipeta de vidrio de 5 mL.

Pipetas pasteur de vidrio de espiga corta con algodón nuevas.

Pipeteador automático para repeticiones con dispensado de 1 a 5 mL y sus respectivas puntas (nuevas) de dispensado de 50 mL o similar.

Probetas de 25 mL, 100 mL y 500 mL o similar.

Refrigerador (>0 a 10°C)

Sistema de Evaporación con Nitrógeno N Evap Organomation para 12 muestras con control de temperatura y suministro de Nitrógeno (o similar).

Sistema de Evaporación con Nitrógeno Biotage Turbo Vap LV para 50 muestras con control de temperatura y suministro de Nitrógeno (o similar).

Sistema de extracción en fase sólida para 24 posiciones, Visiprep DL® Supelco o similar.

Tijeras para disección.

Tubos cónicos de plástico desechables con tapa rosca de 15 mL, nuevos.

[Tubos cónicos de plástico desechables con tapa rosca de 50 mL, nuevos.](#)

Tubos de vidrio 13 x 65 mm de 5 mL, nuevos.

Viales ámbar de vidrio silanizado de 5 mL, nuevos.

Nota 1. Lave la cristalería y otro material reutilizable según el Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 7 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Acetato de etilo, calidad p.a.r

Acetato de sodio 100 mM (Ver Anexo 1)

Acetato de sodio 1M (Ver Anexo 1)

Acetato de sodio trihidratado p.a

Acetonitrilo (ACN) p.a.r.

Ácido acético 100 mM (Ver Anexo 1)

Ácido acético 1M (Ver Anexo 1)

Ácido acético glacial p.a

Ácido clorhídrico 100 mM (Ver Anexo 1)

Ácido clorhídrico concentrado p.a.

Agua desionizada tipo II.

BSTFA-TMCS 1%: Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con trimetilclorosilano al 1%, marca Sigma o similar.

BSTFA-TMCS/Acetato de Etilo (50:50), 200µL por cada muestra.

Buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4,5 (Ver Anexo 1)

Buffer de acetato de sodio 1M pH 5,0 (Ver Anexo 1)

Buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5,0 (Ver Anexo 1)

Buffer de fosfatos 100 mM pH 6,0 (Ver Anexo 1)

Cilindro de Helio UAP.

CRM de 100 ug/mL o 1 mg/mL de Glucorónido de carboxy-delta-9-THC, morfina y codeína marca cerilliant o similar.

CRM de 1 mg/mL de drogas de abuso y metabolitos, marca cerilliant o similar: delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC, metilecgonina, benzoilecgonina, cocaetileno, cocaína, morfina, codeína, monoacetilmorfina, fenciclidina, metadona y ketamina.

CRM de 1 mg/mL de estándar interno de benzoilecgonina D3, cocaína D3, codeína D3, morfina D3 y carboxy-delta-9-THC D3 marca cerilliant o similar.

Diclorometano p.a.r.

Diclorometano/Isopropanol/Amoniaco (78/20/2).

Dihidrógeno Fosfato de Potasio calidad p.a (KH₂PO₄)

Disolución de carboxy-delta-9-THC D3 de 2 ug/mL (Ver Anexo 1).

Disolución de cloro al 0,5%. (Anexo 1).

Disolución de enzima glucoronidasa de abalone Sigma SRE0037 igual o superior.

Disolución de glucorónido de carboxy-delta-9-THC de 10 ug/mL (Ver Anexo 1)

Disolución de glucorónido de codeína y/o morfina 100 ug/mL (Ver Anexo 1)

Disolución de hipoclorito de sodio al 10%, 12% o similar.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 8 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Disolución de CRM de cannabinoides de 10 ug/mL (Ver Anexo 1).

Disolución de CRM de cannabinoides de 1 ug/mL (Ver Anexo 1).

Disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL (Ver Anexo 1).

Disolución de CRM de estándares internos de drogas alcalinas de 10 ug/mL (Ver Anexo 1).

Etanol al 95% industrial.

Hexano p.a.r.

Hidróxido de amonio 28 a 30% p.a. (NH₄OH)

Hidróxido de potasio (KOH) 10 M (Ver Anexo 1)

Hidróxido de sodio 10N (Ver Anexo 1)

Hidróxido de sodio p.a. (NaOH)

Hígado blanco

Isopropanol p.a.r.

Metanol p.a.r.

Músculo blanco

Orina blanco.

Sangre blanco. Para la extracción de cannabinoides debe utilizarse sangre blanco con 3 meses o menos de preparada.

Tolueno p.a.r

6 Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Temperatura en la preparación de muestras y extracción en fase sólida.	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Se puede utilizar cámara de bioseguridad tipo I para preparación de la muestra y capilla de extracción de gases para extracción en fase sólida o cabina de bioseguridad clase 2-B2 para ambos procesos.
2	Temperatura durante el análisis en el equipo GC/MS	No es crítico para el proceso	40°C	Estos parámetros no requieren monitoreo continuo debido a que en condiciones de aire acondicionado no se alcanza esa temperatura máxima. Si se presenta un fallo en el aire acondicionado debe registrarse la temperatura antes de realizar el análisis.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 9 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7 Procedimiento:

7.1 Actividades previas al análisis

- 7.1.1** Para la preparación, verificación y conservación del material de referencia, controles en matriz, disoluciones de CRM, disoluciones de estándares internos, disoluciones de glucoronidos refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 7.1.2** Para la preparación, verificación y conservación de reactivos y materiales críticos refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 7.1.3** Para efectos de realizar la extracción de manera eficiente, la cantidad de muestras, blancos de matriz y blancos enriquecidos debe ser de 24 como máximo. El perito encargado de la pericia es el responsable de la lista de análisis de serie, se asigna además un técnico encargado para la preparación e inyección de las muestras.
- 7.1.4** Remita como perito de la Unidad de Drogas/Plaguicidas la lista de casos pendientes de análisis de drogas por GC/MS al técnico encargado de actualizar la Base de datos "RAS electrónico confirmatorios".
- 7.1.5** Realice como técnico encargado una consulta en la Base de datos "RAS electrónico confirmatorios" de los casos pendientes de análisis por drogas de abuso en GC/MS y seleccione la información de esos casos, para ir llenando el formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso" (cannabinoides y drogas alcalinas).
- 7.1.6** Entregue el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso" al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregárselas al técnico encargado del análisis a través del SADCF.

7.2 Preparación del Equipo Instrumental para inyección de muestras líquidas:

- 7.2.1** Siga el punto 7.1 del Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) para la preparación del Equipo Instrumental para inyección de muestras líquidas.
- 7.2.2** Cerciórese de que la jeringa sea de 1 a 10 µL.
- 7.2.3** Siga los pasos 7.7 y 7.8 del Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) si es necesario realizar algún mantenimiento al equipo.
- 7.2.4** Realice, si es necesario, un tuning según el punto 7.3 del Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).
- 7.2.5** Refiérase al Procedimiento para el USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS) para la utilización del formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental (GC-MS)"

7.3 Verificación de reactivos/equipo

- 7.3.1** Utilice gabacha, guantes desechables y lentes de seguridad.
- 7.3.2** Limpie las cámaras de bioseguridad y las capillas de extracción de gases según lo señalado en el PON de "Limpieza, Revisión y Control de áreas de trabajo".
- 7.3.3** Saque del congelador los CRM o las disoluciones de CRM a utilizar y las matrices blanco de (sangre y orina) sin estándares internos previamente extraídos con esta metodología. Espere aproximadamente 20 minutos para que se atemperen.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 10 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

- 7.3.4** Prepare, según corresponda, una disolución de CRM sin extraer, tomando 50 µL de la disolución de CRM de cannabinoides de 10 ug/mL en un vial ámbar silanizado de 5 mL y agregue 20 µl de estándar(es) interno(s). Esta disolución corresponde al control de arrastre en la secuencia.
- 7.3.5** Seque la disolución de cannabinoides con nitrógeno a temperatura ambiente, añada 100 µL de Tolueno mientras va realizando el secado. Utilice una punta de micropipeta plástica nueva por tubo si realiza el secado en el sistema de evaporación con nitrógeno. Si no dispone de puntas de micropipetas nuevas puede utilizar una pipeta pasteur de espiga corta nueva.
- 7.3.6** Prepare, según corresponda, una disolución de CRM sin extraer, tomando 300 µL de la disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL, en un tubo de vidrio de 5 mL y agregue 20 µl de estándar(es) interno(s). Esta disolución corresponde al control de arrastre en la secuencia.
- 7.3.7** Coloque los tubos con drogas alcalinas en el sistema de evaporación con nitrógeno a una temperatura inferior a 40°C.
- 7.3.8** Evapore suavemente regulando el flujo de nitrógeno, de manera que se formen pequeñas ondas en la superficie de la muestra, sin que salpique en las paredes. Retire inmediatamente se seque.
- 7.3.9** Trasvase cuantitativamente la ampolla de 1 mL de BSTFA-TMCS, a un vial de vidrio ambar silanizado de 5 mL y agregue 1 mL de Acetato de Etilo. Tape y mezcle por inversión manual. Rotule y utilice esta mezcla el mismo día de preparación.
- 7.3.10** Añada 200 µL de BSTFA/Acetato de Etilo (50:50) al tubo con la disolución sin extraer y a las matrices blanco previamente extraídas y secas, coloque los tubos en el agitador tipo vortex por aproximadamente 20 segundos.
- 7.3.11** Coloque las muestras en el horno y lleve a una temperatura de 60°C por 10 minutos (cannabis) o 70°C por 30 minutos (drogas alcalinas).
- 7.3.12** Deje enfriar aproximadamente 15 minutos y transvase a los insertos (desactivados en el caso de Cannabinoides). Revise que en los insertos no queden burbujas.
- 7.3.13** Realice el análisis cromatográfico de la disolución de CRM sin extraer seguida de la matriz blanco de sangre sin estándares internos. Si hay muestras de orina en la secuencia, repita el análisis de la disolución de CRM sin extraer seguida de la matriz blanco de orina sin estándares internos. Las matrices blanco corresponden a controles post-arrastre que se analizan antes de la secuencia con muestras reales.
- 7.3.14** Apruebe como perito de la unidad de confirmatorios y plaguicidas, los resultados de la secuencia de verificación (disoluciones de control de arrastre y de las matrices blanco sin estándares internos) antes de realizar el análisis de la secuencia en el equipo si se cumplen los criterios de aceptación y rechazo descritos en este procedimiento. De lo contrario realice las acciones descritas en el apartado 8. de este procedimiento.

7.4 Preparación inicial de las muestras

- 7.4.1** Utilice como perito encargado del análisis de datos, el SADCF para asignarse a todos los casos del Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso" e iniciar el Registro de Análisis en Serie.
- 7.4.2** Revise, como funcionario encargado del análisis, que los objetos entregados por el encargado de la bodega de indicios correspondan a lo solicitado en el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso". Si por alguna razón, debe entregarse un objeto

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 11 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

diferente al solicitado o no se puede entregar ninguno de los objetos de un caso específico, indíquelo en este formulario. Reciba las muestras que va a analizar a través del SADCF.

- 7.4.3** Registre como perito encargado, cada uno de los indicios a analizar en el Registro de Análisis en serie del SADCF iniciado en el punto 7.4.1, revise que la totalidad de indicios a analizar hayan sido registrados. Imprima dos juegos de 4 etiquetas con el número de la orden de trabajo y el número de objeto (uno de estos juegos de etiquetas se utiliza para reembalar los tubos después del análisis).
- 7.4.4** Utilice las etiquetas generadas por el SADCF, para rotular un tubo de plástico con tapa rosca de 15 mL, un vial de vidrio ámbar silanizado (cannabinoides) o un tubo 13 x 65 mm sin silanizar (drogas alcalinas), para recoger el eluido, además de un cartucho de extracción y un vial de vidrio de 2,0 mL con tapa rosca.
- 7.4.5** Imprima etiquetas adicionales para los controles de análisis que se indican en el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso".
- 7.4.6** Saque del refrigerador o del congelador según corresponda, las muestras de matrices blanco requeridas, según el tipo de matrices de las muestras incógnitas por analizar.
- 7.4.7** Coloque las muestras de sangre y orina (blanco de matriz e incógnitas) en el agitador rotatorio y espere 20 minutos aproximadamente.
- 7.4.8** Coloque las muestras (controles e incógnitas) de vísceras en reposo por 20 minutos aproximadamente. Si recibe las vísceras aún congeladas déjelas al menos 45 minutos en reposo.
- 7.4.9** Al finalizar el análisis, entregue las muestras mediante el SADCF al funcionario de la bodega de indicios o a algún funcionario que las requiera para otro análisis. Si fuera necesario, puede dejárselas en custodia intermedia hasta que pueda entregarlas al encargado de la bodega de indicios.
- 7.4.10** Arme la cámara de extracción para fase sólida de la siguiente manera: instale las válvulas y las guías de teflón de drenaje en los hoyos de la tapa. Instale los cartuchos Clean Screen, uno por muestra, blanco de matriz o blanco enriquecido. Adicione cloro al 0,5 % al kitasato de desechos del sistema de extracción en fase sólida
- 7.4.11** Para abrir el flujo a través del cartucho gírelo en sentido contrario a las manecillas del reloj y al revés para cerrarlo.
- 7.4.12** Coloque bien el empaque de la tapa para sellar la misma, coloque la tapa, cierre la válvula de presión de la cámara de vidrio y encienda la bomba de vacío hasta que el manómetro de esta mida 2 pulgadas de Hg. Si no hay vacío verifique el filtro del sistema de vacío y la bomba.
- 7.4.13** Encienda el dilutor si se requiere y seleccione el método del equipo según los analitos a analizar. Acondicione el dilutor (revisión de jeringas, tuberías y cebado de vías).

7.5 Extracción en fase sólida de cannabinoides

7.5.1 Hidrólisis de muestras de orina:

- 7.5.1.1** Agregue 20 µL del estándar interno a todos los tubos cónicos de muestras y controles.
- 7.5.1.2** Tome, con un equipo volumétrico adecuado, 1000 uL de cada muestra incógnita de orina o de la muestra de orina blanco según sea el caso y coloque en tubos cónicos de 15 mL.
- 7.5.1.3** Coloque 1 mL de muestra de orina blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido I y agregue 15 µL de la disolución de CRM de cannabinoides de 1,0 µg/mL. Este es un control positivo en la concentración del límite administrativo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 12 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7.5.1.4 Coloque 1 mL de orina blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido II y agregue 30 µL de la disolución de CRM de cannabinoides de 10 µg/mL. Este es un control positivo en un nivel alto.

7.5.1.5 Coloque 1 mL de orina blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como glucorónido de 200 ng/mL y agregue 20 µL de la disolución de glucorónido de carboxy-delta-9-THC de 10 µg/mL.

7.5.1.6 Adicione 100 µL de NaOH 10N, y aplique vortex por aproximadamente 20 segundos.

7.5.1.7 Ponga las muestras a hidrolizar por 20 minutos en el baño maría a 60°C aproximadamente. Enfríe aproximadamente 15 minutos antes de continuar el procedimiento.

7.5.1.8 Ajuste a 3,5 aproximadamente, el pH de las muestras de orina con 1 mL de ácido acético glacial.

7.5.2 Extracción en fase sólida de muestras de orina:

7.5.2.1 Agregue a los cartuchos, 3 mL de metanol, deje pasar con flujo alto (10 in. Hg.), deje un menisco, no seque el cartucho.

7.5.2.2 Agregue 3 mL de agua desionizada, deje pasar de la misma manera. Repita con 1 mL de HCl 100 mM. No deje que los cartuchos se sequen en ningún momento.

7.5.2.3 Vacíe las muestras en los cartuchos correspondientes sin perturbar el precipitado. Abra el flujo y déjelas pasar por los cartuchos a un flujo aproximado de una gota por segundo, deje un menisco sin secar el cartucho.

7.5.2.4 Utilice una probeta de 100 mL para preparar la mezcla de HCl 100 mM /Acetonitrilo, colocando 30 mL de Acetonitrilo y 70 mL de HCl 100 mM. Transfiera la mezcla a un beaker de 250 mL y agite manualmente para homogenizar.

7.5.2.5 Lave el cartucho dejando pasar rápidamente 2 mL de agua desionizada, deje un menisco y lave luego con 2 mL de la mezcla HCl 100mM /ACN (70/30).

7.5.2.6 Abra los cartuchos y seque completamente, cerrando la válvula del sistema de extracción, aplicando máximo vacío por aproximadamente 5 minutos sin sobrepasar 20 in Hg. Libere el vacío abriendo la válvula, cierre el flujo que pasa a través de los cartuchos girándolos en el mismo sentido de las manecillas del reloj.

7.5.2.7 Agregue 1 mL de hexano a cada cartucho, sin vacío.

7.5.2.8 Coloque la gradilla del sistema de SPE con los viales de vidrio silanizados de 5 mL para recoger los eluidos de las muestras. Asegúrese que las puntillas de las guías de teflón estén dentro de los tubos.

7.5.2.9 Eluya las muestras de orina utilizando la mezcla de Acetato de Etilo/Hexano (50:50). Utilice una probeta de 100 mL y agregue 50 mL de Acetato de Etilo y 50 mL de Hexano.

7.5.2.10 Continúe el procedimiento en el punto 7.5.4.11.

7.5.3 Preparación de las muestras de sangre:

7.5.3.1 Agregue 20 µL del estándar interno a todos los tubos de muestras y controles.

7.5.3.2 Coloque 1 mL de muestra de sangre blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco de sangre.

7.5.3.3 Coloque 1 mL de muestra sangre blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido I y agregue 10 µL de la disolución de cannabinoides de 1 µg/mL. Este es un control positivo en el límite administrativo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 13 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7.5.3.4 Coloque 1 mL de sangre blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido II y agregue 10 µL de la disolución de cannabinoides de 10 µg/mL. Este es un control positivo en un nivel alto.

7.5.3.5 Tome, con un equipo volumétrico adecuado, 1000 µL de cada muestra incógnita de sangre y deposítelas en los tubos cónicos etiquetados con la información de la muestra. Si por la consistencia de alguna muestra de sangre no se puede tomar el volumen requerido con una micropipeta, proceda a pesar la muestra en la balanza semianalítica.

7.5.3.6 Aplique vortex por aproximadamente 20 segundos. Deje asentar durante aproximadamente una hora.

7.5.3.7 Adicione 2 mL de Acetonitrilo y aplique vortex aproximadamente 30 segundos.

7.5.3.8 Centrifugue las muestras durante 15 minutos a 5000 rpm.

7.5.3.9 Decante el sobrenadante de las muestras de sangre a otro tubo sin perturbar el precipitado y agregue 4 mL de Buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4,5.

7.5.3.10 Aplique vortex aproximadamente 20 segundos y centrifugue las muestras durante 5 minutos a 3500 r.p.m.

7.5.3.11 Preparación de muestras de hígado, músculo:

7.5.3.12 Revise si en la secuencia de análisis hay muestras de hígado o músculo, de ser así incluya un blanco de esas matrices además de los blancos de sangre y orina. Para ello utilice un tubo con la víscera blanco del lote en uso, previamente pesada y picada finamente u homogenizada.

7.5.3.13 Pese un gramo de hígado o músculo de las muestras incógnitas, luego pique finamente con ayuda de la tijera y pinza de disección la porción de víscera pesada. Homogenice con 3 mL de agua desionizada las muestras y controles de vísceras, utilizando para ello el homogeneizador para tejidos biológicos. Si utiliza el homogeneizador de dispersores desechables, pese 3 gramos de hígado o músculo de las muestras incógnitas, luego pique finamente con ayuda de la tijera y pinza de disección la porción de víscera pesada. Homogenice con 9 mL de agua desionizada utilizando tubos cónicos de 50 mL.

7.5.3.14 Si en la secuencia hay más de una muestra incógnita de víscera, previo a la homogenización de cada muestra, desarme el homogenizador de tejidos y enjuaguelo en la tina con disolución de hipoclorito de sodio al 0,5% eliminando primero todo el tejido, luego lave con jabón alcalino con hisopo o cepillo, enjuague con agua de grifo, con agua desionizada y con etanol antes utilizarlo de nuevo. Arme de nuevo el homogenizador y acciónelo dentro de un beaker de 50 mL con agua desionizada aproximadamente 15 segundos. Deseche el agua.

7.5.3.15 Licue aproximadamente 15 segundos el blanco de muestra, aunque ya esté homogenizado, esto para evaluar la limpieza del homogenizador de tejidos y del proceso. Después lo puede utilizar en la siguiente muestra sin lavarlo.

Nota 3. Si utiliza el homogeneizador de dispersores desechables puede licuar las muestras a 6000 r.p.m. por 1 minuto sin necesidad de aplicar los pasos 7.5.3.14 y 7.5.3.15.

7.5.3.16 Tome 1 mL del homogenizado de hígado o músculo del punto anterior y agréguelo al tubo cónico rotulado con la información de la muestra. Agregue 20 µL de la disolución de estándares internos. Siga los pasos 7.5.4 a 7.6.4.5

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 14 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7.5.4 Extracción en fase sólida de muestras de sangre y vísceras:

- 7.5.4.1** Utilice una probeta de 100 mL para preparar la mezcla de Acetato de Etilo/Hexano, colocando 25 mL de hexano y 75 mL de Acetato de Etilo. Transfiera la mezcla a un beaker de 250 mL y agite manualmente para homogenizar los componentes.
- 7.5.4.2** Agregue 3 mL de la mezcla de Acetato de Etilo/hexano (75:25) con el pipeteador automático a cada uno de los cartuchos de extracción para el acondicionamiento de estos, deje pasar con flujo alto (10 in. Hg.), deje un menisco, no seque el cartucho.
- 7.5.4.3** Agregue 3 mL de metanol, deje pasar de la misma manera. Repita con 1 mL de HCl 100 mM. No deje que los cartuchos se sequen en ningún momento.
- 7.5.4.4** Vacíe las muestras en los cartuchos correspondientes sin perturbar el precipitado. Abra el flujo y déjelas pasar por los cartuchos a un flujo aproximado de una gota por segundo, deje un menisco sin secar el cartucho.
- 7.5.4.5** Lave el cartucho dejando pasar rápidamente 3 mL de agua desionizada, deje un menisco y lave luego con 2 mL de la mezcla HCl 100mM /ACN (70:30).
- 7.5.4.6** Abra los cartuchos y seque completamente, cerrando la válvula del sistema de extracción, aplicando máximo vacío por aproximadamente 5 minutos sin sobrepasar 20 in Hg. Libere el vacío abriendo la válvula, cierre el flujo que pasa a través de los cartuchos girándolos en el mismo sentido de las manecillas del reloj.
- 7.5.4.7** Agregue 200 µL de hexano a cada cartucho, sin vacío.
- 7.5.4.8** Abra el vacío y deje pasar el hexano completamente.
- 7.5.4.9** Coloque la gradilla del sistema de SPE con los viales de vidrio silanizados de 5 mL para recoger los eluidos de las muestras. Asegúrese que las puntillas de las guías de teflón estén dentro de los tubos.
- 7.5.4.10** Eluya las muestras, utilizando la mezcla de Acetato de Etilo/Hexano (75:25). Utilice una probeta de 100 mL y agregue 75 mL de Acetato de Etilo y 25 mL de Hexano.
- 7.5.4.11** Cierre los cartuchos girándolos en el mismo sentido a las manecillas del reloj. Aplique en cada uno de los cartuchos cerrados previamente, 3 mL de la mezcla de Acetato de Etilo/Hexano. Eluya con un goteo lento (aproximadamente una gota por segundo).
- 7.5.4.12** Libere el vacío abriendo completamente la válvula de la cámara de extracción, saque los tubos de la cámara SPE y con mucho cuidado elimine gotas de agua que hayan quedado adheridas al vial.
- 7.5.4.13** Seque los tubos con nitrógeno a temperatura ambiente. Utilice una punta de micropipeta plástica nueva o una pipeta pasteur de espiga corta por tubo, si realiza el secado en el sistema de evaporación con nitrógeno N Evap Organomation.
- 7.5.4.14** Añada 100 µL de tolueno y evapore suavemente regulando el flujo de nitrógeno, de manera que se formen pequeñas ondas en la superficie de la muestra, evite que el líquido salpique en las paredes. Retire inmediatamente se seque.
- 7.5.4.15** Añada 200 µL de BSTFA/Acetato de Etilo (50:50) a cada tubo, aplique vortex por aproximadamente 20 segundos.
- 7.5.4.16** Coloque las muestras en el horno y lleve a una temperatura de 60°C por 10 minutos.
- 7.5.4.17** Deje enfriar aproximadamente 15 minutos transvase a los insertos desactivados. Revise que en los insertos no queden burbujas.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 15 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7.5.4.18 Realice el análisis cromatográfico. Los extractos derivatizados pueden almacenarse en refrigeración o congelación máximo 48 horas antes del análisis.

7.6.4.1 Cualquier situación particular que se observe durante el proceso de extracción, por ejemplo, un extracto con una coloración diferente o una muestra que pasó muy lento a través del cartucho, debe quedar documentada en el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso".

7.6 Extracción en fase sólida de drogas alcalinas.

7.6.1 Hidrólisis de muestras de orina para otras drogas alcalinas diferentes a cocaína y metabolitos:

7.6.1.1 Agregue 20 µL de la disolución de estándares internos a todos los tubos cónicos preparados para las muestras y controles.

7.6.1.2 Coloque 1 mL de orina blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco de orina.

7.6.1.3 Coloque 1 mL de orina blanco en un tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido I. Agregue 20 µL de la disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL. Este es un control positivo en la concentración del límite administrativo.

7.6.1.4 Coloque 1 mL de orina blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido II. Agregue 200 µL de la disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL. Este es un control positivo en un nivel alto.

7.6.1.5 Coloque 1 mL de orina blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como glucorónido y agregue 10 µL de la disolución de glucorónido de codeína y/o morfina de 100 µg/mL.

7.6.1.6 Tome, utilizando un equipo volumétrico adecuado, 500 µL de cada muestra incógnita de orina y coloque en tubos cónicos de 15 mL. Adicione 500 µL de agua desionizada en el mismo tubo.

Nota 2. Según la historia del caso, el perito a cargo del caso, puede solicitar el análisis de 1 mL de la muestra incógnita de orina, en lugar de 500 µL.

7.6.1.7 Adicione 1 mL de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5,0, agregue 50 µL de la disolución de enzima glucoronidasa de abalone adquirida comercialmente. Aplique vortex aproximadamente 20 segundos.

7.6.1.8 Ponga las muestras a hidrolizar por 1 hora en el baño maría a 65°C aproximadamente. Enfríe aproximadamente 15 minutos antes de continuar el procedimiento en el punto 7.6.5.

7.6.2 Preparación de muestras de orina para análisis de cocaína y sus metabolitos:

7.6.1.2 Siga los pasos establecidos en los puntos 7.6.1.1 a 7.6.1.4 y 7.6.1.6.

7.6.2.2 Adicione con la ayuda de un equipo volumétrico adecuado, 2 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 6,0 a cada uno de los tubos cónicos de 15 mL.

7.6.3.2 Aplique vortex por aproximadamente 20 segundos. Continúe el procedimiento a partir del punto 7.6.5.

7.6.3 Preparación de muestras de sangre:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 16 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7.6.3.1 Agregue 20 µL de la disolución de estándares internos a todos los tubos cónicos preparados para las muestras y controles.

7.6.3.2 Coloque 1 mL de muestra de sangre blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco de sangre. Este es el control negativo.

7.6.3.3 Coloque 1 mL de muestra de sangre blanco en un tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido I. Agregue 10 µL de la disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL. Este es un control positivo cercano al límite administrativo.

7.6.3.4 Coloque 1 mL de muestra de sangre blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido II. Agregue 100 µL de la disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL. Este es un control positivo en un nivel alto.

7.6.3.5 Tome, con un equipo volumétrico adecuado, 1000 µL de cada muestra incógnita de sangre. Si por la consistencia de alguna muestra de sangre no se puede tomar el volumen requerido con una micropipeta, proceda a pesar la muestra en la balanza semianalítica.

7.6.3.6 Adicione con la ayuda de un equipo volumétrico adecuado, 2 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 6,0 a cada uno de los tubos cónicos de 15 mL.

7.6.3.7 Agregue 4 mL de agua desionizada a todos los tubos de muestras y controles de sangre.

7.6.3.8 Aplique vortex por aproximadamente 20 segundos. Lleve las muestras al baño ultrasónico por 15 min aproximadamente.

7.6.3.9 Centrifugue las muestras durante 15 minutos a 5000 r.p.m.

7.6.4 Preparación de muestras de hígado, músculo:

7.6.4.2 Para la preparación de las muestras de hígado y músculo para el análisis de drogas alcalinas siga los pasos descritos del punto 7.5.3.11 a 7.5.3.15.

7.6.4.3 Tome 1 mL del homogenizado de hígado o músculo del punto anterior y agréguelo al tubo cónico rotulado con la información de la muestra. Agregue 20 µL de la disolución de estándares internos. Siga los pasos 7.6.5 a 7.6.5.15.

7.6.5 Extracción de muestras de sangre, hígado, músculo y orina:

7.6.5.1 Agregue 3 mL de metanol a cada uno de los cartuchos de extracción para el acondicionamiento, deje pasar con flujo alto (10 in. Hg.), deje un menisco, no seque el cartucho.

7.6.5.2 Agregue 3 mL de agua desionizada, deje pasar de la misma manera. Repita con 1 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 6,0. No deje que los cartuchos se sequen en ningún momento.

7.6.5.3 Vacíe las muestras, los blancos de muestra y los blancos enriquecidos en cada uno de los cartuchos sin perturbar el precipitado. Abra el flujo y déjelas pasar por los cartuchos a un flujo aproximado de una gota por segundo, deje un menisco sin secar el cartucho.

7.6.5.4 Lave el cartucho dejando pasar rápidamente 3 mL de agua tipo desionizada, deje un menisco y lave luego con 1 mL de ácido acético 1M. Finalmente agregue 3 mL de metanol a cada uno de los cartuchos.

7.6.5.5 Seque completamente, cerrando la válvula del sistema de extracción, aplicando máximo vacío por aproximadamente 5 minutos a una presión de 10 pulgadas de mercurio.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 17 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

- 7.6.5.6** Coloque la gradilla del sistema de SPE con los tubos de vidrio de 5 mL para recoger los eluidos de las muestras. Asegúrese que las puntillas de las guías de teflón estén dentro de los tubos.
- 7.6.5.7** Utilice una probeta de 100 mL para medir 78 mL de diclorometano. En un beaker de 50 mL, tome, 2 mL de hidróxido de amonio (en una probeta de vidrio) y 20 mL de isopropanol. Agregue esta mezcla al diclorometano contenido en la probeta.
- 7.6.5.8** Eluya las muestras utilizando la mezcla de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amonio (78:20:2) aplicando cada uno de los cartuchos cerrados previamente, 3 mL del eluyente. Eluya con un flujo lento (aproximadamente una gota por segundo).
- 7.6.5.9** Libere el vacío, saque los tubos de la cámara SPE y coloque los tubos en el sistema de evaporación con nitrógeno a una temperatura inferior a 40°C.
- 7.6.5.10** Evapore suavemente regulando el flujo de nitrógeno, de manera que se formen pequeñas ondas en la superficie de la muestra, sin que salpique en las paredes y retire inmediatamente se seque.
- 7.6.5.11** Añada 200 µL de BSTFA/Acetato de Etilo (50:50) a cada tubo y aplique vortex aproximadamente 20 segundos.
- 7.6.5.12** Coloque las muestras en el horno y lleve a una temperatura de 70°C por 30 minutos.
- 7.6.5.13** Deje enfriar aproximadamente 15 minutos y transvase a los insertos. Revise que en los insertos no queden burbujas.
- 7.6.5.14** Realice el análisis cromatográfico. Los extractos derivatizados pueden almacenarse en refrigeración máximo 48 horas antes del análisis.
- 7.6.5.15** Cualquier situación particular que se observe durante el proceso de extracción (por ejemplo, un extracto con una coloración diferente o una muestra que pasó muy lento a través del cartucho) debe quedar documentada en el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso".

7.7 Creación de una secuencia de análisis y corrida de muestras.

- 7.7.1** Tome en cuenta lo señalado para el análisis en serie en el Procedimiento para el MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.
- 7.7.2** Elabore la secuencia iniciando con un blanco de corrida, continúe con el blanco de matriz (sangre u orina), de aquí en adelante ponga un grupo de muestras incógnitas y los blancos enriquecidos I y II de esa matriz correspondiente, distribuidos entre las muestras incógnitas de manera que no queden 10 o más muestras seguidas sin controles entre ellas. Repita el procedimiento anterior utilizando la otra matriz (sangre u orina). En el caso de que deba analizarse muestras de vísceras, coloque el blanco de estas matrices antes de las muestras incógnitas correspondientes. Si hay controles externos o controles de hidrólisis (muestras de orina) dentro de la secuencia, también debe distribuirlos entre las muestras procurando que quede un control al final de la secuencia.
- 7.7.3** La elaboración de la secuencia puede realizarse a través del lector de código de barras realizando la lectura de los indicios incluidos en el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso".
- 7.7.4** En el caso de las muestras de orina para el análisis de drogas alcalinas debe colocarse un blanco de corrida entre cada muestra para evitar arrastres por las altas concentraciones de analitos presentes en este tipo de muestras.
- 7.7.5** Las condiciones del método "drogas de abuso SIM DDMM_AA.M" se detallan en el Anexo 4.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 18 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

7.7.6 Cargue el método "LIMPIEZA.M" en el último blanco de corrida de la secuencia. Coloque los viales en el mismo orden en la bandeja del automuestreador. Salve la secuencia de nuevo. Solicite a un compañero que revise la secuencia antes de ponerla a correr en el equipo.

7.7.7 Si la secuencia se detiene por alguna razón y luego debe reanudarse, guarde de inmediato las muestras en refrigeración o congelación por un máximo de 48 horas hasta reanudar el análisis.

7.8 Análisis de resultados por GC/MS:

7.8.1 El análisis de resultados puede realizarse tanto en el software Masshunter como en el software Chem Station, utilizando ambas señales SIM y SCAN para identificar los analitos.

7.8.2 Análisis de la señal SIM en el software Chemstation:

7.8.2.1 Analice los datos en modo SIM del software Chem Station, si es requerido, siguiendo lo indicado a continuación:

7.8.2.2 Vaya al ícono "Load Data File", "Change Path" y busque la secuencia. Luego revise cada uno de los datos de la secuencia y verifique que el equipo los inyectó y capturó la señal.

7.8.2.3 Cuando el equipo captura la señal SIM, solo captura de 3 a 4 iones (fragmentos m/z) específicos por cada analito. Esta señal no puede utilizarse para comparación con las bibliotecas de espectros de MS.

7.8.2.4 Los blancos enriquecidos, se utilizan para calibrar el equipo antes de analizar las muestras y demás controles. Las muestras de sangre y vísceras deben calibrarse con los calibradores en sangre; las muestras de orina con los calibradores en orina.

7.8.2.5 Existen tres datos que pueden ser calibrados: tiempo de retención, área del ion cuantificador e intensidad relativa de los iones calificadores. El equipo realiza una curva de calibración, en la que grafica el nivel de concentración versus el área del ion cuantificador de cada analito (response) en cada uno de los niveles de los blancos enriquecidos. Para realizar esta calibración:

7.8.2.6 Abra el software "GCMS Data Analysis" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora. Vaya al menú "Method", seleccione la opción "Load Method", y luego "Yes" en la pregunta que aparece en el centro de la pantalla, se despliega una ventana con la lista de métodos del equipo, seleccione el método "DROGAS DE ABUSO SIM DDMM_AA.M".

7.8.2.7 En el menú "File", del software "GCMS Data Analysis", seleccione la opción "Load data file", aparecerá una ventana donde están los cromatogramas de las últimas inyecciones corridas en el equipo. Si desea analizar resultados de otra fecha que no sea la última, seleccione el directorio de la fecha deseada (ddmmm_aa) mediante la opción "Change Path" que está en la ventana que aparece en "Load data file". Una vez ubicados los cromatogramas deseados escoja con el Mouse el correspondiente con el blanco enriquecido con el que desea calibrar el equipo y presione "OK".

7.8.2.8 Vaya luego al menú "Quantitate" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione la opción "Calculate". Aparecerá un reporte en la pantalla donde se indica cuales analitos están siendo reconocidos y cuáles no.

7.8.2.9 Si alguno de los analitos no está siendo reconocido por tiempo de retención o intensidad relativa, vaya al menú "View" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione "QEdit Quant Result". Una nueva pantalla aparecerá. En esta pantalla se despliega la lista de los analitos del blanco enriquecido. Seleccione con clic el analito que no está siendo

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 19 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

reconocido y podrá observar cuál(es) de los iones presenta una diferencia entre el tiempo de retención obtenido y el esperado, y/o entre las respuestas relativas obtenidas y esperadas.

7.8.2.10 Para salir del "QEdit" vaya al menú "View" y seleccione "Return to Data Analysis". Si realizó algún cambio en la integración y quiere salvarlo seleccione "Yes" a la pregunta que aparece, de lo contrario seleccione "No".

7.8.2.11 Vaya al menú "Calibrate" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione "Update One Level". Seleccione "Yes" a la pregunta que aparece.

7.8.2.12 Aparecerá una pantalla en la que seleccione la opción "Update Level (select existing calibration level ID)". Luego marque las opciones que desea calibrar "Responses" para el área del target, "Retention time" para el tiempo de retención, "Replace Qualifier Ion Responses" para las intensidades relativas de los iones calificadores.

7.8.2.13 Se eligen los parámetros a calibrar, según lo indicado en 7.8.2.5, que sean necesarios para reconocer los iones de los analitos en el blanco enriquecido. La opción "Responses" debe ser seleccionada en cada uno de los niveles de los blancos enriquecidos para diseñar la curva de calibración.

7.8.2.14 Luego de un clic en "OK". Al lado derecho de la pantalla escoja con el Mouse el nivel de concentración correspondiente para el blanco enriquecido que está utilizando. De un clic en "OK".

7.8.2.15 Inmediatamente aparecerá una pantalla en la que pueden observarse los datos de tiempo de retención, intensidades relativas de los iones calificadores y la curva de calibración para el compuesto. Si está de acuerdo con los cambios realizados presione "OK" si no "Cancel" y perderá la calibración realizada.

7.8.2.16 Para imprimir el reporte vaya al menú "Quantitate" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione "Generate Report" en la pantalla que aparece seleccione "Detailed" y "To printer".

7.8.2.17 Repita el proceso anterior para el siguiente nivel de concentración del blanco enriquecido.

7.8.2.18 Revise la curva de calibración: vaya al menú "Calibrate" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione "Edit Compounds" en la pestaña "Calibration" aparece el gráfico y la información de la ecuación de la recta de regresión, vaya al menú "File" y seleccione "Save method".

7.8.2.19 Prosiga con el análisis del control negativo y de las muestras. En la opción "Load data file" del menú "File", en el software "GCMS Data Analysis", ubique el cromatograma deseado y escoja con el Mouse el correspondiente control negativo o muestra a analizar.

7.8.2.20 Vaya luego al menú "Quantitate" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione la opción "Calculate". Imprima el reporte en PDF.

7.8.3 Análisis de la señal SIM en el software Masshunter:

7.8.3.1 A continuación, se describen los pasos para realizar el análisis de datos de la señal SIM en el software MassHunter. Esos puntos están ilustrados en el Anexo 5.

7.8.3.2 Al terminar de inyectar la secuencia abra una ventana del "MassHunter MS Quantitative Analysis" dando doble click al icono en Desktop\MS Quantitative Analysis. En la pestaña "File" seleccione "New Batch". Cree el nuevo batch en la misma carpeta donde se guardaron los cromatogramas y guárdela con el nombre "batch, descripción" seguido de la fecha en que se inyectó la secuencia (ej: "batch coca sangre 12-07-18"). Seleccione

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 20 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

"open". Aparecerá el recuadro "Add samples", incluir las muestras del RAS con sus respectivos controles que formarán el batch, oprimiendo la tecla ctrl y marcando cada una de las muestras a incluir y finalmente en "Ok".

7.8.3.3 En la pantalla principal aparecerá una lista con todas las muestras y controles del análisis en serie escogido. Revise que la columna "Type" esté correctamente rotulada para todas las líneas de la lista. En la columna "Type" se describe si la muestra es un blanco ("Blank"), un calibrador ("Cal") o una muestra real o incógnita ("Sample"). En caso de ser un calibrador (Cal) se debe detallar el nivel en la columna "Level" (Ejm: L1, L2, L3, etc).

7.8.3.4 Dentro de la pantalla con la lista de muestras haga clic en el blanco enriquecido con el nivel de concentración mayor (ej: L2). Vaya al menú "Method" y seleccione "Open" seguido de "Open Method from existing file". En el directorio D:\GC-MS 597XX\Proc Method seleccione el método "drogas de abuso SIM DDMM_AA.M".

7.8.3.5 Una vez cargado el metodo vaya a "Method", seleccione "Method Setup Tasks" y haga clic en "Concentration Setup". Revisar que las concentraciones de los niveles de la curva sean las mismas usadas en la secuencia. En este momento se deben modificar las concentraciones en caso de ser necesario. Una vez revisado el método ir al menu "Method" y hacer clic en "Exit". Aparecerá una ventana consultando si quiere aplicar este método al batch ("Would you like to apply this method to the batch?"). Seleccione la opción "Analyze" y en seguida haga clic en "Yes".

7.8.3.6 Si el tiempo de retención de uno o varios analitos cambió debido a mantenimiento del GC-MS, es necesario consultar el tiempo de retención experimental del analito.

7.8.3.7 Consulte este dato en la corrida cromatográfica de la disolución sin extraer de los analitos en cuestión. Para esto, abra una ventana del MassHunter MS Qualitative Analysis dando doble click al icono en Desktop\MS Qualitative Analysis. En la pestaña "File" seleccione "Open Data File" y escoja el archivo que va a analizar. El software mostrará la información de los cromatogramas en la ventana "Data Navigator".

7.8.3.8 En la ventana "Data Navigator", bajo la opción "User Chromatograms" haga click izquierdo en "+TIC MS(1)" del archivo a analizar. Al hacer click izquierdo aparecerá un menú, escoja la opción "extract chromatograms". En la ventana "Extract chromatograms" vaya a la pestaña "MS Chromatogram": en la categoría "type" escoja la opción "EIC", en la categoría "scans" escoja la opción "Selected ion monitor" y en la categoría "m/z value(s)" ingrese la m/z del ion cuantificador del analito en cuestión según el cuadro de parámetros de identificación (ver anexo 2). Una vez seleccionados los parámetros deseados haga click en la opción "OK".

7.8.3.9 Aparecerá en la ventana "Chromatogram results" el pico o picos cromatográficos correspondientes al ión seleccionado. Comparar el tiempo de retención experimental del ión con el tiempo de retención original del método (ver anexo 2). Para modificar el tiempo de retención del analito deseado realice el paso 7.8.3.8 de este PON. Una vez cargado el metodo vaya a "Method", seleccione "Method Setup Tasks" y haga clic en "Retention Time Setup". Actualice manualmente el tiempo de retención del analito deseado. Guarde el método en "save method". Realice el paso 7.8.3.5 de este PON para terminar de analizar el batch.

7.8.3.10 Imprima el reporte vaya a la pestaña "Report" y haga click en "Generate...". En la ventana "Generate Report" escoja la carpeta donde se generará el reporte ("Report folder") y el método de reporte (Report method). En la misma ventana, escoja la opción "Choose samples..." y en la nueva ventana escoja la muestra del batch que desea reportar. Una vez escogida la muestra deseada haga click en la opción "OK" de la ventana

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 21 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

"Generate Report". Al finalizar el análisis de datos en modo SIM, debe realizarse la identificación en modo SCAN.

7.8.3.11 Si la identificación de los analitos se realiza en modo SCAN deben seguirse los criterios establecidos para tal fin, en el procedimiento para el manejo general de casos en las Sección de Toxicología Forense.

7.8.4 Análisis de la señal SCAN en el software Chemstation:

7.8.4.1 En el menú "File", seleccione la opción "Load data file", aparecerá una ventana donde están los cromatogramas de las últimas inyecciones corridas en el equipo. Si desea analizar resultados de otra fecha que no sea la última, seleccione el directorio de la fecha deseada (ddmmmaa) mediante la opción "Change Path" que está en la ventana mencionada.

7.8.4.2 Cuando el método que usted está empleando captura tanto señales SCAN como SIM, al cargar el cromatograma aparecen dos señales (dos cromatogramas). Para seleccionar la señal SCAN vaya al menú "File" y seleccione "Select Signals", aparecen dos opciones "data.ms" y "datasim.ms" seleccione solo "data.ms".

7.8.4.3 Vaya a select library, verifique que las bibliotecas seleccionadas en el método sean las siguientes: Mass Spectra of DESIGNER DRUGS 2018 con "limit match search" de 80, NIST 2014 Mass Spectral Library con "limit match search" de 20 y SWGDRUG Mass Spectra Library

7.8.4.4 Cuando se analiza la señal SCAN, es necesario imprimir la comparación con la biblioteca en las siguientes dos situaciones:

- Si lo que desea es obtener un espectro de masas y una comparación con las bibliotecas de algún analito que no se identifica bien en SIM, porque que las intensidades relativas de los iones no cumplen con las ventanas de variación establecidas (ej. en muestras muy concentradas, por la presencia de algún interferente, etc.)

- Si lo que desea es buscar sustancias de interés en la señal SCAN, que no están incluidas en la metodología.

7.8.4.5 En el caso de muestras que no se identifican bien en SIM, busque el analito en su tiempo de retención característico y cargue su espectro de masa dando doble clic derecho con el Mouse en el pico. Vuelva a dar clic derecho sobre el espectro de masas que aparece, de inmediato se realiza una búsqueda en las bibliotecas de espectro del pico seleccionado y aparecen una lista de posibles aciertos, cada uno con un "match" que indica que tanto se aparece al espectro de la biblioteca. Este valor va de 0 a 100, donde 100 es un espectro idéntico al de la biblioteca.

7.8.4.6 Un "match" que este arriba del 90 % significa que el espectro de masas es muy similar y muy probablemente se trata de la sustancia identificada. Sin embargo, para establecer la identidad de la sustancia es necesario obtener una coincidencia en el tiempo de retención y espectro de masas con el analito en el blanco enriquecido. Ver Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

7.8.4.7 En el caso de otras sustancias de interés que no están agregadas a los blancos enriquecidos, vaya al menú "Spectrum" y seleccione "Library search report". El equipo compara los espectros de cada uno de los picos en la muestra contra la biblioteca en busca de coincidencias y emite un reporte en la pantalla.

7.8.4.8 Revise minuciosamente este reporte en búsqueda de sustancias de interés, si encuentra alguna realice una comparación como la realizada en 7.8.4.5. Un "match" que este arriba del 90 % significa que el espectro de masas es muy similar y muy probablemente se trata

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 22 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

de la sustancia identificada. Sin embargo, para establecer la identidad de la sustancia es necesario inyectarla en el equipo y obtener además una coincidencia en el tiempo de retención.

7.8.4.9 Para imprimir la comparación con la biblioteca de un clic en "Print" en la lista de posibles aciertos.

7.8.4.10 Para cambios mayores en el método como por ejemplo la adición o eliminación de analitos o estándares internos, cambios en la cantidad de niveles de calibración, cambio de algún ion por otro para identificar un analito o si los tiempos de retención se salen de las ventanas del método de adquisición y hay que hacer ajustes en dicho método, se cambiará el nombre del método y se guardará con la fecha en que se realizó la modificación y se probó que diera resultados aceptables, anotando en el software del equipo la justificación para modificar el método. Estos cambios deben ser verificados y aprobados por el líder técnico o por el Jefe de Sección. El método preexistente se pasará de inmediato a la carpeta de métodos viejos.

7.8.4.11 Defina como resultado positivo por alguna de las drogas de abuso o sus metabolitos la señal que cumpla con los siguientes criterios.

- Tiempo de Retención Relativo (TRR) con variación menor a 1,0% con respecto al TRR de ese mismo analito en los blancos enriquecidos; excepto en metilecgonina que puede variar hasta 1,5%.
- Concentración igual o superior al límite de decisión en las matrices utilizadas.
- Que esté presente el ion cuantificador designado para ese analito y al menos dos iones calificadores.
- Las intensidades relativas de los iones calificadores no deben presentar mayor variabilidad que los criterios aceptados en el "Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense" a menos se acepte otra cosa en el informe de validación de la metodología.
- La respuesta del estándar interno es mayor al 50 % en las muestras incógnitas respecto a la respuesta de ese mismo estándar interno en los controles.

7.8.4.12 Finalice como perito encargado del análisis de datos, el llenado del formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso" con los resultados obtenidos en cada una de las muestras y cualquier observación que considere necesaria para alguna de las muestras o controles, firmelo y guárdelo en la unidad de red compartida destinada para el respaldo de los análisis en serie de la unidad de drogas/confirmatorios.

Nota 4. El revisor del Registro de Análisis en Serie en el SADCF, es el encargado de verificar la transferencia de datos en este formulario.

7.8.4.13 Retire como perito encargado del análisis de datos, los viales de la bandeja del automuestreador para su posterior descarte y verifique que los números de objetos y números de DCF de la rotulación de los viales concuerdan con la secuencia elaborada en el equipo o con el Formulario "Lista de objetos de análisis por drogas de abuso".

7.8.4.14 Este procedimiento es de carácter cualitativo; si alguna droga de abuso requiere cuantificación, se seguirán los lineamientos del Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense para tal fin.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 23 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Que no se detecte ningún analito con una respuesta igual o superior al Límite administrativo en el blanco de muestra posterior al control de arrastre.	Ningún analito cumpla con los criterios señalados en 7.8.4.11.	Cambie el liner del equipo independientemente del número de inyecciones acumulado, cambie los viales de lavado de la jeringa, realice al menos 3 lavados a la jeringa en cada vial de lavado. Corra un blanco de acetato de etilo con el método de limpieza. Reinyecte el control de arrastre y el blanco de matriz posterior al control de arrastre. Si el problema persiste comuníquelo al Líder Técnico.
2	Que se detecte los estándares internos en la muestra incógnita	Estándares internos con al menos el 50% de la respuesta de ese mismo estándar interno en los controles.	Ver Procedimiento para el MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.
3	Que en el blanco de muestra se detecten únicamente los estándares internos y que no se detecte el analito.	Que no se detecten los compuestos en una concentración igual o por encima del LA y que se detecten los estándares internos.	Repita la extracción de las muestras de la matriz contaminada. Si los estándares internos no se detectaron, busque una muestra incógnita negativa con estándares internos que valide que no hay contaminación en las muestras de esa matriz.
4	Que estén presentes todos los analitos que se agregaron al blanco de matriz enriquecido con drogas de abuso, en las diferentes concentraciones preparadas	Que todos los analitos cumplan con los criterios señalados de 7.8.4.11	Debe repetir la extracción salvo que en las muestras analizadas se soliciten específicamente los compuestos que no se perdieron en los blancos enriquecidos, en cuyo caso se reportarán los resultados con una nota que indique que el método no es apto para los analitos implicados.
5	Que los picos cromatográficos para el analito sean integrados automáticamente, según los parámetros de integración del método, salvo situaciones	No aplica	En algunos casos puede realizarse una integración manual del pico cromatográfico iniciando en un extremo de la base del pico y finalizando en el

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 24 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

	justificadas.		otro extremo; la integración manual es válida sólo si hay un error evidente debido a alguna particularidad de ese cromatograma, por ejemplo, la presencia de un interferente o una alta concentración del analito en la muestra.
--	---------------	--	--

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

- 9.1** Esta metodología es de carácter cualitativo por esta razón no aplica la evaluación de la incertidumbre.
- 9.2** El software automáticamente grafica una recta de regresión lineal usando las concentraciones de los dos blancos enriquecidos analizados. El área del pico del analito es corregida dividiendo el área del pico de la sustancia entre el área del pico del estándar interno.
- 9.3** Se obtiene una concentración aproximada mediante despeje en la ecuación de una recta de regresión lineal para patrones con concentraciones de drogas de abuso de entre 10 y 1000 ng/mL, tal y como se muestra a continuación:

$$C_x = \frac{\left(\frac{A_x}{A_{IS}}\right) - b_x}{m_x}$$

Donde:

C_x = Concentración del analito en ng/mL

A_x = Área del pico para el analito (abundancia)

A_{IS} = Área para el estándar interno (abundancia)

b_x = Intercepto de la curva de calibración para el analito

m_x = Pendiente de la curva de calibración para el analito

10 Reporte de Análisis y Resultados:

- 10.1** Para el reporte de los resultados, tome en cuenta los criterios generales para la identificación y reporte de sustancias indicados en el PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 10.2** Si se tiene un resultado "Se detectó" en los análisis preliminares o presuntivos se debe utilizar el "Listado de tipos de caso de la Sección de Toxicología" para proceder a realizar o no la confirmación de una droga de abuso.
- 10.3** Con el análisis confirmatorio, un resultado igual o por encima del límite administrativo establecido en alguna de las matrices analizadas, permite afirmar que el organismo del individuo estuvo expuesto a la sustancia y/o cualquier otra droga que se metabolice a dicha sustancia.
- 10.4** En el dictamen criminalístico se reportan resultados cualitativos como "Se detectó" si los analitos se encuentran iguales o por encima del límite administrativo establecido.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 25 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

10.5 Los casos con resultados "Se detectó o "No se detectó" se reportan como tales en el SADCF y en el Dictamen Criminalístico.

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Los tubos con muestras deben transportarse dentro del laboratorio en las gradillas destinadas para este uso.
- Las muestras deben manipularse con todos los cuidados que requieren las muestras de origen biológico. Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad y guantes desechables al manipular las muestras.
- No abra ningún recipiente con disolventes volátiles fuera de la capilla de extracción de gases.
- Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.
- Informe cualquier accidente donde se presuma contacto con material bioinfeccioso al Jefe de Sección o quién este encargado del laboratorio en ese momento para que se le indique el procedimiento a seguir.
- Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.
- Si ocurre algún derrame importante de disolventes o ácido en la ropa o la piel utilice la ducha que se encuentra en el laboratorio.
- Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lávese las manos y deje la gabacha en la entrada de este.

12 Simbología:

aprox:	aproximadamente
BSTFA-TMCS:	bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida con trimetilclorosilano al 1%.
CRM:	material de referencia certificado.
% CV:	coeficiente de Variación Porcentual.
DCF:	Departamento de Ciencias Forenses.
DDMMM_AA:	se refiere a día mes y año, como por ejemplo 07DIC_06.
GC:	cromatógrafo de gases.
GC/MS:	cromatografía de gases con detector de masas.
In. Hg.:	pulgadas de mercurio de vacío.
LA:	límite administrativo.
LD:	límite de detección
MS:	espectrometría de masas.
m/z:	relación masa/carga de los iones
N/A:	no aplica.
O.I.J:	Organismo de Investigación Judicial

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 26 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

p.a.:	calidad para análisis o calidad reactivo.
p.a.r.:	calidad para análisis de residuos o calidad cromatográfica.
PDF:	Formato de Documento Portátil
PON:	Procedimiento de Operación Normado.
RAS:	Registro de Análisis en Serie.
rpm:	revoluciones por minuto
% RSD:	porcentaje de error relativo estándar
SADCF:	Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses
SCAN/seg.:	Velocidad de escaneo en cantidad de barridos por segundo.
SCD:	Solicitud Cambio Documental.
SGC:	Sistema de Gestión de Calidad.
SIM:	Monitoreo de Ion Selectivo
SPE:	extracción en fase sólida.
TA:	temperatura ambiente
TRR:	tiempo de retención relativo
UAP:	Ultra Alta Pureza
UGC:	Unidad de Gestión de Calidad

13 Terminología:

Analito: sustancia o compuesto que se desea determinar.

Blanco de matriz: contiene matriz blanco, además de todos los reactivos utilizados en la preparación, extracción, dilución o derivatización de las muestras. Se nombra según la matriz que contiene (blanco de sangre, blanco de orina, blanco de torunda nasal)

Blanco de corrida: consiste en la inyección de disolvente en un sistema cromatográfico para evidencia ausencia de sustancias.

Blanco enriquecido de matriz: corresponde a un control preparado utilizando matriz blanco y enriquecido con los analitos, al que se aplican todos los procesos de una muestra incógnita o real (preparación, extracción, dilución o derivatización). Se nombra según la matriz que contiene (blanco enriquecido de sangre, blanco enriquecido de orina, etc.).

Control de arrastre (en análisis cualitativos): Disolución de CRM de una concentración alta del analito (por ejemplo, aproximadamente de 10 a 30 veces el LA), que se inyecta en el equipo antes de un control negativo para demostrar que no hay arrastre.

Control de Hidrólisis: Patrón de Glucorónido de algún compuesto de interés que se utiliza para verificar la hidrólisis de los metabolitos glucorónidos presentes en las muestras de orina.

Estándar interno: sustancia de comportamiento similar a los analitos de interés que se agrega a todas las muestras y controles para asegurar que no se den pérdidas de analitos durante el proceso de análisis.

Disolución de CRM: Corresponde a una disolución de un CRM que contiene uno o varios analitos.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 27 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Material de referencia certificado (CRM) en matriz: Material de referencia certificado comercial en matriz que tiene una concentración esperada del analito en la matriz y una incertidumbre asociada o rango aceptable.

Muestra incógnita o real: muestra de sangre, orina u otra matriz, que se desea analizar por drogas de abuso.

Límite administrativo: Límite de corte definido administrativamente o concentración que está en o sobre el límite de detección o de cuantificación del método y es usado para discriminar entre resultados positivos y negativos.

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos.
2	Parámetros de identificación de las drogas en el límite administrativo
3	Resumen de los resultados de la validación de las drogas de abuso
4	Condiciones del método de drogas de abuso por GC/MS
5	Pasos para el análisis de datos en Software MassHunter

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 28 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Anexo 1

PREPARACION DE REACTIVOS

Ácido clorhídrico 100 mM:

Adicione en un beaker aproximadamente 400 mL de agua desionizada. Adicione lentamente 4,2 mL de HCl concentrado con una pipeta de vidrio de 5 mL. Realice este procedimiento en la capilla de extracción.

Agite manualmente y trasvase cuantitativamente a un balón de 500 mL y lleve a la marca de aforo con agua desionizada; almacene en botella de vidrio a temperatura ambiente. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 6 meses después de preparado.

Buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4,5:

Revise en la bitácora de control y uso del pH metro si el instrumento está calibrado el mismo día en que va a preparar el buffer; si no está calibrado proceda a realizar la calibración usando las soluciones amortiguadoras para calibración del pH metro de pH 4,0 y 7,0.

En un beaker de 500 mL, disuelva 2,93 g de acetato de sodio trihidrato en 400 mL de agua desionizada; agregue 1,62 mL de ácido acético glacial.

Trasvase a un balón aforado de 500 mL y lleve hasta la marca de aforo. Mezcle. Utilizando el pH metro ajuste a pH 4,5 con Acetato de Sodio 100 mM o ácido acético 100 mM. Almacene a temperatura ambiente en botella de vidrio o plástica.

Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 6 meses después de preparado, sin embargo, se debe descartar ante la aparición de turbiedad o precipitación.

Buffer de acetato de sodio 1M pH 5,0:

Revise en la bitácora de control y uso del pH metro si el instrumento está calibrado el mismo día en que va a preparar el buffer; si no está calibrado proceda a realizar la calibración usando las soluciones amortiguadoras para calibración del pH metro de pH 4,0 y 7,0.

En un beaker de 500 mL, disuelva 43 g de acetato de sodio trihidratado en 400 mL de agua desionizada; agregue 10,4 mL de ácido acético glacial. Trasvase a un balón aforado de 500 mL y lleve hasta la marca de aforo. Mezcle. Utilizando el pH metro ajuste a pH 5,0 con Acetato de Sodio 100 mM o de ácido acético 100 mM.

Almacene a temperatura ambiente en botella de vidrio o plástica. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 6 meses después de preparado, sin embargo, se debe descartar ante la aparición de turbiedad o precipitación.

Buffer de acetato de sodio 100 mM pH 5,0:

En un beaker de 500 mL, diluya 40 mL del buffer de acetato de sodio 1M pH 5,0 en 400 mL de agua desionizada. Mezcle. Almacene a temperatura ambiente en botella de vidrio o plástica. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 6 meses después de preparado, sin embargo, se debe descartar ante la aparición de turbiedad o precipitación.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 29 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Buffer de fosfatos 100 mM pH 6,0:

Pese en un beaker de 50 mL 13,61 g de KH_2PO_4 utilizando balanza semianalítica. Trasvase cuantitativamente un beaker de un litro. Agregue agua desionizada hasta llegar apenas debajo de la marca de 1 L. Agite con pastilla magnética hasta disolver.

Revise en la bitácora de control y uso del pH metro si el instrumento está calibrado el mismo día en que va a preparar el buffer; si no está calibrado proceda a realizar la calibración usando las soluciones amortiguadoras para calibración del pH metro de pH 4,0 y 7,0. Ajuste el pH del buffer a 6,0 con KOH 10 M. Trasvase y afore con agua desionizada en un balón de un litro.

Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 1 mes después de preparado. Almacene en refrigeración y verifique si no hay contaminación cada vez que se utiliza.

Ácido acético 1,0 M:

En una probeta de 500 mL, agregue a 400 mL de agua desionizada, 28.6 mL de ácido acético glacial p.a.

Lleve a 500 mL con agua desionizada. Agite manualmente y transfiera a un recipiente de vidrio o plástico. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 6 meses después de preparado.

Ácido acético 100 mM:

En una probeta de 500 mL, agregue 40 mL de Ácido Acético 1,0 M y lleve a 400 mL con agua desionizada, agite manualmente y transfiera a un recipiente de vidrio o plástico. Es estable a temperatura ambiente hasta por seis meses.

Acetato de Sodio 1,0 M:

En un beaker de 250 mL, pese 13,6 g de acetato de sodio trihidratado y agregue 90 mL de agua desionizada, disuelva en el agitador magnético y lleve a la marca de 100 mL con agua desionizada.

Transfiera a un recipiente de vidrio o plástico. Es estable a temperatura ambiente hasta por seis meses.

Acetato de Sodio 100 mM:

En una probeta de 100 mL, agregue 10 mL de Acetato de Sodio 1,0 M y lleve a 100 mL con agua desionizada, agite manualmente y transfiera a un recipiente de vidrio o plástico.

Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Es estable al menos 6 meses después de preparado.

Disolución de Glucorónido de carboxy-delta-9-THC de 10 ug/mL:

Siga el mismo procedimiento descrito en la preparación de la disolución de CRM de cannabinoides de 10 ug/mL. Anote la información necesaria en el Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales". Conserve en congelación hasta por 1 año.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 30 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Disolución de glucorónido de codeína y/o morfina 100 ug/mL:

Tome con micropipeta 200 µL de la disolución madre de codeína y/o morfina de 1 mg/mL. Deposítelos en un balón aforado de 2 mL. Afore con metanol. Trasvase a un vial de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con el código alfanumérico consecutivo, la concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación hasta por 1 año.

Hidróxido de potasio (KOH) 10 M:

Pese en un beaker de 50 mL 56,1 g de KOH utilizando balanza semianalítica. Trasvase a un beaker de 250 mL. Agregue agua desionizada hasta llegar apenas debajo de la marca de 100 mL.

Agite con pastilla magnética para disolver. Trasvase a un balón aforado de 100 mL y afore con agua desionizada. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida.

Se puede conservar a temperatura ambiente por 1 año, sin embargo, se debe descartar ante la aparición de turbiedad o precipitación.

Hidróxido de Sodio 10N:

Pese 40 gramos de hidróxido de sodio p.a. en un beaker de 250 mL de capacidad. Adicione con una probeta 90 mL de agua desionizada y agite en el agitador magnético hasta disolver. Trasvase a un balón de 100 mL y afore.

Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida.

Almacene en botella de plástico a temperatura ambiente, es estable 6 meses después de preparado.

Disolución de cloro al 0,5 %:

Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta. Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro al 0,5%, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

despejando se obtiene: $(V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$

donde:

(CD): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente

(V)= Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente de concentración conocida.

Utilice una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente(V) al recipiente que va a contener la disolución de cloro al 0.5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL). Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua desionizada necesario para

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 31 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

completar el volumen de la disolución de cloro al 0,5% deseado. Agite suavemente por inversión manual.

Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 1 mes.

Disolución de CRM de estándares internos de drogas alcalinas de 10 ug/mL:

Tome con micropipeta 50 µL de la disolución madre de cada estándar interno de 1 mg/mL. Deposítelos en un balón aforado de 5 mL. Afore con metanol.

Trasvase a un vial de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con el código alfanumérico consecutivo, la concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación hasta por 1 año.

Disolución de CRM de drogas alcalinas con concentraciones de 1 y 3 ug/mL :

Saque del congelador el CRM de las sustancias de la disolución o mezcla que desea preparar. Colóquelas en la capilla de extracción y espere aproximadamente 20 minutos. Péseles en la balanza analítica y anote la información necesaria en el Formulario "Registro de preparación de disoluciones".

Utilice el siguiente cuadro para preparar la disolución:

Droga	Concentración madre ug/mL	Volumen (mL) de disolución madre	Concentración (ug/mL) en CRM	Balón aforado mL
cocaetileno	1000	0,030	3	10
ketamina	1000	0,030	3	
Benzoilecgonina	1000	0,030	3	
Metilecgonina	1000	0,030	3	
Fenciclidina	1000	0,010	1	
6-MAM	1000	0,010	1	
codeína	1000	0,030	3	
morfina	1000	0,030	3	
metadona	1000	0,030	3	
cocaína	1000	0,030	3	

Tome el volumen calculado de la disolución madre de CRM de cada compuesto utilizando un equipo volumétrico adecuado y deposítelo en un balón aforado. Afore con metanol. Trasvase a uno o más viales de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con el código alfanumérico consecutivo, la concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación hasta por 1 año.

Disolución de CRM de cannabinoides de 10 µg/mL:

Tome con micropipeta 50 µL de la disolución madre de cada analito de 1 mg/mL. Deposítelos en un balón aforado de 5 mL. Afore con metanol.

Trasvase a un vial de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con el código alfanumérico consecutivo, la concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación hasta por 1 año.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 32 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Disolución de CRM de cannabinoides de 1 µg/mL:

Para preparar las disoluciones de los analitos de 1 µg/mL tome con micropipeta 500 µL de la disolución de 10 µg/mL. Deposítelos en un balón aforado de 5 mL. Afore con metanol. Trasvase a un vial de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con el código alfanumérico consecutivo, la concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación hasta por 1 año.

Disolución de carboxy-delta-9-THC D3 de 2 ug/mL:

Saque del congelador el CRM de carboxy-delta-9-THC-D3. Colóquela en la capilla de extracción y espere a que alcance temperatura ambiente. Pésela en la balanza analítica y anote la información necesaria en el Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales".

Determine el volumen que necesita de la disolución madre para preparar el volumen requerido de la disolución de 2 ug/mL (normalmente se trata de un volumen de 10 µL si la solución madre es de 1 mg/mL). Deposítelos en un balón aforado de 5 mL.

Afore con metanol. Trasvase a un vial de 5 mL ámbar silanizado con tapa con teflón. Rotule con el código alfanumérico consecutivo, la concentración, disolvente, fecha e iniciales del responsable. Conserve en congelación hasta por 1 año.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 33 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Anexo 2

Cuadro 1. Parámetros de identificación de las drogas en el límite administrativo

ANALITO	ESTÁNDAR INTERNO	TIEMPO DE RETENCION	ION CUANTIFICADOR	IONES CALIFICADORES	INTENSIDAD RELATIVA
metilecgonina	cocaína D3	4,9	96,1	271,2 182,1 155,1	6 18 17
benzoilecgonina	benzoilecgonina D3	8,5	240	122,1 346,0 361,0	33 11 32
cocaína	cocaína D3	8,2	182,1	303,1 272,0 198,0	23 11 12
coetileno	cocaína D3	8,4	196	317,0 272,0 212,0	17 18 17
ketamina	cocaína D3	6,5	180,1	209,1 152,0 182,1	20 13 33
metadona	cocaína D3	7,9	72,1	223,1 91,1	4 3
fenciclidina	cocaína D3	6,7	200,2	186,1 242,2 243,2	19 31 22
codeína	codeína D3	9,2	371,2	234,1 196,1 178,1	51 66 75
morfina	morfina D3	9,4	414,2	401,1 196,1 429,2	33 82 165
6-monoacetil-morfina	morfina D3	9,7	399,2	340,2 287,1 204,1	72 42 30
carboxy-delta-9-THC	carboxy-delta-9-THC D3	10,3	371,3	372,3 473,3 474,3	31 40 15
hidroxy-delta-9-THC	carboxy-delta-9-THC D3	9,8	371,3	459,3 372,3	3 31
delta-9-THC	carboxy-delta-9-THC D3	8,8	371,3	386,3 315,2 330,0	76 63 33

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 34 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Anexo 3

Cuadro 2. Resumen de los resultados de la validación de las drogas de abuso

Parámetro de Validación	Resultado Obtenido
Arrastre	No se presentó arrastre posterior a la inyección de una disolución con altas concentraciones de analitos.
Interferentes	No se evidencian interferentes en ningún analito por matriz, estándar interno ni presencia de otros grupos de drogas.
Límite de detección	<p>Límite administrativo 10 ng/ml en sangre: fenciclidina, monoacetilmorfina, hidroxy-delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC, delta-9-THC, Límite administrativo 30 ng/ml en sangre: benzoilecgonina, metilecgonina, cocaína, cocaetileno, codeína, morfina, metadona y ketamina.</p> <p>Límite administrativo 15 ng/ml en orina: carboxy-delta-9-THC.</p> <p>Límite administrativo 20 ng/ml en orina: fenciclidina y 6-MAM.</p> <p>Límite administrativo 60 ng/ml en orina: benzoilecgonina, metilecgonina, cocaína, cocaetileno, codeína, morfina, metadona y ketamina.</p> <p>Límite administrativo 50 ng/mg en vísceras: carboxy-delta-9-THC.</p> <p>Límite administrativo 60 ng/mg en vísceras: benzoilecgonina, metilecgonina, cocaína, cocaetileno, codeína, morfina, metadona y ketamina.</p>
Estabilidad de las muestras	Todos los analitos mostraron una respuesta relativa dentro del 20% inferior de las respuestas relativas de los analitos en el tiempo cero (recién fortificados) a las 24 horas en el auto-muestreador.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 35 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Anexo 4

CONDICIONES DEL MÉTODO DE DROGAS DE ABUSO POR GC-MS

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS

D:\GC-MS 5977A\Method\drogas de abuso SIM 02feb-17.M
Tue Oct 31 11:28:34 2017
Control Information

Sample Inlet : GC
Injection Source : External Device
Mass Spectrometer : Enabled
Injection Location: Front
No Sample Prep method has been assigned to this method.
GC
Oven
Temperature
Setpoint On
(Initial) 60 °C
Hold Time 0.6 min
Post Run 325 °C

Program
#1 Rate 50 °C/min
#1 Value 130 °C
#1 Hold Time 0 min
#2 Rate 20 °C/min
#2 Value 325 °C
#2 Hold Time 2.5 min

Equilibration Time 0.5 min
Max Temperature 325 °C
Maximum Temperature Override Disabled
Slow Fan Disabled
Cryo Off
Front SS Inlet He
Mode Pulsed Splitless
Heater On 240 °C
Pressure On 12.35 psi
Total Flow On 54.8 mL/min
Septum Purge Flow On 3 mL/min
Gas Saver Off
Injection Pulse Pressure 25 psi Until 0.4 min
Purge Flow to Split Vent 50 mL/min at 0.75 min

Liner Agilent 5190-2293: 900 µL (Splitless, single taper, ultra inert Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)
Temperature
Setpoint On
P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01
Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 36 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

(Initial) 300 °C
 Post Run 0 °C
 Column
 Column #1
 Flow
 Setpoint Off
 (Initial) 1.8 mL/min
 Post Run -11.175 mL/min
 Agilent 122-5512UI: 02
 DB-5ms Ultra Inert
 0 °C—325 °C (350 °C): 15 m x 250 µm x 0.25 µm

Column lock Unlocked
 In Front SS Inlet He
 Out Aux EPC 2
 (Initial) 60 °C
 Pressure 12.35 psi
 Flow 1.8 mL/min
 Average Velocity 45.665 cm/sec
 Holdup Time 0.54747 min

Column #2
 Flow
 Setpoint Off
 (Initial) 3 mL/min
 Post Run 34.523 mL/min
 Agilent 160-2625-10
 Ret Gap 0.15 mm
 0 °C—325 °C (325 °C): 0.65 m x 150 µm x 0 µm
 Column lock Locked
 In Aux EPC 2 He
 Out MSD
 (Initial) 60 °C
 Pressure 1.4765 psi
 Flow 3 mL/min
 Average Velocity 430.94 cm/sec
 Holdup Time 0.0025139 min
 Column Outlet Pressure 0 psi

Aux EPC 1,2,3
 Aux EPC 1 He
 Pressure
 Setpoint Off
 (Initial) 10 psi
 Post Run 0 psi
 Excluded from Affecting GC's Readiness State

Aux EPC 2 He
 Excluded from Affecting GC's Readiness State
 Aux EPC 2 He Supplies Column 2
 Aux EPC 3 He
 Pressure
 Setpoint Off
 (Initial) 2 psi

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01
 Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 37 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Post Run 0 psi

Excluded from Affecting GC's Readiness State

Signals

Signal #1: Test Plot

Description Test Plot

Details

Save Off

Data Rate 50 Hz

Dual Injection Assignment Front Sample

Signal #2: Test Plot

Description Test Plot

Details

Save Off

Data Rate 50 Hz

Dual Injection Assignment Back Sample

Signal #3: Test Plot

Description Test Plot

Details

Save Off

Data Rate 50 Hz

Dual Injection Assignment Back Sample

Signal #4: Test Plot

Description Test Plot

Details

Save Off

Data Rate 50 Hz

Dual Injection Assignment Back Sample

GERSTEL MAESTRO

SYSTEM SETTINGS

Maestro Runtime : 16.25 min

GC Cool Down Time : 4.00 min

GERSTEL MPS PREP

Sample Prep : not used

GERSTEL MPS Liquid Injection

Syringe : 10ul

SAMPLE PARAMETERS

Sandwich : not used

Inj. Volume : 2.0 uL

Air Volume below : 0.0 uL

Inj. Speed : 50.00 uL/s

Fill Volume : 5.0 uL

Fill Strokes : 1

Fill Speed : 5.00 uL/s

Viscosity Delay : 0 s

Eject Speed : 50.00 uL/s

Pre Inj. Delay : 0 s

Post Inj. Delay : 0 s

Inj. Penetration : 40.00 mm

Sample Tray Type : VT98

Vial Penetration : 27.00 mm

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 38 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

CLEANING PARAMETERS

Preclean Sample : 0
 Wash Station 1 : Wash1
 Preclean Solv.1 : 2
 Postclean Solv.1 : 2
 Fill Speed Solv.1 : 5.00 uL/s
 Viscosity Delay Solv.1 : 0 s
 Eject Speed Solv.1 : 50.00 uL/s
 Wash Station 2 : Wash2
 Preclean Solv.2 : 2
 Postclean Solv.2 : 2
 Fill Speed Solv.2 : 5.00 uL/s
 Viscosity Delay Solv.2 : 0 s
 Eject Speed Solv.2 : 50.00 uL/s

TUNE PARAMETERS for SN: US1450M411

Trace Ion Detection is ON.

EMISSION : 34.593
 ENERGY : 70.007
 REPELLER : 2.888
 IONFOCUS : 89.822
 ENTRANCE_LE : 20.181
 EMVOLTS : 1664.713
 Actual EMV : 1635.8
 GAIN FACTOR : 1.00
 AMUGAIN : 1260.000
 AMUOFFSET : 122.188
 FILAMENT : 1.000
 DCPOLARITY : 1.000
 ENTLENDOFFS : 11.155
 MASSGAIN : -615.000
 MASSOFFSET : -34.000
 END OF TUNE PARAMETERS

Single Quadrupole Acquisition Method - MS Parameters Report

Method file D:\GC-MS 5977A\Method\drogas de abuso SIM 02feb-17.M

Tune file etune.u

Ion source:	EI
Source temperature (°C)	300
Quad temperature (°C)	150
Fixed Electron energy (eV)	70.0
Acquisition Type	SIM/Scan
Stop time (min)	650.00
Solvent delay (min)	2.10
Trace Ion Detection	True
Gain Factor	8
EM Saver	True

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 39 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

EM Saver Limit 100000000
Scan Time Segments
Time Start Mass End Mass Threshold Scan Speed
2.10 40 570 150 1,562 [N=2]

Timed Events
Time Type of Event Parameter
Real-Time Plots

Type of Plot	Label	Low Mass	High Mass
Total Ion	N/A	N/A	N/A
Spectrum	N/A	N/A	N/A
Extracted Ion Scan 1-1		50	550

SIM Time Segment 1
Group Name metilecgonina
Start Time 2.10
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
96.1	100	YES	
155.1	100	NO	
182.1	100	NO	
271.15	100	NO	

SIM Time Segment 2
Group Name norketamina
Start Time 5.70
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
131.1	100	NO	
166.1	100	YES	
168.1	100	NO	
195.1	100	NO	

SIM Time Segment 3
Group Name ketamina
Start Time 6.44
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
152	100	NO	
180.1	100	YES	
182.1	100	NO	
209.1	100	NO	

SIM Time Segment 4
Group Name PCP

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01
Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 40 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

Start Time 6.60

Resolution High

Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
186.1	100	NO	
200.2	100	YES	
242.2	100	NO	
243.2	100	NO	

SIM Time Segment 5

Group Name Metadone

Start Time 7.78

Resolution High

Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
72.1	100	YES	
91.1	100	NO	
223.1	100	NO	
294.2	100	NO	

SIM Time Segment 6

Group Name Coca-coca-D3

Start Time 8.10

Resolution High

Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
82	40	NO	
105	40	NO	
182.1	40	YES	
185.1	40	YES	
303.1	40	NO	
306.1	40	NO	

SIM Time Segment 7

Group Name Benzoil, Cocaet, BenzoilD3 TMS

Start Time 8.30

Resolution High

Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
73	40	NO	
82	40	NO	
122.1	40	NO	
196	40	YES	
212	40	NO	
240.2	40	YES	
243.2	40	NO	
272	40	NO	
317	40	NO	
346	40	NO	
364.2	40	NO	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 41 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

SIM Time Segment 8
Group Name delta-9-THC, TFF
Start Time 8.68
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
303.1	100	NO	
315.2	100	NO	
325.1	100	NO	
326.1	100	YES	
371.3	100	YES	
386.3	100	NO	

SIM Time Segment 9
Group Name codeina-code D3
Start Time 9.13
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
178.1	40	NO	
196.1	40	NO	
234.1	40	NO	
237.1	40	NO	
371.2	40	YES	
374.2	40	YES	

SIM Time Segment 10
Group Name MorfinaTMS morfina D3
Start Time 9.33
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
196.1	40	NO	
236.1	40	NO	
414.2	40	NO	
417.2	40	NO	
429.2	40	YES	
432.2	40	YES	

SIM Time Segment 11
Group Name MAM TM- Hidroxy-delta-9
Start Time 9.62
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
204.1	40	NO	
287.1	40	NO	
340.2	40	NO	
371.3	40	YES	
372.3	40	NO	

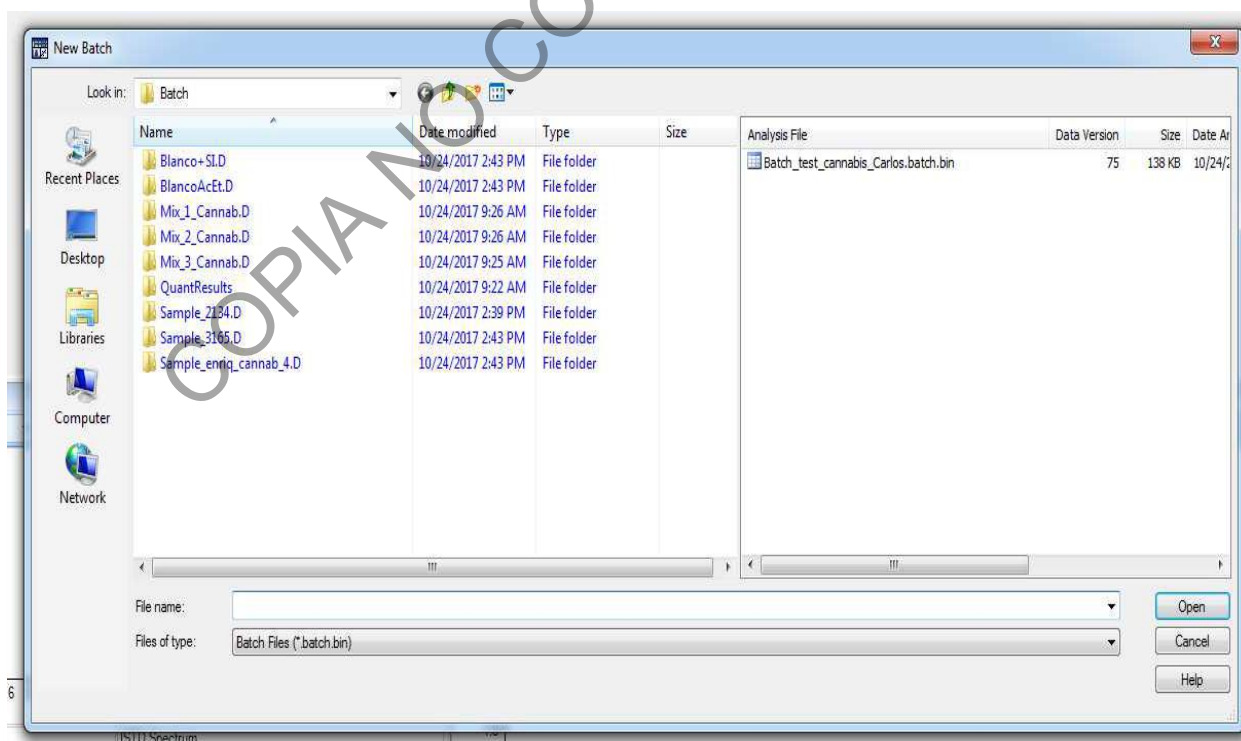
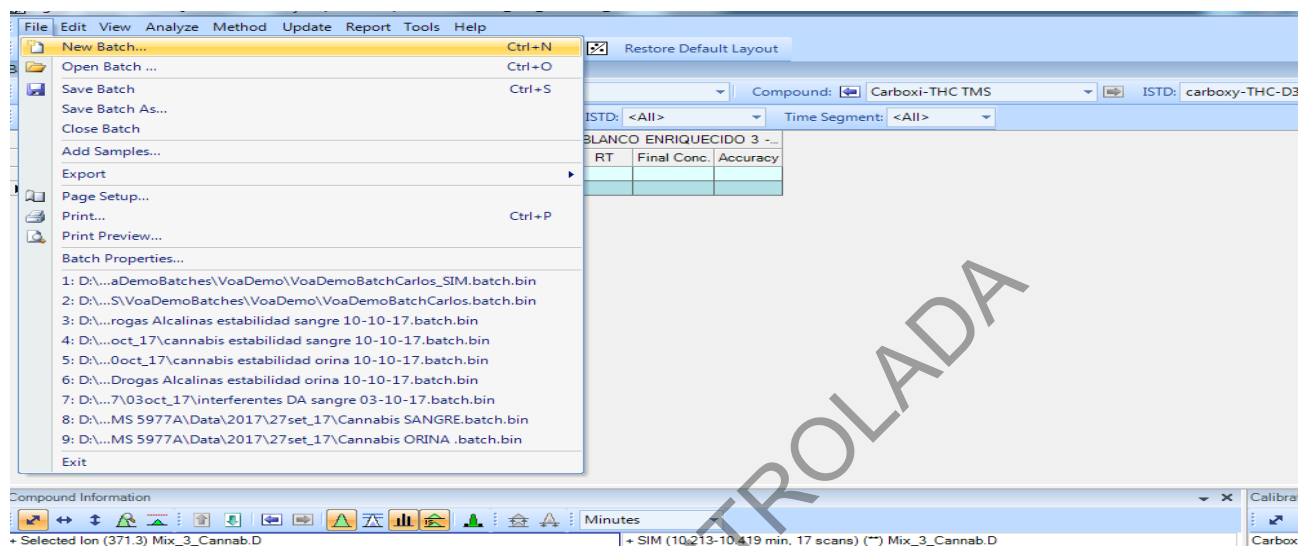
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 42 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS	P-DCF-ECT-TOX-38	

399.2	40	YES
459.3	40	NO
474.3	40	NO

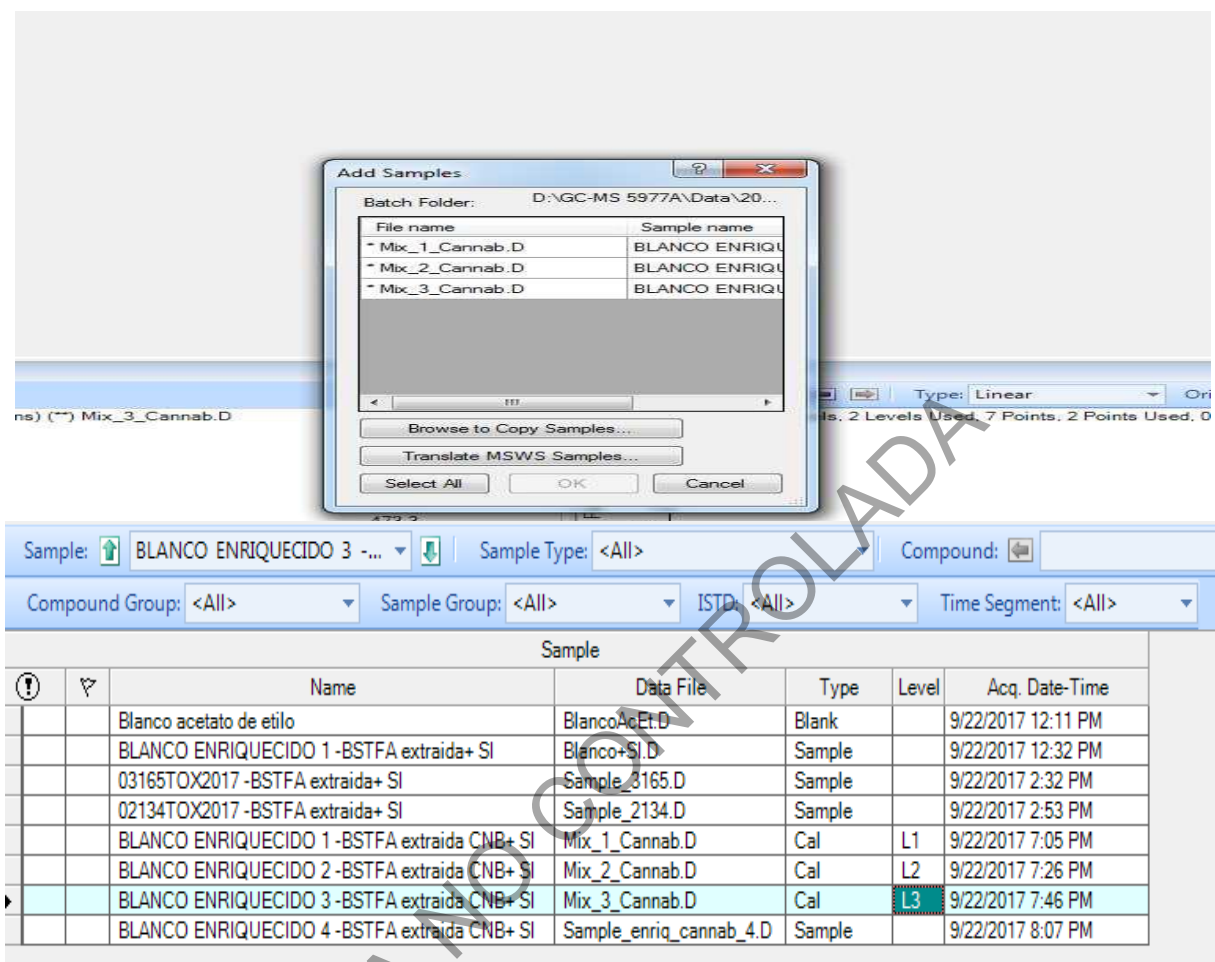
SIM Time Segment 12
Group Name carboxy-delta-9THC-COOH D3
Start Time 10.23
Resolution High
Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
371.3	40	YES	
372.3	40	NO	
374.3	40	YES	
473.3	40	NO	
474.3	40	NO	
476.3	40	NO	

COPIA NO CONTROLADA

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS**P-DCF-ECT-TOX-38****Anexo 5****Pasos para el análisis de datos en Software MassHunter**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 09	PAGINA: 44 de 46
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS		P-DCF-ECT-TOX-38



Add Samples

Batch Folder: D:\GC-MS 5977A\Data\20...

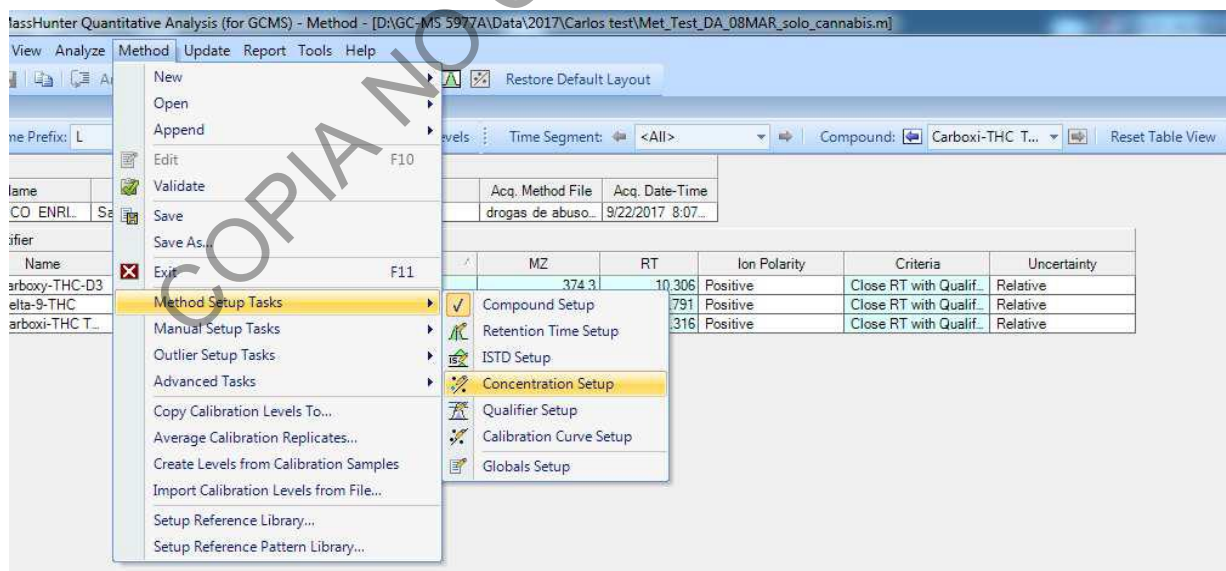
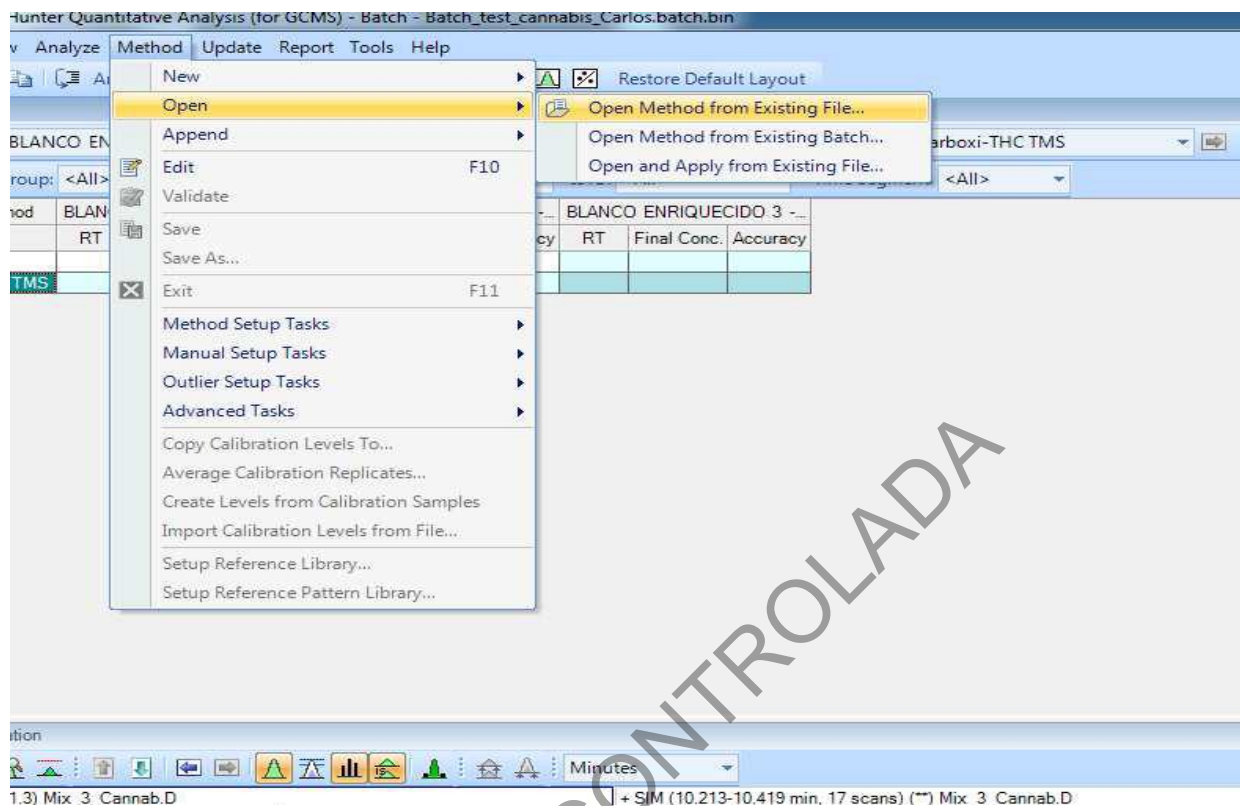
File name	Sample name
* Mix_1_Cannab.D	BLANCO ENRIQUECIDO
* Mix_2_Cannab.D	BLANCO ENRIQUECIDO
* Mix_3_Cannab.D	BLANCO ENRIQUECIDO

Buttons: Browse to Copy Samples..., Translate MSWS Samples..., Select All, OK, Cancel

Sample: BLANCO ENRIQUECIDO 3 -... Sample Type: <All> Compound:

Compound Group: <All> Sample Group: <All> ISTD: <All> Time Segment: <All>

Sample						
?		Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time
		Blanco acetato de etilo	BlancoAcEt.D	Blank		9/22/2017 12:11 PM
		BLANCO ENRIQUECIDO 1 -BSTFA extraida+ SI	Blanco+SI.D	Sample		9/22/2017 12:32 PM
		03165TOX2017 -BSTFA extraida+ SI	Sample_3165.D	Sample		9/22/2017 2:32 PM
		02134TOX2017 -BSTFA extraida+ SI	Sample_2134.D	Sample		9/22/2017 2:53 PM
		BLANCO ENRIQUECIDO 1 -BSTFA extraida CNB+ SI	Mix_1_Cannab.D	Cal	L1	9/22/2017 7:05 PM
		BLANCO ENRIQUECIDO 2 -BSTFA extraida CNB+ SI	Mix_2_Cannab.D	Cal	L2	9/22/2017 7:26 PM
		BLANCO ENRIQUECIDO 3 -BSTFA extraida CNB+ SI	Mix_3_Cannab.D	Cal	L3	9/22/2017 7:46 PM
		BLANCO ENRIQUECIDO 4 -BSTFA extraida CNB+ SI	Sample_enri_cannab_4.D	Sample		9/22/2017 8:07 PM

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS**P-DCF-ECT-TOX-38**

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DROGAS DE ABUSO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS**P-DCF-ECT-TOX-38**

Sample

Name	Sample
BLANCO ENRL	Sample
carboxy-THC-D3	Sample

Quantifier

Name	Sample
Delta-9-THC	Sample

Calibration

Level	Conc.	Response	Enable
L1	5.0000		<input checked="" type="checkbox"/>
L2	20.0000		<input checked="" type="checkbox"/>
L3	100.0000		<input checked="" type="checkbox"/>

Quantifier

Name	TS	Scan	Type	Units	Dil. High Conc.	Dil. F
Carboxi-THC T...	16	SIM	Target	ng/ml		

Calibration

Level	Conc.	Response	Enable
L1	5.0000		<input checked="" type="checkbox"/>
L2	20.0000		<input checked="" type="checkbox"/>
L3	100.0000		<input checked="" type="checkbox"/>

Apply Method

Would you like to apply this method to the batch?

Yes No Cancel

Additional batch processing after applying the method

☒ Analyze ☐ Quantitate ☐ Integrate ☐ None