



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

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN  
NORMADO ESPECIFICO

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

**P-DCF-ECT-TOX-45**

VERSION: 01

Rige desde: 21/06/2024

PAGINA: 1 de **30**

<b>Elaborado o modificado por:</b>  <b>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes</b> Perito, Sección Toxicología	<b>Revisado por Líder Técnico:</b>  <b>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes</b> Líder Técnico de Sección/Unidad de Confirmatorios y Plaguicidas
<b>Visto Bueno Encargado de Calidad:</b>  <b>Dr. Marco Martínez Esquivel</b> Encargado de Calidad, Sección de Toxicología	<b>Aprobado por:</b>  <b>Dr. Diego Arias Alfaro</b> Jefatura, Sección de Toxicología

**CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN**

<b>Versión</b>	<b>Fecha de Aprobación</b>	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Descripción del Cambio</b>	<b>SCD</b>	<b>Solicitado por</b>
01	21/06/2024		Versión Inicial del Procedimiento	06-2024	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 01	PAGINA: 2 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

## 1 Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer un procedimiento para la determinación cualitativa de cannabinoides (delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC y carboxy-delta-9-THC) en sangre y vísceras 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 cannabinoides (delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC) 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, idealmente preservada con fluoruro de sodio o suero. 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 con cartuchos Clean Screen THC. La identificación y confirmación de los cannabinoides 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 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 3.5 y 3.6). El resumen de los resultados de la validación de drogas de abuso se puede observar en el Anexo 3.

El estándar interno utilizado para la determinación de cannabinoides es carboxy-delta-9-THC-D3.

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 los cannabinoides validados, las intensidades relativas mostradas corresponden a la concentración en el Límite Administrativo (LA).

Se establece 10 ng/mL en sangre como Límite Administrativo (se obtuvieron límites de detección menores); para carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC y delta-9-THC. En muestras de vísceras (hígado y músculo rojo) solo se analiza el carboxy-delta-9-THC y se define 50 ng/mg como LA para este analito.

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.

## 3 Referencias:

**3.1** Costa Rica. Poder Judicial. Organismo de Investigación Judicial. Departamento de Ciencias Forenses. Procedimiento MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE, versión vigente.

**3.2** Helena Teixeira, Alain Verstraete, Paula Proenca et al. Validated method for the simultaneous determination of  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-

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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 3 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization, Forensic Science International, 2007.

- 3.3** Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). 2013. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. J Anal Toxicol, 37:452–474.
- 3.4** United Chemical Technologies (UCT). Clinical and Forensic Applications Manual, 2015.
- 3.5** 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.
- 3.6** 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 de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).

Agitador magnético.

Agitador por vibración tipo vortex.

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

Balanza granataria, rango de 1 a 1500 gramos ( $\pm 0,01$  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.

Base de datos "RAS electrónico confirmatorios".

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

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

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

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

Centrífuga refrigerada, capaz de alcanzar una velocidad de al menos 5000 r.p.m. Thermo 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  $\mu\text{L}$  a 50000  $\mu\text{L}$ , 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)".

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 4 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

Formulario "Lista de objetos de análisis por cannabinoides en sangre".

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 Spectral Library, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2017 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 Spectral Library, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2020 y Maurer/Pfleger/Weber Mass Spectral Library 2007.

Guantes desechables.

Guías de teflón desechables para cámara SPE Visiprep DL Supelco.

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 Cl-S621 o similar.

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 10  $\mu\text{L}$  a 100  $\mu\text{L}$  o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta ajustable de 100  $\mu\text{L}$  a 1000  $\mu\text{L}$  o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta ajustable de 20  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{L}$  o similar. Con puntas nuevas.

Micropipeta automática 20  $\mu\text{L} \pm (0,02 \mu\text{L})$ . Con puntas nuevas.

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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 5 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

Pinza de disección con punta plana o similar.

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

Sistema de Evaporación con Nitrógeno N Evap Organomation para 12 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.

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

Viales ámbar de vidrio silanizado de 5 mL, nuevos.

Nota 1. Lave la cristalería y otro material reutilizable según el Procedimiento MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGÍA FORENSE.

## 5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Acetato de etilo, calidad p.a.r.

Acetato de sodio trihidratado p.a.

Acetonitrilo (ACN) p.a.r.

Ácido acético 1M (Ver Anexo 1).

Ácido acético 100 mM (Ver Anexo 1).

Acetato de Sodio 1M (Ver Anexo 1).

Ácido acético glacial p.a.

Ácido clorhídrico 100 mM Reactivo crítico (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. Reactivo crítico.

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

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

Cilindro de Helio UAP.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 6 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

CRM de 100 µg/mL o 1 mg/mL de Glucorónido de carboxy-delta-9-THC marca Cerilliant o similar.

CRM de 1 mg/mL de cannabinoides, marca Cerilliant o similar: delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC, hidroxy-delta-9-THC.

CRM de 1 mg/mL de estándar interno de carboxy-delta-9-THC-D3 marca Cerilliant o similar.

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

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

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

Disolución de Glucorónido de carboxy-delta-9-THC 10 µg/mL (Ver Anexo 1).

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

Etanol al 95% industrial.

Hexano p.a.r.

Hidróxido de sodio 10N (Ver Anexo 1).

Hidróxido de sodio p.a. (NaOH).

Hígado blanco. Reactivo crítico.

Metanol p.a.r.

Músculo blanco. Reactivo crítico.

Sangre blanco. Reactivo crítico.

Tolueno p.a.r,

Nota 2. Para la preparación, verificación y conservación del material de referencia, controles en matriz, disoluciones de CRM, disoluciones de estándares internos, disoluciones de glucorónidos, reactivos y materiales críticos refiérase al Procedimiento MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.

## 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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 7 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

				fallo en el aire acondicionado debe registrarse la temperatura antes de realizar el análisis.
--	--	--	--	---

## 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 o disoluciones de estándares internos, refiérase al Procedimiento 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 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 Confirmatorios y Plaguicidas la lista de casos pendientes de análisis de cannabinoides en sangre y/o vísceras 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 cannabinoides en sangre".
- 7.1.6** Entregue el Formulario "Lista de objetos de análisis por cannabinoides en sangre" 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 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 7.8 y 7.9 del Procedimiento 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 USO Y MANEJO DE CROMATÓGRAFOS DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).
- 7.2.5** Refiérase al Procedimiento 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)"

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 8 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

### 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 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 sin estándares internos previamente extraídos con esta metodología. Espere aproximadamente 20 minutos para que se atemperen.
- 7.3.4** Prepare, según corresponda, una disolución de CRM sin extraer, tomando 50 µL de la disolución de CRM de cannabinoides de 10 µg/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** 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 cuando se seque para evitar pérdidas de los analitos.
- 7.3.7** Trasvase cuantitativamente la ampolla de 1 mL de BSTFA-TMCS, a un vial de vidrio ámbar 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.
- 7.3.8** 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.
- 7.3.9** Coloque las muestras en el horno y lleve a una temperatura de 60°C por 10 minutos.
- 7.3.10** Deje enfriar aproximadamente 15 minutos y transvase a los insertos desactivados. Revise que en los insertos no queden burbujas.
- 7.3.11** Realice el análisis cromatográfico de la disolución de CRM sin extraer seguida de la matriz blanco de sangre sin estándares internos. Las matrices blanco corresponden a controles post-arrastre que se analizan antes de la secuencia con muestras reales.
- 7.3.12** 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 cannabinoides en sangre" 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 cannabinoides en sangre". Si por alguna razón debe entregarse un



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 9 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

objeto 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 al menos un juego de 4 etiquetas con el número de la orden de trabajo y el número de objeto. Recuerde re embalar 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 para recoger el eluido, además de un cartucho de extracción y un vial ámbar 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 cannabinoides en sangre".
- 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 (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 THC, 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 ésta 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 Etapas previas a la Extracción en Fase Sólida**

### **7.5.1 Preparación de muestras de sangre**

- 7.5.1.1** Agregue 20 µL del estándar interno a todos los tubos de muestras y controles.
- 7.5.1.2** Coloque 1 mL de muestra de sangre blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco de sangre.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 10 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

- 7.5.1.3** Coloque 1 mL de muestra sangre blanco en tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido 1 y agregue 10 µL de la disolución de cannabinoides de 1 µg/mL. Este es un control positivo en el límite administrativo.
- 7.5.1.4** Coloque 1 mL de sangre blanco en otro tubo cónico de 15 mL rotulado como blanco enriquecido 2 y agregue 10 µL de la disolución de cannabinoides de 10 µg/mL. Este es un control positivo en un nivel alto.
- 7.5.1.5** 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 1 gramo de la muestra en la balanza granataria.
- 7.5.1.6** Aplique vortex por aproximadamente 20 segundos. Deje asentar durante aproximadamente una hora.
- 7.5.1.7** Adicione 2 mL de Acetonitrilo y aplique vortex aproximadamente 30 segundos.
- 7.5.1.8** Centrifugue las muestras durante 15 minutos a 5000 rpm.
- 7.5.1.9** 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.
- 7.5.1.10** Aplique vortex aproximadamente 20 segundos y centrifugue las muestras durante 5 minutos a 3500 r.p.m.
- 7.5.2 Preparación de muestras de hígado, músculo**
- 7.5.2.1** Revise si en la secuencia de análisis hay muestras de hígado o músculo, de ser así incluya un blanco de esas matrices además del blanco de sangre. Para ello utilice un tubo con la víscera blanco del lote en uso, previamente pesada y picada finamente u homogenizada.
- 7.5.2.2** 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.
- 7.5.2.3** 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 enjuáguelo 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.
- 7.5.2.4** 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.
- 7.5.2.5** 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. Continúe en 7.6.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 11 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

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 7.5.2.3 y 7.5.2.4.

### **7.6 Extracción en Fase Sólida de muestras de sangre y vísceras**

- 7.6.1** Utilice una probeta de 100 mL para preparar la mezcla de Hexano/Acetato de Etilo colocando 80 mL de Hexano y 20 mL de Acetato de Etilo. Transfiera la mezcla a un beaker de 250 mL y agite manualmente para homogeneizar los componentes.
- 7.6.2** Agregue 3 mL de la mezcla de Hexano/Acetato de Etilo (80:20) 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.
- 7.6.3** 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.
- 7.6.4** 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.
- 7.6.5** Utilice una probeta de 100 mL para preparar la mezcla de HCl 100mM /ACN colocando 70 mL de HCl 100 mM y 30 mL de Acetonitrilo. Transfiera la mezcla a un beaker de 250 mL y agite manualmente para homogeneizar los componentes.
- 7.6.6** 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).
- 7.6.7** 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.
- 7.6.8** Agregue 200 µL de hexano a cada cartucho, sin vacío.
- 7.6.9** Abra el vacío y deje pasar el hexano completamente.
- 7.6.10** 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.
- 7.6.11** Eluya las muestras, utilizando la mezcla de Hexano/Acetato de Etilo (80:20).
- 7.6.12** 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 Hexano/Acetato de Etilo. Eluya con un goteo lento (aproximadamente una gota por segundo).
- 7.6.13** 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.
- 7.6.14** 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.
- 7.6.15** 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 para evitar pérdidas de los analitos.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 12 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**7.6.16** Añada 200 µL de BSTFA/Acetato de Etilo (50:50) a cada tubo, aplique vortex por aproximadamente 20 segundos.

**7.6.17** Coloque las muestras en el horno y lleve a una temperatura de 60°C por 10 minutos.

**7.6.18** Deje enfriar aproximadamente 15 minutos transvase a los insertos desactivados. Revise que en los insertos no queden burbujas.

### **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 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, de aquí en adelante ponga un grupo de muestras incógnitas y los blancos enriquecidos 1 y 2, distribuidos entre las muestras incógnitas de manera que no queden 10 o más muestras seguidas sin controles entre ellas. 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 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 cannabinoides en sangre".

**7.7.4** Las condiciones del método "cannabinoides SIM DDMM\_AA.M" se detallan en el Anexo 4.

**7.7.5** Cargue el método "LIMPIEZA.M" en el último blanco de corrida de la secuencia. Salve la secuencia de nuevo. Verifique que otro funcionario revise la secuencia antes de ponerla a correr en el equipo. Los viales deben colocarse en el mismo orden en la bandeja del automuestreador del equipo.

**7.7.6** 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 se realiza en el software Chemstation, utilizando ambas señales SIM y SCAN para identificar los analitos.

### **7.9 Análisis de la señal SIM en el software Chemstation**

**7.9.1** 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.

**7.9.2** 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.

**7.9.3** 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.

**7.9.4** 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:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 13 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

- 7.9.5** 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 "CANNABINOIDES SIM SANGRE DDMM\_AA.M".
- 7.9.6** 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".
- 7.9.7** 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.
- 7.9.8** 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 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.
- 7.9.9** 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".
- 7.9.10** Vaya al menú "Calibrate" del software "GCMS Data Analysis" y seleccione "Update One Level". Seleccione "Yes" a la pregunta que aparece.
- 7.9.11** 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.
- 7.9.12** Se eligen los parámetros a calibrar, según lo indicado en 7.9.4, 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.
- 7.9.13** 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".
- 7.9.14** 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.
- 7.9.15** 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".
- 7.9.16** Repita el proceso anterior para el siguiente nivel de concentración del blanco enriquecido.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 14 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**7.9.17** 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".

**7.9.18** 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.

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

### **7.10 Análisis de la señal SCAN en el software Chemstation**

**7.10.1** 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.

**7.10.2** Seleccione la señal SCAN, vaya al menú "File" y seleccione "Select Signals", aparecen dos opciones "data.ms" y "datasim.ms" seleccione solo "data.ms".

**7.10.3** 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 2017 Mass Spectral Library con "limit match search" de 20 y SWGDRUG Mass Spectra Library.

**7.10.4** Cuando se analiza la señal SCAN, es necesario imprimir la comparación con la biblioteca en la siguiente situación:

- 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 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.)

**7.10.5** 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.

**7.10.6** 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 MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGÍA FORENSE.

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

**7.10.8** Defina como resultado positivo por alguno de los cannabinoides la señal que cumpla con los siguientes criterios:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 15 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

- Tiempo de Retención (TR) con variación menor a 1,0% con respecto al TR de ese mismo analito en los blancos enriquecidos.
- Concentración igual o superior al límite administrativo en las matrices utilizadas.
- Que esté presente el ion cuantificador designado para ese analito y al menos dos iones calificadores.

**7.10.9** Las intensidades relativas de los iones calificadores no deben presentar mayor variabilidad que los criterios aceptados en el Procedimiento MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGÍA FORENSE.

**7.10.10** Finalice como perito encargado del análisis de datos, el llenado del formulario "Lista de objetos de análisis por cannabinoides en sangre" con los resultados obtenidos en cada una de las muestras y cualquier observación que considere necesaria para alguna de las muestras o controles, fírmelo y guárdelo en la unidad de red compartida destinada para el respaldo de los análisis en serie de la Unidad de Confirmatorios y Plaguicidas.

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.

**7.10.11** Retire como perito encargado del análisis de datos, los viales de la bandeja del automuestreador para su posterior descarte.

## 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 7.10.8	Cambie el liner del equipo independientemente del número de inyecciones acumulado, reinyecte el control de arrastre y el blanco de matriz posterior al control de arrastre. Si no se corrige el arrastre, 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. Si el problema persiste comuníquelo al Líder Técnico.
2	Que se detecte el estándar interno en la muestra incógnita.	Que el estándar interno cumpla con los criterios señalados en 7.10.8	Ver Procedimiento MANEJO GENERAL DE CASOS EN LA SECCIÓN DE TOXICOLOGIA FORENSE.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 16 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

3	Que en el blanco de muestra se detecte únicamente el estándar interno y que no se detecte el analito.	Que no se detecten los compuestos con una respuesta igual o por encima del LA y que se detecte el estándar interno.	Repita la extracción de las muestras de la matriz contaminada. Si el estándar interno no se detectó, busque una muestra incógnita negativa con estándar interno; 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 cannabinoides, en las diferentes concentraciones preparadas.	Que todos los analitos cumplan con los criterios señalados de 7.10.8.	Debe repetir la extracción salvo que, en las muestras analizadas, se requiera el reporte de los compuestos que no se perdieron en los blancos enriquecidos, en cuyo caso debe quedar registrada la situación en el RAS.
5	Que los picos cromatográficos para el analito sean integrados automáticamente, según los parámetros de integración del método, salvo situaciones justificadas.	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 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 Cannabinoides de entre 10 y 100 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)



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 17 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

$b_x$  = Intercepto de la curva de calibración para el analito

$m_x$  = Pendiente de la curva de calibración para el analito

**9.4** Para obtener la concentración aproximada en las muestras de vísceras se utiliza la curva preparada con los controles en sangre.

## **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.

**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:**

**11.1** Los tubos con muestras deben transportarse dentro del laboratorio en las gradillas destinadas para este uso.

**11.2** 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.

**11.3** No abra ningún recipiente con disolventes volátiles fuera de la capilla de extracción de gases.

**11.4** Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.

**11.5** 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.

**11.6** Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.

**11.7** Si ocurre algún derrame importante de disolventes o ácido en la ropa o la piel utilice la ducha que se encuentra en el laboratorio.

**11.8** Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lávese las manos y deje la gabacha en la entrada de este.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 18 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

## 12 Simbología:

aprox:	aproximadamente.
BSTFA-TMCS:	bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida con trimetilclorosilano al 1%.
CRM:	material de referencia certificado.
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.
MS:	espectrometría de masas.
m/z:	relación masa/carga de los iones.
O.I.J.:	Organismo de Investigación Judicial.
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.
SADCF:	Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses.
SCD:	Solicitud Cambio Documental.
SGC:	Sistema de Gestión de Calidad.
SIM:	Monitoreo de Ion Selectivo.
SPE:	extracción en fase sólida.
TR:	Tiempo de retención.
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 hígado, etc.).

Blanco de corrida: consiste en la inyección de disolvente en un sistema cromatográfico para

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 19 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

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 por ejemplo blanco enriquecido de sangre.

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.

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.

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 (Cannabinoides)
4	Condiciones del método de Cannabinoides por GC/MS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 20 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>	

## 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 trihidratado 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.

#### **Ácido acético 1M:**

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 1M:**

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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 21 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**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 µg/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.

**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 fórmula:

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

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 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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 22 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>	<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>	

**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.

**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 µg/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 µg/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 01	PAGINA: 23 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**Anexo 2**

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

ANALITO	ESTÁNDAR INTERNO	TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos)	IÓN CUANTIFICADOR	IONES CALIFICADORES	INTENSIDAD RELATIVA (%)
carboxy-delta-9-THC	carboxy-delta-9-THC-D3		371,3	372,3 473,3 474,3	31 40 15
hidroxy-delta-9-THC	carboxy-delta-9-THC-D3		371,3	459,3 372,3	3 31
delta-9-THC	carboxy-delta-9-THC-D3		371,3	386,3 315,2 330,2	76 63 33

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 24 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**Anexo 3**

**Cuadro 2. Resumen de los resultados de la validación de las drogas de abuso (Cannabinoides)**

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	Límite administrativo 10 ng/mL en sangre: hidroxy-delta-9-THC, carboxy-delta-9-THC y delta-9-THC. Límite administrativo 50 ng/mg en vísceras: carboxy-delta-9-THC.
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.

COPIA NO CONTROLADA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 25 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**Anexo 4**

**Condiciones del método de Cannabinoides por GC/MS**

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS

-----  
D:\GC-MS 5977A\Method\Cannabis SIM 13nov\_23.M  
Mon Jan 29 15:50:40 2024  
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  
GC Summary  
Run Time 10.083 min  
Post Run Time 1 min

**Oven**  
Temperature  
Setpoint On  
(Initial) 120 °C  
Hold Time 0.5 min  
Post Run 325 °C  
Program  
#1 Rate 30 °C/min  
#1 Value 280 °C  
#1 Hold Time 2 min  
#2 Rate 20 °C/min  
#2 Value 325 °C  
#2 Hold Time 0 min

Equilibration Time 0.5 min  
Max Temperature 325 °C  
Maximum Temperature Override Disabled  
Slow Fan Disabled  
Front SS Inlet He  
Mode Pulsed Splitless  
Heater On 240 °C  
Pressure On 16.654 psi  
Total Flow On 54.8 mL/min  
Septum Purge Flow On 3 mL/min  
Gas Saver Off

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES  
EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS****P-DCF-ECT-TOX-45**

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  
(Initial) 280 °C  
Post Run 0 °C

**Column**

Column #1  
Flow  
Setpoint On  
(Initial) 1.8 mL/min  
Post Run -1.3784 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 Locked  
In Front SS Inlet He  
Out Aux EPC 3  
(Initial) 120 °C  
Pressure 16.654 psi  
Flow 1.8 mL/min  
Average Velocity 46.609 cm/sec  
Holdup Time 0.53637 min

**Column #2**

Flow  
Setpoint On  
(Initial) 3 mL/min  
Post Run 5.1656 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 3 He  
Out MSD  
(Initial) 120 °C  
Pressure 3.8901 psi  
Flow 3 mL/min  
Average Velocity 442.51 cm/sec  
Holdup Time 0.0024482 min  
Column Outlet Pressure 0 psi

Aux EPC 1,2,3  
Aux EPC 1 He  
Pressure  
Setpoint Off  
(Initial) 10 psi

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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 27 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

Post Run 0 psi

\*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*

Aux EPC 2 He

Pressure

Setpoint Off

(Initial) 1.4765 psi

Post Run 0 psi

\*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*

Aux EPC 3 He

\*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*

Aux EPC 3 He Supplies Column 2

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 : 11.08 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

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 28 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

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

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 : 3.889  
 IONFOCUS : 89.822  
 ENTRANCE\_LENS : 12.582  
 EMVOLTS : 1708.295  
 Actual EMV : 1778.4  
 GAIN FACTOR : 0.89  
 AMUGAIN : 1262.000  
 AMUOFFSET : 123.250  
 FILAMENT : 1.000  
 DCPOLARITY : 1.000  
 ENTLNENSOFFS : 14.768  
 ION BODY: 5.001  
 EXTLENS: 0.503  
 MASSGAIN : -612.000  
 MASSOFFSET : -35.000  
 END OF TUNE PARAMETERS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 29 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

**Single Quadrupole Acquisition Method - MS Parameters Report**

Method file D:\GC-MS 5977A\Method\Cannabis SIM 13nov\_23.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) 5.00  
 Trace Ion Detection True  
 Gain Factor 15  
 EM Saver True  
 EM Saver Limit 100000000  
 Scan Time Segments  

Time	Start Mass	End Mass	Threshold	Scan Speed
5.00	40	500	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 delta-9-THC

Start Time 5.00

Resolution High

Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
315.2	100	NO	
371.3	100	YES	
386.3	100	NO	
330.2	100	NO	

SIM Time Segment 2

Group Name 2 Hidroxy-delta-9-THC

Start Time 6.10

Resolution High

Detector EMV Override

Ion mass-to-charge	Dwell time (ms)	Plot This Ion?	Label
371.3	100	YES	
372.3	100	NO	

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 30 de 30
<b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOIDES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR SPE-GC/MS</b>		<b>P-DCF-ECT-TOX-45</b>

459.3

100

NO

SIM Time Segment 3

Group Name carboxy-delta-9THC-COOH D3

Start Time 6.75

Resolution High

Detector EMV Override

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

COPIA NO CONTROLADA